

Aus dem Institut für Angewandte Genetik der Freien Universität Berlin

**Hochauflösende Kartierung und molekulare Analyse
der Region um den Resistenzlocus *RPB1*
auf Chromosom 1 von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Andrea Arbeiter
aus Berlin

Berlin 2002

Gutachter: Prof. Dr. M. D. Sacristán

Gutachter: Prof. Dr. T. Schmülling

Tag der mündlichen Prüfung: 12. April 2002

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Abwehrmechanismen bei Pflanzen	1
1.2 Strukturmerkmale und Funktionen von Resistenzgenen	3
1.3 Isolierung von Genen	5
1.3.1 Kartengestütztes Klonieren	5
1.4 <i>Arabidopsis thaliana</i>	7
1.5 Genetik der Wirt-Pathogen-Interaktion	8
1.6 Das Krankheitsbild von <i>Plasmodiophora brassicae</i>	9
1.7 Die Interaktion von <i>Plasmodiophora brassicae</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
1.8 Identifizierung und Kartierung des Resistenzgens <i>RPBI</i>	11
1.9 Zielsetzung der Arbeit	12
2. Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	14
2.1.2 DNA- Längenstandards und Gelbeladungspuffer	14
2.1.3 Kits	14
2.1.4 Synthetische Oligonukleotide	15
2.1.5 Gebrauchswaren und Geräte	15
2.1.6 Stammlösungen	15
2.1.7 Nährmedien	16
2.1.8 <i>Plasmodiophora brassicae</i> Isolat e _H	17
2.1.9 <i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotypen	17
2.1.10 Kreuzungspopulation	18
2.1.11 BAC-Klone	19
2.1.12 Cosmidbibliotheken	19
2.1.13 RFLP-Sonden	20
2.1.14 Bakterienstämme	20
2.1.15 Vektoren	20
2.2 Methoden	20
2.2.1 Kultivierung der Pflanzen	20
2.2.2 Herstellung des Inokulums	21
2.2.3 Inokulation der Pflanzen	21
2.2.4 Bonitur der Pflanzen	21
2.2.5 DNA-Minipräparation (nach Edwards)	23
2.2.6 Gesamt-DNA-Mikro-Präparation	23
2.2.7 CTAB-Gesamt-DNA-Präparation	24

2.2.8 Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA	25
2.2.9 BAC DNA-Isolierung	26
2.2.10 Identifizierung von BAC-Klonen auf 3x3 Duplikat-Filtern der IGF-BAC-Bibliothek	27
2.2.11 PCR mit dem RAPD-Primer L4	27
2.2.12 Allelspezifische Marker für die Vorselektion	28
2.2.12.1 Umwandlung des RFLP-Markers AIG1 in den allelspezifischen PCR-Marker (A3/B3)	28
2.2.12.2. Ableitung eines allelspezifischen PCR-Markers (S3/S4) vom linken Ende des YACs CIC3H11	30
2.2.13 Restriktion genomischer DNA für RFLP-Analysen	30
2.2.14 Transfer der genomischen DNA aus dem Gel auf Membranfilter	31
2.2.15 Radioaktive Markierung von Doppelstrang-DNA	31
2.2.16 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden an membrangebundene DNA	32
2.2.17 Nichtradioaktive Markierung von Doppelstrang-DNA mittels Digoxigenin (DIG)	33
2.2.18 Hybridisierung DIG-markierter Sonden an membrangebundene DNA	33
2.2.18.1 Immunologische Detektion	33
2.2.19 Entfernung der markierten Sonde von der Membran	33
2.2.20 Bestimmung der BAC-Insertgröße mittels Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE)	34
2.2.21 Restriktionsanalyse ("Fingerprinting") der BACs	34
2.2.22 Isolierung von BAC-Endfragmenten	35
2.2.22.1 Isolierung von BAC-Endfragmenten mittels inverser PCR (iPCR)	35
2.2.22.2 Amplifikation von BAC-Endfragmenten mittels spezifischer PCR	37
2.2.23 Isolierung interner BAC-Fragmente zur Etablierung neuer Marker	39
2.2.24 Klonierung von PCR-Produkten und genomischen DNA-Fragmenten	41
2.2.24.1 Klonierung der BAC-Enden	41
2.2.24.2 BAC-Subklonierung	42
2.2.25 Herstellung einer Cosmidbibliothek des <i>Arabidopsis</i> -Ökotyps Tsu	42
2.2.26 Durchmusterung der Cosmidbibliotheken	45
2.2.27 DNA-Sequenzanalyse	46
2.2.28 Gelelektrophorese	46
2.2.29 Restriktionsansätze	47
2.2.30 Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen	47

3. Ergebnisse **48**

3.1 Identifizierung und Charakterisierung von BACs in der <i>RPBI</i> -Region zur Erstellung eines BAC-Contigs	48
3.1.1 Durchmusterung einer BAC-Bibliothek zur Identifizierung von BAC-Klonen in der <i>RPBI</i> -Region	49
3.1.2 Isolierung von BAC-Endfragmenten mittels inverser PCR	50
3.1.3 Bestimmung der Insertgröße der BAC-Klone	50
3.1.4 Restriktionsanalyse der BAC-Klone	52

