



Molekulargenetische Charakterisierung von Resistenzgenanaloga im Rosengenom als Basis für die Resistenzzüchtung



Von dem Fachbereich Gartenbau
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
DOKTORIN DER GARTENBAUWISSENSCHAFTEN
- Dr. rer.hort. -

genehmigte Dissertation
von
Dipl.-Ing. agr. Anja Hattendorf

geboren am 25.11.1975 in Kösching

2005

Referent : Prof. Dr. Debener
Koreferent: Prof. Dr. Grunewaldt
Tag der Promotion: 19.11.2004

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	IV
Abstract.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Pflanzliche Resistenz.....	1
1.2 Pflanzliche Resistenzgene.....	3
1.3 Resistenzgenanaloga (RGA).....	5
1.4 Resistenz bei Rosen.....	9
1.5 Die Resistenzgene <i>Rdr1</i> und <i>Rpp1</i>	10
1.6 Ziele der Arbeit.....	11
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Pflanzenmaterial.....	13
2.2 Sonstige Materialien.....	14
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	14
2.3.1 Aufreinigung und Fällung von Nukleinsäuren.....	14
2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	14
2.3.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	15
2.3.4 DNA-Extraktion.....	15
2.3.5 RNA-Extraktion.....	15
2.3.6 Amplifikation der RGA.....	16
2.3.7 Klonierung der RGA.....	16
2.3.8 Insert-PCR.....	18

2.3.9	Isolierung von Plasmid-DNA.....	18
2.3.10	Sequenzierung der Insert-DNA	19
2.3.11	Southern-blot-Analysen.....	20
2.3.12	Lokalisierung der RGA im Rosengenom: Kartierung.....	21
2.3.13	Expressionsanalysen	24
2.4	Bioinformatik.....	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Isolierung der genomischen und exprimierten Rosen-RGA.....	26
3.2	Sequenzanalyse	29
3.3	Charakterisierung der RGA-Bank durch Kolonie-Hybridisierung	31
3.4	Phylogenie	34
3.5	Kopienzahl der RGA im Genom.....	39
3.6	Abundanz in der RGA-Bank und Kopienzahl im Rosengenom	42
3.7	Lokalisierung der RGA im Rosengenom: Kartierung	45
3.7.1	Integration in die Rosen-Chromosomenkarten.....	45
3.7.2	RGA und Resistenzgene	56
3.7.3	RGA und QTL.....	56
3.7.4	Homogene und heterogene RGA-Cluster	56
3.8	Expressionsanalyse	57
3.8.1	Makroarray-Technik	57
3.8.2	Semiquantitative RT-PCR	57

4	Diskussion	68
4.1	Klonierung der Rosen-RGA und Sequenzanalyse	68
4.2	Diversität und Phylogenie	70
4.3	Kopienzahl einzelner RGA im Genom	74
4.4	Lage und Anordnung der RGA im Rosengenom	74
4.5	Expressionsanalysen	79
4.6	Ausblick	82
5	Literaturverzeichnis	83
6	Anhang.....	92
A 6.1	Abkürzungen.....	92
A 6.2	Primer	93
A 6.3	Hersteller	96
A 6.4	Puffer und Lösungen	97
A 6.5	Medien	99
A 6.6	Bakterienstamm.....	100
A 6.7	Verschiedene Materialien und Geräte.....	100
A 6.8	Polyacrylamid-Gele.....	101
A 6.9	Software.....	102
A 6.10	Identitätsmatrizen	102

Zusammenfassung

Die meisten bisher klonierten pflanzlichen Resistenzgene gehören zur NBS (Nucleotide Binding Site)-LRR (Leucine Rich Repeat)-Klasse. Die NBS-LRR-Gene sind insgesamt sehr divers, jedoch gibt es innerhalb der NBS-Region sogenannte konservierte Motive, die allen Genen dieser Klasse eigen sind. Mit Hilfe von degenerierten Primern, die an diese konservierten Motive binden, können Sequenzen mit Ähnlichkeit zu den bekannten NBS-LRR-Genen aus verschiedenen Pflanzenarten isoliert werden. Solche Sequenzen werden als Resistenzgenanaloga (RGA) bezeichnet.

Die alleinige Funktion, mit der NBS-Sequenzen bisher in Verbindung gebracht werden konnten, ist die Beteiligung an Abwehrreaktionen gegen verschiedene Pathogene. RGA sind in Pflanzen in großer Anzahl vorhanden und im Genom häufig in Clustern angeordnet. Sie sind oftmals in der Nähe von Resistenzgenen lokalisiert oder stellen selbst einen Teil funktioneller Resistenzgene dar.

Der Ansatz über RGA bietet eine Alternative zu den bisher praktizierten zeitaufwendigen, arbeits- und kostenintensiven Verfahren der Resistenzgenisolierung. Mit Hilfe dieses Ansatzes ist es gelungen, Resistenzgene aus *Arabidopsis*, Flachs und Weizen zu klonieren. Zudem eignen sich RGA als molekulare Marker für Resistenz in der Markergestützten Selektion zur Verkürzung des Selektionsprozesses resistenter Genotypen. Darüber hinaus verschafft die phylogenetische Analyse der RGA in verschiedenen Pflanzen Einblicke in die Evolution der Resistenzgene.

In der vorliegenden Arbeit wurden NBS-LRR-RGA aus Rosen isoliert und eine umfangreiche RGA-Bank bestehend aus ca. 7000 Klonen wurde angelegt. Einhundertsiebenunddreißig Klone sind sequenzanalytisch näher untersucht worden, die restliche RGA-Bank wurde durch Kolonie-Hybridisierung zu 67 % charakterisiert. Vierzig verschiedene RGA-Familien unterschiedlicher Größe wurden identifiziert. Zwei Drittel davon gehörten der TIR (Toll-Interleukin 1-Rezeptor)-Gruppe der NBS-LRR-Gene an, ein Drittel der LZ (Leucine Zipper)-Gruppe. Die Mitglieder einer Familie waren auf DNA-Sequenz-Ebene zu mindestens 80 % identisch. Die Aminosäuresequenz (AS)-Identität zwischen Mitgliedern der verschiedenen Subgruppen betrug maximal 68 % bei den TIR-RGA und 53 % bei den LZ-RGA. Die TIR-RGA zeigten eine relativ hohe Ähnlichkeit mit dem Tabak-Resistenzgen *N* gegen den Tabakmosaikvirus und dem Flachs-Resistenzgen *M* gegen *Melampsora lini*, die beide der TIR-NBS-LRR-Klasse angehören (42,3 bzw. 31,6 % AS-Identität). Die LZ-RGA waren jeweils zu etwa 27 % mit den LZ-NBS-LRR-Genen *Xa1* aus Reis gegen *Xanthomonas oryzae* und *RPM1* aus *Arabidopsis* gegen *Pseudomonas syringae* identisch.

Zwischen den TIR- und LZ-RGA aus Rosen zeigte sich ein eindeutiger phylogenetischer Unterschied. Aus der phylogenetischen Analyse zusammen mit Resistenzgenen und RGA aus anderen Pflanzen ging hervor, dass es für die Evolution der Rosen-RGA vermutlich mindestens vier verschiedene Startpunkte gab, und zwar vor der Trennung der Gymnospermen und Angiospermen, vor der Abtrennung der *Rosaceae* von den anderen Angiospermen, nach der Abtrennung der *Rosaceae* von den anderen *Rosidae* und nach der Abtrennung der Gattung *Rosa* von den anderen *Rosaceae*.

Bei 75 % der untersuchten RGA handelte es sich um komplexe Loci mit hoher genomischer Kopienzahl, es gab aber auch einige ‚single-‘ und ‚low-copy‘ Loci. Es bestand keine Korrelation zwischen der Kopienzahl im Genom und der Größe der Familien in der RGA-Bank.

Eine Vielzahl der RGA konnte in die Chromosomenkarten zweier Rosen-Kartierungspopulationen integriert werden, in denen auch Resistenzgene gegen den Sternrußtau und den Echten Mehltau sowie QTL („Quantitative Trait Loci“) für Resistenz gegen den Echten Mehltau kartiert sind. In beiden Kartierungspopulationen waren einige RGA in der Region des Resistenzgens *Rdr1* gegen den Sternrußtau lokalisiert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zu dem *Rdr1* umgebenden Resistenzgencluster gehören. Diverse RGA-Cluster wurden identifiziert, von denen eines auf Chromosom 7 aufgrund seiner Größe besonders auffiel. Dieses Cluster kann als ‚Hotspot‘ für noch nicht charakterisierte Rosen-Resistenzgene angesehen werden. Die RGA-Cluster waren in den meisten Fällen homogen, d. h. ihre Mitglieder gehörten derselben Familie an, aber auch heterogene Cluster mit RGA unterschiedlicher Familien wurden identifiziert. Diverse RGA fielen in genomische Regionen zusammen mit QTL für Resistenz gegen den Echten Mehltau und sind somit vermutlich an der Abwehrreaktion gegen dieses Pathogen beteiligt.

Die Verteilung der RGA auf den Chromosomen gibt Aufschluss darüber, dass während der Resistenzgenevolution im Zuge der Genvervielfältigung unterschiedliche Duplikationsmechanismen eine Rolle gespielt haben müssen, nämlich Tandem-, ektopische und segmentale Duplikation.

Einige RGA zeigten nach Sternrußtau-Infektion in Rosenblättern eine deutlich erhöhte Expression. Diese RGA spielen vermutlich entweder in der induzierten, spezifischen Resistenzreaktion selbst oder bei der im Anschluss etablierten SAR („Systemic Acquired Resistance“) zur unspezifischen längerfristigen Pathogenabwehr eine wichtige Rolle.

Die Analyse von RGA wurde bisher an einer Vielzahl unterschiedlicher Pflanzen durchgeführt, wobei der Schwerpunkt eindeutig auf den ökonomisch bedeutenden landwirtschaftlichen Kulturen, wie z. B. Weizen, Gerste, Mais und Soja, lag. Daneben gab es aber auch diverse Studien mit exotischeren Kulturen, wie *Citrus*, Kaffee, Kakao und Zuckerrohr, die sicherlich in ihren heimischen Gebieten einen enormen Stellenwert besitzen und von daher wichtige Objekte für die Resistenzforschung sind.

Die vorliegende Arbeit ist die erste RGA-Studie bei Rosen. Die hier erarbeiteten Ergebnisse stellen neben den RGA-Analysen in *Pyrus* und *Malus* eine Wissensbereicherung auf dem Gebiet der *Rosaceae* dar und geben erste Einblicke in die Diversität und Genomorganisation der NBS-Sequenzen bei Zierpflanzen. Die Ergebnisse der phylogenetischen Analysen der Rosen-RGA zusammen mit Resistenzgenen und RGA aus anderen Pflanzen vervollständigen die bisher an anderen Arten durchgeführten Evolutionsstudien. Die umfangreiche RGA-Bank kann künftig als Basis für die Resistenzgenisolierung bei Rosen genutzt werden. Die RGA-Kartierung bietet darüber hinaus wichtige Anhaltspunkte bezüglich der Lage potentieller neuer Rosen-Resistenzgene.

Weiterhin sind die RGA-Sequenzen zur Konversion in Marker für Resistenz nutzbar, um für die Selektion resistenter Genotypen im Züchtungsprozess eingesetzt zu werden.

Schlagwörter: Rose, Resistenz, Resistenzgenanaloga (RGA)

Abstract

Most of the so far cloned plant disease resistance genes belong to the 'nucleotide binding site' (NBS)-'leucine rich repeat' (LRR) class. The NBS-LRR genes as a whole are very diverse, but within the NBS region there are so-called conserved motives that are abundant in all genes belonging to this class. Sequences with similarity to known NBS-LRR resistance genes can be isolated from a wide range of plants with degenerate oligonucleotide primers that hybridize to these conserved NBS motives. Those sequences are called 'resistance gene analogs' (RGAs).

In plants the only function attributed to NBS sequences so far is in pest and disease resistance. RGAs are highly abundant in plants and genomically often arranged in tightly linked clusters. In many cases they are located in close vicinity to resistance genes or are even part of functional resistance genes themselves.

The RGA approach provides an alternative strategy to the so far applied time- and labour-consuming and cost-intensive processes of resistance gene isolation. With the RGA approach resistance genes were cloned successfully from *Arabidopsis*, flax and wheat.

Furthermore, RGAs can well be exploited as molecular markers for resistance during the 'marker assisted selection' (MAS) to shorten and facilitate the selection of resistant genotypes.

In addition, the phylogenetic analysis of RGAs in different plants provides information about the evolution of resistance genes.

In the present study NBS-LRR-RGAs were isolated from roses. An extensive RGA library with about 7000 clones was constructed. One hundred and thirty-seven clones were analysed in detail by sequencing, the remaining part of the RGA library was characterized via colony-hybridization by 67 %. Forty different RGA families of variable size were identified. Twenty-seven of them were of the TIR ('*toll-l interleukin 1-receptor*'), thirteen of the LZ ('leucine zipper') type.

Members within one family shared a nucleotide sequence identity of at least 80 %. The amino acid sequence identity between members of the different subgroups maximally amounted to 68 % for the TIR-RGAs and 53 % for LZ-RGAs.

TIR-RGAs showed a relatively high similarity to the tobacco *N*-gene conferring resistance against tobacco mosaic virus and the flax *M*-gene against *Melampsora lini* (42.3 and 31.6 %, respectively), both belonging to the TIR-NBS-LRR class of resistance genes. LZ-RGAs were identical by about 27 % to the LZ-NBS-LRR genes *Xa1* of rice against *Xanthomonas oryzae* and *Arabidopsis-RPM1* against *Pseudomonas syringae*.

The TIR and LZ group of the rose RGAs showed a clear phylogenetic separation. The phylogenetic analysis of the rose RGAs together with resistance genes and RGAs from other plants revealed that there probably existed four different starting points for the evolution of the rose RGAs: prior to the split of the gymnosperms and angiosperms, prior to the separation of the *Rosaceae* from the other angiosperms, after the separation of the *Rosaceae* from the other *Rosidae* and after the separation of the genus *Rosa* from the other *Rosaceae*.

About 75 % of the analysed RGAs were very complex loci with a high copy number in the rose genome, but single- and lowcopy loci were also found. No correlation was observed between the copy number of the RGAs in the genome and the size of the RGA family in the RGA library.

A multitude of the RGAs was integrated in the chromosome maps of two rose mapping populations, in which there are mapped single dominant resistance genes against black spot and powdery mildew as well as several 'quantitative trait loci' (QTL) for resistance against powdery mildew.

In both populations RGAs were located in the region around the black spot resistance gene *Rdr1*, which are most probably members of the resistance gene cluster around *Rdr1*.

Several RGA clusters were identified, of which one on chromosome 7 was especially striking because of its size. This cluster can be regarded as a 'hotspot' for not yet characterised rose resistance genes.

Mostly, the RGA clusters were homogenous, i. e. the members belonged to the same family, but heterogenous cluster with RGAs of different families could also be observed.

Several RGAs mapped in genomic regions together with QTL for powdery mildew resistance and therefore are most probably involved in the defense reaction against this pathogen.

The distribution of the RGAs on the chromosomes indicated that different mechanisms of gene duplication must have taken place during the evolution of resistance genes, namely tandem, ectopic and segmental duplication.

Some RGAs showed a clearly increased expression level in rose leaves after black spot infection. These RGAs probably are either involved in the induced specific resistance reaction itself or in the afterwards established so-called 'systemic acquired resistance' (SAR) for unspecific durable pathogen defense.

So far, RGAs were analysed in a multitude of different plant species. However, most of the RGA studies dealt with economic important agricultural crops, like f. e. wheat, barley, maize, soybean. Additionally, RGA studies were also performed with more exotic crops, like citrus, coffee, cocoa and sugarcane, which certainly have a high value in their native countries and therefore are important objectives for resistance research.

This thesis is the first study about RGAs in roses. Besides the RGA analysis in *Pyrus* and *Malus*, the here presented results are an extension of knowledge on the sector of the *Rosaceae* and provide first insights in the diversity and genomic organization of RGAs in ornamental plants.

The results of the phylogenetic analyses of the rose RGAs together with resistance genes and RGAs of other plants make the evolutionary studies so far carried out with other species more complete.

The extensive RGA library may serve as basis for the isolation of resistance genes from roses in the future. The RGA map provides important clues concerning the genomic position of potential new rose resistance genes.

Furthermore, the RGA sequences could be used for the conversion into molecular markers for resistance for the selection of resistant genotypes in the breeding process.

Key words: rose, resistance, resistance gene analogs (RGAs)

1 Einleitung

1.1 Pflanzliche Resistenz

Pflanzen sind während ihrer gesamten Lebensdauer permanent Krankheiten und Schädlingen ausgesetzt. Dennoch ist in der Natur eine kompatible Wirt-/ Pathogen-Interaktion, d. h. die erfolgreiche Infektion bzw. Besiedelung der Pflanze durch das Pathogen, der Ausnahmefall (Hammond-Kosack und Jones 1996). Inkompatible Wirt-/ Pathogen-Interaktionen treten häufiger auf, da die Pflanzen im Zuge der Evolution eine Reihe von Abwehrreaktionen entwickelt haben (Hammond-Kosack und Jones 1996, Staskawicz 2001).

Zu den unspezifischen oder präformierten Abwehrmechanismen, welche unabhängig vom Befall konstitutiv „angeschaltet“ sind, gehören strukturelle Barrieren, wie eine verdickte Kutikula und Blatthaare, die Produktion von Inhibitoren, vor allem phenolische Verbindungen, Tannine und Lectine und Enzyminhibitoren, die Enzyme des Pathogens inaktivieren (Bowles 1990).

Eine andere Klasse der Resistenzmechanismen ist die sogenannte Gen-für-Gen-Resistenz, die durch die spezifische Erkennung sogenannter Avirulenz (*Avr*)-Determinanten von Pathogenen durch pflanzliche Resistenzgene (*R*-Gene) charakterisiert ist. Die Gen-für-Gen-Resistenz ist monogen bedingt und verleiht in der Regel komplette Resistenz gegen eine einzelne Rasse des Erregers, weshalb sie auch als rassenspezifische oder vertikale Resistenz bezeichnet wird. Nach der Erkennung wird eine Signalkaskade ausgelöst, die Abwehrreaktionen in Gang setzt, mit dem Ziel den Befall abzuwehren bzw. einzugrenzen. Die Reaktion endet oftmals mit dem schnellen Zelltod am Ort der Infektion, was als ‚hypersensitive Reaktion‘ (HR) bezeichnet wird und die Ausbreitung des Pathogens in der Pflanze verhindern soll (Glazebrook 2001, Bent 1996). Andere zelluläre Prozesse, welche die rassenspezifische Resistenz charakterisieren, sind u. a. die Akkumulation von Phytoalexinen, die Ausschüttung reaktiver Sauerstoff-Radikale (‚Oxidative Burst‘), Zellwand-Verdickung durch Lignifizierung, Akkumulation von Zellwandproteinen oder Papillenbildung und die Induktion sogenannter PR (‚Pathogenesis Related‘)-Proteine mit antifungizider oder antibakterieller Wirkung, wie z. B. Chitinasen oder Glukanasen (Hammond-Kosack und Jones 2000, 1996, Baker et al. 1997).

Die Aktivierung der HR zieht in der Regel eine unspezifische, systemische Resistenz gegen verschiedene Sekundärinfektionen nach sich, die als ‚Systemic Acquired Resistance‘ (SAR) bezeichnet wird (Gozzo 2004). Die resultierende Resistenz ist sowohl gegen das induzierende Pathogen effektiv als auch gegen andere, nicht verwandte Schaderreger (Salmeron et al. 2002). Die SAR wird vermutlich durch Salicylsäure (SA) als Signalmolekül aktiviert, die nach der HR in der gesamten Pflanze akkumuliert wird. Daneben kommt es im Zuge der SAR zur gesteigerten Expression eines charakteristischen Satzes typischer PR-Gene sowie zur Aktivitätssteigerung verschiedener Enzyme, besonders Glukanasen, Chitinasen und Peroxidasen (Gozzo 2004, Salmeron et al. 2002, Glazebrook 2001). Einmal etabliert, kann die SAR in der Pflanze über mehrere Wochen oder sogar Monate bestehen bleiben.

Die Gen-für-Gen-Resistenz wurde erstmals 1947 von Flor für das Wirt-Pathogen-System Flachs-Flachsrost beschrieben. Nach dem Modell von Flor besitzen Wirt und Pathogen komplementäre genetische Systeme. Sind die korrespondierenden Resistenz (*R*)- und Avirulenz (*Avr*)-Gene im Wirt und im Pathogen vorhanden, so kommt es zur Resistenz, wenn aber eines dieser beiden Gene inaktiv oder abwesend ist, so kann das Pathogen die Pflanze erfolgreich befallen.

Für die Funktionsweise der Resistenzgene gibt es verschiedene Modelle. Im einfachsten Modell, dem sogenannten Rezeptor-Liganden-Modell, codieren *R*-Gene für Rezeptormoleküle, an welche die komplementären *Avr*-Moleküle des Pathogens direkt binden, wodurch die Resistenzreaktion ausgelöst wird (Jones 2001, Ellis et al. 2000). Da allerdings bisher nur sehr wenige direkte Wechselwirkungen zwischen *R*- und *Avr*-Genen nachgewiesen werden konnten, wurde die sogenannte ‚Guard‘-Hypothese aufgestellt (Dangl und Jones 2001, van der Biezen und Jones 1998). Demnach stellen die *R*-Proteine (‚Guards‘) sozusagen ein Überwachungssystem für andere pflanzliche Proteine (‚Guardees‘) dar, woran die *Avr*-Proteine binden. Der resultierende Komplex aus ‚Guardee‘- und *Avr*-Protein wird vom Resistenzgenprodukt erkannt und die Resistenzreaktion wird in Gang gesetzt.

Viele *R*-Gene sind intrazellulär lokalisiert. Die spezifische Erkennung der *Avr*-Determinanten findet demnach in der Regel in der Zelle statt. Bakterielle Pathogene besitzen ein sogenanntes ‚Typ III Delivery‘-System über das *Avr*-Proteine in die Wirtszellen gelangen (Gálan und Collmer 1999). Viele pilzliche Schaderreger bilden enge Membrankontakte mit den Wirtszellen durch spezialisierte Ernährungsstrukturen, den sogenannten Haustorien, aus, welche die Einschleusung der Pathogen-Effektor-Proteine ermöglichen könnte (Dangl und Jones 2001).

Neben der rassenspezifischen Resistenz existiert ein weiterer genetischer Resistenzmechanismus: die rassenunspezifische oder horizontale Resistenz, die von mehreren Genen mit quantitativer Wirkung determiniert wird. Die horizontale Resistenz richtet sich gegen sämtliche physiologische Pathogenrassen der *forma specialis* einer Pathogenspezies, wobei der Befallsverlauf verlangsamt, jedoch nicht vollständig abgewehrt wird (Keller et al. 2000, Prell 1996). Dabei findet keine offensichtliche Wechselwirkung zwischen *R*-Genen der Pflanze und *Avr*-Genen des Pathogens statt.

Bei der Resistenzzüchtung sind monogene (qualitative) Resistenzen in der Regel einfacher zu bearbeiten, weil sie weit weniger komplex sind als quantitativ vererbte. Sie haben allerdings den Nachteil, dass sie nicht dauerhaft sind und durch Mutation der Erregerasse überwunden werden können.

Mit der Entdeckung der molekularen Marker war ein entscheidender Schritt in Richtung markergestützter Selektion von QTLs (‚Quantitative Trait Loci‘) getan. Der individuelle Beitrag der an der Ausprägung quantitativer Merkmale beteiligten Einzelgene, deren Effekte phänotypisch nicht unterscheidbar sind, kann mithilfe molekularer Marker erkannt werden. Auf diese Weise können Genotypen selektiert werden, die für alle Gene das jeweils günstigere Allel und damit die gewünschte Allelkombination tragen (Becker 1993).

1.2 Pflanzliche Resistenzgene

Als erstes pflanzliches Resistenzgen wurde 1992 das *Hm1*-Gen aus Mais kloniert, welches Resistenz gegen *Cochliobolus carbonum* durch Inaktivierung des von diesem Pilz produzierten Toxins gewährleistet (Bent 1996). Das *Hm1*-Gen codiert für eine Toxin-Reduktase und unterscheidet sich funktionell und strukturell von allen später klonierten Resistenzgenen, welche Rezeptoren bzw. Komponenten in der Signalweiterleitung in *Drosophila* und Wirbeltieren ähneln (Hammond-Kosack und Jones 2000, Bent 1996).

Bislang wurden etwa 30 Resistenzgene gegen bakterielle, pilzliche und virale Pathogene und Nematoden aus verschiedenen Pflanzen kloniert, deren Produkte diverse gemeinsame strukturelle Charakteristika aufweisen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten wird angenommen, dass Pflanzen gleiche Signalweiterleitungsmechanismen zur Induktion der Resistenzreaktion gegen eine breite Spanne nicht miteinander verwandter Pathogene entwickelt haben (Hammond-Kosack und Jones 2000, Aarts et al. 1998 a, Baker et al. 1997, Staskawicz et al. 1995).

Entsprechend der Struktur ihrer Produkte können Resistenzgene in fünf unterschiedliche Klassen eingeteilt werden (s. Abb. 1) (Toyoda et al. 2002). Drei davon besitzen eine sogenannte ‚Leucin Rich Repeat‘ (LRR)-Region am carboxyterminalen Ende, welche Leucinreste oder andere hydrophobe Aminosäuren in definierten Intervallen innerhalb einer Sequenz von ungefähr 24 Aminosäuren enthält (Hammond-Kosack und Jones 2000; Bent 1996). Die LRR-Domäne ist an Protein-Protein-Wechselwirkungen und somit an der Rezeptor-Liganden-Erkennung bei einer Vielzahl von Organismen beteiligt. Ihr wird eine entscheidende Rolle in der Erkennungsspezifität der *Avr*-Determinanten zugesprochen, wobei die Anzahl der Wiederholungen ebenso einen entscheidenden Einfluss auf die Spezifität zu haben scheint wie die Zusammensetzung (Ellis et al. 2000, Deng et al. 2000, Martin 1999, Baker et al. 1997, Bent 1996).

Die größte Klasse der Resistenzgene codiert für cytoplasmatische Proteine, denen neben der LRR-Domäne eine sogenannte zentrale ‚Nucleotide Binding Site‘ (NBS)-Region mit zahlreichen konservierten Segmenten eigen ist (Hulbert et al. 2001). Die NBS ist ein essentielles Element für die katalytische Aktivität zahlreicher pro- und eukaryontischer Proteine, wobei die funktionelle Domäne dieser Proteinstruktur der Bindung von ATP und GTP dient (Hammond-Kosack und Jones 2000). Die spezifische Funktion des NBS-Motivs im Resistenzmechanismus ist bislang noch nicht geklärt.

Etwa die Hälfte der bisher klonierten Resistenzgene gehören zu der NBS-LRR-Klasse, darunter das Tabak *N*-Gen gegen den Tabakmosaikvirus, *Xa1* aus Reis gegen *Xanthomonas oryzae*, *M* und *L6* aus Flachs gegen *Melampsora lini* sowie die Arabidopsisgene der *RPS*- und *RPM*-Subfamilie gegen *Pseudomonas syringae* und der *RPP*-Subgruppe gegen *Peronospora parasitica* (Abb. 1).

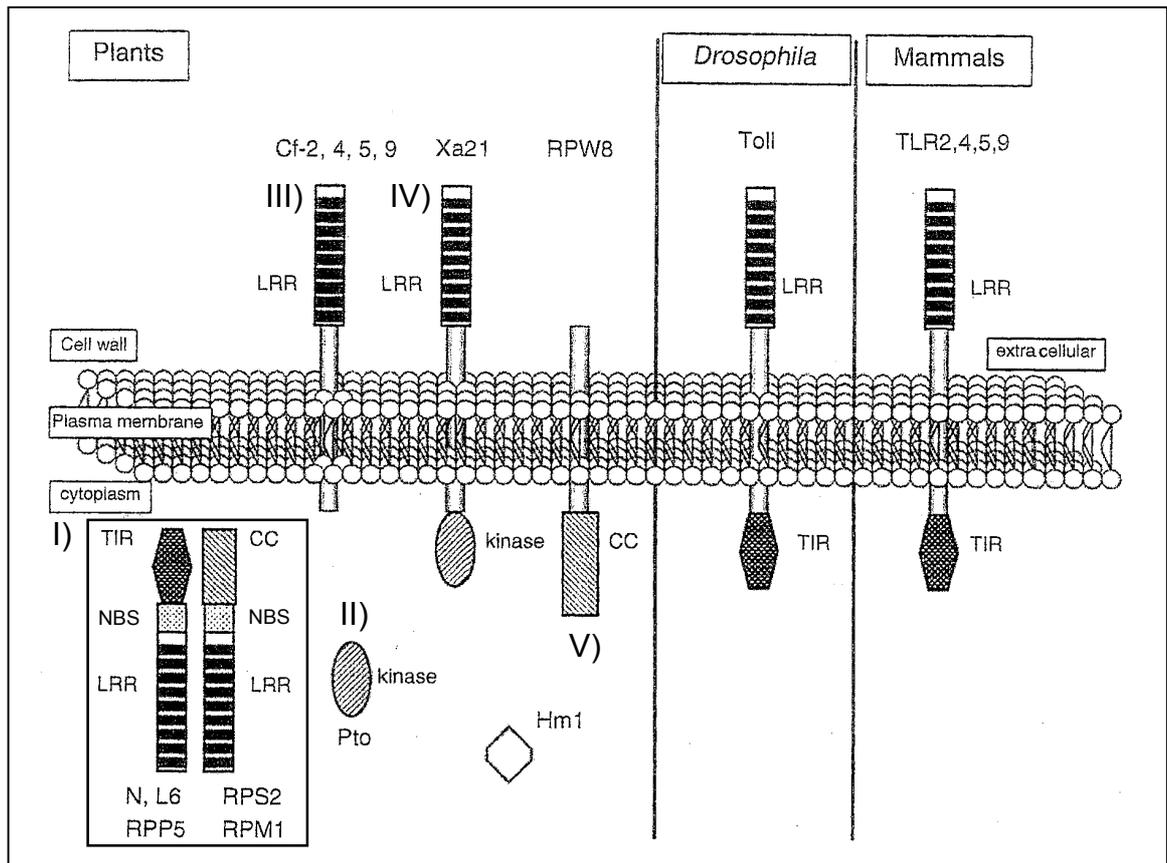


Abb. 1: Darstellung der verschiedenen Klassen pflanzlicher Resistenzgenprodukte (I - V; links) und Immunitätsrezeptoren von *Drosophila* und Wirbeltieren (rechts) (verändert nach Toyoda et al. 2002). Umrandet: NBS-LRR-Klasse. Die Abkürzungen sind im Text erläutert.

Die NBS-LRR-Resistenzgene können in Abhängigkeit ihrer aminoterminalen Region weiter unterteilt werden in zwei Gruppen. Die Mitglieder der ersten Gruppe besitzen eine sogenannte TIR-Domäne mit struktureller Ähnlichkeit zu dem *Toll*-Protein in *Drosophila* und dem *Interleukin-1* Rezeptor in Wirbeltieren, die beide eine wichtige Rolle in der Immunabwehr spielen (Abb. 1) (Toyoda et al. 2002, Pan et al. 2000 b). Zu der TIR-NBS-LRR Gruppe gehören u. a. das Tabak *N*-Gen, das *M*-Gen aus Flachs und das *RPP5*-Gen aus *Arabidopsis*.

Den Mitgliedern der anderen NBS-LRR-Gruppe, zu denen u. a. die *Arabidopsis* *RPS*- und *RPM*-Gene zählen, fehlt eine solche TIR-Region, sie sind dafür durch eine ‚Leucin Zipper‘ (LZ)- oder ‚Coiled-Coil‘ (CC)-Sequenz zwischen dem N-Terminus und der NBS-Domäne charakterisiert (Hammond-Kosack und Jones 2000).

Sowohl TIR- als auch LZ-Domäne spielen eine Rolle in der Signalweiterleitung, wobei die Mechanismen unterschiedlich zu sein scheinen, da sie in *Arabidopsis* unterschiedliche Proteine für ihre Funktion benötigen (Aarts et al. 1998 b, Innes 1998). Während Mitglieder der LZ-NBS-LRR-Gruppe in Monokotylen und Dikotylen weit verbreitet sind, wurden TIR-NBS-LRR-Gene bislang ausschließlich in Dikotylen gefunden (Pan et al. 2000 a).

Für die zweite Klasse der Resistenzgene ist derzeit nur ein einziges Mitglied bekannt, nämlich *Pto* aus Tomate gegen *Pseudomonas syringae*, durch das eine cytoplasmatische Serin-Threonin-Kinase kodiert wird. Das *Pto*-Produkt enthält keine LRR-Region und benötigt für seine Funktion die Anwesenheit des gekoppelten NBS-LRR-Gens *Prf* (Ellis et al. 2000). Die *Pto/Prf/AvrPto*-Proteininteraktionen kann als klassisches Beispiel für die ‚Guard‘-Hypothese angesehen werden (van der Biezen und Jones 1998). In dem Modell agiert das NBS-LRR Protein *Prf* als „Wächter“ (‚Guard‘) für das *Pto* Proteinkinase-Gen (‚Guardee‘). Nach Erkennung des *Pto/AvrPto*-Proteinkomplexes wird die Abwehrreaktion in Gang gesetzt.

