

### Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

Suren Samuelian am 7. November 2002 bei Priv.-Doz. Dr. Kleine:

„*Identification of genes differentially expressed upon nematode infection by cDNA-AFLP analysis*“

Der Rübenzystemnematode *Heterodera schachtii* verursacht weltweit erhebliche Ertragsseinbußen im Zuckerrübenbau. Natürliche Resistenzen konnten bisher in Kulturpflanzen nicht gefunden werden. Obwohl größere Fortschritte bei der Übertragung von Resistenzgenen aus Wildrübenarten in die Zuckerrübe erzielt wurden, zeigten die erhaltenen Linien geringe Ertragsleistungen und ungenügende Stabilität der Resistenzgene. Zur Erzielung einer stabilen Resistenz sollten Gene aus verschiedenen Resistenzquellen kloniert, analysiert und in Zuchtsorten übertragen werden.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Klonierung und Analyse von pflanzlichen Genen, die an der Resistenzantwort gegen den Rübenzystemnematoden beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurden zwei Wege verfolgt:

- Erstens wurden Gene mit Hilfe der cDNA-AFLP-Technik, die nach einem Nematodenbefall differenziell exprimiert wurden, isoliert. Darauf folgte die Untersuchung ihres Expressionsmusters und die Analyse ihres Nematodenabwehrpotenzials.
- Zweitens wurde eine BAC-Bibliothek als Voraussetzung für die Klonierung von weiteren Resistenzgenen erstellt.

Für die erste Untersuchung wurden sechs Zuckerrüben *hairy root*-Klone verwendet: ein transgener, resistenter Klon mit dem Resistenzgen *HsI<sup>pro-1</sup>*, drei resistente Klone mit einer Translokation aus *Beta procumbens* und eine anfällige Kontrolle. Ein *hairy root*-Klon mit einem *antisense*-Konstrukt von *HsI<sup>pro-1</sup>* wurde als weitere anfällige Kontrolle verwendet. Weiterhin wurden die anfällige Linie 93161 und die resistente Linie 940043 sowie die das Resistenzgen *HsI<sup>pro-1</sup>* enthaltende F2-Population 950623 untersucht. Für die Erstellung einer BAC-Bibliothek wurde die resistente, aber nicht *HsI<sup>pro-1</sup>* enthaltende F2-Population 950608 verwendet.

Nach Nematodenbefall differenziell exprimierte Gene wurden in der cDNA der *hairy root*-Klone identifiziert. Insgesamt wurden mit 156 Primerkombinationen (132 *EcoRI/MseI* und 24 *PstI/MseI*) 10.000 *transcript-derived fragments* (TDFs) erstellt. Zwei Gruppen von TDFs wurden untersucht. Die erste Gruppe umfaßte TDFs, die in den resistenten, transgenen *HsI<sup>pro-1</sup>*-Klonen und in den drei translokationsspezifischen *hairy root*-Klonen exprimiert wurden. Die zweite Gruppe enthielt TDFs, die ausschließlich in den drei translokationsspezifischen *hairy root*-Klonen exprimiert wurden. Auf diesem Wege konnten insgesamt 43 TDFs isoliert und sequenziert werden.

Das Expressionsmuster der in den *hairy root*-Klonen identifizierten TDFs wurde mit Hilfe einer zweiten cDNA-AFLP mit Material aus Wurzeln anfälliger und resistenter Pflanzen bestätigt. Allerdings konnte nur ein Fragment - TDF\_6 - in resistenten Pflanzen identifiziert und weiter untersucht werden. Ein weiteres Fragment - TDF\_42 - wurde ebenfalls weiter analysiert, da es Homologien zu Oxalat-Oxidase-ähnlichen Germin-Genen aus *B. vulgaris*, die während biotischem und abiotischem Streß hochreguliert werden, zeigte. Die beiden Fragmente wurden mit Hilfe der quantitativen PCR und der Northern-Hybridisierung untersucht. Damit konnte gezeigt werden, dass TDF\_6 und TDF\_42 nach Nematodenbefall in resistenten Pflanzen hochreguliert werden. Die cDNA-AFLP-Fragmente wurden mittels RACE-Technologie an den 5'- und 3'-Bereichen verlängert und konnten als Vollängen-cDNAs identifiziert und kloniert werden. Abschließend wurde die mögliche Funktion der Gene 6 und 42 als Inhibitoren der Nematodenentwicklung mit Hilfe des *hairy root*-Systems untersucht. Die Überexpression des Gens 6 zeigte eine Hemmung der Nematodenentwicklung in transgenen *hairy root*-Klonen. Kein Hemmeffekt konnte dagegen mit dem Gen 42 in den transgenen *hairy root*-Klonen festgestellt werden.

Die in dieser Arbeit erstellte BAC-Bibliothek enthält 45.041 Klone mit einer durchschnittlichen Insertionsgröße von 108,36 kb.