3.1.5 Ableitung spezifischer Primer von ausgewählten BAC-Enden	53
3.1.6 Anordnung der BAC-Klone zu einem Contig	55
3.1.7 Subklonierung des BACs F3C3	56
3.2 Molekulare Analyse in der <i>RPBI</i> -Region anhand veröffentlichter BAC-Sequenzen	56
3.3 Herstellung einer Cosmidbibliothek des <i>Arabidopsis</i> -Ökotyps Tsu	58
3.4 Durchmusterung von Cosmidbibliotheken mit BAC-Fragmenten	59
3.5 Hochauflösende Kartierung in der <i>RPBI</i> -Region	63
3.5.1 Etablierung neuer Marker für die Vorselektion auf Rekombinationsereignisse	64
3.5.2 Vergrößerung der Kartierungspopulation	65
3.5.3 Kartierung neuer RFLP- und PCR-Marker	66
3.6 PCR-Analysen zur Expression von Genen in der <i>RPBI</i> -Region	70
3.7 Untersuchungen zur genetischen Diversität zwischen den <i>Arabidopsis</i> -Ökotypen	74
3.7.1 Identifizierung von DNA-Polymorphismen mittels PCR und Hybridisierung	75
3.7.2 Vergleich der Sequenzdaten der Ökotypen Tsu und Col	78

4. Diskussion **79**

4.1 Auswertung der Kartierungsdaten im Hinblick auf Interferenzen und Rekombinations-cold-spots in der <i>RPBI</i> -Region	79
4.2 Abgleich der Daten der charakterisierten BACs mit publizierten Ergebnissen	83
4.3 Eingrenzung des <i>RPBI</i> -Locus und Identifizierung entsprechender Kandidatengene im Ökotyp Col	84
4.4 Untersuchungen zur Expression der Kandidatengene in den Ökotypen Tsu und Cvi	86
4.5 Die <i>RPBI</i> -vermittelte Resistenz: Eine bekannte Abwehrreaktion, aber keine Hinweise auf einen typischen Resistenzmechanismus	87
4.6 Bedeutung der Isolierung des <i>RPBI</i> -Gens für die Resistenzzüchtung	88
4.7 Ausblick auf weiterführende Arbeiten	90

5. Zusammenfassung **93**

5. Summary **95**

6. Literaturverzeichnis **96**

7. Anhang **104**

Abkürzungen

abs.	absolut
BAC	bacterial artificial chromosome = künstliches Bakterienchromosom
BC ₁	1. Rückkreuzungsgeneration (1st backcross generation)
BC ₁ S ₁	1. Selbstungsgeneration der BC ₁ -Generation
bidest. H ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin = Rinderserumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	complementary DNA = (zur mRNA) komplementäre DNA
μCi	Mikrocurie
CTAB	Hexacyldimethylammoniumbromid
cM	centi Morgan (1 cM = Rekombinationsfrequenz von 1%)
cv.	cultivar (Sorte)
dest. H ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
λ-DNA	DNA des Bakteriophagen λ
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
dpg	days past germination = Tage nach der Keimung
dpi	days after inoculation = Tage nach der Inokulation
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
<i>et al.</i>	et alii (lat.) = und andere
F ₁	1. Filialgeneration
g	Erdbeschleunigung (9,81 m s ⁻²)
iPCR	inverse Polymerasekettenreaktion
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactosid
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
LB	Luria-Bertani
M	Molar
MATDB	MIPS <i>Arabidopsis thaliana</i> database
Mb	Megabasenpaare
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIPS	Munich Information Center for Protein Sequences
mM / μM	Millimolar / Mikromolar
MnCl ₂	Manganchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid
mRNA	messenger RNA = Boten-RNA
N	Normal

NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Natriumsalz)
NaOH	Natronlauge
OD ₈₀₀	Optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von 800 Nanometern
P	Parentalgeneration
³² P	radioaktives Phosphorisotop
Pa	Pascal
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsed-Field-Gel-Elektrophorese
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pv.	pathovar (Pathovar)
RAPD	random amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
upm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssp.	subspecies = Unterart
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
ü. N.	über Nacht
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
v/v	volume / volume = Volumen / Volumen
V/cm	Volt pro Zentimeter
w / v	weight / volume = Gewicht / Volumen
X-Gal	5-Chloro-4-bromo-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid
YAC	yeast artificial chromosome = künstliches Hefechromosom

Internetadressen

Arabidopsis Genome Initiative (AGI): <http://www.arabidopsis.org/agi.html>

The Arabidopsis Information Resource (TAIR): <http://www.arabidopsis.org/home.html>

National Center for Biotechnology Information BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

MIPS *Arabidopsis thaliana* database: <http://www.mips.gsf.de/proj/thal/db/index.htm>

EMBL-Datenbank: <http://www.embl.de>