Die Proteine der dritten und vierten Resistenzgenklasse enthalten beide Transmembran-Rezeptormoleküle mit extrazellulären LRR-Domänen (Pan et al. 2000 a). Zu den Mitgliedern der dritten Klasse gehört die *Cf*-Genfamilie in Tomate, die Resistenz gegen *Cladosporium fulvum*, den Erreger der Blattflecken und Fruchtfäule an Tomate, vermitteln. Die vierte Klasse enthält bislang nur ein Mitglied, nämlich *Xa21* aus Reis gegen *Xanthomonas oryzae*, dessen Produkt zusätzlich zu den oben erwähnten Strukturen eine intrazelluläre Serin-Threonin-Kinase-Domäne enthält. Auch der Proteinkinase-vermittelten Signalweiterleitung wird eine wichtige Rolle in der rassen-spezifischen Resistenz zugeschrieben (Hammond-Kosack und Jones 2000). Ebenfalls nur ein Mitglied wurde bisher für die fünfte Klasse identifiziert: das *Arabidopsis RPW8*-Gen für Resistenz gegen den Echten Mehltau. Dieses Gen codiert für ein kleines membrangebundenes Protein mit einer ‚Coiled-Coil‘ (CC) Domäne und besitzt keine offensichtliche Homologie zu den anderen charakterisierten Resistenzproteinen.

1.3 Resistenzgenanaloga (RGA)

Innerhalb ihrer NBS-Region weisen die verschiedenen Resistenzgene der NBS-LRR-Klasse mindestens sieben gemeinsame strukturelle Domänen auf (Abb. 2 und 3 a). Man spricht von sogenannten konservierten Motiven, die entweder unabhängig der Gruppenzugehörigkeit der Gene konserviert sind oder spezifisch für die TIR- oder die LZ-Gruppe.

Diese konservierten Motive innerhalb der NBS-Region können als Basis für die Herstellung degenerierter Primer genutzt werden, mit denen in PCR-gestützten Verfahren Sequenzen amplifiziert werden, die eine hohe Ähnlichkeiten zu den Resistenzgenen der NBS-LRR-Klasse aufweisen (Pan et al. 2000 a, Rivkin et al. 1999, Kanazin et al. 1996, Leister et al. 1996, Yu et al. 1996). Solche Sequenzen werden als Resistenzgenanaloga (RGA) bezeichnet.

RGA wurden erfolgreich aus einer Vielzahl unterschiedlicher mono- und dikotyler Angiospermen und einiger Gymnospermen isoliert (s. Tab. 1).

Die Anzahl der RGA im Pflanzengenom wird auf mehrere hundert bis zu über tausend geschätzt, wobei häufig eine geclusterte Anordnung auftritt (Young 2000, Meyers et al. 1998 b, Michelmore und Meyers 1998). Im komplett sequenzierten *Arabidopsis*genom wurden über 150 NBS-LRR-Gene identifiziert, was etwa 1 % der Gesamtanzahl an Genen in *Arabidopsis* entspricht (Meyers et al. 2003, Richly et al. 2002). Mehr als zwei Drittel davon sind in Clustern aus zwei oder mehr eng gekoppelten Mitgliedern angeordnet. In Reis existieren etwa 600 NBS-LRR-Gene (Goff et al. 2002).

Tab. 1: Pflanzen, aus denen Resistenzgenanaloga (RGA) kloniert wurden

Pflanze	RGA-Typ	Referenzen
<i>Arabidopsis thaliana</i>	TIR, LZ	Richly et al. 2002, Aarts et al. 1998, Speulman et al. 1998
<i>Arachis hypogaea</i>	TIR, LZ	Bertioli et al. 2003
<i>Beta vulgaris</i>	TIR, LZ, STPK	Hunger et al. 2002
<i>Brassica oleracea</i>	TIR, LZ	Vicente et al. 2001
<i>Capsicum annuum</i>	TIR, STPK	Pflieger et al. 1999
<i>Citrus</i> ssp.	TIR, LZ	Deng et al. 2000
<i>Coffea</i> L.	LZ	Noir et al. 2001
<i>Cucumis melo</i>	TIR, LZ	Brotman et al. 2002, Garcia-Mas et al. 2001
<i>Glycine max</i>	TIR, LZ	Peñuela et al. 2002, Jeong et al. 2001, Graham et al. 1999, 2000, Kanazin et al. 1996, Yu et al. 1996
<i>Helianthus annuus</i>	TIR, STPK	Bouzidi et al. 2002, Gentzbittel et al. 1998
<i>Hordeum vulgare</i>	LZ	Madsen et al. 2003, Toojinda et al. 2001, Aycliffe et al. 1999, Leister et al. 1998, Seah et al. 1998
<i>Lactuca sativa</i>	TIR, LZ	Meyers et al. 1998
<i>Linum sativum</i>	TIR, LZ	Dodds et al. 2001
<i>Lycopersicon esculentum</i>	TIR, LZ, STPK	Zhang et al. 2001, Pan et al. 2000
<i>Malus</i> ssp.	TIR, LZ	Lee et al. 2003
<i>Manihot esculenta</i>	TIR, LZ	López et al. 2003
<i>Medicago sativa</i>	TIR, LZ	Cordero et al. 2002
<i>Medicago truncatula</i>	TIR, LZ	Zhu et al. 2002
<i>Oryza sativa</i>	LZ	Bai et al. 2002, Ramalingam et al. 2002, Wang et al. 2002, Mago et al. 1999, Leister et al. 1998
<i>Phaseolus vulgaris</i>	TIR, LZ, STPK	Ferrier-Cana et al. 2003, López et al. 2003, Vallad et al. 2001, Geffroy et al. 2000, Rivkin et al. 1999
<i>Pinus monticola</i>	TIR	Liu et al. 2003
<i>Pisum sativum</i>	TIR, LZ	Timmerman-Vaughan et al. 2000
<i>Saccharum</i> ssp.	TIR, LZ, STPK	Rossi et al. 2003
<i>Solanum tuberosum</i>	TIR	Leister et al. 1996
<i>Theobroma cacao</i>	LZ	Kuhn et al. 2003
<i>Triticum aestivum</i>	LZ, STPK	Maleki et al. 2003, Huang et al. 2001, Spielmeyer et al. 1998, Seah et al. 1998, Feuillet et al. 1997, Lagudah et al. 1997
<i>Vitis vinifera</i>	TIR, LZ, STPK	Di Gaspero et al. 2002, 2003, Donald et al. 2002
<i>Zea mays</i>	LZ	Bai et al. 2002, Quint et al. 2002, Collins et al. 1998

TIR : TIR-NBS-LRR-RGA ; LZ : LZ-NBS-LRR-RGA ; STPK : Serin-Threonin-Proteinkinase-RGA

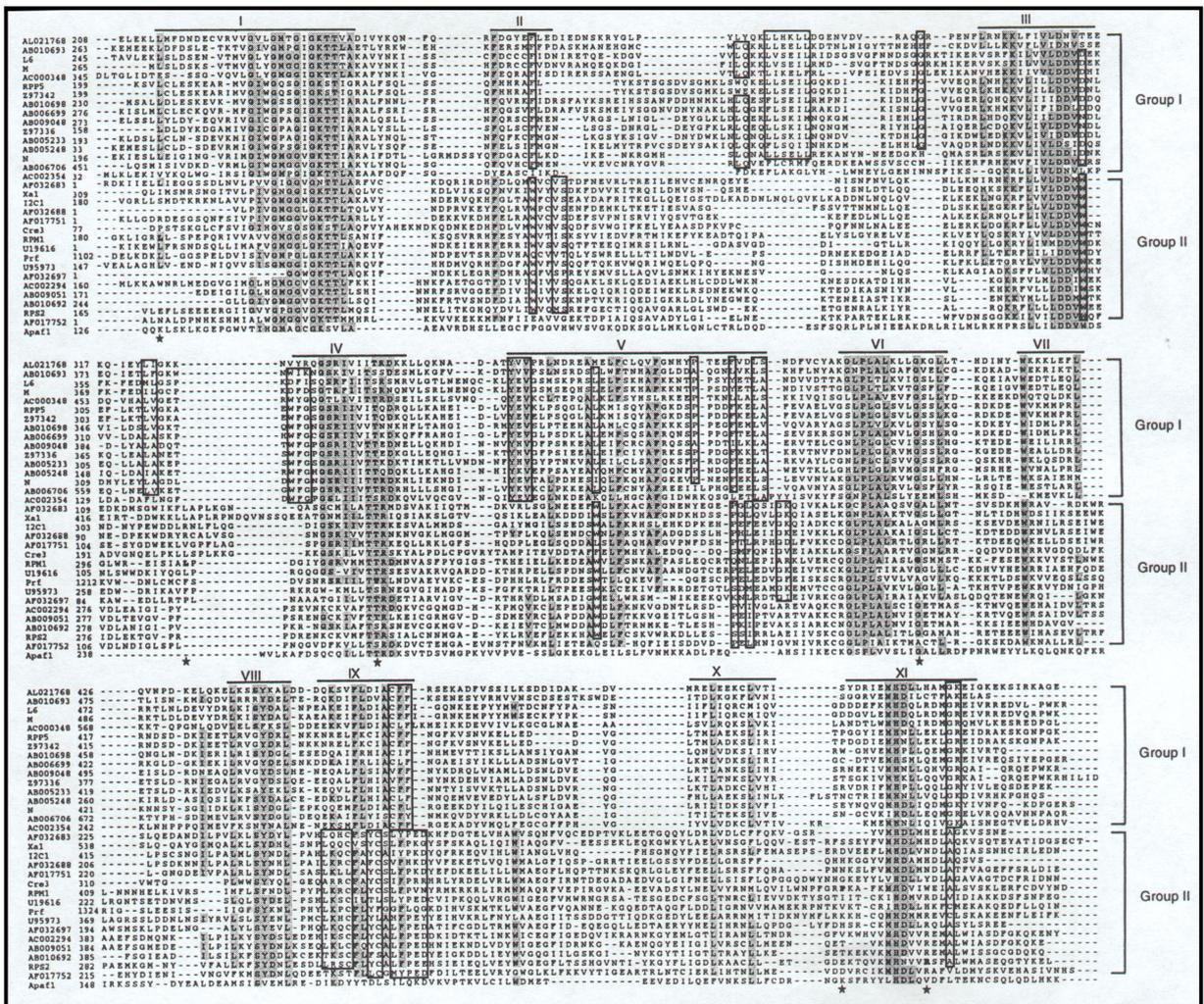


Abb. 2: Aminosäuresequenz-Alignment von NBS-Domänen verschiedener pflanzlicher Resistenzgene, RGA und dem menschlichen *Apaf1*-Gen mit den konservierten Motiven (Pan et al. 2000 a). Sequenzen mit mehr als 50 % Übereinstimmung sind grau hinterlegt. Umrahmte Sequenzmotive sind gruppenspezifisch für Gruppe I (TIR) oder II (LZ).

Da NBS-Sequenzen aus Pflanzen bisher ausschließlich mit Schädlings- und Krankheitsresistenz in Verbindung gebracht werden konnten (Di Gaspero und Ciariani 2003, Graham et al. 2002 a, Michelmore 2000, Meyers et al. 1999) und sie im Genom oft in der Nähe von Resistenzloci positioniert sind (Aarts et al. 1998, Shen et al. 2001, Speulman et al. 1998, Kanazin et al. 1996, Leister et al. 1996, Yu et al. 1996), werden NBS-RGA als aussichtsreiche Kandidaten für echte Resistenzgene angesehen.

RGA lassen sich leicht in molekulare Marker umwandeln und können somit zur markergestützten Selektion (MAS) für resistente Genotypen verwendet werden (van der Linden et al. 2003, Quint et al. 2002, Deng et al. 2000). Zudem gilt der RGA-Ansatz als Alternative zu den bisher angewendeten zeitaufwendigen, arbeits- und kostenintensiven Strategien der Resistenzgen-Isolierung (Vicente und King 2001, Michelmore 2000).

Um die in PCR-gestützten Verfahren isolierten RGA hinsichtlich ihrer Beziehung zu Resistenzgenen zu überprüfen, ist es notwendig, sie in spaltenden Nachkommenschaften zu kartieren. Die auf der Chromosomenkarte in der Nähe von Resistenzgenen kartierten RGA stellen potentielle Kandidaten für das Gen dar (Collins et al. 2001, 1998). Sie müssen in umfangreichen Populationen hinsichtlich ihrer Cosegregation mit der Resistenz weiter analysiert werden. Mit der Resistenz cosegregierende RGA können als Klonierungsstartpunkte zur Isolierung des Resistenzgens verwendet werden. Durch transgene Komplementation eines anfälligen Genotyps kann der Beweis erbracht werden, dass es sich bei dem Kandidatengen tatsächlich um das funktionelle Resistenzgen handelt (Hunger et al. 2002, Dodds et al. 2001).

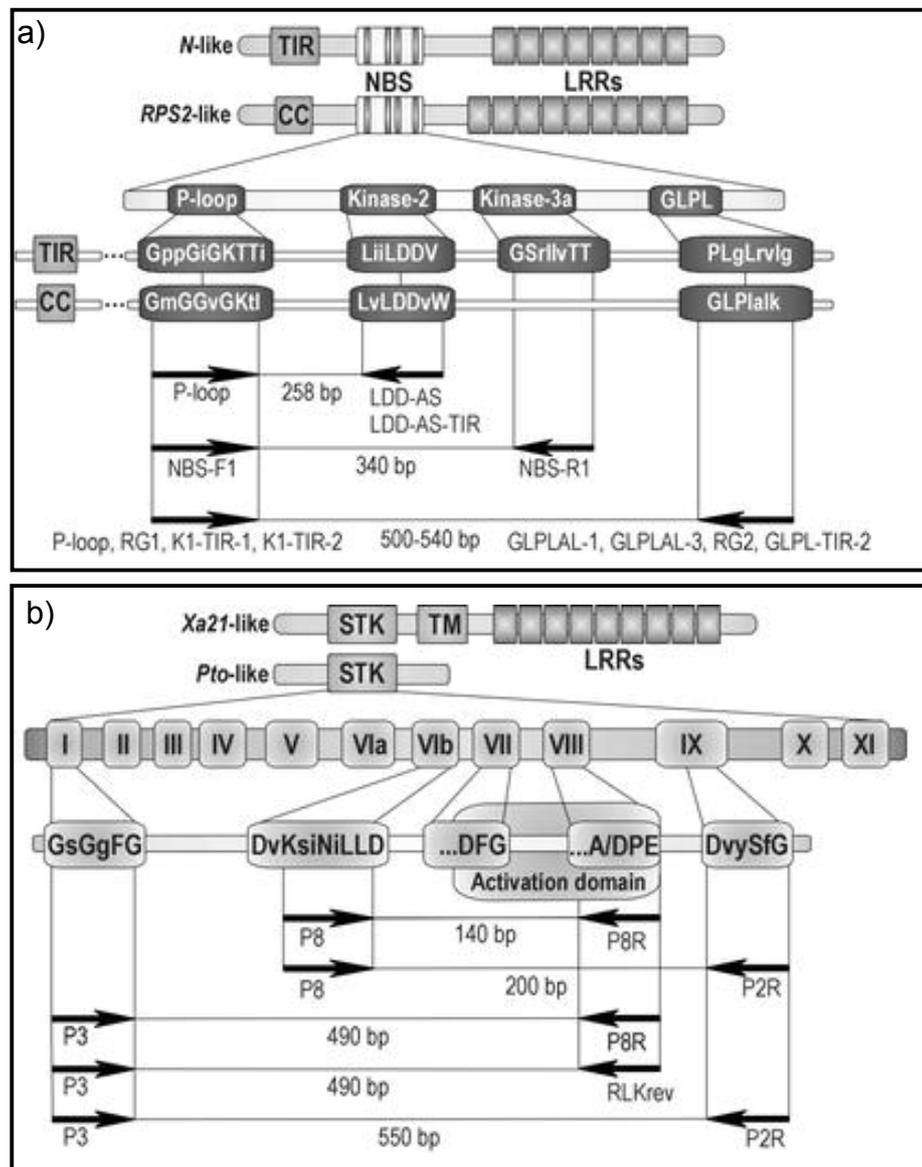


Abb. 3: Modell der NBS-LRR- (a) und der Kinase- (b) Klasse der Resistenzgenprodukte mit konservierten Motiven innerhalb der NBS- und STK-Domäne (Di Gaspero und Cipriani 2003). Die Pfeile geben die Primerbindungsstellen an, die in der Studie von Di Gaspero und Cipriani (2003) zur Isolierung von RGA aus Weinrebe verwendet wurden.

Der Ansatz über NBS-LRR-RGA wurde erfolgreich zur Klonierung des Maisrost-Resistenzgens *Rp1-D* (Collins et al. 1999) und des Flachsrost-Resistenzgens *N* (Dodds et al. 2001) angewendet. In *Arabidopsis* erwies sich ein RGA als Fragment des klonierten Resistenzgens *RPP5* (Aarts et al. 1998).

Auch in der Kinase-Domäne der Kinase-Resistenzgene (Klasse 2 und 4) sind diverse konservierte Motive vorhanden (s. Abb. 3 b), die zur Isolierung von Serin-Threonin-Kinase (STK)-RGA ausgenutzt werden können. Verschiedene Autoren haben analog des NBS-LRR-RGA-Ansatzes STK-RGA charakterisiert und kartiert (Di Gaspero und Cipriani 2003, Maleki et al. 2003, Vallad et al. 2001, Pflieger et al. 1999, Chen et al. 1998, Genzmittel et al. 1998). Feuillet et al. (1997) gelang die Isolierung des Kinase-Resistenzgens *Lr10* aus Weizen durch Screening mit STK-RGA.

Allerdings ist die Funktion rezeptorähnlicher Kinasen in Pflanzen nicht auf die Resistenzreaktion beschränkt, sie spielen vielmehr in unterschiedlichen Signalwegen bei Prozessen wie z. B. Meristem- und Blattentwicklung eine wichtige Rolle (Di Gaspero und Cipriani 2003). Aus diesem Grund ist die Eignung von STK-RGA zur Klonierung von Resistenzgenen begrenzt.

1.4 Resistenz bei Rosen

Rosen haben unter den Zierpflanzen weltweit eine große wirtschaftliche Bedeutung (Gudin 2000).

Zwei pilzliche Schaderreger führen jährlich zu großen Verlusten in der kommerziellen Rosenproduktion und erfordern den Einsatz erheblicher Mengen an Fungiziden zur Eindämmung des Befalls. Eine der großen Schaden verursachenden Krankheiten von Rosen im Freiland ist der Sternrußtau, der durch den hemibiotrophen pilzlichen Schaderreger *Diplocarpon rosae* hervorgerufen wird (Horst 1983). Die Infektion anfälliger Rosengentypen führt zu typischen schwarzen Flecken auf infizierten Blättern, die meistens von starken Chlorosen umgeben sind (s. Abb. 4 a). Bei den befallenen Pflanzen kommt es zu frühzeitigem Blattfall und einer extremen Schwächung nach einer Reihe von Sekundärinfektionen, was schließlich zum Absterben der gesamten Pflanze führen kann.

Der Echte Mehltau, verursacht durch den obligat biotrophen Erreger *Podosphaera pannosa*, gilt als Hauptschaderreger von im Gewächshaus kultivierten Rosen (Horst 1983, Linde und Shishkoff 2003). Befallene Pflanzen sind durch den typischen weißlichen, dünnen Mycelüberzug an Blättern, Trieben, Knospen und Blüten sowie Verkrüppelungen an Blättern und Blüten zu erkennen (s. Abb. 4 b).



Abb. 4: Sternrußtau an Rosenblättern (a). Echter Mehltau an Rosen-Trieben und Blüten (b).

Aufgrund strenger Auflagen hinsichtlich des Einsatzes von Fungiziden und eines gesteigerten Umweltbewusstseins ist die Züchtung resistenter Rosensorten zum Hauptziel aktueller Rosenzüchtungsprogramme geworden (von Malek et al. 2000). Da Resistenzgene im Genpool heutiger Sorten nicht vorhanden sind, müssen sie aus Wildarten eingekreuzt werden, was in der Regel einen großen Zeitaufwand darstellt und durch Kreuzungsbarrieren sowie unterschiedliche Ploidiestufen zwischen Wild- und Kulturrosen extrem erschwert wird (Debener et al. 2003). Die Integration einer monogen bedingten, qualitativen Resistenzeigenschaft in ein pflanzliches Genom durch Rückkreuzung dauert etwa zehn Generationen (Lübberstedt et al. 2001). Durch markergestützte Selektion mithilfe eng an Resistenzgene gekoppelter Marker könnte dieser zeitaufwendige Prozess der Resistenzzüchtung erheblich verkürzt werden (Rommens und Kishore 2000). Zudem gewinnt die Isolierung von Resistenzgenen aus Wildarten und der Transfer in Kultursorten zunehmendes Interesse, auch wenn die öffentliche Akzeptanz des Gentransfers derzeit noch wenig vorhanden ist. Wie anhand verschiedener Beispiele gezeigt wurde, behalten Resistenzgene nach dem Transfer innerhalb - und in einigen Fällen auch zwischen - Pflanzenarten ihre Aktivität (Tai et al. 1999, Whitham et al. 1996, Rommens et al. 1995, Bent et al. 1994). Auf lange Sicht ließe sich durch die gezielte Integration von Resistenzgenen in Kultursorten der Pestizideinsatz auf ein Minimum beschränken.

1.5 Die Resistenzgene *Rdr1* und *Rpp1*

Debener et al. (1998) charakterisierten fünf physiologische *Diplocarpon rosae*-Rassen und stellten fest, dass die tetraploide Rosen-Zuchtlinie 91/100-5 eine weitreichende Resistenz gegenüber allen fünf Rassen besitzt. Spaltungsanalysen ergaben, dass die Resistenz von einem monogen dominant vererbten Resistenzgen kontrolliert wird. Dieses als *Rdr1* bezeichnete Gen ist das erste in Rosen beschriebene Resistenzgen (von Malek und Debener 1998). Eine Reihe molekularer Marker mit enger Kopplung zu *Rdr1* wurde identifiziert, wodurch dessen Lokalisierung auf der Rosen-Chromosomenkarte möglich war (Debener und Mattiesch 1999, von Malek et al. 1998, Debener, persönliche Mitteilung).

Einige dieser eng gekoppelten Marker werden im Rahmen eines am Institut für Zierpflanzenzüchtung in Ahrensburg laufenden Projektes als Hybridisierungssonden eingesetzt, um *Rdr1* über eine Positionsklonierung zu isolieren. Diese gestaltet sich allerdings aufgrund der großen Anzahl repetitiver Elemente auf dem BAC-Contig sowie des hohen Heterozygotiegrades als schwierig (Debener, persönliche Mitteilung).

Linde und Debener (2003) charakterisierten mit einem Sortiment aus zehn Rosengenotypen acht unterschiedliche physiologische Rassen von *Podosphaera pannosa*. Auch hier wurde durch Spaltungsanalysen die Kontrolle der Resistenz durch ein einzelnes dominantes Gen nachgewiesen, welches als *Rpp1* bezeichnet wurde und auf der Rosen-Chromosomenkarte kartiert werden konnte (Linde et al. 2004).

Neben dem qualitativen Resistenzgen *Rpp1* wurde eine Reihe von QTL, die an der quantitativen Resistenz gegen den Echten Mehltau beteiligt sind, identifiziert und auf der Rosen-Chromosomenkarte lokalisiert (Linde, persönliche Mitteilung).

1.6 Ziele der Arbeit

Als Ziel der vorgelegten Arbeit sollte ein möglichst umfangreicher Satz von NBS-LRR-RGA aus Rosen isoliert und molekulargenetisch charakterisiert werden. In Abbildung 5 sind die Schwerpunkte der RGA-Charakterisierung schematisch dargestellt:

- **Diversität:** Bei der Analyse der Diversität wurde untersucht, ob Mitglieder beider NBS-LRR-Gruppen im Rosengenom vorhanden sind. Die ungefähre Anzahl und Größe der unterschiedlichen RGA-Familien und deren prozentuale Aminosäuresequenz-Identität untereinander und mit Resistenzgenen aus anderen Pflanzen wurde ermittelt.
- **Phylogenie:** Die phylogenetischen Beziehungen zwischen den Rosen-RGA und Resistenzgenen bzw. RGA aus anderen Pflanzen wurden analysiert, um einen Einblick in die Resistenzgenevolution bei Rosen zu bekommen.
- **Komplexität:** Ausgewählte RGA-Loci wurden hinsichtlich ihrer Komplexität untersucht, um Informationen über die genomische Organisation der Rosen-RGA zu bekommen. Die Kenntnis über die Komplexität der Loci war zudem zur korrekten Interpretation der später durchgeführten Expressionsanalysen erforderlich.
- **Lage und Anordnung:** Durch die Kartierung der RGA in zwei verschiedenen Rosen-Populationen wurde deren Lage auf den Chromosomen bestimmt. Damit sollten Marker für Resistenzen und potentielle Kandidaten für die beiden Rosen-Resistenzgene sowie ‚Hotspot‘-Regionen für noch nicht charakterisierte Resistenzgene identifiziert werden. Die Anordnung der RGA auf den Chromosomen lässt zudem Rückschlüsse auf die Mechanismen der Genervielfältigung im Zuge der Evolution zu.

- Expression: Ausgewählte RGA wurden hinsichtlich ihrer Organspezifität und der Induktion nach Sternrußtau-Infektion analysiert. Mit den Infektionsstudien sollten Kandidaten mit verstärkter Expression in infiziertem Gewebe identifiziert und damit deren direkte Beteiligung an der Resistenzreaktion nachgewiesen werden. Damit hätte man einen ersten Hinweis auf die Funktion dieser RGA.

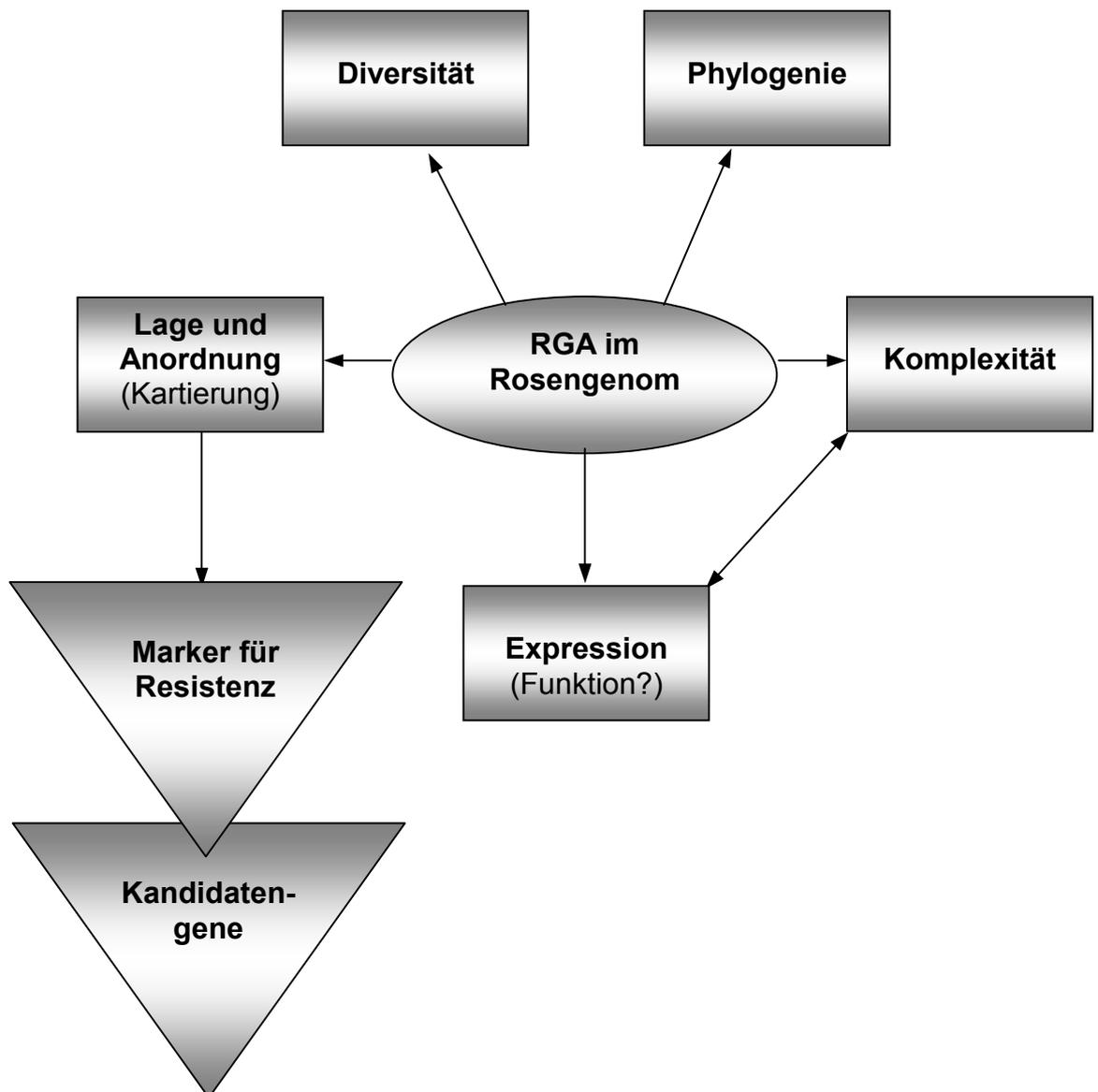


Abb. 5: Schwerpunkte der molekulargenetischen Charakterisierung der RGA im Rosengenom.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Rosengenotypen sind Bestandteil der Sammlung des Institutes für Zierpflanzenzüchtung in Ahrensburg. Die Pflanzen der Kartierungspopulationen wurden im Bodenbeet oder in Töpfen im Gewächshaus unter normalen Bedingungen kultiviert, die anderen verwendeten Genotypen waren im Freiland ausgepflanzt.

Die genomischen RGA wurden aus der diploiden *R. multiflora* Hybride 88/124-46 isoliert, die aus der Kreuzung zwischen einer tetraploiden Gartenrose und einer diploiden *R. multiflora*, gefolgt von vier Zyklen offener Bestäubung, hervorgegangen ist (von Malek und Debener 1998). Zur Isolierung exprimierter RGA diente ein Gemisch aus Blättern der resistenten Genotypen 95/13-90 (2x), 91/100-1 (4x) und 91/100-5 (4x). Die Herkunft der drei Genotypen ist detailliert beschrieben in Drewes-Alvarez (1992), von Malek und Debener (1998) und Linde und Debener (2003).

Die genomischen Southern-blot-Analysen wurden an den Arten *R. rugosa* (Genotyp 93/36-05), *R. roxburghii* (Genotyp 93/35-02) und der *R. multiflora*-Hybride 88/124-46 sowie dem experimentellen *Prunus cerasus*-Klon 90/2.0-11 durchgeführt.

Die Kartierung der RGA erfolgte in den diploiden Rosen-Populationen 94/1 und 97/7, die beide eine Aufspaltung für das Resistenzgen *Rpp1* gegen den Echten Mehltau der Rasse 9 (Linde et al. 2003) und letztere zusätzlich für *Rdr1* gegen den Sternrußtau der Rasse 5 (von Malek und Debener 1998) zeigen. Die diploiden Eltern der Population 94/1, nämlich 93/1-117 (weiblicher Elter) und 93/1-119 (männlicher Elter), sind durch offene Bestäubung des diploiden Genotyps 81/42-15 entstandene Halbgeschwister (Abb. 6 a). Die Population 97/7 ist aus einer Kreuzung des resistenten diploiden Genotyps 88/124-46 als weiblicher Elter mit dem anfälligen Genotyp 82/78-1 als männlicher Elter gefolgt von einer Rückkreuzung der F1-Hybride 95/13-39 mit 82/78-1 entstanden (Abb. 6 b).

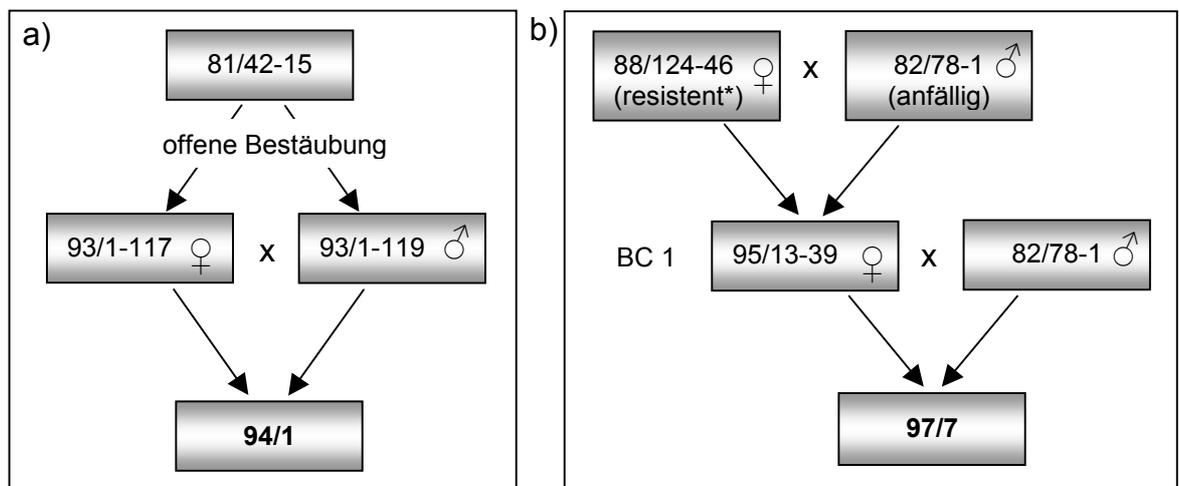


Abb. 6: Abstammung der Populationen 94/1 (a) und 97/7 (b). ♀ Weiblicher Elter; ♂ männlicher Elter; * resistent gegen den Echten Mehltau der Rasse 9 und den Sternrußtau der Rasse 5; BC: Rückkreuzung („Backcross“).

