

Master of Science Yanyan Tian

Zusammenfassung

Die meisten bisher klonierten Resistenzgene gegen phytopathogene Organismen besitzen gemeinsame Strukturmerkmale wie leucinreiche Repetitionseinheiten (LRR), Leucinzipper (LZ), Nukleotidbindungsstellen (NBS) und Transmembran-Domänen (HD). Diese ermöglichen daher eine direkte PCR-gestützte Klonierung neuer Resistenzgene aus Pflanzen.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Klonierung des zweiten Nematodenresistenzgens *Hs1-1^{pro-1}*. Dazu wurden die degenerierten Primer aus den konservierten NBS-LRR-Motiven der bekannten R-Gene abgeleitet und an das „codon usage“ der Zuckerrübe angepasst.

In Kombination mit der Sichtung einer cDNA-Bank wurden 27 genomische und 12 exprimierte NBS-LRR-RGAs (nLRGAs) identifiziert und in drei Klassen eingeteilt. Eine Sequenzanalyse zeigte, dass Nukleotidsubstitutionen und Insertionen/Deletionen primär zur Diversität der nLRGA-Sequenzen in der Zuckerrübe beitragen. Phylogenetische Untersuchungen zeigten, dass die isolierten nLRGA-Sequenzen mit bekannten Resistenzgenen aus Angiospermen in verwandtschaftlicher Beziehung stehen. Eine der identifizierten Gruppen weist eine übereinstimmende Abstammung mit den R-Genen *Prf*, *Rx*, *RPP8* und *Mi* auf, während eine andere Gruppe mit den Genen *I2C1*, *Xa1* und *Cre3* in phylogenetischer Beziehung steht.

Unerwartet zeigen alle von den nLRGA-Sequenzen abgeleiteten Proteine Sequenz- und Strukturhomologien mit den Resistenzgenen, deren Proteine ebenfalls keine TIR-Domäne (Toll-Interleukin) beinhalten. Da auch eine Analyse von mehr als 16.000 Zuckerrüben-ESTs keine Sequenz hervorbrachte, die eine TIR-Domäne enthielt, ist davon auszugehen, dass TIR-RGAs im Zuckerrüben-genom nicht vorhanden sind.

Vier vollständige cDNA-nLRGA Sequenzen wurden aus einer nematodenresistenten Zuckerrübenlinie isoliert. Basierend auf einer SNP-Analyse (*single nucleotide polymorphism*) zwischen NBS-LRR-Sequenzen aus *Beta procumbens* und Zuckerrübe wurde gezeigt, dass zwei der Sequenzen, cZR-3 und cZR-7, ihren Ursprung im *B. procumbens*-Genom haben und sich innerhalb der Translokation der nematodenresistenten Linien 940043 und Pro4 befinden. Die Sequenzen cZR-1 und cZR-9 sind hingegen spezifisch dem Zuckerrüben-genom zuzuordnen. Die Charakterisierung von cZR-3 und cZR-7 ergab eine weitgehende Übereinstimmung einer Consensus-Region der Sequenzen mit dem Motiv LxxLxxLxLxxC/N/LxxLxxLPxS/L, das in allen R-Genen mit einer cytoplasmatischen LRR-Domäne vorkommt. Darüber hinaus konnte innerhalb der beiden abgeleiteten Aminosäuresequenzen ein Abschnitt von sauren Aminosäuren gefunden werden, der in seiner Sequenzstruktur dem Nematodenresistenzgen *Hero* gleicht.

Schließlich hat eine genetische Komplementation gezeigt, dass cZR-3 im *hairy root*-System vollständige Resistenz gegen den Wurzelzystennematoden *H. schachtii* vermittelt. Dies beweist, dass es sich bei der Sequenz cZR-3 um das zweite Nematodenresistenzgen handelt. Die anderen drei Sequenzen konnten die Anfälligkeit der Wurzeln nur leicht vermindern. Ein Funktionsmodell des *Hs1^{pro-1}* Locus wird diskutiert.

PCR-based Cloning of the Second Nematode Resistance Gene *Hs1-1^{pro-1}* and Resistance Gene Analogues from Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.)

Darüber hinaus wurde die Wirkung der transkriptionellen Regulation des *Hs1^{pro-1}* Gens unter der Kontrolle des Gen-eigenen Promotors untersucht. Es wurde gezeigt, dass der Promotor des *Hs1^{pro-1}*-Gens geeignet ist, die Transkription des *Hs1^{pro-1}* Gens so zu aktivieren, dass es zur Ausbildung von Nematodenresistenz in Pflanzen kommt.