

Genetische und physikalische Limitierung des *Bs3*

Resistenzgen-Locus in *Capsicum annuum*



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther Universität Halle Wittenberg

von

Tina Jordan

geb. am 25.09.1973 in Ebingen

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. U. Bonas, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. T. Debener, Universität Hannover

Halle (Saale), 25.02.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008237

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008237>]

1 Einleitung	1
1.1 Abwehrmechanismen von Pflanzen.....	1
1.2 Struktur und Funktion pflanzlicher Resistenzproteine.....	2
1.3 Isolierung von Genen aus komplexen Genomen.....	5
1.3.1 Kartengestützte Isolierung von Genen.....	6
1.4 Paprika: eine wichtige Nutzpflanze aus der Neuen Welt.....	8
1.5 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> : der Auslöser der bakteriellen Fleckenkrankheit in Paprika und Tomate.....	9
1.5.1 Resistenzreaktionen gegen <i>Xcv</i> in Paprika.....	11
1.5.2 Die AvrBs3 Protein-Familie.....	11
1.5.3 Gibt es funktionale Allele des Paprika <i>Bs3</i> Gens?.....	12
1.6 Lokalisierung des <i>Bs3</i> Resistenzgens in Paprika.....	13
1.7 Ziele dieser Arbeit.....	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Chemikalien, Enzyme, Gebrauchswaren und Geräte.....	16
2.2 Häufig verwendete Stammlösungen.....	16
2.3 Nährmedien.....	17
2.4 Bakterienstämme.....	18
2.5 Verwendete Vektoren.....	19
2.6 Pflanzenmaterial.....	19
2.7 Inokulationsexperimente und F ₃ -Familientests.....	20
2.8 Isolierung von Nukleinsäuren.....	21
2.8.1 Isolierung genomischer Pflanzen-DNA (Minipräparation).....	21
2.8.2 Isolierung hochmolekularer pflanzlicher DNA (Maxipräparation).....	22
2.8.3 Extraktion von pflanzlichen Zellkernen.....	23
2.8.4 Präparation von Plasmid-DNA aus kleinen Kulturen.....	23
2.8.5 Isolierung von hochmolekularer Plasmid (BAC) DNA.....	24
2.8.6 BAC-DNA Präparation ohne Säule.....	24
2.8.7 Isolierung von BAC-DNA für die Herstellung der "Pool-DNA" der BAC-Bibliothek.....	25
2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	26
2.9.1 Konzentrationsbestimmung am Photometer.....	26
2.9.2 Konzentrationsbestimmung mittels Agarose-Gels.....	26
2.10 DNA-Amplifikation mittels PCR.....	26
2.10.1 Standardbedingungen der PCR.....	27
2.11 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	27
2.11.1 Konventionelle Agarose-Gelelektrophorese.....	27
2.11.2 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE).....	27
2.11.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) zur Auftrennung der AFLP-Fragmente.....	28
2.12 Elution von DNA aus Agarose-Gelen.....	29
2.12.1 Elektroelution.....	29
2.12.2 Aufreinigung von PCR Produkten.....	30
2.13 Klonierung von PCR-Produkten und genomischen DNA-Fragmenten.....	30
2.13.1 Ligation von Amplifikationsprodukten in T-Überhangvektoren.....	30
2.13.2 Ligation von genomischen DNA-Fragmenten.....	30
2.13.3 Dephosphorelierung von Vektoren.....	31
2.14 Southern-Analysen.....	31
2.14.1 Kapillartransfer von DNA-Fragmenten.....	31
2.14.2 Elektrotransfer von DNA-Molekülen.....	32

2.14.3 Nicht-radioaktive Markierung von DNA-Sonden mittels PCR	32
2.14.4 Nicht-radioaktive Markierung von Sonden nach der "random primed-Methode"	32
2.15 AFLP-Analyse.....	34
2.15.1 Restriktion der DNA und Ligation der Adaptoren.....	34
2.15.2 Präamplifikation von AFLP-Fragmenten.....	35
2.15.3 5'-Markierung der verwendeten <i>Sac</i> -Oligonukleotide.....	36
2.15.4 Selektive Amplifikation der Präamplifikationen unter Verwendung der radioaktiv-markierten Oligonukleotide	36
2.15.5 Reamplifikation der AFLP-Fragmente	39
2.15.6 "Reverser AFLP"	39
2.16 Erstellung einer BAC-Bibliothek der resistenten Linie <i>C. annuum</i> ECW-30R.....	39
2.16.1 Partielle Restriktion der genomischen DNA.....	39
2.16.2 Ligation der DNA in BAC-Vektoren.....	40
2.16.3 Transformation in elektrokompente <i>E. coli</i> Zellen	40
2.16.4 Organisation und Sichtung der BAC-Bibliothek	41
2.17 Isolierung von BAC-Endfragmenten	41
2.17.1 Amplifikation von BAC-Endfragmenten mittels spezifischer PCR	42
2.17.2 Isolierung von BAC-Enden durch ein abgewandeltes "GenomeWalker"-Protokoll.....	42
2.18 Restriktionsanalyse der BAC-Klone	46
2.19 Subklonierung von BAC 128	46
2.20 DNA-Sequenzanalyse	46
2.21 Berechnung der genetischen Abstände	47
3 Ergebnisse	48
3.1 Markeranreicherung am <i>Bs3</i> Locus	48
3.1.1 Analyse der verwendeten Pflanzen	49
3.1.2 Suche nach neuen AFLP-Markern	51
3.1.3 Weitere Analyse der polymorphen AFLP-Fragmente	52
3.1.4 Konvertierung der AFLP-Marker in CAPS-Marker	55
3.1.4.1 Klonierung der AFLP-Fragmente	55
3.1.4.2 Identifizierung der korrekten Marker Sequenz	56
3.1.4.3 Etablierung von CAPS-Markern.....	57
3.2 Vergrößerung der Kartierungspopulation	59
3.2.1 Gibt es Mutanten am <i>Bs3</i> Locus?.....	60
3.2.2 Gibt es ein <i>Bs16</i> in PI 197409 <i>C. frutescens</i> ?	61
3.3 Erstellung einer genomischen BAC-Bibliothek der resistenten Linie ECW-30R	63
3.3.1 Isolierung hochmolekularer DNA.....	63
3.3.2 Partielle Restriktion und Größenselektion der DNA-Fragmente	64
3.3.3 Ligation und durchschnittliche Insertgrößen der BAC-Klone	65
3.3.4 Organisation der BAC-Bibliothek.....	66
3.4 Identifizierung von BAC-Klonen in der <i>Bs3</i> Region.....	67
3.4.1 Überprüfung von BAC-Klonen, die mittels PCR isoliert wurden	68
3.4.2 Isolierung von BAC-Endfragmenten	69
3.4.3 Bestimmung der Insertgrößen der BAC-Klone.....	70
3.4.4 Überlappungsanalysen der isolierten BAC-Klone	71
3.4.5 Genetische Kartierung ausgewählter BAC-Endfragmente	75
3.4.6 Ein BAC-Contig am <i>Bs3</i> Locus	77
3.5 Sequenzierung des <i>Bs3</i> Locus	79

4 Diskussion	81
4.1 AFLP-basierte Markerverdichtung am Paprika <i>Bs3</i> Locus	81
4.1.1 AFLP: die Methode der Wahl?	81
4.1.2 Konvertierung von AFLP-Markern.....	82
4.1.3 Anwendung der "bulked segregant-Analyse"	85
4.2 Der Paprika <i>Bs3</i> Locus ist ein lokaler Rekombinations "hot spot".....	86
4.3 Meiotische Instabilität am <i>Bs3</i> Locus	89
4.3.1 Funktionalität des <i>Bs3</i> Locus in den "mutierten" Pflanzen.....	90
4.3.2 Evolutionäre Aspekte der meiotischen Instabilität	91
4.5 Ein Kandidatengen für <i>Bs3</i>	92
4.5.1 Kodieren <i>Bs4</i> , <i>xa5</i> und <i>Bs3</i> für strukturhomologe Proteine?.....	92
4.5.2 Auswertung der Sequenzdaten	93
4.6 Bedeutung des <i>Bs3</i> Gens für die Resistenzzüchtung	95
4.7 Ausblick auf weiterführende Arbeiten	96
5 Zusammenfassung.....	98
6 Literaturverzeichnis.....	100
7 Anhang	110

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin-Nukleotid
AAD	acidic activation domain (Transkriptionsaktivierungsdomäne)
Abb.	Abbildung
AFLP	amplified fragment length polymorphism
AR	ankyrin repeat
AS	Aminosäure
Avr	Avirulenz
BAC	bacterial artificial chromosome
BC	back cross
bp	Basenpaare
BSA	bulked segregant analysis
bspw.	beispielsweise
C	Cytosin-Nukleotid
CAPS	cleaved amplified polymorphic sequence
cDNA	complementary DNA
μCi	Mikrocurie
cM	centi Morgan (1 cM = Rekombinationsfrequenz von 1%)
cv	Kultivar
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dest.	destilliert
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et al.	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
F ₁ , F ₂ , F ₃	1., 2., 3. Filialgeneration
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G	Guanin-Nukleotid
h	Stunde
iPCR	inverse PCR
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
lt.	laut
M	Molar
mA	Milliamper
Mbp	Megabasenpaare
mM/ μM	Millimolar/Mikromolar
NLS	nuclear localisation signal (Kernlokalisierungssignal)
O.D.	Optische Dichte
ORF	open reading frame
P	Parentalgeneration
³³ P	radioaktives Phosphorisotop

Pa	Pascal
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFGE	pulsed field gel electrophoresis
PI	plant introduction line
pv.	Pathovar
R-	Resistenz-
rcf	relative centrifuge force
RE	Rekombinationsereignis
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannt
SSC	Standard Sodium Citrat
ssp.	Subspecies
T	Thymnin-Nukleotid
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq.	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	Unit = Enzymeinheit
ü. N.	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
V/cm	Volt pro Zentimeter
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
W	Watt
ws	watersoaking
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Chloro-4-bromo-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
Xcv	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
YAC	yeast artificial chromosome
Y2H	yeast two hybrid
z. B.	zum Beispiel

Internet-Adressen:

NCBI-Homepage: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

TIGR-Datenbank: <http://www.tigr.org>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Darstellung der vier R-Protein-Hauptklassen.	3
Abbildung 1.2: Krankheitssymptome der bakteriellen Fleckenkrankheit.....	10
Abbildung 1.3: Gen-für-Gen basierte Erkennung von AvrBs3 und AvrBs4.....	13
Abbildung 1.4: Genetische Karte der <i>Bs3</i> Region zu Beginn dieser Arbeit.....	14
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Kartierungspopulation.....	19
Abbildung 2.2: Laborphänotypen einer <i>Xcv</i> -Inokulation.....	21
Abbildung 3.1: Graphische Genotypen der AFLP-Individuen.	49
Abbildung 3.2: Ausschnitte aus Autoradiogrammen der AFLP-Marker 1427 und 1834.	52
Abbildung 3.3: Autoradiogramm der Einzelpflanzen-Analyse des Markers 1834.....	53
Abbildung 3.4: Autoradiogramme ausgewählter Rekombinanten zur Anordnung des Markers 1834.	54
Abbildung 3.5: Genetische Anordnung der neuen AFLP-Marker.....	55
Abbildung 3.6: Identifizierung der Sequenz des AFLP-Markers 1827 mittels "reversen AFLPs".....	57
Abbildung 3.7: Partielle <i>HindIII</i> -Restriktion genomischer ECW-30R DNA.	64
Abbildung 3.8: Verteilung der Insertgrößen der <i>HindIII</i> -Klone der BAC-Bibliothek.	65
Abbildung 3.9: Schema der Organisation der BAC-Bibliothek zur Analyse mittels PCR66	
Abbildung 3.10: Hybridisierungs-basierte Überprüfung der BAC-Klone 128, 30, 31, 32 und 33.....	69
Abbildung 3.11: Größenbestimmung ausgewählter BAC-Inserts mittels PFGE.....	70
Abbildung 3.12: Fingerprintanalysen einiger ausgewählter BAC-Klone.	72
Abbildung 3.13: Integrierte genetische und physikalische Karte des <i>Bs3</i> Resistenzlocus	78
Abbildung 4.1: Darstellung der Rekombinationsfrequenzen am <i>Bs3</i> Locus.	87
Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Kandidatengens.....	94
Abbildung 7.1 Vektorkarte von pIndigoBAC-5.....	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme	18
Tabelle 2.2: Liste der 16 verschiedenen Kombinationen der Präamplifikation +1/+1	36
Tabelle 2.3: Verwendete AFLP-Oligonukleotide	37
Tabelle 2.4: Oligonukleotide zur spezifischen Isolierung von BAC-Endfragmenten.	43
Tabelle 3.1: Ausgewählte Paprika Pflanzen für die AFLP-Analyse	50
Tabelle 3.2: Anzahl und Größe der isolierten AFLP-Fragmente	55
Tabelle 3.3: Die neuen CAPS-Marker	58
Tabelle 3.4: Hochauflösende Kartierung der genetischen Marker in der <i>Bs3</i> Region.....	60
Tabelle 3.5: Resistenzspezifitäten der 14 "widersprüchlichen" F ₃ -Familien	61
Tabelle 3.6: Test auf <i>Bs16</i> -spezifische HR ausgewählter F ₂ -Pflanzen der Kartierungs- population.....	62
Tabelle 3.7: Insertgrößen der isolierten BAC-Klone	71
Tabelle 3.8 Ergebnisse der PCR- und Hybridisierungsexperimente zur Erstellung der BAC-Contigs	
Tabelle 3.9: Von BAC-Enden abgeleitete CAPS-Marker.....	75
Tabelle 3.10: Rekombinante Pflanzen im Marker-Intervall Y152-1/B14T7	76
Tabelle 7.1: Rekombinante Pflanzen im Marker-Intervall Y65-2/Y110-2	111
Tabelle 7.2: Die 58 bestätigten AFLP-Marker	115
Tabelle 7.3: Pflanzen, die für die Anordnung der AFLP-Marker genutzt wurden	116

1 Einleitung

Pflanzen sind im Laufe ihrer Entwicklung einer Vielzahl abiotischer und biotischer Umweltfaktoren ausgesetzt. Dabei reicht das Spektrum der für Pflanzen schädlichen Umwelteinflüsse von Wasser- und Nährstoffmangel über diverse mikrobielle Krankheitserreger, wie Bakterien, Pilze und Viren, bis hin zu Nematoden, Insekten und anderen tierischen Schädlingen. Sie können durch die unterschiedlichsten Eingriffe in den pflanzlichen Metabolismus oder direkte Fraßschäden die Entwicklung der Pflanze beeinträchtigen. In Wildpopulationen kommt es selten zu einem bestandsvernichtenden Befall, da durch ihre heterogene Struktur die massenhafte Ausbreitung von Pathogenen verhindert wird. Im Vergleich dazu sind Kulturpflanzen weitaus stärker gefährdet. Da sie meist als Monokultur angepflanzt werden, leistet ihre genetische Uniformität der epidemischen Vermehrung von Krankheitserregern Vorschub. Folglich avancierte die Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten zu einem Schwerpunkt sowohl in der klassischen Pflanzenzüchtung als auch in der molekularen Analyse von Pflanzeigenschaften.

1.1 Abwehrmechanismen von Pflanzen

Da Pflanzen kein zirkulierendes Immunsystem besitzen, muß jede Zelle einer Pflanze fähig sein, ein potentiell Pathogen autark zu erkennen und zu bekämpfen. Dabei werden verschiedene Stufen der Abwehr unterschieden (NÜRNBERGER et al. 2004).

Der Begriff **Nicht-Wirtsresistenz** beschreibt die Tatsache, daß die Mehrheit der Pflanzen resistent gegen die meisten mikrobiellen Angreifer ist und diese Resistenz auch dauerhaft aufrecht erhalten bleibt. Bei der nicht-induzierten Form sorgen präformierte Barrieren wie Wachsschichten, verstärkte Zellwände, antimikrobielle Enzyme und die Einlagerung verschiedener Sekundärmetabolite dafür, daß potentielle Pathogene die Pflanzen nicht besiedeln können (THORDAL-CHRISTENSEN 2003). Zudem können Krankheitserreger durch sog. generelle Elicitoren, auch als PAMPs (pathogen associated molecular pattern) bezeichnet, erkannt werden. Diese, wie bspw. Flagellin (GÓMEZ-GÓMEZ and BOLLER 2000), Lipopolysaccharide (LPS) (NEWMAN et al. 2002) oder Harpine (BAKER et al.

1993) sind nicht spezifisch für bestimmte Pathogene, werden jedoch von vielen Pflanzen erkannt und führen zur Induktion einer Abwehrreaktion.

Die **rassenspezifische Resistenz** ist eine sekundäre Anpassungserscheinung an jene Pathogene, die die Barrieren der Nicht-Wirtsresistenz erfolgreich überwunden haben. Sie wird als ein Mechanismus beschrieben, bei dem diejenigen Pflanzen, die ein bestimmtes Resistenzgen (*R*-Gen) besitzen, ein Molekül, welches vom Pathogen produziert wird (Avirulenz (*Avr*) Protein), erkennen. Im Gegensatz zur unspezifischen Nicht-Wirtsresistenz ist die Wirkung der rassenspezifischen Resistenz auf wenige Isolate oder Rassen ansonsten virulenter Pathogene beschränkt (NIMCHUK et al. 2001). Dieses Phänomen wurde von H. Flor als Gen-für-Gen-Hypothese beschrieben (FLOR 1956). Zu einer inkompatiblen Interaktion (Resistenz) zwischen Wirtspflanze und Pathogen kommt es nur dann, wenn sowohl das *R*-Gen in der Pflanze als auch das entsprechende *avr*-Gen im Pathogen exprimiert werden. Das Fehlen einer dieser Komponenten bedingt eine kompatible Interaktion (Krankheit). Die Aktivierung der pflanzlichen Abwehrantwort durch das *R*-Genprodukt ist meist begleitet von einem programmierten, schnellen Zelltod im Bereich des Infektionsherdes, der **hypersensitive Reaktion (HR)** genannt wird. Mit dem Absterben der Zellen wird dem Pathogen die Nährstoffzufuhr abgeschnitten und es an einer weiteren Verbreitung im Wirt gehindert.

In manchen Fällen kann die lokal-induzierte Abwehrantwort eine langandauernde, systemische Antwort auslösen, die dazu führt, daß bei nachfolgenden Infektionen die Pflanze gegen ein breites Spektrum von Pathogenen resistent ist (GLAZEBROOK 2001). Diese induzierte Resistenz wird als **SAR** (systemic acquired resistance) bezeichnet.

1.2 Struktur und Funktion pflanzlicher Resistenzproteine

Die Gen-für-Gen Hypothese wurde durch die Isolierung von korrespondierenden *R*- und *avr*-Genen molekular bestätigt. Um deren Interaktion, die zur Auslösung einer Resistenzreaktion führen kann, zu erklären, wird für pflanzliche Resistenzproteine eine duale Rolle als potentieller Rezeptor und Signalüberträger postuliert. Bis heute wurden mehr als 40 Resistenzgene aus über zehn verschiedenen Pflanzenarten isoliert (Übersicht s. MARTIN et al. 2003). Der Vergleich dieser Proteine ergab überraschenderweise ein relativ geringes Repertoire unterschiedlicher Struktur motive, aus denen sich die verschiedenen Resistenzgene zusammensetzen (HAMMOND-KOSACK and PARKER 2003).

Die Mehrheit der R-Proteine kann, basierend auf der Kombination dieser Strukturmodule, in vier Hauptklassen (s. Abb. 1.1) unterteilt werden (MARTIN et al. 2003).

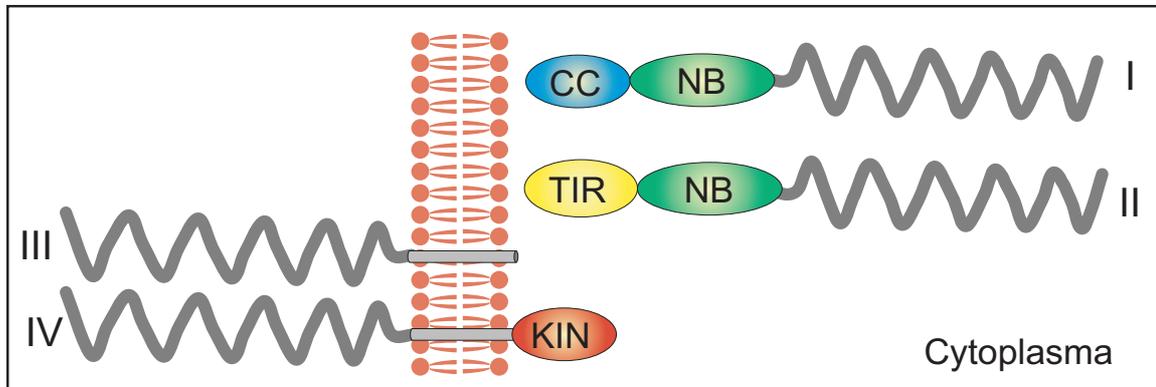


Abbildung 1.1: Darstellung der vier R-Protein-Hauptklassen. (verändert nach MCDOWELL and WOFFENDEN 2003)

Die LRR Domänen sind in grau dargestellt. Sie sind in cytoplasmatischen Proteinen (Klasse I und II) enthalten oder, über eine Transmembran-Domäne (TM) verankert, extrazellulär lokalisiert (Klasse III und IV). Die NB-LRR Proteine unterscheiden sich am N-Terminus: sie enthalten ein CC Motiv (Klasse I) oder eine TIR Domäne (Klasse II). Klasse IV enthält zusätzlich zu LRR und TM eine Kinase-Domäne.

Die größte Gruppe umfaßt Proteine, die eine zentrale NB- und LRR-Domäne enthalten. Je nachdem, ob N-terminal CC- oder TIR-Motive zu finden sind, werden sie in CC-NB-LRR und TIR-NB-LRR Proteine unterteilt (Klasse I und II) (TAI et al. 1999a, LEISTER and KATAGIRI 2000, SCHORNACK et al. 2004). Eine Sonderform der Klasse II Proteine stellt das RRS1 Protein aus *Arabidopsis* dar (DESLANDES et al. 2002). Es handelt sich um ein TIR-NB-LRR Protein, das C-terminal ein putatives Kernlokalisierungssignal und ein WRKY-Motiv enthält. Die Cf-Proteine aus Tomate bilden die dritte Gruppe (Klasse III). Sie bestehen aus einer extrazellulären LRR-Domäne, die über eine Transmembran-Domäne (TM) in der Zellwand verankert ist (THOMAS et al. 2000). Klasse IV Proteine haben zusätzlich zur TM und zum extrazellulären LRR eine cytoplasmatische Kinase-Domäne (WANG et al. 2004). Die Struktur der einzelnen Domänen und ihre jeweilige putative Funktion soll im folgenden kurz beschrieben werden.

Die **LRR** (leucin-rich repeat) Domäne besteht aus kurzen Aminosäure (AS)-Wiederholungen mit Leucinresten an jeder zweiten oder dritten Stelle, die eine flexible β -Faltblattstruktur ausbilden. Diese Domäne ist aus den unterschiedlichsten Proteinen bekannt und soll bei der Interaktion von Proteinen eine Rolle spielen (KOBE and KAJAVA 2001). So konnte für RPS2 gezeigt werden, daß die LRR-Region für die Interaktion mit anderen Proteinen in der Pflanze notwendig ist (BANERJEE et al. 2001). Durch zahlreiche

Mutationsstudien und "domain-swapping-Experimente" (WULFF et al. 2001, BANERJEE et al. 2001) wurde verdeutlicht, daß die LRRs zur Erkennungsspezifität der R-Proteine einen wichtigen Beitrag leisten, wenngleich auch andere Faktoren eine Rolle spielen (ELLIS et al. 2000).

Die am besten konservierten Motive der **NB** (nucleotide binding site) sind die Kinasen (P-loop) 1a, 2, 3a und die GLPL-Sequenz, da sie notwendig für Bindung und Hydrolyse von NTPs sind (MEYERS et al. 1999). Bei der Auslösung der HR in der pflanzlichen Resistenzantwort scheint die NB eine wichtige Rolle zu spielen. So führten Mutationen im zentralen Bereich z. B. zur Auslösung einer konstitutiven HR (BENDAHDANE et al. 2002). Ein Zusammenhang zwischen der Bindung von Nukleotiden bzw. deren Hydrolyse und der Auslösung der HR konnte für das R-Protein I2 aus Tomate festgestellt werden (TAMELING et al. 2002).

Das **CC** (coiled-coiled) Motiv setzt sich aus Wiederholungen von sieben AS mit hydrophoben Resten zusammen, die zwei oder mehr α -Helices formen können, welche sich zu einem "supercoil" zusammenlegen. Eine Variante ist der LZ (leucine zipper). Es ist bekannt, daß diese Domäne in Proteininteraktionen sowie deren Oligomerisierung und der damit assoziierten Bindung von Nukleinsäuren involviert ist. Da R-Proteine, die ein CC Motiv aufweisen, im Gegensatz zu solchen mit einer TIR Domäne (s. unten) Abhängigkeit von anderen Signalwegskomponenten zeigen, könnte das CC Motiv an der Signaltransduktion beteiligt sein (TORNERO et al. 2002).

Die **TIR** Domäne pflanzlicher *R*-Gene weist Homologie zum Toll-Protein aus *Drosophila* und dem Interleukin1-Rezeptor des Menschen auf. Beide Proteine sind in die Signalübermittlung während der Pathogenabwehr involviert (TAKKEN and JOOSTEN 2000). Die Rolle der TIR Domäne in der pflanzlichen Abwehr ist noch nicht geklärt. Mutationen in dieser Region können jedoch den Funktionsverlust von R-Proteinen bedingen (DINESH-KUMAR et al. 2000).

Einige R-Proteine können keiner der vier oben genannten Klassen zugeordnet werden. Das *Pto*-Gen aus Tomate kodiert bspw. für eine Serin-Threonin Kinase (MARTIN et al. 1993). *Hm1*, das Resistenz gegen *Cochliobolus carbonum* in Mais verleiht, ist eine Toxinreduktase (ZHANG et al. 2002). Das Genprodukt von *RTM2* aus *Arabidopsis* zeigt Homologie zu Hitzeschockproteinen (WHITMAN et al. 2000). Die Ve-Proteine aus Tomate sind putative Zelloberflächen-Glycoproteine (KAWCHUK et al. 2001). Ein *R*-Gen

aus Paprika (*xa5*) kodiert für die γ -Untereinheit des Transkriptionsfaktors IIA (IYER and MCCOUCH 2004).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die duale Funktionalität der R-Proteine durch die bislang isolierten und charakterisierten Struktur motive, die sowohl als Rezeptor als auch als Signalübermittler fungieren können, bestätigt wurde. Ein einfaches Modell, die Auslösung einer Immunantwort zu erklären, ist das **Rezeptor-Liganden** Modell (ELLINGBOE 1981): Das Avr-Protein wird durch direkte Bindung vom R-Protein erkannt und dadurch die Abwehr der Pflanze aktiviert. Gegen dieses Modell spricht, daß bis heute nur zwei direkte Interaktionen zwischen R-Protein und korrespondierendem Avr-Protein nachgewiesen werden konnten (ECKARDT 2004). Generell scheint die Frage nach der Aktivierung von Immunantworten in Pflanzen komplexer zu sein. Einige R-Proteine (Pto, Cf2, Mi1, RPS5 und RPM1) benötigen zusätzliche pflanzliche Proteine, um ihre Funktion erfüllen zu können (MARTIN et al. 2003). Diese Befunde führten zu einer weiteren Hypothese: dem "**guard model**". Hierbei wird angenommen, daß das R-Protein als eine Art "Wächter" fungiert, der ein anderes pflanzliches Protein schützt. Dieses könnte Angriffspunkt von pathogen-assoziierten Effektoren sein. Der Angriff auf dieses Protein (z. B. durch Interaktion) wird jedoch vom R-Protein erkannt und daraufhin eine Resistenzantwort ausgelöst (DANGL and JONES 2001).

1.3 Isolierung von Genen aus komplexen Genomen

Mit Hilfe der klassischen Genetik ist es relativ einfach, die Vererbung eines bestimmten Merkmals zu verfolgen. Die konventionelle Pflanzenzüchtung macht sich diesen Umstand zunutze, um interessante, phänotypisch-charakterisierte Merkmale, wie bspw. Ertrag, Resistenzen gegen Krankheitserreger oder Fruchtgröße und -farbe, in agronomisch relevante Pflanzenarten und Kultivare einzukreuzen. Dabei bereiten einerseits Artbarrieren Probleme, andererseits ist nicht prognostizierbar, welche anderen, durchaus auch unerwünschten Eigenschaften die resultierenden Pflanzen haben werden.

Die, diesen Merkmalen zugrundeliegende Biologie zu verstehen, ist weitaus schwieriger, da dies detaillierte Kenntnisse über die entsprechenden Gene voraussetzt. Informationen über Gene können mit Hilfe der positionellen Klonierung erlangt werden. Dazu wird die Position des gesuchten Genes im Genom lokalisiert ("vorwärts Genetik"). Eine Methode

ist die Insertionsmutagenese mittels Transposons ("transposon tagging"). Dabei wird das gesuchte Gen durch Integration einer bekannten DNA-Sequenz im codierenden Bereich inaktiviert und zugleich markiert. Das Tabak *N* Gen (WHITHAM et al. 1996) und das *Cf-9* Gen aus Tomate (JONES et al. 1994) konnten mit dieser Methode isoliert werden. Die Mehrzahl der Resistenzgene wurde jedoch über eine **kartengestützte Strategie** ("map based cloning") isoliert. Im nächsten Abschnitt soll näher auf diese Methode eingegangen werden, da sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit Anwendung fand.

1.3.1 Kartengestützte Isolierung von Genen

Grundlage jeder kartengestützten Isolierung von Genen ist die Einteilung der Individuen einer Population in unterschiedliche Phänotypen: Es werden z. B. resistente von suszeptiblen Pflanzen diskriminiert. Durch Kreuzung von Pflanzen mit diesen unterschiedlichen Eigenschaften wird eine Kartierungspopulation erstellt, die für das gewünschte Gen (Resistenz) aufspaltet.

Der nächste Schritt im Rahmen einer Genisolierung ist die Identifizierung von DNA-Polymorphismen (molekulare Marker), die in der Kartierungspopulation genetische Kopplung mit dem Zielgen (Resistenz) aufweisen. Der genetische Abstand wird anhand der Häufigkeit von Rekombinationsereignissen zwischen dem untersuchten Merkmal und den Markern errechnet, wobei eine 1%-ige Rekombinationsfrequenz einem cM (centi Morgan) entspricht. Entscheidend für den Erfolg einer kartengestützten Genisolierung ist es, möglichst schnell, möglichst viele DNA-Marker zu generieren, um den Ziellocus eingrenzen zu können. Die unten aufgeführte Liste gibt einen Überblick über die am häufigsten verwendeten Markersysteme:

- RFLP (restriction fragment length polymorphism)
- RAPD (random amplified polymorphic DNA)
- AFLP (amplified fragment length polymorphism)
- SNP (single nucleotide polymorphism)
- SCAR (sequence characterized amplified region)
- SSCP (single-strand conformation polymorphism)
- Mikrosatelliten/SSR (simple sequence repeats)
- CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence)

Die genannten Markersysteme können in Multilocus- (AFLP, RAPD) oder Einzellocus-Marker (SCAR, CAPS, etc.) unterschieden werden. Bis auf RFLPs basieren alle

Methoden auf PCR-Techniken, durch die die DNA-Polymorphismen auf unterschiedlichste Art dargestellt werden. In dieser Arbeit wurden zur Eingrenzung des *Bs3* Resistenzlocus AFLP-Marker verwendet, folglich soll speziell auf diese Technik detaillierter eingegangen werden.

Die **AFLP-Technik** stellt eine Kombination aus RFLPs und RAPD-Markern dar (VOS et al. 1995). Wie bei der RFLP Methode wird die DNA eines Organismus mit Restriktionsenzymen geschnitten. Eingesetzt werden meist ein häufig- und ein selten-schneidendes Enzym. An die entstandenen DNA-Fragmente werden kurze, synthetische DNA-Sequenzen, sog. Linker, ligiert. Jetzt erfolgt der Einsatz der PCR, in der zu den Linkersequenzen komplementäre Oligonukleotide eingesetzt werden. Da jedoch auf diese Weise Tausende von Amplifikaten entstehen würden, werden Oligonukleotide ausgewählt, die in die unbekannte Sequenz hineinreichen. D. h. es wird an die Oligonukleotidsequenz eine willkürliche Abfolge von 2 - 3 Nukleotiden angehängt, so daß nur die DNA-Fragmente amplifiziert werden, die neben der Linkersequenz zufällig diese Nukleotidabfolge besitzen. So erfolgt also unter den vielen Fragmenten eine Selektion, die die Anzahl der Amplifikate einschränkt. Zur weiteren Reduktion der auszuwertenden Fragmente wird ein Oligonukleotid radioaktiv oder mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dadurch können später nur solche Fragmente detektiert werden, die mit diesem Oligonukleotid amplifiziert wurden (WILLMITZER and HOFFMAN 1997). Durch die Verwendung längerer Oligonukleotide und höherer "Annealing-Temperaturen" ist die Reproduzierbarkeit von AFLP-Markern gegenüber RAPDs wesentlich verbessert worden, und im Gegensatz zu RFLP-Markern entfallen die aufwendigen Hybridisierungsschritte.

Im nächsten Schritt, der Feinkartierung, wird die Markerdichte im untersuchten Bereich erhöht, um das genetische Zielintervall weiter einzugrenzen. Wie groß die Kartierungspopulation sein muß, um sehr eng gekoppelte Marker kartieren zu können, ist abhängig von der Rekombinationsfrequenz im jeweiligen Abschnitt des Genoms.

Der Eingrenzung des gesuchten Gens auf einen minimalen genetischen Bereich folgt schließlich die physikalische Limitierung mittels BAC- oder YAC-Klonen. Gegenwärtig werden hauptsächlich BACs verwendet, da sie einfacher zu handhaben und weniger anfällig dafür sind, chimäre Klone zu bilden. Für die meisten Pflanzenspezies gibt es BAC-Bibliotheken, die entweder mittels Hybridisierung oder PCR nach Klonen durchsucht werden können, die homologe Bereiche zu den kartierten DNA-Markern aufweisen (GEORGI et al. 2002, KAUFMANN et al. 2003, MOZO et al. 1998). Insert-Enden

von BAC-Klonen können auch dazu genutzt werden, neue Marker im Zielintervall zu generieren (CHEN and GMITTER 1999, KIM et al. 1997).

Als letzter Schritt muß die biologische Funktion (Komplementation) des isolierten Kandidatengens mittels Mutationsanalysen oder Transformation verifiziert werden. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation stellt dabei eine häufig angewendete Technik dar (BENDAHDANE et al. 2000, GELVIN 2003). Manche Organismen, hierzu gehört Paprika, lassen sich jedoch nur mit geringer Effizienz stabil transformieren, weshalb transiente *Agrobacterium*-vermittelte Transformation (VAN DEN AKERVEKEN et al. 1996) oder VIGS (virus induced gene silencing) (RATCLIFF et al. 2001) erfolgsversprechender sind.

1.4 Paprika : eine wichtige Nutzpflanze aus der Neuen Welt

Capsicum spp. L. gehört zur Familie der Nachtschattengewächse (Solanaceae). Mit 2500 beschriebenen Arten ist sie weltweit über ihr Ursprungsgebiet, den Neotropen Amerikas, hinaus bis in die gemäßigten Zonen verbreitet (HAWKES 1999). Aus der Familie der Solanaceae gingen viele wichtige Nutzpflanzen hervor, schon die Ureinwohner Meso-Amerikas domestizierten einige Arten. Heutzutage liefern Solanaceae nicht nur wichtige Feldfrüchte wie Kartoffeln, Tomaten, Paprikas und Auberginen, sondern auch wichtige Sekundärmetabolite für die Pharmaindustrie. Außerdem dienen sie als Gewürz-, Heil- und Zierpflanzen.

Durch die Spanier nach Europa eingeführt, wurde Paprika zuerst hauptsächlich als Gewürz- (Ersatz für Pfeffer) und Zierpflanze genutzt. Erste Klassifizierungen der verschiedenen Arten sind aus dem 16. Jahrhundert überliefert. Seit dieser Zeit wird auch der Anbau von Paprika in Europa, vor allem in Ungarn und im Mittelmeerraum, beschrieben. Ende der 90-iger Jahre des 20. Jhds. wurden weltweit über 10 Millionen MT (metrische Tonne) Paprika angebaut (FAO 1996). Diese Zahl unterstreicht die ökonomische Relevanz dieser Art und die damit verbundene, intensivierete Forschung auf dem Gebiet der Paprikazüchtung.

Für *Capsicum* wurden 25 Arten beschrieben (BARENDSE and VAN DER WEERDEN 1999), die sich durch ihren Gehalt an Capsaicinoiden auszeichnen. Diese Alkaloide verleihen den meisten Paprikafrüchten den typisch scharfen Geschmack (BOSLAND and ZEWDIE

2001). Die phänotypische Variation der Gattung *Capsicum* ist groß, angefangen bei der Fruchtfarbe von gelb bis dunkelviolett über die –größe von klein-kegelförmig zu groß und glockenförmig bis hin zum Capsaicin-Gehalt, der in den unterschiedlichen Arten beträchtlich variiert. Der gewerbliche Anbau ist hauptsächlich auf die fünf domestizierten Arten *C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. baccatum* L., *C. pubescens* Ruiz & Pav. und *C. chinense* Jacq. beschränkt. Außer bei einigen Wildspezies liegt die haploide Chromosomenzahl aller *Capsicum*-Arten bei 12. Zum DNA-Gehalt gibt es bisher nur zwei Untersuchungen. Für *C. annuum* werden 2702 – 3420 Mbp (ARUMUGANATHAN and EARLY 1991) und 3293 - 3381 Mbp angegeben, *C. frutescens* hat eine Genomgröße von 3332 Mbp (MOSCONE et al. 2003). Bezüglich der genetischen Größe des Genoms liegen voneinander abweichende Angaben vor. Es wurden diverse genetische Karten erstellt - oftmals mit relativ kleinen Kartierungspopulationen -, bis heute jedoch keine, die alle bisher verwendeten Marker einschließt. Die Zahlenwerte der durch interspezifische Kreuzungen erstellten genetischen Karten schwanken von 1245,7 bis 1832 cM (LEFEBVRE et al. 2002; LIVINGSTONE et al. 1999, KANG et al. 2001; PARAN et al. 2004). Daraus lassen sich Werte von 1,4 – 2,7 Mbp/cM für das Paprikagenom errechnen. Diese Angaben sind jedoch nur Schätzwerte, da die genaue genetische Größe des Paprikagenoms nicht bekannt ist. In dieser Arbeit wurde deshalb der Einfachheit halber ein Wert von 1,5 Mbp/cM zur Abschätzung der physikalischen Abstände angenommen.

1.5 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*: der Auslöser der bakteriellen Fleckenkrankheit in Paprika und Tomate

Das Gram-negative Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) befällt überwiegend *Capsicum* spp. und *Lycopersicon* spp., als Wirtspflanzen werden jedoch auch andere Solanaceen beschrieben. Global verbreitet, treten die größten, aus der sog. bakteriellen Fleckenkrankheit resultierenden Ernteverluste in Regionen feucht-warmen Klimas auf, da hier die infektiöns-begünstigenden Faktoren, wie starke Regenfälle, hohe Luftfeuchtigkeit und Temperaturen über 30°C in besonderer Weise gegeben sind. *Xcv* dringt über Spaltöffnungen oder kleine Wunden in den Interzellularraum der Wirtspflanzen ein, wo es sich vermehrt. Die dadurch ausgelösten Krankheitssymptome, wässrige Läsionen, die später nekrotisch werden, sind lokal begrenzt (STALL 1995). Der

Befall durch *Xcv* kann jedoch zu frühzeitigem Abwurf von Blättern und Früchten führen. Die Übertragung des Erregers auf andere Pflanzen erfolgt vorwiegend mittels Regenwassers, die Infizierung kann aber auch durch verunreinigtes Saatgut verursacht werden.