2.2 Sonstige Materialien

Sofern nicht extra angegeben wurden Feinchemikalien von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich und Merck bezogen. Die verwendeten Enzyme stammten von den Firmen Invitrogen, Roche Diagnostics oder Ambion. Alle PCR-Reagenzien bis auf die dNTPs (Roth) wurden ebenso wie der Längen- und Mengenstandard zur analytischen Bestimmung von DNA von Invitrogen hergestellt. Die Zusammensetzung der Puffer, Lösungen, Nährmedien und Acrylamidgele sowie die Hersteller der Geräte und Gebrauchsmaterialien sind im Anhang aufgeführt (A 6.4, A 6.5, A 6.7, A 6.8)

Die Standorte der Hersteller der verwendeten Chemikalien, Kits, Gebrauchsmaterialien und sonstigen Reagenzien sind im Herstellerverzeichnis im Anhang aufgeführt (A 6.3).

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Aufreinigung und Fällung von Nukleinsäuren

Die Entfernung von Proteinen aus DNA-Lösungen erfolgte durch Zugabe von 1 Vol Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1), gründliche Durchmischung und Zentrifugation für 5 Min. bei 12000 Upm. Der wässrige Überstand mit der gereinigten DNA wurde in ein neues Gefäß überführt. Um verbliebene Phenolreste aus der Lösung zu entfernen, wurde dieser 1 Vol Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt, gründlich gemischt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß gegeben.

Die Fällung diente der Aufreinigung und Konzentrierung der Nukleinsäuren. Der DNA-Lösung wurden 0,1 Vol 3 M Natriumacetat pH 5,2 und entweder 2 Vol Ethanol (100 %) oder 0,7 - 1 Vol Isopropanol (100 %) zugesetzt. Nach 30 Min. Inkubation bei 4 °C wurde die Probe für 20 Min. bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene DNA-Pellet wurde zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, danach jeweils für 5 Min. bei 13000 Upm zentrifugiert und nach Abnahme der Restflüssigkeit mit einer Pipette ca. 10 Min. bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde anschließend in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ oder TE-Puffer gelöst und bei - 20 °C gelagert.

2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Diese Methode diente der analytischen und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten. Je nach Bedarf wurden Gele zwischen 1 und 2 % (w/v) Agarose (Peggold Universal Agarose von Peqlab Biotechnologie) mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid in 1 x TAE-Puffer verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 0,1 Vol 10 x Ladepuffer versetzt und bei einer Spannung von 6 - 9 V/cm in horizontalen Elektrophoresekammern mit 1 x TAE-Puffer aufgetrennt, wobei 1 kB-Leiter als Längenstandard diente. Die Gele wurden auf einem UV-Transilluminator fotografiert und unter Zuhilfenahme des Programms *Quantity One* ausgewertet.

2.3.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung der DNA erfolgte entweder nach der Elektrophorese im Agarosegel oder im sogenannten Tropfentest. Hierbei wurden mit 10 ng Ethidiumbromid versetzte, verdünnte DNA-Lösungen als 10 μ L-Tropfen auf Parafilm direkt auf dem UV-Tisch mit der Kamera fotografiert. Durch Intensitätsvergleich der unter UV-Licht fluoreszierenden zu bestimmenden DNA mit einer Eichreihe aus λ -DNA mit bekannten Konzentrationen wurde die DNA-Konzentration mit der Software *Quantity One* berechnet. Teilweise wurde zusätzlich eine Quantifizierung im Fotometer nach Sambrook und Russell (2001) durchgeführt, wobei die auf diese Weise ermittelten DNA-Konzentrationen die Werte aus Gel- bzw. Tropfentest meist um Faktor 2 überstiegen. Die RNA-Konzentration wurde wie in Sambrook und Russell (2001) beschrieben im Fotometer gemessen.

2.3.4 DNA-Extraktion

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte mit den im Folgenden aufgeführten Modifikationen nach dem in Kobayashi et al. (1998) beschriebenen Protokoll oder mit dem *Dneasy Plant Mini Kit* (Qiagen) aus 50 - 80 mg frischen jungen Blättern. Das Blattmaterial wurde vor der Extraktion zum Abbau der Kohlenhydrate zwei Tage bei Raumtemperatur dunkel gelagert. Danach wurde es in 2 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit je zwei Edelstahl-Mahlkugeln in flüssigem Stickstoff eingefroren und mittels einer Schwingmühle für 5 Min. zerkleinert, wobei die Mahlbecher zuvor ebenfalls in Stickstoff vorgekühlt worden sind.

Bei der Kobayashi-Methode wurde das zerkleinerte Pflanzenmaterial in 1,5 mL Puffer 1 aufgenommen und bei 2000 Upm für 5 Min. bei 4 °C abzentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 mL Puffer 2 resuspendiert und für 10 - 30 Min. bei 65 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Chloroform-Aufreinigung. Die DNA im wässrigen Überstand wurde mit Isopropanol gefällt und in TE-Puffer resuspendiert. Es folgte ein RNase-Verdau mit 10 μ g/mL RNase A für 30 Min. bei 37 °C. Anschließend wurde eine Phenol/ Chloroform und eine Chloroform-Extraktion vorgenommen, wonach eine erneute Fällung der DNA mit Isopropanol folgte.

Bei Verwendung des *Dneasy Mini Kits* wurde nach dem dazugehörigen Protokoll gearbeitet, mit einer zusätzlichen Chloroform-Extraktion nach Zugabe von Puffer AP2.

2.3.5 RNA-Extraktion

Die Extraktion der RNA wurde mit dem *Invisorb Spin Plant RNA Mini Kit* (Invitex) durchgeführt, wobei die hierfür verwendeten Gefäße und Pipettenspitzen zur Vermeidung der RNA-Degradation durch RNasen zuvor einer Behandlung mit DEPC unterzogen wurden (Sambrook und Russell 2001). Ausgangsmenge waren 30 - 80 mg junges Blattmaterial, welches sofort nach Abnahme und Einwiegen in 2 mL-Eppendorfgefäße in Stickstoff eingefroren wurde. Einzige Modifikation zu dem vom Hersteller beschriebenen Protokoll war eine Chloroform-Extraktion nach Resuspension des zerkleinerten Pflanzenmaterials mit Lysis-Lösung RP. Zur Entfernung eventueller DNA-Kontaminationen aus den RNA-Lösungen wurde im Anschluss eine DNase-

Behandlung mit 10 U RNase-freier Dnase I (30 Min. 37 °C) mit darauffolgender Phenol/ Chloroform-Extraktion vorgenommen. Die RNA wurde mit Ethanol gefällt und in RNase-freiem H₂O_{bidest} resuspendiert.

2.3.6 Amplifikation der RGA

Die PCR-Amplifikation der genomischen RGA erfolgte aus der Linie 88/124-46 mit sechs unterschiedlichen Primerkombinationen (Tab. A 17) in einem Gesamtvolumen von 50 µL in 0,5 mL-Reaktionsgefäßen mit folgender Zusammensetzung der Reaktionslösungen: 50 ng DNA, 5 µM ‚forward‘ und ‚reverse‘ Primer, 2,5 U *Taq*-Polymerase, 0,2 mM dNTPs, 2,5 mM MgCl₂ im 1 x PCR-Puffer von Invitrogen. Die PCR-Reaktionsbedingungen sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tab. 2: Reaktionsbedingungen für die Amplifikation der RGA

Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur
1	Anfangsdenaturierung	3 Min.	94 °C
35	Denaturierung	1 Min.	94 °C
	Hybridisierung	1 Min.	42 °C
	Synthese	1 Min.	72 °C
1	Endsynthese	10 Min.	72 °C

Die Amplifikation der exprimierten RGA erfolgte mittels RT-PCR und drei unterschiedlichen Primerkombinationen (Tab. A 17) mit dem *OneStep RT-PCR Kit* (Qiagen) aus jeweils 500 ng RNA des Gemisches der drei oben genannten Genotypen. Nach der Reversen Transkription für 30 Min. bei 50 °C wurde die Reverse Transkriptase bei 95 °C für 15 Min. inaktiviert und gleichzeitig die bis dahin an Antikörpern gebundene *Taq*-Polymerase durch Zerstörung derselbigen aktiviert. Die PCR Bedingungen waren anschließend dieselben wie für die genomischen RGA. Um auszuschließen, dass eventuelle Rest-DNA-Kontaminationen als Template fungierten, wurden Negativ-Kontrollreaktionen mit *Taq*-Polymerase ohne Reverse Transkriptase durchgeführt.

2.3.7 Klonierung der RGA

2.3.7.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die für die Herstellung der kompetenten Zellen benötigten Kolben und Zentrifugenbecher wurden zuvor mit H₂O_{bidest} gefüllt autoklaviert, da die Reinheit der Gefäße einen maßgeblichen Einfluss auf die spätere Kompetenz der Zellen hat. Eine Einzelkolonie von *E. coli*-Zellen des Stammes DH10B wurde für 16 Std. bei 30 °C auf dem Inkubationsschüttler bei 180 Upm in einem 250 mL-Erlenmeyerkolben mit 20 mL LB-Medium angezogen. Fünf mL dieser Bakterienkultur wurden zu 500 L LB-Medium in einem 2 L-Erlenmeyerkolben gegeben. Bei 37 °C und 180 Upm wurde die Bakterien-suspension geschüttelt, bis sie nach ca. 2,5 Std. eine OD₅₅₀ von 0,95 erreicht

hatte, was $3 - 6 \times 10^8$ Zellen/mL entspricht. Danach wurde das Medium auf drei vorgekühlte 250 mL-Nalgene-Zentrifugenbecher aufgeteilt und die Bakterien bei 4 °C und 4000 Upm für 5 Min. pelletiert. Die Bakterien wurden in 500 mL eiskalter 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert, abermals abzentrifugiert und die Lösung verworfen. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt, bis die Bakterien in ca. 1 mL 10 %iger Glycerinlösung endgültig gelöst und portionsweise in 0,5 mL-Reaktionsgefäßen (je 120 µL) in einem bei - 80 °C vorgekühlten Metallblock schockgefroren wurden. Die Lagerung der elektrokompetenten Zellen erfolgte bei - 80 °C.

2.3.7.2 Klonierungsvektor

Als Klonierungsvektor wurde der *pGEM-T Easy*-Vektor von Promega verwendet. Dieser trägt ein Gen für Ampicillin-Resistenz, so dass auf Ampicillin-haltigem Medium nur Bakterien wachsen, in denen das Plasmid integriert ist. Des Weiteren ist auf dem Vektor innerhalb der ‚Multiple Cloning Site‘ (MCS) das β -Galaktosidase-Gen *lacZ* lokalisiert, welches die Erkennung der Rekombinanten durch eine einfache Farbreaktion ermöglicht. Bei funktionellem *lacZ*-Gen wird nach Aktivierung durch das Lactose-Analogon IPTG als Induktor das Enzym β -Galaktosidase synthetisiert. Dieses spaltet das farblose Substrat X-Gal, wodurch als Produkt ein blaues Indoxyl-Derivat entsteht. Bei Insertion eines DNA-Fragments in den Vektor wird das *lacZ*-Gen auf der MCS unterbrochen, wodurch die β -Galaktosidase-Synthese gestört ist und X-Gal nicht gespalten werden kann. Deshalb bleiben die rekombinanten Bakterienkolonien farblos.

2.3.7.3 Ligation

Die PCR Produkte wurden auf 1,5 %igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Fragmente im erwarteten Größenbereich zwischen 500 und 700 bp wurden auf dem UV-Tisch mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und nach Anleitung des Herstellers mit dem *MinElute Gel Extraction Kit* (Qiagen) eluiert. Die eluierten DNA-Fragmente wurden im Agarosegel quantifiziert und entsprechend des vom Hersteller beschriebenen Protokolls in den *pGEM-T Easy*-Vektor ligiert.

Die Ligationsansätze wurden dabei von 10 µL Gesamtvolumen auf 5 µL reduziert und zwei unterschiedliche molare Insert:Vektor-Konzentrationen (1:1, 3:1) wurden eingesetzt, um die Ligationseffizienz zu optimieren.

2.3.7.4 Transformation

Die Transformation erfolgte durch Elektroporation für ca. 5 Sek. bei 2,5 kV mit einem *E. coli*-Pulser in 0,2 cm dicken Elektroporationsküvetten. Dabei setzte sich der Reaktionsansatz aus 1 µL des Ligationsansatzes und 40 µL der elektrokompetenten *E. coli*-Zellen zusammen. Nach der Elektroporation wurde dem Ansatz möglichst zügig 1 mL SOC-Medium zugegeben und unter konstanter Bewegung folgte eine einstündige Erholungsphase bei 37 °C in 15 mL-Falcon-Gefäßen. Anschließend wurden zwischen 20 und 100 µL der Bakteriensuspensionen in Petrischalen mit festem LB-Medium, das mit 50 µg/mL Ampicillin (Sigma-Aldrich) sowie 16 µM IPTG und 32 mM X-Gal

versetzt war, plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde eine sogenannte Blau-Weiß-Selektion vorgenommen, d. h. die rekombinanten weißen Klone wurden mittels steriler Zahnstocher in 384er Mikrotiterplatten mit FB-Medium überführt, über Nacht bei 37 °C inkubiert und bei - 80 °C gelagert.

2.3.8 Insert-PCR

Die Größe der Inserts wurde mittels PCR-Amplifikation mit M13-Primern in 96er Mikrotiterplatten überprüft. Die M13-Primer hybridisieren links und rechts der Klonierungsstelle, so dass das integrierte DNA-Fragment sowie ein kurzes Stück des Vektors amplifiziert wird. Die Länge der mitamplifizierten Vektorsequenz muss hinterher von der Gesamtlänge abgezogen werden, um die Größe des Inserts zu erhalten.

Der einzelne Reaktionsansatz setzte sich bei einem Gesamtvolumen von 25 µL wie folgt zusammen: 0,25 µM ‚forward‘ und ‚reverse‘ M13-Primer, 0,2 µM dNTPs, 0,5 U *Taq*-Polymerase in 1 x Williams-Puffer.

Die Bakteriensuspensionen wurden mit einem 96er Replikationsstempel unter der sterilen Werkbank übertragen. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Gummimatte abgedeckt und die Reaktion im Thermocycler mit beheizbarem Deckel durchgeführt, um ein Verdampfen der Proben zu verhindern. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 3: Reaktionsbedingungen für die PCR-Amplifikation der Inserts

Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur
1	Denaturierung	2 Min.	95 °C
30	Denaturierung	45 Sek.	94 °C
	Hybridisierung	45 Sek.	52 °C
	Synthese	2 Min. 30 Sek.	72 °C
1	Endsynthese	10 Min.	72 °C

Die Längenbestimmung der PCR-Produkte wurde wie oben beschrieben im Gel mit 1 kb-Leiter als Standard durchgeführt.

2.3.9 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit den im Folgenden aufgeführten Modifikationen entsprechend des in Sambrook und Russell (2001) beschriebenen Protokolls zur Alkalischen Lyse. Dazu wurden die Bakterien in je 5 mL LB-Medium mit 50 µg/mL Ampicillin über Nacht bei 37 °C auf dem Inkubationsschüttler bei 180 Upm angezogen, anschließend bei 4000 Upm und 4 °C pelletiert und in 200 µL Lösung 1 resuspendiert.

Zur Lyse der Bakterien wurden 400 µL Lösung 2 zugegeben und die Suspension für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Präzipitierung der Zellbestandteile sowie der Bakterien-DNA und der denaturierten chromosomalen DNA erfolgte für mindestens 20 Min. auf Eis nach Zugabe von 300 µL eiskalter Lösung 3. Anschließend wurde eine Phenol/ Chloroform-Extraktion

vorgenommen, die Plasmid-DNA im wässrigen Überstand mit Isopropanol gefällt und in TE resuspendiert. Nach dem RNase-Verdau mit 10 µg/ml RNase A bei 37 °C für 1 Std. wurde eine Chloroform-Aufreinigung vorgenommen, die DNA mit Ethanol wieder gefällt und in H₂O_{bidest} gelöst. Die Quantifizierung der Plasmid-DNA erfolgte wie bei der genomischen DNA im Gel.

2.3.10 Sequenzierung der Insert-DNA

Die Sequenzreaktionen wurden mit dem Sequenzierungskit (*Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP*) von Amersham Biosciences unter Verwendung IRD-markierter M13-Primer durchgeführt. Um ‚forward‘- und ‚reverse‘-Sequenz in einer Reaktion zu erfassen, wurden Primer eingesetzt, die mit zwei verschiedenen Farbstoffen (IRD 700 bzw. IRD 800) markiert waren, welche unterschiedliche Absorptionsmaxima haben. Die Reaktionsansätze wurden folgendermaßen vorbereitet: Es wurde ein Voransatz bestehend aus 300 ng Plasmid-DNA, je 0,15 µM ‚forward‘ und ‚reverse‘ Primer, 23 % (v/v) DMSO in 13 µL Gesamtvolumen hergestellt. Von diesem wurden je 2 µL auf 2 µL der mitgelieferten A-/ C-/ G-/ T-Reaktionslösungen gegeben, die außer den vier Desoxynucleotiden das entsprechende Didesoxynucleotid und *Taq*-DNA-Polymerase enthielten. Die Ansätze wurden anschließend mit Mineralöl überschichtet. Die Sequenz-PCR erfolgte im Thermocycler unter den in Tabelle 4 angegebenen Reaktionsbedingungen.

Tab. 4: Reaktionsbedingungen für die Sequenz-PCR

Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur
1	Denaturierung	2 Min.	95 °C
25	Denaturierung	18 Sek.	95 °C
	Hybridisierung	18 Sek.	55 °C
	Synthese	18 Sek.	70 °C

Im Anschluss an die PCR wurde den Ansätzen 1 Vol der mitgelieferten Formamid-haltigen Stoplösung zugegeben und diese bei 70 °C für 2 Min. denaturiert. Die PCR-Produkte wurden in 6 %igen denaturierenden Polyacrylamidgelen mit Hilfe des Doppellaser-Sequenzsystems unter Verwendung von 1 x TBE als Laufpuffer über Nacht aufgetrennt und die Daten mit der zugehörigen Software *Baseimage IR* aufgezeichnet und prozessiert. Die DNA-Sequenzdaten wurden mit den Programmen *DNASIS*, Version 2.1, bzw. *BioEdit* weiter bearbeitet, in denen die Vektorsequenzen entfernt und die Güte der einzelnen Sequenzen durch paarweises Alignment von ‚forward‘- und ‚reverse‘-Sequenz kontrolliert wurde. Ein Teil der Sequenzierungen wurde von der Agova GmbH (Berlin) durchgeführt.

2.3.11 Southern-blot-Analysen

2.3.11.1 Kolonie-Southern-blots

2.3.11.1.1 Herstellung der Plasmid-Arrays

Die Bakteriensuspensionen mit den rekombinanten Plasmiden wurden aus den Mikrotiterplatten mit einem 384er Replikationsstempel auf 8 x 12 cm große Hybond-N Nylonmembranen übertragen und über Nacht auf Petri-schalen (\varnothing 14 cm) mit Ampicillin-haltigem LB-Festmedium (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bei 37 °C inkubiert. Die Freisetzung, Denaturierung und Fixierung der Plasmid-DNA erfolgte anschließend entsprechend der im Hybond-N Protokollheft von Amersham beschriebenen Anleitung für Bakterien-Kolonie-Lifts. Durch 2-stündiges „Backen“ der Membranen im Ofen bei 80 °C wurde die DNA daran fixiert.

2.3.11.1.2 Herstellung der RGA-Sonden

Mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* wurden die Inserts aus den Plasmiden ausgeschnitten. Der Verdau von 10 μg Plasmid-DNA erfolgte in 100 μL Gesamtvolumen mit 3 U *EcoRI* in dem zugehörigen Reaktionspuffer für 3 Std. bei 37 °C. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt und in 30 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ resuspendiert. Nach Auftrennung im 1,5 %igen Agarosegel wurden die Inserts auf dem UV-Tisch mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *MinElute-Kit* von Qiagen entsprechend des vom Hersteller beschriebenen Protokolls eluiert. Die Quantifizierung der Inserts wurde wie oben beschrieben im Gel durchgeführt.

Es wurden 30 - 50 ng denaturierte Insert-DNA mit 30 μCi α - ^{32}P -dCTP (Amersham Biosciences) in einem 20 μL -Reaktionsansatz aus jeweils 0,5 mM dATP, dGTP und dTTP, 1 x Hexanukleotid-Mix (Roche Diagnostics) und 2 U Klenow-Enzym für 30 Min. bei 37 °C radioaktiv markiert. Zur Entfernung der nicht eingebauten markierten Nukleotide wurde der Ansatz für 2 Min. bei 3000 Upm durch Säulen mit Sephadex G-50 (Amersham Biosciences, Uppsala, S) zentrifugiert, die nach dem in Sambrook und Russell (2001) beschriebenen Protokoll hergestellt worden sind.

Die Einbaurate der radioaktiv markierten Nukleotide wurde anschließend mit einem Handmessgerät für α -Strahlung abgeschätzt.

2.3.11.1.3 Hybridisierung

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf den Filtern wurden diese in Hybridisierungsröhren (10 Plasmid-Filter je Röhre) mit 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ denaturierter Heringsperma-DNA in 20 mL Hybridisierungspuffer für mindestens 4 Std. oder über Nacht bei 65 °C im Hybridisierungsofen vorhybridisiert. Nach Zugabe der denaturierten RGA-Sonde (5 Min. 100 °C) erfolgte die Hybridisierung für ca. 16 Std. bei 65 °C. Die Filter wurden nach der Hybridisierung mit SSC-Puffern gewaschen, und zwar zunächst zweimal für je eine halbe Stunde in den Röhren bei 65 °C mit 1 x SSC, 0,1 % SDS, danach jeweils eine halbe Stunde in einer Plastikschale im 65 °C warmen Wasserbad unter konstanter Bewegung mit 0,5 x SSC, 0,1 % SDS und 0,2 x SSC, 0,1 % SDS.

Die Exposition erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in *Kodak X-Omatic*-Kassetten auf *HyperfilmTM MP* Autoradiographie-Filmen für einen oder mehrere Tage je nach Stärke der Signale. Entwickelt und fixiert wurden die Filme mit Röntgen-Entwickler- und Fixierlösung von Kodak.

2.3.11.2 Genomische Southern-blots

2.3.11.2.1 Herstellung der Filter

Jeweils $10\text{ }\mu\text{g}$ genomischer DNA wurden mit 200 U *EcoRI* bzw. *HindIII* in dem vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer (Gesamtvolumen $300\text{ }\mu\text{L}$) über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ verdaut. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt, in $30\text{ }\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ resuspendiert und bei $2,8\text{ V/cm}$ über Nacht in einem 1 %igen Agarose-Maxigel ($20\text{ x }25\text{ cm}$) mit 1 kB-Leiter als Längenstandard aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend nacheinander für je 20 Min. in Depurinierungs-, Denaturierungs- (zweimal) und Neutralisierungslösung (zweimal) in einer Plastikschaale geschüttelt. Der Transfer auf eine Hybond-N Nylonmembran ($20\text{ x }25\text{ cm}$) erfolgte über Nacht entsprechend des in Sambrook und Russell (2001) beschriebenen Protokolls. Die DNA wurde wie bei den Plasmid-Arrays an der Membran fixiert.

2.3.11.2.2 Herstellung der Sonden

Das Verfahren zur Herstellung der RGA-Sonden für die genomischen Southern-blots war identisch zu dem für die Plasmid-Arrays. Als Längenstandard wurden 10 ng mit $10\text{ }\mu\text{Ci}$ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dCTP markierte 1 kB-Leiter eingesetzt, wobei die Markierungsreaktion analog der für die RGA-Sonden durchgeführt wurde.

2.3.11.2.3 Hybridisierung

Die Bedingungen für Vorhybridisierung und Hybridisierung waren identisch zu denen der Plasmid-Arrays, wobei jeweils ein Filter pro Röhre hybridisiert wurde. Gewaschen wurden die Filter zweimal in der Röhre bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 1 x SSC , $0,1\text{ }\%$ SDS-Puffer und einmal in einer Plastikschaale mit $0,5\text{ x SSC}$, $0,1\text{ }\%$ SDS für jeweils eine halbe Stunde. Die Exposition erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 bis 10 Tage auf *BiomaxTM MS* Filmen von Kodak in einer Kassette mit einem *Biomax Transcreen HE* Intensivierungsschirm vom selben Hersteller zur Verstärkung der Signale.

2.3.12 Lokalisierung der RGA im Rosengenom: Kartierung

2.3.12.1 Kartierungspopulationen

Für die Kartierungspopulation 94/1 ist 1999 von Debener und Mattiesch die erste genetische Kopplungskarte für Rosen mit 305 RAPD- und AFLP-Markern erstellt worden (Debener und Mattiesch 1999). Die RGA-Marker wurden zusammen mit diesen „alten“ Markern sowie 436 neuen AFLP-, SSR-, RAPD-, SCAR-, RFLP- und morphologischen Markern, die am Institut für Zierpflanzenzüchtung (IZZ) in Ahrensburg und am Plant Research

International (PRI) in Wageningen entwickelt worden sind, verrechnet. Als Basis für die RGA-Kartierung wurden 72 Einzelpflanzen aus 94/1 verwendet. Die Kartierungspopulation 97/7 bestand aus insgesamt 270 Nachkommen, von denen 170 für die Markeranalysen verwendet wurden, wobei in erster Linie Pflanzen ausgewählt wurden, die in wiederholten Inokulationstests mit Echtem Mehltau reproduzierbare und eindeutige Reaktionen - d. h. entweder starke Resistenz oder Anfälligkeit - zeigten (Linde, persönliche Mitteilung). Zusätzlich zu den RGA wurden 173 im IZZ Ahrensburg entwickelte AFLP- und morphologische Marker kartiert.

2.3.12.2 SSCP-Technik: PCR-Amplifikation

Die Kartierung der RGA erfolgte als SNP („Single Nucleotide Polymorphism“)-Marker mit der SSCP („Single-Strand Conformational Polymorphism“)-Technik (Orita et al. 1989). Dazu wurden mit dem Programm *Oligo* auf der Basis der DNA-Sequenzen spezifische Primer konstruiert (Tab. A 18). Mit genomischer DNA der Linie 88/124-46 als Template wurde im Gradienten-Thermocycler getestet, ob und bei welcher Annealing-Temperatur in PCR-Reaktionen das Produkt im erwarteten Größenbereich amplifiziert wurde. Der einzelne Reaktionsansatz setzte sich dabei folgendermaßen zusammen: 25 ng DNA, 0,1 mM dNTPs, je 0,5 µM ‚forward‘ und ‚reverse‘ Primer, 1 U *Taq*-Polymerase in 1 x Williams-Puffer (Gesamtvolumen 25 µL). Die Reaktionsbedingungen für die SSCP-PCR mit den spezifischen RGA-Primern sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tab. 5: Reaktionsbedingungen für die SSCP-PCR

Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur
1	Denaturierung	5 Min.	95 °C
35	Denaturierung	1 Min.	94 °C
	Hybridisierung	1 Min.	49 - 61 °C *
	Synthese	1 Min.	72 °C
1	Endsynthese	10 Min.	72 °C

* Bei Gradienten-PCR Annealingtemperatur mit Gradient zwischen 49 und 61 °C, um optimale Temperatur zu ermitteln.

Es zeigte sich, dass für alle Primer, die PCR-Produkte im erwarteten Größenbereich erzeugten, die optimale Annealing-Temperatur bei 58 °C lag. In einem Vortest wurden die funktionierenden Primer daraufhin an den Eltern-Genotypen und 20 Individuen der Kartierungspopulationen getestet, ob sie auf MDE-Polyacrylamidgelen Polymorphismen detektierten. Solche Primer wurden dann in dem kompletten Satz von Kartierungsgenotypen untersucht.

2.3.12.4 SSCP-Gelelektrophorese und Silberfärbung

Mit den im Folgenden aufgeführten Modifikationen wurde die Probenaufbereitung und SSCP-Gelelektrophorese wie in Slabaugh et al. (1997) beschrieben durchgeführt. Die Glasplatten, zwischen welche die 0,5 x MDE-Gelösung gegossen wurde, sind zuvor mit zwei unterschiedlichen Silanisierungsmitteln zwecks Anhaftung des Gels (Methacryloxypropyltrimethoxysilan-Lösung: hintere Platte) bzw. Erleichterung der späteren Ablösung (Dimethyldichlorosilan-Lösung: vordere Platte) behandelt worden. Die Reaktionsansätze wurden mit 1 Vol Stop-Lösung („Formamid Loading Dye“) versehen, für 3 Min. bei 94 °C denaturiert und 5 µL davon auf das Gel geladen. Die Auftrennung erfolgte über Nacht bei 4 °C mit Hilfe eines vertikalen Elektrophoresesystems mit auf 4 °C vorgekühltem 0,6 x TBE als Laufpuffer. Die Silberfärbung der Gele wurde nach dem modifizierten Protokoll von Sanguinetti et al. (1994) vorgenommen. Zur Fixierung der DNA wurden die Gele nach Ablösung der vorderen Glasplatte in einer geeigneten Plastikwanne mindestens eine halbe Stunde in 0,5 L Fixierlösung geschüttelt. Anschließend wurde das Gel zweimal für 5 Min. mit entionisiertem H₂O gewaschen bevor es 45 Min. in 0,5 L Färbelösung geschüttelt wurde. Die Entwicklung erfolgte mit 2 x 0,5 L eiskalter Entwicklungslösung, die nach ca. 5 Min. ausgetauscht wurde. Die Entwicklungsreaktion wurde durch Zugabe der Fixierlösung gestoppt, nachdem die Banden deutlich braun gefärbt waren. Das Gel wurde anschließend in entionisiertem H₂O gewaschen, für ca. 2 Std. im Ofen bei 80 °C getrocknet und zur Dokumentation mit einer Digitalkamera auf einem Lichttisch fotografiert.

2.3.12.5 Berechnung der Kopplungsgruppen

Die Berechnung der Kopplungsgruppen erfolgte mit der Kartierungssoftware *JoinMap*, Version 3 (van Oijen und Voorrips 2001) auf der Basis des zugehörigen Manuals. Die Markerdaten wurden in Microsoft Excel als 0/1-Matrix erfasst und darin entsprechend des für *JoinMap* benötigten Codes für CP („Cross Pollinated“)-Populationen, d. h. Populationen, die aus der Kreuzung heterogener, heterozygoter oder homozygoter diploider Eltern hervorgehen, umgewandelt. Der Segregationstyp wurde mit <lm> bzw. <nn> codiert in Abhängigkeit davon, in welchem Elter der Locus heterozygot vorlag, wobei ‚ll‘ und ‚nn‘ in der 0/1-Matrix ‚0‘ (keine Bande), ‚lm‘ und ‚np‘ ‚1‘ (Bande vorhanden) entsprachen. Die Kopplungsgruppen wurden getrennt für die beiden Eltern berechnet. Die getrennten Karten für die Population 97/7 wurden im Anschluss zu einer Karte integriert. Die Zuordnung der Marker zu den Gruppen erfolgte mit der Kartierungsfunktion nach Kosambi jeweils mit einem LOD-Score von 5. Die Markerabstände auf den Kopplungsgruppen wurden mit den voreingestellten Parametern berechnet, wobei im ersten Schritt ausnahmslos alle Marker in die Berechnung miteinbezogen wurden. Im nächsten Schritt wurden die Marker ausgeschlossen, die ungenügende oder zweifelhafte Kopplung mit den anderen Markern der Gruppe ergaben („low pair count“ oder „suspect linkages“), erheblich von dem erwarteten Spaltungsverhältnis abwichen oder gravierende Störungen in der Markeranordnung zur Folge hatten. Die Darstellung der Kopplungsgruppen erfolgte mit dem Programm *MapChart* (Voorrips 2002).

2.3.13 Expressionsanalysen

2.3.13.1 Makroarray-Technik

2.3.13.1.1 Herstellung des RGA-Makroarrays

Durch Insert-PCR mit RGA-Plasmiden als Template wurden die RGA-Inserts aus 96 Plasmiden für den Makroarray amplifiziert (s. Insert-PCR 2.3.8). Die Konzentration der Insert-DNA in den PCR-Lösungen wurde durch Verdünnung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf $5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ eingestellt. Insgesamt 50 ng Insert-DNA ($= 10 \mu\text{L}$) wurden je Probe in einem 1,5 %igen Agarose Maxi-Gel ($20 \times 25 \text{ cm}$) für ca. 3 Std. bei 120 V aufgetrennt. Zusätzlich im Gel aufgetrennt wurden 50 ng Actin-DNA als Positiv-Kontrolle sowie $10 \mu\text{g}$ Hering-sperma-DNA als Negativ-Kontrolle und je Reihe einmal 100 ng 1 kb-Leiter als Längen-Standard. Der Southern-Transfer der DNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran erfolgte entsprechend der oben beschriebenen Anleitung für genomische Southern-blots.

