

**Diplom-Biologin Daniela Schulte**

Dr.-Vater: Professor Dr. C. Jung

## **Physische Kartierung und Sequenzierung einer Translokation aus der Wildart *Beta procumbens* am Zuckerrüben-Chromosom 9**

Der Rübenzystennematode *Heterodera schachtii* ist ein bedeutender Parasit der Zuckerrübe. In der Zuckerrübe konnte keine Resistenz gegen den Nematoden identifiziert werden. Daher wurden die Wildformen auf ihre Resistenzeigenschaften untersucht und es wurde in den Arten *Beta procumbens*, *B. patellaris* und *B. webbiana* vollständig resistente Pflanzen gefunden. Die Kreuzungen von diploiden Zuckerrüben mit *B. procumbens* führten zu monosomen Additionslinien, Fragment-Additionslinien und Translokationslinien.

Translokationslinien zeichnen sich durch eine stabile Vererbung der Nematoden-Resistenz aus. Alle resistenten Linien besitzen eine Translokation am Ende von Chromosom 9, was auf einen *hot-spot* für Rekombination hindeutet. Das Resistenzgen *HsI<sup>pro-1</sup>* konnte in der Translokationslinie A906001 kloniert werden. Diese Translokation von ca. 1,5 MB stammt von Chromosom 1 aus *B. procumbens*. Eine weitere Translokationslinie 930363 (Pro4), ebenfalls mit einer Translokation von Chromosom 1, aber ohne das *HsI<sup>pro-1</sup>*-Gen, zeigt ebenfalls vollständige Resistenz gegen *H. schachtii*. Durch Restriktions-Kartierung konnte gezeigt werden, dass beide Linien einen überlappenden Bereich von ca. 350 kb besitzen. Das zweite Nematoden-Resistenz-Gen wird demnach in diesem Bereich erwartet und wird als *HsI-1* bezeichnet.

Ziele der Arbeit waren die Erstellung einer BAC-Bank und eines *contigs* für den überlappenden Bereich der Translokationen 000520 und 930363. Die Analyse der BAC-Klone sollte es ermöglichen, das zweite Nematodenresistenzgen zu identifizieren und den Translokationsbruchpunkt zu charakterisieren.

Zunächst wurde eine BAC-Bank der BC<sub>4</sub>-Population 000520 erstellt. Die BAC-Bank besteht aus 61.056 Klonen mit einer durchschnittlichen Insertionsgröße von 97 kb. Nach Abzug der Klone mit mitochondrialer und plastidärer DNA ergibt sich daraus eine 7,5-fach Genomabdeckung. Zur Sichtung der BAC-Bank wurden *B. procumbens*-spezifische Sonden eingesetzt. Insgesamt wurden 59 positive BAC-Klone durch Southern- und PCR-Analysen charakterisiert. Die Überlappungen der BAC-Klone wurden durch gemeinsame Restriktionsfragmente, PCR-Analyse und Hybridisierung von BAC-End-Sequenzen und *single-copy* Sonden bestätigt.

Anschließend konnten die BAC-Klone in zwei *contigs* angeordnet werden. Der Bereich, in dem beide Translokationslinien überlappen, konnte vollständig mit insgesamt fünf BAC-Klonen abgedeckt werden. Die Sichtung der BAC Klone mit der RFLP-Sonde pKP557, die am Ende des „normalen“ Chromosoms 9 lokalisiert worden war, ergab 7 positive BAC-Klone. Diese BAC-Klone decken somit die Region ab, die den Translokationsbruchpunkt überschreitet, da sie jeweils mit einem Ende in die Translokation hineinragen.

Sechs BAC-Klone, die den überlappenden Bereich der Translokationslinien abdecken, wurden sequenziert. Für jeden BAC-Klon wurden durchschnittlich 20,1 zusammenhängende Sequenz-*contigs* erstellt. Diese *contigs* repräsentieren 71,1 – 97,9 % der Gesamtsequenz der selektierten BAC-Klone. Alle Sequenzen wurden mit dem Programm BLAST auf Homologien mit der Datenbank (NCBI) und auf offene Leserahmen (Genscan, FgeneSH) untersucht. Neben zahlreichen DNA- und Retrotransposons konnten 13 Sequenzen mit hoher Homologie zu Zuckerrüben ESTs gefunden werden. Zwölf ORFs wurden als Kandidaten für das zweite Resistenzgen identifiziert. Die Sequenz dieser ORFs zeigt Homologie zu bekannten Proteinen, die als Reaktion auf Stressbedingungen gebildet werden.

-----