Die Pathogenität von *Xcv* hängt von der Funktionalität des Typ-III-Sekretionssystems (TTSS) ab (BÜTTNER and BONAS 2003). Über dieses System werden Effektorproteine (z. B. AvrBs3) in die Pflanzenzelle übertragen, die einerseits für eine erfolgreiche Infektion notwendig sind, durch die andererseits die Bakterien aber auch von der Pflanzenzelle erkannt werden können (Avr-Proteine, s. 1.1).

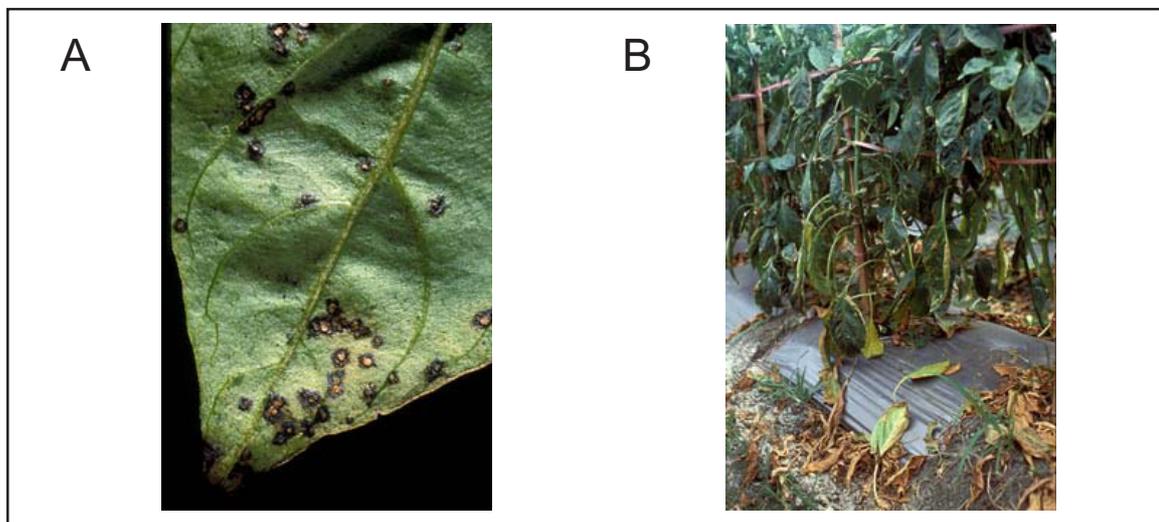


Abbildung 1.2: Krankheitssymptome der bakteriellen Fleckenkrankheit.

Photos: T. A. Kucharek, B. H. Chew und G. L. Hartman veröffentlicht in AVRDC – The World Vegetable Center. A: lokal begrenzte wässrige Läsionen, die später nekrotisch werden. B: *Xcv*-Infektion führt zum Abwurf von Blättern und Früchten.

1.5.1 Resistenzreaktionen gegen *Xcv* in Paprika

Resistenz gegen die bakterielle Fleckenkrankheit wird in Paprika als rassenspezifisch, von speziellen *avr*-Genen abhängig beschrieben (COOK and STALL 1963). In *Capsicum* spp. wurden die drei Resistenzgene *Bs1*, *Bs2* und *Bs3* identifiziert, die eine spezifische HR-vermittelte Resistenz gegenüber *Xcv*-Stämmen verleihen, die die *avr*-Gene *avrBs1*, *avrBs2* und *avrBs3* exprimieren (MINSAVAGE et al. 1990). Sequenzvergleiche ergaben, daß zwischen diesen *avr*-Genen keine Ähnlichkeiten bestehen (MINSAVAGE et al. 1990). Es gibt jedoch eine Vielzahl von Xanthomonaden, die *avrBs3*-homologe *avr*-Gene tragen (s. 1.5.2).

Die genannten Paprika *R*-Gene werden dominant-monogen vererbt. *Bs1* und *Bs3* wurden in den *C. annuum* Linien PI 271322 und PI 163192 identifiziert, während *Bs2* aus *C. chacoense* stammt (KIM and HARTMANN 1985). Sie wurden einzeln und kumulativ in das susceptible *C. annuum* Kultivar Early Calwonder (ECW) eingekreuzt. Die daraus resultierenden Linien wurden als ECW-10R, ECW-20R, ECW-30R und ECW-123 bezeichnet (MINSAVAGE et al. 1990). Das *Bs2* Gen, welches für ein NB-LRR Protein kodiert, konnte schon isoliert werden (TAI et al. 1999a; TAI et al. 1999b). *Bs2* spielt eine wichtige Rolle in der Bekämpfung der bakteriellen Fleckenkrankheit, da *AvrBs2* in vielen *Xcv*-Stämmen vorkommt und höchstwahrscheinlich Virulenzfunktion besitzt (TAI et al. 1999b). Aus anderen Pflanzenspezies sind schon Resistenzgene gegen Xanthomonaden bekannt, die *AvrBs3*-Homologe exprimieren. Das Tomaten *Bs4* Gen gehört zur TIR-NB-LRR Klasse von R-Proteinen (BALLVORA et al. 2001b), und das Reis *xa5* Gen, welches rezessiv vererbt wird, kodiert für die γ -Untereinheit des Transkriptionsfaktors IIA (TFIIA γ) (IYER and MCCOUCH 2004).

1.5.2 Die *AvrBs3* Protein-Familie

Der Namensgeber dieser Protein-Familie ist *AvrBs3* aus *Xcv* (s. Abb. 1.3). Markantestes Charakteristikum dieses Proteins ist ein 34-AS-Sequenzmotiv ("repeat") im zentralen Bereich des Polypeptids, das in 17,5 fast identischen Kopien vorkommt (BONAS et al. 1989). Im C-terminalen Bereich weist *AvrBs3* nukleäre Lokalisierungssignale (NLS) sowie eine saure transkriptionelle Aktivierungsdomäne (AAD) auf, typische Merkmale eukaryotischer Transkriptionsfaktoren (SZUREK et al. 2001). *AvrBs3* wird über das Typ-III-Sekretionssystem (TTSS) ins Cytoplasma der Pflanzenzelle transloziert. Dort kann, wie Y2H-Analysen aufdeckten, *AvrBs3* pflanzliche Transportmechanismen nutzen, um

in den Zellkern zu gelangen (SZUREK et al. 2002) und dort die Transkription der Wirtszelle zu modulieren (MAROIS et al. 2002).

Die Mitglieder der AvrBs3 Familie weisen auf Aminosäureebene 90 – 97% Identität auf (LAHAYE and BONAS 2001). Die Unterschiede betreffen hauptsächlich die Anzahl der "repeat-Einheiten" im zentralen Bereich der Proteine, die von 5,5 bis 25,5 variieren, sowie deren AS-Sequenz. Differenzen ergeben sich auch hinsichtlich ihrer Avirulenzaktivität. Funktionsstudien ergaben, daß die NLS- und ADD-Domänen essentiell für die Funktion von AvrBs3 sind (VAN DEN AKERVEKEN et al. 1996, SZUREK et al. 2002). Dies trifft hingegen nicht auf *avrBs4*ΔNLS-Derivate zu, die immer noch eine Bs4-vermittelte Resistenzreaktion auslösen können. Dieser Befund zeigt, daß die zu den AvrBs3-Homologen korrespondierenden *R*-Gene sich unterschiedlicher Perzeptionsstrategien bedienen.

Die Erkennungsspezifität der AvrBs3-Homologen wird durch die "repeat-Region" festgelegt. Deletionsstudien der "repeat-Region" von AvrBs3 zeigten, daß neben dem Verlust der Avirulenzaktivität auch neue Spezifitäten erzeugt werden können (HERBERS et al. 1992). Außerdem wurden intragenische Rekombinationsereignisse, die zu neuen Wirtsspezifitäten führen können, auch *in vivo* in Xanthomonaden beobachtet (YANG and GABRIEL 1995).

1.5.3 Gibt es funktionale Allele des Paprika *Bs3* Gens?

Wie bereits erwähnt (s. 1.5.2), wurden *avrBs3*-Derivate generiert, denen eine oder mehrere der 17,5 "repeat-Einheiten" fehlen (HERBERS et al. 1992). Zwei der vierzehn getesteten *avrBs3*-Derivate (*avrBs3*Δrep16 und *avrBs3*Δrep99) induzieren eine HR im anfälligen Paprika Kultivar ECW (*bs3*), jedoch nicht in ECW-30R (*Bs3*) (s. Abb. 1.3). Die Analyse von 332 F₂-Segreganten aus einer ECW x ECW-30R Kreuzung ergab, daß *bs3* und *Bs3* funktionale Allele oder sehr eng gekoppelte *R*-Gene darstellen. Weiterführende Analysen haben gezeigt, daß NLS-Deletionsderivate von *avrBs3*Δrep16 keine HR in ECW auslösen (G. Van den Ackerveken und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Somit sind *bs3* und *Bs3* funktional homolog, da beide *R*-Gene eine NLS-abhängige Erkennung AvrBs3-ähnlicher Proteine vermitteln. Im Rahmen dieser Arbeit wird das funktionale (dominante) ECW-*bs3* Allel zur Unterscheidung gegenüber dem resistenten Allel in ECW-30R als „*Bs16*“ bezeichnet.

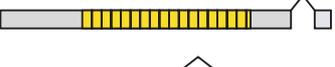
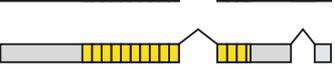
avrBs3 Derivate		Pflanzenspezies		
Bezeichnung	Struktur der Derivate	<i>C. annuum</i> ECW-30R	<i>C. annuum</i> ECW	<i>L. esculentum</i> cv MM
<i>avrBs3</i>		+ ^a	- ^a	- ^c
<i>avrBs3ΔNLS</i>		- ^b	- ^b	- ^e
<i>avrBs3Δrep16</i>		- ^a	+ ^a	
<i>avrBs3Δrep16ΔNLS</i>		- ^d	- ^d	
<i>avrBs4</i>		- ^c	- ^e	+ ^c
<i>avrBs4ΔNLS</i>		- ^c	- ^d	+ ^c

Abbildung 1.3: Gen-für-Gen basierte Erkennung von AvrBs3 und AvrBs4. +: HR, -: wässrige Läsionen ^a(HERBERS et al. 1992),^b(VAN DEN AKERVEKEN et al. 1996),^c; (BALLVORA et al. 2001a) ^dGürlebeck, Schornack, Lahaye & Bonas, unveröffentlichte Daten; ^eKay & Bonas, unveröffentlichte Daten

1.6 Lokalisierung des *Bs3* Resistenzgens in Paprika

Zur Erstellung einer Kartierungspopulation wurde das resistente *C. annuum* Kultivar ECW-30R mit dem anfälligen Elter PI 197409 (*C. frutescens*) gekreuzt. AFLP-Analysen mit den Enzymkombinationen *HindIII/MseI*, *PstI/MseI* und *EcoRI/MseI* lieferten erste mit *Bs3* gekoppelte Marker. In einer Kartierungspopulation von 790 BC (back cross) Pflanzen konnte der *Bs3* Resistenzlocus auf ein 2,1 cM großes Intervall eingegrenzt werden (s. Abb. 1.4, PIERRE et al. 2000). Zudem konnte anhand dieser Marker *Bs3* auf dem Paprika Chromosom 2 (LEFEBVRE et al. 2002) lokalisiert werden. Um über Syntenie des Paprika- und Tomatengenoms vielleicht weitere, mit *Bs3* gekoppelte Marker zu erhalten, wurden einige AFLP-Marker in Tomate getestet. Die Marker H3-4 und H6-4 zeigten Cosegregation mit den Tomatenmarkern TG33 und TG31 (TANKSLEY et al. 1992) auf Tomatenchromosom 2. Diese waren in Paprika jedoch nicht polymorph und konnten somit nicht zur Kartierung verwendet werden. Andere zusätzliche Tomatenmarker konnten nicht identifiziert werden (PIERRE et al. 2000).

Daher wurde, von den am engsten mit *Bs3* gekoppelten AFLP-Markern P23-70 und P22-3 ausgehend, die Sichtung einer YAC-Bibliothek des Genotyps ECW 123 (TAI and STASKAWICZ 2000) initiiert. Im ersten Schritt konnten die zwei Klone Y65 und Y110

identifiziert werden. Mit dem rechten Ende von Y65 konnte ein weiterer Klon, Y152, isoliert werden. Endfragmente von Y110 lieferten keine weiteren Klone, so daß der Resistenzlocus nicht überspannt werden konnte (U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Die Endsequenzen dieser Klone wurden jedoch in die CAPS-Marker Y65-2, Y152-1 und Y110-2 umgewandelt, die zur Suche nach Rekombinationsereignissen in der Kartierungspopulation verwendet werden konnten (s. Abb. 1.4). Mit einer Kartierungspopulation von 800 F₂-Pflanzen wurden die CAPS-Marker am *Bs3* Locus kartiert. Marker Y65-2 und Y110-2 umfassen ein Intervall von 2 cM, Y152-1 liegt 0,3 cM von Y65-2 entfernt. Der genetische Abstand zu *Bs3* wurde nicht determiniert, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Resistenztests der rekombinanten F₂-Pflanzen erfolgt waren (M. Pi erre, T. Lahaye u. U. Bonas, unveröffentlichte Daten).

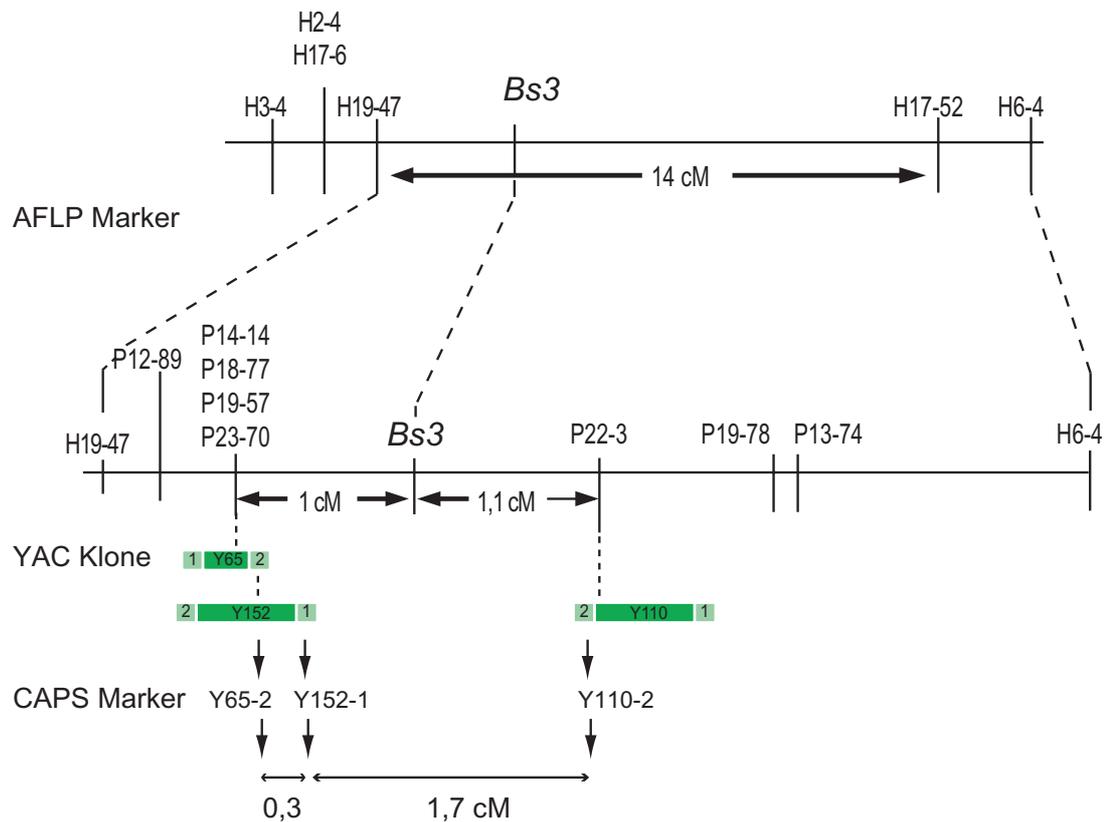


Abbildung 1.4: Genetische Karte der *Bs3* Region zu Beginn dieser Arbeit. (veränd. nach PIERRE et al. 2000) Pfeile geben die Intervalle zwischen den gen. Markern an. H: *HindIII/MseI* basierte und P: *PstI/MseI* basierte AFLP-Marker. Die Balken stellen die isolierten YAC Klone dar, 1 und 2 geben das rechte und linke Ende der Klone an, gestrichelte Linien zeigen an, mit welchem Marker die YAC Klone isoliert wurden. YAC 65 wurde mit AFLP-Marker P23-70 identifiziert.

1.7 Ziele dieser Arbeit

Die Isolierung des *Bs3* Gens dient nicht nur dazu, ein wichtiges Resistenzgen für die Pflanzenzüchtung nutzbar zu machen, sondern verfolgt vornehmlich das Ziel, weitere Einblicke in die der rassenspezifischen Resistenz zugrunde liegenden Mechanismen zu erlangen. Trotz ausgeprägter Homologien (97% identisch) zwischen AvrBs3 und AvrBs4 wird die Erkennung jeweils spezifisch durch das Paprika (*C. annuum* spp.) Bs3 bzw. das Tomaten (*Lycopersicon* spp.) Bs4 R-Protein (BALLVORA et al. 2001a) vermittelt. Da der Erkennung durch die beiden R-Proteine unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen (s. 1.5.2), ist zu vermuten, daß es sich um R-Proteine unterschiedlicher Struktur handelt. Ein Vergleich der beiden R-Proteine und ihrer Wirkungsweisen (in Verbindung mit der AvrBs3 Familie) könnte zu neuen Erkenntnissen hinsichtlich der Wirkzusammenhänge der R-Gen vermittelten rassenspezifischen Resistenz beitragen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Kartierung von *Bs3* fortzusetzen und so den Resistenzlocus physikalisch zu limitieren. Dazu sollte die Markerdichte im 1,7 cM Zielintervall erhöht und die Kartierungspopulation für eine genauere Kartierung der Marker vergrößert werden. In der Absicht, eine physikalische Karte des Resistenzlocus zu erstellen, sollten mit möglichst eng gekoppelten Markern genomische Bibliotheken gesichtet werden. Da die Paprika YAC-Bibliothek (TAI and STASKAWICZ 2000) ungeeignet zur Isolierung von *Bs3* ist (Lücke in der *Bs3* Region), galt es, eine BAC-Bibliothek der resistenten Linie ECW-30R zu erstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme, Gebrauchswaren und Geräte

Falls nicht anders erwähnt, wurden Chemikalien, Enzyme, Gebrauchswaren und Geräte folgender Hersteller genutzt:

Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg i. Breisgau), Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Biozym (Hess. Oldenburg), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Clontech Laboratories GmbH (Heidelberg), Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH (Berlin), Difco (Augsburg), Gibco BRL (Eggenstein), Greiner Labortechnik GmbH (Solingen), Invitrogen (Groningen, Niederlande), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), metabion GmbH (Martinsried), New England Biolabs GmbH (Schwalbach i. Taunus), peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen), Qiagen GmbH (Hilden), Roche Molecular Biochemicals GmbH (Mannheim), S & S Schleicher und Schüll GmbH (Dassel), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen), Sorvall (Hanau).

Das Radioisotop γ -³³P-dATP mit einer spezifischen Aktivität von 110 TBq/mmol wurde von Hartmann Analytic (Braunschweig) bezogen.

Verwendete DNA-Längenstandards:

Gene Ruler 100 bp DNA ladder, Gene Ruler 1 kb ladder (MBI Fermentas, St. Leon Rot)

Lambda Ladder PFG Marker, MidRange I PFG Marker (NEB, Schwalbach)

Hyperladder VI (Bioline, London)

DNA Molecular Weight Marker VII, Dig markiert (Roche Diagnostics, Mannheim)

Verwendete Oligonukleotide:

Alle für diese Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) entsalzt und lyophilisiert bezogen. Sie wurden in der Regel auf 1 µg/µl eingestellt.

2.2 Häufig verwendete Stammlösungen

20 x SSC

3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat-Dihydrat, pH 7,0

10 x PCR-Puffer	0,5 M KCl, 0,1 M TRIS-HCl (pH 8,3), 20 mM MgCl ₂ , 1% (v/v) Triton X 100, 0,1% (w/v) Gelatine
6 x Ladepuffer	15% Ficoll 400, Farbstoff: Orange G
1 x TAE	40 mM TRIS, 40 mM Eisessig, 1 mM EDTA, pH 8,0
1 x TBE	90 mM TRIS, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0
1 x TE	10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
Phosphatpuffer	1 M NaHPO ₄ : 134 g Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O in 1 l H ₂ O, 4 ml H ₃ PO ₄ , pH 7,2
X-Gal	20 mg X-Gal in 1 ml Dimethylformamid, Lagerung lichtgeschützt; Arbeitsverdünnung 1:400
IPTG	200 mg IPTG in 1 ml H ₂ O, Arbeitsverdünnung 1:200

Antibiotika:

Antibiotikum	Stammlösung	Verdünnungen
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml (in H ₂ O)	1:1000 (Platten), 1:2000 (Flüssigkultur)
Kanamycin (Kan)	5 mg/ml (in H ₂ O)	1:200
Rifampicin (Rif)	20 mg/ml (in Methanol)	1:200
Spectinomycin (Spec)	10 mg/ml (in H ₂ O)	1:100
Tetrazyklin (Tet)	2 mg/ml (in 70% EtOH)	1:200
Chloramphenicol (Clm)	12,5 mg/ml (in 100% EtOH)	1:1000

2.3 Nährmedien

Für die Herstellung der Bakterienmedien wurden Produkte des Herstellers Difco (Augsburg) verwendet.

LB Medium:	1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) NaCl; pH 7,5.
2YT Medium	1,6% (w/v) Bacto-Trypton, 1% (w/v) Hefe-Extrakt, 0,5% (w/v) NaCl.
NYG Medium:	0,5% (w/v) Bacto-Pepton, 0,3% (w/v) Hefe-Extrakt, 0,2% Glycerin.

Für die Herstellung von LB- und NYG-Platten wurden einem Liter Medium jeweils 1,5%, für 2YT-Platten 1% (w/v) Bacto-Agar zugesetzt. Die Platten wurden bei konstant

4°C im Kühlraum gelagert. Die Sterilisation der Nährmedien erfolgte für 20 min bei 121°C und $1,1 \times 10^5$ Pa (Autoklavieren). Zur selektiven Kultivierung von Bakterien wurden den Medien nach dem Autoklavieren die hierfür jeweilig benötigten Mengen Antibiotika in den entsprechenden Verdünnungen zugegeben.

2.4 Bakterienstämme

Die in Tab. 2.1 aufgeführten *Xcv*-Stämme wurden bei Inokulationsexperimenten (s. 2.7) eingesetzt. Die angegebenen *E. coli*-Stämme wurden zur Klonierung von BAC-Endfragmenten, BAC-Subklonen und PCR Produkten zur Sequenzierung genutzt.

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme

	Stamm	Resistenz	Beschreibung/Referenz
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (<i>Xcv</i>)	85-10 (<i>avrBs1</i> ⁺ , <i>avrBs2</i> ⁺ , <i>avrBs3</i>)	Rif ^r	Paprikarasse 2/ (MINSAVAGE et al. 1990)
	85-10 pDS300 (<i>avrBs1</i> ⁺ , <i>avrBs2</i> ⁺ , <i>avrBs3</i> ⁺)	Rif/Spec ^r	Paprikarasse 2, pDSK602 exprimiert das <i>avrBs3</i> Gen (Klon pL3XV1-6)/ (VAN DEN AKERVEKEN et al. 1996)
	85-10 (<i>avrBs3Δrep16</i>)	Rif/Tet ^r	Paprikarasse 2, enthält ein Deletionsderivat von <i>avrBs3</i> , subkloniert in den Vektor pLAFR3/ (HERBERS et al. 1992)
	82-8 uns (<i>avrBs2</i> ⁻ , <i>avrBs3</i>)	Rif ^r	Paprikarasse 1, universell suszeptibel, enthält kein <i>avr</i> -Gen/ (MINSAVAGE et al. 1990)
	82-8 (<i>avrBs2</i> ⁻ , <i>avrBs3</i> ⁺)	Rif/Tet ^r	Paprikarasse 1, enthält das <i>avrBs3</i> Gen/ (MINSAVAGE et al. 1990)
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	XL1-Blue MRF ^r		D(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyr A96 relA1lac</i> (F' <i>proAB lacI</i> ^q Z ΔM15Tn10 (tet ^r)), Stratagene
	One Shot TOP 10 Electrocomp		F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBc</i>) Δ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139Δ(ara, leu)7697 galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> , Invitrogen
	DH10B		F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBc</i>) φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139Δ(ara, leu)7697 galU galK rpsL nupG</i> Bethesda Research Laboratories (MD,USA)

2.5 verwendete Vektoren

- pCR[®]-TA-TOPO und pCR[®]-XL-TOPO (Invitrogen) zur Klonierung von PCR Produkten
- pBluescript KS zur Subklonierung von BAC-Klonen
- pIndigoBAC-5 [*Hind*III-Cloning ready] von Epicentre für die Erstellung einer BAC-Bibliothek

2.6 Pflanzenmaterial

<i>C. annuum</i> ECW	suszeptible Linie (<i>bs3/bs3</i>)
<i>C. annuum</i> ECW-30R	resistente Linie (<i>Bs3/Bs3</i>), Elter der Kartierungspopulation
<i>C. annuum</i> ECW123	resistente Linie (<i>Bs1/Bs1</i> , <i>Bs2/Bs2</i> , <i>Bs3/Bs3</i>)
<i>C. frutescens</i> PI 197409	suszeptible Linie (<i>bs3/bs3</i>), Elter der Kartierungspopulation
<i>C. annuum</i> HD208	suszeptible Linie (<i>bs3/bs3</i>), die zur Erstellung der BAC-Bibliothek aus Evry (RUFFEL et al. 2002)genutzt wurde.

Das *Bs3* Gen wird als monogen-dominanter Locus vererbt. Für den Aufbau einer Kartierungspopulation wurde die resistente Linie *C. annuum* ECW30R mit der suszeptiblen Linie PI 197409 (*C. frutescens*) gekreuzt (s. 1.6 und Abb. 2.1). Zur Suche nach Rekombinationsereignissen im Markerintervall Y65-2 und Y110-2 wurde die F₂-Generation herangezogen. Die rekombinanten Pflanzen wurden für Resistenztests mittels *Xcv*-Inokulation durch Selbstung in die F₃-Generation gebracht. Eine Liste aller rekombinanter Pflanzen findet sich im Anhang.

Alle Paprikapflanzen wurden unter Gewächshausbedingungen angezogen (26 - 28°C, 60 -70% relative Luftfeuchte, Lichtperiode von 6.00 bis 22.00 Uhr).

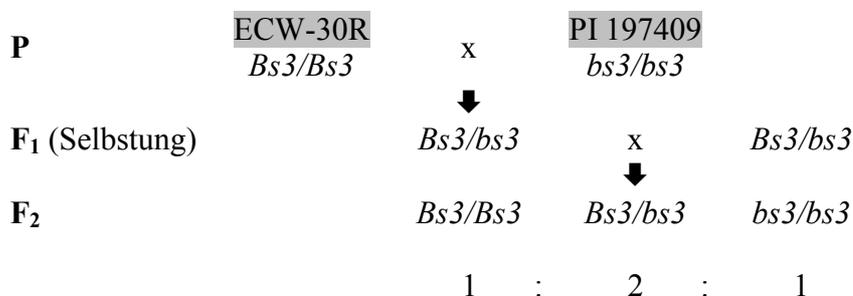


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Kartierungspopulation

2.7 Inokulationsexperimente und F₃-Familientests

Zur phänotypischen Typifizierung von Segreganten wurden diese mit den *Xcv*-Stämmen 85-10 (*avrBs1*⁺, *avrBs2*⁺, *avrBs3*⁻) und 85-10 pDS300 (*avrBs1*⁺, *avrBs2*⁺, *avrBs3*⁺) infiltriert. In der Regel wurden die rekombinanten F₂-Pflanzen geselbstet. Für die F₃-Familientests wurden jeweils 13 Körner ausgesät. Durch die unterschiedlichen Keimungsraten wurden jeweils 3 - 13 Pflanzen im 4-Blatt-Stadium inokuliert. Da mit den 85-10 Stämmen Schwierigkeiten bei der Bonitur der Phänotypen auftraten, wurden später die Stämme 82-8 uns (*avrBs2*⁻, *avrBs3*⁻) und 82-8 (*avrBs2*⁻, *avrBs3*⁺) verwendet.

Die Bakterien wurden zwei Tage lang auf selektiven NYG-Agarplatten angezogen. Für die Infiltrationen wurden sie mit einem flachen Holzstäbchen von den Platten abgenommen, in 1 mM MgCl₂ resuspendiert und die erhaltenen Suspensionen auf eine O. D. von 0,4 bei 600 nm (entspricht in etwa 4 x 10⁸ Zellen pro ml) eingestellt. Diese wurden dann über das stumpfe Ende einer Einwegspritze in die Interzellularräume junger Blätter injiziert. Die Infiltrationen erfolgten stets von der Blattunterseite her. Bei der Inokulation der Pflanzen war darauf zu achten, daß das Blattgewebe nicht verletzt wird, da eine Verwundungsreaktion fälschlicherweise als Reaktion auf den jeweiligen *Xcv*-Stamm interpretiert werden könnte. Die Pflanzen verblieben auch nach erfolgter Infiltration in Gewächshausatmosphäre (26 - 28°C, 60-70% relative Luftfeuchte, Lichtperiode von 6.00 bis 22.00 Uhr).

Die Bonitur der Phänotypen erfolgte 48 h nach Infiltration. Bei Resistenz der Pflanzen gegenüber *avrBs3*-exprimierenden *Xcv*-Stämmen trat 48 h nach Inokulation eine HR auf. Diese war gekennzeichnet durch abgestorbene, bräunlich gefärbte Blattgewebe innerhalb des infiltrierten Bereichs. Bei Durchlicht waren dunkle Ränder sichtbar, die diesen Bereich begrenzten. In den meisten Fällen war auch bereits ein Kollaps des Blattgewebes zu beobachten. Der susceptible Phänotyp hingegen zeichnete sich dadurch aus, daß 48 h nach Infiltration keine HR auftrat. Nach 72 h zeigten susceptible Pflanzen im infizierten Bereich sog. wässrige Läsionen, d. h. das betreffende Blattgewebe erschien wässrig, blieb aber grün und lichtdurchlässig.

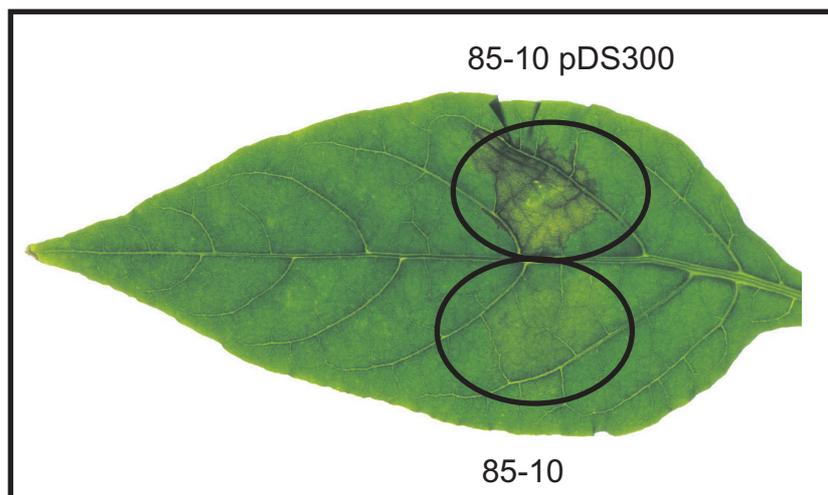


Abbildung 2.2: Laborphänotypen einer *Xcv*-Inokulation.

Eine Bakteriensuspension von 0,4 OD wurde lokal in die Blattunterseiten infiltriert. Die Auswertung der Symptome erfolgte 48 h nach der Inokulation der *Xcv*-Stämme. 85-10 zeigt beginnende wässrige Läsionen. 85-10 pDS300 verursacht eine HR, das Gewebe ist kollabiert und an den Rändern zeichnen sich dunkle Ränder ab.

2.8 Isolierung von Nukleinsäuren

2.8.1 Isolierung genomischer Pflanzen-DNA (Minipräparation)

Extraktionspuffer: 0,25 M NaCl
0,2 M TRIS-HCl, pH 7,5
25 mM EDTA, pH 8,0
0,5% (w/v) SDS

Als Ausgangsmaterial wurden 1 - 2 kleine, junge Blätter geerntet, in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Typ *Safe-lock*; Eppendorf) überführt und in flüssigem Stickstoff mit Metall-Mörsern zu einem feinen Pulver verarbeitet. Anschließend wurden 700 µl vorgewärmter Extraktionspuffer (65°C) zugegeben. Die Proben wurden auf dem Vortexer (Heinemann, Duderstadt) kräftig durchmischt und für 30 min bei 60°C im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl vorgekühltem Chloroform (-20°C) wurden die Proben wiederum sorgfältig invertiert (5 min) und zur Phasentrennung 15 min bei 16.100 rcf (Eppendorf Zentrifuge 5415D) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol gefällt. Die Proben wurden anschließend zur Präzipitation der pflanzlichen Nukleinsäuren 10 min bei 16.100 rcf zentrifugiert. Die DNA-Pellets wurden mit 500 µl 70%-igem Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in

150 µl 0,1 x TE resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C . Die durchschnittliche DNA-Ausbeute betrug zwischen 50 und 250 ng/µl. Für die Markeranalyse wurden die Nukleinsäure-Lösungen im Verhältnis 1:5 mit bidest. H_2O verdünnt, wovon 5 µl eingesetzt wurden.

2.8.2 Isolierung hochmolekularer pflanzlicher DNA (Maxipräparation)

Extraktionspuffer: 100 mM Tris, pH 8,0
50 mM EDTA, pH 8,0
500 mM NaCl
1,25% SDS (w/v)
8,3 mM NaOH
0,38% Natriumbisulfit

Zur Gewinnung großer Mengen hochmolekularer DNA aus rekombinanten Pflanzen wurden 15 - 20 Blätter geerntet. Diese wurden in flüssigem Stickstoff in vorgekühlten Mörsern mit dem Pistill zu einem feinen Pulver verarbeitet. Das Pulver wurde anschließend in gekühlte 50-ml-Röhrchen (Greiner) überführt (ca. 10 ml pulverisiertes Material) und mit ca. 20 ml vorgewärmtem Extraktionspuffer (65°C) versetzt. Die Proben wurden sorgfältig gemischt und 1 h lang bei 60°C unter regelmäßigem Invertieren im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlen der Proben wurden diesen jeweils 7,1 ml 5M KAc zugegeben, durch Invertieren gemischt (> 5 min) und für 20 min auf Eis inkubiert und bei 4°C für 10 min (1700 rcf, Sorvall T21) zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Miracloth (CalBiochem, LaJolla, CA) filtriert und zur Fällung der DNA mit 0,7 Vol. Isopropanol gemischt (nicht vortexen) und bei 4°C für 20 min (3313 rcf, Sorvall T21) zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 70% EtOH gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml TE 50/10 aufgenommen, zweimal für 10 sec gevortext und für 5 min bei 65°C inkubiert. 2,5 ml 7,4 M NH_4Ac wurden hinzugefügt und für 15 min bei 1700 rcf (Sorvall T21) zentrifugiert. Zur nochmaligen Pelletierung der DNA wurden wieder 0,7 Vol. Isopropanol zugesetzt und bei 4°C für 20 min (3313 rcf Sorvall T21) zentrifugiert. Das Pellet wurde nochmals in 4,5 ml TE 50/10 gelöst, 10 sec gevortext und bei 65°C für 5 min inkubiert, zusätzlich wurden 0,5 ml 3M NaAc hinzugefügt und die DNA, wie oben beschrieben, gefällt. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 0,5 ml TE gelöst. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C . Die DNA-Ausbeute wurde am Photometer (s. 2.9.1) bestimmt und lag zwischen 400 ng/µl und 1,5 µg/µl.

2.8.3 Extraktion von pflanzlichen Zellkernen

10 x HB Puffer: 0,1 M Tris
 0,8 M KCl
 0,1 M EDTA
 0,01 M Spermidin
 0,01 M Spermin

Als Ausgangsmaterial dienten ca. 15 g Blattmaterial von Pflanzen, die im voraus für mind. 48 h in Dunkelheit gehalten worden waren. In vorgekühlten Mörsern wurden die Blattproben in Stickstoff zu einem feinen Pulver zermalen, in 200 ml 1 x HB+ Puffer (1 x HB Puffer + 0,15% β -Mercaptoethanol + 0,4% Triton X-100) aufgenommen und für 20 min im Eisbad gerührt. Anschließend wurde die Blattpulversuspension durch einen Nylonfilter (Porengröße: 50 μ m) filtriert und für 8 min bei 1500 x g (RT) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml 1 x HB+ Puffer resuspendiert und für 2 min bei 57 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, durch einen 40 μ m-Poren Nylonfilter gegeben und nochmals bei 1500 x g für 8 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in ca. der gleichen Menge an 1 x HB+ Puffer gelöst und mit dem gleichen Volumen an 1,2%-iger Incert-Agarose (Cambrex, BMA, Rockland, CA) versetzt und zu "plugs" gegossen. Zur Zerstörung der Zellkernwände wurden die "plugs" bei 37°C über Nacht in Lysispuffer (0,5 M EDTA, 1% NatriumLaurylsarcosin, 0,5 mg/50 ml Proteinase K) inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C in TE 10:10. Bevor die in den "plugs" enthaltene DNA verdaut werden konnte, wurden die "plugs" für 2 x 30 min in TE 10:10 und für 2 h in TE 10:1 gewaschen.

2.8.4 Präparation von Plasmid DNA aus kleinen Kulturen

P1:	P2:	P3:
25 mM Tris, pH 8,0	0,2 M NaOH	3 M NaAc, pH 5,0
10 mM EDTA	1% SDS	
3 μ l RNase (10 mg/ml) auf		
100 μ l Puffer		

Die Isolierung von Plasmiden hoher Kopienzahl aus Bakterien erfolgte nach dem Protokoll der Alkalischen Lyse (SAMBROOK et al. 1989) oder wurde z. B. für Sequenzierungsreaktionen mit dem GFX™ Micro-Plasmid-Prep-Kit (Amersham Pharmacia Biotech) oder dem Plasmid-Mini-Kit™ von Qiagen durchgeführt.

Der Ablauf der Präparation erfolgte nach Herstellerangaben. Die Bakterien wurden zunächst in selektiven 2-ml-Übernachtskulturen angezogen. Je 1,5 ml Kultur wurden bei 8000 rcf (Eppendorf Zentrifuge 5415D) für 4 min abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen.

Für die Präparation von Plasmid-DNA ohne Kit wurde das Bakterienpellet in 100 µl P1 gelöst, 200 µl P2 hinzugefügt, kurz gemischt und für 15 min inkubiert. Anschließend wurden 200 µl P3 zugegeben, für 10 min auf Eis inkubiert und bei 16.100 rcf (Eppendorf Zentrifuge 5415D) für 10 min abzentrifugiert. Zur Fällung der Plasmide wurde 1 ml 100% EtOH hinzugefügt und bei 16.100 rcf (Eppendorf Zentrifuge 5415D) für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 70% EtOH gewaschen, danach getrocknet und in 100 µl bidest. H₂O gelöst.

2.8.5 Isolierung von hochmolekularer Plasmid (BAC) DNA

Die Präparation von BAC-DNA für die Insertgrößenbestimmung, Restriktionsanalysen und Subklonierungen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll für das Qiagen-Plamid-Midi-Kit™ (tip-100). 200 ml 2YT-Medium (Chloramphenicol 12,5 µg/ml) wurden, mit einer Einzelkolonie angeimpft, über Nacht bei 37°C inkubiert. Folgende Änderungen gegenüber dem Qiagen-Protokoll wurden vorgenommen:

1. Die Puffermengen (P1, P2, P3) wurden von 4 ml auf 10 ml erhöht.
2. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte mit 5 ml auf 65°C erwärmtem QF-Puffer, der in Aliquots von 1 ml über die Säule gegeben wurde.