2.3.13.1.2 Herstellung der cDNA-Sonden und Hybridisierung

Die cDNA-Sonden wurden mit dem *First-Strand cDNA Synthesis*-Kit von Invitrogen entsprechend der vom Hersteller beschriebenen Anleitung aus $2 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA bzw. $0,5 \mu\text{g}$ mRNA aus Blättern bzw. Blüten der diploiden *R. multiflora* Hybride 88/124-46 synthetisiert. Statt des mitgelieferten dNTP-Mixes wurden je Reaktion $0,5 \text{ mM}$ dATP, dGTP, dTTP und $40 \mu\text{Ci}$ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dCTP zur Markierung eingesetzt. Die Aufreinigung der Sonden nach der cDNA-Synthese und die Hybridisierung erfolgte ebenso wie die Exposition analog der oben beschriebenen genomischen Southern-blot-Analysen (Vgl. 2.3.11.2).

2.3.13.2 Semiquantitative RT-PCR

Im ersten Schritt wurden die spezifischen Kartierungsprimer in Gradienten-PCR-Reaktionen mit verschiedenen RGA-Plasmiden als Template gescreent, ob sie sich zur sicheren Differenzierung der RGA eignen und damit für die Expressionsanalyse mittels RT-PCR verwendet werden konnten. Der Reaktionsmix und die Bedingungen für die PCR waren dieselben wie bei den SSCP-Analysen (Tab. 5) mit 2 ng Plasmid-DNA als Substrat und Annealing-Temperaturen von $58 - 72,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Die cDNA-Synthese wurde mit dem Invitrogen *First-Strand cDNA Synthesis*-Kit entsprechend der vom Hersteller beschriebenen Anleitung mit $1 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA durchgeführt. Es wurden 1 bis $2 \mu\text{L}$ cDNA-Lösung in die PCR eingesetzt, der Reaktionsmix war ansonsten identisch mit dem für die SSCP-Analysen.

Die Optimierung der Bedingungen für die semiquantitative PCR (Zyklenzahl, Konzentration der Ausgangssubstanzen) erfolgte in enger Anlehnung an Marone et al. (2001) und ist im Ergebnisteil näher erläutert. Die Primer zur

internen Kontrolle wurden von einem Rosen-Actin-Gen (s. Tab. A 20) abgeleitet. Jeweils 0,2 μMol wurden von den Actin-Primern neben 0,5 μM jedes RGA-spezifischen Primers in die PCR eingesetzt (s. Tab. A 19).

2.4 Bioinformatik

Die Webadressen der online frei erhältlichen Programme sowie die Verreiber der käuflichen Software sind im Anhang aufgeführt (A 6.9).

Sequenzhomologien zu den in verschiedenen Datenbanken erfassten DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem vom ‚National Center for Biotechnology Information‘ (NCBI) bereitgestellten Programm ‚Basic Logic Alignment Search Tool‘ (*BLAST*) ermittelt (Altschul et al., 1997).

Die Kalkulation der Sequenzidentitätsmatrizen und die Übersetzung der DNA- in Aminosäuresequenzen wurden mit der *BioEdit*-Software durchgeführt.

Alignments der DNA- und Proteinsequenzen wurden in *CLUSTAL_X* unter Beibehaltung der voreingestellten Parameter erstellt (Thompson et al. 1997).

Das unbewurzelte Dendrogramm der Rosen-RGA wurde auf der Basis des *CLUSTAL_X*-Alignments der Aminosäuresequenzen zwischen dem ‚P-Loop‘ und der ‚GLPL‘-Motiv mit demselben Programm nach der ‚Neighbor-Joining‘-Methode von Saitou und Nei (1987) berechnet und in *TreeView* dargestellt. Das bewurzelte Phylogramm der Rosen-RGA mit Resistenzgenen und RGA aus anderen Pflanzen wurde auf derselben Basis mit Hilfe der *PHYLIP*-Software (Felsenstein, 1989) nach der von W. Fitch (1977) entwickelten ‚Maximum-Parsimony‘-Methode entsprechend der im *PHYLIP*-Manual beschriebenen Anleitung unter Beibehaltung der voreingestellten Parameter berechnet. Die Bootstrap-Werte wurden durch 100malige Wiederholung der Stammbaum-Berechnung ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung der genomischen und exprimierten Rosen-RGA

Sechzehn Kombinationen zwölf unterschiedlicher degenerierter Primer wurden zur PCR-Amplifikation mit genomischer DNA und cDNA von Rosen verwendet (Tab. A 17). Die Primer wurden auf der Basis von drei konservierten Motiven innerhalb der NBS-Region bekannter Resistenzgene konstruiert (Abb. 6).

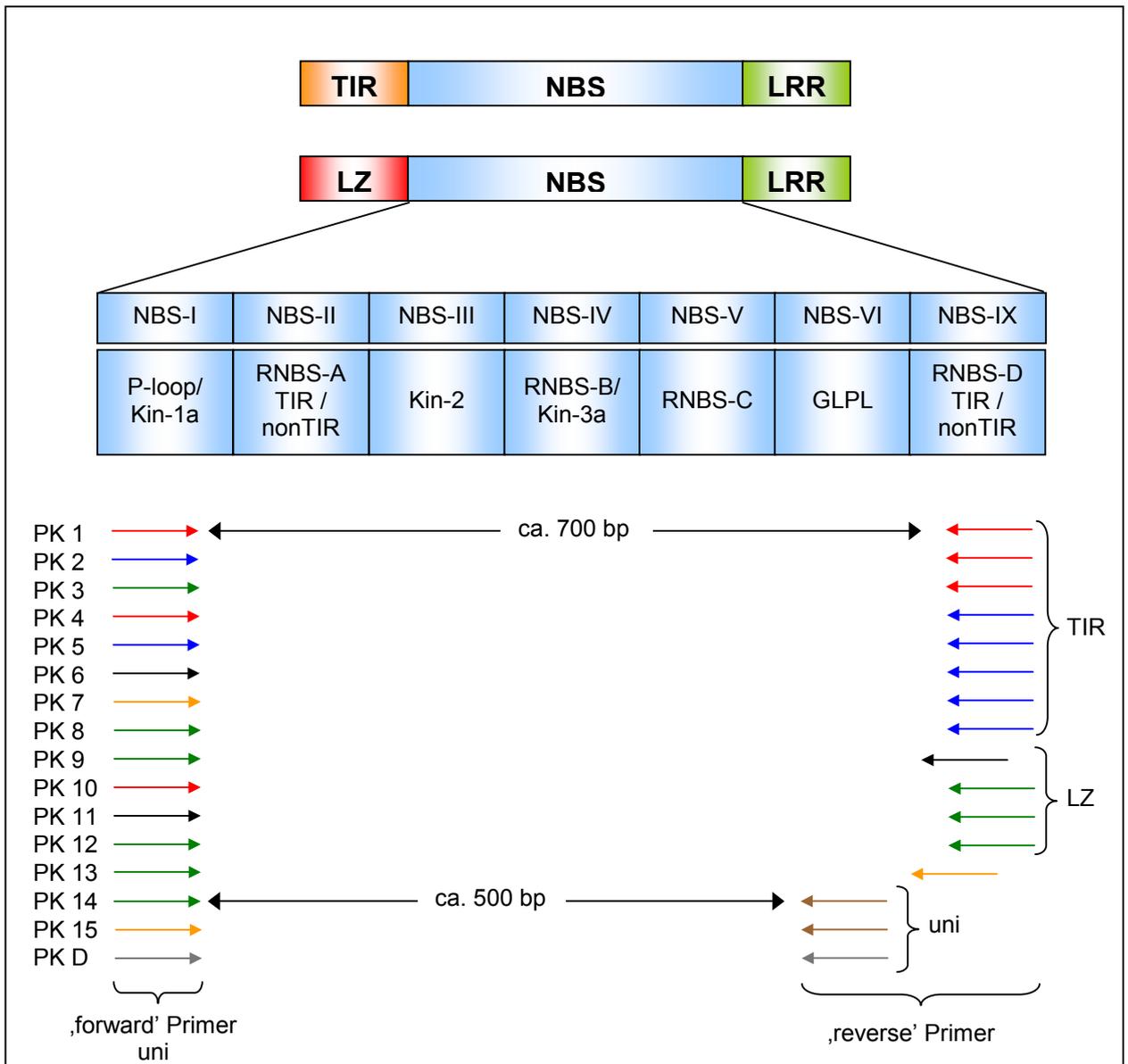


Abb. 6: Schematische Darstellung der TIR- und LZ-NBS-LRR Proteinstruktur mit den konservierten Motiven innerhalb der NBS-Region und Position der daraus entwickelten degenerierten Primer. Die farbigen Pfeile stellen die verwendeten Primer dar, gleiche Farben der 'forward' bzw. 'reverse' Primer bedeuten identische Primer. PK: Primerkombination; D: DERES-Primer; TIR: TIR-spezifische Primer; LZ: LZ-spezifische Primer; uni: gruppenunspezifische Primer.

Die Sequenz der ‚forward‘ Primer entsprach in allen Fällen der des ‚P-Loop‘-Motivs in Abschnitt NBS-I. Die ‚reverse‘ Primer wurden entweder für das gruppenunspezifische ‚GLPL‘-Motiv in NBS-VI entworfen, das sowohl in TIR- als auch in LZ-NBS-LRR Genen vorhanden ist oder für die gruppenspezifischen Motive in NBS-IX, die jeweils nur in einer der beiden Gruppen vorkommen. Es wurden also sowohl universelle Primer, die RGA beider Gruppen isolieren sollten, als auch gruppenspezifische Primer zur selektiven Amplifikation von TIR- oder LZ-RGA verwendet.

Die Nummerierung der NBS-Motive von NBS-I bis NBS-IX im oberen hellblauen Balken in Abb. 6 wurde der Veröffentlichung von Pan et al. (2000 a) entnommen, die Bezeichnungen im Balken darunter stammen von Meyers et al. (1999). Die Pfeile geben die Positionen der zur Isolierung der RGA verwendeten degenerierten ‚forward‘ und ‚reverse‘ Primer an. Die gruppenunspezifischen Motive ‚P-Loop‘ und ‚GLPL‘ liegen ca. 500 bp auseinander, zwischen ‚P-Loop‘ und den TIR-/ LZ-spezifischen ‚RNBS-D‘-Motiven liegen ca. 700 bp.

Die Ergebnisse der PCR bzw. RT-PCR Reaktionen sind in Tabelle 6 aufgelistet und in Abbildung 7 dargestellt. Elf der 16 Primerkombinationen erzeugten PCR-Produkte aus genomischer DNA im für RGA erwarteten Größenbereich von 500 bzw. 700 bp (Abb. 7 a). Mit Rosen-cDNA als Template fand lediglich bei drei Primerkombinationen eine PCR-Amplifikation statt (Abb. 7 b). Dabei war die Kontrollreaktion ohne Reverse Transkriptase in allen drei Fällen negativ, wie hier exemplarisch für die Variante mit den DERES-Primern gezeigt (Abb. 7 c), d. h. es lag keine Kontamination mit genomischer DNA vor.

Tab. 6: Ergebnisse der PCR-/ RT-PCR Reaktionen mit den degenerierten Primern

Primer-paar	RGA-Gruppe	Produktlänge [bp]	Amplifikation mit genom. Rosen-DNA	Amplifikation mit Rosen-cDNA
1	TIR	700 bp	+	-
2	TIR	700 bp	+	-
3	TIR	700 bp	+	+
4	TIR	700 bp	+	-
5	TIR	700 bp	+	-
6	TIR	700 bp	+	-
7	TIR	700 bp	-	-
8	TIR	700 bp	+	-
9	LZ	700 bp	-	-
10	LZ	700 bp	+	-
11	LZ	700 bp	+	+
12	LZ	700 bp	+	-
13	LZ	700 bp	-	-
14	universal	500 bp	-	-
15	universal	500 bp	-	-
D	universal	500 bp	+	+

(+) Amplifikation hat stattgefunden; (-) Amplifikation hat nicht stattgefunden; hinterlegt: PCR-Produkte wurden kloniert; D: DERES-Primer.

Die drei RT-PCR-Produkte der Primerkombinationen 3, 11 und DERES sowie die genomischen PCR-Produkte der Primerkombinationen 1, 3, 4, 10, 11 und 12 wurden kloniert. Je Variante wurden 2 x 384 Klone isoliert, so dass eine Bank aus nahezu 7000 Klonen entstand, die im Folgenden näher charakterisiert wurde.

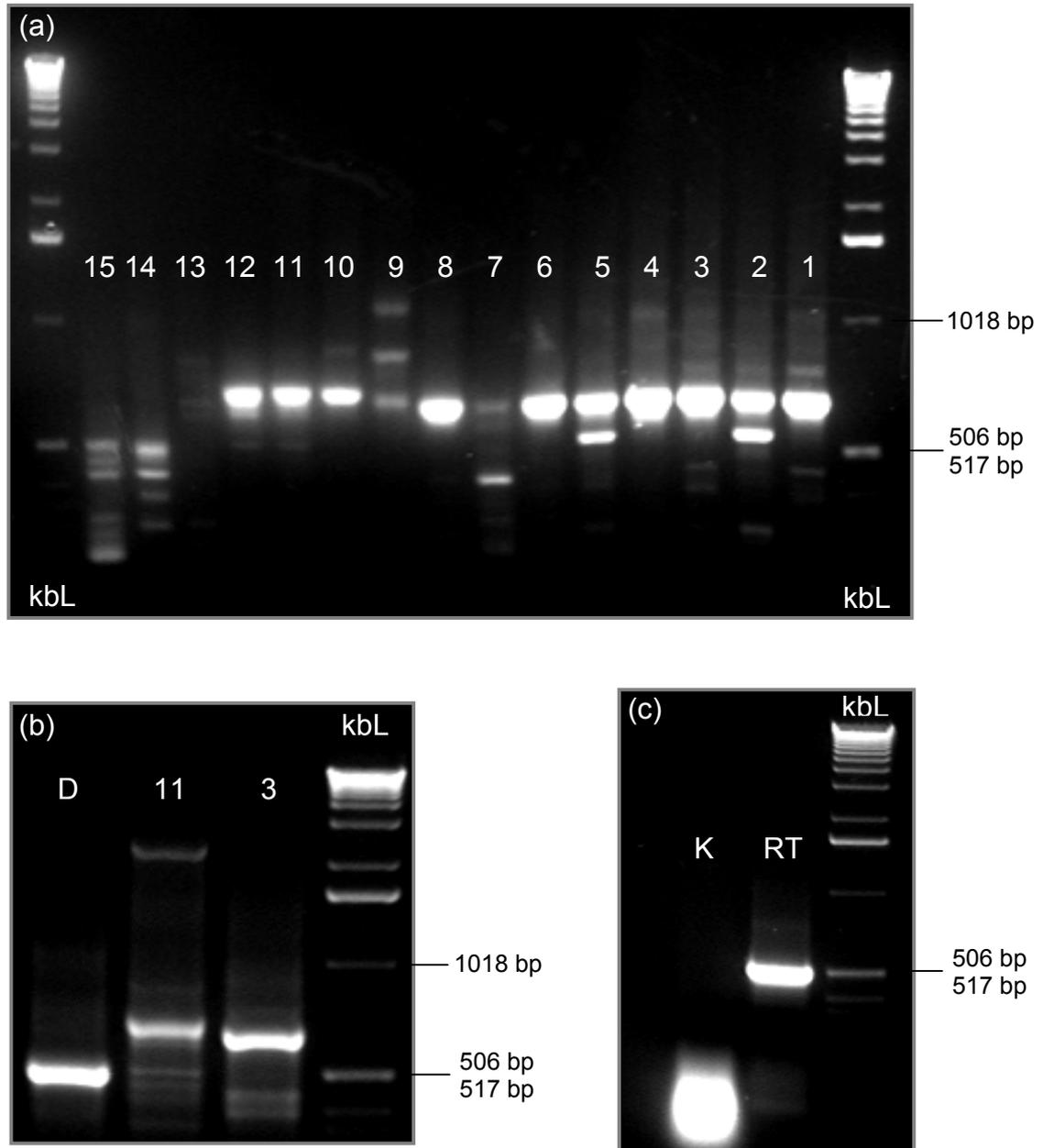


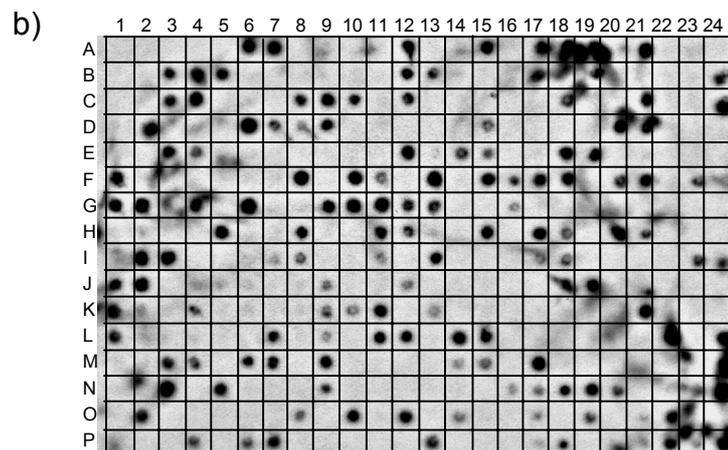
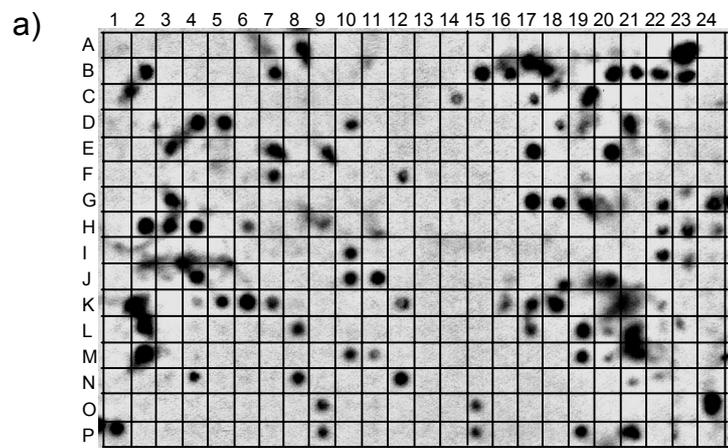
Abb. 7: Größenbestimmung der PCR-Produkte der degenerierten RGA-Primer im Agarosegel. a) PCR-Produkte der Primerkombinationen 1 - 15 mit genomischer DNA; b) Produkte der RT-PCR Reaktionen der Primerkombinationen DERES (D), 11 und 3; c) RT-PCR-Produkt der DERES-Primer (RT: Reverse Transkriptase) und Kontrolle (K) ohne Reverse Transkriptase; kbL = 1 kB-Leiter (Längenstandard).

3.2 Sequenzanalyse

Um die umfangreiche Klonbank möglichst vollständig und mit minimalem Arbeitsaufwand zu charakterisieren, wurde ein sukzessiver Prozess aus Sequenzierung und Kolonie-Hybridisierung durchgeführt. Das heißt nach jeder Sequenzierungsrunde, in der eine Auswahl der Klone sequenziert und analysiert wurde, wurden einige der identifizierten RGA als radioaktiv markierte Sonden gegen die RGA-Bank hybridisiert, um den Anteil identischer bzw. ähnlicher Klone zu ermitteln (s. Abb. 8).

In der nächsten Sequenzierungsrunde wurde dann eine Auswahl derjenigen Klone analysiert, die keine Kreuzhybridisierung mit den eingesetzten RGA-Sonden zeigten. Insgesamt erfolgten drei Sequenzierungsrunden. Die gezielte Sequenzierung von jeweils zehn Hybridisierungskandidaten ergab, dass Klone miteinander hybridisierten, sofern ihre DNA-Sequenz zu mindestens 80 % identisch war (Tab. A 20). Dieser Schwellenwert wurde für die Einteilung der RGA in Subgruppen bzw. Familien herangezogen.

Zur Abschätzung der während der PCR-Amplifikation und Sequenzreaktion entstehenden Sequenzfehler wurden dieselben Klone mehrfach wiederholt sequenziert. Die Sequenzdaten zeigten, dass Sequenzfehler von bis zu 3 % auf DNA-Ebene auftraten (Daten nicht aufgeführt), d. h. DNA-Sequenzen mit einer Übereinstimmung von 97 % oder mehr wurden als identisch angesehen.



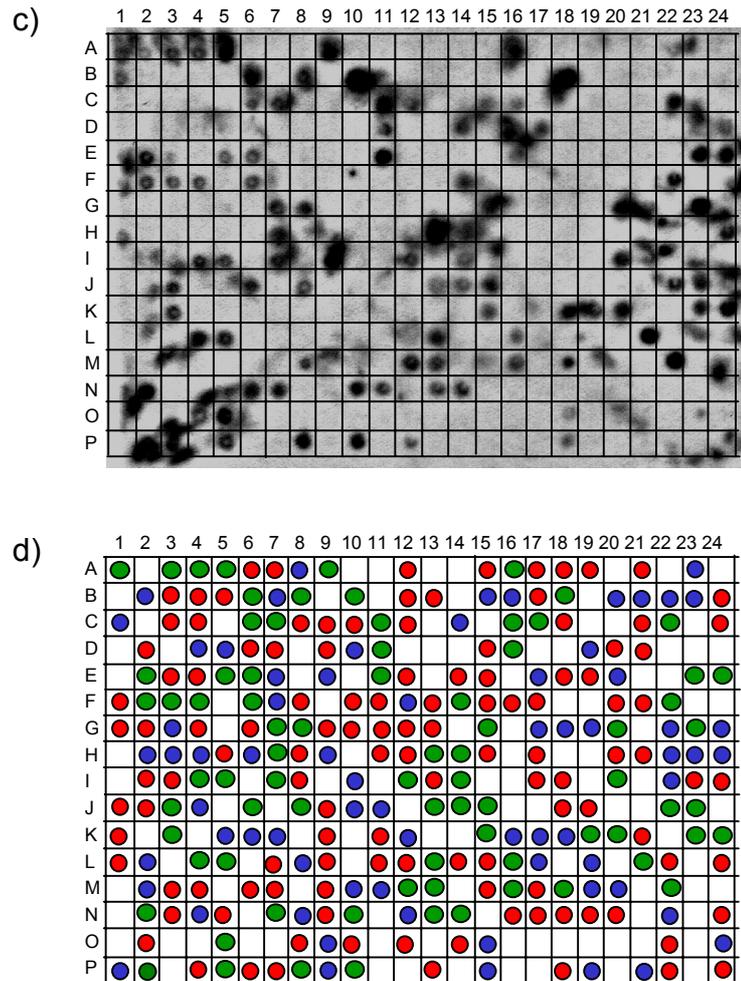


Abb. 8: Kolonie-Hybridisierungen mit drei verschiedenen RGA-Sonden gegen die Filter der mit Primerkombination 11 isolierten, genomischen Klone: a) 11a-H10 Sonde; b) 11a-G8 Sonde; c) 11a-G16 Sonde; d) zusammenfassendes Auswertungsschema (blau: 11a-H10-, rot: 11a-G8-, grün: 11a-G16-Hybridisierungssignale).

Die Ergebnisse der Sequenzierungen sind in Tabelle 7 aufgelistet und können folgendermaßen zusammengefasst werden: Es wurden insgesamt 137 Klone sequenziert, von denen 122 mit Wahrscheinlichkeitswerten bis zu $1,2 \times e^{-43}$ Homologien zu den in Datenbanken verfügbaren Sequenzen bekannter Resistenzgene und RGA aufwiesen. Von den 122 RGA enthielten 98 kein Stopcodon und konnten in ununterbrochene ‚Open Reading Frames‘ (ORFs) übersetzt werden. Diese 98 RGA wurden hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit auf DNA-Ebene analysiert. Sequenzen mit mindestens 80 % Übereinstimmung wurden als Mitglieder einer Familie bzw. Subgruppe angesehen. Nach dieser Einteilung verblieben 40 unterschiedliche RGA-Familien, von denen 27 aufgrund ihrer *BLAST*-Homologien der TIR-Gruppe zugeordnet werden konnten und 13 der LZ-Gruppe. Bis auf drei Ausnahmen sind mit den TIR-/ LZ-spezifischen Primern ausschließlich RGA der jeweiligen Gruppe isoliert worden. In der dritten Sequenzierungsrunde wurden drei mit LZ-spezifischen Primern amplifizierte RGA identifiziert, die nach ihren *BLAST*-

Homologien eindeutig der TIR-Gruppe angehörten. Die universellen DERES-Primer isolierten in erster Linie RGA der TIR-Gruppe, erst in der letzten Sequenzierungsrunde wurden fünf DERES-Klone identifiziert, die vom LZ-Typ waren.

Tab. 7: Ergebnisse der drei Sequenzierungsrunden

	Primer	Sequenzierte Klone	RGA	RGA ohne Stops	RGA Typ	Unterschiedl. RGA-Familien ¹⁾
1. Runde	Universal	11	11	9	TIR	3
	TIR-spez.	9	7	5	TIR	4
	LZ-spez.	19	18	14	LZ	4
2. Runde	Universal	5	5	3	TIR	1
	TIR-spez.	16	15	14	TIR	5
	LZ-spez.	13	10	9	LZ	1
3. Runde	Universal	13	13	10	5 TIR 5 LZ	4 TIR 2 LZ
	TIR-spez.	30	26	21	TIR	10
	LZ-spez.	21	17	13	10 LZ 3 TIR ²⁾	6 LZ
	Gesamt	137	122	98		40

¹⁾ RGA-Familien sind unterschiedlich, wenn DNA-Sequenzidentität kleiner 80 %. ²⁾ Die drei mit den eigentlich LZ-spezifischen Primern isolierten TIR-RGA waren zu über 80 % identisch mit bereits bekannten TIR-RGA und deshalb nicht neu.

3.3 Charakterisierung der RGA-Bank durch Kolonie-Hybridisierung

In Tabelle 8 a ist der prozentuale Anteil der mit den RGA-Sonden hybridisierenden Klone getrennt für die Klonvarianten angegeben. Die unterschiedlichen Klonvarianten sind in der obersten Zeile aufgeführt, ihre Bezeichnung ergibt sich aus den zur Isolierung verwendeten Primerkombinationen sowie der Art des Templates (genomische DNA = g, cDNA = e) und der Spezifität (TIR/ LZ/ uni). Die RGA-Sonden sind in der linken Spalte aufgeführt, ihre Bezeichnung setzt sich zusammen aus der zur Isolierung verwendeten Primerkombination, der zugehörigen Mikrotiterplatte (1, 2 bzw. a, b) und der Position des Klons in der 384er Mikrotiterplatte. Außerdem ist jeweils vermerkt, ob es sich um RGA der TIR- oder LZ-Gruppe handelt. Zur besseren Übersicht sind alle Felder hinterlegt, in denen der Anteil der mit der Sonde hybridisierenden Klone größer 0 ist.

In der vorletzten Spalte (∅) ist der mit den Sonden hybridisierende mittlere prozentuale Anteil bezogen auf die jeweilige NBS-LRR-Gruppe aufgeführt, also die Kopienzahl des jeweiligen RGAs innerhalb der zugehörigen Teilbank. Bei einem Anteil größer 1 %, wurden die Hybridisierungskandidaten als

Subgruppe angesehen, welche als Bezeichnung den jeweiligen RGA-Typ (TIR, LZ) und eine fortlaufende römische Ziffer erhielt (letzte Spalte). Sofern die Kopienzahl eines RGAs in der jeweiligen Teilbank einen geringeren Anteil als 1 % der Klone ausmachte, wurde dieses als Einzel-RGA angesehen.

Der mit den eingesetzten Sonden charakterisierte Gesamtanteil je Klonvariante ist in der untersten Zeile angegeben (Σ [%]).

Die Ergebnisse der Kolonie-Hybridisierungen lassen sich im Wesentlichen wie folgt zusammenfassen:

Erstens kam es in keinem Fall zur Kreuzhybridisierung von Sonden des einen NBS-LRR-Typs mit Klonen der jeweils anderen Gruppe. TIR- und LZ-RGA unterschieden sich also erheblich in ihrer DNA-Sequenz.

Zweitens waren die Abundanzen der einzelnen RGA-Familien in der Bank extrem unterschiedlich. Mehr als die Hälfte aller DERES-Klone waren zu mindestens 80 % identisch mit RGA D1-M1, während z. B. D1-B1 in nur sehr wenigen Kopien vertreten war (5 von 768 DERES-Klonen).

Drittens gab es teilweise signifikante Unterschiede in der Abundanz einzelner RGA zwischen den genomischen und exprimierten Klonen, die mit derselben Primerkombination (3 oder 11) isoliert wurden. Beispielsweise 11a-G16-ähnliche Sequenzen waren mehr als doppelt so häufig unter den exprimierten 11er Klonen vertreten wie unter den genomischen und die Kopienzahl der 3a-C2-analogen exprimierten 3er-Klone überstieg die der genomischen sogar um Faktor 3,5. Auch der umgekehrte Fall konnte beobachtet werden, wo die Kopienzahl der einzelnen RGA unter den genomischen Klonen um ein Vielfaches größer war als unter den exprimierten (z. B. bei 11a-H10).

Innerhalb der TIR-Gruppe bildeten sich teilweise RGA-Familien in Abhängigkeit der zur Isolierung verwendeten Primerpaare, so hybridisierten 3a-C2 und 3a-L5 ausschließlich mit 3er-Klonen. Daneben gab es aber auch RGA, die unabhängig der zur Isolierung verwendeten Primerkombinationen mit Mitgliedern aller Klonvarianten hybridisierten, wie beispielsweise 3a-A7. Mit den Primerkombinationen 1 und 4 isolierte RGA schienen einander in der Regel ähnlicher zu sein als den Klonen der anderen Varianten, in vier Fällen hybridisierten 1er- bzw. 4er-Sonden ausschließlich mit 1er- und 4er-Klonen, nicht jedoch mit Klonen der Varianten 3 oder DERES.

Die Hybridisierung der drei mit den eigentlich LZ-spezifischen Primern amplifizierten TIR-RGA gegen die RGA-Bank zeigte, dass es sich hierbei um Einzelfälle unter den LZ-Klonen handelte, unter den TIR-Klonen jedoch durchaus ähnliche Kandidaten zu finden waren (s. Tab. 8 a, 3. Hybridisierungsrunde: Sonde 10g1-H22).

Tab. 8 a: Ergebnisse der Kolonie-Hybridisierungen

	RGA Sonden	Klonvarianten									Ø [%]	RGA-Sg. ³⁾
		D - e ¹⁾ uni	1 - g ²⁾ TIR	3 - e ¹⁾ TIR	3 - g ²⁾ TIR	4 - g ²⁾ TIR	10 - g ²⁾ LZ	11 - e ¹⁾ LZ	11 - g ²⁾ LZ	12 - g ²⁾ LZ		
1. Hybridisierungsrunde	D1-B1 (TIR)	1,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	s ⁴⁾
	D1-M1 (TIR)	54,2	1,0	0,4	1,2	4,4	0	0	0	0	12,2	TIR-I
	3a-A7 (TIR)	4,3	5,7	8,8	11,1	3,1	0	0	0	0	6,6	TIR-II
	3a-C2 (TIR)	0	0	28,9	8,2	0	0	0	0	0	7,4	TIR-III
	3a-C8 (TIR)	0,8	0	1,4	0,3	0	0	0	0	0	0,5	s ⁴⁾
	3a-C12 (TIR)	0	15,2	18,1	11,7	0	0	0	0	0	9,0	TIR-IV
	11a-G16 (LZ)	0	0	0	0	0	33,3	58,5	24,5	47,8	41,0	LZ-I
	11a-G8 (LZ)	0	0	0	0	0	29,0	19,7	30,7	22	25,4	LZ-II
	11b-L4 (LZ)	0	0	0	0	0	0	1,0	0	0	0,2	s ⁴⁾
	11a-G11 (LZ)	0	0	0	0	0	0	2,0	0	0	0,5	s ⁴⁾
2. Hybridisierungsrunde	D1-N13 (TIR)	18,5	0,1	0,5	0	0	0	0	0	0	3,8	TIR-V
	1g2-D10 (TIR)	0	9,6	0	0	15,1	0	0	0	0	4,9	TIR-VI
	1g1-E24 (TIR)	0	8,0	0	0	19,0	0	0	0	0	5,4	TIR-VII
	3a-L5 (TIR)	0	0	4,0	1,8	0	0	0	0	0	1,2	TIR-VIII
	11a-H10 (LZ)	0	0	0	0	0	9,9	2,9	17,7	7,3	9,5	LZ-III
3. Hybridisierungsrunde	3g1-P4 (TIR)	0	0,3	0,5	1,3	0	0	0	0	0	0,4	s ⁴⁾
	3g2-O10 (TIR)	0	0,5	1,0	3,0	0	0	0	0	0	0,9	s ⁴⁾
	4g1-J11 (TIR)	0	2,9	0	0	3,4	0	0	0	0	1,3	x ⁵⁾
	4g2-K5 (TIR)	0	4,6	0	0	11,3	0	0	0	0	3,2	x ⁵⁾
	10g1-H22 (TIR)	0	1,8	0	0	6,6	0,1	0	0	0	1,7	s ⁴⁾
	D2-H13 (LZ)	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	s ⁴⁾
	D2-G11 (LZ)	1,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3	s ⁴⁾
Σ [%]	81,4	49,7	63,6	38,6	62,9	72,3	84,1	73,1	77,1			

¹⁾ e: exprimiert; ²⁾ g: genomisch; ³⁾ Sg.: Subgruppe; ⁴⁾ s: Einzel-RGA; ⁵⁾ x: nicht sequenziert

Die DERES-Klone nahmen eine Art Sonderstellung ein, da sie bis auf wenige Ausnahmen in erster Linie mit Klonen der eigenen Variante hybridisierten und nur mit einem geringen Prozentsatz der anderen Klone. Die mit den DERES-Primern isolierten LZ-RGA hybridisierten ausschließlich mit Mitgliedern der DERES-Variante und nicht mit den anderen LZ-Sequenzen, sie stellen also neue Kandidaten unter den LZ-RGA dar (s. Tab. 8 a, 3. Hybridisierungsrunde: Sonden D2-H13, D2-G11). Die DERES-Klone wurden bei der Berechnung des insgesamt charakterisierten Anteils der TIR- bzw. LZ-Teilbank ausgeschlossen, da sie sich in den Kolonie-Hybridisierungen deutlich von den TIR- und LZ-Klonen unterschieden. Sie bildeten sozusagen eine gesonderte Teilbank.