2.8.6 BAC-DNA Präparation ohne Säule:

Solution I:

25 mM Tris, pH 8,0
50 mM Glukose
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase

Solution II:

0,2 N NaOH
1% SDS

Solution III:

5 M Kaliumacetat, pH 5,5

Mit dieser Methode werden größere Erträge als mit der vorgenannten (s. 2.8.5) erzielt, problematisch bei ihr ist aber, daß auch chromosomale DNA enthalten sein kann. Die Bakterien wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen 20 min bei 3200 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 2,2 ml eiskalter Solution I gelöst, auf Eis 4,4 ml Solution II hinzugegeben und

unter mehrmaligem Invertieren des Zentrifugenröhrchens höchstens 5 min lang inkubiert. 3,3 ml Lösung III wurden hinzugefügt und die Suspension mehrmals gemischt. Es bildete sich ein flockiger Niederschlag, der durch den nächsten Zentrifugationsschritt (20 min bei 22.600 x g) entfernt wurde. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zugabe von 20 ml 100%-igem EtOH die DNA gefällt. Diese wurde pelletiert durch eine Zentrifugation bei 14.200 x g für 30 min. Das Pellet wurde mit 70%-igem EtOH gewaschen, anschließend vollständig getrocknet und in 100 µl bidest. H₂O aufgenommen.

2.8.7 Isolierung von BAC-DNA für die Herstellung der "Pool-DNA" der BAC-Bibliothek

GTE-Puffer:

50 mM Glukose
25 mM Tris, pH 8,0
10 mM EDTA, pH 8,0
100 µg/ml RNase

Lysispuffer:

1% SDS
0,2 M NaOH

Die 384-er Mikrotiterplatten mit den BAC-Einzelklonen wurden kurz angetaut, mittels eines "Igels" jeweils auf zwei 2YT-Platten (1% Agar, Chloramphenicol 12,5 µg/ml) übertragen und für ca. 24 h bei 37°C inkubiert. Mit 25 ml sterilem aqua dest. wurden die Kolonien einer Platte heruntergewaschen und in 50 ml Röhrchen (Greiner) überführt. Zur Pelletierung der Bakterien wurde für 20 min (RT) bei 3313 rcf (Sorvall T21) zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 4 ml GTE-Puffer gelöst, mit 5 ml Lysispuffer versetzt und 5 min lang unter vorsichtigem Invertieren inkubiert. Zum Fällen der Proteine wurden der Lösung 5 ml 3 M Kaliumacetat (pH 5,5) hinzugefügt und diese unter gelegentlichem Invertieren für 20 min auf Eis inkubiert. Nach 20-minütigem Zentrifugieren (Sorvall T21, 3313 rcf, 4°C) wurde der Überstand durch Miracloth (CalBiochem, LaJolla, CA) filtriert und zur Fällung der DNA mit 10 ml 100% Isopropanol versetzt. Dazu wurden die Proben mind. 16 h bei 4°C inkubiert und anschließend für 30 min (Sorvall T21, 3313 rcf, 4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen (15 min, Sorvall T21, 3313 rcf), kurz getrocknet und anschließend in 1 ml 0,1 x TE aufgenommen.

2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

2.9.1 Konzentrationsbestimmung am Photometer

Die Konzentrationsbestimmung am Photometer (Ultrospec 3000; Pharmacia Biotech) erfolgte über die Messung der Absorption von UV-Licht der Wellenlängen 260 nm bzw. 280 nm. Dabei entspricht ein Absorptionswert von 1 bei einer Schichtdicke der Quarzküvette von 1 cm einer Konzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA und einer Konzentration von 40 µg/ml bei einzelsträngiger DNA oder RNA. Die DNA-Proben wurden stets 1:40 mit bidest. H₂O in einem Gesamtvolumen von 400 µl verdünnt. Die Konzentration der Proben errechnet sich wie folgt:

$$\text{OD}_{260 \text{ nm}} \times 50 \times 40 (\text{Verdünnungsfaktor}) = \mu\text{g DNA/ml}$$

Die DNA-Konzentrationsbestimmung am Photometer war allerdings nur dann durchführbar, wenn vergleichsweise große Mengen an DNA zur Verfügung standen. Das Photometer liefert nur in einem Bereich von 0,05 bis 1 OD zuverlässige Werte. Das entspricht in etwa einer Nukleinsäuremenge von 2,5 - 50 µg je ml.

2.9.2 Konzentrationsbestimmung mittels Agarose-Gels

Eine Möglichkeit zur Abschätzung der DNA-Konzentration bei geringen Mengen an DNA bot die Agarose-Gelelektrophorese. Dabei wurde ein Aliquot der Nukleinsäurelösung gemeinsam mit einer Verdünnungsreihe eines Standards (λ-DNA: 0,3 mg/ml; MBI Fermentas) auf das Gel aufgetragen. Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten der Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Moleküle unter UV-Licht verglichen.

2.10 DNA-Amplifikation mittels PCR

Die PCR-Reaktionen wurden in Temperaturzyklus-Steuergeräten mit beheizbarem Deckel (PTC-225 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, San Francisco, USA) durchgeführt. Bakterielle Kolonie-PCRs erfolgten unter modifizierten Standardbedingungen: das Volumen wurde auf 22 µl erhöht, eine kleine Menge der Kolonie direkt in den PCR-Mix gerührt und der erste Denaturierungsschritt auf 3 min erhöht.

2.10.1 Standardbedingungen der PCR

Standardansatz (20 µl):
 10 - 250 ng genomische DNA
 1 x PCR Puffer
 200 µM dNTPs
 je 30 ng Oligonukleotide
 2 u *Taq*-Polymerase
 ad 20 µl dest. H₂O

Standard-Prozeßbedingungen:

Zyklus	Reaktion	Temperatur	Dauer	Wiederholung
1	Denaturierung	94°C	2 min	1 x
2	Denaturierung	94°C	30 sec	35 x
	Anlagerung	50 - 65°C	15 - 30 sec	
	Elongation	72°C	30 sec - 1,5 min	
3	"Fill-in"	72°C	5 min	1 x

2.11 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

2.11.1 Konventionelle Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten < 50 kb erfolgte mittels konventioneller horizontaler Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden in der Regel Gele mit einer Agarose-Konzentration von 0,7 - 3% benutzt. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Zur Sichtbarmachung der DNA-Fragmente wurden den Gelen jeweils 3 µl/100 ml wässrige Ethidiumbromidlösung (1%) zugesetzt. Das Ethidiumbromid interkaliert hierbei in die DNA und wird unter UV-Bestrahlung sichtbar. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage.

2.11.2 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

DNA-Fragmente >50 kb zeigen in einer konventionellen Elektrophorese eine größenunabhängige, relativ hohe Mobilität. Durch einen regelmäßigen Wechsel der Richtung des elektrischen Feldes im spitzen Winkel zur Wanderrichtung der DNA kommt es zu einer größenabhängigen Retardierung sehr langer DNA-Fragmente.

Die PFGE wurde zur Bestimmung der Insertgrößen der BAC-Klone und zur Größenselektion des partiellen *Hind*III Verdau genomischer DNA (s. 2.16.1) für die Herstellung der BAC-Bibliothek verwendet.

Die DNA-Fragmente wurden in einem 1%-igen Agarose-Gel (SeaKem[®] Gold Agrose [Cambrex, BMA, Rockland, USA] in 0,5 x TBE) unter folgenden Bedingungen aufgetrennt:

- Für Größenbestimmung der BAC-Inserts und die erste Auftrennung des partiellen Verdau: Laufzeit: 20 h bei 6V/cm bei 14°C, Puffer: 0,5 x TBE, Pulslänge 1 – 50 sec, Reorientierungswinkel: 120 °
- Für die zweite Auftrennung des partiellen Verdau, zur Eliminierung kleinerer Fragmente: Laufzeit: 20 h bei 6V/cm bei 14°C, Puffer: 0,5 x TBE, Pulslänge 3 sec, Reorientierungswinkel: 120 °

Die DNA wurde mit 6 x Loading Dye (MBI Fermentas) gemischt und in die Gel-Taschen pipettiert. Nicht genutzte Taschen wurden mit 1%-iger Agarose abgedichtet. Zum Auftragen des partiellen Verdau wurden die Gel-Taschen mit einem Skalpell entsprechend vergrößert und die zerkleinerten "DNA-plugs" eingefüllt, wobei es galt, Luftblasen zu vermeiden. Anschließend wurden die Taschen mit 1%-iger Agarose abgedichtet. Für die zweite Auftrennung wurde die DNA entsprechender Größe aus dem Gel geschnitten, in die passend ausgeschnittenen Taschen des neuen Gels eingepaßt und gleichfalls mit Agarose abgedichtet.

Zur Anfärbung wurden die Gele in einem Ethidiumbromid-Färbebad (0,5 mg/l) für 30 min inkubiert. Bei präparativen Gelen wurden nur die Längenstandards angefärbt und die Größen auf dem ungefärbten Teil des Gels markiert.

2.11.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) zur Auftrennung der AFLP-Fragmente

5% Acrylamidmix:
62,5 ml Acrylamid 40% (19:1)
225 g Harnstoff
auffüllen auf 500 ml H₂O, durch einen 0,2 mm Filter (Whatman) filtern, bei 4°C lagern

Ladepuffer:
5 mM EDTA,
0,25% w/v Bromphenolblau,
0,25% w/v Xylencyanol
in Formamid lösen

Die Auftrennung der AFLP-Fragmente erfolgte über den SQ3 Sequenzierer von Hoefler (San Francisco, USA). Für ein Sequenzier-Gel wurden:

57 ml 5% Acrylamidmix,
3 ml 10 x TBE,
420 µl APS und
24 µl Temed

gründlich gemischt. Zum Gießen des Gels wurden die Glasplatten in einem ungefähren Winkel von 30° aufgestellt und am oberen Ende die Acrylamidmischung hineingegossen. War die Gel-Lösung bis zum unteren Rand der Glasplatten gelaufen, wurde das Gel horizontal festgestellt. Die Acrylamidmischung sollte für die Dauer von ca. 1 h auspolymerisieren. Danach wurde das Gel in den Sequenzierapparat gestellt, der obere Tank mit 0,5 x TBE, der untere mit 1,5 x TBE befüllt. Dieser Gradient dient der Verbesserung der Qualität der Auftrennung, besonders im oberen Bereich des Gels. Anschließend wurde der Kamm eingesetzt und die Taschen gut ausgewaschen. Der Vorlauf zum Erwärmen des Gels auf 60 – 65°C erfolgte bei 3500V, 150 mA und 90 W. Jetzt konnten 3 µl der frisch denaturierten Proben (s. 2.15.4, 94°C für 10 min, abkühlen auf Eis, 8 µl Ladepuffer hinzufügen) in die Taschen geladen werden. Bevor das Gel bei 85 W neu gestartet wurde, wurden dem unteren Tank 43 ml 4 M NaAc zugesetzt. Nach ca. 2 h konnte das Gel gestoppt werden, die obere Glasplatte wurde vorsichtig entfernt, das Gel auf ein Whatman-Filterpapier transferiert und mit Frischhaltefolie abgedeckt. Das Gel wurde in einem Vakuumtrockner (SLAB Gel Dryer, Hoefler) bei 80°C für 1 – 2 h getrocknet und für mind. 24 h auf einem Röntgenfilm (BioMax MR, Kodak, New York, USA) exponiert.

2.12 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

2.12.1 Elektroelution

Zur Elution großer Mengen an DNA aus Agarose-Gelen, z. B. bei der Erstellung der BAC-Bibliothek (s. 2.16) oder der Subklonierung von BAC 128 (s. 2.19), wurde das BIOTRAP Elektroseparationssystem (S & S Schleicher und Schuell) verwendet. Die Apparatur umfaßt eine Elektrophoresekammer, in die 4 sog. BIOTRAP-Geräte eingesetzt werden können. Die BIOTRAP-Geräte bestehen jeweils aus einer 1,2 x 10 cm große Elutionskammer. Des weiteren gehören zwei verschiedene Membrantypen zum

Elutionssystem. Die BT1-Membran ist eine inerte Membran, durchlässig für Pufferionen und kleine Moleküle (< 3 - 5 kD). Dagegen ist die BT2-Membran eine Mikroporenmembran, die als Vorfilter fungiert und den Durchgang von Agarose und größeren Partikeln verhindert. Pufferionen und Makromoleküle können diese Membran jedoch ungehindert passieren.

Die Membranen wurden, wie vom Hersteller angegeben, in die Elutionskammern eingesetzt. Die BT2- und BT1-Membran fungieren dabei als eine Art Falle. Makromoleküle (> 3 - 5 kD) können durch Anlegen einer Spannung in sie einwandern, werden durch die BT1-Membran allerdings innerhalb der Falle zurückgehalten. Zum Betrieb wurden die BIOTRAP-Geräte in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Agarose-Gelstücke wurden unmittelbar vor der BT2-Membran placiert und die Kammern mit 1 x TAE-Puffer gefüllt. Zur Elution von DNA-Fragmenten wurde für 4 - 8 Stunden eine Spannung von 150 V an das Gerät angelegt. Nach Beendigung der Elution wurde für 20 sec bei 200 V umgepolt, um DNA-Moleküle von der BT1-Membran abzulösen.

2.12.2 Aufreinigung von PCR Produkten

PCR Produkte wurden meist mit Hilfe des QIAEXII™-Kits (Qiagen) oder des GFX™PCR DNA and Gel Band Purification Kits (Amersham, Biosciences) aufgereinigt, z. B. für Klonierungen. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Gelöst wurden die PCR-Produkte in 20 µl bidest. H₂O.

2.13 Klonierung von PCR-Produkten und genomischen DNA-Fragmenten

2.13.1 Ligation von Amplifikationsprodukten in T-Überhangsvektoren

Die Amplifikationsprodukte wurden in pCR®-TA-TOPO® und pCR®-XL-TOPO® (Invitrogen) nach Herstellerangaben ligiert. Das PCR-Produkt mit dem von der *Taq* DNA-Polymerase gebildeten Überhang am 3'-Ende wird hier in einen Vektor mit 3'-T-Überhang kloniert.

2.13.2 Ligation von genomischen DNA-Fragmenten

Zur Subklonierung des BACs 128 (s. 2.19) wurden die genomischen Fragmente in pBluescript ligiert. Der Vektor wurde durch *EcoRI* und *BamHI* linearisiert und dephosphoreliert (s. 2.13.3). Die Ligation (40 µl-Ansatz) erfolgte, unter Verwendung von 30 u Ligase und 2 µl dephosphoreliertem Vektor, in der Regel für 1 - 2 h bei RT.

2.13.3 Dephosphorelierung von Vektoren

Die Vektoren (pBluescript) wurden mit den jeweils notwendigen Enzymen verdaut und anschließend sofort mit 1 µl SHRIMP Phosphatase (MBI Fermentas) für 10 min bei 37°C inkubiert, durch 10-minütiges Erhitzen auf 65°C wurde die Reaktion abgestoppt. Gelagert wurden die Vektoren bei -20°C.

2.14 Southern-Analysen

Die Southern-Analyse ist ein Verfahren (SOUTHERN 1975) bei dem DNA-Fragmente zunächst nach ihrer Größe in Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aus der Gel-Matrix durch die Wirkung von Kapillarkräften auf geeignete Trägermembranen transferiert werden. Nach Fixierung auf der Membran werden die DNA-Moleküle mit einer Sonde hybridisiert.

2.14.1 Kapillartransfer von DNA-Fragmenten

Die zu analysierenden DNA-Fragmente wurden zunächst über 0,7 - 1%-ige Agarose-Gele bei geringer Spannung (80 V) ihrer Größe nach aufgetrennt. Für den Kapillartransfer wurde das Gel wie folgt vorbehandelt:

- Depurinierung der DNA für 15 min in 0,25 M HCl
- Denaturierung der DNA für 40 min in 1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH
- Neutralisierungsschritt für 30 min in 1,5 M NaCl; 1 M TRIS-HCl, pH 7,4
- Inkubation für 5 min in 20 x SSC

Der Transfer auf die positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics) erfolgte ü. N. mit 20 x SSC als Transferpuffer. Die Nylonmembran wurde in 2 x SSC voräquiliert. Nach dem Transfer wurde die Membran zur Fixierung der DNA für 2 h bei 80°C inkubiert. Um die überschüssigen Salze auszuwaschen, wurde dann für 30 min in 2 x SSC inkubiert. Abschließend wurde die Membran bei RT getrocknet.

2.14.2 Elektrotransfer von DNA-Molekülen

Für den "reversen AFLP" (s. 2.15.6) mußte die DNA aus der Acrylamidmatrix auf eine Nylonmembran transferiert werden. Dazu wurden Elektroblokkammern (TE 42, Amersham, Pharmacia Biotech) benutzt. Da im Labor keine Kammern vorhanden waren, die ein ganzes Sequenzier-Gel fassen, wurde der Teil des Gels ausgeschnitten, auf dem die polymorphen Banden lokalisiert waren. Als am geeignetsten erwies sich die Methode, den entsprechenden Gel-Teil mit einem Whatman-Filterpapier abzuziehen und sofort die Nylonmembran zu applizieren. Der Transfer fand bei 40 V in 1 x TBE als Transferpuffer für 1 – 2 h bei 4°C statt.

2.14.3 Nicht-radioaktive Markierung von DNA-Sonden mittels PCR

Die nicht-radioaktive Markierung von klonierten AFLP-Fragmenten und BAC-Endsonden erfolgte mittels DIG (Digoxigenin)-markierten dNTPs in einer PCR-Reaktion. Dig-11-dUTP (2 mM, Roche Diagnostics) wurde im Verhältnis 1:1 mit unmarkierten dNTPs (2 mM) gemischt und in eine Standard-PCR eingesetzt. Die synthetisierten Amplifikationsprodukte zeigen aufgrund ihres höheren Molekulargewichtes eine verringerte Mobilität in der Gel-Elektrophorese gegenüber nicht-markierten Produkten, wodurch ein Nachweis über den Einbau des markierten Nukleotids in die Sonde erfolgen kann.

2.14.4 Nicht-radioaktive Markierung von Sonden nach der "random primed-Methode"

Die vollständige Markierung der BAC-Inserts 103 und 104 zur Hybridisierung mit den Subklonen von BAC 128 (s. 2.19) erfolgte nach der "random primed-Methode" von Feinberg und Vogelstein (FEINBERG and VOGELSTEIN 1983). Um Kreuzhybridisierungen mit der Vektor-DNA zu vermeiden, wurden Inserte der BAC-Klone mit *NotI* herausgeschnitten. Der Verdau wurde auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt. Nach dem Ausschneiden wurde die Insertbande zur Entfernung der Agarose über Glaswolle abzentrifugiert. Die erhaltene Lösung wurde direkt in die Markierungsreaktion eingesetzt. Für die Markierung wurde der HexaLabel™ DNA Labeling Kit (MBI Fermentas) verwendet.

Ansatz einer Markierungsreaktion (50 µl): DNA-Matrize 50 - 100 ng

Hexanukleotidmix 10 µl

dest. H₂O ad 44 µl

Die Proben wurden für 10 min bei 95°C (Denaturierung) inkubiert und auf Eis abgekühlt. Danach wurden 1 µl Klenow-Fragment (5 U/µl) und 5 µl Dig-markierten dNTP-Mix hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C (DNA-Synthese). Durch die Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA wurde die Reaktion abgestoppt.

2.14.5 Hybridisierung und Detektion DIG-markierter Sonden

Maleinsäurepuffer: 0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl, pH 7,5	Blockierungspuffer: Maleinsäure-Puffer + 1% Blocking-"reagent" (aufgereinigtes Milcheiweiß)	Detektionspuffer: 100 mM TRIS-HCl, pH 9,5 100 mM NaCl
--	--	--

Waschpuffer:
Maleinsäure-Puffer +
0,3% (v/v) Tween 20

Prähybridisierungs- und Hybridisierungspuffer: DIG *Easy Hyb* (Roche Diagnostics)

Die Prähybridisierung der Membranen erfolgte für 30 min bei 38°C im Hybridisierungssofen. Vor der Hybridisierung wurden dem Hybridisierungspuffer jeweils 15 µl Sonde, die zuvor bei 95°C für 10 min denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt wurden, zugesetzt. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte über Nacht ebenfalls bei 38°C.

Behandlung nach der Hybridisierung:

- Waschen der Membranen:
- 1 x für 5 min in 2 x SSC; 0,1% SDS bei RT
 - 2 x für 15 min in 0,5 x SSC; 0,1% SDS bei 65°C
- Blockierung freier Protein-Bindestellen: • 30 min in Blockierungspuffer
- Antikörperinkubation: • 30 min in 1:10.000 verd. Antikörper (Anti-DIG AP, Fab Fragmente, Roche Diagnostics) in Blockierungspuffer
- Waschen der Membranen: • 2 x für 15 min in Waschpuffer bei RT
- Detektion der Sonden:
- 5 min in Detektionspuffer inkubieren
 - Chemilumineszenz-Substrat (CSPD) applizieren
 - Exposition des Röntgenfilms für 20 - 40 min bei 37°C

Zur Filmentwicklung wurden gebrauchsfertige Entwickler- und Fixierlösungen (Sigma Processing Chemicals, Kodak GBX Developer/Replenisher, Kodak GBX Fixer/Replenisher) verwendet.

2.15 AFLP-Analyse

Die AFLP-Technik stellt eine Kombination aus RFLPs und RAPD-Markern dar (VOS et al. 1995). Wie bei der RFLP-Methode wird die DNA eines Organismus mit Restriktionsenzymen geschnitten (meist einem häufig- und einem selten-schneidenden Enzym) und an die entstandenen DNA-Fragmente werden kurze synthetische DNA-Sequenzen (Linker) ligiert, die zur Amplifikation der unbekanntes DNA-Fragmente dienen (ausführlichere Beschreibung s. 1.3.1).

2.15.1 Restriktion der DNA und Ligation der Adaptoren

Die DNA für die AFLP-Analyse wurde lt. Abschnitt 2.8.2 isoliert. Die DNA-Proben wurden auf ca. 400 ng/µl eingestellt (s. 2.9.2). Jeweils 10 µl DNA/Pflanze wurden für den resistenten und suszeptiblen "Pool" (jeweils 9 Pflanzen) gemischt und 5 µl davon in die Restriktion eingesetzt.

Restriktion: Die DNA der "Pools" wurde mit 1. dem häufig schneidenden Enzym *TaqI* (TCGA) und 2. mit dem selten schneidenden Enzym *SacI* (GAGCTC) geschnitten. Da unterschiedliche Restriktions-Puffer benötigt wurden, wurden die Restriktionen nacheinander vorgenommen.

1. *TaqI*-Verdau (20 µl):

5 µl DNA
2 µl *Taq*-Puffer (MBI Fermentas)
20 u *TaqI*
11 µl bidest. H₂O

für 1,5 h bei 65°C inkubieren, danach auf 37°C abkühlen lassen

2. *SacI*-Verdau (100 µl):

zu 1. wurden hinzugefügt:
8 µl Y⁺-Puffer
30 u *SacI*
69 µl bidest. H₂O

für 2 h bei 37°C inkubieren

Um eine Fällung zwischen den beiden Verdauansätzen zu vermeiden, wurde das Volumen des 2. Verdau stark erhöht, so daß der zuerst verwendete Puffer stark verdünnt wurde. Für die 2. Restriktion sollte ein Puffer verwendet werden, in dem die nachfolgend verwendete Ligase ebenfalls aktiv ist.

Ligation: Die Ligation sollte gleich auf die Restriktion der DNA folgen, damit die Enzyme noch aktiv sind und so die Bildung von *Taq-Taq*-Konkatemeren verhindert werden kann. Es wurden Adaptoren (s. Tab. 2.3) ligiert, die an die Schnittstellen der genutzten Enzyme passen und später als Anlagerungsstelle für die Oligonukleotide dienen können.

Dem 100 µl Restriktionsansatz wurden hinzugefügt:

Ligationsansatz (110 µl):

- 1 µl Y⁺-Puffer
- 1 µl ATP (100 mM)
- 1 µl Sac-Adaptoren (5 µM)
- 1 µl Taq-Adaptoren (50 µM)
- 5 u Ligase (HC, MBI Fermentas)
- 5 µl bidest. H₂O

Der Ligationsansatz wurde für 1,5 h bei 37°C inkubiert, so behalten die Restriktionsenzyme ihre Aktivität und können gebildete Konkatemere wieder spalten. Anschließend wurden dem Ligationsansatz nochmals 5 u *TaqI* hinzugefügt und für 30 min bei 65°C inkubiert, zur Spaltung von Konkatemeren und Inaktivierung der Ligase. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

2.15.2 Präamplifikation von AFLP-Fragmenten

Die erste nicht-selektive Amplifikation erfolgte mit Oligonukleotiden S03-N und T00-N, die komplementär zur Adaptorsequenz waren. Anschließend wurde diese 1:10 verdünnt und mit Oligonukleotiden amplifiziert, die ein zusätzliches selektives Nukleotid tragen (s. Tab. 2.3 und Tab. 2.2).

Präamplifikation +0/+0:

50 µl-Ansatz:
 5 µl DNA (unverdünnt aus der Ligation)
 30 ng T-Oligo.
 30 ng S-Oligo.
 1 x PCR-Puffer
 25 mM dNTP
 2,5 u *Taq*-Polymerase
 ad 50 µl bidest. H₂O

Präamplifikation +1/+1:

50 µl-Ansatz:
 5 µl DNA (unverdünnt aus +0/+0)
 30 ng T-Oligo.
 30 ng S-Oligo.
 1 x PCR-Puffer
 25 mM dNTP
 2,5 u *Taq*-Polymerase
 ad 50 µl bidest. H₂O

Prozeßbedingungen für die Präamplifikationen:

Zyklus	Reaktion	Temperatur	Dauer	Wiederholung
1	Denaturierung	94°C	1 min	1 x
	Denaturierung	94°C	30 sec	
2	Anlagerung	56°C	1 min	20 x
	Elongation	72°C	1 min	

Tabelle 2.2: Liste der 16 verschiedenen Kombinationen der Präamplifikation +1/+1:

T20-A	S04-A	T21-C	S04-A	T22-G	S04-A	T23-T	S04-A
	S05-C		S05-C		S05-C		S05-C
	S06-G		S06-G		S06-G		S06-G
	S07-T		S07-T		S07-T		S07-T

2.15.3 5'-Markierung der verwendeten Sac-Oligonukleotide

Unter Verwendung einer Polynukleotidkinase (PNK) wurden die selektiven Oligonukleotide S08 – S23 (s. Tab. 2.3) radioaktiv markiert, um die Anzahl der sichtbaren Banden zu reduzieren. Auf dem Autoradiogramm sind später nur noch *Sac/Sac*- oder *Sac/Taq*-Fragmente sichtbar.

Markierungsansatz für eine Reaktion (0,5 µl):

- 0,07 µl γ^{33} PdATP
- 0,1 µl S-Oligo. (50 ng/µl)
- 0,05 µl PNK-Puffer A
- 0,02 µl PNK
- 0,26 bidest. H₂O

Für 1 h bei 37°C inkubieren, anschließend 15 min bei 65°C inaktivieren. Die markierten Oligonukleotide könne bei –20°C aufbewahrt werden.

2.15.4 Selektive Amplifikation der Präamplifikationen unter Verwendung der radioaktiv-markierten Oligonukleotide

Die Präamplifikation +1/+1 (s Tab. 2.2) diene als Matrize für die PCR mit den selektiven radioaktiv-markierten SacI-Oligonukleotiden. Die Auswahl der Matrizen aus Tab. 2.2 richtete sich nach der verwendeten *Sac*+2/*Taq*+3-Oligonukleotidkombination. Alle Oligonukleotide sind in Tab. 2.3 aufgelistet.

PCR-Ansatz (10 µl):

- 1 µl DNA (1:10 verdünnte Präamplifikation +1/+1)
- 1 x PCR-Puffer
- 25 µM dNTP
- 1,5 u *Taq*-Polymerase
- 0,5 µl Sac-Oligo.*
- 30 ng *Taq*-Oligo.
- ad 10 µl bidest. H₂O

* Pro PCR-Reaktion wird der ganze Markierungsansatz (s. 2.15.3) verwendet.

Prozeßbedingungen der selektiven Amplifikation:

Zyklus	Reaktion	Temperatur	Dauer	Wiederholung
1	Denaturierung	94°C	30 sec	1 x
	Anlagerung	65°C	30 sec	
	Elongation	72°C	1 min	
2	Denaturierung	94°C	30 sec	12 x
	Anlagerung	65 - 56,6°C*	30 sec	
	Elongation	72°C	1 min	
	* pro Zyklus wird die Anlagerungstemp. um 0,7°C verringert			
3	Denaturierung	94°C	30 sec	23 x
	Anlagerung	56°C	30 sec	
	Elongation	72°C	1 min	

Nach der Amplifikation wurden die DNA-Fragmente über ein Polyacrylamid-Gel (s. 2.11.3) aufgetrennt. Für die Detektion der Banden wurde das Polyacrylamid-Gel auf einem Vakuumtrockner für 2 h getrocknet (SLAB Gel Dryer, Hoefer) und für mind. 24 h ein Film (BioMax MR, Kodak, N.Y., USA) exponiert.

Tabelle 2.3: Verwendete AFLP-Oligonukleotide.

Oligoname	Sequenz	selektive Nukleotide
S03-N	GAC TGC GTA CAA GCT C	
S04-A	GAC TGC GTA CAA GCT C	A
S05-C	GAC TGC GTA CAA GCT C	C
S06-G	GAC TGC GTA CAA GCT C	G
S07-T	GAC TGC GTA CAA GCT C	T
S08-AA	GAC TGC GTA CAA GCT C	AA
S09-AC	GAC TGC GTA CAA GCT C	AC
S10-AG	GAC TGC GTA CAA GCT C	AG
S11-AT	GAC TGC GTA CAA GCT C	AT
S12-CA	GAC TGC GTA CAA GCT C	CA
S13-CC	GAC TGC GTA CAA GCT C	CC
S14-CG	GAC TGC GTA CAA GCT C	CG
S15-CT	GAC TGC GTA CAA GCT C	CT
S16-GA	GAC TGC GTA CAA GCT C	GA
S17-GC	GAC TGC GTA CAA GCT C	GC
S18-GG	GAC TGC GTA CAA GCT C	GG
S19-GT	GAC TGC GTA CAA GCT C	GT
S20-TA	GAC TGC GTA CAA GCT C	TA
S21-TC	GAC TGC GTA CAA GCT C	TC
S22-TG	GAC TGC GTA CAA GCT C	TG
S23-TT	GAC TGC GTA CAA GCT C	TT
T00-N	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	
T20-A	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	A
T21-C	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	C
T22-G	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	G
T23-T	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	T
T24-AAA	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	AAA
T25-AAC	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	AAC
T26-AAG	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	AAG
T27-AAT	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	AAT
T28-ACA	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	ACA
T29-ACC	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	ACC

Oligoname	Sequenz	selektive Nukleotide
T30-ACG	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	ACG
T31-ACT	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	ACT
T32-AGA	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	AGA
T33-AGC	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	AGC
T34-AGG	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	AGG
T35-AGT	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	AGT
T36-ATA	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	ATA
T37-ATC	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	ATC
T38-ATG	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	ATG
T39-ATT	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	ATT
T40-CAA	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	CAA
T41-CAC	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	CAC
T42-CAG	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	CAG
T43-CAT	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	CAT
T44-CCA	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	CCA
T45-CCC	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	CCC
T46-CCG	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	CCG
T47-CCT	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	CCT
T48-CGA	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	CGA
T49-CGC	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	CGC
T50-CGG	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	CGG
T51-CGT	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	CGT
T52-CTA	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	CTA
T53-CTC	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	CTC
T54-CTG	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	CTG
T55-CTT	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	CTT
T56-GAA	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	GAA
T57-GAC	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	GAC
T58-GAG	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	GAG
T59-GAT	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	GAT
T60-GCA	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	GCA
T61-GCC	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	GCC
T62-GCG	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	GCG
T63-GCT	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	GCT
T64-GGA	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	GGA
T65-GGC	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	GGC
T66-GGG	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	GGG
T67-GGT	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	GGT
T68-GTA	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	GTA
T69-GTC	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	GTC
T70-GTG	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	GTG
T71-GTT	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	GTT
T72-TAA	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	TAA
T73-TAC	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	TAC
T74-TAG	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	TAG
T75-TAT	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	TAT
T76-TCA	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	TCA
T77-TCC	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	TCC
T78-TCG	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	TCG
T79-TCT	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	TCT
T80-TGA	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	TGA
T81-TGC	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	TGC
T82-TGG	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	TGG
T83-TGT	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	TGT
T84-TTA	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	TTA
T85-TTC	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	TTC
T86-TTG	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	TTG
T87-TTT	GAC GAT GAG TCC TGA CCG A	TTT

Oligoname	Sequenz	selektive Nukleotide
S01-Ad/nPho	CTC GTA GAC TGC GTA CA	
S02-Ad/Pho	CTG ATG TAC GCA GC TTA C	
T18-Ad/nPho	GAC GAT GAG TCC TGA	
T19-Ad/Pho	CGG TCA GGA CTC AT	
Alle Oligonukleotide wurden auf 300ng/µl eingestellt.		

2.15.5 Reamplifikation der AFLP-Fragmente

Zur Bestimmung der Sequenz der AFLP-Banden wurden diese aus dem Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten. Dazu wurde das Gel mit dem Autoradiogramm abgeglichen und die entsprechenden Banden wurden markiert. Das Amplifikat wurde in 200 µl bidest. H₂O ü. N. bei 4°C gelöst. In einen PCR Standardansatz (s. 2.10.1) wurden 5 µl Amplifikat und jeweils 0,6 µl Sac-Oligo. und 2 µl Taq-Oligo. eingesetzt. Die Prozeßbedingungen richteten sich nach Abschnitt 2.10.1. Die Reamplifikationen wurden kloniert (s. 2.13.1) und sequenziert (s. 2.20).

2.15.6 "Reverser AFLP"

Die ausgewählte AFLP-Reaktion wurde wiederholt (s. 2.15.4, 2.11.3) und auf eine Nylonmembran übertragen (s. 2.14.2). Die zu analysierenden reamplifizierten und klonierten AFLP-Fragmente (s. 2.15.5) wurden Dig-markiert (s. 2.14.3) und mit den Membranen hybridisiert (s. 2.14.5).

2.16 Erstellung einer BAC-Bibliothek der resistenten Linie *C. annuum* ECW-30R

2.16.1 Partielle Restriktion der genomischen DNA

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte analog Abschnitt 2.8.3. Jeder "DNA-plug", in sehr kleine Stücke zerschnitten, wurde in 500 µl verdaut:

50 µl Restriktions-Puffer 10 x
 20 µl Spermidin 40 mM
 430 µl bidest. H₂O

Zuerst wurden die klein geschnittenen "plugs" 40 min auf Eis im Restriktionsmix inkubiert, anschließend wurde die entsprechende Menge Restriktionsenzym hinzugefügt und weitere 15 min unter Schütteln auf Eis inkubiert. Es wurden 2,5 – 15 u Enzym eingesetzt. Die Restriktion fand für 15 min bei 37°C statt, abgestoppt wurde die Reaktion mit 100 µl 0,5 M EDTA. Vor dem Beladen des Gels sollte der Puffer sorgfältig abgenommen werden, da das EDTA das Laufverhalten der DNA stören könnte. Die DNA wurde mittels PFGE aufgetrennt und Größenselektioniert (s. 2.11.2). Fragmente zwischen 100 kb und 250 kb wurden aus den präparativen Gelen ausgeschnitten und für die Erstellung der BAC-Bibliothek verwendet.

2.16.2 Ligation der DNA in BAC-Vektoren

Die verdaute (s. 2.16.1) und größenselektionierte (s. 2.11.2) genomische DNA wurde unter Anwendung der Elektroelution (s. 2.12.1) aus der Agarose isoliert und die Konzentration im Agarose-Gel mit Standardlösungen verglichen (s. 2.9.2).

Ligationsansatz 100 µl: 25 ng pIndigoBAC-5
 1 x Ligasepuffer
 30 u Ligase (Promega, 20u/µl)
 125 – 2400 ng DNA
 ad. bidest. H₂O auf 100 µl

Die Ligation wurde ü. N. bei 16°C inkubiert und durch Erhitzen der Proben auf 65°C abgestoppt.

2.16.3 Transformation in elektrokompente *E. coli* Zellen

Da große Mengen der ligierten DNA transformiert werden sollten, mußte die Ligation vorher entsalzt werden. Dazu wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß ca. 1 ml 1%-ige, in 10 mM Glucose gelöste Agarose pipettiert. Um nach Abkühlen der Agarose eine Kuhle zu bilden, wurde auf die flüssige Agarose ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Zum Entsalzen wurde die Ligation vorsichtig auf die Agarose pipettiert und für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Ligationen sollten direkt nach dem Entsalzen transformiert werden, da sie dadurch instabiler werden. Je 2 µl Ligation wurden mit 20 µl elektrokompenten DH10B Zellen (ElectroMAX™, Invitrogen) vermischt. Für die Transformation wurde die Spannung auf 330V reduziert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium bei moderatem Schütteln für 45 min bei 37°C inkubiert. Zur Selektion wurden die Zellen auf 2YT + IPTG + X-Gal + 12,5 µg/ml Chloramphenicol ausplattiert. Dabei

war zu beachten, daß nicht mehr als 2000 – 3000 Kolonien/24 x 24 cm Petrischale wachsen und diese gleichmäßig verteilt sein sollten, um optimale Bedingungen für das Picken der Kolonien durch einen Roboter zu gewährleisten.

2.16.4 Organisation und Sichtung der BAC-Bibliothek

Die ca. 100.000 Einzelkolonien wurden in 263 384-Mikrotiterplatten in 2YT-Medium + 5% Glycerin bei -80°C aufbewahrt. Zur leichteren Identifizierung von BAC-Klonen mittels PCR wurde DNA aller Klone isoliert (s. 2.8.7) und zu verschiedenen "Pools" zusammengefaßt:

- "superpools": Die DNA von je 8 384-Mikrotiterplatten wurden zusammengefasst
⇒ insgesamt 33 "superpools"
- "platepools": Die DNA je einer 384-Mikrotiterplatte wurde zusammengefasst
⇒ insgesamt 263 "platepools".

Für die PCRs wurde die DNA 1:20 verdünnt, wovon je 5 μl in einen Standardansatz (s. 2.10.1) eingesetzt wurden.

- 1. PCR: Auf "Superpool-Ebene" zum Durchmustern der Bibliothek nach positiven Klonen.
- 2. PCR: Testen der 8 "platepools" eines positiven "superpools" zur Isolierung positiver 384-Mikrotiterplatten
- 3. und 4. Kolonie-PCR (s. 2.10): Zur Suche nach positiven Einzelklonen einer 384-Mikrotiterplatte. Dazu wurden die Mikrotiterplatten, wie in 2.8.7 beschrieben, ausplattiert und zuerst alle Reihen einer Platte, später die Einzelkolonien einer positiven Reihe getestet.

2.17 Isolierung von BAC-Endfragmenten

Für die Erstellung eines BAC-Contigs und zur Etablierung neuer Marker war es notwendig, Endfragmente der untersuchten BAC-Klone zu isolieren. Diese DNA-Fragmente wurden auf zwei unterschiedliche Weisen isoliert, mittels spezifischer PCR Amplifikation und durch eine abgewandelte "GenomeWalker"-Methode (Clontech).

2.17.1 Amplifikation von BAC-Endfragmenten mittels spezifischer PCR

Die Inserts der BAC-Klone wurden von beiden Seiten auf einer Länge von ca. 500 bp ansequenziert (s. 2.20). Von der erhaltenen Sequenz wurden Oligonukleotide abgeleitet, die die sequenzierten Enden spezifisch amplifizierten. Die einzelnen Oligonukleotidsequenzen sind in Tab. 2.4 aufgelistet.

2.17.2 Isolierung von BAC-Enden durch ein abgewandeltes "GenomeWalker"-Protokoll

Die "GenomeWalker"-Methode (Clontech) wurde zur Isolierung von BAC-Enden und der Verlängerung von AFLP-Fragmenten genutzt. In Abänderung des unten beschriebenen Protokolls wurden dafür nur die AP1- und AP2-Oligonukleotide verwendet und genomische DNA eingesetzt. Diese Methode basiert darauf, durch Verdau und Ligation von Adaptern unbekannte Sequenzen amplifizieren zu können. Um spezifisch Endfragmente amplifizieren zu können, wurden Oligonukleotide, die auf die Adapter passten (AP1, AP2), und zusätzlich Oligonukleotide, die in den die Klonierungsstellen flankierenden Bereichen binden (BAC-A5, BAC-A6, B1, Seq01, s. Abb. 7.1), verwendet. Für die Isolierung beider Enden wurden die Enzyme *Bst*1107I, *Dra*I, *Eco*RV und *Sac*I eingesetzt. Diese Enzyme schneiden nicht in den die Klonierungsstelle flankierenden Bereichen des BAC-Vektors (s. Abb. 7.1, Anhang): 1 – 383 bp (T7-Ende) und 383 – 793 bp (Sp6-Ende). 250 ng BAC-DNA wurde in einem Vol. von 30 µl unter Verwendung von 20 u Enzym für 2 h bei entsprechenden Temperaturen verdaut, bevor durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA die Reaktion abgestoppt wurde. Anschließend wurden die Linker an die verdaute DNA ligiert. 10 µl des Verdaus wurden unter Zugabe von 0,5 µl ATP (100 µM), 25 ng Linker und 5 u Ligase in dem jeweiligen Restriktionspuffer für 2 h bei RT inkubiert. Abgestoppt wurde die Ligation für 10 min bei 70°C.

GenomeWalker-Linker:



Für die Amplifikation der BAC-Endfragmente wurden für das T7-Ende folgende Oligonukleotide eingesetzt: 1. PCR: BAC-A5/AP1, 2. PCR: BAC-A6/AP2.

Entsprechend für das Sp6-Ende: 1. PCR: B1/AP1, 2. PCR: Seq01/AP2.

Das Volumen des Standard-PCR-Ansatzes (s. 2.10.1) wurde auf 50 µl erhöht. Es wurden 1 µl Ligation (1:10 verdünnt) und je 10 µM pro Oligonukleotid eingesetzt.

Prozeßbedingungen 1. PCR:

Zyklus	Reaktion	Temperatur	Dauer	Wiederholung
1	Denaturierung	94°C	25 sec	7 x
	Elongation	72°C	3 min	
2	Denaturierung	94°C	25 sec	32 x
	Elongation	67°C	3 min	
3	"Fill-in"	67°C	7 min	1 x

Für die 2. PCR wurden 1 µl Amplifikat (1:50 verdünnt) eingesetzt und die Anzahl der Wiederholungen bei Zyklus 1 und 2 auf 5 bzw. 20 reduziert. 5 µl des synthetisierten PCR Produkts wurden auf ein Agarose-Gel aufgetragen. In der Regel war eine spezifische Bande zu erkennen, die direkt sequenziert werden konnte. Von diesen Sequenzen konnten wiederum Oligonukleotide abgeleitet werden, die spezifisch BAC-Endfragmente amplifizieren.

Tabelle 2.4: Oligonukleotide zur spezifischen Isolierung von BAC-Endfragmenten.

Oligonukleotid- Name		Sequenz	PCR-Produkte [bp] T _m f. PCR
BAC 1 (165-2B) Sp6	I	GAGAGGAAATCTTTCAAGCAGCG	328
	II	CAGTGAGATCATCGAGCTCAGC	65°C
BAC 1 (165-2B) T7	I	ATGAATCTCATCCTTTGTCTCC	283
	II	ATTCAACTCAAGATAATACCA	55°C
BAC 2 (170-2B) Sp6	I	wie BAC 1 Sp6	328
	II	wie BAC 1 Sp6	65°C
	III	AGGAATACGTAAAACCTACCTAC	-
	IV	GACATGATGGTCGTGGTAGTAG	-
BAC 2 (170-2B) T7	I	CACCTATCAAGCCTCGACTG	307
	II	TCATCCAACCCTCTCCCTCATCT	67°C
BAC 3 (19-1E) Sp6	I	GTATAGACACCTGAACTAAGACGG	330
	II	CGAAGCATAAATTAGTAGTATTAGG	60°C
BAC 3 (19-1E) T7	I	CATTCTAAATATAAATAGGAC	348
	II	CAGTTCACACTATATGACATTG	50°C
	III	CTTGTGTTGAGATATGGTAC	-
	IV	TGACTGTTAGTTGGCGTGTGAAG	-
	V	TAGCCTGTGAAACAACCTCGTTTTG	-
BAC 13 (43-2H) Sp6	I	GCCACAACCTTCGAAGATAGTG	258
	II	GATTGAAAGATAGTTTGAGTGTC	65°C
BAC 13 (43-2H) T7	I	GAAAGTGATGAAATCTCCAAC	457
	II	CGTGCAACCCACATACTT	59°C
BAC 14 (77-1B) Sp6	I	GAAGAGTCCGAGCAACTTAG	406
	II	GATTATACATAACCCTCCAGG	54°C
BAC 14 (77-1B) T7	I	CATTGAGTTTTYTTGATTGCAG	611
	II	CTATCATGTAATTACCATAG	54°C

Oligonukleotid- Name		Sequenz	PCR-Produkte [bp] Tm f. PCR
	III	CCTAATAGAATTCTTTCCAATATTG	-
	IV	ACTAGTCCAAAGATTGTTTAGG	
BAC 15 (84-1B) Sp6	I	CTACATCTACCACTCTATGAG	387
	II	CATACATAAACCTATGGTTG	54°C
BAC 15 (84-1B) T7	I	AGGACGGCTCAATTACATC	458
	II	GCTAGATTCTCGGTAGGCAT	63°C
BAC 16 (241-4H) Sp6	I	CTTGGATGGCAGAAAGAATC	452
	II	GTGCAGATCATGTGGCTGT	59°C
BAC 16 (241-4H) T7	I	CTTAAAGCCGCACATTGTAG	554
	II	CTTGCAGATAATGGTAGGACAT	63°C
BAC 17 (236-4H) Sp6	I	CGAGTGGACAGGCTTC	184
	II	CTCATGAGAGATGAAC	51°C
BAC 17 (236-4H) T7	I	CCAACGTAACTGCTGTTTC	496
	II	TGCAGTAGCAATTGAAGAC	59°C
BAC 23 (108/2/15) T7	I	CAACACCTTTACCAGAGCGC	463
	II	GTATCGGTCAATGATAAG	51°C
BAC 23 (108/2/15) Sp6	I	TCTGGTAAGTCTTATGCTGCATGG	380
	II	GTGAGAGAATCAGTGGCATGTTG	53°C
BAC 25 (160/22/4) T7	I	CACAATGGGATAATCTCAGC	309
	II	GTATTTAGGAATTGCAGTGAGATG	53°C
BAC 25 (160/22/4) Sp6	I	GATTCAACTAATTCTTATC	345
	II	TATATGGTAGGAGAAT	46°C, Betain
BAC 26 (182/5/10) T7	I	wie BAC 23 Sp6	380
	II	wie BAC 23 Sp6	53°C
BAC 26 (182/5/10) Sp6	I	GATAATCTCCTGTCCAC	361
	II	GTCTATGTAGATGATGTC	51°C
BAC 27 (146/23/11)T7	I	CTTGATTGTTGAACCAATTCATC	434
	II	wie BAC 25 T7	51°C, Betaine
BAC 27 (146/23/11)Sp6	I	wie BAC 23 Sp6	380
	II	wie BAC 23 Sp6	53°C
BAC 128 (142/16/4) T7	I	GTAATGTTAGGGATAATCCCT	416
	II	GAAGTTAGACGATACAGTTC	58°C betaine, +
BAC 128 (142/16/4) Sp6	I	TAGTAGAAGTTTACCAAG	377
	II	ACGGTATTGCTGCTTCTTC	50°C betaine
BAC 29 (183/14/4) Sp6	I	GGACTTTAAGATTGGAGTTGT	504
	II	GTATGTGATATGCGTCAAGACATG	45°C betaine
BAC 29 (183/14/4)T7	I	TCCACTTTCGTACATGTGG	241
	II	GCGACCTGAAAGTTTGGCGCA	58°C betaine
BAC 30 (96/15/5) Sp6	I	AGGTATTCAATATGCAGACA	371
	II	GTGAATGTATGCAGATTGTAT	50°C, betaine
BAC 30 (96/15/5) T7	I	AGTCGACCTGCAGGCATGCA	374
	Ia	GAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGC	
	II	GAGCATGGGAATATCTAACGT	
	III	TCAAGAGTTTAAGCTTCCCATG	
	IV	AGAACATAACATGGGAATTGC	
	V	GTATGAAATCACGATTCAAAGAC	
	VI	CACATAGGTATCAGGTGTTTCATAA	
	VII	CATTGAATTAATAAGAGATTCATGG	
BAC 31 (64/16/10) Sp6	I	TAGTCCCTAAATCCGGAGGA	448
	II	AGGACTGGGAGTGGTTAGTTAAG	59°C

Oligonukleotid-Name		Sequenz	PCR-Produkte [bp] Tm f. PCR
	III	CGCGTAAATGTCAACTTGCCCCTAG	-
	IV	AAGGGTGAAAATACATGCATTATGC	
	V	CTATTGTTACCCATATTTAATACAAG	
BAC 31 (64/16710) T7	I	TGACTGTCAAATATTTGTTGA	372
	II	AGAATGATGATTAGATCATTC	52°C
BAC 32(102/20/15) Sp6	I	ACCTTGAGCTTGAGTTGAGTTGAC	362
	II	GATATGTTGGTTCCTTCAAGATT	57°C
BAC 32 (102/20/15) T7	I	GGTAAAGATTCTCTCCATATTC	238
	II	GATCAGTTATACCTTTGTTTCATAC	52°C, Betain, 40cycl.
BAC33 (138/20/14) Sp6	I	GTTAGCAAATTTACCACTCATCAAC	420
	II	TGTCTCATGTGCGTGGAGTTAACTC	60°C
BAC 33 (138/20714) T7	I	AGCCTTGGCTACATCACACAAG	232
	II	CTCTCCTGCTAACTCTGCACC	60°C
BAC 34 T7	I	GACACATATATTGAAAGCAC	202
	II	GATTTGTATTATGGATTTATATGA	kein Amp. möglich
BAC 34 Sp6	I	CTGGTACTTCTGATCTTGAGAAATA	165
	II	TAGAGAGGCTTACGCAGCAGGTCTC	58°C
BAC 35 (38/14/8) T7	I	GATCTCAATCTCAGATTTAG	182
	II	CATGATACTGAGATACTGAATG	56°C
BAC 35(38/14/8) Sp6	I	GGAAGTCATCTATATTTCACTCAAATG	274
	II	GTAATCATGGATATACTTGTTCATATC	61°C
BAC 36 (152/17/4) T7	I	GCATTGCTTATCAATTTGTTGC	-
	II	TGAACGCTCTCCTGAGTAGGAC	
	III	GGTCGTTTCCACTCATTTTTAGCCTC	244
	IV	ATTGGAAACTCTTCTTCACACTTTTG	55°C
	IA	GAGCTAAGTTTCTTGATGCCT	-
	IIA	CCTGTCACGGATGGCGTCAAG	
BAC 36 (152/17/4)Sp6	I	ATCATCACCAAATACATTTGT	146
	II	ATCCAATTCTCCACATGATAG	59°C
	III	CATACATGGACTCAGAAGGCAGT	308
	IV	TGAGAGGTATGTTTGTGGTATTACC	-
BAC 37 (197/2/12) T7	I	CCTGTCACGGATGGCGTCAAG	-
	II	ACAGCCTGGGCTAGCGCTTG	
	III	GCTCTTCTACCTTAGCTTCTCTCAT	201
	IV	TCACCCGAATTATGCATGTGTCAG	65°C
BAC 37 (197/2/12) Sp6	I	CATGGACTCAGAAGGCAGTTG	316
	II	CATTTGTTAAACCTGAGAGGTATG	60°C
	III	TGGGTTTCATGAACTTCAATAGGAAGC	

Die Länge der PCR-Produkte und Anlagerungstemperaturen sind nur für die verwendeten Oligonukleotid-kombinationen angegeben

2.18 Restriktionsanalyse der BAC-Klone

Um zu bestimmen, wie groß die überlappenden Bereiche der einzelnen BAC-Klone sind, wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Hierzu wurde DNA der verschiedenen Klone jeweils mit *EcoRI*, *HindIII* und *BamHI* verdaut und das Restriktionsmuster der verschiedenen Klone miteinander verglichen. Es wurden jeweils ca. 500 ng BAC-DNA mit 20 u Enzym für 4 h oder ü. N. verdaut. Der gesamte Restriktionsansatz wurde auf einem 0,8%-igem Gel aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der einzelnen Fragmente wurden folgende Längenstandards mit aufgetragen:

Gene Ruler 1 kb ladder (MBI Fermentas) und Hyperladder VI (Bioline).

2.19 Subklonierung von BAC 128

Zur Subklonierung wurde die BAC-DNA des Klons mit den Restriktionsendonukleasen *TasI* (AATT) und *Sau3A* (GATC) partiell gespalten (2.19). Diese Enzyme schneiden häufig in pflanzlicher DNA und generieren kompatible Enden zu *EcoRI* und *BamHI*, die zum Linearisieren des Vektors verwendet wurden.

Für die Restriktion wurde eine Verdünnungsreihe der Enzyme *TasI* und *Sau3A* hergestellt, ausgehend von 5 u bis 0,02 u Enzym. Pro Verdünnung wurden 300 ng DNA eingesetzt und für 15 min 37°C (*TasI* 65°C) inkubiert. Zum Abstoppen wurde der Reaktion 1 µl 0,5 M EDTA hinzugefügt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente in einem nicht mit Ethidiumbromid versetzten 0,8%-igen Agarose-Gel (s. 2.11.1) aufgetrennt. Die fragmentierte DNA wurde zur Klonierung auf Größen von 2,0 – 10,0 kb selektiert, mittels Elektroelution (s. 2.12.1) aus dem Gel isoliert und direkt in die Ligation eingesetzt. Die Ligation erfolgte wie in 2.13.2 beschrieben, es wurden jeweils 10 µl eluierte DNA eingesetzt.

2.20 DNA-Sequenzanalyse

Die direkte Sequenzierung von Insertenden aus vollständigen BAC-Klonen wurde vom Sequenzierservice DLMBC (Dienstleistungen in der Molekularbiologie und Biochemie, M. Meixner, Berlin) durchgeführt.

Die Sequenzierung von kleineren Plasmiden und PCR Produkten wurde in unserem

Labor vorgenommen (ABI 377-Sequenzierautomat, PE Biosystems). Sie erfolgte nach dem Prinzip von Sanger mit sog. Dye-Terminatoren (SANGER et al. 1977). Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte über geeignete Computer-Software (Sequencher[®] 4.1, Gene Codes Corporation und DNA-Star, DNASTAR Inc.).

Die Sequenzierreaktionen erfolgten in einem PCR-Thermoblock nach folgenden Sequenzier-Bedingungen und mit dem Big Dye-Terminator Kit (PE Biosystems).

Prozeßbedingungen:

Zyklus	Reaktion	Temperatur	Dauer	Wiederholung
1	Denaturierung	96°C	1 min	1 x
2	Denaturierung	96°C	10 sec	30 x
	Anlagerung	50°C	20 sec	
	Elongation	60°C	4 min	

Für eine Sequenzierungsreaktion (10 µl) wurden 2 – 4 µl Plasmid oder 0,5 – 2 µl ungereinigtes PCR-Produkt, 20 ng Oligonukleotid und 2 µl Big-Dye-Mix eingesetzt.

2.21 Berechnung der genetischen Abstände

Genetische Distanzen zwischen molekularen Markern wurden über die Rekombinationshäufigkeit zwischen diesen in einer F₂-Pflanzenpopulationen berechnet. Die Berechnung erfolgte nach Allard (ALLARD, 1956):

$$p = \frac{h + 2b}{2n}$$

p = Rekombinationsfrequenz

h = Anzahl der heterozygot-rekombinante F₂-Pflanzen

b = Anzahl der homozygot-rekombinante F₂-Pflanzen

n = Anzahl der getesteten Individuen

3 Ergebnisse

3.1 Markeranreicherung am *Bs3* Locus

Für den *Bs3* Resistenzlocus wurden, wie in Kap. 1.6 beschrieben, bereits gekoppelte AFLP-Marker identifiziert (PIERRE et al. 2000). Ausgehend von den am engsten gekoppelten Markern P23-70 und P22-3, wurden YAC Klone isoliert, die den Resistenzlocus jedoch nicht überspannten (U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Die von den YAC Enden abgeleiteten CAPS-Marker Y152-1 und Y110-2 überspannten ein Intervall von 1,7 cM (s. Abb. 1.4), was in Paprika (*C. annuum*) ca. 2600 kb entspricht (s. 1.4).

Um in diesem Zielintervall die Markerdichte zu erhöhen, sollte eine neue AFLP-Analyse (s. 2.15) durchgeführt werden. Dazu sollten die Individuen für die AFLP-Analyse mittels molekularer Marker vorselektiert werden (THOMAS et al. 1995). Kombiniert wurde dies mit der "bulked segregant-Methode" (TANKSLEY et al. 1995, MICHELMORE et al. 1991). Bei dieser Methode werden die Individuen einer Kreuzungspopulation, die für die Allele der beiden Elternlinien an allen Loci des Genoms segregieren, im Hinblick auf eine bestimmte Merkmalsausprägung (bspw. Resistenz/Anfälligkeit) in zwei Gruppen ("Pools") unterteilt. Diese beiden "Pools" variieren dann nur in der Allelkonfiguration für die mit dem Merkmal korrespondierenden Gene. Für eine AFLP-basierte "bulked segregant" Analyse wird die DNA mehrerer Pflanzen des selben "Pools" gemischt, und anschließend werden die Amplifikationsmuster verglichen. Amplifikate, die nur in einem der beiden "Pools" vorhanden sind, sind mit dem ausgewählten Gen (Resistenz) gekoppelte Marker.

Für die "bulked segregant-Analyse" wurden resistente und susceptible Pflanzen aus der *Bs3* Kartierungspopulation (zu diesem Zeitpunkt ca. 2000 F₂-Pflanzen) ausgewählt. Zusätzlich zur phänotypischen Selektion wurden die Pflanzen für die "Pools" so selektiert, daß diese im 1,7 cM-Zielintervall zwischen den Markern Y152-1 und Y110-2 entweder genotypisch homozygot-resistent oder -suszeptibel waren (s. Abb. 3.1). Der Vorteil, das Zielintervall auf 1,7 cM zu limitieren, lag darin, daß neue AFLP-Marker nur innerhalb dieses Bereichs gefunden werden und andere, weniger eng gekoppelte Marker nicht analysiert zu werden brauchen. Die Verwendung von homozygoten Pflanzen ist

zusätzlich von Nutzen, weil sowohl Marker, die in *cis*, als auch Marker, die in *trans* mit *Bs3* gekoppelt sind, gefunden werden.

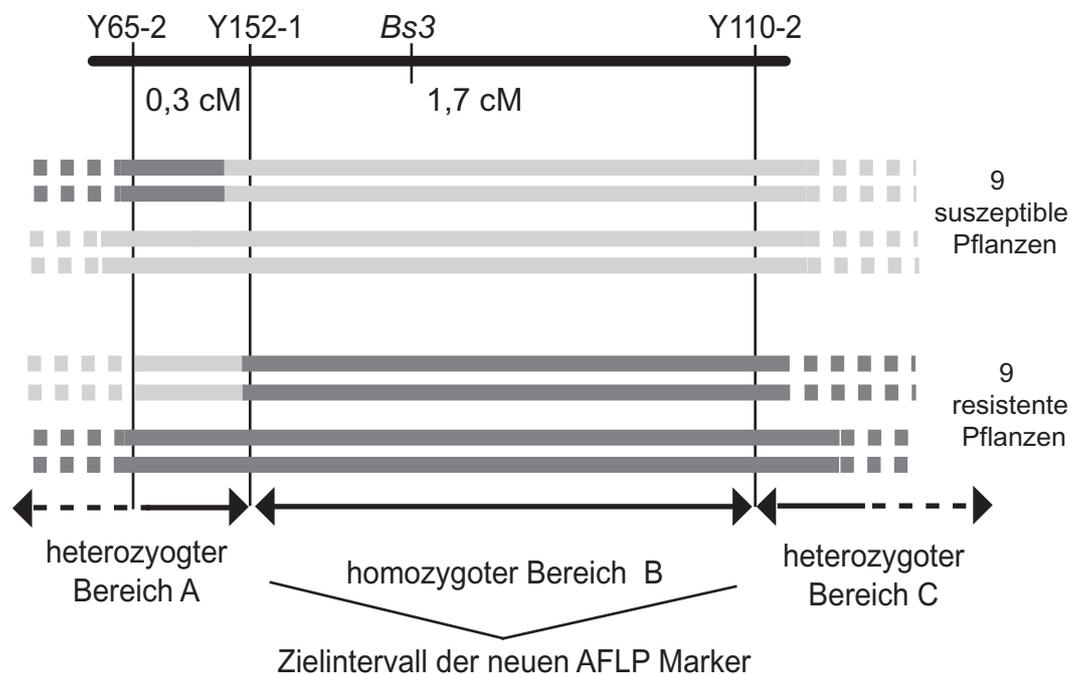


Abbildung 3.1: Graphische Genotypen der AFLP-Individuen.

Das Markerintervall B umfaßt den homozygoten Bereich der ausgewählten Pflanzen. Die Pflanzen weisen entweder kein RE im Markerintervall Y65-2/Y110-2 (Bereiche A u. B.) auf, oder der homozygote Bereich B wird durch ein RE in Bereich A limitiert. Hellgraue Balken stellen Chromosomen mit suszeptibler (*bs3/bs3*) Allel-Konfiguration dar, dunkelgraue Chromosomen mit resistenter (*Bs3/Bs3*), Farbumbrüche geben Rekombinationsereignisse an. Die Strichelung der Balken symbolisiert die restlichen Abschnitte der Chromosomen. Die genetische Distanzen der Intervalle sind in cM angegeben. Die cM-Angaben entsprechen der Datenlage zu Beginn dieser Arbeit (s. Abb. 1.4).

3.1.1 Analyse der verwendeten Pflanzen

Um zu gewährleisten, daß die Pflanzen, die Teil der "Pools" sind, im genannten Zielintervall homozygot waren, wurden sie mit schon vorhanden CAPS-Markern untersucht (s. Abb. 3.1). Zur einen Seite konnte das Zielintervall B durch die Marker Y65-2 und Y152-1 (Bereich A) abgegrenzt werden. Für die "Pools" wurden bis zu fünf Pflanzen verwendet, die ein Rekombinationsereignis im Bereich A aufwiesen (s. Tab. 3.1). Auf der anderen Seite des *Bs3* Genlocus (Bereich C) konnten keine weiteren AFLP-in CAPS-Marker umgewandelt werden, daher stand nur ein Marker (Y110-2) zur Verfügung. Die Selektion von Pflanzen mit Rekombinationsereignissen im Bereich C war

daher nicht möglich. Demzufolge konnte nach dieser Seite hin der homozygote Bereich B nicht eingegrenzt werden. Trotzdem sollten die Bereiche A und C genomweit heterozygot sein, so daß sich die "Pools" nur im homozygoten Intervall B unterscheiden.

In Tab. 3.1 sind die für die AFLP-Analyse verwendeten Pflanzen aufgelistet. Es wurden sowohl F₂-, als auch F₃-Pflanzen der Kartierungspopulation (s. 2.6) verwendet. Die Rekombinanten 360-A, 888-50, 622, 909-B, 1717, 1964, 2074, 2079 und 2140 wurden als resistenter "Pool" zusammengefaßt. Der suszeptible "Pool" beinhaltet die Rekombinanten 559-B, 1428, 1549, 1873, 1956, 2094, 2109, 2112 und 2116. Alle Pflanzen waren im Bereich B (Marker Y152-1/Y110-2) homozygot.

Tabelle 3.1: Ausgewählte Paprika Pflanzen für die AFLP-Analyse.

Pflanzen Nr.	Phänotyp	CAPS-Marker		
		Y65-2	Y152-1	Y110-2
360-A	R	s	r	r
888-50	R	s	r	r
622	R	h	r	r
909-B	R	s	r	r
1717	R	h	r	r
1964	R	r	r	r
2074	R	r	r	r
2079	R	r	r	r
2140	R	r	r	r
559-B	S	r	s	s
1428	S	h	s	s
1549	S	h	s	s
1873	S	h	s	s
1956	S	s	s	s
2094	S	s	s	s
2109	S	s	s	s
2112	S	s	s	s
2116	S	s	s	s

Genotypen: r: (*Bs3/Bs3*), h: (*Bs3/bs3*), s:(*bs3/bs3*)

Phänotypen: R: resistent (HR), S: suszeptibel (WS)

3.1.2 Suche nach neuen AFLP-Markern

Die AFLP-Methode ist eine Verbindung von randomisierter Amplifikation von DNA und der RFLP-Methode (restriction fragment length polymorphism). Dabei wird die DNA eines Organismus mit Restriktionsenzymen geschnitten. An die entstandenen Fragmente werden kurze Linker ligiert, über die die Amplifikation der DNA erfolgen kann (s. 1.3.1). Da in vorangegangenen AFLP-Analysen die Enzymkombinationen *HindIII/MseI* und *PstI/MseI* verwendet wurden (PIERRE et al. 2000), sollte für die neue Analyse die selten-schneidende Restriktionsendonuklease *SacI* mit dem häufig-schneidenden Enzym *TaqI* kombiniert werden. Nach Linker-Ligation (s. 2.15.1) erfolgte die erste Präamplifikation (s. 2.15.2) mit den Adaptor-spezifischen S03-N und T00-N Oligonukleotiden. Der zweite Präamplifikationsschritt wurde mit Oligonukleotiden durchgeführt, die jeweils eine selektive Base aufwiesen (s. 2.15.2). Diese Amplifikation (s. Tab. 2.2) wurde als Ausgangspunkt für die weiteren Amplifikationen mit Oligonukleotiden "S+2" bzw. "T+3" selektiven Basen genutzt. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sowie die der Adapter und die genauen Amplifikationsbedingungen sind in Abschnitt 2.15.3 und in Tab. 2.3 aufgeführt.

Im ganzen wurden 1024 verschiedene Oligonukleotidkombinationen untersucht. Durch Vergleich der Fragmentmuster der Elternlinien ECW-30R (resistent) und PI 197409 (suszeptibel) wurde ein genomweiter Polymorphiegrad von ca. 16 % ermittelt. Ein exemplarischer Ausschnitt einer Amplifikation der Elternlinien ist in Abb. 3.2 A dargestellt. Durchschnittlich wurden pro Oligonukleotidkombination 100 DNA-Fragmente amplifiziert. Gesetzt, jedes AFLP-Fragment entspricht einem genetischen Locus, wurden ca. 16.400 ($1024 \times 100 \times 0,16$) verschiedene Loci auf Kopplung zum *Bs3* Locus analysiert.

Insgesamt wurden 160 differentielle Amplifikate gefunden (entspricht ca. 1% der untersuchten Fragmente). Diese traten je zur Hälfte im resistenten bzw. suszeptiblen "Pool" auf. 58 dieser Polymorphismen konnten in Wiederholungsexperimenten, die unter identischen Bedingungen stattfanden, reproduziert werden. Bei einer nochmaligen Wiederholung konnten elf der 58 Polymorphismen nicht mehr bestätigt werden (s. Tab. 7.2). Die Bezeichnung der 47 identifizierten AFLP-Marker richtete sich nach den verwendeten Oligonukleotidkombinationen. Ein polymorphes Amplifikat, das mit dem

Oligonukleotidpaar S18 und T34 (Pol. 1834) generiert wurde, ist beispielhaft in Abb. 3.2 B dargestellt.

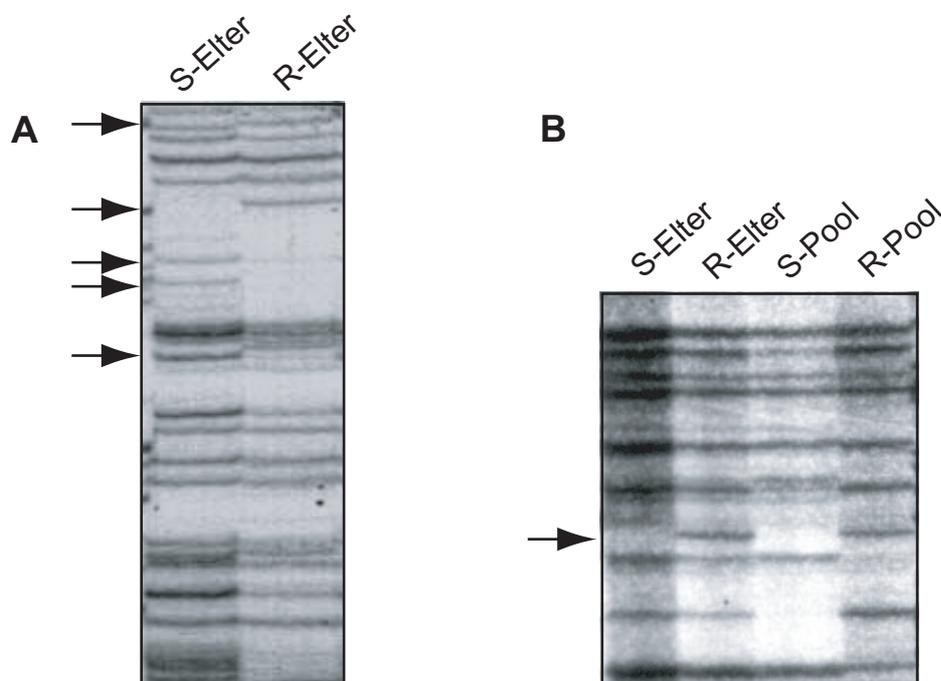


Abbildung 3.2: Ausschnitte aus Autoradiogrammen der AFLP-Marker 1427 und 1834.

A: Vergleich der Amplifikationsmuster der Elternlinien der Kartierungspopulation (Oligonukleotidkombination 1427), die Pfeile zeigen polymorphe Banden an. **B:** Identifizierung des Markers 1834. Das *Bs3*-gekoppelte AFLP Fragment ist in den Elternlinien und den "Pools" durch einen Pfeil gekennzeichnet.

3.1.3 Weitere Analyse der polymorphen AFLP-Fragmente

Durch das Mischen der DNA der "Pool-Pflanzen" und die daraus resultierende Verdünnung besteht die Möglichkeit, daß Fragmente auf den Autoradiogrammen nicht detektiert werden, da die Amplifikation nur sehr schwach erfolgt (LAHAYE et al. 1998). Deshalb sollte überprüft werden, ob die Amplifikation der Einzelpflanzen-DNA übereinstimmende Ergebnisse zur "Pool"-Amplifikation lieferte. D. h. alle Einzelpflanzen sollten das entsprechende resistente oder suszeptible Muster der "Pools" aufweisen. In Abb. 3.3 ist exemplarisch die Amplifikation der Einzelpflanzen für Marker 1834 dargestellt. Das polymorphe Fragment des Markers befindet sich im resistenten "Pool". Von links sind alternierend die resistenten und suszeptiblen Individuen der "Pools"

aufgetragen. Bei jeder resistenten Pflanze ist das polymorphe Fragment zu sehen, dagegen weist keine der suszeptiblen Pflanzen diese Bande auf.

Alle restlichen 47 AFLP-Marker wurden auf diese Weise untersucht. Nur solche Marker sollten zur Eingrenzung des *Bs3* Gens dienen, für die eine eindeutige Cosegregation mit dem *Bs3* Locus gezeigt werden konnte.

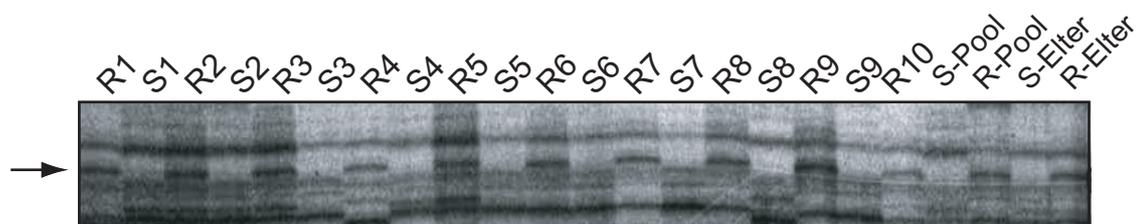


Abbildung 3.3: Autoradiogramm der Einzelpflanzen-Analyse des Markers 1834.

Alternierend sind resistente und suszeptible Pflanzen aufgetragen. Der Pfeil markiert das *Bs3*-gekoppelte Fragment im resistenten "Pool" und den Einzelpflanzen.

Insgesamt 29 der 47 AFLP-Marker mußten verworfen werden, da bei diesen Oligonukleotidkombinationen die Segregation der einzelnen "Pool-Individuen" nicht eindeutig war. Für die verbliebenen 18 AFLP-Marker wurde nun die genetische Distanz zu *Bs3* bestimmt. Dazu wurden diese Marker mit weiteren 26 homozygoten Pflanzen der Kartierungspopulation getestet, die Rekombinationsereignisse zwischen den Markern Y65-2 und Y110-2 aufwiesen (s. Tab. 7.3). Es konnten keine heterozygoten Rekombinanten analysiert werden, da es sich bei AFLP-Markern um dominante Marker handelt. Abb. 3.4 zeigt Autoradiogramme zur Anordnung des Markers 1834. Die mit * markierten Spuren zeigen Pflanzen mit Rekombinationsereignissen zwischen dem AFLP-Marker und dem *Bs3* Locus an. Daher konnte dieser Marker ins Zielintervall eingeordnet werden. Sieben AFLP-Marker waren zwar mit *Bs3* gekoppelt, konnten jedoch nicht im Zielintervall angeordnet werden.

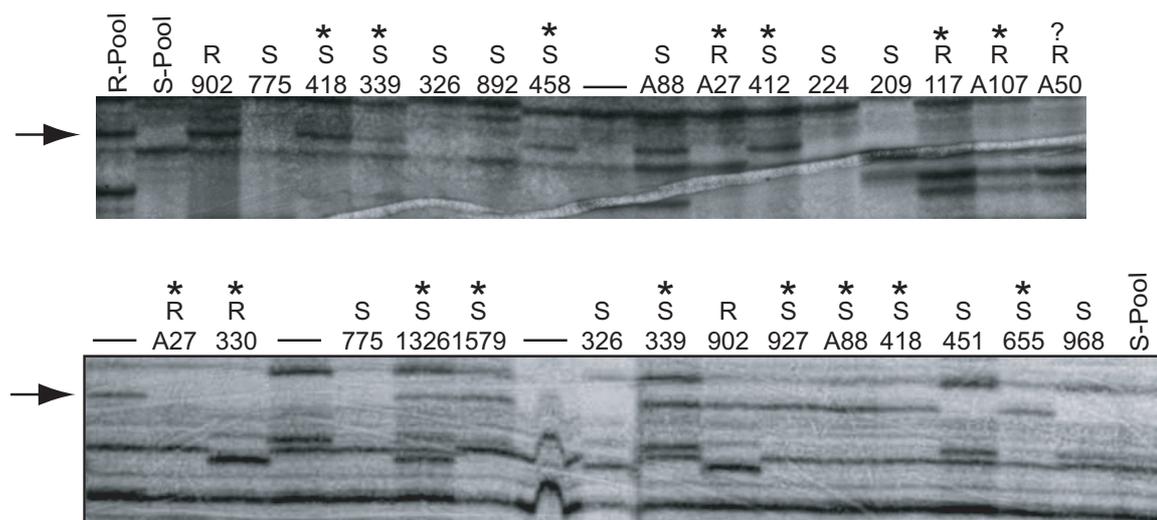


Abbildung 3.4: Autoradiogramme ausgewählter Rekombinanten zur Anordnung des Markers 1834.

R/S über der Pflanzennummer gibt an, ob die Pflanze resistent oder suszeptibel ist. -: diese Pflanzen wurden nicht zur Anordnung des Markers verwendet, *: zeigt Pflanzen an, die ein Rekombinationsereignis zwischen AFLP-Marker und *Bs3* Locus aufweisen.

Das Ergebnis der AFLP-Analyse sind elf neue AFLP-Marker, die ins Zielintervall kartieren. Die genetische Anordnung der elf - eng mit *Bs3* gekoppelten - Marker ist in Abb. 3.5 dargestellt. Sie erfolgte ausschließlich über die 26 mittels AFLP analysierten Rekombinanten. Das entspricht 15% der gesamten Rekombinanten (172) im Intervall Y65-2 und Y110-2. Nur ein Marker (1471) wurde links von *Bs3* in das Intervall zwischen Y152-1 und *Bs3* eingeordnet, während die restlichen zehn Marker im Intervall zwischen *Bs3* und Y110-2 lagen.

Um genauere Informationen über die genetische Kopplung zu *Bs3* zu erhalten, sollten die am engsten mit *Bs3* gekoppelten AFLP-Marker 1471, 1464, 1827 und 2245 in co-dominante CAPS-Marker umgewandelt werden. Mittels CAPS-Marker kann eine größere Anzahl von Rekombinanten (auch heterozygote) der Kartierungspopulation einfacher und schneller getestet werden.

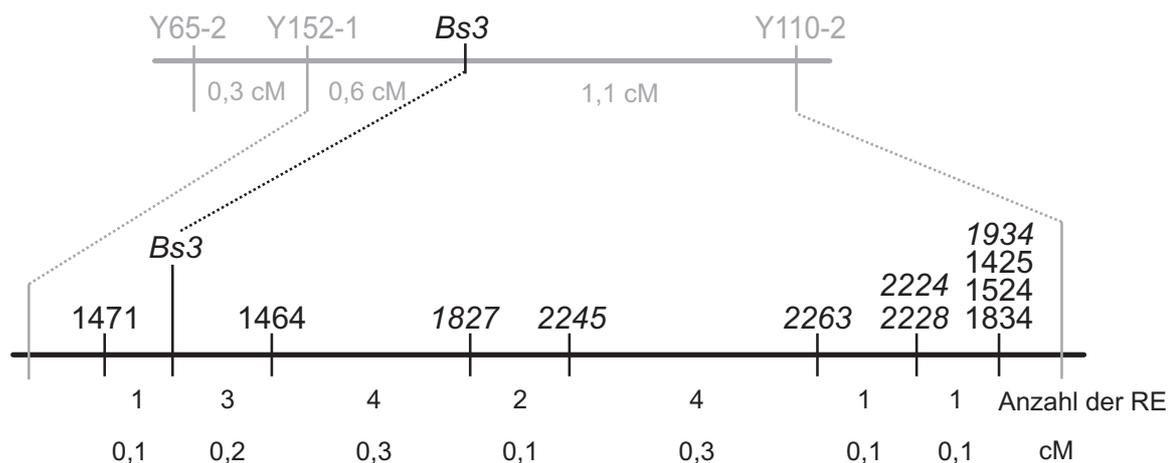


Abbildung 3.5: Genetische Anordnung der neuen AFLP-Marker.

Die Anordnung erfolgte mittels 26 rekombinanter Pflanzen aus der Kartierungspopulation. Zwischen den Markern sind die Anzahl der Rekombinationsereignisse und die genetischen Abstände in cM angegeben. Kursiv dargestellte Marker wurden im suszeptiblen "Pool" gefunden.

3.1.4 Konvertierung der AFLP-Marker in CAPS-Marker

3.1.4.1 Klonierung der AFLP-Fragmente

Zur Konvertierung von AFLP- in CAPS-Marker ist es notwendig, die Sequenz der AFLP-Fragmente zu bestimmen. Dafür wurden die polymorphen Fragmente der Marker 1471, 1464, 1827 und 2245 aus dem AFLP-Gel ausgeschnitten, die DNA wurde in Wasser gelöst und anschließend mit denselben Oligonukleotiden reamplifiziert (s. 2.15.5). Nach Klonierung und Sequenzierung stellte sich heraus, daß bei den Markern 1471, 1464 und 1827 mehrere Fragmente mit unterschiedlicher Sequenz isoliert worden waren. Die Größe dieser Fragmente lag zwischen 134 bp und 700 bp. Die Ergebnisse der Klonierung der AFLP-Fragmente sind in Tab. 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Anzahl und Größe der isolierten AFLP-Fragmente

Marker	Größe [bp]	Polymorphes Fragment in "Pool"	Anzahl isolierter Fragmente
1471	600-700	res	2
1464	134-160	res	11
1827	247-250	sus	4
2245	200	sus	1

3.1.4.2 Identifizierung der korrekten Marker Sequenz

Um aus den klonierten Fragmenten die *Bs3*-gekoppelten AFLP-Fragmente zu identifizieren, wurde die Methode des "reversen AFLP" (PIERRE et al. 2000) angewendet (s. 2.15.6). Dabei macht man sich den Tatbestand zunutze, daß das korrekte Fragment im resistenten und suszeptiblen Elter und "Pool" differentiell sein muß. Im Gegensatz dazu sind nicht-gekoppelte AFLPs in der Regel nicht polymorph.