Mit den drei Runden Kolonie-Hybridisierung konnte die RGA-Bank zu 67 % charakterisiert werden. In Tabelle 8 b ist der mit den verschiedenen Sonden charakterisierte mittlere prozentuale Anteil der RGA-Teilbanken angegeben. Die Diversität war innerhalb der TIR-Gruppe deutlich höher als innerhalb der LZ-Gruppe. So wurden mit drei LZ-RGA-Sonden 76 % der LZ-Teilbank charakterisiert, wohingegen bei den TIR-RGA (ausgenommen der DERES-Variante) mit zwölf verschiedenen Sonden (ohne DERES-RGA-Sonden) im Mittel nur knapp 54 % aller TIR-Klone detektiert wurden.

Tab. 8 b: Charakterisierter Anteil der RGA-Bank

	TIR-Teilbank					LZ-Teilbank			
	D-e uni	1-g TIR	3-e TIR	3-g TIR	4-g TIR	10-g LZ	11-e LZ	11-g LZ	12-g LZ
Charakterisierter Anteil je Variante [%]	81,4	49,7	63,6	38,6	62,9	72,3	84,1 81,3*	73,1	77,1
Mittlerer charakterisierter Anteil je Teilbank (TIR/ LZ)	53,7 %					76,7 % 75,9 %*			

* ohne Einzel-RGA 11a-G11, 11b-L4

3.4 Phylogenie

Die durch Sequenzierung und Kolonie-Hybridisierung identifizierten 40 unterschiedlichen RGA-Familien wurden auf der Basis ihrer DNA- bzw. der abgeleiteten Aminosäure (AS)-Sequenzen genauer analysiert. Das AS-Sequenz-Alignment zeigte, dass neben den als Primerbindungsstellen verwendeten Motiven in allen RGA-Sequenzen zwei bis drei zusätzliche konservierte Domänen enthalten waren, die auch in anderen NBS-LRR Resistenzgenen zu finden sind (Abb. 9).

Mehr als die Hälfte der TIR-RGA enthalten am Ende des Kinase 2-Motivs eine Asparaginsäure (D), alle Mitglieder der LZ-Gruppe tragen an dieser Position einen Tryptophan-Rest (W) (Abb. 9).

	NBS-I	NBS-III	NBS-IV	NBS-VI	NBS-IX	
	P-loop	Kinase 2	Kinase 3a	GLPLAL		
<u>RGA</u>
	5	80	105	170	230	
3g1-M19	~~~~~K	VLLVLDDVD~	~GSRIITTR	~GLPLALR~	~~~~~	~
1g2-D10	~~~~~K	VLLVLDDVE~	~GSRIIVTTR	~GLPLALK~	~~~~~	~
4g2-I14	~~~~~K	ILVVLDDVS~	~GSRVIVTTR	~GLPLALK~	~~~~~	~
1g2-C6	~~~~~K	VLVIVDNVD~	~GGIIITTR	~GLPLALE~	~~~~~	~
3a-C8	~~~~~K	VLIILDDVD~	~GSRIITTR	~GLPLAIK~	~~~~~	~
3g2-O10	~~~~~K	VLLVLDDVD~	~GSKIIITTR	~GLPLALK~	~~~~~	~
3a-C12	~~~~~R	VLLVIDDVD~	~GSRIITTR	~GLPLALK~	~~~~~	~
1g2-J13	~~~~~K	VLIVLDDVN~	~GSKIIITTR	~GIPLALQ~	~~~~~	~
3a-C2	~~~~~R	VLVVLDDVD~	~GSRIITTR	~GLPLALE~	~~~~~	~
1g2-M14	~~~~~R	ILLIILDDVN~	~GSRIITTR	~GLPLALV~	~~~~~	~
3g1-E4	~~~~~R	ILLIILDDVN~	~GSRIITTR	~GLPLALI~	~~~~~	~
4g1-J7	~~~~~R	VLLVLDDVN~	~GSRVITTR	~GLPLALV~	~~~~~	~
1g1-E24	~~~~~R	VLLVLDDVN~	~GSRIITTK	~GLPLAVN~	~~~~~	~
D2-D14	~~~~~K	VLIVLDDVN~	~GSIVITTR	~GLPLAL~	~~~~~	~
D2-K16	~~~~~R	VLLALDDVS~	~GSKIIITTR	~GLPLAL~	~~~~~	~
D1-P13	~~~~~R	VLIILDDVD~	~GSRVITTR	~GLPLAL~	~~~~~	~
D1-B1	~~~~~R	VLIILDNVN~	~GSRILITTR	~~~~~	~~~~~	~
3g2-E4	~~~~~R	VLLVLDDVD~	~RSRIITTR	~GIPLALE~	~~~~~	~
D1-D1	~~~~~K	VLLIILDDVS~	~GSRIVITTR	~~~~~	~~~~~	~
D1-M1	~~~~~M	VLIILDDVD~	~GSRIITTSR	~~~~~	~~~~~	~
D1-N13	~~~~~K	VLLVLDDVD~	~GSRIITTR	~~~~~	~~~~~	~
3a-A7	~~~~~K	VLLIILDDVN~	~GSRVITTR	~GLPLALT~	~~~~~	~
3g2-K19	~~~~~K	VFLIILDDVD~	~GSRIITTR	~GLLLAFK~	~~~~~	~
3g2-N10	~~~~~K	VLVVIDDVD~	~GSRIITTT	~GLPLALV~	~~~~~	~
3g2-I18	~~~~~R	VLVVIDDVD~	~GSRIITTT	~RLPLALQ~	~~~~~	~
N	GGVGKTT~K	VLIVLDDID~	~GSRIITTR	~GLPLALK~	~FLDIACFL~	~
D1-C14	~~~~~K	VLIVLDDVD~	~GSRILITTR	~GLPLAL~	~~~~~	~
3b-L16	~~~~~K	VLVVLDDVN~	~GSRIITTR	~GIPLALK~	~~~~~	~
M	GGIGKTT~K	ILVVLDDVD~	~GTRFLITSR	~GLPLTLK~	~FLDIACFF~	~
10g1-F8	~~~~~K	FVFLDDLW~	~SKVLFVTTTR	~GLPLALI~	~~~~~	~
12g2-E8	~~~~~K	FVLLDDVW~	~KCKVIFTTR	~GLPLALI~	~~~~~	~
D1-K15	~~~~~R	MLIILDDIW~	~GSKVILTTR	~GLPLAL~	~~~~~	~
11g1-I16	~~~~~T	FLFILDDVW~	~GCSVIVASR	~GLPLLI~	~~~~~	~
D1-H6	~~~~~R	YMIVLDDVW~	~GSRIMLTTR	~GFPLAL~	~~~~~	~
RPM1	GGSGKTT~R	YIVVLDDVW~	~GSRVMMTTR	~GLPLAIA~	~CFLYCSLFP V~	
11a-H10	~~~~~K	YLVVLDDVW~	~GSRIVLTTR	~GLPLAIV~	~~~~~	~
12g2-C8	~~~~~K	YLLVLDDVW~	~GSKILVTTR	~GAPLAVR~	~~~~~	~
12g1-G10	~~~~~R	YLLVLDDVW~	~GSKIVVTTR	~GVPLAIR~	~~~~~	~
Xa1	GGIGKTT~R	FLFILDDIW~	~GNIIIVTTR	~GSPLAAK~	~CFSYCALFP E~	
12g1-K16	~~~~~K	FLLVLDDVW~	~GSRILVTTR	~GLPLAAK~	~~~~~	~
11a-G16	~~~~~K	LLLVLDDVW~	~GSSILVTTR	~GLPLAAK~	~~~~~	~
11a-G8	~~~~~K	FLIIVLDDVW~	~GSIILXTTR	~GLPLAAR~	~~~~~	~
11b-L4	~~~~~K	FLFVLDDVW~	~GSKIVTTR	~GLPLAAK~	~~~~~	~
11a-G11	~~~~~R	YVLIILDDVW~	~GSNIITTR	~GVPLVAK~	~~~~~	~

TIR-RGA

LZ-RGA

Abb. 9: Konservierte Motive innerhalb der NBS-Region im AS-Sequenz-Alignment der unterschiedlichen RGA-Familien mit den Resistenzgenen *N*, *M*, *RPM1* und *Xa1*. Die für die Primerkonstruktion verwendeten Motive sind nicht mit aufgeführt.

Trotz der gemeinsamen Motive waren die Rosen-RGA zum Teil hoch divers, wie aus der Identitätsmatrix deutlich wird (Tab. A 21). In Tabelle 9 a ist die prozentuale Identität der Aminosäure (AS)-Sequenzen zwischen dem ‚Kinase 2‘- und dem ‚GLPL‘-Motiv einschließlich dieser Domänen zusammenfassend aufgeführt. Die beiden unterschiedlichsten RGA innerhalb der TIR-Gruppe waren zu 29 % identisch, die beiden ähnlichsten zu 68 %. Die durchschnittliche Sequenzübereinstimmung innerhalb dieser Gruppe betrug ca. 40 %. Innerhalb der LZ-Gruppe war eine größere Distanz zu beobachten mit 17 % als niedrigstem und 53 % als höchstem Wert für die Sequenzidentität. Im Mittel waren die verschiedenen LZ-RGA zu 24 % identisch. Die AS-Sequenzidentität zwischen RGA der verschiedenen NBS-Gruppen betrug im Mittel 21,6 % mit Werten von 14 % bis 29 %. Somit war die Sequenzidentität innerhalb der LZ-Gruppe nur um 2,4 % höher als zwischen den beiden Gruppen.

Tab. 9 a: Prozentuale Aminosäuresequenz-Identität der unterschiedlichen Rosen-RGA

	Minimum	Maximum	Mittel
TIR	29 %	68 %	40,3 %
LZ	17 %	53 %	24 %
TIR/ LZ	14 %	29 %	21,6 %

In Tabelle 9 b ist die prozentuale Aminosäure-Sequenzidentität der Rosen-RGA mit den NBS-LRR-Resistenzgenen *N*, *M*, *RPM1* und *Xa1* angegeben. Die TIR-RGA waren durchschnittlich zu 42,3 bzw. 31,6 % mit den TIR-NBS-LRR-Genen *N* bzw. *M* identisch, während die Rosen-LZ-RGA weniger als 22 % Sequenzhomologie mit diesen aufwiesen. Die Resistenzgene der Nicht-TIR-Klasse zeigten eine Sequenzübereinstimmung von ca. 27 % mit den Rosen-LZ-RGA, mit den Rosen-TIR-RGA betrug die Identität 19 % für *Xa1* und 23 % für *RPM1*.

Tab. 9 b: Prozentuale AS-Sequenzidentität der Rosen-RGA mit klonierten Resistenzgenen (RG) der NBS-LRR-Klasse

RG	TIR-RGA (%)	LZ-RGA (%)
<i>N</i>	34 - 48	17 - 28
	Ø 42,3	Ø 21,8
<i>M</i>	26 - 36	16 - 27
	Ø 31,6	Ø 21,4
<i>Xa1</i>	13 - 23	19 - 35
	Ø 18,9	Ø 27,1
<i>RPM1</i>	21 - 26	20 - 48
	Ø 22,8	Ø 27,4

In Abbildung 10 sind die phylogenetischen Beziehungen der Rosen-RGA zusammen mit vier NBS-LRR Resistenzgenen im unbewurzelten Dendrogramm dargestellt, welches auf der Basis des Alignments der DNA-Sequenzen zwischen ‚P-Loop‘ und ‚GLPL‘ -Motiv (ca. 160 Aminosäuren) erstellt wurde. Das Dendrogramm zeigt die eindeutige phylogenetische Trennung der TIR- und LZ-RGA, deren Gruppenzugehörigkeit durch *BLAST*-Analysen überprüft wurde. Der TIR-Teilbaum umfasst mehr unterschiedliche Mitglieder und weist gegenüber dem LZ-Teilbaum kürzere Astlängen und stärkere Verzweigung auf.

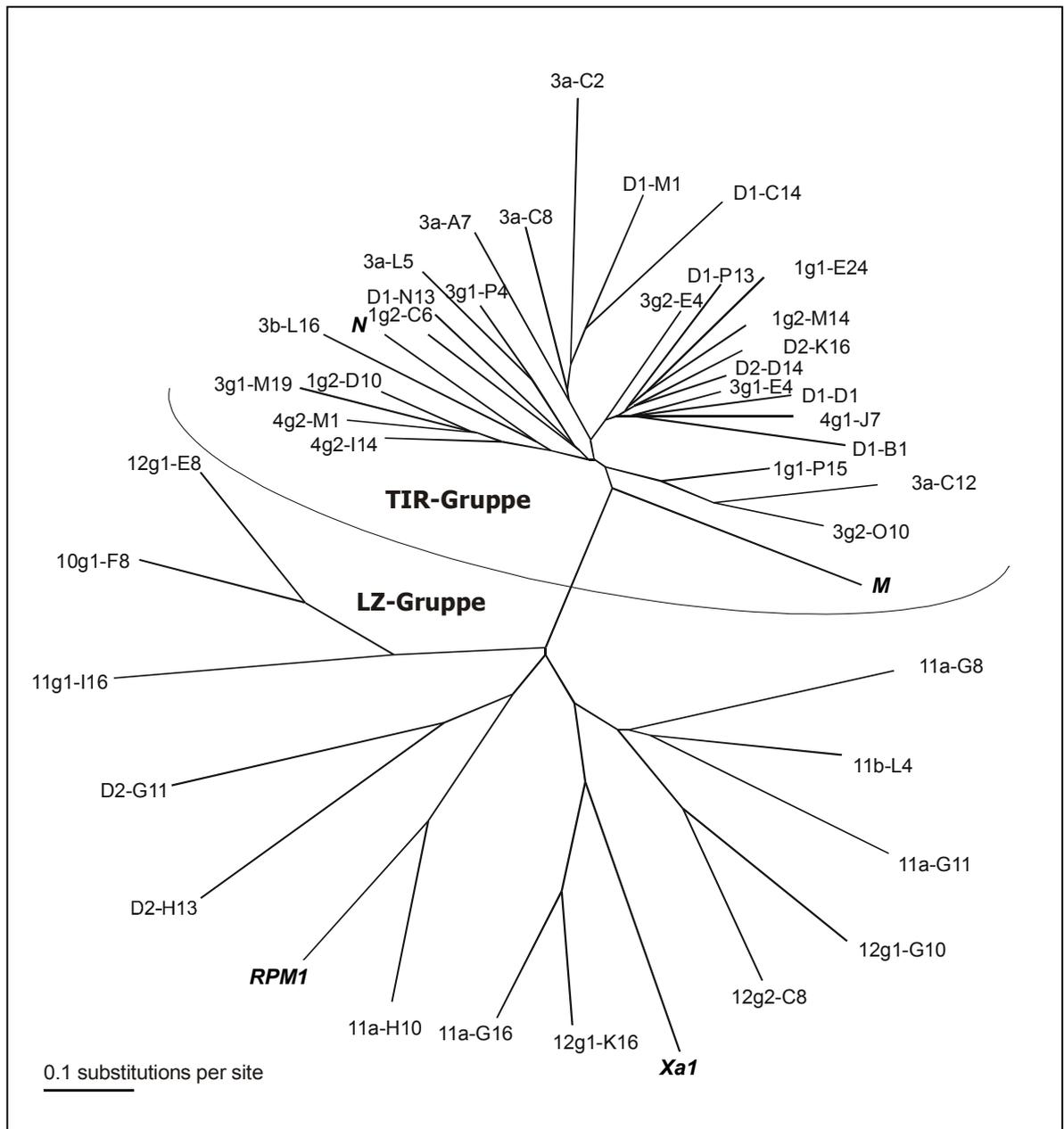
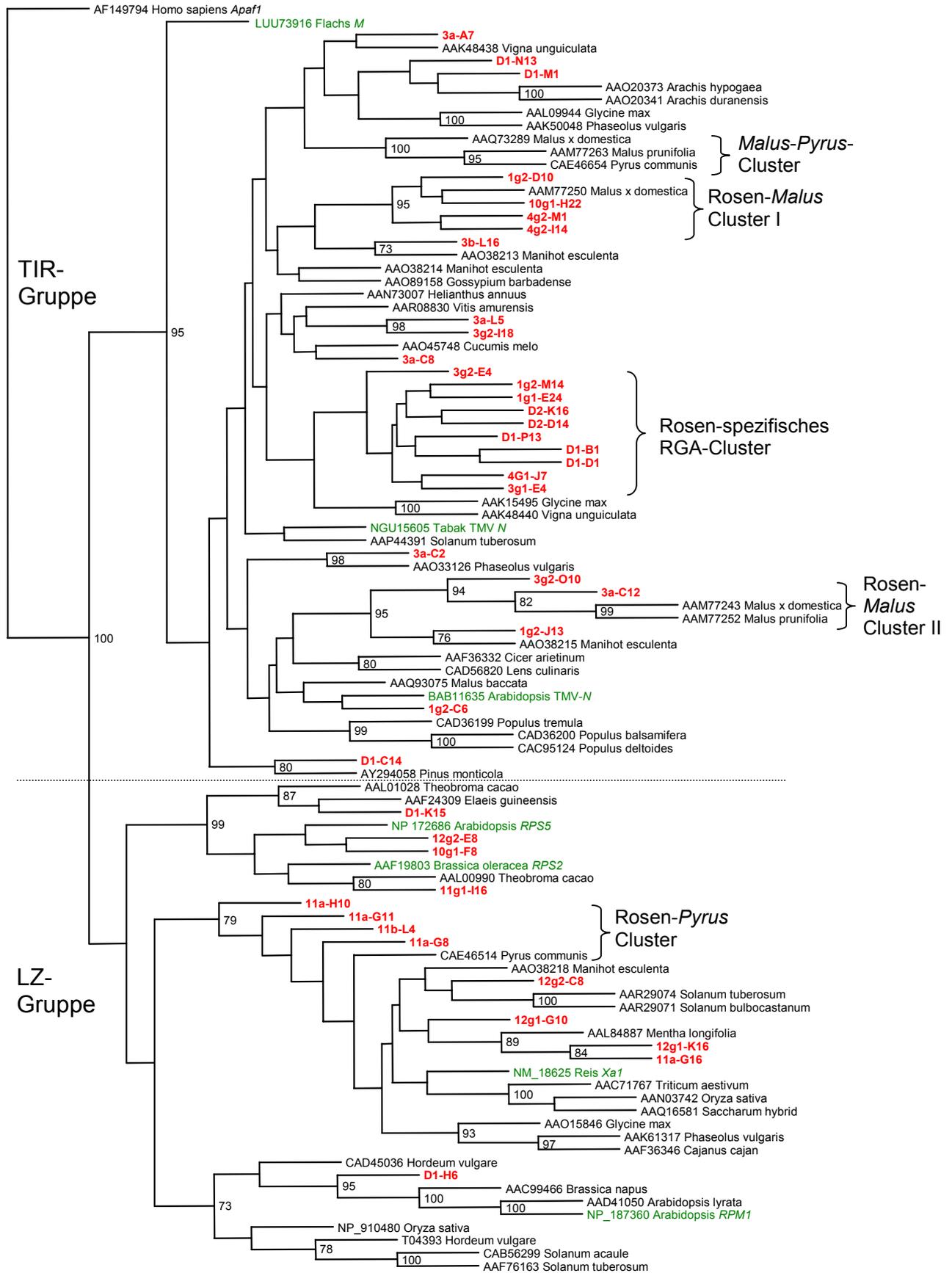


Abb. 10: Unbewurzeltes ‚Neighbor-Joining‘-Dendrogramm der verschiedenen Rosen-RGA mit den NBS-LRR Resistenzgenen *N*, *M*, *RPM1*, *Xa1*.



_10

Abb. 11: ‚Maximum-Parsimony‘-Phylogramm der Rosen-RGA (rot) mit ausgewählten Resistenzgenen (grün) und RGA aus anderen Pflanzen. Nur die Bootstrap-Werte > 70% sind angegeben. Der Maßstab unten links gibt als relatives Distanzmaß die Entfernung zwischen den Sequenzen an.

Die phylogenetischen Beziehungen zwischen Rosen-RGA und ausgewählten Resistenzgenen und RGA aus anderen Pflanzen, die in Internet-Datenbanken verfügbar sind, wurden auf der Basis der Aminosäuresequenz zwischen ‚P-Loop‘ und ‚GLPL‘ -Motiv untersucht und im Phylogramm (Abb. 11) dargestellt. Als Outgroup diente dabei die NBS-Region des menschlichen Regulator-Gens *Apaf1*, welches beim Zelltod eine wichtige Rolle spielt (Li et al. 1997). Analog zu Lopez et al. (2003) und Meyers et al. (1999) wurden im Phylogramm nur die Bootstrap-Werte > 70 % angegeben, da die Werte darunter keine sichere Aussage ermöglichen.

Das Phylogramm zeigte die zu 100 % gesicherte Trennung der NBS-LRR-RGA in zwei Hauptgruppen, wobei die RGA der größeren Gruppe nach *BLAST*-Analyse ausnahmslos vom TIR-Typ waren und die der kleineren vom LZ-Typ. Die kleinere Gruppe umfasste RGA aus mono- und dikotylen Pflanzen, die größere jedoch ausschließlich aus dikotylen. Das *M*-Gen aus Flachs zeigte mit 95 %iger Absicherung eine eindeutige Abgrenzung von allen anderen TIR-RGA (Abb. 11).

In beiden Hauptgruppen gab es Rosen-RGA, die mit hoher Absicherung näher mit RGA aus anderen Pflanzen (*Manihot esculenta*, *Phaseolus vulgaris*, *Malus x domestica*, *Theobroma cacao*, *Mentha longifolia*) verwandt waren als mit den anderen Rosen-RGA. Zum Teil traten die Rosen-RGA in Clustern zusammen mit RGA aus *Pyrus* und *Malus* auf, die ebenfalls zu der Familie der *Rosaceae* gehören. Innerhalb der TIR-Gruppe zeigte ein Rosen-RGA eine enge verwandtschaftliche Beziehung zu einem RGA aus einer *Pinus*-Art.

Daneben fiel innerhalb der TIR-Gruppe ein homogenes Cluster aus zehn Mitgliedern auf, welches ausschließlich aus Rosen-RGA bestand.

3.5 Kopienzahl der RGA im Genom

Ein wichtiger Aspekt bei der molekulargenetischen Charakterisierung von RGA ist deren genomische Komplexität, gemessen an der Kopienzahl im Genom. Diese wurde für ausgewählte RGA-Loci durch genomische Southern-blot-Analysen in drei bzw. vier verschiedenen Rosen-Genotypen und *Prunus cerasus* untersucht. Die *Prunus*-DNA war bei der Filterherstellung der begrenzende Faktor, weshalb einige RGA alternativ in einer zusätzlichen *R. multiflora*-Hybride eines anderen Genotyps analysiert wurden. Um die Genauigkeit der Abschätzung der Kopienzahl zu erhöhen, wurde die DNA jedes Genotyps mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen (*EcoRI* und *HindIII*) verdaut.

In Tabelle 10 ist die Anzahl der Hybridisierungssignale je Genotyp für die beiden Enzyme getrennt und das Mittel beider Werte aufgeführt. In den vier analysierten Rosen-Genotypen erzeugten die RGA-Sonden unterschiedlich viele Hybridisierungssignale in einem Größenbereich zwischen 0,5 und 12 kb. Die durchschnittliche Anzahl der Hybridisierungssignale in den Rosengentypen wurde als Maß verwendet für die Einteilung der RGA in Komplexitätskategorien. Unter Verwendung dieses Maßstabes waren vier der 14 untersuchten RGA-Loci ‚singlecopy‘ (1 - 2 Kopien; s. Abb. 12 b), zwei ‚lowcopy‘ (3 - 5 Kopien) und sieben ‚multicopy‘ (> 5 Kopien; s. Abb. 12 a). Ein RGA (11a-G11) konnte keiner allgemeingültigen Kategorie zugeordnet werden, da er in *R. rugosa* als ‚singlecopy‘ und in den beiden *R. multiflora*-Genotypen als ‚lowcopy‘ Locus vorlag, während in *R. roxburghii* kein Signal zu beobachten war. Keine Sonde hybridisierte mit *P. cerasus*-DNA.

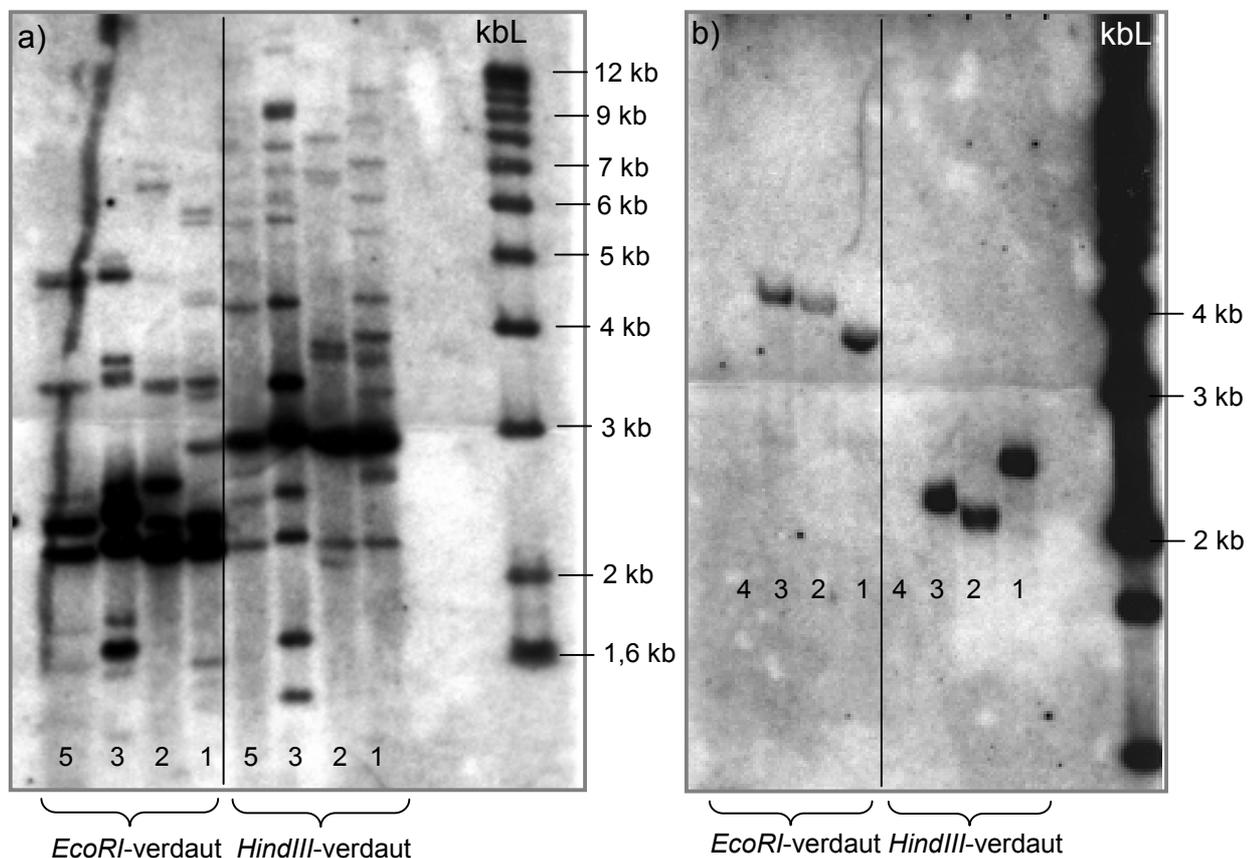


Abb. 12: Southern-blot-Analysen des ‚multicopy‘ Locus D1-F1 (Subgruppe TIR-I) (a) und des ‚singlecopy‘ Locus D1-B1 (b). 1: *R. rugosa*; 2: *R. roxburghii*; 3: *R. multiflora*-Hybride 88/124-46; 4: *Prunus cerasus*; 5: *R. multiflora*-Hybride 82/78-1; kbL: 1 kb-Leiter (Längensstandard).

Tab. 10: Ergebnisse der genomischen Southern-blot-Analysen

RGA-Locus	Subgruppe ¹⁾	Anzahl der Hybridisierungssignale					Ø Kopienzahl ⁴⁾	Komplexität
		<i>R. rugosa</i>	<i>R. roxburghii</i>	<i>R. multiflora</i> 88	<i>R. multiflora</i> 82	<i>Prunus cerasus</i>		
D1-B1 (TIR)	s	1 / 1 ²⁾ 1 ³⁾	1 / 1 1	1 / 1 1	- -	0 / 0 0	1	‚single-copy‘
D1-F1 (TIR)	TIR-I	11 / 11 11	8 / 6 7	13 / 10 11,5	11 / 8 9,5	- -	9	‚multi-copy‘
D1-D13 (TIR)	TIR-I	5 / 12 8,5	4 / 7 5,5	9 / 7 8	- -	0 / 0 0	7	‚multi-copy‘
D1-N13 (TIR)	TIR-V	2 / 1 1,5	3 / 2 2,5	3 / 2 2,5	2 / 2 2	- -	2	‚single-copy‘
3a-A7 (TIR)	TIR-II	17 / 17 17	10 / 10 10	11 / 16 13,5	- -	0 / 0 0	14	‚multi-copy‘
3a-C2 (TIR)	TIR-III	0 / 2 1	0 / 1 0,5	0 / 2 1	1 / 2 1,5	- -	1	‚single-copy‘
3a-C8 (TIR)	s	4 / 3 3,5	3 / 3 3	7 / 3 5	6 / 5 5,5	- -	4	‚low-copy‘
3a-C12 (TIR)	TIR-IV	9 / 12 10,5	6 / 7 6,5	12 / 13 12,5	- -	0 / 0 0	10	‚multi-copy‘
3a-L5 (TIR)	TIR-VIII	10 / 17 13,5	5 / 12 8,5	11 / 17 14	- -	0 / 0 0	15	‚multi-copy‘
11a-G8 (LZ)	LZ-II	11 / 10 10,5	4 / 4 4	11 / 9 10	- -	0 / 0 0	8	‚multi-copy‘
11a-G16 (LZ)	LZ-I	1 / 2 1,5	1 / 1 1	1 / 3 2	- -	0 / 0 0	2	‚single-copy‘
11a-G11 (LZ)	s	1 / 1 1	0 / 0 0	5 / 5 5	3 / 3 3	- -	3	‚single-/lowcopy‘
11a-H10 (LZ)	LZ-III	6 / 7 6,5	3 / 6 4,5	6 / 7 6,5	- -	0 / 0 0	6	‚multi-copy‘
11b-L4 (LZ)	s	5 / 2 3,5	3 / 2 2,5	8 / 2 5	8 / 4 6	- -	4	‚low-copy‘

¹⁾ Subgruppen-Bezeichnung analog Tab. 8 a; ²⁾ obere Zeile: *EcoRI*-verdaute DNA / *HindIII*-verdaute DNA, ³⁾ untere Zeile: Mittelwert; ⁴⁾ durchschnittliche Anzahl der Hybridisierungssignale in den Rosen-Genotypen als Maß für die Einteilung der RGA-Loci in Komplexitätskategorien (1 - 2: ‚singlecopy‘, 3 - 5: ‚lowcopy‘, > 5: ‚multicopy‘).

3.6 Abundanz in der RGA-Bank und Kopienzahl im Rosengenom

Um die Beziehung zwischen der Kopienzahl der RGA in der Klonbank (Größe der RGA-Familien) und im Genom (genomische Komplexität) zu ermitteln, wurden die Ergebnisse der RGA-Bank-Charakterisierung und die der genomischen Southern-blot-Analysen miteinander verglichen. Dabei sollte geklärt werden, ob beide positiv miteinander korreliert sind, d. h. ob komplexe RGA-Loci mit vielen Kopien im Genom auch in der Bank große Multigenfamilien repräsentierten und genomische ‚singlecopy‘ Loci kleine Familien oder sogar Einzelgene.