Für den "reversen AFLP" wurde die AFLP-Amplifikation nochmals durchgeführt, auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran gebロットet (s. Abb. 3.6 A). Die verschiedenen klonierten AFLP-Fragmente wurden als Sonden eingesetzt (s. 2.14.3). Polymorphe Hybridisierungsmuster zwischen resistentem und suszeptiblem "Pool" zeigen an, daß das richtige AFLP-Fragment kloniert wurde. Aus Abb. 3.6 B wird das Hybridisierungsmuster der vier verschiedenen Fragmente des Markers S1827 ersichtlich. Die Sonden 1 - 3 hybridisieren sowohl mit den amplifizierten DNA-Fragmenten des suszeptiblen "Pools" als auch mit denen des resistenten. Nur Sonde 4 zeigt entsprechend den Fragmenten des AFLP-Experiments ein differentielles Hybridisierungsmuster. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß Fragment 4 die DNA-Sequenz des Markers 1827 enthält. Über den gleichen experimentellen Ansatz wurde aus elf klonierten PCR Produkten die zum AFLP-Marker 1464 korrespondierende Sequenz identifiziert.

Die Sequenzbestimmung bei Marker 1471 erfolgte durch die Verwendung von Oligonukleotiden, denen ein zusätzliches spezifisches Nukleotid angehängt wurde. Mit der Kombination S14-A und T71-T wurde eine differentielle Bande amplifiziert, die anderen 15 Kombinationen ergaben ein uniformes Amplifikationsmuster.

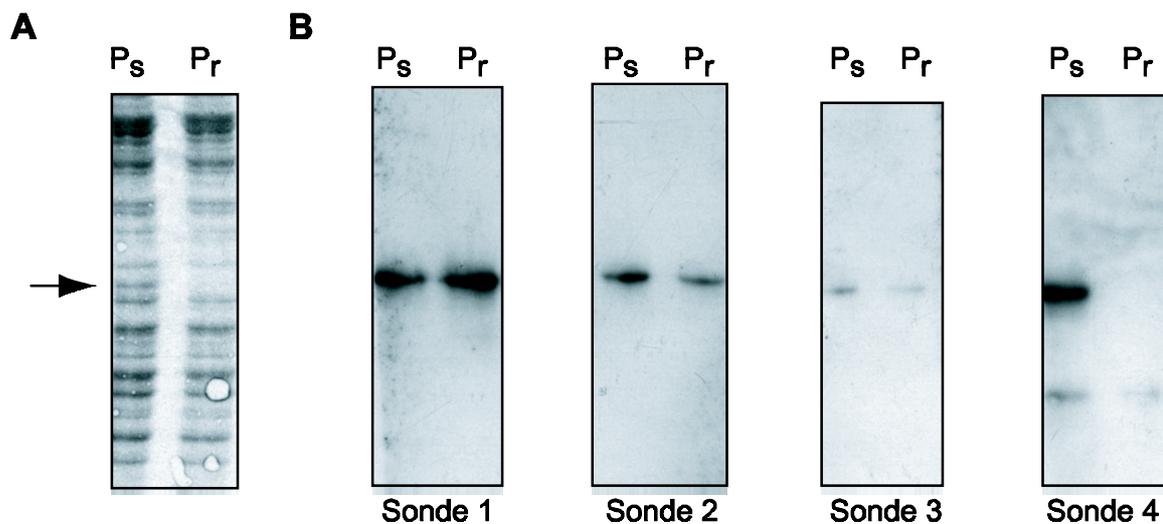


Abbildung 3.6: Identifizierung der Sequenz des AFLP-Markers 1827 mittels "reversen AFLPs".

A: Autoradiogramm der Amplifikation der resistenten und suszeptiblen "Pools" nach Transfer auf eine Nylonmembran. Der Pfeil zeigt das mit *Bs3*-gekoppelte Fragment an. **B:** Immunologischer Nachweis der Hybridisierung der vier isolierten Fragmente. Fragmente 1 - 3 hybridisieren uniform, Fragment 4 hybridisiert nur im suszeptiblen "Pool". P_s: suszeptibler Pool, P_r: resistenter Pool

3.1.4.3 Etablierung von CAPS-Markern

Nachdem die Sequenz der AFLP-Fragmente ermittelt worden war, konnte das korrespondierende Fragment im komplementären Genotyp amplifiziert und sequenziert werden. Zur Ableitung von CAPS-Markern wurden die AFLP-Marker spezifischen Sequenzen des resistenten und suszeptiblen Genotyps verglichen und nach polymorphen Restriktionsschnittstellen gesucht. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit geeigneter Computer-Software (Sequencher® 4.1, Gene Codes Corporation). Außerdem wurde durch Abgleich mit öffentlichen Datenbanken (NCBI BLAST, TIGR) überprüft, ob die erhaltenen Sequenzen als Einzelkopie-Marker verwendet werden konnten.

Die Marker 1827, 1464, 2245 und 1471 zeigten keine Übereinstimmungen mit repetitiven Sequenzen. Vermutlich handelte es sich bei 1827 trotzdem nicht um einen Einzelkopie-Marker, da mit den zehn getesteten Oligonukleotidkombinationen immer mehrere Banden amplifiziert wurden. Zudem wurden bei der Verlängerung des Markers über "GenomeWalker" (s. 2.17.2) viele Fragmente amplifiziert, die der Marker-Sequenz nicht zugeordnet werden konnten. Um auch für Marker 1471 polymorphen Schnittstellen zu ermitteln, wurde die Sequenz des AFLP-Markers 1471 ebenfalls über die "GenomeWalker-Methode" (s. 2.15.7) verlängert. Nach Elongation um ungefähr 1000

Nukleotide konnte eine differentielle Restriktionsschnittstelle ermittelt werden, die jedoch bei der Restriktion der PCR-Produkte von Marker 1471 kein eindeutiges Restriktionsmuster lieferte. Wahrscheinlich wurde mit den Oligonukleotidkombinationen für 1471 weitere Loci im Genom amplifiziert. Daher konnten die AFLP-Marker 1827 und 1471 nicht in CAPS-Marker umgewandelt werden.

Nach vergleichender Sequenzierung der Sequenz des AFLP-Markers 2245 (200 bp) konnten keine Restriktionspolymorphismen ermittelt werden. Deshalb wurde ein dCAPS-Marker (NEFF et al. 1998) abgeleitet. Dazu wurde ein *Eco147I* Polymorphismus über die verwendeten Oligonukleotide eingefügt. Daraus resultieren differentielle Spaltprodukte von 215 bp in PI 197409 und 175 bp in ECW-30R.

Die Sequenz des Markers 1464 wurde mittels "GenomeWalker" auf 1200 bp verlängert (MEYER 2002). Die vergleichende Sequenzierung ergab, daß der AFLP-Polymorphismus auf eine differentielle *TaqI*-Schnittstelle zurückzuführen ist. Diese konnte zur Etablierung eines CAPS-Markers genutzt werden. Nach Amplifikation und Verdau entstehen in ECW-30R (resistent) neun Spaltprodukte und in PI 197409 (suszeptibel) nur sieben. Die aus den AFLP-Markern abgeleiteten CAPS-Marker sind in Tab. 3.3 zusammengefaßt. Sie werden jetzt als S1464 und S2245 bezeichnet, um die Konvertierung in CAPS-Marker zu verdeutlichen.

Tabelle 3.3: Die neuen CAPS-Marker

Name	Größe [bp]	Enzym	Verwendete Oligonukleotide
S1464	1200	<i>TaqI</i> [†]	1464-1 1464-4
S2245	215	<i>Eco147I</i> ⁺	2245-01 2245-A

†: hat eine Schnittstelle zusätzlich im res. Genotyp, +: schneidet im res. Genotyp

3.2 Vergrößerung der Kartierungspopulation

In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits eine Kartierungspopulation von 790 BC und 800 F₂-Pflanzen mit AFLP- und CAPS-Markern getestet und der *Bs3* Locus auf ein 1,7 cM großes Intervall eingegrenzt (s. 1.6).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kartierungspopulation um 3418 auf insgesamt 5008 Pflanzen (davon sind 4218 F₂-Pflanzen) erhöht. Die CAPS-Marker Y65-2 und Y110-2 dienten zur Selektion von Rekombinanten in der Kartierungspopulation. Insgesamt wurden 172 Pflanzen, die ein Rekombinationsereignis (RE) im Zielintervall aufwiesen, identifiziert. Diese wurden in F₃-Familientests (s. 2.7) mittels Inokulation *avrBs3*-exprimierender *Xcv* auf die Allelkonfiguration am *Bs3* Locus getestet.

Durch die Vergrößerung der Kartierungspopulation konnte eine genetische Auflösung von $\pm 0,01$ cM im Zielintervall erreicht werden. Die ermittelten genetischen Distanzen dienen als Basis zur Abschätzung der physikalischen Abstände der genetischen Marker. Dazu wird angenommen, daß eine lineare, über das ganze Genom gleichmäßige Korrelation zwischen genetischer und physikalischer Distanz besteht. Für das Paprikagenom wird durchschnittlich mit 1500 kb pro cM gerechnet (s. 1.4). Demzufolge wird etwa ein RE in 15 kb erwartet.

Die 172 im Zielintervall rekombinanten Pflanzen wurden zusätzlich mit den CAPS-Markern Y152-1, S1464 und S2245 getestet, um den Ort der RE genauer bestimmen zu können. Die sich daraus ergebenden genetischen Abstände sind in Tab. 3.4 aufgelistet. Mit Abständen von 0,16 und 0,24 cM sind die Marker Y152-1 und S1464 am engsten mit *Bs3* gekoppelt. Im Vergleich zu Abb. 3.5 hat sich die Position des Markers Y152-1 verändert. Als Ergebnis der Resistenztests mussten einige RE, die zuerst zwischen Y152-1 und *Bs3* angeordnet worden waren, neu positioniert werden. Zudem wurden bei der Sichtung der vergrößerten Kartierungspopulation nur sehr wenige weitere Rekombinante identifiziert, die ein RE zwischen Y152-1 und *Bs3* aufwiesen.

Basierend auf der genomweiten Korrelation zwischen genetischer und physikalischer Distanz beträgt der Abstand der Marker zu *Bs3* ungefähr 240 (Y152-1) und 360 kb (Y110-2).

Tabelle 3.4: Hochauflösende Kartierung der genetischen Marker in der *Bs3* Region.

Marker	Y65-2	Y152-1	<i>Bs3</i>	S1464	S2245	Y110-2
Y65-2		0,36 (33)	0,51 (47)	0,75 (69)	1,14 (105)	1,90 (172)
Y152-1	0,36 (33)		0,16(14)	0,40 (36)	0,78 (72)	1,51 (139)
<i>Bs3</i>	0,51 (47)	0,16 (14)		0,24 (22)	0,63 (58)	1,36 (125)
S1464	0,75 (69)	0,40 (36)	0,24 (22)		0,40 (36)	1,12 (103)
S2245	1,14 (105)	0,78 (72)	0,63 (58)	0,40 (36)		0,73 (67)
Y110-2	1,90 (172)	1,51 (139)	1,36 (125)	1,12 (103)	0,73 (67)	

Der Abstand zwischen den einzelnen Markern ist in cM angegeben. In Klammern ist die Anzahl der Rekombinationsereignisse aus 5008 Pflanzen aufgeführt.

3.2.1 Gibt es Mutanten am *Bs3* Locus?

Bei der Analyse der rekombinanten F₃-Familien wurden 14 Pflanzenfamilien (aus 4200 F₂-Pflanzen) identifiziert, die am *Bs3* Locus Widersprüche zwischen genotypischer Charakterisierung durch die molekularen Marker und den Resistenztests aufwiesen. Obwohl alle Pflanzen mit den *Bs3*-flankierenden Markern das ECW-30R Allel aufwiesen, waren diese Pflanzen in den F₃-Familiendtests durchweg suszeptibel (s. Tab. 3.5). Die Pflanzenfamilien wurden jeweils mittels mindestens drei unabhängiger Resistenztests überprüft. Für diese wurden je 13 Individuen einer Familie ausgesät. Da die Keimungsrate der Rekombinanten recht unterschiedlich war, wurden durchschnittlich 3 - 13 Pflanzen getestet. Je nach Ursprungspflanze spalten diese Familien in nicht-rekombinant-resistente oder -suszeptible sowie in heterozygot- und homozygot-rekombinante Nachkommen auf. Bei den 14 "widersprüchlichen" Familien wurde bei allen nicht-rekombinanten Nachkommen, die am *Bs3* Locus homozygot das ECW-30R Allel aufwiesen, nie eine HR festgestellt. Das verdeutlicht, daß Widersprüche nicht nur in den rekombinanten Nachkommen zu finden sind, sondern tatsächlich ein Verlust der Avr*Bs3*-spezifischen Erkennung vorliegt. Die unterschiedliche Anordnung der Rekombinationsereignisse der Pflanzen - fünf weisen ein Rekombinationsereignis zwischen Marker S1464 und S2245, drei zwischen S2245 und Y110-2 und sechs zwischen Y65-2 und Y152-1 auf - spricht ebenfalls dafür, daß es sich vermutlich um den Verlust der Erkennung und nicht die falsche Anordnung des *Bs3* Locus innerhalb der genetischen Karte handelt.

Neun der 14 Pflanzenfamilien wurden zusätzlich mit dem *avrBs3*-Derivat *avrBs3Δrep16* getestet, das in ECW eine HR auslöst (s. 1.5.3), um zu überprüfen, ob durch den Verlust der AvrBs3-spezifischen Erkennung neue Resistenzspezifitäten entstanden sind. In den F₃-Familien 543, 775, 1383, 1454, 1285, 1556 und 1689 löste dieses Derivat eine eindeutige HR aus, nicht jedoch in den F₃-Familien 1052 und 2180.

Tabelle 3.5: Resistenzspezifitäten der 14 "widersprüchlichen" F₃-Familien

Pflanzen Nr.	Phänotypen		CAPS-Marker					
	A	B	Y65-2	Y152-1	<i>Bs3</i>	S1464	S2245	Y110-2
543	-	+	r	r		r	h	h
775	-	+	h	h		h	s	s
1383	-	+	h	h		h	s	s
887	-	n.a.	h	h		h	s	s
572	-	n.a.	h	h		h	s	s
687	-	n.a.	r	r		r	r	h
1454	-	+	h	h		h	h	s
1052	-	-	h	h		h	h	s
1285	-	+	h	r		r	r	r
2180	-	-	h	r		r	r	r
2484	-	n.a.	h	r		r	r	r
3279	-	n.a.	h	r		r	r	r
1556	-	+	h	r		r	r	r
1689	-	+	h	r		r	r	r

Genotypen: s: (*bs3/bs3*), r: (*Bs3/Bs3*), h: (*Bs3/bs3*). Phänotypen: -: keine HR, +: HR
A: Test mit *avrBs3*, **B:** Test mit *avrBs3Δrep16*. n. a.: nicht analysiert. Es sind die Genotypen des F₂-Elters angegeben. Die Resistenz der Pflanzen wurde durch Inokulation mit *Xcv* 85-10 (s. oben) überprüft. Die Symptome wurden nach 48 h ausgewertet.

3.2.2 Gibt es ein *Bs16* in PI 197409 *C. frutescens* ?

Wie bereits in der Einleitung angesprochen (s. 1.5), gibt es ein *avrBs3*-Derivat (*avrBs3Δrep16*), welches eine HR in ECW, jedoch nicht in der fast isogenen Linie ECW-30R induziert. Um zu klären, ob das ECW-*Bs16* Allel auch im suszeptiblen Kreuzungspartner PI 197409 der Kartierungspopulation (ECW-30R x PI 197409) vorliegt, wurden 22 F₂-Rekombinante dieser Population in zwei Wiederholungen mit den *Xcv*-Stämmen 85-10 (*avrBs3*⁺) und 85-10 (*avrBs3Δrep16*) und 85-10 (*avrBs3*⁻) getestet (genaue Beschreibung der Stämme s. 2.4). Als Kontrolle dienten Pflanzen der Linie ECW (HR)

und ECW-30R (keine HR). Wie aus Tab. 3.6 ersichtlich wird, induzierte in den elf Pflanzen des PI 197409 Genotyps weder AvrBs3 noch AvrBs3 Δ rep16 eine HR. In vier der acht heterozygoten Pflanzen induzierte AvrBs3 Δ rep16 eine HR. In zwei Pflanzen des Genotyps ECW-30R wurde, entsprechend der Kontrolle, keine HR induziert. Eine Pflanze (1672) zeigte eine HR, allerdings war die HR mit dem AvrBs3-Konstrukt nicht eindeutig. Diese Ergebnisse sind schwer zu interpretieren, da sie aus einer kleinen, nicht repräsentativen Auswahl von Pflanzen resultieren. Die Tatsache, daß eine HR nur in heterozygoten Pflanzen induziert wird, könnte darauf hindeuten, daß *Bs16* und *Bs3* in dieser Kreuzungspopulation nicht gekoppelt sind.

Tabelle 3.6: Test auf *Bs16*-spezifische HR ausgewählter F₂-Pflanzen der Kartierungspopulation

Rekomb. Pflanzen.	Genotyp am <i>Bs3</i> Locus	85-10	85-10 <i>avrBs3</i>	85-10 <i>avrBs3Δrep16</i>	Rekomb. Pflanzen	Genotyp am <i>Bs3</i> Locus	85-10	85-10 <i>avrBs3</i>	85-10 <i>avrBs3Δrep16</i>
1579	PI 197409	-	-	-	1880	h	-	+	-
1822	PI 197409	-	-	-	1518	h	-	+	+
1843	PI 197409	-	-	-	1653	h	-	+	+
1873	PI 197409	-	-	-	1405	h	-	+	-
1026	PI 197409	-	-	-	1564	ECW-30R	-	+	-
133	PI 197409	-	-	-	1566	ECW-30R	-	+	-
1425	PI 197409	-	-	-	1672	ECW-30R	-	(+)	+
1428	PI 197409	-	-	-	PI 197409	PI 197409	-	-	-
1537	PI 197409	-	-	-	ECW-30R	ECW-30R	-	+	-
1547	PI 197409	-	-	-	ECW	ECW	-	+	+
1549	PI 197409	-	-	-					
1583	h	-	+	(+)					
1585	h	-	+	+					
1729	h	-	+	-					
1741	h	-	+	-					

h: heterozygot, +: HR, (+): schwache HR, -: keine HR

Die F₂-Rekombinanten wurden mittels CAPS-Marker Y152-1 und Y110-2 genotypisch charakterisiert und die Allelkonfiguration am *Bs3* Locus durch *Xcv*-Inokulation (s. oben) überprüft. Die Symptome wurden nach 48 h ausgewertet.

3.3 Erstellung einer genomischen BAC-Bibliothek der resistenten Linie ECW-30R

Zur physikalischen Eingrenzung des *Bs3* Locus sollte ein BAC-Contig erstellt werden, welcher das *Bs3* Gen überspannt. Die genomischen Inserts von BAC-Klonen sind in der Regel 100 – 150 kb groß und damit wesentlich kleiner als die von YAC Klonen (400 - 500 kb), allerdings sind sie schneller und einfacher zu handhaben. Durch die größere Stabilität der Insert-DNA sind chimäre Klone, die in YAC Bibliotheken häufig vorkommen, in BAC-Bibliotheken äußerst selten (KIM et al. 1996, SHIZUYA et al. 1992). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach Möglichkeiten gesucht, vorhandene Paprika BAC-Bibliotheken für die Isolierung von BAC-Klonen in der *Bs3* Region zu nutzen. Eine BAC-Bibliothek (HD208, *bs3/bs3*), die jedoch nicht das *Bs3* Resistenzgen enthält, steht im INRA Evry (Abdel Bendahmane) zur Verfügung (RUFFEL et al. 2002). Diese wurde für die Isolierung erster BAC-Klone genutzt (s. 3.4). Da jedoch für die Komplementationsanalysen zwingend genomische Klone der resistenten Linie am *Bs3* Locus benötigt wurden, war es notwendig, eine BAC-Bibliothek der resistenten Linie ECW-30R zu erstellen. Die Insertgrößen sollten zwischen 100 und 250 kb liegen, und es sollte eine vierfache Abdeckung des Paprikagenoms (ca. 100.000 Klone) erreicht werden. Dank eines EMBO-Kurzzeitstipendiums war es möglich, diese Arbeiten am CIRAD - AMIS Montpellier (Pietro Piffanelli) durchzuführen. Dieses Institut ist mit der nötigen technischen Ausstattung (z. B. Roboter zum Picken der Einzelklone) ausgerüstet, und es wurden dort schon diverse BAC-Bibliotheken der unterschiedlichsten Pflanzenarten erstellt (VILARINHOS et al. 2003, CLÉMENT et al. 2004).

3.3.1 Isolierung hochmolekularer DNA

Einer der kritischsten Punkte bei der Erstellung einer genomischen Bibliothek mit großen Inserts ist die Isolierung hochmolekularer DNA. Bei den meisten standardisierten DNA Extraktions-Protokollen wird die DNA in kleinere Fragmente geschert. Um dies zu verhindern, wurden Zellkerne aus Paprikablättern isoliert (s. 2.8.3). Erste Kernextraktionen zeigten, daß die erhaltene Suspension sehr stärkehaltig war. Dies könnte einen ungünstigen Einfluß auf die nachfolgende Restriktion der DNA haben. Deshalb wurden die Paprikapflanzen vor weiteren Extraktionen für 24 Stunden in

Dunkelheit gehalten, was den Stärkegehalt der Blätter und der daraus resultierenden Kernsuspensionen stark verringerte.

3.3.2 Partielle Restriktion und Größenselektion der DNA-Fragmente

Um DNA-Fragmentgrößen zwischen 100 und 250 kb zu erhalten, wurden partielle Restriktionen (s. 2.16.1) mit den Endonukleasen *Hind*III (s. Abb. 3.7) und *Bam*HI durchgeführt. Um möglichst wenige Fragmente, die < 100 kb sind in den BAC-Vektor (pIndigoBAC-5 [ready-to-use *Hind*III bzw. *Bam*HI], Epicentre) zu ligieren, wurden die DNA-Fragmente einer zweifachen Größenselektion mittels PFGE (pulsed field gel electrophoresis, s. 2.11.2) unterzogen. Obwohl die erste Gelelektrophorese dazu dient, DNA-Fragmente gleichmäßig aufzutrennen, sind oft in den Fraktionen noch Fragmente < 100 kb zu finden. Daher sollte die zweite gelelektrophoretische Auftrennung helfen, diese kleineren Fragmente zu eliminieren (VILARINHOS et al. 2003).

Zur Größenselektion (s. 2.11.2) wurden Fragmente von 100 - 250 kb aus dem ersten Gel ausgeschnitten. Diese wurden auf ein neues Gel transferiert und nochmals mit einer kürzeren Pulslänge von 3 s aufgetrennt. Die DNA wurde mittels Elektroelution (s. 2.12.1) aus den Agaroseblöcken eluiert und anschließend direkt in die Ligation eingesetzt.

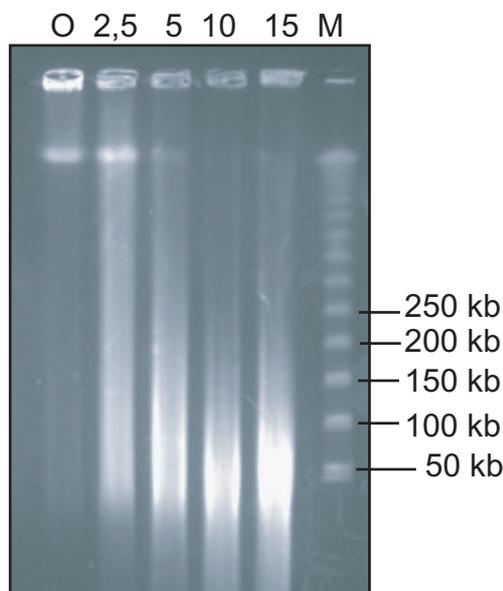


Abbildung 3.7: Partielle *Hind*III-Restriktion genomischer ECW-30R DNA.

Die Auftrennung erfolgte mittels PFGE unter folgenden Bedingungen: 6V/cm, Pulslänge 1 – 50 s, Reorientierungswinkel 120°, 20 h bei 14°C in 0,5 x TBE.. M: Lambda ladder PFG I Marker (Biolabs). Die DNA wurde mit unterschiedlichen (0; 2,5; 5; 10 und 15) Enzymeinheiten gespalten. Die Restriktion mit 2,5 und 5 Enzymeinheiten ergibt die größte Ausbeute an Fragmenten zwischen 100 und 300 kb.

3.3.3 Ligation und durchschnittliche Insertgrößen der BAC-Klone

Es wurden 33 verschiedene Ligationen vorgenommen. In der Regel wurden für jede Ligation (s. 2.16.2) 25 ng Vektor-DNA und 125 – 2400 ng DNA-Fragmente eingesetzt. Die stabilsten Ligationen und, daraus resultierend, die meisten Klone wurden mit Verhältnissen zwischen DNA und Vektor von 30:1 bis 64:1 erzielt. 157 Klone wurden willkürlich aus allen Ligationen ausgewählt, um die Insertgrößen zu ermitteln.

Die "multiple cloning site" des BAC-Vektors wird von zwei *NotI*-Schnittstellen (GCGGCCGC) flankiert. Da dieses Enzym sehr selten in pflanzlicher DNA schneidet, ist anzunehmen, daß die meisten Inserts in voller Länge aus dem Vektor geschnitten werden. In Abb. 3.8 ist die Verteilung der Insertgrößen der getesteten *HindIII*-Klone dargestellt. Mehr als 60 Klone enthalten ein Insert von 100 - 110 kb, weniger als 10 wiesen Insertgrößen kleiner 90 kb auf. Inserts größer als 110 kb traten in mehr als 50 Klonen auf. Da die meisten *BamHI*-Ligationen keine oder nur kleine Inserts enthielten, wurden nur 3000 *BamHI*-Klone für die Bibliothek verwendet.

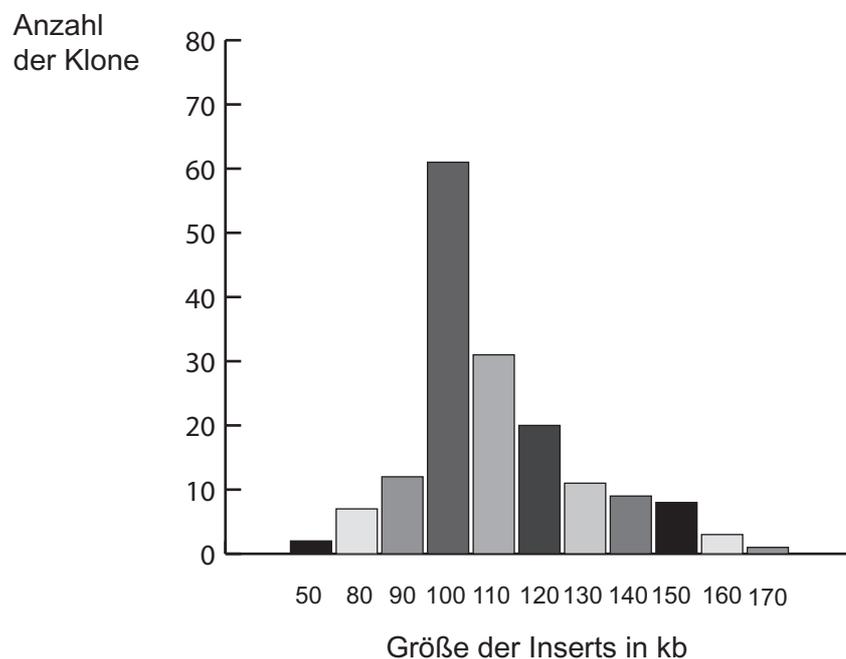


Abbildung 3.8: Verteilung der Insertgrößen der *HindIII*-Klone der BAC-Bibliothek.

Auf der x-Achse sind die Insertgrößen in kb angegeben. Die Höhe der Balken gibt die Häufigkeit bestimmter Insertgrößen an.

3.3.4 Organisation der BAC-Bibliothek

Insgesamt wurden 100.992 Kolonien, davon 97.990 *HindIII* und 3002 *BamHI* Klone, als Einzelklone in 263 384-er Mikrotiterplatten überführt. Bei einer durchschnittlichen Insertgröße von 110 - 120 kb entspricht das einer Abdeckung von vier Paprikagenom-Äquivalenten.

Die Sichtung der BAC-Bibliothek sollte mittels PCR vorgenommen werden. Dazu wurde von allen 384-er Mikrotiterplatten DNA extrahiert (s. 2.8.7). Diese wurde als "platepool-DNA" bezeichnet. Um die Sichtung der Bibliothek zu vereinfachen, wurde nochmals DNA von allen Mikrotiterplatten isoliert und die DNA von acht Platten zu einem "superpool" vereinigt. Abb. 3.9 veranschaulicht schematisch die Organisation der BAC-Bibliothek und die Vorgehensweise bei einer PCR-basierten Sichtung dieser genomischen Bibliothek.

Zur Sichtung der Bibliothek (s. 2.16.4) mit einem PCR-Marker erfolgte zuerst eine Amplifikation der 33 "superpools". Für diejenigen "superpools", in denen ein Fragment richtiger Größe amplifiziert werden konnte, wurden die acht "platepools" getestet. Die positiven Mikrotiterplatten wurden als Duplikate repliziert. Um die Einzelkolonie zu finden, die das gewünschte Markerfragment enthält, wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Zuerst wurden alle 24 Reihen als "Pools" getestet. Als letzter Schritt wurden dann die Einzelkolonien der Reihen, die das Marker Fragment enthielten, analysiert. Um mit einem Marker eine Kolonie zu finden, die das entsprechende Fragment enthält, sind also 81 PCR Reaktionen notwendig.

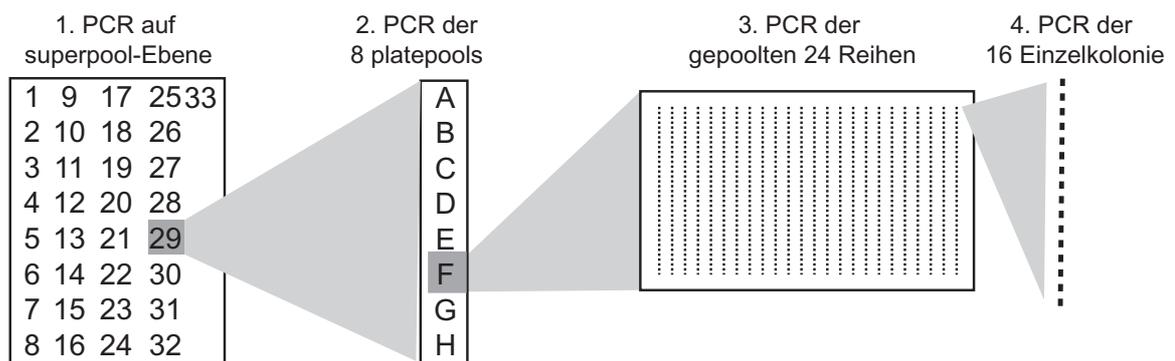


Abbildung 3.9: Schema der Organisation der BAC-Bibliothek zur Analyse mittels PCR

3.4 Identifizierung von BAC-Klonen in der *Bs3* Region

Wie unter 3.3 erwähnt, wurden die zwei BAC-Bibliotheken HD208 (RUFFEL et al. 2002) und ECW-30R (diese Arbeit) zur Suche nach BAC-Klonen, die die *Bs3* Region limitieren, herangezogen. Erste Klone sollten mit den Markern Y152-1 und S1464, die zu diesem Zeitpunkt am engsten mit *Bs3* gekoppelt waren (0,16 bzw. 0,24 cM), in der BAC-Bibliothek HD208 isoliert werden, da zu diesem Zeitpunkt noch keine ECW-30R Bibliothek vorhanden war. Bibliothek HD208 enthält zwölf Genomäquivalente und kann ebenfalls mittels PCR analysiert werden.

Während in der Bibliothek HD208 mit Marker Y152-1 kein Klon isoliert werden konnte, wurden für den Marker S1464 drei Klone (BACs 1, 2 und 3) identifiziert. Über das T7-Endfragment (s. 2.17.1 und 3.4.2) des Klons BAC 3 konnten zehn weitere Klone isoliert werden. Vier davon (13, 14, 17 und 18) konnten mittels Überlappungsanalysen (s. 3.4.4) eindeutig einander zugeordnet werden (s. Tab. 3.8 und Abb. 3.13). Insgesamt wurden in dieser Bibliothek 13 Klone isoliert, von denen sieben zu einem Contig angeordnet werden konnten (s. Abb. 3.13).

Die neu erstellte BAC-Bibliothek ECW-30R wurde im ersten Schritt mit Marker Y152-1 und mit dem - zu diesem Zeitpunkt am engsten mit *Bs3*-gekoppelten - BAC-Ende B14T7 analysiert (s. Abb. 3.13). Es konnte ein Klon, der den Marker Y152-1 enthält, isoliert werden, sowie vier Klone für Marker B14T7. Der BAC-Klon 128 (identifiziert mit Y152-1) wurde in der Diplomarbeit von Patrick Römer weiter bearbeitet. Über das BAC-Ende B128T7 konnten zwei weitere Klone identifiziert werden, die homologe Bereiche zu diesem BAC-Ende enthielten (Diplomarbeit, Patrick Römer).

In drei aufeinanderfolgenden Durchmusterungen mit den BAC-Enden B23Sp6, B30T7 und B31T7 wurden zusätzlich elf BAC-Klone identifiziert, von denen sich jedoch acht als falsch-positiv herausstellten.

Insgesamt wurden in der Bibliothek ECW-30R 20 Klone isoliert, von denen sich zehn (23, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 128, 103, 104) zu zwei Contigs anordnen ließen (s. Tab. 3.8 und Abb. 3.13).

3.4.1 Überprüfung von BAC-Klonen, die mittels PCR isoliert wurden

Die Sichtung von genomischen Bibliotheken mittels PCR ist in der Handhabung einfach und effizient. Bei repetitiven oder duplizierten Bereichen im Genom kann es dennoch zur gehäuften Isolierung falsch-positiver Klone kommen, da mehrere Loci gleichzeitig amplifiziert und so BAC-Klone aus unterschiedlichen Bereichen des Genoms mit dem selben Marker isoliert werden. Da das *C. annuum* Genom relativ groß ist (ca. 3000 Mb), ist ein hoher Prozentsatz nicht kodierender, putativ repetitiver Regionen zu erwarten.

Um die falsch-positiven Klone auszusortieren, wurden die mittels PCR identifizierten Klone durch Hybridisierungsexperimente überprüft (s. 2.14). Dazu wurde die DNA aller Klone mit dem Restriktionsenzym, welches für die Klonierung verwendet wurde, geschnitten. Die Hybridisierung wurde mit BAC-Enden durchgeführt, mit denen die BAC-Klone identifiziert wurden. In Abb. 3.10 ist exemplarisch die Hybridisierung der BAC-Klone 128, 30, 31, 32 und 33 mit dem T7-Ende von BAC 30 dargestellt. Da alle fünf Klone über *Hind*III-Schnittstellen in den Vektor kloniert wurden, sollten die homologen Bereiche der Klone identische Sequenzen und damit das gleiche Hybridisierungsmuster aufzeigen. BAC 128 wurde als Negativkontrolle verwendet, da dieser Klon mit dem Marker Y152-1 isoliert wurde und keinerlei Überlappungen mit BAC 30 aufweist. Bei der Hybridisierung mit dem BAC-Ende B30T7 dient das Signal in BAC 30 als Positivkontrolle. BAC-Klone, die von den in diesem BAC detektierten Fragmenten abweichende Hybridisierungsmuster zeigen, sind falsch-positiv. Umgekehrt sind übereinstimmende Hybridisierungsmuster ein Hinweis für einen korrekt identifizierten Klon. Die Hybridisierungssignale von BAC 32 und 33 mit der Sonde B30T7 zeigen bspw. keine Übereinstimmung mit den Signalen in der Positivkontrolle BAC 30, im Gegensatz zu Klon 31, der mit BAC 30 übereinstimmt. Dies läßt darauf schließen, daß es sich bei den BACs 32 und 33 um falsch-positive Klone handelt.

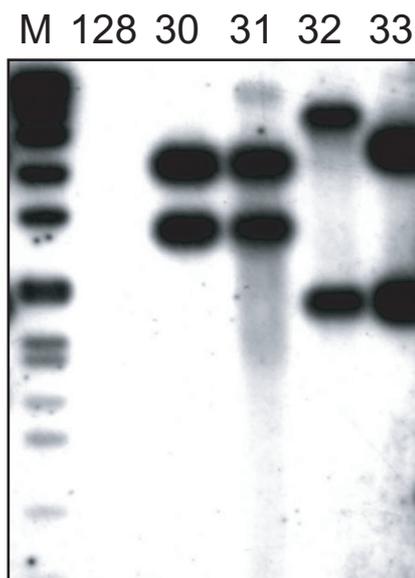


Abbildung 3.10: Hybridisierungs-basierte Überprüfung der BAC-Klone 128, 30, 31, 32 und 33.

Immunologischer Nachweis der Hybridisierung. M: DNA Molecular Weight Marker VII, Dig markiert (Roche Diagnostics)

3.4.2 Isolierung von BAC-Endfragmenten

Als Grundlage für Überlappungsanalysen (s. 3.4.4) müssen die Endfragmente der BAC-Inserts isoliert werden.

Die meisten Endfragmente der BAC-Inserts wurden durch direkte Sequenzierung des Inserts mit pIndigoBAC-5-spezifischen Oligonukleotiden isoliert (s. 2.17.1). Von der erhaltenen Sequenz wurden Oligonukleotide abgeleitet, die spezifisch das T7- oder Sp6-Ende amplifizieren. Die Bezeichnungen T7 und Sp6 leiten sich von der Lage der Sequenzieroligonukleotide in der Vektorkarte ab (s. Abb. 7.1). Insert Enden, die mit pIB FP-1 ansequenziert wurden, wurden als das T7-Ende definiert. Entsprechend gilt für das Sp6-Ende der Inserts, daß sie mit pIB RP-1 ansequenziert wurden. Für die Sequenzierung der Inserts der Klone, die in der Bibliothek HD208 identifiziert wurden, wurden die Oligonukleotide Sp6 und T7 verwendet (s. 2.20, M. Meixner). Danach richtete sich dann die Bezeichnung der Insert Enden der Klone.

Bei einigen Klonen wurden die Endfragmente jedoch über eine auf der "GenomeWalker"-Technik (Clontech) basierenden Strategie (s. 2.17.2) isoliert. Die Restriktionsenzyme zur Fragmentierung der Insert-DNA wurden so gewählt, daß jeweils ein Teil des BAC-Vektors erhalten blieb, da dieser als Bindestelle für ein Oligonukleotid für die Endfragment-spezifische Amplifikation notwendig war (s. Abb. 7.1). Nach

Restriktion und Ligation der Adaptoren an die DNA-Fragmente wurde diese mit einer Kombination von Adaptor- und BAC-Vektorspezifischen Oligonukleotiden amplifiziert, um spezifisch die Endfragmente der Inserts zu erhalten (s. Abb. 7.1). Die PCR Produkte konnten anschließend direkt sequenziert werden (s. 2.20).

Durch einen Vergleich der Nukleotidsequenzen mit öffentlichen Datenbanken (NCBI BLAST, TIGR) wurde nachgeprüft, ob diese Ähnlichkeiten zu repetitiven Sequenzabschnitten aufweisen. Homologien zu repetitiven Elementen wurden nicht ermittelt, aber generell zeigten alle Sequenzen einen hohen Gehalt an Adenin- und Thymin-Nukleotiden auf. Dadurch war es oftmals schwierig, Oligonukleotide abzuleiten, die eine spezifische und effiziente Amplifikation ermöglichten.

3.4.3 Bestimmung der Insertgrößen der BAC-Klone

Die Größenbestimmung einiger BAC-Klone ist in Abb. 3.11 exemplarisch dargestellt.

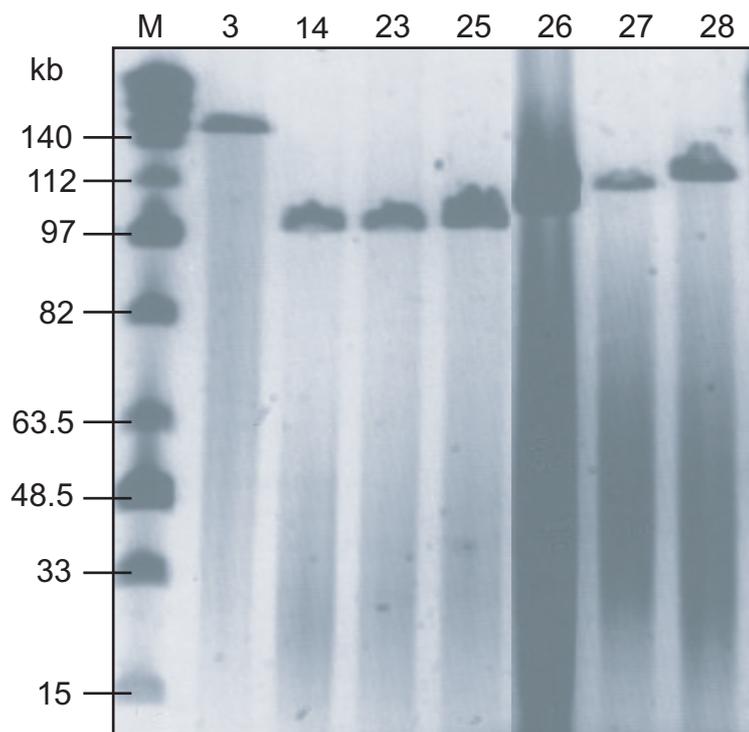


Abbildung 3.11: Größenbestimmung ausgewählter BAC-Inserts mittels PFGE.

Die Auftrennung erfolgte auf einem 1% Agarose-Gel bei: 6V/cm, Pulslänge 1 – 50 s, Reorientierungswinkel 120°, 20 h bei 14°C in 0,5 x TBE. M: Midrange I PFG Marker (Biolabs). Die Zahlen über den Spuren geben die Nummern der untersuchten BAC-Klone an.

Zur Größenbestimmung wurde zunächst das Insert durch einen Verdau der BAC-DNA mit dem Restriktionsenzym *NotI* aus dem Vektor herausgeschnitten. Wie bereits unter

3.3.3 angeführt, schneidet *NotI* sehr selten in pflanzlicher DNA, d. h. in der Mehrzahl der Fälle sind keine *NotI*-Schnittstellen in den Inserts zu erwarten. Die Insert-DNA wurde mittels PFGE (s. 2.11.2) aufgetrennt, und die Länge der DNA-Fragmente über den Vergleich zum Midrange I PFG Marker (Biolabs) bestimmt. In Tab. 3.7 sind die Größen aller BAC-Inserts aufgelistet.

Tabelle 3.7: Insertgrößen der isolierten BAC-Klone.

BAC Nr.	identifiziert mit	Insertgröße [kb]
1	S1464	100
2	S1464	112
3	S1464	140
13	3T7	145
14	3T7	100
15	3T7	93
17	3T7	82
18	3T7	114
23	14T7	100
25	14T7	105
26	14T7	107
27	14T7	110
29	23Sp6	98
30	23Sp6	108
128	Y152-1	112
103	128T7	100
104	128T7	130

3.4.4 Überlappungsanalysen der isolierten BAC-Klone

Bei einem "chromosome walk" werden nach jeder Marker-basierten Sichtung der Bibliothek die isolierten Klone mittels Überlappungsanalyse in einem physikalischen Contig zueinander angeordnet. Die Grundlage dieser Contig-Analyse stellten hier die isolierten BAC-Endfragmente dar. Mit BAC-End spezifischen Oligonukleotidpaaren wurde die Präsenz bzw. das Fehlen eines korrespondierenden Sequenzbereichs in anderen BAC-Inserts untersucht. In einem komplementären experimentellen Ansatz wurden die BAC-Endfragmente als Sonden in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt, um die Ergebnisse der PCR-gestützten Analysen zu veri- bzw. falsifizieren. Diese Resultate und

die der Hybridisierungsexperimente sind in Tab. 3.8 zusammengefaßt. Die Sequenzierung der Endfragmente ergab außerdem, daß einige der Endfragmente identisch sind: das Sp6-Ende von BAC 1 ist identisch zum Sp6-Ende von BAC 2, und das T7-Ende von BAC 26 ist identisch zu den Sp6-Enden der BAC-Klone 23 und 27. Vermutlich gibt es Restriktionsschnittstellen im Genom, die bevorzugt erkannt werden. Daher werden trotz des partiellen Verdaus mehrere DNA-Fragmente mit identischen Endsequenzen kloniert.

Um zu klären, inwieweit BAC-Klone identisch sind, werden Restriktionsanalysen (Fingerprints) durchgeführt. Für die "Fingerprint-Analysen" (s. 2.18) wurden die BAC-Inserts mit dem Restriktionsenzym *Hind*III geschnitten und die DNA-Fragmente über Agarose-Gelelektrophorese größenfraktioniert. In Abb. 3.12 ist die Restriktionsanalyse ausgewählter Klone dargestellt.

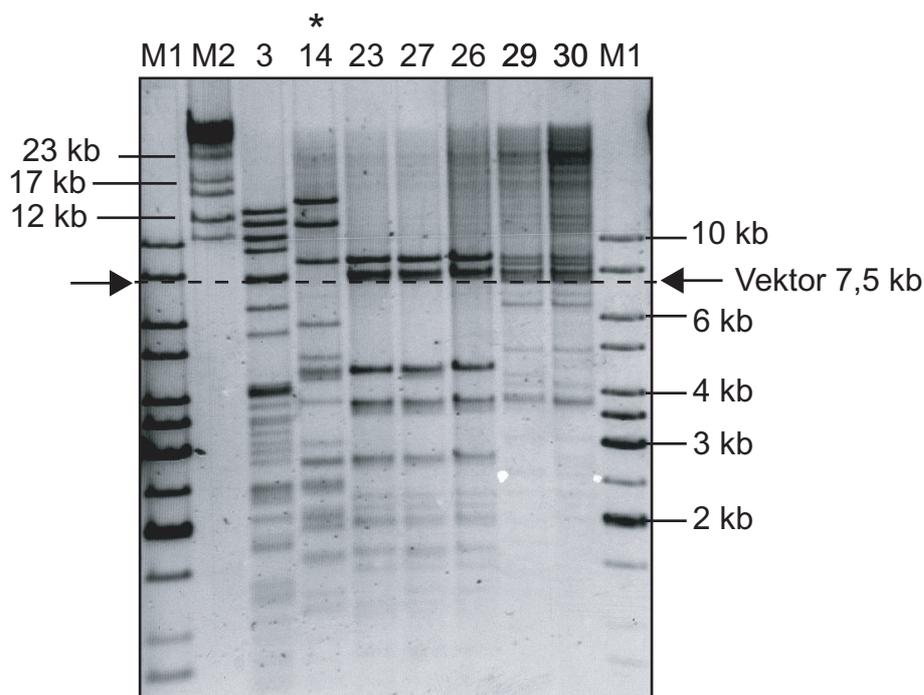


Abbildung 3.12: "Fingerprint-Analysen" einiger ausgewählter BAC-Klone.

Die gestrichelte Linie markiert das Vektorfragment bei 7,5 kb, *: *Bam*HI kloniertes Insert, daher Vektor + x bp Insert, M1: 1kb DNA ladder (MBI Fermentas), M2: Hyperladder VI (Bioline). Die Auftrennung erfolgte über ein 0,8-%iges Agarose-Gel.

Es ist zu beobachten, daß Klon 14 kein 7,5 kb Vektorfragment aufweist, da die Insert-DNA über *Bam*HI-Schnittstellen kloniert wurde. Das Vektorfragment enthält daher ein zusätzliches Stück Insert-DNA unbekannter Größe.

Die BAC-Klone 23, 26 und 27 sind laut Restriktionsanalyse nahezu identisch. Nur im niedermolekularen Bereich (Fragmente < 5 kb) des Gels weisen die BACs 26 und 27 im Vergleich zu BAC 23 zusätzliche DNA-Fragmente auf. Die Fingerprint Analysen sind konsistent mit den Daten der PCR- und hybridisierungsbasierten Überlappungsanalysen und der PFGE-basierten Größenbestimmung. In den Überlappungsanalysen wurde für die Klone 23, 26 und 27 ein identisches Ende identifiziert (s. Tab. 3.8), die PFGE-basierte Größenbestimmung zeigte nur minimale Größenvarianzen von 100-110 kb auf.

Tabelle 3.8: Ergebnisse der PCR- und Hybridisierungsexperimente zur Erstellung der BAC-Contigs.

BAC	13-Sp6	13-Sp6	18-Sp6	17-T7	17-T7	1-T7	18-Sp6	2-T7	15-Sp6	14-Sp6	3-T7	13-T7	17-Sp6	15-T7	27-T7	25-T7	26-Sp6	23-T7	14-T7	25-Sp6	29-T7	30-Sp6	26-T7	23-Sp6	27-Sp6	29-Sp6	30-T7	128-Sp6	Y-152-1	104-Sp6	103-T7	128-T7	104-T7	103-Sp6			
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
18	?	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
17			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
15																																					
14																																					
27																																					
25																																					
23																																					
26																																					
29																																					
29																																					
30																																					
128																																					
104																																					
103																																					

Die PCR wurde mit den spezifischen Oligonukleotiden für das jeweilige BAC-Ende oder die CAPS-Marker durchgeführt.

+: BAC-End spezifisches PCR-Produkt bzw. Hybridisierungssignal

leere Kästchen: kein BAC-End spezifisches PCR-Produkt bzw. kein Hybridisierungssignal

?: Ergebnis nicht eindeutig

3.4.5 Genetische Kartierung ausgewählter BAC-Endfragmente

Um das BAC-Contig relativ zu *Bs3* zu positionieren, wurden ausgewählte BAC-Endfragmente genetisch kartiert. Die BAC-End spezifischen Amplifikationsprodukte von B3T7, B14T7 und B30T7 und auf der anderen Seite von *Bs3* von B128T7, B103Sp6, B103T7 und B104Sp6 (Diplomarbeit, Patrick Römer) wurden zunächst auf DNA-Polymorphismen zwischen den resistenten und suszeptiblen Kreuzungseltern untersucht. Keines der Amplifikationsprodukte zeigte einen sichtbaren Längenpolymorphismus in den Elternlinien. Die direkte Sequenzierung der PCR-Produkte ergab jedoch für alle Fragmente Restriktionsschnittstellen-Polymorphismen, die zur Kartierung genutzt werden konnten und in Tab. 3.9 zusammengefaßt sind. In der Folge wurden diese BAC-End spezifischen Marker mit solchen Pflanzen getestet, die ein Rekombinationsereignis im Zielintervall zwischen den Markern Y152-1 und S1464 aufwiesen (s. Tab. 3.10). Die Marker B14T7 und B30T7 sowie Marker B128T7 und B103T7 konnten genetisch nicht voneinander getrennt werden. Die Marker B3T7, B14T7/B30T7, B103Sp6 und B128T7/B103T7 sind rechts vom *Bs3* Locus anzuordnen (s. Abb. 3.13). Sie sind durch jeweils 14, 13 bzw. 9 Rekombinationsereignisse vom *Bs3* Locus getrennt. Der Marker B104Sp6 wurde auf der linken Seite von *Bs3* lokalisiert und ist durch 12 Rekombinationsereignisse von *Bs3* getrennt (s. Abb. 3.13).

Tabelle 3.8: Von BAC-Enden abgeleitete CAPS-Marker

CAPS-Marker	Länge des Amplicons [bp]	Restriktions-Polymorphismus
B3T7	350	<i>HindIII</i> *
B14T7	275	<i>SpeI</i> ⁺
B30T7	260	<i>MboII</i> *
B128T7	192	<i>MunI</i> *
B103T7	250	<i>RsaI</i> *
B103Sp6	260	<i>AluI</i> *
B104Sp6	275	<i>HphI</i> *

*: schneidet im Genotyp *Bs3*. +: schneidet im Genotyp *bs3*.

Tabelle 3.9: Rekombinante Pflanzen im Marker-Intervall Y152-1/B14T7

Rekomb. Nr.	CAPS-Marker			R-Locus	CAPS-Marker								
	Y65-2	Y152-1	B104 Sp6	Bs3	B103 T7	B128 T7	B103 Sp6	B14T7	B3T7	S1464	S2245	Y110-2	
A13	s	s	s	R	r	r	r	r	r	r	r	r	r
A27	r	r	r	R	r	r	r	s	s	s	s	s	s
R902	r	r	r	R	s	s	s	s	s	s	s	s	s
A37	30	30	s	S	s	s	s	s	s	s	s	s	s
A88	s	s	s	S	s	s	r	r	r	r	r	r	r
A107	r	r	r	R	r	r	r	s	s	s	s	s	s
135	s	s	s	R	r	r	r	r	r	r	r	r	r
158	r	r	s	S	s	s	s	s	s	s	s	s	s
209	r	r	r	S	s	s	s	s	s	s	s	s	s
255	s	s	s	S	r	r	r	r	r	r	r	r	r
451	r	r	r	S	s	s	s	s	s	s	s	s	s
524	r	r	r	S	s	s	s	s	s	s	s	s	s
892	s	s	s	S	s	s	s	r	r	r	r	r	r
973	s	s	s	R	r	r	r	r	r	r	r	r	r
1405	r	r	r	S	s	s	s	s	s	s	s	s	s
1457	s	s	s	S	s	s	r	r	r	r	r	r	r
1518	s	s	s	R	r	r	r	r	r	r	r	r	r
1822	s	s	s	S	r	r	r	r	r	r	r	r	r
1857	r	r	r	R	r	r	s	s	s	s	s	s	s
2024	r	r	r	R	r	r	s	s	s	s	s	s	s
2083	r	r	r	S	s	s	s	s	s	s	s	s	s
2619	r	r	r	S	s	s	s	s	s	s	s	s	s
3600	r	r	r	S	s	s	s	s	s	s	s	s	s
3690	s	s	s	S	r	r	r	r	r	r	r	r	r
3735	s	s	s	S	s	s	s	r	r	r	r	r	r
3843	s	s	s	S	s	s	r	r	r	r	r	r	r
2265	r	r	r	S	s	s	s	s	s	s	s	s	s
389	s	s	s	S	s	s	s	r	r	r	r	r	r

Genotypen: r: *Bs3/Bs3* s: *bs3/bs3*. Phänotypen: R: HR (resistent), S: keine HR (suszeptibel, ws)

Die Rekombinanten wurden mittels CAPS-Marker genotypisiert und die Allelkonfiguration des *Bs3* Locus durch *Xcv*-Inokulation (s. 2.4 u. 2.7) ermittelt. Die Phänotypen wurden nach 48 h bonitiert.

Die versch. Farben symbolisieren die Umbruchpunkte der Rekombinationsereignisse, die zur Anordnung des *Bs3* Locus führten.

3.4.6 Ein BAC-Contig am *Bs3* Locus

Insgesamt wurden 17 BAC-Klone im Rahmen dieser Arbeit (15) und der Diplomarbeit von Patrick Römer (2) isoliert, die genomische DNA des Zielintervalls zwischen den Markern Y152-1 und S1464 enthalten. Durch Überlappungsanalysen (s. 3.4.4) und die genetische Kartierung einiger BAC-Enden (s. 3.4.5) wurden zwei Contigs im Zielintervall erstellt (s. Abb. 3.13). Das Contig, ausgehend von Marker Y152-1, überspannt drei Klone, während das Contig, ausgehend von S1464, 14 Klone überspannt. Zwei BAC-Klone (BAC 128 und BAC 104) überspannen den *Bs3* Locus und sollten daher das Resistenzgen *Bs3* enthalten. Durch die Kartierung der BAC-Enden dieser Klone konnte der *Bs3* Locus zwischen die Marker B104Sp6 und B128T/B103T7 auf ein genetisches Intervall von 0,17 cM limitiert werden. Überlappungsanalysen der Klone 128 und 104 zeigen, daß dieser Bereich ca. 60 kb entspricht. Cosegregierende Marker konnten bislang noch nicht identifiziert werden.

Überraschend sind die Unterschiede zwischen genetischer und physikalischer Distanz im Zielintervall. Durch Restriktionsanalysen (s. 3.4.5) konnte die Größe der beiden Contigs grob abgeschätzt werden (s. Abb. 3.13). Das Contig, welches den *Bs3* Locus einschließt, umfaßt ca. 150 – 180 kb und überspannt einen genetischen Bereich von 0,24 cM. Die Größe des Contigs rechts von *Bs3* liegt etwa bei 350 – 380 kb und überspannt einen genetischen Bereich von 0,09 cM. Wird das *Bs3*-überspannende Contig im Detail betrachtet, liegen zwischen den Markern Y152-1 und B128T7, die den *Bs3* Locus flankieren und die beide auf BAC 128 lokalisiert sind, 18 Rekombinationsereignisse (RE). BAC 128 selbst umfaßt ca. 112 kb. Da die genaue Lokalisation von Marker Y152-1 auf BAC 128 nicht bekannt ist werden zur Berechnung der Rekombinationsfrequenz ca. 112 kb angenommen. Für BAC 128 gilt dann: 1 RE pro 6,25 kb. BAC 103, der den *Bs3* Locus nicht enthält, hat eine Größe von 100 kb. Die beiden kartierten BAC-Enden sind durch fünf RE getrennt. Es liegt also nur 1 RE pro 20 kb vor. Im rechten Contig entspricht 1 RE etwa 40 kb. Diese Daten deuten darauf hin, daß es sich beim *Bs3* Locus um einen sogenannten "hot spot" der Rekombination handeln könnte.

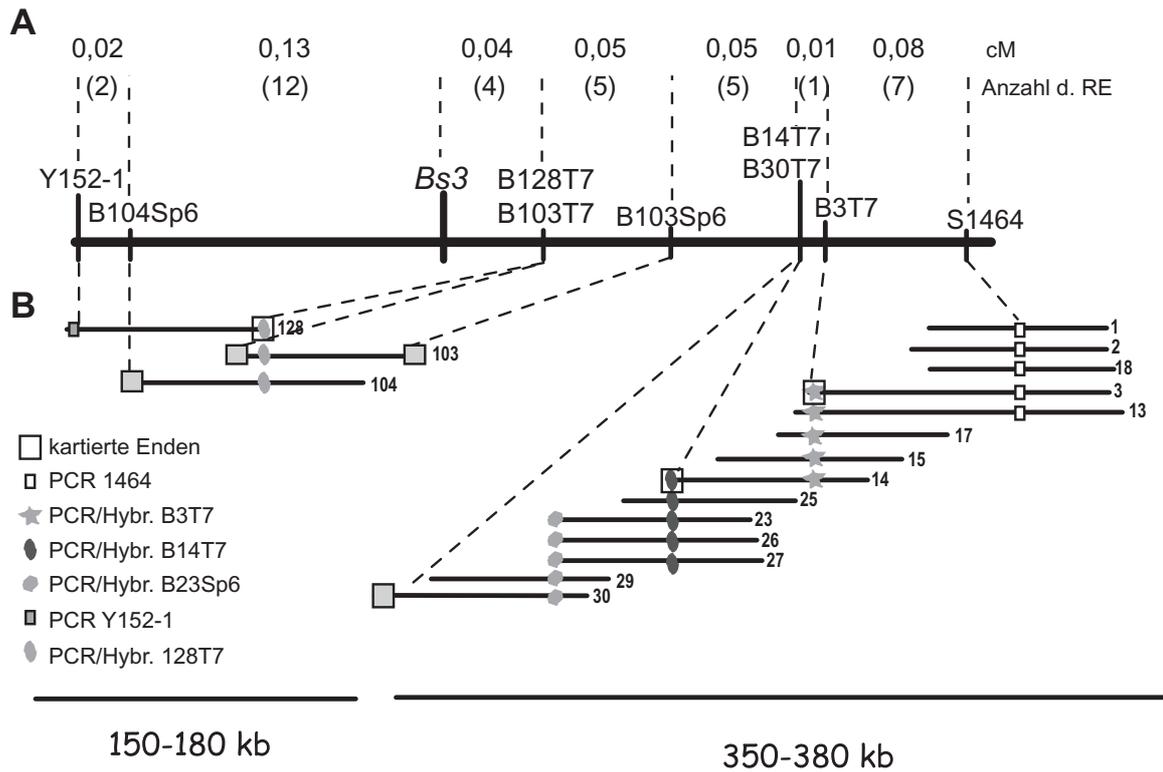


Abbildung 3.13: Integrierte genetische und physikalische Karte des *Bs3* Resistenzlocus.

A: Hochauflösende genetische Karte. Die genetischen Distanzen (in cM) und die Anzahl der Rekombinationsereignisse sind zwischen den jeweiligen Markern angegeben. **B:** Physikalische Karte auf der Grundlage von BAC-Klonen. Die verschiedenen BAC-Klone sind proportional ihrer Größe als dünne Balken dargestellt.

3.5 Sequenzierung des *Bs3* Locus

Der *Bs3* Locus konnte physikalisch auf die BAC-Klone 128 und 104 limitiert werden. Durch die von diesen BAC-Enden abgeleiteten, neuen CAPS-Marker konnte der *Bs3* Locus auch genetisch zwischen die Marker B104Sp6 und B128T7/B103T7 determiniert werden (s. Abb 3.13). Die physikalische Größe dieses Intervalls entspricht ca. 60 kb. BAC 103 begrenzt den *Bs3* Locus auf der rechten Seite, da die BAC-Enden jeweils vier (B103T7) sowie neun (B103Sp6) Rekombinationsereignisse zu *Bs3* aufweisen.

Zur Identifizierung potentieller Kandidatengene für *Bs3* wurde mit der Sequenzierung von Klon 128 begonnen. Die Subklonierung von BAC 128 wurde wie in 2.19 beschrieben vorgenommen.

Um den Aufwand zu minimieren, sollte zunächst jedoch nicht das vollständige Insert von BAC 128, sondern nur der Teil (ca. 60 kb) sequenziert werden, der das *Bs3* Gen enthält. Wie aus Abb. 3.13 zu entnehmen ist, überlappen die Klone 103 und 104 mit BAC 128. BAC 104 enthält ebenfalls das *Bs3* Gen und limitiert den Resistenzlocus durch den Marker B104Sp6 auf der linken Seite. Der mit BAC 128 überlappende Bereich von BAC 103 ist durch vier Rekombinationsereignisse von *Bs3* getrennt. Dadurch wird der Resistenzlocus auf der rechten Seite durch BAC 104 begrenzt. Die Subklone von BAC 128 wurden mit den BACs 103 und 104 hybridisiert (s. 2.14.4). Nur diejenigen Klone wurden sequenziert, die Hybridisierungssignale mit BAC 104, nicht aber mit BAC 103 aufwiesen.

Insgesamt wurden 260 Subklone mit den Dig-markierten (s. 2.14.4) BAC-Klonen 103 und 104 hybridisiert. 30 % der Klone hybridisierten mit Sonde 104, nicht aber mit 103. Sie wurden für die Sequenzierung ausgewählt. Die durchschnittliche Größe der Subklone betrug 4 kb. Zur Sequenzierung der Insertenden der Subklone wurden die Oligonukleotide M13-fwd und M13-rev verwendet, die jeweils Sequenzen von 200 – 600 bp/Ende generieren. Sie wurden mit der Computer-Software Sequencher[®] 4.1 (Gene Codes Corporation) analysiert.

Bis dato wurden 47,4 kb des ~ 60 kb großen *Bs3* Locus sequenziert. Davon liegen 21 kb als Einzelsequenzen von 200 – 600 bp vor. 26,1 kb konnten zu 39 längeren Sequenz-Contigs von 317 – 1773 bp zusammengefügt werden. Der Anzahl der Sequenz-Contigs und ihrer Länge nach zu urteilen, müssen mindestens weitere 30 - 50 Klone sequenziert werden, um eine komplette Sequenz für den ausgewählten Bereich zu erhalten.

Alle erhaltenen Sequenzen wurden auf Homologien mit bekannten Genen oder Sequenzmotiven mittels "NCBI BLAST X" (ALTSCHUL et al. 1990) überprüft. Hierbei werden die genomischen Sequenzen translatiert und die erhaltenen Proteinsequenzen auf Homologien überprüft. 47 % der Sequenzdaten zeigten keine signifikante Homologie zu Sequenzen in der Datenbank. 15,5 % der Sequenzen waren homolog zu repetitiven Sequenzen wie Copia-Poly-Proteinen, Retrotransposons oder Microsatelliten. Für 6,8 % konnte Homologie zu bakterieller und Vektor-DNA festgestellt werden. Da zur Subklonierung des BACs 128 der gesamte Vektor eingesetzt wurde, war dies zu erwarten. 30,7 % der Sequenzen wiesen Homologien zu bekannten Proteinen in der Datenbank auf, die kürzer als 30 AS waren. Resistenzgen-Homologe (NB-LRR) wurden bisher nicht gefunden.

Die Mehrheit der längeren Sequenz-Contigs (> 1000 bp) weist keine signifikanten Homologien auf. Interessant sind jedoch vier Klone, die auf drei unterschiedliche Contigs verteilt sind, von denen alle Homologie zum selben Gen aus *L. esculentum* aufweisen. Eine konservierte Domäne dieses Proteins ist ein "Ankyrin repeat"-Motiv, welches auch in den Sequenzen aus *C. annuum* identifiziert wurde.

4 Diskussion

4.1 AFLP-basierte Markerverdichtung am Paprika *Bs3* Locus

Bei der markergestützten Kartierung des *Bs3* Resistenzlocus wurde die AFLP-Methode bereits erfolgreich für die Suche nach gekoppelten Markern eingesetzt (PIERRE et al. 2000). Da jedoch bei diesen Arbeiten keine Marker identifiziert wurden, die eng mit dem Resistenzlocus gekoppelt waren (s. Abb. 1.4), war eine weitere Markersichtung zur Identifikation enger gekoppelter Marker notwendig. In der, in dieser Arbeit durchgeführten AFLP-Analyse, wurde die Enzymkombination *SacI/TaqI* verwendet. Durchschnittlich wurden 100 Fragmente pro Oligonukleotidkombination (1024) amplifiziert. Der genomweite Polymorphiegrad zwischen den Elternlinien lag bei 16 %, daraus resultiert eine Analyse von 16.400 (1024 x 100 x 0,16) Loci auf Kopplung mit *Bs3*. Elf AFLP-Marker wurden am *Bs3* Locus identifiziert, davon konnten zwei (S1464, S2245) in CAPS-Marker (S1464, S2245) konvertiert werden.

4.1.1 AFLP: die Methode der Wahl?

Die AFLP-Methode (VOS et al. 1995) ist eine weit verbreitete Technik zur Identifikation von DNA-Polymorphismen. Sie findet Einsatz bei der Erstellung genomweiter und lokaler genetischer Karten (PETERS et al. 2003; RAFALSKI 2002), sowie bei Verwandtschaftsanalysen (BAYDAR et al. 2004). Alternative Methoden zur AFLP-Technologie, die ebenfalls auf PCR basieren, sind RAPDs und bspw. die Subtraktive Hybridisierung. Bei der RAPD-Methode (WILLIAMS et al. 1990) werden kurze Oligonukleotide (bis zu 10 Nukleotide lang) mit willkürlicher Sequenz, die zufällig an die DNA binden, eingesetzt. Aufgrund der kurzen Anlagerungssequenzen und der niedrigen "Annealing-Temperaturen" ist diese Methode jedoch nicht leicht reproduzierbar und wegen der vielen amplifizierten Fragmente nicht immer eindeutig auswertbar. Untersuchungen in Paprika ergaben zudem, daß mit der RAPD-Methode bis zu 10 mal weniger Polymorphismen nachgewiesen werden, als mit der AFLP-Technik (LEFEBVRE et al. 2001). Im Rahmen einer Diplomarbeit (MEYER 2002) wurde versucht, das Verfahren der Subtraktiven Hybridisierung auf die Identifizierung differentieller DNA-Fragmente, die sich als molekulare Marker eignen, in der *Bs3* Region anzuwenden. Diese

spezielle Technik der Nukleinsäurehybridisierung wird vornehmlich bei Prokaryoten zur Isolierung differentiell exprimierter Gene oder zu Genomvergleichen genutzt (AKOPYANTS et al. 1998). Dieser theoretisch einfache Ansatz konnte jedoch nicht auf ein so komplexes eukaryotisches Genom wie das von *C. annuum* übertragen werden. Es stellte sich heraus, daß 63 – 92 % der isolierten Fragmente zwischen den untersuchten Linien (ECW-30R, PI 197409) nicht differentiell waren. Andere Techniken, wie die hybridisierungs-basierte RFLP-Methode, sind mit hohem Arbeitsaufwand verbunden. Für Mikrosatelliten oder SCAR-Marker werden Sequenzinformationen benötigt, die nicht zur Verfügung standen. Daher erscheinen diese Methoden als nicht geeignet für eine saturierende Suche nach Markern in der *Bs3*-Region. Zur Erhöhung der Markerdichte stellt also die AFLP-Methode – selbst in Anbetracht einiger Nachteile (s. 4.1.2) - die geeignete Technik dar.

Der weite Verbreitungsgrad dieser Technik liegt darin begründet, daß durch die Kombination von RFLP und PCR eine robuste Markertechnologie entstand, bei der zahlreiche Loci parallel hinsichtlich DNA-Polymorphismen analysiert werden können. Dabei kann durch die Wahl der eingesetzten Restriktionsenzyme die Häufigkeit und die Ausprägung der nachzuweisenden AFLP-Marker beeinflusst werden. In *Capsicum* spp. wurde beobachtet, daß durch die Verwendung von Enzymen mit GC-reichen Erkennungssequenzen eine größere Anzahl an Polymorphismen detektiert wird, als dies beim Einsatz von Enzymen mit AT-reichen Erkennungssequenzen der Fall ist (DJIAN-CAPORALINO et al. 2001). Weiterhin wurde festgestellt, daß unter Verwendung methylierungs-sensitiver Enzyme die Anzahl der detektierten Polymorphismen ansteigt (HAANSTRA et al. 1999). Aufgrund dieser Tatsachen wurde das Restriktionsenzym *SacI* für die neue AFLP-Analyse ausgewählt. Es besitzt eine GC-reiche Erkennungssequenz (GAGCTC) und ist methylierungs-sensitiv. Da transkribierte Bereiche im pflanzlichen Genom in der Regel hypo-methyliert sind, sollte *SacI* bevorzugt in genreichen Regionen schneiden, was die Chancen erhöhen sollte, sehr eng mit *Bs3* gekoppelte Marker zu finden.

4.1.2 Konvertierung von AFLP-Markern

Obwohl die AFLP-Technik effizient und reproduzierbar Marker identifiziert, die mit *R*-Genen gekoppelt sind (DJIAN-CAPORALINO et al. 2001; THOMAS et al. 1995), ist ihre Anwendungsmöglichkeit hinsichtlich der kartenorientierten Isolierung von Genen

eingeschränkt: Aufgrund der Dominanz der AFLP-Marker, des relativ großen Arbeitsaufwands und der hohen Kosten ist die AFLP-Methode zur Analyse großer Kartierungspopulationen nicht geeignet. Daher wird eine Konvertierung der AFLPs in sequenz-spezifische PCR-Marker notwendig. Hierbei werden weitere Nachteile der AFLP-Methode deutlich. Das erste Problem (i) stellt die Extraktion des AFLP-Fragments aus dem Polyacrylamid-Gel dar. Oft enthalten diese Extrakte aufgrund der Co-Isolation von Hintergrund-Amplifikaten mehrere Fragmente. Die zweite Hürde (ii) ist darin begründet, daß AFLP-Fragmente oft zu kurz sind, um interne Polymorphismen erwarten zu können, die sich als geeignet zur Konvertierung in CAPS-Marker erweisen. In den folgenden Abschnitten sollen unterschiedliche Lösungsansätze vorgestellt werden.

(i) Oftmals zeigen die isolierten Fragmente unterschiedliche Längen auf. Daher ist es möglich, über Größenvergleiche der isolierten Fragmente mit der Original-Amplifikation das korrekte AFLP-Fragment auszusortieren (BRADEEN and SIMON 1998). Größenvergleichs-Experimente (nicht dargestellt) für Marker 1464 konnten jedoch nicht ausgewertet werden. Die klonierten Fragmente demonstrierten ein inkonsistentes Laufverhalten gegenüber der Vergleichs-AFLP-Reaktion. In diesem Zusammenhang könnten vielleicht die Mengenunterschiede zwischen Plasmiden und Amplifikation eine Rolle spielen. Alternativ dazu kann über genomische Southern-Analysen die differentielle Hybridisierung der isolierten Fragmente überprüft werden (SARDENASI et al. 2002). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Sequenzierung der erhaltenen Klone, um über die Mehrheitsverhältnisse die korrekte Sequenz abzuleiten (DUSSLE et al. 2002). Dazu müssen zum einen sehr viele Klone sequenziert werden, zum anderen ist nicht sicher, ob wirklich die Mehrheit der Sequenzen dem gekoppelten AFLP-Fragment entspricht.

In dieser Arbeit wurden letztere Ansätze kombiniert. Der Sequenzierung der isolierten Fragmente folgte ein "reverser AFLP" (s. 3.1.4.2, PIERRE et al. 2000). Da hierbei die AFLP-Reaktion verwendet wird, umgeht man aufwendige genomische Southern-Hybridisierungen. Durch die Sequenzierung konnten dann gezielt alle unterschiedlichen Fragmente als Sonden eingesetzt werden. So wurde sichergestellt, daß nicht mehrere gleiche Fragmente als Sonden verwendet wurden. Für die AFLP-Marker 1464 und 1827 konnte damit erfolgreich die Sequenz der gekoppelten Fragmente ermittelt werden (s. 3.1.4.2). Für Marker 1471 wurde eine andere Strategie ausgewählt (s. 3.1.4.2): hier wurde über zusätzliche selektive Nukleotide die korrekte Sequenz des AFLP-Fragments

ermittelt. Diese Methode scheint aber ungeeignet für den generellen Einsatz zu sein, da sie voraussetzt, daß für jeden Marker neue Oligonukleotide synthetisiert werden müssen.

(ii) In der Regel werden bei der vergleichenden Sequenzierung der AFLP-Marker des resistenten und suszeptiblen Elter keine internen Restriktionspolymorphismen festgestellt, die für die Konvertierung in einen CAPS-Marker verwendet werden könnten. Geeignete Restriktionspolymorphismen können bspw. über dCAPS-Oligonukleotide eingefügt werden (NEFF et al. 1998). Hierbei werden durch die Einführung einer Fehlpaarung im Oligonukleotid vorhandene SNPs (single nucleotide polymorphisms) in differentielle Enzym-Erkennungsstellen umgewandelt. Bei dCAPS-Markern muß beachtet werden, daß die über die Oligonukleotide eingefügten Restriktionspolymorphismen nur zu sehr geringen Unterschieden im Restriktionsmuster führen und daher die Spaltprodukte auf hochprozentigen Agarose-Gelen aufgetrennt werden müssen. Dafür ist der Aufwand der Konvertierung allerdings relativ gering. AFLP-Marker 2245 konnte durch Einführung einer differentiellen *Eco*147I-Schnittstelle in den dCAPS-Marker S2245 umgewandelt werden (s. 3.1.4.3).

Durch Verlängerung der AFLP-Fragmente können externe Polymorphismen aufgedeckt werden. Häufig wird die iPCR dafür eingesetzt (BRADEEN and SIMON 1998). Der limitierende Schritt liegt dabei in der Zirkularisierung der verdauten DNA-Fragmente und in der Optimierung der PCR. Als effizienter hat sich die Methode des "GenomeWalker" (Clontech, s. 2.17.2) erwiesen. Hierbei muß darauf geachtet werden, daß die verwendeten Enzyme nicht im AFLP-Fragment schneiden. Für Marker 1464 konnte durch Verlängerung des Fragments der AFLP-spezifische *Taq*I-Polymorphismus ermittelt und für die Ableitung eines CAPS-Markers genutzt werden (MEYER 2002). Liegen AFLP-Marker aber in repetitiven oder duplizierten Bereichen, gestaltet sich eine Verlängerung durch "GenomeWalker" als schwierig, da die Zuordnung der erhaltenen Amplifikate dann nicht möglich ist, wie bspw. für Marker 1827. Um die Komplexität des "GenomeWalker"-Ansatzes zu verringern, können - soweit verfügbar - auch BAC-Klone herangezogen werden. Bei der Konvertierung von AFLP- in CAPS-Marker werden die Nachteile der AFLP-Methode deutlich. Nur zwei von vier AFLP-Markern konnten erfolgreich in CAPS-Marker umgewandelt werden.

4.1.3 Anwendung der "bulked segregant-Analyse"

Um die Detektion von nicht eng gekoppelten Markern auszuschließen, wurden die Pflanzen für die "BSA-Pools" durch molekulare Marker charakterisiert (s. 3.1.1). Diese Strategie konnte schon erfolgreich bei der Isolierung des *Cf9* Gens in Tomate angewendet werden (THOMAS et al. 1995). Es ist jedoch wichtig das Zielintervall nicht zu eng zu definieren, da sonst die Suche nach Markern zu aufwendig wird. Ein weiterer Vorteil der Marker-basierten Auswahl von Individuen ist die Nutzung von homozygoten Pflanzen, weil sich dadurch die Anzahl der Polymorphismen, die detektiert werden können, erhöht. Bei einer rein phänotypischen Selektion der Pflanzen sind im resistenten "Pool" immer heterozygote Individuen enthalten, weshalb AFLP-Marker, die auf polymorphen Fragmenten im suszeptiblen "Pool" beruhen, nicht detektiert werden können.

Die Ergebnisse, auch die anderer Arbeitsgruppen (LAHAYE et al. 1998) zeigten, daß es besonders wichtig ist, vor der weiteren Verwendung der AFLP-Marker die Individuen der "BSA-Pools" genau zu überprüfen (s. 3.1.3). Durch das Mischen der DNA der "Pool-Pflanzen" und die daraus resultierende Verdünnung besteht die Möglichkeit, daß schwache Amplifikate nicht nachgewiesen werden und es so zur Detektion nicht-realer Polymorphismen kommt. In dieser Arbeit wurden 29 von 47 Polymorphismen identifiziert, die nicht in allen "Pool-Individuen" Cosegregation mit dem Zielintervall aufwiesen (s. 3.1.3). Diese wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Von den restlichen 18 AFLP-Markern konnten sieben nicht zwischen den Markern Y152-1 und Y110-2 angeordnet werden. Das hängt damit zusammen, daß rechts des *Bs3* Gens nur ein Marker zur Verfügung stand und daher die Selektion von "Pool-Pflanzen" mit Rekombinationsereignissen hier nicht möglich war (s. 3.1.1). Es kann also trotz der Marker-gestützten Selektion der "Pool-Pflanzen" zur Detektion von AFLP-Markern außerhalb des Zielintervalls kommen. Unter Berücksichtigung der oben genannten Punkte, kann aber die "bulked segregant-Analyse" erfolgreich angewendet werden.

Bei ca. 16.400 analysierten AFLP-Loci (s. 3.1.2) werden in *Capsicum* spp., bei einer Länge der genetischen Karten von ca. 1800 cM, etwa 9 Marker pro cM erwartet. Die Lokalisierung von elf AFLP-Markern im 1,7 cM großen Zielintervall zwischen Y152-1 und Y110-2 entspricht in etwa dem Schätzwert. Allerdings konnte nur einer dieser neuen Marker im linken 0,7 cM großen Bereich zwischen Y152-1 und *Bs3* (s. Abb. 3.5) angeordnet werden.