Die hinsichtlich ihrer Kopienzahl in der RGA-Bank und im Rosengenom analysierten RGA sind im unbewurzelten Dendrogramm (Abb. 13) farblich unterschiedlich markiert (s. Legenden Abb. 13). Sofern die RGA einer Subgruppe zugeordnet worden sind (s. Tab. 8 a), ist die Subgruppennummer daneben angegeben. Zur besseren Übersicht sind diejenigen RGA, deren Abundanz in der Rosen-RGA-Bank nicht untersucht wurde, nicht mit aufgeführt. Als Maß für die Einteilung der RGA in unterschiedliche Abundanzkategorien entsprechend ihrer Häufigkeit in der Bank diente der mit der jeweiligen Sonde hybridisierende mittlere prozentuale Anteil bezogen auf die zugehörige NBS-LRR-Gruppe (TIR oder LZ), der in der vorletzten Spalte von Tabelle 8 a angegeben ist. Folgende Schwellenwerte wurden dabei für die Einteilung der RGA angewendet:

Abundanz*	Kategorie
< 1 %	gering
1 - 9 %	mittel
9 - 15 %	hoch
> 15 %	sehr hoch

* in der RGA-Bank innerhalb der jeweiligen NBS-LRR-Gruppe

Als Maß für die Einteilung der RGA-Loci in Komplexitätskategorien diente die in den genomischen Southern-blot-Analysen ermittelte durchschnittliche Anzahl der Hybridisierungssignale in den Rosen-Genotypen (vorletzte Spalte Tab. 10) mit folgenden Schwellenwerten:

Kopienzahl*	Komplexität
1 - 2	‚singlecopy‘
3 - 5	‚lowcopy‘
> 5	‚multicopy‘

* im Genom

Aus Abbildung 13 wird deutlich, dass die Komplexität der Loci im Rosen-genom und die Abundanz der RGA in der Klonbank nicht miteinander korrelieren. So lagen große RGA-Familien mit mittlerer oder hoher Abundanz in der Bank im Genom durchaus als ‚singlecopy‘ Loci vor (Beispiel: 3a-C2, 11a-G16) und ebenso gab es RGA, die eine geringe Abundanz in der Bank hatten, aber als genomische ‚multicopy‘ Loci identifiziert wurden (3a-L5, 3a-A7, 3a-C12). Daneben waren aber auch Fälle zu beobachten, in denen sich Abundanz und Komplexität entsprachen, z. B. der ‚singlecopy‘ Locus D1-B1, der nur in sehr wenigen Kopien in der Bank vertreten war oder der ‚multicopy‘ Locus 11a-G8, der eine sehr hohe Abundanz in der LZ-RGA-Teilbank hatte. Das unbewurzelte Dendrogramm stellt die Ergebnisse der Kolonie-Hybridisierungen bildlich dar: Die LZ-Gruppe bestand im Wesentlichen aus drei unterschiedlichen RGA-Subgruppen mit mittlerer bis hoher Abundanz ($> 9\%$) und einer Reihe von Einzel-RGA, die unter den Klonen der LZ-Teilbank nur in wenigen Kopien vertreten waren ($< 1\%$). Es wurden keine LZ-RGA mit geringer Abundanz in der Bank (zwischen 1 und 9 %) identifiziert, wohingegen bei der TIR-Gruppe sieben von zwölf untersuchten RGA in diese Kategorie fielen.

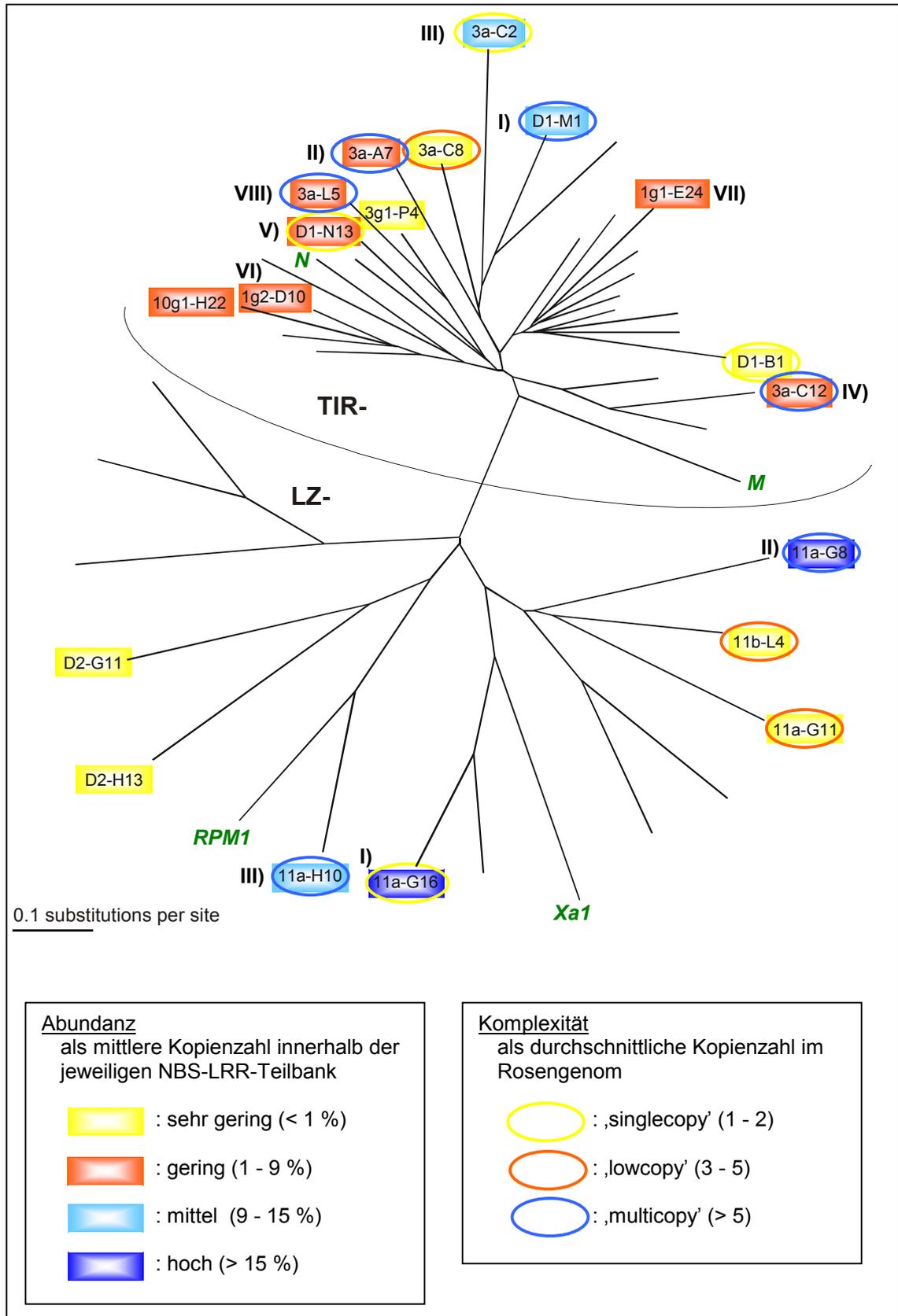


Abb. 13: Unbewurzeltetes Dendrogramm ausgewählter Rosen-RGA mit Kennzeichnung der Abundanz innerhalb der RGA und der Komplexität im Rosengenom. Die Subgruppen sind mit römischen Ziffern gekennzeichnet analog Tabelle 8 a. Grün: NBS-LRR-Resistenzgene.

3.7 Lokalisierung der RGA im Rosengenom: Kartierung

3.7.1 Integration in die Rosen-Chromosomenkarten

Zur Klärung der Verteilung der RGA im Rosengenom sowie deren Position zu den beiden kartierten Rosen-Resistenzgenen wurden ausgewählte RGA in die zwei bestehenden Rosen-Chromosomenkarten integriert.

Entsprechend der Chromosomenanzahl im haploiden Satz setzen sich die Chromosomenkarten der beiden Rosen-Kartierungspopulationen aus sieben Kopplungsgruppen zusammen. Das Resistenzgen *Rdr1* gegen den Sternrußtau konnte in beiden Populationen 94/1 und 97/7 auf der Kopplungsgruppe (KoGr) 1 lokalisiert werden (von Malek et al. 2000, Linde, persönliche Mitteilung). In der Population 94/1 war die Kartierung von *Rdr1* nur über eng gekoppelte Marker möglich, da die Nachkommenschaft nicht eindeutig für die Sternrußtau-Resistenz aufspaltete (Debener, persönliche Mitteilung). Das Resistenzgen *Rpp1* gegen den Echten Mehltau konnte bisher nur in der Population 94/1 ebenfalls über eng gekoppelte Marker kartiert werden, und zwar auf KoGr 3 (Linde et al. 2004).

In den Jahren 2001 und 2002 wurden im Gewächshaus und im Freiland in der Population 97/7 umfangreiche Befallsdaten erhoben, auf deren Basis auf verschiedenen Kopplungsgruppen QTL („Quantitative Trait Loci“) für Resistenz gegen den Echten Mehltau lokalisiert werden konnten (Linde, persönliche Mitteilung).

Zusätzlich zu den RGA, die aus Rosen-DNA oder RNA isoliert worden sind, wurden vier genomische TIR-RGA mit kartiert, die von einem BAC („Bacterial Artificial Chromosome“)-Contig aus *R. rugosa* um den Resistenzgen-Locus *Rdr1* stammten (Kaufmann et al. 2003). Zwei dieser mit ‚BAC‘ bezeichneten RGA wiesen eine Aminosäuresequenz-Identität von 77 % auf, die anderen drei waren zu über 80 % identisch. Alle vier unterschieden sich aber deutlich von den anderen genomischen und exprimierten Rosen-RGA und bildeten somit eine eigene Subgruppe (Tab. A 22).

In den SSCP-Analysen zeigten von den 55 spezifischen RGA-Primern insgesamt 33 in mindestens einer der beiden Rosen-Kartierungspopulationen Polymorphismen zwischen den Eltern genotypen und in den Nachkommenschaften und konnten somit zur RGA-Kartierung eingesetzt werden (s. Tab. A 18).

Bis auf wenige Ausnahmen bestand das von den spezifischen Primern erzeugte SSCP-Bandenmuster aus mehr als vier PCR-Banden, wie man es bei diploiden Genotypen für einen einzelnen Genlocus maximal erwarten würde. Abbildung 14 c zeigt exemplarisch das hochkomplexe SSCP-Bandenmuster eines Mitgliedes der Subgruppe LZ-I. Zum Vergleich sind in Abb. 14 a und b zwei ‚single-‘ oder ‚lowcopy‘ RGA-Loci dargestellt.

Häufig gab es bei den ‚highcopy‘ RGA zwischen den verschiedenen SSCP-Banden keine Unterschiede unter den analysierten Individuen, d. h. die Nachkommen spalteten für die verschiedenen DNA-Fragmente gleich auf. Bei identischen Aufspaltungsverhältnissen wurden die Marker nicht als verschiedene Loci angesehen und nur einmal erfasst. In Tabelle 11 ist für die beiden Populationen die Anzahl der Banden je RGA-Primer aufgeführt, welche als potentielle RGA-Loci angesehen wurden. Zusätzlich ist die Anzahl

der „trennbaren“ Loci angegeben, das sind solche, bei denen in mindestens einem Individuum ein Rekombinationsereignis stattgefunden hat und die sich dadurch von den anderen unterscheiden. In der Population 94/1 lag die mittlere Anzahl der SSCP-Banden je Primer bei 13,4, wovon aber durchschnittlich lediglich 2 ein unterschiedliches Spaltungsverhältnis aufwiesen und als Marker ausgewertet wurden. Die mittlere Bandenzahl in der Population 97/7 betrug 15,5. Die Anzahl der trennbaren Marker war mit durchschnittlich 4,6 mehr als doppelt so hoch wie in der Population 94/1.

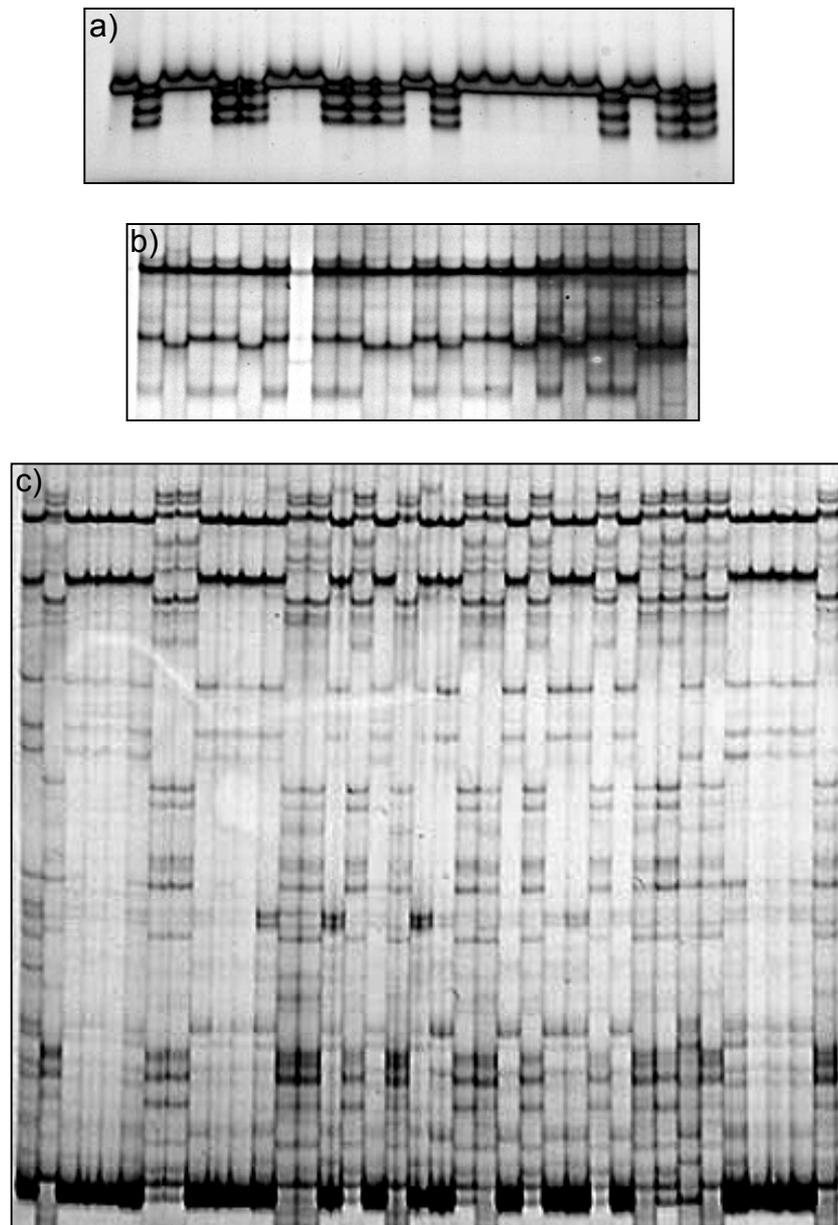


Abb. 14: SSCP-Analysen für die RGA-Kartierung in der Population 94/1. In den linken beiden Spuren sind jeweils die beiden Eltern-Genotypen abgebildet, dahinter einige Individuen der Nachkommenschaft. a) ‚Single-‘ oder ‚lowcopy‘ RGA-Locus 4g2-B16 (TIR, keiner Subgruppe zugeordnet); b) ‚single-‘ oder ‚lowcopy‘ RGA-Locus 3a-C5 (Subgruppe: TIR-III); c) ‚multicopy‘ RGA-Locus 12g1-M19 (Subgruppe: LZ-I).

Tab. 11: Anzahl der potentiellen und trennbaren Loci je RGA in 94/1 und 97/7

		Kartierungspopulation			
		94/1		97/7	
RGA	Sub- gruppe ¹⁾	Pot. Loci ⁴⁾	Trennbare Loci ⁵⁾	Pot. Loci ⁴⁾	Trennbare Loci ⁵⁾
11a-G2	LZ-I	22	2	26	7
11b-E10	LZ-I	20	2	24	7
11g1-O5	LZ-I	20	1	24	6
12g1-E12	LZ-I	18	2	22	6
12g1-M19	LZ-I	24	3	-	-
11a-G8	LZ-II	14	1	-	-
11a-H10	LZ-III	12	1	-	-
12g1-E15	LZ-III	14	3	16	2
11a-G11	LZ-s ²⁾	4	3	-	-
11b-L4	LZ-s	10	1	-	-
D1-A2	TIR-I	30	2	-	-
D1-D13	TIR-I	16	2	10	6
D1-F1	TIR-I	-	-	10	4
D1-K1	TIR-I	-	-	8	4
D1-M1	TIR-I	24	1	-	-
D1-O1	TIR-I	14	2	-	-
L3-E9	TIR-I	18	2	20	4
L3-F3	TIR-I	7	1	-	-
3a-L19	TIR-II	12	2	16	4
3a-C5	TIR-III	5	3	-	-
3b-N10	TIR-III	8	2	-	-
3a-C8	TIR-s ²⁾	16	2	16	5
D1-D1	TIR-s	4	2	7	3
1g2-D10	TIR-VI	14	2	12	5
1g1-E24	TIR-VII	-	-	14	3
4g2-B16	TIR-0 ³⁾	4	1	-	-
L3-D1	TIR-0	6	1	-	-
L3-D2	TIR-0	14	2	-	-
L3-E6	TIR-0	11	1	15	6
BAC-3-C1	TIR-BAC	14	5	-	-
BAC-3-C5	TIR-BAC	8	2	-	-
BAC-4-F24	TIR-BAC	7	3	8	2
BAC-help	TIR-BAC	13	3	-	-
	Mittel	13,4	2,0	15,5	4,6

¹⁾ Subgruppen-Bezeichnung analog Tab. 8 a; ²⁾ TIR-/ LZ-s: Einzel-RGA; ³⁾ TIR-0: keiner Subgruppe zugeordnet, da nicht in Kolonie-Hybridisierungen analysiert und verschieden zu anderen RGA; ⁴⁾ potentielle Loci: Anzahl der SSCP-Banden; ⁵⁾ trennbare Loci: in mindestens einem Individuum verschieden; Pfeile: Kopienzahl im Genom in Southern-blot-Analysen untersucht (weiß: ‚singlecopy‘, grau: ‚lowcopy‘, schwarz: ‚multicopy‘).

Zu Vergleichszwecken sind die RGA, deren Komplexität in genomischen Southern-blot-Analysen zuvor untersucht wurde, in Tabelle 11 in Abhängigkeit von der Komplexität der Loci mit weißen, grauen und schwarzen Pfeilen markiert (s. Legende). Vier der sieben hinsichtlich der Komplexität analysierten RGA waren ‚multicopy‘ Loci. Das SSCP-Bandenmuster dieser RGA war mit durchschnittlich 13 Banden recht komplex. Dies war allerdings bei den beiden ‚lowcopy‘ RGA ebenfalls der Fall. Das Bandenmuster des einzigen kartierten, in Southern-blot-Analysen als ‚singlecopy‘ identifizierten RGA-Locus bestand aus vier Banden.

Tab. 12: Anzahl der kartierten RGA auf den Kopplungsgruppen (KoGr) für Population 94/1 und 97/7

KoGr	94/1		97/7		Resistenzgene
	RGA	Loci	RGA	Loci	
1	5	12	3	7	<i>Rdr1</i>
2	3*	3	-	-	-
3	-	-	-	-	<i>Rpp1</i> (94/1)
4	5	9	2	4	-
5	4	5	1	4	-
6	3	3	-	-	-
7	10*	15	9	37	-
ges.	29*	47	15	52	

* Auf KoGr 2 und 7 jeweils ein Locus desselben RGA kartiert, daher insgesamt 29 RGA und nicht 30.

Tabelle 12 fasst die Anzahl der kartierten RGA je Kopplungsgruppe (KoGr) für die Populationen 94/1 und 97/7 zusammen. In der Population 94/1 wurden 47 Loci kartiert, die 29 RGA repräsentierten. Die 47 RGA-Loci verteilen sich auf sechs der sieben Kopplungsgruppen, wobei auf KoGr 1 und 7 eine Konzentrierung von RGA-Loci zu beobachten ist. In Population 97/7 wurden 15 RGA mit 52 Loci auf vier der sieben Kopplungsgruppen kartiert, wobei nahezu drei Viertel davon auf KoGr 7 liegen. Sieben bzw. zwölf RGA-Loci wurden auf KoGr 1 kartiert, wo auch das Resistenzgen *Rdr1* gegen den Sternrußtau lokalisiert ist. Kein RGA wurde auf der Kopplungsgruppe von *Rpp1* gegen den Echten Mehltau identifiziert.

In Tabelle 13 sind die kartierten RGA einzeln mit den zugehörigen Loci und den Kopplungsgruppen, auf denen diese lokalisiert sind, vergleichend für die beiden Kartierungspopulationen aufgeführt. Farblich umrahmt sind jeweils die Mitglieder einer Subgruppe und die zugehörigen Kopplungsgruppen.

Bei insgesamt 33 RGA war die Integration in die Chromosomenkarten der Kartierungspopulationen 94/1 und/oder 97/7 möglich. Aufgrund fehlender Polymorphismen, erheblicher Abweichungen vom erwarteten Marker-Spaltungsverhältnis oder ungenügender Kopplung mit den anderen Markern konnten nicht alle RGA in beiden Populationen kartiert werden.

Die 14 doppelt kartierten RGA, sind in beiden Populationen ausnahmslos auf den gleichen Kopplungsgruppen lokalisiert. Die Mitglieder einer Subgruppe liegen dabei bis auf wenige Ausnahmen gemeinsam in einer Kopplungsgruppe (Tab. 13, grün umrahmt). Dies ist bei allen Mitgliedern aus Subgruppe LZ-I (fünf RGA) und TIR-III (zwei RGA) der Fall sowie bei sieben der acht RGA aus TIR-I. Bei einem Mitglied aus TIR-I tritt ein Sonderfall auf: Hier liegen die beiden zugehörigen RGA-Loci auf unterschiedlichen Kopplungsgruppen, einer auf KoGr 7, der andere auf KoGr 2 (Tab. 13, rot gedruckt). Ein weiteres RGA aus TIR-I ist ebenfalls auf KoGr 2 lokalisiert (Tab. 13, rot umrahmt). Bis auf die zwei Ausnahmen in TIR-I gibt es nur noch zwei weitere Fälle, in denen die RGA einer Subgruppe auf unterschiedlichen Kopplungsgruppen lokalisiert sind: Die beiden Mitglieder aus LZ-III lagen auf KoGr 1 bzw. 5 (Tab. 13, rot umrahmt) und zwei der zehn RGA-Marker, die von dem *Rdr1*-BAC-Contig abgeleitet worden sind, wurden auf KoGr 5 statt, wie die anderen acht, auf KoGr 1 kartiert (Tab. 13, rot umrahmt).

In den Abbildungen 15 a - e sind die Kopplungsgruppen 1, 4, 5 und 7 der Chromosomenkarten vergleichend für die Populationen 94/1 und 97/7 dargestellt. Unter den Karten sind die Positionen der RGA-Marker auf den Kopplungsgruppen tabellarisch aufgeführt sowie die Gruppen (TIR/ LZ) und Subgruppen (s. Tab. 8 a) der zugehörigen RGA.

Die Kopplungsgruppen 2, 3 und 6 sind nicht abgebildet, da darauf entweder keine (KoGr 3) oder nur in der Population 94/1 jeweils drei RGA lagen.

Für die Population 94/1 wurden die Kopplungsgruppen der beiden Eltern getrennt dargestellt, da sich durch die relativ geringe Individuenzahl (72) bei der hohen Markerdichte (ca. 800) eine fehlerfreie Integration der beiden Karten als schwierig gestaltete und dabei unter Umständen Informationen verloren gehen könnten. Die uniparentalen RGA-Marker sind in der Population 94/1 für den mütterlichen Elter am Ende mit einer 1, für den väterlichen mit einer 2 gekennzeichnet, die biparentalen tragen die Abkürzung bi in ihrem Namen.

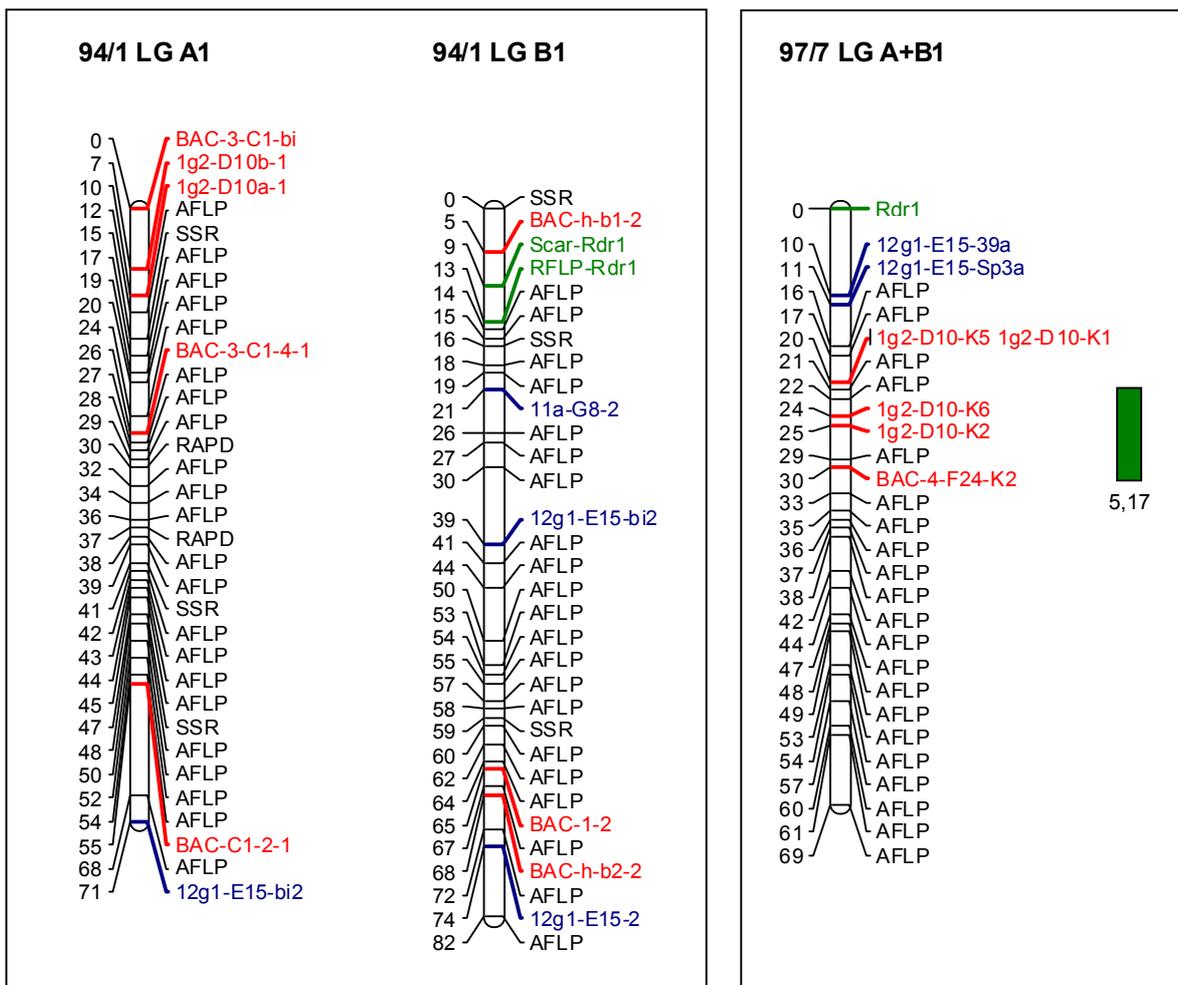
Die Chromosomenkarte für die Population 97/7, die auf der Grundlage von 170 Individuen und insgesamt 231 Markern basiert, wurde integriert aus den Einzelkarten beider Eltern. Die Marker, die sich aus dem anfälligen Pollenspender-Elter ableiteten, tragen in ihrem Namen die Bezeichnung Sp3, die des gegen den Echten Mehltau und Sternrußtau resistenten Elters enden mit 39. Die biparentalen Marker tragen das Kürzel K.

In der Population 97/7 wurde eine Reihe von QTL gegen den Echten Mehltau im Freiland und im Gewächshaus detektiert (Linde, persönliche Mitteilung). Positionen, in denen RGA auf derselben chromosomalen Region wie diese QTL kartiert wurden, sind mit einem grünen Balken auf der rechten Seite der Kopplungsgruppen gekennzeichnet. Der LOD („Likelihood of the Odds“)-Score, der die Sicherheit für die Lage des QTL ausdrückt, ist jeweils darunter angegeben.

Tab. 13: Kartierte RGA mit Anzahl der Loci und zugehöriger KoGr

RGA	Sub- gruppe ¹⁾	Population 94/1		Population 97/7	
		Anzahl der Loci	KoGr	Anzahl der Loci	KoGr
11a-G2	LZ-I	2	7	3	7
11b-E10	LZ-I	1	7	6	7
11g1-O5	LZ-I	1	7	6	7
12g1-E12	LZ-I	1	7	6	7
12g1-M19	LZ-I	3	7	-	-
11a-G8	LZ-II	1	1	-	-
11a-H10	LZ-III	1	5	-	-
12g1-E15	LZ-III	2	1	2	1
11a-G11	LZ-s	3	4	-	-
11b-L4	LZ-s	1	5	-	-
D1-A2	TIR-I	2	7	-	-
D1-D13	TIR-I	2	2; 7	2	7
D1-F1	TIR-I	-	-	4	7
D1-K1	TIR-I	-	-	3	7
D1-M1	TIR-I	1	7	-	-
D1-O1	TIR-I	2	7	-	-
L3-E9	TIR-I	1	7	4	7
L3-F3	TIR-I	1	2	-	-
3a-L19	TIR-II	1	6	-	-
3a-C5	TIR-III	2	4	-	-
3b-N10	TIR-III	1	4	-	-
3a-C8	TIR-s	1	5	4	5
D1-D1	TIR-s	2	4	1	4
1g2-D10	TIR-VI	2	1	4	1
1g1-E24	TIR-VII	-	-	3	7
4g2-B16	TIR-0	1	6	-	-
L3-D1	TIR-0	1	6	-	-
L3-D2	TIR-0	1	2	-	-
L3-E6	TIR-0	1	4	3	4
BAC-3-C5	TIR-BAC	2	5	-	-
BAC-3-C1	TIR-BAC	4	1	-	-
BAC-4-F24	TIR-BAC	-	-	1	1
BAC-help	TIR-BAC	3	1	-	-
Anzahl der Loci		47		52	
Anzahl der RGA		29		15	

¹⁾ S. Index Tab. 11; grün umrahmt: Mitglieder einer Subgruppe, die auf derselben KoGr liegen; rot umrahmt bzw. gedruckt: Mitglieder einer Subgruppe, die auf verschiedenen KoGr liegen.



TIR-RGA, LZ-RGA, Rdr1

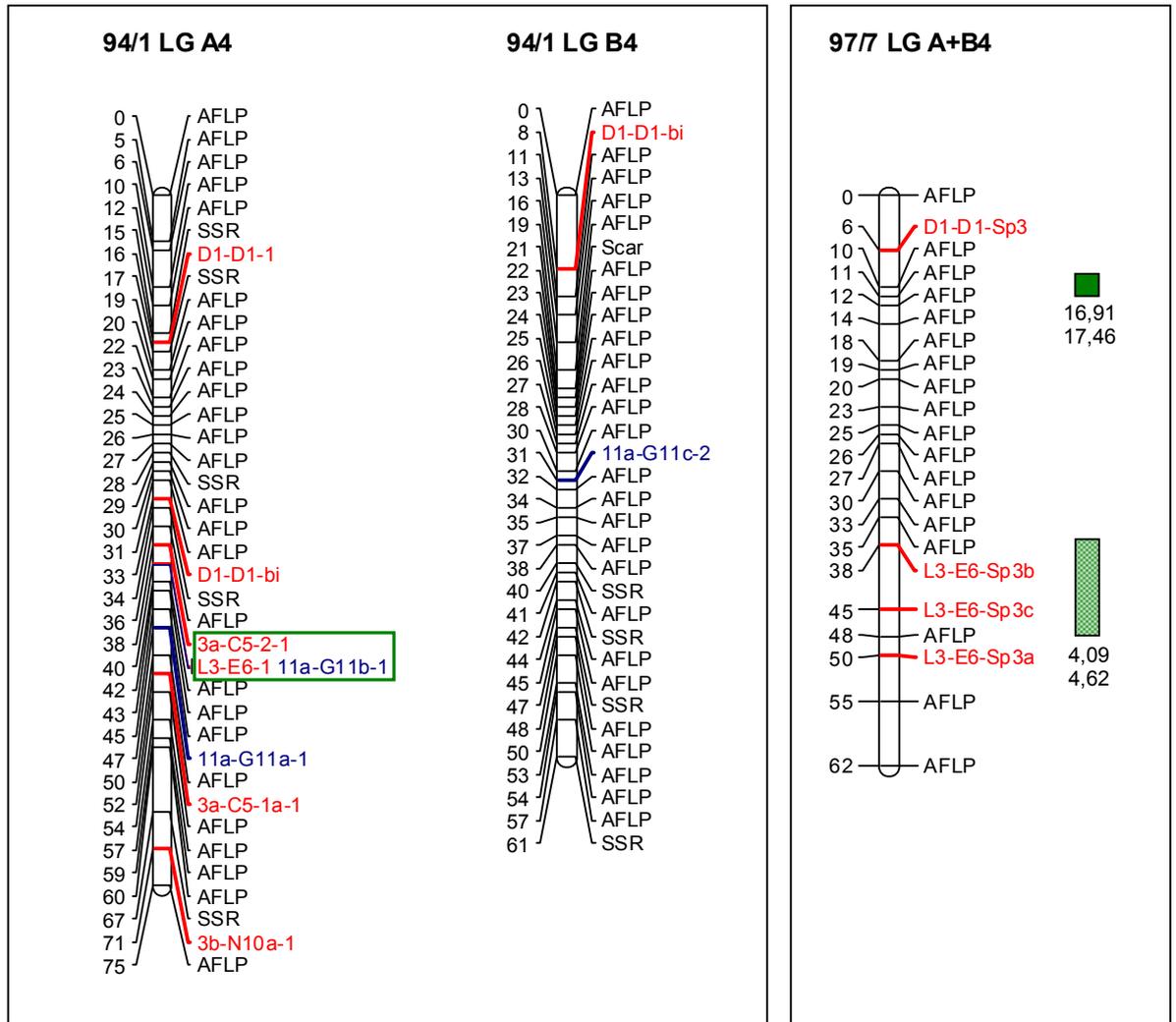
QTL für Resistenz gegen Echten Mehltau im Gewächshaus in den Jahren 2001 und 2002.