Im Zuge der hochauflösenden Kartierung der *Bs3* Region verringerte sich der genetische Abstand des Markers Y152-1 zu *Bs3* auf 0,16 cM und zu Y110-2 auf 1,5 cM (s. 3.2 und

Tab. 3.4): zum einen durch die Resistenztests, und zum anderen dadurch, daß nur noch wenige zusätzliche Rekombinationsereignisse zwischen Y152-1 und *Bs3* gefunden wurden. Die Erstellung eines BAC-Contigs ergab, daß Y152-1 einen physikalischen Maximalabstand von 112 kb (s. Abb. 3.13) zu *Bs3* aufweist. Basierend auf diesen Daten ist die Anordnung der neuen AFLP-Marker folgerichtig.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß es, durch die Marker-basierte Selektion der Pflanzen in Kombination mit einer "bulked segregant-Analyse" und mittels hochauflösender Kartierung der in CAPS- umgewandelten AFLP-Marker gelang, den *Bs3* Locus von 1,7 cM auf 0,4 cM einzugrenzen (s. Abb. 3.13).

4.2 Der Paprika *Bs3* Locus ist ein lokaler Rekombinations "hot spot"

Das Verhältnis von physikalischer zu genetischer Distanz berechnet sich aus der Anzahl von Rekombinationsereignissen (RE) im untersuchten Bereich des Genoms. Genomweit wird dieses Verhältnis immer als Durchschnittswert angegeben, wobei davon ausgegangen wird, daß die Rekombinationsereignisse gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt sind. Aus den unterschiedlichen Angaben zur Genomgröße von *Capsicum* spp. und den verschiedenen genetischen Karten ergeben sich Werte von 1,4 – 2,7 Mbp/cM (s. 1.4).

Da Rekombinationsereignisse jedoch nicht, wie für die Berechnung der Durchschnittswerte angenommen, an allen Stellen des Genoms mit gleicher Wahrscheinlichkeit stattfinden, kommt es häufig zu Fehleinschätzungen der physikalischen Abstände von molekularen Markern. Genomweit kann dieses Phänomen, das als "Cluster-Bildung" von Markern beschrieben wird (LIVINGSTONE et al. 1999), bei der Erstellung von genetischen Karten beobachtet werden. Durch Unterdrückung der Rekombination, z. B. in Centromer-Bereichen, werden genetische Abstände kartiert, die jedoch nicht die realen physikalischen Distanzen widerspiegeln. Solche Regionen werden als "cold spots", Bereiche mit hoher Rekombinationsfrequenz als "hot spots" bezeichnet.

Aus Abb. 4.1 geht hervor, daß es am *Bs3* Locus zu Fehleinschätzungen hinsichtlich der physikalischen Distanzen aufgrund lokal beträchtlich schwankender Rekombinationsfrequenzen gekommen ist.

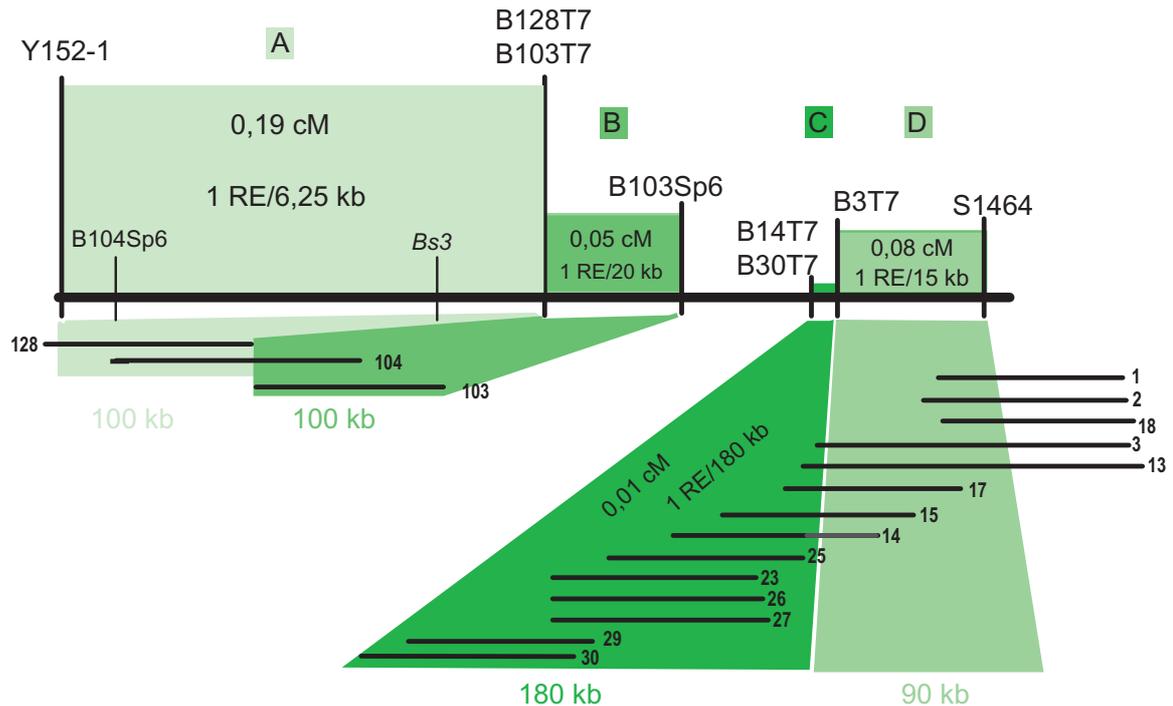


Abbildung 4.1: Darstellung der Rekombinationsfrequenzen am *Bs3* Locus.

Die Höhe der Säulen gibt die Unterschiede in der Rekombinationsfrequenz an. Sie sind in die genetische Karte des *Bs3* Locus integriert. Die einzelnen Markerintervalle werden durch Buchstaben gekennzeichnet. A: Y152-1/B128T7, B: B103T7/B103Sp6, C: B30T7/B3T7 und D: B3T7/S1464. Im unteren Teil der Abb. sind die BAC-Contigs als Balken dargestellt, und es ist die physikalische Distanz der Intervalle angegeben.

Die *Bs3* Region (Markerintervall Y152-1/S1464) wird zur Veranschaulichung in vier Bereiche aufgeteilt (s. Abb. 4.1).

- A: Dieser Bereich entspricht ca. 112 kb. BAC 104 (130 kb) ist zu ca. 100 kb mit BAC 128 (112 kb) identisch. Marker Y152-1 und B104Sp6 sind durch zwei RE getrennt. Folglich liegt Y152-1 am linken Ende von BAC 128. Bereich A überspannt 18 RE, daraus ergibt sich eine Korrelation von physikalischer zu genetischer Distanz von 0,52 Mbp/cM.
- B: Für BAC 103 wurden beide Enden kartiert. Zwischen den Markern liegen fünf RE. Daraus folgt ein Wert von 2,0 Mbp/cM.
- C: Dieses Intervall wird von acht BAC-Klonen gebildet, die in drei aufeinander folgenden Sichtungen isoliert wurden. Aus den Fingerprintanalysen der BAC-Klone resultiert eine physikalische Distanz von 180 - 200 kb. Die flankierenden Marker sind nur durch ein RE voneinander getrennt. In diesem Bereich liegt das Verhältnis des genetischen Abstands zum physikalischen bei 18 Mbp/cM.

D: Zwischen S1464 und dem BAC End-Marker B3T7 liegen 7 RE. Die Position von S1464 auf BAC 3 (140 kb) wurde nicht bestimmt. Nach den Überlappungsanalysen zu urteilen, sollte der Abstand zwischen den Markern 80 – 90 kb betragen, was für diesen Bereich einen Wert von 1,12 Mb/cM ergibt.

Die gesamte physikalische Distanz der untersuchten Region kann nicht ermittelt werden, da die Lücke zwischen den Contigs nicht geschlossen werden konnte. Der Vergleich der Rekombinationsfrequenzen am *Bs3* Locus zeigt aber, daß in diesem genetisch relativ kleinen Bereich von 0,4 cM die Rekombinationsfrequenz starken lokalen Schwankungen unterworfen ist, so daß das Verhältnis zwischen genetischer und physikalischer Distanz von 0,5 – 18,0 Mbp/cM reicht. Im Bereich A steigt die Rekombinationsfrequenz deutlich an, so daß dieser als "hot spot" eingestuft werden kann.

Auch in anderen Pflanzenspezies mit komplexen Genomen, das veranschaulicht das Beispiel des *al-sh2* Intervalls in Mais, kommen deutliche Veränderungen der Rekombinationsfrequenz innerhalb kleiner physikalischer Abschnitte vor (CIVARDI et al. 1994). In der untersuchten Region von 140 kb liegen drei Gene (*al*, *yz1* und *x1*). Auch wenn *x1* nicht als solcher bezeichnet werden kann, wurden insgesamt drei "hot spots" identifiziert. Zwei davon liegen in den Genen *al* und *yz1*, der dritte in einem nicht-genischen Bereich. In den Abschnitten zwischen den "hot spots" sinkt die Rekombinationsfrequenz oft unter den Mittelwert. Besonders Bereiche mit hohem Anteil an repetitiver DNA wiesen nur sehr wenige Rekombinationsereignisse auf (YAO et al. 2002).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß "hot spots" vornehmlich in kodierenden Regionen des Genoms vorkommen. Dies wird durch die Tatsache untermauert, daß, obwohl die Genomgröße eukaryotischer Organismen stark variiert, die Anzahl der Gene sowie die Größe der genetischen Karten mehr oder weniger konstant ist und daher Rekombinationsereignisse hauptsächlich mit Genen assoziiert sein müssen (FARIS et al. 2000). Diese These unterstreichen Beobachtungen aus *S. cerevisiae* (Hefe). Dort kommen "hot spots" bevorzugt in Regionen hoher transkriptioneller Aktivität vor, also an den Stellen im Genom, die dekondensiert und leicht zugänglich für den Zugriff von Nukleasen sind (PETES 2001).

Auf den ersten Blick erscheint die Aussage, daß "Rekombinations- hot spots" vornehmlich in Regionen mit hoher Gen-Dichte vorkommen nicht zuzutreffen, da im

bisher sequenzierten Bereich von 47,1 kb nur wenige Abschnitte mit Kodierungswahrscheinlichkeiten ermittelt wurden. Der Gengehalt in Tomate wird mit ca. 35.000 Genen angegeben (BENNETZEN et al. 2004). Rechnet man mit der gleichen Anzahl von Genen in Paprika, wird ein Gen in pro 90 kb erwartet. Daher scheint das Verhältnis von einem Gen in 47 kb schon fast einer genreichen Region in Paprika zu entsprechen und die in Bereich A beobachtete erhöhte Rekombinationsfrequenz könnte eventuell ein weiteres Indiz für kodierende Bereiche in BAC 128 sein (s. Abb. 4.1).

4.3 Meiotische Instabilität am *Bs3* Locus

Im Zusammenhang mit der Kartierung des *Bs3* Locus wurden bei der Analyse der F₃-Familien 14 Pflanzenfamilien identifiziert, die Widersprüche aufzeigten: obwohl alle Pflanzen mit den *Bs3*-flankierenden Markern das ECW-30R Allel aufwiesen, waren diese Pflanzen durchweg suszeptibel (s. 3.2.1). Diese hohe Anzahl suszeptibler Individuen in der Kartierungspopulation könnte mit der erhöhten Rekombinationsfrequenz am *Bs3* Locus korrelieren und ein Indiz für eine meiotische Instabilität sein.

Beispiele für meiotische Instabilität sind die Resistenzloci *Rp1* in *Zea mays* (SUDUPAK et al. 1993) und *Dm3* in *Lactuca sativa* (KUANG et al. 2004). Diese "R-Gen-Cluster" sind aus einer Vielzahl eng gekoppelter, homologer Gene zusammengesetzt. An beiden Loci wurde das spontane Auftreten von suszeptiblen Individuen beobachtet, das auf molekularer Ebene mit illegitimem "crossing-over" oder in seltenen Fällen mit Genkonversion assoziiert ist. Am *Rp1* Locus kommt es hauptsächlich zu intra-genischen Rekombinationen zwischen den einzelnen Homologen, wobei keine offensichtliche Bevorzugung bestimmter Rekombinations-Stellen vorliegt (CHIN et al. 2001; RAMAKRISHNA et al. 2002). Dagegen liegen die Rekombinations-Punkte am *Dm3* Locus vorwiegend in inter-genischen Bereichen, so daß es dort zu Veränderungen in der Anzahl der Homologen, aber nicht zur Bildung von chimären Genen kommt, wie es am *Rp1* Locus der Fall ist (CHIN et al. 2001). Außerdem liegt hier eine Präferenz für bestimmte Rekombinations-Stellen vor.

Der *Rp1* Locus (HULBERT et al. 1993) weist, genauso wie der *Bs3* Locus in *C. annuum*, eine erhöhte Rekombinationsfrequenz auf. Die oben beschriebenen Rekombinationsereignisse führen durch das Entstehen nicht-parentaler Genotypen am *Rp1* Locus zur Entwicklung neuer Resistenz-Spezifitäten (SUDUPAK et al. 1993). Anders

als bei den *Rp1*-Pflanzen, konnten am *Bs3* Locus keine nicht-parentalen Genotypen nachgewiesen werden. Um eine Rekombination innerhalb des *Bs3* Gens festzustellen, müssten diese Pflanzen mit physikalisch sehr eng gekoppelten Markern getestet werden, die bislang noch nicht vorliegen. Daher muß die Frage unbeantwortet bleiben, ob die Rekombinationsereignisse, die zur Suszeptibilität der Rekombinanten führen, mit dem *Bs3* Gen assoziiert sind oder andere Gene betreffen, die für die Ausbildung einer Resistenzreaktion notwendig sind.

4.3.1 Funktionalität des *Bs3* Locus in den "mutierten" Pflanzen

Beide Alternativen eröffnen neue Möglichkeiten, den Modus der *Bs3*-vermittelten Resistenz zu verstehen. Einerseits könnten *Bs3*-Mutantenallele identifiziert werden, die eine wertvolle Ressource für die Analyse von Struktur-Funktions-Beziehungen sind. Andererseits könnten Signalkomponenten der *Bs3*-vermittelten Resistenz identifiziert werden. Es ist daher wichtig, diese Individuen in späteren Analysen zu berücksichtigen.

Um die Funktion des potentiell mutierten *Bs3* Locus zu testen, wurden neun Pflanzenfamilien mit dem *avrBs3Δrep16*-Derivat getestet (s. 3.2.1). Dieses Derivat löst bei Pflanzen der Linie ECW einer HR aus. Sieben Pflanzenfamilien reagierten auf die Inokulation des Deletionsderivates mit der Ausbildung einer HR. Genau wie in der Linie ECW wird zwar Wildtyp AvrBs3 nicht mehr erkannt, stattdessen aber das Deletionsderivat.

Diese Ergebnisse könnten auf die Möglichkeit einer Kreuzbestäubung durch ECW-Pflanzen hinweisen. Um dies zu untersuchen, müssten eng mit *Bs3* gekoppelte DNA-Marker generiert werden, die eine Diskriminierung der Genotypen ECW-30R und ECW zulassen.

Die Resultate der Inokulationstests könnten aber auch so ausgelegt werden, daß in diesen sieben Pflanzenfamilien ein Rekombinationsereignis innerhalb des *Bs3* Gens oder im engeren physikalischen Bereich stattgefunden hat und es daher zu einer veränderten Erkennungsspezifität kommt. Es ist jedoch nicht klar, ob dieselbe Mutation für beide Effekte, sowohl für Resistenzverlust als auch für –gewinn verantwortlich ist. Daher muß das Ergebnis von Analysen mit physikalisch sehr eng gekoppelten Markern und anschließenden vergleichenden Sequenzanalysen des *Bs3* Gens in diesen Pflanzen abgewartet werden, um die Mechanismen, die dieser Phänotyp-Konversion zugrunde liegen, ermitteln zu können.

4.3.2 Evolutionäre Aspekte der meiotischen Instabilität

Das Phänomen der meiotischen Instabilität scheint an *R*-Gen Loci eine Ausnahmeerscheinung darzustellen, da dort meistens Rekombinationen unterdrückt werden und es sehr selten zum spontanen Verlust der Resistenz durch natürliche Rekombinationsereignisse kommt (VAN DER HOORN et al. 2002). Nun stellt sich die Frage, ob die meiotische Instabilität für die vorgestellten *R*-Gen Loci vorteilhaft sein kann?

Eine der wesentlichsten Eigenschaften von Genen ist die Fähigkeit zur identischen Replikation. Dagegen dient der Prozeß der meiotischen Rekombination, unter populationsgenetischen Aspekten betrachtet, der Erhaltung der genetischen Vielfalt. Die Bedeutsamkeit dieses Vorgangs für die Evolution von *R*-Genen wird durch die Tatsache unterstrichen, daß die Entstehung neuer Resistenz-Spezifitäten meistens mit dem Vorkommen von Rekombinationsereignissen korreliert ist (HULBERT et al. 2001). Untersuchungen der *Dm3* und *Rp1* Loci unterstreichen diese These, da dort durch Deletionen, Duplikationen und die Bildung von chimären Genen Ressourcen für neue Resistenzgene geschaffen werden (RICHTER et al. 1995). Solche meiotische Instabilitäten könnten in dem evolutionär relativ jungen Alter dieser *R*-Gen Loci begründet sein.

Inwieweit sich diese Beobachtungen auf den *Bs3* Locus übertragen lassen, ist fraglich. Es handelt sich bei den hier dargestellten Beispielen um *R*-Gen Loci, die aus einer unterschiedlichen Anzahl genetisch und physikalisch eng gekoppelter "NB-LRR-Gene" zusammengesetzt sind. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit für Rekombinationsereignisse, da hier - im Gegensatz zu Einzelgen-Loci - homologe Gene auf engstem Raum vorliegen, die die Ausbildung von illegitimem "crossing-over" fördern. Für den *Bs3* Locus ist bis jetzt nicht bekannt, ob es sich um einen komplexen Bereich oder einen Einzelgen-Locus handelt, da auf BAC 128 bisher nur ein Gen lokalisiert werden konnte, das nicht für ein NB-LRR R-Protein kodiert (s. 3.5).

4.5 Ein Kandidatengen für *Bs3*

Die molekulare Isolierung von *R*-Genen, die Resistenzen gegen phylogenetisch diverse Pflanzenpathogene vermitteln, hat gezeigt, daß die überwiegende Mehrzahl für NB-LRR Proteine kodiert. Derzeit sind zwei Gene molekular charakterisiert, die die Erkennung von AvrBs3-ähnlichen Proteinen vermitteln: das Tomaten *Bs4* und das Reis *xa5* Gen.

Ein Blick auf diese beiden Gene kann Hinweise darauf liefern, welche Art von Resistenzgenen die Erkennung von AvrBs3 in Paprika vermitteln könnten. Die Ähnlichkeit zwischen den AvrBs3-Homologen auf AS-Ebene von 90 bis 97 % (LAHAYE and BONAS 2001) legt die Vermutung nahe, daß es sich bei allen dazu korrespondierenden Resistenzgenen ebenfalls um Strukturhomologe handelt.

4.5.1 Kodieren *Bs4*, *xa5* und *Bs3* für strukturhomologe Proteine?

Das *Bs4* Resistenzprotein aus Tomate, welches die Erkennung des AvrBs3-ähnlichen AvrBs4 Proteins vermittelt, wird der Klasse der cytoplasmatisch lokalisierten TIR-NB-LRR Proteine zugeordnet (BALLVORA et al. 2001b; SCHORNACK et al. 2004). AvrBs3 und AvrBs4 sind auf AS-Ebene zu 97 % identisch. Beide enthalten im zentralen Bereich 17,5 Wiederholungen von nahezu identischen 34-AS-Sequenzmotiven ("repeats", s. 1.5.2). Außer einer Deletion von vier AS im C-Terminus liegen die variablen Bereiche der beiden Proteine ausschließlich in der "Repeat-Region". Diese 97%-ige Identität legt den Schluß nahe, daß es sich bei *Bs3* und *Bs4* um Gene gemeinsamen Ursprungs handeln könnte (BALLVORA et al. 2001a).

Ein wichtiges Indiz für die Hypothese, daß es sich bei *Bs3* und *Bs4* um Proteine unterschiedlicher Struktur handeln könnte, resultiert aus der Analyse von AvrBs3- und AvrBs4-NLS-Deletionsderivaten (s. 1.5.2). Während *Bs3* keine Erkennung von avrBs3-NLS-Deletionsderivaten vermittelt, ist die AvrBs4-induzierte Resistenz nicht von NLS-Zielsequenzen in der Avr-Komponente abhängig. Daher wurde postuliert, daß die *Bs4*-basierte Erkennung von AvrBs4 im Cytoplasma der Zelle stattfindet (SCHORNACK et al. 2004). Im Gegensatz dazu wird angenommen, daß *Bs3* ein nukleär lokalisiertes Protein darstellt. Übereinstimmend damit sollte das Kandidatenprotein ebenfalls nukleär lokalisiert sein.

Einen weiteren Hinweis darauf, daß die Gene unabhängig voneinander entstanden, liefert die Analyse der Syntenie der beiden *R*-Gen Loci. Zwischen den Genomen von *Lycopersicon* spp. und *Capsicum* spp. besteht ein hoher Grad an Colinearität

(LIVINGSTONE et al. 1999), dementsprechend sollten sich orthologe Gene in colinearen Bereichen der Chromosomen befinden. Dies trifft jedoch auf *Bs3* und *Bs4* nicht zu. *Bs3* ist auf dem Paprika Chromosom 2 (LEFEBVRE et al. 2002), *Bs4* dagegen auf dem Tomaten Chromosom 5 (BALLVORA et al. 2001a) lokalisiert.

Das *R*-Gen *xa5* aus Reis (*Oryza sativa*) vermittelt rassen-spezifische Resistenz gegen *avrxa5*-exprimierende *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Stämme und wird rezessiv vererbt (IYER and MCCOUCH 2004). Das korrespondierende Avirulenzgen ist mit höchster Wahrscheinlichkeit ein Mitglied der AvrBs3-Familie (BAI et al. 2000). Inwieweit die *xa5*-vermittelte Erkennung von Avrxa5 ebenfalls NLS-abhängig ist, wurde bisher nicht genauer analysiert. Da *xa5* für die γ -Untereinheit des Transkriptionsfaktors IIA (TFIIA γ) kodiert, erscheint es jedoch wahrscheinlich, daß *xa5* im Kern lokalisiert ist und demnach die Perzeption von Avrxa5 ebenfalls im Zellkern erfolgt. Bemerkenswerterweise interagiert TFIIA γ mit der AAD des Herpes Simplex Virus VP16 (KOBAYASHI et al. 1995), einer Proteindomäne, die auch Teil des AvrBs3 Proteins ist.

Ergo besteht die Möglichkeit, daß *xa5* mit der AAD Domäne AvrBs3-ähnlicher Proteine (z. B. *avrxa5*) interagiert. Im konzeptionellen Kontext des "guard models" wäre Xa5 das "Pathogenitäts-Target" von Avrxa5. Aufgrund der Interaktion der AAD von Avrxa5 mit TFIIA γ könnte letzterer zu Promotoren dirigiert werden, die in die Ausprägung der Krankheitssymptome involviert sind. Durch eine rezessive Mutation in TFIIA γ , die wahrscheinlich keine Auswirkungen auf die anderen Funktionen des Proteins hat, könnte diese Bindung verhindert werden. Da Xa5 (wt-Allel!) für das Wachstum des Pathogens von Vorteil ist, ist *xa5* im strengeren Sinne kein Resistenz-, sondern ein Suszeptibilitätsfaktor.

Es wäre denkbar, daß ein Bs3-ähnliches Protein den "Wächter" für *xa5* darstellt. Allerdings sind bei einer Hefe-Dihybrid-Sichtung (Y2H) mit AvrBs3 keine *xa5*-homologen Proteine identifiziert worden (SZUREK et al. 2001, D. Gürlebeck, S. Hahn u. Ulla Bonas, unveröffentlichte Daten) .

4.5.2 Auswertung der Sequenzdaten

Bis dato wurden bei der Sequenzierung von 47,1 kb des ca. 60 kb großen Zielbereichs nur wenige Sequenzbereiche mit hoher Kodierungswahrscheinlichkeit identifiziert (s. 3.5). Da bislang die Sequenzierung des *Bs3*-überspannenden Genomsegments noch nicht

abgeschlossen ist, besteht die Möglichkeit, daß das *Bs3* Gen im bisher nicht sequenzierten Bereich lokalisiert ist. Des weiteren besteht die Gefahr, daß bei der "in silico" Analyse bereits sequenzierter Bereiche kodierende Regionen nicht als solche identifiziert worden sind. Aufgrund der Tatsache, daß in der bisher vorliegenden Sequenz aus dem physikalischen Zielbereich noch kein NB-LRR-kodierendes Gen identifiziert wurde, erscheint es unwahrscheinlich, daß *Bs3* Teil eines "Clusters" von NB-LRR-kodierenden Genen ist.

Die Sequenzdaten, die eine hohe Kodierungswahrscheinlichkeit aufweisen, stammen von vier verschiedenen Plasmiden, die in drei Sequenzcontigs vorliegen (s. Abb. 4.2). Die identifizierten genomischen Sequenzabschnitte zeigen Homologie zu verschiedenen Bereichen einer cDNA aus *Lycopersicon esculentum*. Dazwischen liegen große nicht-homologe Bereiche, die auf mögliche Introns hinweisen könnten. Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, daß diese Sequenzabschnitte zu zwei oder drei unabhängigen cDNAs gehören, die Ähnlichkeiten mit im Zellkern lokalisierten transkriptionellen Regulatoren aufweisen.

Die "in silico" Analyse der vorhandenen Sequenzdaten lieferte bisher keine Hinweise auf andere Kandidatengene. Folglich ist das oben genannte Gen momentan der einzige potentielle *Bs3* Kandidat.

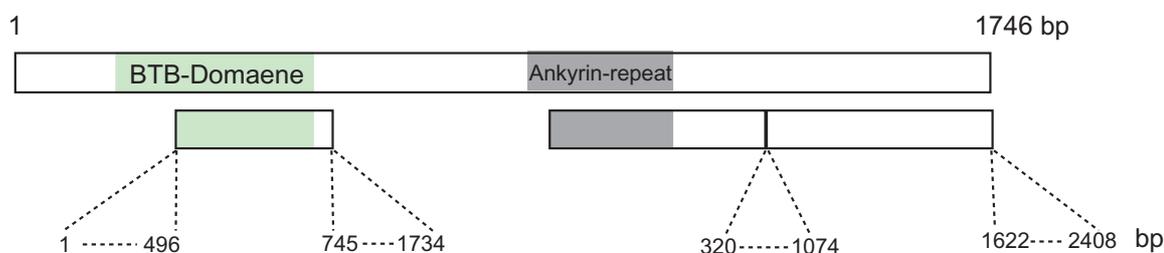


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Kandidatengens

Die breiten Balken entsprechen der Nukleotidsequenz des Gens aus *L. esculentum* (oben) und den dazu homologen Bereichen des Kandidatengens aus *C. annuum* (unten). Lage und Größe der nicht-homologen Nukleotidsequenzen sind durch gestrichelte Linien angegeben. Die Abschnitte der Protein-Domänen sind entsprechend ihrer Größe in die Nukleotidsequenz eingetragen.

Die cDNA aus Tomate weist zwei Strukturdomänen auf: eine BTB/POZ-Domäne (*Drosophila* Broad-Complex, Tamtrack, Bric à brac proteins/Pox virus zinc-finger proteins) im N-terminalen Bereich des Proteins und ein "Ankyrin-repeat-Motiv" (AR) im C-Terminus. Diese Domänen sind auch Teil der isolierten Subklone von BAC 128 (s. Abb. 4.2). Die Primärstruktur der "Ankyrin-repeats" besteht aus je zwei hintereinander

angeordneten 33-AS-Sequenzen ("tandem repeat"). Eine Studie in *Arabidopsis* zeigte, daß AR-Domänen weit verbreitet sind, und daß diese z. B. in Helikasen, Acyl-CoA-Binde-Proteinen oder auch in Proteinen auftreten, die verschiedenste Stressantworten von Pflanzen kontrollieren (BECERRA et al. 2004). Die Funktion der AR liegt in der Vermittlung von Protein-Protein Interaktionen - insbesondere in der Stabilisierung von Komplexen, wie bspw. der Zusammensetzung der Untereinheiten des GA-Bindeproteins (GABP), und damit der Vermittlung einer stabilen Bindung dieses Komplexes an DNA (THOMPSON et al. 1991).

Die BTB-Domäne ist häufig Bestandteil von Transkriptionsfaktoren, die Entwicklung und Differenzierung von Organismen beeinflussen (SHIM et al. 2001). Sie vermittelt Protein-Homodimerisierung und -Multimerisierung oder kann in heteromere Interaktionen involviert sein (HA et al. 2004).

Da das Kandidaten-Protein, das BTB- und AR-Domänen aufweist, über Ähnlichkeiten mit transkriptionellen Regulatoren verfügt, liegt die Annahme einer Aktivität im Zellkern nahe. Dieses Charakteristikum stimmt mit der Hypothese der Bs3-Lokalisation im Zellkern überein. Bs3 könnte direkt über die AR- und BTB-Domäne mit AvrBs3 interagieren, wofür allerdings in Y2H-Analysen keine Anhaltspunkte gefunden werden konnten (SZUREK et al. 2001, D. Gürlebeck, S. Hahn u. Ulla Bonas, unveröffentlichte Daten). Dies könnte aber auf einer ungenügenden Effizienz des Systems beruhen, gerade diese Interaktion nachzuweisen. Alternativ dazu könnte die Interaktion aber auch indirekt erfolgen, z. B. über die Erkennung eines xa5-ähnlichen "Pathogenitäts-Targets" oder die Rekrutierung oder Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch Bs3.

Abschließend ist nochmals darauf hinzuweisen, daß für das oben diskutierte Kandidatengen zum jetzigen Zeitpunkt - mit Ausnahme der genetisch- physikalischen Position - keine Evidenzen dafür vorliegen, daß es für *Bs3* kodiert.

4.6 Bedeutung des *Bs3* Gens für die Resistenzzüchtung

Mit der Kartierung des Resistenzgens *Bs3* aus Paprika stellt sich natürlich auch die Frage nach dem angewandten Nutzen dieser Arbeit. Die bakterielle Fleckenkrankheit ist eine der schwerwiegendsten Krankheiten im Paprikaanbau. Durch die Übertragung des Erregers mittels Wassertropfen läßt sich bei Freilandkulturen die Infektion ganzer Felder kaum verhindern. Daher ist die Grundlage vieler Züchtungsprogramme die Züchtung

Xcv-resistenter Paprikasorten. Die dominant vererbten *R*-Gene *Bs2* und *Bs3* werden seit langem in der Züchtung genutzt. Die genetische und physikalische Limitierung des *Bs3* Locus eröffnet nun die Möglichkeit diagnostische Marker zu etablieren, die in Züchtungsprogrammen verwendet werden können. Die CAPS-Marker Y65-2, Y152-1 und Y110-2 wurden bereits getestet (C. Kretschmer u. T. Lahaye, unveröffentlichte Daten). Leider war keiner der Marker aus unserer Kartierungspopulation (*C. annuum* x *C. frutescens*) innerhalb der verschiedenen *C. annuum* Arten informativ. Deshalb ist ein weiterer, wichtiger Schritt in der Etablierung diagnostischer Mikrosatellitenmarker zu sehen, die in Züchtungsprogrammen eingesetzt werden könnten. Die Grundlage hierfür liegt in der Sequenzierung der *Bs3* Region. Eine zweite Möglichkeit wäre die direkte Übertragung des *Bs3* Gens in agronomisch relevante Paprika-Kultivare. Generell kann jedes isolierte Gen in andere Pflanzenspezies oder –Kultivare eingebracht werden, um dort die Effekte des Gens nutzbar zu machen. Aber gerade bei *R*-Genen ist nicht immer eine Übertragung in andere Arten möglich. Das *Arabidopsis RPS2* *R*-Gen bspw. funktioniert nicht in Tomate, das *Bs2* Gen aus Paprika funktioniert ausschließlich in Solanaceae. Diese eingeschränkte Funktionalität wird als RTF (restricted taxonomic functionality) bezeichnet (TAI et al. 1999a, MCDOWELL and WOFFENDEN 2003). Daher sollte die Funktionalität von *Bs3* zuerst in *Capsicum* spp. und anderen Solanaceae getestet werden.

4.7 Ausblick auf weiterführende Arbeiten

Der Resistenzlocus *Bs3* konnte auf ein ca. 60 kb großes Intervall eingegrenzt werden. Nach Sequenzierung von ungefähr 47 kb wurde bisher erst ein Gen als Kandidat für *Bs3* identifiziert.

Die Fortführung der Sequenzierung des Resistenzlocus sollte zu zwei wesentlichen Ergebnissen führen: Erstens wird dadurch die Sequenz der 60 kb Region komplettiert. Zweitens lassen sich weitere Kandidatengene identifizieren und die genomische Sequenz des putativen Kandidatengens vervollständigen. Vermutlich müssten dazu noch 30 – 50 Subklone von BAC 128 ansequenziert werden.

RT-PCR-Analysen können außerdem klären, ob die Suszeptibilität in PI 197409 auf i) das Fehlen eines korrespondierenden Transkripts oder ii) ein aberrantes Transkript (bspw. "Splice-Site-Mutation") zurückzuführen ist.

Sobald die Sequenz des Kandidatengens vervollständigt sein wird, sind zwei Schritte notwendig:

- a) Das Kandidatengens sollte vergleichend in ECW-30R und PI 197409 sequenziert werden. Aus Unterschieden in der Sequenz können neue PCR-Marker etablierte werden. Sie dienen zur genaueren Analyse des *Bs3* Locus und könnten bei der Analyse der "mutierten" Rekombinanten (s. 3.2.2) genutzt werden.
- b) Die putative Resistenzfunktion des Kandidatengens muß mittels Komplementations-Analysen überprüft werden. Komplementations-Tests können derzeit nur transient über *Agrobacterium* in suszeptiblen Pflanzen erfolgen, da stabile Transformationen erstens zu langwierig sind, zweitens Paprika sehr schwer zu transformieren ist. Daß eine transiente Expression in Paprika prinzipiell möglich ist, wurde in unserem Labor schon gezeigt (VAN DEN AKERVEKEN et al. 1996). Dabei ist zu beachten, daß die Komplementation grundsätzlich mit genomischen DNA Fragmenten erfolgen sollte, da cDNA-Konstrukte nicht immer funktional sind (review s. JORDAN et al. 2002).

5 Zusammenfassung

Das auf Chromosom 2 von *Capsicum annuum* L. lokalisierte Resistenzgen *Bs3* vermittelt eine dominant-monogen vererbte Resistenz gegen das Gram-negative Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) mit dem korrespondierenden Avirulenz-Gen *AvrBs3* (PIERRE et al. 2000). Vorangegangene Untersuchungen zeigten, daß die *Bs3*-vermittelte Erkennung von *AvrBs3* abhängig von nukleären Lokalisierungssignalen im C-Terminus des Avirulenz-Proteins ist (VAN DEN AKERVEKEN et al. 1996). Um ein tiefgreifenderes Verständnis der molekularen Mechanismen dieser Resistenzreaktion, immer auch im Vergleich mit anderen zur *AvrBs3*-Familie korrespondierenden *R*-Genen, zu erhalten, sollte das *Bs3* Gen mittels eines Marker-gestützten Kartierungsansatzes isoliert werden.

Der erste Schritt der Kartierung im Rahmen dieser Arbeit war eine AFLP-Analyse. Am *Bs3* Locus, der auf ein ca. 1,7 cM großes Intervall eingegrenzt worden war, (s. 1.6 und PIERRE et al. 2000) sollte die Markerdichte erhöht werden, um die Feinkartierung des *Bs3* Gens zu ermöglichen. Die AFLP-Analyse erfolgte über eine Marker-basierte Vorselektion der Pflanzen, kombiniert mit der "bulked segregant-Methode". Nur homozygote Pflanzen wurden für den resistenten und suszeptiblen "Pool" ausgewählt, so daß neue Marker nur im 1,7 cM großen *Bs3*-Intervall gefunden werden sollten. Mit 1024 verschiedenen Oligonukleotidkombinationen wurden ca. 16.400 AFLP-Loci auf Kopplung mit *Bs3* hin untersucht. Daraus resultierten 47 AFLP-Marker. Nach Analysen der einzelnen "Pool-Pflanzen" konnte für 18 AFLP-Marker Kopplung mit *Bs3* nachgewiesen werden. Elf dieser Marker kartierten im Zielintervall.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Kartierungspopulation von 790 BC-Pflanzen (PIERRE et al. 2000) und 800 F₂-Pflanzen (U. Bonas u. T. Lahaye, unveröffentlichte Daten) auf über 5000 Individuen erhöht. Die genetische Kartierung der vorhandenen Marker in dieser Kartierungspopulation resultierte in der Eingrenzung des *Bs3* Locus auf 0,4 cM (Markerintervall Y152-1 und S1464).

Die physikalische Limitierung des *Bs3* Locus erfolgte über die Sichtung der BAC-Bibliotheken HD208 (RUFFEL et al. 2002) und ECW-30R (diese Arbeit). 17 BAC-Klone wurden in der *Bs3* Region identifiziert. Die genetische Kartierung der BAC-Enden und Überlappungsanalysen ergaben, daß zwei der BAC Klone (128 und 104) den *Bs3* Locus überspannen. Genetisch konnte der *Bs3* Locus auf 0,17 cM limitiert werden

(Diplomarbeit, P. Römer). In diesem Intervall (ca. 60 kb) wurden ca. 47 kb sequenziert. Bisher konnte ein Gen, das Ähnlichkeit zu einem transkriptionellen Regulator aufweist, als putativer Kandidat für *Bs3* identifiziert werden.