Marker	cM
BAC-3-C1-bi	0.0
TIR-BAC	
1g2-D10b-1	6.8
TIR-VI	
1g2-D10a-1	10.4
TIR-VI	
BAC-3-C1-4-1	25.8
TIR-BAC	
BAC-3-C1-2-1	54.6
TIRBAC	
12g1-E15-bi2	70.6
LZ-III	

Marker	cM
BAC-h-b1-2	5.4
TIR-BAC	
Scar-Rdr1	9.2
RFLP-Rdr1	12.7
11a-G8-2	20.7
LZ-II	
12g1-E15-bi2	39.2
LZ-III	
BAC-3-C1-1-2	65.4
TIR-BAC	
BAC-h-b2-2	68.0
TIR-BAC	
12g1-E15-2	73.7
LZ-II	

Marker	cM
Rdr1	0.0
12g1-E15-39a	10.0
LZ-III	
12g1-E15-Sp3a	11.0
LZ-III	
1g2-D10-K5	19.5
TIR-VI	
1g1-D10-K1	19.8
TIR-VI	
1g1-D10-K6	23.5
TIR-VI	
1g1-D10-K2	25.1
TIR-VI	
BAC-4-F24-K2	30.3
TIR-BAC	

Abb. 15 a: KoGr 1 der Populationen 94/1 und 97/7 und Positionen der kartierten RGA.



TIR-RGA, LZ-RGA

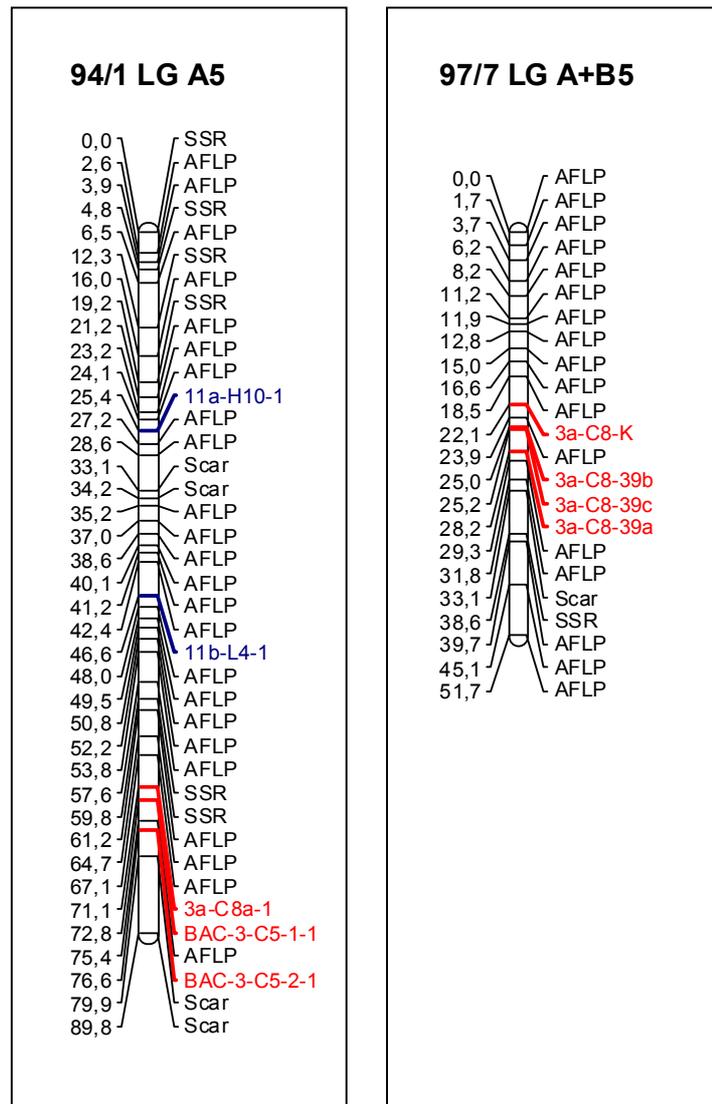
QTL für Resistenz gegen Echten Mehltau im Gewächshaus in den Jahren 2001 und 2002;
 QTL für Resistenz gegen Echten Mehltau im Freiland in den Jahren 2001 und 2002.

Marker	cM
D1-D1-1 TIR-s	15.7
D1-D1-bi TIR-s	32.6
3a-C5-2-1 TIR-III	38.2
L3-E6-1 TIR-0	39.8
11a-G11b-1 LZ-s	40.3
11a-G11a-1 LZ-s	47.5
3a-C5-1a-1 TIR-III	51.8
3b-N10a-1 TIR-III	71.2

Marker	cM
D1-D1-bi TIR-s	8.4
11a-G11c-2 LZ-s	31.4

Marker	cM
D1-D1-Sp3 TIR-s	5.6
L3-E6-Sp3b TIR-0	38.2
L3-E6-Sp3c TIR-0	44.9
L3-E6-Sp3a TIR-0	50.4

Abb. 15 b: KoGr 4 der Populationen 94/1 und 97/7 und Positionen der kartierten RGA. Grün umrahmt: gemischtes TIR/ LZ-Cluster.

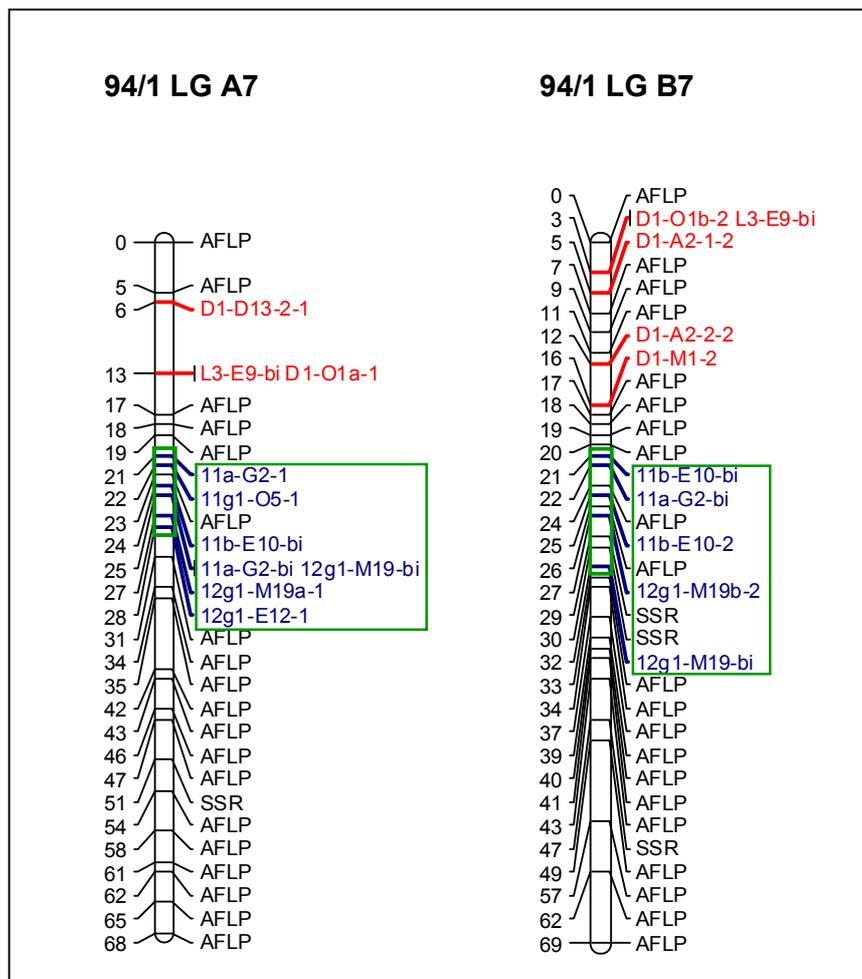


TIR-RGA, LZ-RGA

Marker	cM
11a-H10-1	25.4
LZ-III	
11b-L4-1	46.6
LZ-s	
3a-C8a-1	71.1
TIR-s	
BAC-3-C5-1-1	72.8
TIR-BAC	
BAC-3-C5-2-1	76.6
TIR-BAC	

Marker	cM
3a-C8-K	22.1
TIR-s	
3a-C8-39b	25.0
TIR-s	
3a-C8-39c	25.2
TIR-s	
3a-C8-39a	28.2
TIR-s	

Abb. 15 c: KoGr 5 der Populationen 94/1 und 97/7 und Positionen der kartierten RGA.



TIR-RGA, LZ-RGA

Marker - Sg.	cM
D1-D13-2-1	6.2
TIR-I	
L3-E9-bi	12.7
TIR-I	
D1-O1a-1	13.1
TIR-I	
11a-G2-1	21.3
LZ-I	
11g1-O5-1	22.3
LZ-I	
11b-E10-bi	24.2
LZ-I	
11a-G2-bi	24.8
LZ-I	
12g1-M19-bi	25.1
LZ-I	
12g1-M19a-1	26.9
LZ-I	
12g1-E12-1	28.4
LZ-I	

Marker - Sg.	cM
D1-O1b-2	3.2
TIR-I	
L3-E9-bi	3.3
TIR-I	
D1-A2-1-2	5.2
TIR-I	
D1-A2-2-2	12.4
TIR-I	
D1-M1-2	16.1
TIR-I	
11b-E10-bi	21.4
LZ-I	
11a-G2-bi	22.4
LZ-I	
11b-E10-2	24.5
LZ-I	
12g1-M19b-2	27.0
LZ-I	
12g1-M19-bi	32.5
LZ-I	

Abb. 15 d: KoGr 7 der Population 94/1 und Positionen der kartierten RGA. Grün umrahmt: Großes LZ-I RGA-Cluster.

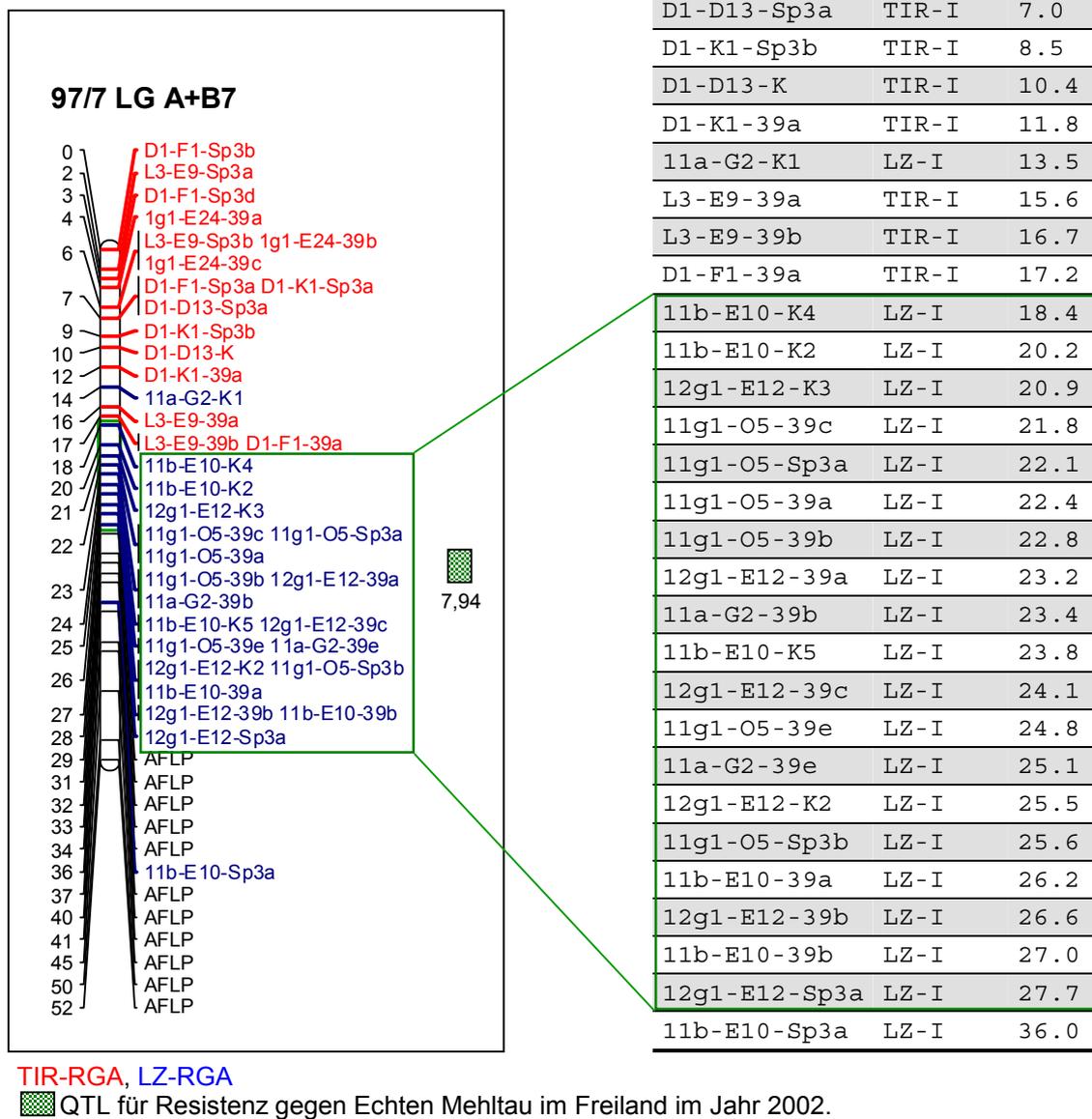


Abb. 15 e: KGr 7 der Population 97/7 und Positionen der kartierten RGA. Grün umrahmt: Großes LZ-I RGA-Cluster.

3.7.2 RGA und Resistenzgene

In der Population 94/1 ist *Rdr1* in einer Region von 3,5 cM zwischen einem SCAR („Sequence-Characterized Amplified Region“)- und einem RFLP („Restriction Fragment Length Polymorphism“)-Marker telomerisch auf KoGr 1 des männlichen Elters lokalisiert (Abb. 15 a, grün markiert). Der *Rdr1*-RFLP-Marker ist mit einem LOD-Score von 11,8 mit einem LZ-RGA-Marker gekoppelt, der in einer Entfernung von 8 cM in centromerer Richtung liegt. Telomerisch 3,8 cM entfernt von dem *Rdr1*-Scar-Marker ist auf dem väterlichen Chromosom ein TIR-RGA-Marker lokalisiert, der von dem BAC-Contig um *Rdr1* abgeleitet wurde. Auf dem mütterlichen Chromosom liegen telomerisch in der *Rdr1*-Region drei weitere TIR-RGA-Loci.

Von den zehn vom *Rdr1*-BAC-Contig abgeleiteten RGA-Marker wurden acht auf KoGr 1 kartiert, zwei davon in unmittelbarer Nähe zu dem Resistenzgen, die anderen breit gestreut über die gesamte Kopplungsgruppe.

Durch die Aufspaltung für Sternrußtau-Resistenz konnte in der Population 97/7 das Resistenzgen direkt kartiert werden. Auch hier ist *Rdr1* auf KoGr1 telomerisch lokalisiert. Der am stärksten an *Rdr1* gekoppelte Marker (LOD 23,9) wurde von einem LZ-RGA abgeleitet und ist 10 cM centromerisch von dem Resistenzgen lokalisiert. Ein weiterer Locus desselben RGA wurde 1 cM entfernt von dem ersten Locus kartiert.

Auf der KoGr 3, auf der in der Population 94/1 das Resistenzgen *Rpp1* gegen den Echten Mehltau lokalisiert ist, wurde kein RGA kartiert.

3.7.3 RGA und QTL

In der Population 97/7 wurden diverse QTL für Resistenz gegenüber dem Echten Mehltau auf verschiedenen Kopplungsgruppen kartiert (Linde, persönliche Mitteilung). Die QTL, die auf Chromosomenabschnitten zusammen mit RGA liegen, sind in Abbildung 15 eingezeichnet.

Auf KoGr 1 wurden zwei Loci eines TIR-RGA direkt in der Region eines QTL für Mehltau-Resistenz im Gewächshaus kartiert. Ein vom dem BAC-Contig um *Rdr1* abgeleiteter Marker ist innerhalb des Konfidenzintervalls lokalisiert.

Auf KoGr 4 wurden zwei QTL für Resistenz gegen Echten Mehltau im Gewächshaus und im Freiland detektiert. Etwa 2,5 cM vom ersten QTL entfernt liegt ein TIR-RGA-Locus. Drei Loci eines TIR-RGAs sind direkt in der Region des zweiten QTLs auf dieser Kopplungsgruppe lokalisiert.

Auf KoGr 7 liegt in dem großen LZ-I RGA-Cluster über eine Region von ca. 2 cM ein QTL für Mehltau-Resistenz im Freiland im Jahr 2002.

3.7.4 Homogene und heterogene RGA-Cluster

Wie bereits aus Tabelle 12 hervorgeht, tritt auf KoGr 7 in beiden Populationen eine deutliche Anhäufung von RGA auf. In centromerer Region bilden auf diesem Chromosom mehrere RGA der Subgruppe LZ-I ein großes Cluster (Abb. 8 d und e). Dieses RGA-Cluster umfasst in der Population 94/1 fünf RGA mit 13 Loci, in der Population 97/7 vier RGA mit 19 Loci und erstreckt sich über 11 bzw. 9 cM.

In der Population 94/1 wurden auf der KoGr 4 des mütterlichen Elters 0,5 cM voneinander entfernt ein TIR- und ein LZ-RGA-Marker kartiert (Abb. 15 b, grün umrahmt), deren Kopplung mit einem hohen LOD-Score von 17,1 abgesichert ist. Ein weiterer TIR-RGA-Marker liegt 1,6 cM von dem anderen TIR-RGA entfernt.

3.8 Expressionsanalyse

3.8.1 Makroarray-Technik

Ein RGA-Makroarray sollte als Tool zur Expressionsanalyse einer großen Anzahl von RGA in verschiedenen Rosen-Genotypen, Gewebearten, Entwicklungs- und Infektionsstadien dienen. Die Rosen-RGA wurden mittels Southern-Transfer nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Nylonmembran übertragen und daran fixiert. Um zu überprüfen, ob die Technik funktionierte, wurde das konstitutiv exprimierte Actin-Gen, das eine wichtige Funktion für die Struktur und die Beweglichkeit aller Zellen spielt, in zwei Wiederholungen mit in den Makroarray eingebaut.

Gegen den RGA-Makroarray wurde radioaktiv markierte Gesamt-RNA und mRNA der Rosen-Genotypen hybridisiert, aus denen die RGA ursprünglich isoliert worden sind. Das Ziel war, stärker exprimierte RGA, deren Transkripte in der mRNA in größerer Anzahl vertreten sind, durch die stärkere Intensität der Hybridisierungssignale zu identifizieren.

Da bei der Verwendung von Gesamt-RNA unspezifische Hybridisierungssignale außerhalb des Größenbereiches für RGA auftraten, musste diese Technik verworfen werden.

Durch den Einsatz von mRNA als Hybridisierungssonde konnten die unspezifischen Hybridisierungssignale ausgeschaltet werden. Deutliche Hybridisierungssignale waren bei den beiden Actin-Kontrollen zu beobachten. Keiner der 94 RGA auf dem Makroarray hybridisierte mit der mRNA-Sonde.

3.8.2 Semiquantitative RT-PCR

3.8.2.1 Spezifität der RGA-Primer

Die Kartierungsprimer wurden in PCR-Reaktionen mit verschiedenen RGA-Plasmiden als Templates auf ihre Spezifität überprüft, um festzustellen, ob sie für die Expressionsuntersuchung der einzelnen RGA mittels RT-PCR geeignet waren.

Es stellte sich heraus, dass in einigen Fällen PCR-Produkte amplifiziert wurden, obwohl das RGA-Template einer anderen Subgruppe angehörte als die RGA-Sequenz, für die der spezifische RGA-Primer entworfen wurde. Auch nach erneuter Plasmid-Präparation aus zweimal überimpften Einzelkolonien, um eine Kontamination oder eine Vermischung der Klone auszuschließen, konnten diese „unerwünschten“ PCR-Produkte nicht eliminiert werden. Die Kontrollreaktionen mit Wasser ohne DNA-Template waren negativ, d. h. hier wurde kein PCR-Produkt erzeugt, so dass eine Kontamination der PCR-Reagenzien auszuschließen war.

Folgende Möglichkeiten kamen als Ursache für die PCR-Amplifikation mit den spezifischen Primern trotz fehlenden spezifischen Templates in Frage:

- 1.) Die RGA-Primer waren nicht ausreichend spezifisch und hybridisierten auch mit RGA-Sequenzen anderer Subgruppen, die dann amplifiziert wurden.
- 2.) Die dem PCR-Ansatz zugegebenen Plasmid-Lösungen waren mit dem Ziel-RGA kontaminiert, welches amplifiziert wurde.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden die PCR-Produkte einer Auswahl der spezifischen Primer mit unterschiedlichen DNA-Templates, nämlich RGA-Klonen aus Subgruppe TIR-I und LZ-I und zwei *R. rugosa*-Genotypen, kloniert und sequenziert. Die RGA-Klone, die als PCR-Templates verwendet wurden, und die Zielsequenzen, für die die Primer spezifisch sein sollten, gehörten zu unterschiedlichen Familien und wiesen eine DNA-Sequenzidentität zwischen 38 und 62 % auf (s. Tab. 14 a).

Die Sequenzanalyse ergab, dass die PCR-Produkte der spezifischen Primer unabhängig von der Art des Templates zu mehr als 85 % identisch mit der Original-RGA-Sequenz waren, für die der Primer entworfen wurde (s. Tab. 10 b).

Tab. 14 a: Prozentuale DNA-Sequenzidentitäten ausgewählter RGA

RGA (Sg.)	11a-G8 (LZ-II)	12g1-M19 (LZ-I)	3a-C8 (TIR-0)	D1-M1 (TIR-I)
11a-G8 (LZ-II)	100	49	38	39
12g1-M19 (LZ-I)	-	100	38	42
3a-C8 (TIR-0)	-	-	100	62
D1-M1 (TIR-I)	-	-	-	100

Sg.: Subgruppe (s. Tab. 8 a); TIR-0: keiner Subgruppe zugeordnet

Tab. 14 b: Prozentuale DNA-Sequenzidentität der PCR-Produkte der spezifischen Primer mit der Ursprungs-RGA-Sequenz

Ursprungssequenz ¹	Plasmid-DNA Templates ²							
	D1-M1 (TIR-I)	D1-M1 (TIR-I)	D1-M1 (TIR-I)	D1-M1 (TIR-I)	12g1-M19 (LZ-I)	12g1-M19 (LZ-I)	12g1-M19 (LZ-I)	12g1-M19 (LZ-I)
D1-M1 (TIR-I)	100	100	100	100	90	90	90	99
3a-C8 (TIR-0)	99	99	99	99	99	100	100	99
12g1-M19 (LZ-I)	92	92	93	92	94	94	93	94
11a-G8 (LZ-II)	99	99	99	100	100	100	100	99

Ursprungs- sequenz ¹	Rosen-DNA Templates ²							
	88/124- 46	88/124- 46	88/124- 46	88/124- 46	82/78-1	82/78-1	82/78-1	82/78-1
D1-M1 (TIR-I)	90	85	86	90	99	93	87	99
3a-C8 (TIR-0)	98	97	99	98	98	92	91	91
12g1-M19 (LZ-I)	94	89	95	94	92	92	91	95
11a-G8 (LZ-II)	97	85	85	85	85	85	88	88

¹ von der der spezifische Primer abgeleitet wurde; ² Sequenzierung von jeweils vier Klonen = vier Wiederholungen

3.8.2.2 Test auf Differenzierbarkeit

Um diejenigen Primer zu identifizieren, die zur Differenzierung der RGA und somit zur Expressionsanalyse mittels RT-PCR geeignet waren, wurden die spezifischen Primer in Gradienten-PCR-Reaktionen gescreent. Als PCR-Templates fungierten Plasmide mit RGA unterschiedlicher Familien. Die Primer galten nur dann als spezifisch, wenn nur in den Reaktionen mit dem zugehörigen RGA-Template ein Produkt amplifiziert wurde, nicht aber mit den RGA anderer Familien. Da nur mit fünf Primern eine sichere Differenzierung der RGA möglich war, wurden von den Haupt-RGA-Subgruppen neue spezifische Primer entworfen. Weitere fünf Primer wurden identifiziert, die eine ausreichende Spezifität für die jeweilige RGA-Sequenz besaßen.

In Tabelle 15 sind die Annealing-Temperaturen aufgeführt, bei der mit den spezifischen Primern eine sichere Differenzierung der Ziel-RGA-Familie erreicht wurde. Es zeigte sich, dass einige Primer in einem breiten Temperaturbereich spezifisch für ihr zugehöriges RGA waren, wie in Abbildung 16 a exemplarisch für den Primer 11a-G11 zu sehen ist. Bei anderen Primern wurde die erwünschte Spezifität erst bei höheren Temperaturen erreicht, wie Abbildung 16 b am Beispiel von Primer 1g2-D10 zeigt. Dieser amplifizierte erst bei einer Annealing Temperatur von 68,8 °C ausschließlich mit dem zugehörigen RGA-Template ein PCR-Produkt. Bei einem Großteil der Primer konnte die erwünschte Spezifität auch mit hohen Annealing-Temperaturen nicht erreicht werden, weshalb sie nicht für die RT-PCR-Reaktionen zur Expressionsanalyse der speziellen RGA eingesetzt werden konnten.

Tab. 15: Annealing-Temperaturen, bei der RGA-Familien mit spezifischen Primern differenziert werden konnten

Nr.	RGA (Subgruppe)	Produktlänge	Annealing-Temperatur
1	11a-G11 (s)	301 bp	56,0 - 72,5 °C
2	11a-G16 (LZ-I)	236 bp	72,5 °C
3	11a-G8 (LZ-II)	452 bp	69,0 °C
4	11a-H10 (LZ-III)	378 bp	67,0 °C
5	1g2-D10 (TIR-VI)	426 bp	69,0 °C
6	3a-C2 (TIR-III)	358 bp	70,5 °C
7	3g1-P13 (TIR-II)	270 bp	59,0 - 70,0 °C
8	D1-B1 (s)	320 bp	63,0 - 69,0 °C
9	D1-D13 (TIR-I)	378 bp	59,0 - 65,5 °C
10	D1-N1 (TIR-V)	280 bp	59,0 - 70,0 °C

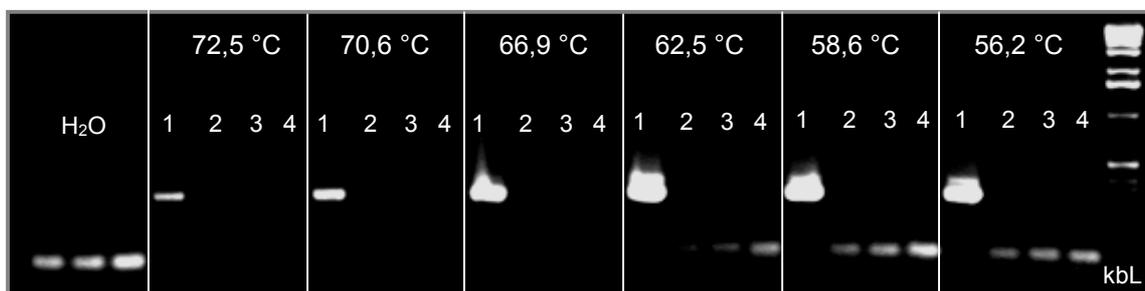


Abb. 16 a: Gradienten-PCR mit 11a-G11-spezifischem Primer. Templates: 1: 11a-G11, 2: 11a-G8, 3: 3a-C8, 4: D1-M1; kbL: 1 kb-Leiter (Längenstandard); H₂O: Wasser-Kontrolle ohne DNA.

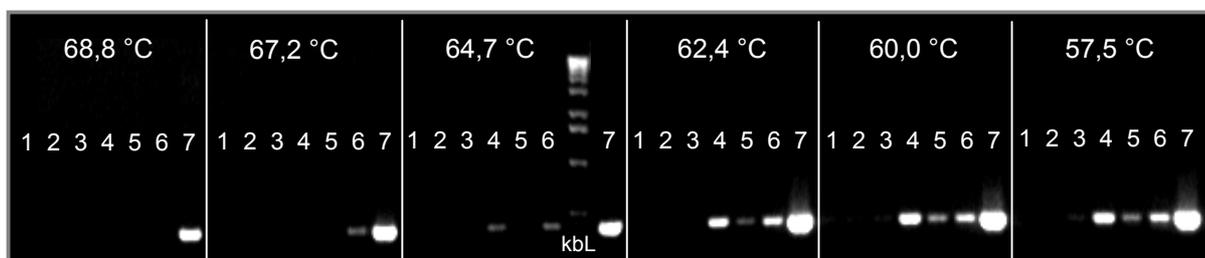


Abb. 16 b: Gradienten-PCR mit 1g2-D10-spezifischem Primer. 1 - 3: LZ-RGA verschiedener Subgruppen als PCR-Templates, 4 - 6: TIR-RGA anderer Subgruppen als Templates, 7: 1g2-D10 Template; kbL: 1 kb-Leiter (Längenstandard).

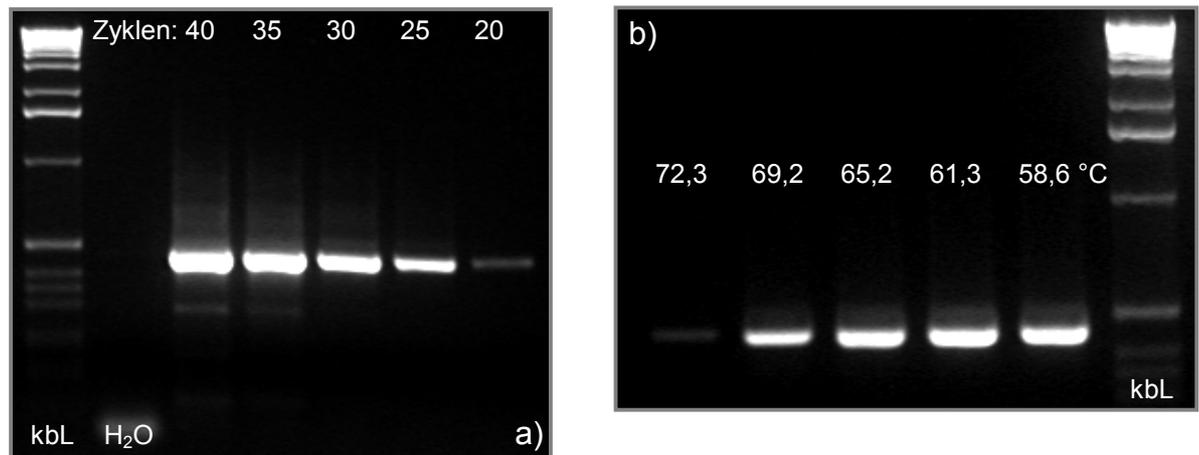


Abb. 17: a) Ermittlung der optimalen Zyklenzahl für die Actin-Primer; H₂O: Wasser-Kontrolle ohne cDNA; b) Gradienten-PCR mit Actin-Primern; kbL: 1 kb-Leiter.

3.8.2.3 Interne Kontrolle und PCR-Bedingungen

Als interne Kontrolle zur Abschätzung der cDNA-Qualität und der PCR-Effizienz diente wiederum Actin, wofür spezifische Primer entworfen wurden (Grunwald, persönliche Mitteilung). Diese Actin-spezifischen Primer wurden zusammen in demselben PCR-Ansatz mit den RGA-spezifischen Primern eingesetzt. Das PCR-Produkt der Actin-Primer hatte eine Länge von 460 bp (s. Abb. 17 a und b).