6 Literaturverzeichnis

- AKOPYANTS, N. S., A. FRADKOV, L. DIATCHENKO, J. E. HILL, P. D. SIEBERT et al., 1998 PCR-based subtractive hybridisation and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. Proc. Natl. Acad. Sci 95: 13108-13113.
- ALLARD, R.W. 1956 formulars and tabels to facilitate the calculation of recombination values in heredity. Hilgardia 24: 235-278
- ALTSCHUL, S. F., W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS AND D. J. LIPMAN, 1990 Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215: 403-410.
- ARUMUGANATHAN, K., AND E. D. EARLY, 1991 Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Molecular Biology Reporter 9: 211-215.
- BAI, J., S.-H. CHOI, G. PONCIANO, H. LEUNG AND J. LEACH, 2000 *Xanthomonas oryza* pv. *oryzae* avirulence gene contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. Molecular Plant-Microbe Interaction 13: 1322-1329.
- BAKER, C. J., E. W. ORLANDI AND N. M. MOCK, 1993 Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. Plant Physiology 102: 1341-1344.
- BALLVORA, A., M. PIERRE, G. VAN DEN AKERVEKEN, S. SCHORNACK, O. ROSSIER et al., 2001a Genetic mapping and functional analysis of the tomato *Bs4* locus governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AvrBs4 protein. Molecular Plant-Microbe Interaction 14: 629-638.
- BALLVORA, A., S. SCHORNACK, B. BAKER, M. GANAL, T. LAHAYE et al., 2001b Chromosome landing at the tomato *Bs4* locus. Mol Genet Genomics 266: 639-645.
- BANERJEE, D., X. ZHANG A. F. AND BENT, 2001 The leucin-rich repeat domain can determine effective interaction between *RPS2* and other host factors in *Arabidopsis* *RPS2* -mediated disease resistance. Genetics 158: 439-450.
- BARENDSE, G. W. M. AND G. M. VAN DER WEERDEN, 1999 The conservation of genetic resources of the Solanaceae, pp. 361-367 in *Solanaceae IV*, edited by S. D. E. Nee M., Lester R.N., Jessop J.P. Royal Botanic Gardens, Kew.
- BAYDAR, N. G., H. BAYDAR AND T. DEBENER, 2004 Analysis of genetic relationships among *Rosa damascena* plants grown in Turkey by using AFLP and microsatellite markers. Journal of Biotechnology 111: 263-267.
- BECERRA, C., T. JAHRMANN, P. PUIGDOMÈNECH AND C. M. VICIENT, 2004 Ankyrin repeat-containing proteins in *Arabidopsis*: characterization of a novel and

- abundant group of genes coding ankyrin-transmembrane proteins. *Gene* 340: 111-121.
- BENDAHDANE, A., G. FARNHAM, P. MOFFET AND D. C. BAULCOMBE, 2002 Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the *Rx* locus of potato. *The Plant Journal* 32: 195-204.
- BENDAHDANE, A., M. QUERCI, K. KANYUKA AND D. C. BAULCOMBE, 2000 *Agrobacterium* transient expression system as a tool for isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. *The Plant Journal* 21: 73-81.
- BENNETZEN, J. L., C. COLEMAN, R. LIU, J. MA AND W. RAMAKRISHNA., 2004 Consistent over-estimation of gene number in complex plant genomes. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 732-736.
- BONAS, U., R. E. STALL B. AND STASKAWICZ, 1989 Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Mol Gen Genet* 218: 127-136.
- BOSLAND, P. W. AND Y. ZEWDIE, 2001 Diversity and characterisation of capsaicinoids and their application to chemotaxonomy of *Capsicum*, pp. 179-185 in *Solanaceae V*, edited by van den Berg R.G. AND Barendse G.W.M. Nijmegen University Press.
- BRADEEN, J. M. AND P. W. SIMON, 1998 Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot *Y₂* locus to a simple, codominant, PCR-based marker form. *Theor Appl Genet* 97: 960-967.
- BÜTTNER, D. AND U. BONAS, 2003 Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 312-319.
- CHEN, C. AND J. F. G. GMITTER, 1999 Direct cloning and sequencing of bacterial artificial chromosome (BAC) insert ends based on double digestion. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 231-238.
- CHIN, D. B., R. ARROYO-GARCIA, O. E. OCHOA, R. V. KESSELI, D. O. LAVELLE et al., 2001 Recombination and spontaneous mutation at the major cluster of resistance genes in Luttuce (*Lactuca sativa*). *Genetics* 157: 831-849.
- CIVARDI, L., Y. XIA, K. J. EDWARDS, P. S. SCHNABLE AND B. J. NIKOLAU, 1994 The relationship between genetic and physical distances in the cloned *a1-sh2* interval of the *Zea mays* L. genome. *Proc. Natl. Acad. Sci* 91: 8268-8272.
- CLÉMENT, D., C. LANAUD, X. SABAU, O. FOUET, L. LE CUNFF et al., 2004 Creation of BAC genomic resources for cocoa (*Theobroma cacao* L.) for physical mapping of RGA containing BAC clones. *Theor Appl Genet* 108: 1627-1634.
- COOK, A. A. AND R. E. STALL, 1963 Inheritance of resistance in pepper to bacterial spot. *Phytopathology* 53: 1060-1062.
- DANGL, J. L. AND J. D. G. JONES, 2001 Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833.

- DESLANDES, L., J. OLIVIER, F. THEULIÈRES, J. HIRSCH, D. X. FENG et al., 2002 Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. Proc. Natl. Acad. Sci 99: 2404-2409.
- DINESH-KUMAR, S. P., W.-H. THAM J. AND B. BAKER, 2000 Structure-function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*. Proc. Natl. Acad. Sci 97: 14789-14794.
- DJIAN-CAPORALINO, C., L. PIJAROWSKI, A. FAZARI, M. SAMSON, L. GAVEAU et al., 2001 High-resolution genetic mapping of the pepper (*Capsicum annuum* L.) resistance loci *Me₃* and *Me₄* conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Theor Appl Genet 103: 592-600.
- DUSSE, C. M., M. QUINT, M. L. XU, A. E. MELCHINGER AND T. LÜBBERSTEDT, 2002 Conversion of AFLP fragments tightly linked to SCMV resistance genes *Scmv1* and *Scmv2* into simple PCR-based markers. Theor Appl Genet 105: 1190-1195.
- ECKARDT, N., 2004 Mechanism of Pto-Mediated Disease Resistance: Structural Analysis Provides a New Model. The Plant Cell 16: 2543-2545.
- ELLINGBOE, A. H., 1981 Changing concepts in host-pathogen interactions. Annual Review of Phytopathology 19: 125-143.
- ELLIS, J., P. DODDS AND T. PRYOR, 2000 Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. Current Opinion in Plant Biology 3: 278-284.
- FAO, 1996 FAO production yearbook. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Rome 49.
- FARIS, J. D., K. M. HAEN AND B. S. GILL, 2000 Saturation mapping of a gene-rich recombination hot spot region in wheat. Genetics 154: 823-835.
- FEINBERG, A. P. AND B. VOGELSTEIN, 1983 A technique for radiolabeling DNA restriction fragments to a high specific activity. Annals of Biochem 132: 6-13.
- FLOR, H. H., 1956 The complementary genetic systems in flax and flax rust. Adv. Genet. 8: 29-54.
- GELVIN, S. B., 2003 Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. Microbiol Mol. Biol. Rev. 67: 16-37.
- GEORGI, L. L., Y. WANG, D. YVERGNIAUX, T. ORMSBEE, M. INIGO et al., 2002 Construction of a BAC library and its application to identification of simple sequence repeats in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). Theor Appl Genet 105: 1151-1158.
- GLAZEBROOK, J., 2001 Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* - 2001 status. Current Opinion in Plant Biology 4.
- GÓMEZ-GÓMEZ, L. AND T. BOLLER, 2000 FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. Molecular Cell 5: 1003-1011.

- HA, C. M., J. H. JUN, H. G. NAM AND J. C. FLETCHER., 2004 *BLADE-ON-PETIOLE1* encodes a BTB/POZ Domaine protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 45: 1361-1370.
- HAANSTRA, J. P. W., C. WYE, H. VERBAKEL, F. MEIJER-DEKENS, P. VAN DEN BERG et al., 1999 An integrated high-density RFLP-AFLP map of tomato based on two *Lycopersicon esculentum* x *L.pennellii* F₂-populations. *Theor Appl Genet* 99: 254-271.
- HAMMOND-KOSACK, K. E. AND J. E. PARKER, 2003 Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 177-193.
- HAWKES, J. G., 1999 The economic importance of the family Solanaceae, pp. 1-8 in *Solanaceae IV*, edited by S. D. E. Nee M., Lester R.N., Jessop J.P. Royal Botanic Garden, Kew.
- HERBERS, K., J. CONRAD-STRAUCH AND U. BONAS, 1992 Race specificity of plant resistance to bacterial spot disease determined by repetitive motifs in a bacterial protein. *Nature* 356: 172-174.
- HULBERT, S. H., M. A. SUDUPAK. AND K. S HONG, 1993 Genetic relationships between alleles of the *Rpl* rust resistance locus of maize. *MPMI* 6: 387-392.
- HULBERT, S. H., C. A. WEBB, S. M. SMITH AND Q. SUN, 2001 Resistance gene complexes: Evolution and Utilisation. *Annual Review of Phytopathology* 39: 285-312.
- IYER, A. S. AND S. R. MCCOUCH, 2004 The Rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. *MPMI* 17: 1348-1354.
- JONES, D. A., C. M. THOMAS, K. E. HAMMOND-KOSACK, P. J. BALINTKURTI AND J. D. G. JONES, 1994 Isolation of tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266.
- JORDAN, T., S. SCHORNACK AND T. LAHAYE, 2002 Alternative splicing of transcripts encoding Toll-like plant resistance proteins-what is the functional relevance to innate immunity? *Trends in Plant Science* 7: 392-398.
- KANG, B. C., S. H. NAHM, J. H. HUH, H. S. YOO, J. W. YU et al., 2001 An interspecific (*Capsicum annuum* x *C. chinese*) F₂ linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers. *Theor Appl Genet* 102.
- KAUFMANN, H., L. MATTIESCH, H. LÖRZ AND T. DEBENER, 2003 Construction of a BAC library of *Rosa rugosa* Thumb. and assembly of a contig spanning *Rdr1*, a gene that confers resistance to blackspot. *Molecular Gen Genomics* 268: 666-674.
- KAWCHUK, L. M., J. HACHEY, D. R. LYNCH, F. KULCSAR, G. VAN ROOIJEN et al., 2001 Tomato *Ve* disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci Early Edition*.

- KIM, B. S., AND R. W. HARTMANN, 1985 Inheritance of a gene (Bs₃) conferring hypersensitive resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper (*Capsicum annuum*). Plant Dis 69: 233-235.
- KIM, J., E. A. CARVER AND L. STUBBS, 1997 Amplification and sequencing of end fragments from bacterial artificial chromosome clones by single-primer polymerase chain reaction. Analytical Biochemistry 253: 272-275.
- KIM, U.-J., B. W. BIRREN, T. SLEPAK, V. MANCINO, C. BOYSEN et al., 1996 Construction and Characterisation of a Human Bacterial Artificial Chromosome Library. Genomics 34: 213-218.
- KOBAYASHI, N., T. G. BOYER AND A. J. BERK, 1995 A class of activation domains interacts directly with TFIIA and stimulates TFIIA-TFIID-promotor complex assembly. Molecular Cell Biology 15: 6465-6473.
- KOBE, B., AND A. V. KAJAVA, 2001 The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. Curr Opin Struct Biol 11: 725-732.
- KUANG, H., S.-S. WOO, B. C. MEYERS, E. NEVO AND R. W. MICHELMORE, 2004 Multiple genetic processes result in heterogeneous rates of evolution within the major cluster disease resistance genes in lettuce. The Plant Cell 16: 2870-2894.
- LAHAYE, T. AND U. BONAS, 2001 Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. Trends in Plant Science 6: 479-485.
- LAHAYE, T., S. HARTMANN, S. TÖPSCH, A. FREIALDENHOVEN, M. YANO et al., 1998 High-resolution genetic and physical mapping of the *Rar1* locus in barley. Theor Appl Genet 97: 526-534.
- LEFEBVRE, V., B. GOFFINET, J. C. CHAUVET, B. CAROMEL, P. SIGNORET et al., 2001 Evaluation of genetic distances between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: comparison of AFLP, RADP and phenotypic data. Theor Appl Genet 102: 741-750.
- LEFEBVRE, V., S. PFLIEGER, A. THABUIS, C. CARANTA, A. BLATTES et al., 2002 Towards the saturation of the pepper linkage map by alignment of three intraspecific maps including known-function genes. Genome 45: 839-854.
- LEISTER, R. T. AND F. KATAGIRI, 2000 A resistance gene product of the nucleotide binding site-leucine rich repeat class can form a complex with bacterial avirulence proteins in vivo. The Plant Journal 22: 345-354.
- LIVINGSTONE, K. D., V. K. LACKNEY, J. R. BLAUTH, R. VAN WIJK AND M. K. JAHN, 1999 Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in the Solanaceae. Genetics 152: 1183-1202.
- MAROIS, E., G. VAN DEN AKERVEKEN AND U. BONAS, 2002 The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. Molecular Plant Microbe Interaction 15: 637-646.

- MARTIN, G. B., A. J. BOGDANOVA AND G. SESSA, 2003 Understanding the function of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology* 54: 23-61.
- MARTIN, G. B., S. H. BROMMONSCHENKEL, J. CHUNWONGSE, A. FRARY, M. W. GANAL et al., 1993 Map-Based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262: 1432-1436.
- MCDOWELL, J. M. AND B. J. WOFFENDEN, 2003 Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *TRENDS in Biotechnology* 21: 178-183.
- MEYER, A., 2002 Markersichtung am Paprika *Bs3*-Locus mittels subtraktiver Hybridisierung. Diplomarbeit, Inst. für Genetik, Martin Luther Universität, Halle-Wittenberg.
- MEYERS, B. C., A. W. DICKERMANN, R. W. MICHELMORE, S. SIVARAMAKRISHNAN, B. W. SOBRAL et al., 1999 Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *The Plant Journal* 20: 317-332.
- MICHELMORE, R. W., I. PARAN AND R. V. KESSELI, 1991 Identification of markers linked to disease-resistance gene by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci* 88: 9828-9832.
- MINSAVAGE, G. V., D. DAHLBECK, M. C. WHALEN, B. KEARNEY, U. BONAS et al., 1990 Gene-for-Gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - Pepper Interactions. *MPMI* 3: 41-47.
- MOSCONE, E. A., M. BARANY, I. EBERT, J. GREILHUBER, F. EHRENDORFER et al., 2003 Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by Flow Cytometry and Feulgen Densitometry. *Annals of Botany* 92: 21-29.
- MOZO, T., S. FISCHER, S. MEIER-EWERT, H. LEHRACH AND T. ALTMANN, 1998 Use of the IGF BAC library for physical mapping of the *Arabidopsis thaliana* genome. *The Plant journal* 16: 377-384.
- NEFF, M. M., J. D. NEFF, J. CHORY AND A. E. PEPPER, 1998 dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *The Plant Journal* 14: 387-392.
- NEWMAN, M.-A., E. VON ROEPENACK-LAHAYE, A. PARR, M. J. DANIELS AND J. M. DOW, 2002 Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defense in response to bacteria. *The Plant Journal* 29: 487-495.
- NIMCHUK, Z., L. ROHMER, J. H. CHANG AND J. L. DANGL, 2001 Knowing the dancer from the dance: R-gene products and their interactions with other proteins from host and pathogen. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 288-294.
- NÜRNBERGER, T., F. BRUNNER, B. KEMMERLING AND L. PIATER, 2004 Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198: 249-266.

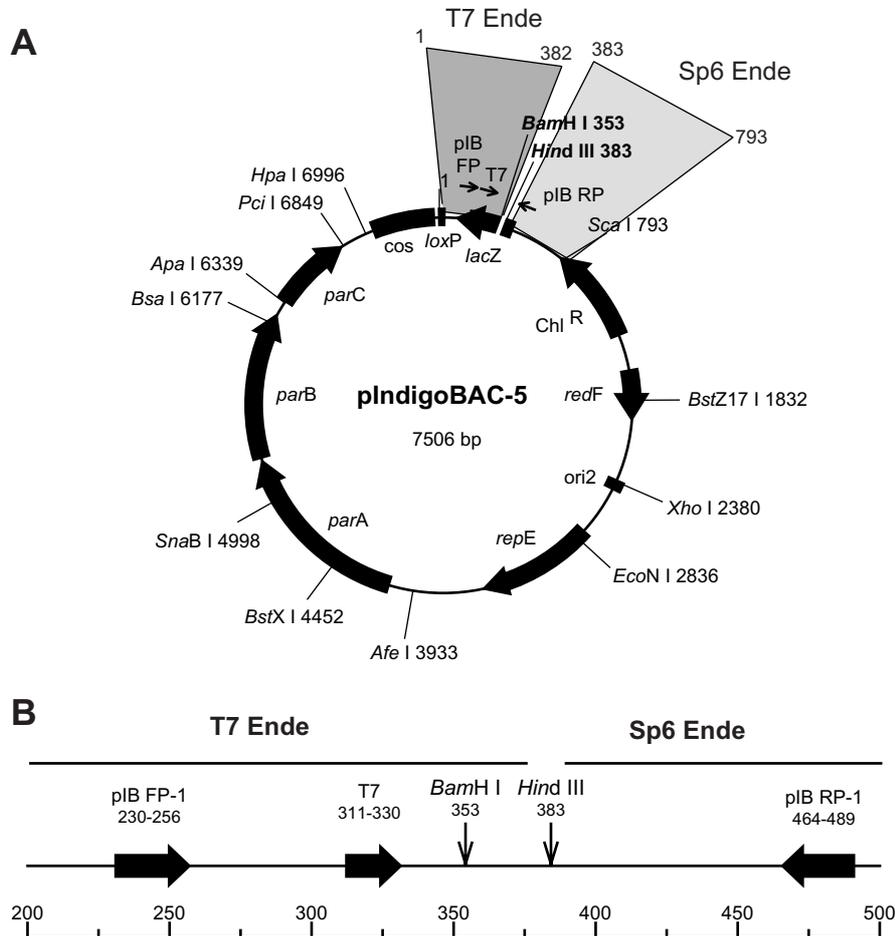
- PARAN, I., J. R. VAN DER VOORT, V. LEFEBVRE, M. JAHN, L. LANDRY et al., 2004 An integrated genetic linkage map of pepper (*Capsicum* spp.). *Molecular Breeding* 13: 251-261.
- PETERS, J. L., F. CNUUDE AND T. GERATS, 2003 Forward genetics and map-based cloning approaches. *Trends Plant Science* 8: 484-491.
- PETES, T. D., 2001 Meiotic Recombination Hot Spots and Cold Spots. *Nature Review Genetics* 2: 360-369.
- PIERRE, M., L. NOËL, T. LAHAYE, A. BALLVORA, J. VEUSKENS et al., 2000 High-resolution genetic mapping of the pepper resistance locus *Bs3* governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *AvrBs3* protein. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 255-263.
- RAFALSKI, J. A., 2002 Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. *Plant Science* 162: 329-333.
- RAMAKRISHNA, W., J. EMBERTON, M. OGDEN, P. SANMIGUEL AND J. L. BENNETZEN, 2002 Structural analysis of the Maize *Rp1* complex reveals numerous sites and unexpected Mechanisms of local rearrangement. *The Plant Cell* 14: 3213-3223.
- RATCLIFF, F., A. M. MARTIN-HERNANDEZ AND D. C. BAULCOMBE, 2001 Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal* 25: 237-245.
- RICHTER, T. E., T. J. PRYOR, J. L. BENNETZEN AND S. H. HULBERT, 1995 New rust resistance specificities associated with recombination in the *Rp1* complex in maize. *Genetics* 141: 373-383.
- RUFFEL, S., M.-H. DUSSAULT, A. PALLOIX, B. MOURY, A. BENDAHMANE et al., 2002 A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *The Plant Journal* 32: 1067-1075.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH AND T. MANIATIS, 1989 *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory).
- SANGER, F., S. NICKLEN AND A. R. COULSON, 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci* 74: 5463-5467.
- SARDENASI, N., A. KUMAR, K. R. RAJYASHRI, S. NAIR AND M. MOHAN, 2002 Identification and mapping of an AFLP marker linked to *Gm7*, a gall midge resistance gene and its conversion to a SCAR marker for its utility in marker aided selection in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 691-698.
- SCHORNACK, S., A. BALLVORA, D. GÜRLEBECK, J. PEART, M. GANAL et al., 2004 The tomato resistance protein *Bs4* is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates responses to severely truncated derivatives of *AvrBs4* and overexpressed *AvrBs3*. *The Plant Journal* 37: 46-60.
- SHIM, K., K. J. BLAKE, J. JACK AND M. A. KRASNOW, 2001 The *Drosophila* ribbon gene encodes a nuclear BTB domain protein that promotes epithelial and morphogenesis. *Development* 128: 4913-4933.

- SHIZUYA, H., B. BIRREN, U.-J. KIM, V. MANCINO, T. SLEPAK et al., 1992 Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci* 89: 8794-8797.
- SOUTHERN, E. M., 1975 Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gelelectrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503-517.
- STALL, R. E., 1995 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, pp. 167-184 in *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases: Histological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases, Prokaryotes*, edited by S. R. P. Singh U.S., Kohmoto K. Pergamon Press, Tarrytown NY.
- SUDUPAK, M. A., J. L. BENNETZEN AND S. H. HULBERT, 1993 Unequal exchange and meiotic instability of disease-resistance genes in the *Rp1* region of Maize. *Genetics* 133: 119-125.
- SZUREK, B., E. MAROIS, U. BONAS AND G. VAN DEN AKERVEKEN, 2001 Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *The Plant Journal* 26: 523-534.
- SZUREK, B., O. ROSSIER, G. HAUSE AND U. BONAS, 2002 Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Molecular Microbiology* 46: 13-23.
- TAI, T., D. DAHLBECK, E. T. CLARK, P. GAJIWALA, R. PASION et al., 1999a Expression of the *Bs2* pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci* 96: 14153-1458.
- TAI, T., D. DAHLBECK, R. E. STALL, J. PELEMAN AND B. J. STASKAWICZ, 1999b High-resolution genetic and physical mapping of the region containing the *Bs2* resistance gene of pepper. *Theor Appl Genet* 99: 1201-1206.
- TAI, T., AND B. J. STASKAWICZ, 2000 Construction of a yeast artificial chromosome library of pepper (*Capsicum annuum* L.) and identification of clones from the *Bs2* resistance locus. *Theor Appl Genet* 100: 112-117.
- TAKKEN, F. W., AND M. H. J. JOOSTEN, 2000 Plant resistance genes: their structure, function and evolution. *European Journal of Plant Pathology* 106: 699-713.
- TAMELING, W. I. L., S. D. J. ELZINGA, P. S. DARMIN, J. H. VOSSEN, F. W. TAKKEN et al., 2002 The tomato R gene products I-2 and Mi-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *The Plant Cell* 14: 2929-2939.
- TANKSLEY, S. D., M. W. GANAL AND B. M. MARTIN, 1995 Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends in Genetics* 11: 63-68.
- TANKSLEY, S. D., M. W. GANAL, J. P. PRINCE, M. C. DEVICENTE, M. W. BONIERBALE et al., 1992 High-density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Trends in Genetics* 11: 63-68.

- THOMAS, C. M., S. TANG, K. HAMMOND-KOSACK AND J. D. G. JONES, 2000 Comparison of the Hypersensitive Response induced by the tomato *Cf-4* and *Cf-9* genes in *Nicotiana* spp. *Molecular Plant Microbe Interaction* 13: 465-469.
- THOMAS, C. M., P. VOS, M. ZABEAU, D. A. JONES, K. A. NORCOTT et al., 1995 Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The Plant Journal* 8: 785-794.
- THOMPSON, C. C., T. A. BROWN AND S. L. MCKNIGHT, 1991 Convergence of Ets- and Notch-related structural motifs in a heteromeric DNA binding complex. *Science* 253: 762-768.
- THORDAL-CHRISTENSEN, H., 2003 Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 351-357.
- TORNERO, P., P. MERRITT, A. SADANANDOM, K. SHIRASU, R. W. INNES et al., 2002 *Rar* and *NDRI* contribute quantitatively to disease resistance in Arabidopsis, and their relative contributions are dependent on the *R* gene assayed. *The Plant Cell* 14: 1005-1015.
- VAN DEN AKERVEKEN, G., E. MAROIS AND U. BONAS, 1996 Recognition of the Bacterial Avirulence Protein AvrBs3 Occurs inside the Host Plant Cell. *Cell* 87: 1307-1316.
- VAN DER HOORN, R. A. L., P. J. G. M. DE WIT AND M. H. A. J. JOOSTEN, 2002 Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends in plant science* 7: 67-71.
- VILARINHOS, A. D., P. PIFFANELLI, P. LAGODA, S. THIBIVILLIERS, X. SABAU et al., 2003 Construction and characterisation of a bacterial artificial chromosome library of banana (*Musa acuminata* Colla). *Theor Appl Genet* 106: 1102-1106.
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DEN LEE et al., 1995 AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- WANG, G. L., C. WU, L. ZENG, C. HE, M. BARAOIDAN et al., 2004 Isolation and characterisation of rice mutants compromised in *Xa21*-mediated resistance to *X.oryzae* pv. *oryzae*. *Theor Appl Genet* 108: 379-384.
- WHITHAM, S., S. MCCORMICK AND B. BAKER, 1996 The *N* gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8776-8781.
- WHITMAN, S. A., ANDERBERG R. J., S. T. CHISHOLM AND J. C. CARRINGTON, 2000 *Arabidopsis* *RTM2* gene is necessary for specific restriction of tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock-like protein. *Plant Cell* 12: 569-582.
- WILLIAMS, J. G. K., A. R. KUBELIK, K. J. LIVAK, J. A. RAFALSKI AND S. V. TINGEY, 1990 DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 22: 6531-6535.
- WILLMITZER, L., AND T. HOFFMAN, 1997 *Biologische Grundlagen der Pflanzenzüchtung* (Odenbach W. Hrsg). Parey Buchverlag Berlin.

- WULFF, B. B. H., C. M. THOMAS, M. SOMKER, M. GRANT AND J. D. G. JONES, 2001 Domain swapping and gene shuffling identify sequences required for induction of an Avr-dependent hypersensitive response by the tomato Cf-4 and Cf-9 Proteins. *The Plant Cell* 13: 255-272.
- YANG, Y., AND D. W. GABRIEL, 1995 Intragenic recombination of a single plant pathogen gene provides a mechanism for the evolution of new host specificities. *Journal of Bacteriology* 177: 4963-4968.
- YAO, H., Q. ZHOU, J. LI, M. YANDEAU, B. J. NIKOLAU et al., 2002 Molecular characterization of meiotic recombination across the 140-kb multigenic *al-sh2* interval of maize. *PNAS* 99: 6157-6162.
- ZHANG, L., A. S. PEEK, D. DUNAMS AND B. S. GAUT, 2002 Population genetics of duplicated disease-defense genes, *hm1* and *hm2* in maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.) and its wild ancestor (*Zea mays* spp. *parviglumis*). *Genetics* 162: 851-860.

7 Anhang



pIB FP = pIndigoBAC-5 Forward Sequencing Primer 5' GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG 3'
 pIB RP = pIndigoBAC-5 Reverse Sequencing Primer 5' CTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC 3'
 T7 = T7 Promoter Primer 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

Abbildung 7.1: Vektorkarte von pIndigo BAC-5

A: Zirkuläre Darstellung. In den grau unterlegten Abschnitten schneiden die Restriktionsenzyme *Bst*1107I, *Dra*I, *Eco*RV und *Sac*I nicht. Diese wurden für die "GenomeWalker"-basiert Isolierung von BAC-Enden genutzt. Die pIndigo-spezifischen Oligonukleotide, die für die Amplifikation verwendet wurden, liegen in diesen Abschnitten: BAC-A5 und BAC-A6 T7-Ende (1 – 383). Entsprechend für das Sp6-Ende (383 – 793): B1 und Seq01.

BAC-B1-PR: CCGATTCATTAATGCAGCTGGCACG
 BAC-A5-PR: GTTGCGGGTGTTCGGGGCTGGCTTAACTATG
 BAC-A6-PR: GTGAAATACCACACAGATGCGTAAGGAG
 BAC-Seq-01-PR: ACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGC

B: MCS und Sequenzieroligonukleotide. Sp6- und T7-Ende werden über die verwendeten Sequenzieroligonukleotide definiert.

Tabelle 7.1: Rekombinante Pflanzen im Marker-Intervall Y65-2/Y110-2.

Pfl.-Nr.	Y65-2	Y152-1	Bs3	14T7	3T7	1464	2245	Y110-2
S326	11	11	sus	11	11	11	11	30
S339	11	11	11			11	30	30
R360	11	30	30	30	30	30	30	30
S412	11	11	11			11	11	30
S559	30	11	11	11	11	11	11	11
R711	11	30	res	30	30	30	30	30
R888	11	30	res	30	30	30	30	30
R902	30	30	res	11	11	11	11	11
S927	11	11	sus	11	11	11	30	30
A13	11	11	res	30	30	30	30	30
A27	30	30	res	11	11	11	11	11
A34	30	30	res	30	30	30	30	h
A37	30	30	sus	11	11	11	11	11
A50	11	11	res	30	30	30	30	30
A88	11	11	sus	30	30	30	30	30
A107	30	30	res	11	11	11	11	11
45	11	11	11	11	11	11	11	30
47	30	30	sus	11	11	11	11	11
66	11	11	11	11	11	11	11	30
73	h	h		h	h	30	30	30
92	30	30	res	30	30	30	11	11
117	30	30	res	30	30	30	30	11
133	11	11	11	11	11	11	11	30
134	30	30	30	30	30	30	30	11
135	11	11	res	30	30	30	30	30
147	11	30	res	30	30	30	30	30
158	30	30	sus	11	11	11	11	11
166	11	11	sus	11	11	11	11	30
209	30	30	sus	11	11	11	11	11
255	11	11	sus	30	30	30	30	30
267	30	30	res	30	30	30	11	11
290	11	11	sus	11	11	11	11	30
306	11	11	sus	11	11	11	11	30
330	30	30	res	30	30	30	30	11
335	30	30	res	30	30	30	30	11
383	h	h		h	h	h	h	11
389	11	11	res	30	30	30	30	30
418	11	11	sus	11	11	11	11	30
443	30	30	res	30	30	30	30	11
451	30	30	sus	11	11	11	11	11
458	11	11	sus	11	11	11	30	30
475	30	30	res	30	30	30	30	11

plant	Y65-2	Y152-1	Bs3	14T7	3T7	1464	2245	Y110-2
524	30	30	sus	11	11	11	11	11
543	30	30	11?	30	30	30	11	11
572	h	h	11?	h	h	h	11	11
622	11	30	res	30	30	30	30	30
655	11	11	11?	11	11	11	30	30
671	11	11	sus	11	11	11	30	30
687	30	30	11?	30	30	30	30	11
775	30	30	11?	30	30	30	11	11
787	30	30	res	30	11	11	11	11
831	h	30		30	30	30	30	30
856	11	11	sus	11	11	11	30	30
887	h	h	11	h	h	h	11	11
892	11	11	sus	30	30	30	30	30
909	11	30	res	30	30	30	30	30
933	11	11	sus	11	11	11	30	30
968	30	11	sus	11	11	11	11	11
969	11	11	sus	11	11	11	11	30
973	11	11	res	30	30	30	30	30
1031	30	30		30	30	30	30	h
1036	30	30		30		30	30	h
1052	30	30	11	30	30	30	30	11
1062	11	11	sus	11	11	11	11	30
1088	h	h	res	h	h	h	h	11
1147	11	11	sus	11	11	11	30	30
1153	30	30	res	30	30	30	11	11
1176	11	11	sus	11	11	11	30	30
1184	11	11	sus	11	11	11	11	30
1225	30	30	res		30	30	30	11
1285	h	30	30	30	30	30	30	30
1326	11	11	sus	11	11	11	11	30
1333	11	11	sus	11	11	11	h	h
1340	11	11	sus?	11	11	11	11	30
1358	h	h	res	30	30	30	30	30
1383	30	30	sus?	30	30	30	11	11
1398	h	h				h	h	11
1405	30	30	sus	11	11	11	11	11
1413	h	30	30	30	30	30	30	30
1425	11	11	sus	11	11	11	11	30
1428	30	11	sus	11	11	11	11	11
1454	30	30	11	30	30	30	30	11
1457	11	11	sus	30	30	30	30	30
1518	11	11	res?	30	30	30	30	30
1549	h	11	sus	11	11	11	11	11
1554	30	30	res	30	30	30	30	h

plant	Y65-2	Y152-1	Bs3	14T7	3T7	1464	2245	Y110-2
1556	11	30	sus	30	30	30	30	30
1579	11	11	sus	11	11	11	11	30
1581	11	11	sus	11	11	11	11	30
1582	11	11	11	11	11	30	30	30
1583	30	30	res	30	30	30	11	11
1585	h	h		h	h	30	30	30
1635	30	30	res	30	30	30	30	11
1653	h	h		h	h	h	h	30
1672	30	30	res?	30	30	30	30	11
1689	11	30	11?	30	30	30	30	30
1717	11	30	res	30	30	30	30	30
1729	11	h	res				30	h
1741	30	30	res	30	30	30	11	11
1755	h	30	res	30	30	30	30	30
1822	11	11	sus	30	30	30	30	30
1857	30	30	res	11	11	11	11	11
1873	h	11	sus	11	11	11	11	11
1880	11	11	sus	11	11	30	30	30
1901	h	h	res	h	h	h	h	11
1913	30	30		30	30	30	30	h
1986	h	11	sus	11	11	11	11	11
2024	30	30	res	11	11	11	11	11
2043	30	30	res	30	30	30	11	11
2083	30	30	sus	11	11	11	11	11
2130	11	11	sus	11	11	11	11	30
2180	h	30	11	30	30	30	30	30
2183	h	30	30	30	30	30	30	30
2240	h	h	30		11?	h	h	11
2265	30	30	sus	11	11	11	11	11
2279	11	11	sus	11	11	11	30	30
2301	11	11		11	11	11	11	h
2384	11	11		11	11	11	h	h
2404	h	h		h	h	h	h	30
2416	30	30		30	30	30	30	h
2436	11	11		11	11	11	11	h
2447	11	11	sus	11	11	h	h	h
2457	11	11		11	11	11	11	30
2470	h	h		30	h	h	11	11
2472	11	11	sus?	30	30	30	30	30
2484	h	30	11	30	30	30	30	30
2491	30	30		30	30	30	30	11
2560	h	30	30	30	30	30	30	30
2576	h	11			11	11	11	11
2595	h	30			30	30	30	30
2619	30	30	sus	11	11	11	11	11
2627	h	h			h	h	h	11

plant	Y65-2	Y152-1	Bs3	14T7	3T7	1464	2245	Y110-2
2627	h	h			h	h	h	11
2633	30	30			30	30	h	h
2685	11	30	res	30	30	30	30	30
2704	11	11				11	11	h
2826	30	h				h	h	h
2834	30	30				30	30	11
2844	h	h				h	h	11
2860	h	h		h	h	h	h	11
2874	30	30				30	30	h
2897	11	11				11	11	h
2914	h	30		30	30	30	30	30
2920	h	h				h	h	11
2945	30	30	30	30	h	30	11	11
2949	h	h		h	h	h	11	11
2959	h	h		h	h	h	11	11
2990	h	h		h	h	h	11	11
3003	h	h		h	h	h	11	11
3023	h	h				h	30	30
3062	11	11				11	h	h
3079	11	11				11	11	h
3117	30	30		30	30	30	30	h
3253	h	h				h	h	11
3279	h	30		30	30	30	30	30
3315	11	11				11	11	h
3356	30	30				30	h	h
3384	h	h				h	30	30
3401	h	11	sus	11	11	11	11	11
3498	30	30	res	30	30	30	h	h
3518	h	30		30	30	30	30	30
3542	h	30	res	30	30	30	30	30
3589	h	h				h	h	11
3600	30	30	sus	11	11	11	11	11
3690	11	11	sus	30	30	30	30	30
3735	11	11	sus	30	30	30	30	30
3739	30	30	res?			30	30	11
3767	h	h				h	h	11
3771	h	h				h	h	11
3775	30	30				30	30	h?
3795	11	11	sus	11	11	30	30	30
3805	h	h		h	h	h	h	11?
3843	11	11	sus	30	30	30	30	30
3845	h	h	res	h	h	h	11	11
3846	h	h	res	11	11	h	h	h
3932	h				h	h	h	11
3937	h				h	h	h	11

11: Genotyp PI 197409, 30: Genotyp ECW-30R, h: heterozygot

Tabelle 7.2: Die 58 bestätigten AFLP-Marker

Oligo.-Komb.	1.Test	2.Test	Individuen	Anordnung	CAPS
S08/T54	+	+	+	-	-
S09/T26	+	+	-	-	-
S09/T31	+	-	-	-	-
S09/T34	+	+	-	-	-
S09/T37	+	-	-	-	-
S09/T39	+	+	-	-	-
S10/T34	+	+	-	-	-
S10/T56	+	+	-	-	-
S12/T70	+	+	-	-	-
S13/T28	+	+	-	-	-
S13/T31	+	+	-	-	-
S13/T33	+	+	-	-	-
S13/T37	+	+	-	-	-
S13/T39	+	-	-	-	-
S13/T57	+	-	-	-	-
S13/T74	+	-	-	-	-
S14/T60	+	+	+	-	-
S14/T71	+	+	+	+	-
S14/T25	+	+	+	+	-
S14/T27	+	+	-	-	-
S14/T24	+	+	-	-	-
S14/T64	+	+	+	+	+
S15/T24	+	+	+	+	-
S15/T30	+	+	-	-	-
S15/T37	+	+	-	-	-
S15/T60	+	+	-	-	-
S16/T30	+	+	+	-	-
S16/T34	+	+	-	-	-
S16/T35	+	+	-	-	-
S16/T56	+	+	-	-	-
S16/T57	+	+	-	-	-
S16/T63	+	+	-	-	-
S16/T70	+	+	-	-	-
S16/T79	+	-	-	-	-
S16/T83	+	-	-	-	-
S16/T85	+	+	-	-	-
S17/T28	+	+	-	-	-
S17/T34	+	+	-	-	-
S17/T71	+	+	-	-	-
S18/T27	+	+	+	+	-
S18/T29	+	+	-	-	-
S18/T34	+	+	+	+	-
S18/T36	+	-	-	-	-
S18/T60	+	+	-	-	-
S18/T61	+	+	+	-	-
S19/T70	+	+	+	-	-
S19/T29	+	+	-	-	-
S19/T34	+	+	+	+	-
S20/T66	+	-	-	-	-
S21/T57	+	+	+	-	-
S21/T79	+	+	-	-	-
S22/T24	+	+	+	+	-
S22/T28	+	+	+	+	-
S22/T30	+	-	-	-	-
S22/T45	+	+	+	+	+
S22/T46	+	-	-	-	-
S22/T59	+	+	+	-	-
S22/T63	+	+	+	+	-

Tabelle 7.3: Pflanzen, die für die Anordnung der AFLP-Marker genutzt wurden

Pflanzen-Nr.	Phänotyp	Y65-2	Y152-1	Y110-1
A27/7	R	r	r	s
330/7	R	r	r	s
775/10	S	r	r	s
1326/3	S	s	s	r
1579/2	S	s	s	r
968/6	S	r	s	s
326/C-2	S	s	s	r
339/17-1	S	s	s	r
902/12-1	R	r	r	s
927/5-2	S	s	s	r
A88/C-1	S	s	s	r
418/8	S	s	s	r
A107/1	R	r	r	s
892/11	S	s	s	r
458/8	S	s	s	r
209/3	S	r	r	s
224/12	S	r	s	s
117/9	R	r	r	s
412/34-1	S	s	s	r
45/9	S	s	s	r
134/3	R	r	r	s
147/3	R	r	s	s
166/4	S	s	s	r
451/7	S	r	r	s
655/4	S	s	s	r
1873/7	S	r	s	s

R: HR, S: keine HR (ws), r: Genotyp ECW-30R, s: Genotyp PI197409

Danksagung

An erster Stelle richtet sich mein Dank an Frau Prof. Dr. Ulla Bonas für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe und die Überlassung des vielseitigen und interessanten Themas. Außerdem möchte ich mich für die gute Betreuung und für die Begutachtung der Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Thomas Debener danke ich für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit, besonders in Anbetracht der kurzen Zeit, die dafür zur Verfügung steht.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Thomas Lahaye. Für sein Engagement, die vielen konstruktiven Diskussionen und die Unterstützung bei zahlreichen theoretischen und praktischen Fragen, die sich während dieser Arbeit ergaben.

Annett, Kristin, Sebastian und Patrick danke ich für die zahlreichen "Nachbarschaftshilfen" im Laboralltag und die gute Laboratmosphäre.

Carola möchte ich besonders für ihre Sequenzierleidenschaft danken und für die tatkräftige Hilfe bei vielen Hochdurchsatz-Experimenten.

Außerdem möchte Bianca dafür danken, daß sie bei all den tausend ausgesäten, umgetopften und beernteten Paprikapflanzen den Überblick behielt.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für das gute Arbeitsklima, das zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Nicht zu vergessen die zahlreichen Ausgleichssport-Stunden mit Doreen.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders herzlich dafür, daß sie mir ein angenehmes und erfolgreiches Studium und nicht zuletzt diese Arbeit ermöglicht haben.

Ines danke ich für das Aufspüren der letzten Fehler.

Danke Stoffel für Deine Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Tina Jordan
Geburtsdatum	25.09.73
Geburtsort	Ebingen-Albstadt

Ausbildung

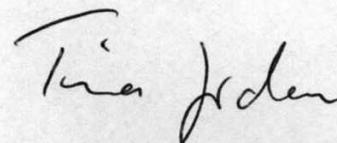
1980 - 1983	Besuch der Grund- und Hauptschule Schutterwald
1983 - 1993	Besuch der Freien Waldorfschule Offenburg
1993 - 1998	Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin
11/1998 – 07/1999	Diplomarbeit am Institut für Angewandte Genetik der FU Berlin mit dem Titel "Kartierung molekularer Marker in der <i>RPBI</i> -Region"
11/1999 – 12/2004	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß diese Arbeit von mir ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden.

Halle/Saale im Dezember 2004

Tina Jordan

A handwritten signature in cursive script that reads "Tina Jordan". The signature is written in black ink and is positioned below the printed name.