Um die korrekte Quantifizierung des PCR-Produktes zu ermöglichen, war es notwendig, die Amplifikation gegen Ende der exponentiellen Phase der PCR abzurechnen, bevor das Plateau erreicht war. Die optimalen Zyklenzahlen wurden in PCR-Reaktionen einzeln für die RGA-spezifischen und die Actin-Primer ermittelt (s. Abb. 17 a). Die optimale Zyklenzahl lag für alle spezifischen Primer sowie für die Actin-Primer bei 30.

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob es beim Einsatz der RGA-spezifischen Primer und der Actin-Primer in einem Reaktionsansatz zu Konkurrenz um die PCR-Ausgangsstoffe, nämlich Template, Nukleotide und MgCl₂ kam. Dazu wurde die Intensität der PCR-Produkte verglichen, die in Reaktionen mit den Primern einzeln und in Kombination amplifiziert wurden (s. Abb. 19 a - c). In den meisten Fällen kam es nicht zur Konkurrenz um die Ausgangssubstanzen und die Intensität der PCR-Banden veränderte sich nicht, wenn beide Primer in Kombination eingesetzt wurden (s. Abb. 18). In einem Fall war die RGA-Bande in der Reaktion zusammen mit den Actin-Primern deutlich schwächer als mit den spezifischen Primern alleine (s. Abb. 19 a). Eine Steigerung der MgCl₂-Konzentration auf 3 mM führte zu keiner Veränderung des Ergebnisses (Abb. 19 b). Nach der Verdopplung des cDNA-Substrates für die PCR hatte die RGA-Bande mit den kombinierten Primern die gleiche Intensität wie mit den einzelnen, spezifischen Primern (Abb. 19 c). Die Konkurrenz um das cDNA-Template konnte somit durch Erhöhung der Ausgangskonzentration ausgeschaltet werden.

In folgenden Fällen konnten RGA-spezifische und Actin-Primer nicht in einer Reaktion eingesetzt werden:

- 1.) Die PCR-Produkte für RGA 11a-G8 und 1g2-D10 hatten annähernd die gleiche Länge wie das Actin-Produkt (s. Tab. 16 und Abb. 20 a und b). Die Banden konnten daher im Gel nicht ausreichend getrennt werden und die Reaktionen mussten einzeln durchgeführt werden.
- 2.) Die 11a-G16 Primer waren nur bei einer Annealing-Temperatur von 72,5 °C ausreichend spezifisch (s. Tab. 16). Die Actin-Primer funktionierten bei dieser hohen Annealing-Temperatur jedoch nicht mehr (s. Abb. 17 b). Deshalb wurden auch hier die Reaktionen für die beiden Primerkombinationen getrennt durchgeführt mit einer entsprechend niedrigeren Annealing-Temperatur für die Actin-Primer.

Die Intensität der PCR-Produkte wurde anhand einer Eichreihe mit λ -DNA bekannter Konzentrationen gemessen. Die PCR-Reaktionen wurden in drei Wiederholungen durchgeführt. Der Quotient aus der mittleren Konzentration des RGA-PCR-Produktes und der mittleren Konzentration des Actin-PCR-Produktes diente als Maß für die relative Genexpression des jeweiligen RGA. Die Genexpression wurde anhand der *R. multiflora*-Hybride 88/124-46 untersucht, und zwar in gesundem Blattgewebe als Kontrolle, in Blattgewebe, das zwei Tage zuvor mit dem Sternrußtau-Isolat *DortE4* inokuliert worden war und in jungem Blütengewebe.

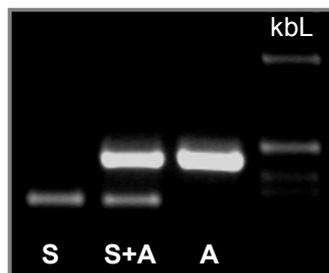


Abb. 18: Test auf Konkurrenz um PCR-Ausgangsstoffe zwischen Actin-Primer und D1-B1-spezifischem Primer. S: RGA-spezifischer Primer, S+A: Kombination Actin- und RGA-spezifischer Primer, A: Actin-Primer, kbL: 1 kB-Leiter (Längenstandard).

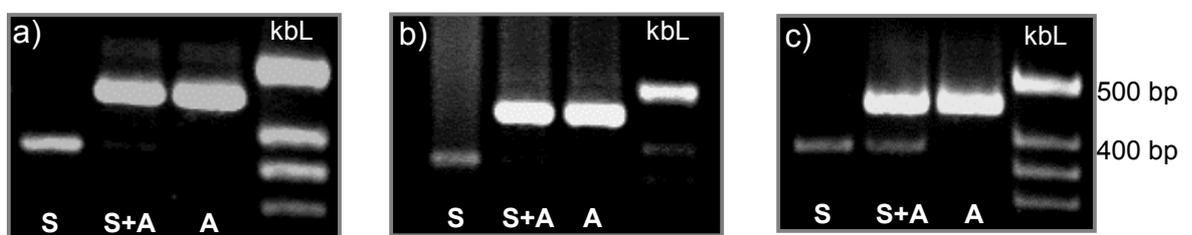


Abb. 19: Test auf Konkurrenz zwischen Actin-Primer und 11a-H10-spezifischem Primer. Von links nach rechts: RGA-spezifischer Primer (S), Kombination Actin- und RGA-spezifischer Primer (S+A), Actin-Primer (A), Längenstandard (kbL). a) 1 μ L cDNA-Lösung, 2 mM MgCl₂; b) 1 μ L cDNA-Lösung, 3 mM MgCl₂; c) 2 μ L cDNA-Lösung, 2 mM MgCl₂.

3.8.2.4 Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR

In den Abbildungen 20 a - k sind die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR Analysen einzeln dargestellt. Die relative Expression der untersuchten RGA ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst angegeben.

Tab. 16: Relative Expression der RGA

RGA	Sub- gruppe ¹⁾	Komple- xität ²⁾	relative Expressionsstärke			
			Blüten	Blätter Kontrolle	Blätter <i>DortE4</i> ³⁾	Faktor ⁴⁾ (inf. / K.)
11a-G11	s	‚low‘	0,3	0,8	0,8	1,0
11a-G16	LZ-I	‚single‘	0,5	0,7	1,1	1,6
11a-G8	LZ-II	‚multi‘	0,0	1,0	1,5	1,5
11a-H10	LZ-III	‚multi‘	0,1	0,2	0,2	1,0
D1-B1	s	‚single‘	0,0	0,1	0,8	8,0
D1-D13	TIR-I	‚multi‘	0,0	0,2	0,7	3,5
3g1-P13	TIR-II	‚multi‘	0,0	0,2	1,6	8,0
3a-C2	TIR-III	‚single‘	0,4	0,3	1,5	5,0
D1-N1	TIR-V	‚single‘	0,0	0,3	0,9	3,0
1g2-D10	TIR-VI	n. u.	0,5	1,0	2,9	2,9

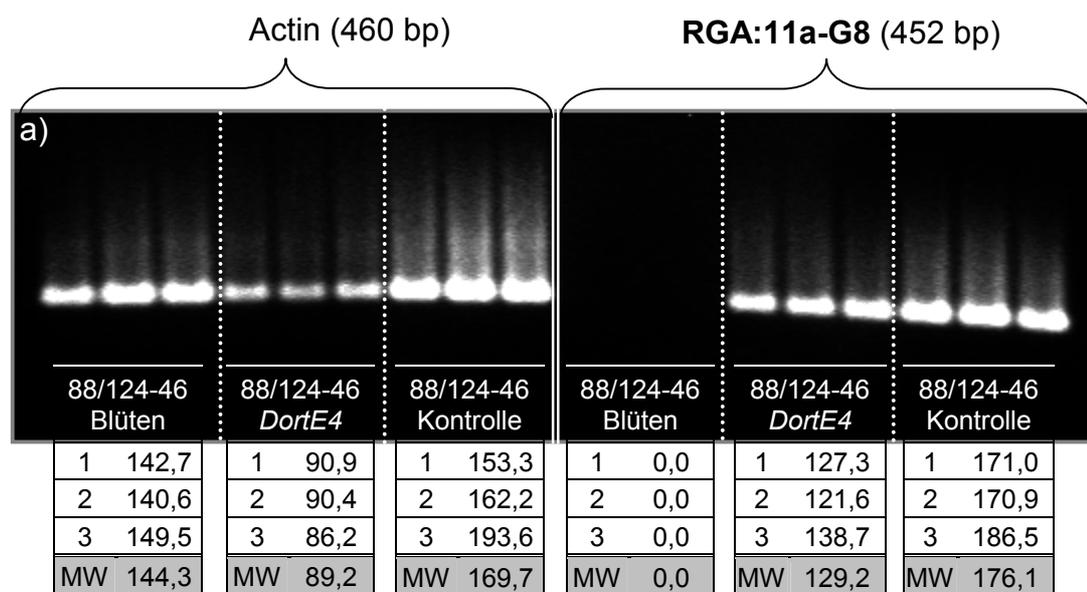
¹⁾ s. Tab. 8 a; ²⁾ Kopienzahl im Genom ermittelt in genomischen Southern-blot-Analysen (n. u.: nicht untersucht); ³⁾ zwei Tage nach Inokulation mit Sternrußtau-Isolat *DortE4*; ⁴⁾ Faktor, um den die relative Expression nach Sternrußtau-Inokulation (inf.) im Vergleich zur Kontrolle (K) erhöht war.

Zusätzlich zu den Werten für die relative Expression in Blüten, nicht infizierten und mit *DortE4*-inokulierten Blättern von 88/124-46 (Spalten 4 - 6) ist die Komplexität der RGA-Loci angegeben, wie sie in den Southern-blot-Analysen ermittelt worden ist (Spalte 3). Der Faktor, um den die RGA-Expression in den Blättern nach Sternrußtau-Infektion erhöht war, ist in der letzten Spalte aufgeführt. Die Betrachtung der genomischen Komplexität der RGA-Loci in Zusammenhang mit der Expression ist unerlässlich, da mit den spezifischen Primern nicht die einzelnen RGA-Kopien im Genom differenziert werden können. Somit konnte eine starke relative Expression entweder durch die starke Expression eines Einzelgens oder durch die schwache Expression vieler Kopien eines RGA zustande kommen. Durch die Information bezüglich der genomischen Komplexität der RGA-Loci war die korrekte Interpretation der RGA-Expression möglich.

In Blüten waren fünf der zehn untersuchten RGA gar nicht exprimiert, bei den anderen fünf konnte eine sehr schwache Expression beobachtet werden. In den nicht infizierten Kontrollblättern waren alle RGA exprimiert, wobei die Expressionsstufen zwischen 0,1 und 1,0 variierten.

Das Expressionsniveau war bei den meisten RGA nach Sternrußtau-Infektion deutlich höher als bei den Kontrollen. In zwei Fällen war die RGA-Expression bei der *DortE4*-Variante verglichen mit der Kontrolle um den Faktor 8 erhöht. Interessanterweise war diese Erhöhung der Expression hauptsächlich bei den TIR-RGA zu beobachten.

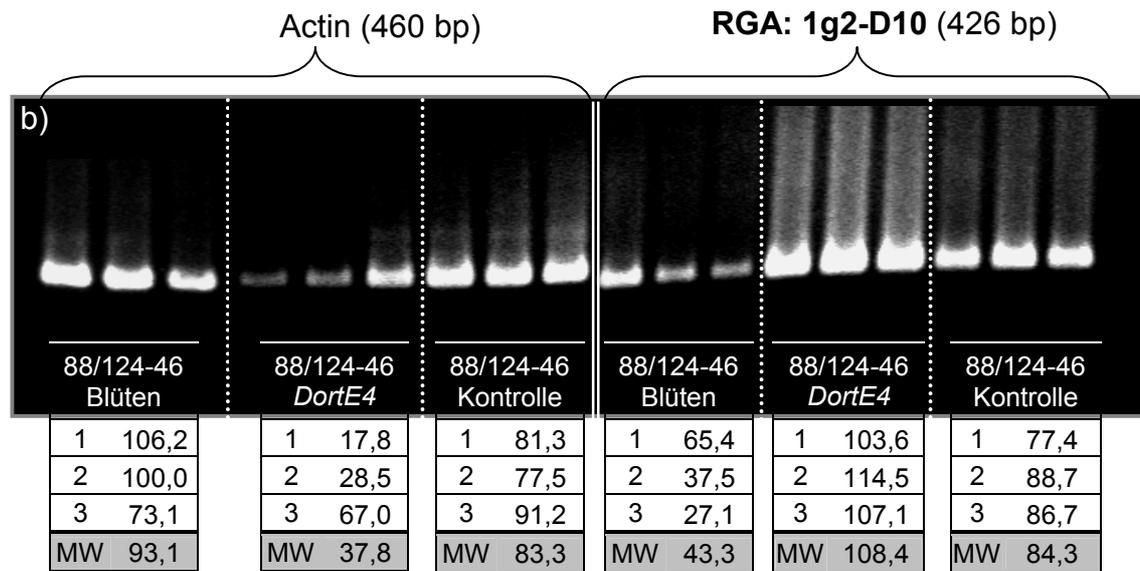
Von den vier untersuchten LZ-RGA zeigten zwei keine, die anderen beiden eine geringfügig höhere Expressionsrate in der *DortE4*-Variante. Die Steigerung des Expressionsniveaus der TIR-RGA war mindestens doppelt bis mehr als fünfmal so hoch wie bei den LZ-RGA. Die Komplexität der RGA-Loci korrelierte nicht mit dem Expressionsniveau, d. h. es gab sowohl ‚multicopy‘ Loci, die sehr niedrig exprimiert waren (z. B. 11a-H10), als auch ‚single-‘ oder ‚lowcopy‘ Loci mit relativ hoher Expression in den Kontrollblättern (11a-G11, 11a-G16). Bei den RGA, deren Expression in den infizierten Blättern um ein 8-faches höher war gegenüber der Kontrolle, handelte es sich um ein genomisches und ein exprimiertes RGA der TIR-Gruppe, von denen ersteres als ‚multicopy‘, letzteres als ‚singlecopy‘ Locus im Genom vorlag.



∅ relative Expression 11a-G8:

	K	I	BI
S/A	1,0	1,5	0,0

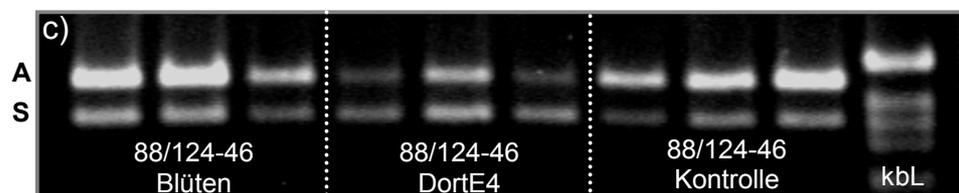
Abb. 20 a: Relative Expressionsstärke von RGA 11a-G8 in Blättern und Blüten des Rosengenotyps 88/124-46, ermittelt in semiquantitativen RT-PCRs mit spezifischen Primern und Actin-Primern als interne Kontrolle (jeweils drei Wiederholungen abgebildet). Kontrolle: gesundes Blattgewebe/ *DortE4*: Blattgewebe zwei Tage nach Inokulation mit dem Sternrußtau-Isolat *DortE4*.



∅ relative Expression 1g2-D10:

	K	I	Bl
S/A	1,0	2,9	0,5

RGA: 3a-C2

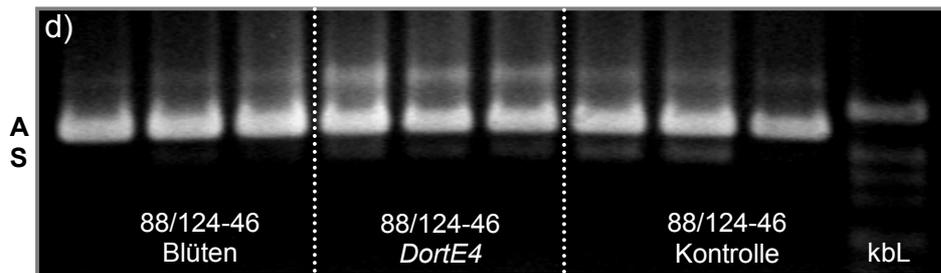


∅ relative Expression 3a-C2:

	S	A	S/A
K	14,2	44,8	0,3
I	17,6	14,8	1,2
Bl	20,2	52,4	0,4

Abb. 20 b - c: Relative Expressionsstärke von RGA 1g2-D10 (b) und RGA 3a-C2 (c) in Blättern und Blüten des Rosengentyps 88/124-46, ermittelt in semiquantitativen RT-PCRs mit spezifischen Primern und Actin-Primern als interne Kontrolle (jeweils drei Wiederholungen abgebildet). Kontrolle: gesundes Blattgewebe/ *DortE4*: Blattgewebe zwei Tage nach Inokulation mit dem Sternrußtau-Isolat *DortE4*. A: Actin-Primer; S: spezifischer Primer; kBL: 1 kB-Leiter (Längenstandard).

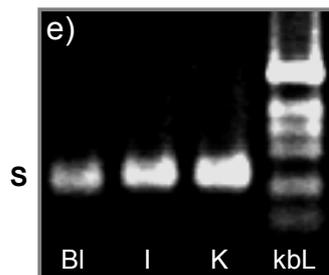
RGA: 11a-H10



∅ relative Expression 11a-H10:

	S	A	S/A
K	6,9	44,8	0,2
I	7,6	41,7	0,2
Bl	5,3	44,7	0,1

RGA: 11a-G16

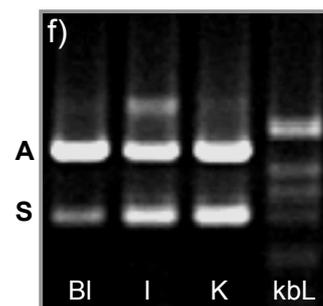


∅ relative Expression 11a-G16:

	S	A*	S/A
K	34,9	48,0	0,7
I	31,0	28,3	1,1
Bl	20,5	39,7	0,5

* Mittelwerte aus je 6 Wdh.
bei 59 °C

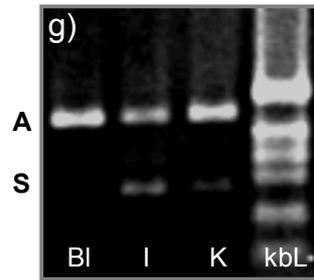
RGA: 11a-G11



∅ relative Expression 11a-G11:

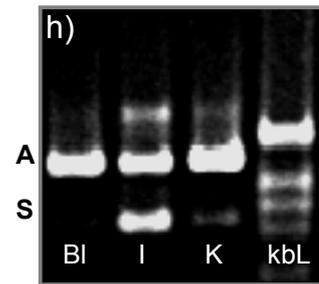
	S	A	S/A
K	68,9	86,9	0,8
I	49,4	63,0	0,8
Bl	22,8	88,0	0,3

Abb. 20 d - f: Relative Expressionsstärke von RGA 11a-H10 (d), RGA 11a-G16 (e) und RGA 11a-G11 (f) in Blättern und Blüten des Rosengenotyps 88/124-46, ermittelt in semiquantitativen RT-PCRs mit spezifischen Primern und Actin-Primern als interne Kontrolle. A: Actin-Primer; S: spezifischer RGA-Primer; K: gesundes Blattgewebe als Kontrolle; I: Blattgewebe zwei Tage nach Inokulation mit dem Sternrußtau-Isolat *DortE4*; Bl: Blüten; kbL: 1 kb-Leiter (Längenstandard).

RGA: 3g1-P13

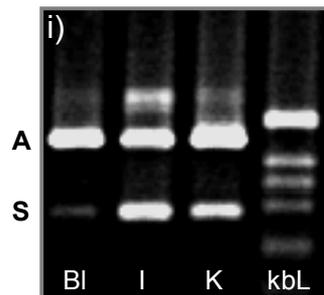
∅ relative Expression 3g1-P13:

	S	A	S/A
K	3,3	18,8	0,2
I	6,1	5,8	1,1
BI	0,0	12,9	0,0

RGA: D1-B1

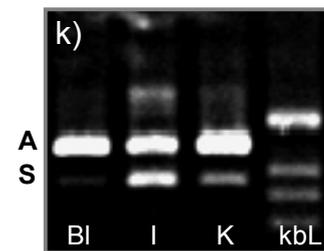
∅ relative Expression D1-B1:

	S	A	S/A
K	3,9	58,0	0,1
I	26,7	35,2	0,8
BI	0,0	46,0	0,0

RGA: D1-N1

∅ relative Expression D1-N1:

	S	A	S/A
K	17,8	51,5	0,3
I	25,9	30,3	0,9
BI	1,5	41,4	0,0

RGA: D1-D13

∅ relative Expression D1-D13:

	S	A	S/A
K	9,4	44,5	0,2
I	18,3	26,3	0,7
BI	0,0	37,9	0,0

Abb. 20 g - k: Relative Expressionsstärke von RGA 3g1-P13 (g), RGA D1-B1 (h), RGA D1-N1 (i) und RGA D1-D13 (k) in Blättern und Blüten des Rosengenotyps 88/124-46, ermittelt in semiquantitativen RT-PCRs mit spezifischen Primern. A: Actin-Primer; S: spezifischer RGA-Primer; K: gesundes Blattgewebe als Kontrolle; I: Blattgewebe zwei Tage nach Inokulation mit dem Sternrußtau-Isolat *DortE4*; BI: 88/124-46 Blüten; kbL: 1 kb-Leiter (Längenstandard).

4 Diskussion

Die Identifizierung und genetische Charakterisierung von Resistenzgenen in Kulturpflanzen ist eine wichtige Grundlage für die Resistenzzüchtung. Über die genetische Charakterisierung hinaus gewinnt die Isolierung von Resistenzgenen zunehmend an Bedeutung, da mit dem interspezifischen Transfer von Resistenzgenen mithilfe gentechnischer Methoden der langwierige Prozess der Genübertragung durch klassische Rückkreuzung verkürzt werden könnte. Die Integration klonierter Resistenzgene in anfällige Genotypen hätte den Vorteil, dass gezielt Einzelgene übertragen werden könnten und unerwünschte Genomabschnitte des Donorelterns nicht erst in mehreren Generationen eliminiert werden müssten.

Zur Identifizierung von Resistenzgen-Kandidaten ist heterologe Hybridisierung mit klonierten Genen als Sonden aufgrund der geringen Gesamt-Sequenzähnlichkeit zwischen Resistenzgenen keine vielversprechende Strategie, (Leister et al. 1996, Shen et al. 1998). Dagegen ist die PCR-Amplifikation mit degenerierten Primern basierend auf konservierten Motiven von NBS-LRR-Genen eine sensitive und effiziente Methode zur Klonierung von Resistenzgenanaloga (RGA), die potentielle Resistenzgen-Kandidaten darstellen (Yu et al. 1996).

Im sogenannten RGA-Ansatz ist es einer Vielzahl von Autoren gelungen, RGA aus unterschiedlichsten Pflanzenarten zu klonieren und z. T. deren Beteiligung an Resistenzreaktionen gegen verschiedene Pathogene nachzuweisen.

In *Arabidopsis* beispielsweise erwies sich ein TIR-NBS-LRR-RGA als Teil des klonierten *RPP5*-Gens gegen *Peronospora parasitica*, den Erreger des Falschen Mehltaus (Aarts et al. 1998).

Dodds et al. (2001) konnten durch transgene Komplementation nachweisen, dass es sich bei einem TIR-NBS-LRR-RGA aus Flachs, das mit dem *N*-Locus cosegregierte, tatsächlich um das Rost-Resistenzgen *N* handelte.

4.1 Klonierung der Rosen-RGA und Sequenzanalyse

In der vorliegenden Studie wurden mit degenerierten Primern, die auf der Basis konservierter Motive innerhalb der ‚Nucleotide Binding Site‘ (NBS) von NBS-LRR-Resistenzgenen entworfen wurden, exprimierte und genomische RGA der TIR- und LZ-NBS-LRR-Gruppe aus Rosen isoliert.

Es wurde eine RGA-Bank, bestehend aus rund 7000 Klonen, die mit sieben verschiedenen Primerkombinationen isoliert wurden, angelegt.

Ein Ziel der vorliegenden Studie war die möglichst vollständige Charakterisierung der im Rosengenom vorhandenen NBS-LRR-RGA.

Eine höhere Pflanze enthält mindestens 20.000 Gene (Kaul et al. 2000). Das nahezu komplett sequenzierte Reisgenom umfasst zwischen 32.000 und 50.000 Gene, wovon ca. 600, also etwa 1 - 2 %, NBS-Sequenzen sind (Goff et al. 2002). Im *Arabidopsis*genom existieren ca. 150 NBS-Gene, was rund 1 % der Gesamtanzahl der Gene entspricht (Meyers et al. 2003, Richly et al. 2002). Young (2000) schätzt die Anzahl der NBS-Gene in Pflanzen auf mehrere hundert bis zu über tausend.

Die Anzahl der Gene in Rosen ist bislang nicht bekannt, nimmt man aber die in anderen Pflanzen als Schätzwerte, so könnte das Rosengenom zwischen 200 und 1000 NBS-Sequenzen enthalten, was 1 - 2 % von 20.000 - 50.000 Genen insgesamt entspräche. Die Rosen-RGA-Bank besteht aus 7000 Klonen, also siebenmal so vielen wie die maximale geschätzte Anzahl an NBS-Genen im Rosengenom. Zwar sind Wiederholungen und Ungleichgewichte unter den Klonen nicht auszuschließen, doch durch die große Klonanzahl ist die maximale Wahrscheinlichkeit gegeben, den Satz an NBS-Sequenzen in Rosen möglichst komplett erfasst zu haben.

Um die umfangreiche Klonbank hinsichtlich der RGA-Diversität bei gleichzeitiger Minimierung des Arbeits- und Zeitaufwandes möglichst vollständig zu charakterisieren, wurde ein kombinierter Prozess aus Sequenzierung und Kolonie-Hybridisierung in drei aufeinanderfolgenden Runden angewendet. In der ersten Runde wurde eine Auswahl der Klone sequenziert und einige davon als radioaktiv markierte Sonden gegen die Bank hybridisiert, um die doppelte Sequenzierung identischer RGA zu vermeiden. Nur solche Kandidaten, die nicht mit den eingesetzten RGA-Sonden hybridisierten, wurden in der nächsten Runde sequenziert.

Collins et al. (1998) nutzten ebenfalls das Verfahren der Kolonie-Hybridisierung, um potentiell neue RGA aus einer Klonbank mit 700 Mais-RGA zu identifizieren. Durch die Kolonie-Hybridisierung wurden alle Sequenzen erfasst, die auf DNA-Ebene zu mindestens 80 % mit der Sonde identisch waren. Daher ist dieser Schwellenwert für die Einteilung der Rosen-RGA in Familien verwendet worden. Auch Mago et al. (1999) und Collins et al. (2001) teilten ihre RGA aus Reis und Gerste auf der Basis von Kolonie-Hybridisierungen in Subgruppen ein. In der Literatur variieren die Grenzwerte der Aminosäuresequenz-Identität für die Bildung von RGA-Familien. Kuhn et al. (2003) benutzte ebenfalls einen Grenzwert von 80 % für die Einteilung seiner Kakao-RGA, wohingegen bei anderen Autoren niedrigere Werte zwischen 70 und 75 % zu finden sind (Liu et al. 2003, Madsen et al. 2003, Bai et al. 2002, Noir et al. 2001).

Von den insgesamt 137 sequenzierten Rosen-Klonen handelte es sich bei 122 um RGA-Sequenzen, was einem prozentualen Anteil von 89 % entspricht. Verglichen mit den Ergebnissen anderer Autoren war der RGA-Anteil verhältnismäßig hoch. Bei Bertioli et al. (2003) waren mehr als die Hälfte der klonierten *Arachis*-Sequenzen keine RGA. Bei Madsen et al. (2003) und Brotman et al. (2002) betrug der Anteil an Nicht-RGA unter den isolierten Klonen aus Gerste bzw. Melone sogar zwischen 75 und 80 %. Manche Autoren wendeten die ‚Nested‘-PCR Strategie zur Erhöhung der Spezifität bei der RGA-Isolierung an, d. h. sie setzten die in der ersten Runde amplifizierten PCR-Produkte für eine zweite PCR-Amplifikation als Template mit internen Primern ein (Liu et al. 2003, Collins et al. 1998).

Die degenerierten Primer, die zur Amplifikation der RGA verwendet werden, scheinen einen entscheidenden Einfluss auf die „RGA-Ausbeute“ zu haben. Unter den 29 analysierten, mit den gruppenunspezifischen ‚DERES‘-Primern isolierten Sequenzen, war keine einzige Nicht-RGA-Sequenz. Die Effizienz dieser Primer zur Isolierung von Rosen-RGA war also hoch. Einen entscheidenden Beitrag zu der hohen „RGA-Ausbeute“, die mit diesen Primern erzielt wurde, kann aber auch die Verwendung von RNA als Substrat bei der PCR-Amplifikation gehabt haben, da mit dieser Methode nur

exprimierte, funktionelle Gene erfasst und Pseudogene ausgeschlossen wurden.

Mit den DERES-Primern, die mit den gruppenunspezifischen ‚P-Loop/ GLPL‘-Motiven hybridisierten und somit gleichermaßen RGA der TIR- und LZ-Gruppe isolieren sollten, wurden zu über 80 % TIR-RGA isoliert. Diese vermehrte Isolation von TIR-NBS-LRR-RGA durch ‚P-Loop/ GLPL‘-Primer wurde bereits von verschiedenen Autoren beschrieben (Di Gaspero und Cipriani 2003, Lee et al. 2003, Kanazin et al. 1996). Bertioli et al. (2003) vermutet als Ursache Konkurrenz bei der PCR, da mehr TIR- als LZ-RGA im Genom vorhanden sind.

In Getreide eignen sich ‚P-Loop/ GLPL‘-Primer nicht zur Isolierung von RGA, da das ‚GLPL‘-Motiv vermutlich hier nicht vorhanden ist (Maleki et al. 2003). Auch in Kaffee und Kakao war die „RGA-Ausbeute“ mit ‚P-Loop/ GLPL‘-Primern mit jeweils um die 15 % gemessen an der Gesamtanzahl sequenzierter Klone sehr gering (Kuhn et al. 2003, Noir et al. 2001). Bisher wurden in beiden Arten ausschließlich LZ-RGA isoliert und es liegt die Vermutung nahe, dass keine TIR-RGA im Kakao- und Kaffeegenom vorhanden sind. Somit sind die primär TIR-RGA-amplifizierenden ‚P-Loop/ GLPL‘-Primer zur RGA-Isolierung in diesen Arten wenig geeignet und es sollten vielmehr LZ-spezifische Primer verwendet werden, die mit LZ-spezifischen konservierten Motiven hybridisieren.

Bei den mit den TIR- bzw. LZ-spezifischen degenerierten Primern isolierten Rosen-Sequenzen war der Anteil an Nicht-RGA mit 13 bzw. 15 %, gemessen an der Gesamtanzahl sequenzierter Klone, äquivalent. Die TIR-/ LZ-Spezifität der Primer, die durch die Anbindung an TIR- bzw. LZ-spezifische konservierte Motive erzielt werden sollte, war bei den TIR-spezifischen Primern zu 100 %, bei den LZ-spezifischen zu 93 % gegeben.

4.2 Diversität und Phylogenie

Mit der angewendeten Technik der Kolonie-Hybridisierung wurde die RGA-Bank zu 67 % charakterisiert, d. h. es ist darin durchaus noch ein erhebliches Potential an möglichen neuen RGA-Kandidaten enthalten.

Die Bank wurde in Abhängigkeit von der Spezifität der zur RGA-Isolierung verwendeten Primer in drei Teilbanken untergliedert. Während die LZ-RGA-Teilbank mit drei verschiedenen Sonden zu 76 % charakterisiert werden konnte, identifizierten zwölf verschiedene Sonden, ausgenommen der DERES-Sonden, nur etwas mehr als die Hälfte der TIR-RGA-Klone, ausgenommen der DERES-Klone. Die Sequenzen in der TIR-RGA-Teilbank waren also weitaus diverser als die LZ-Sequenzen.

Die mit den universellen DERES-Primern isolierten RGA wurden nicht mit den anderen TIR-Sequenzen zusammengefasst, da sie in erster Linie mit Klonen der eigenen Variante hybridisierten und somit eine Art Sonderstellung einnahmen. Die Diversität unter den DERES-Klonen, die alle aus Rosen-RNA isoliert wurden, war relativ gering. Mehr als die Hälfte gehörte zur großen TIR-I Familie.

Auch unter den mit den Primerkombinationen 3 und 11 isolierten RGA gab es Kandidaten, die entscheidend häufiger unter den cDNA-Klonen vertreten waren als unter den genomischen, was die vermehrte Transkription bestimmter RGA in Rosenblättern andeutet.

Die mit den ‚P-Loop/ GLPL‘-Primern (DERES) isolierten RGA unterschieden sich verhältnismäßig stark von den anderen RGA, welche mit Primern auf der Basis des ‚P-Loop‘- und des TIR- bzw. LZ-spezifischen ‚RNBS-D‘-Motivs isoliert wurden. Das deutet darauf hin, dass mit verschiedenen Primerkombinationen offensichtlich unterschiedliche Spektren von RGA erfasst werden. Selbst bei den mit den TIR-spezifischen Primerkombinationen 1, 3 und 4 isolierten RGA zeigte sich, dass sich die 3-er RGA deutlich von den 1-er und 4-er RGA unterscheiden, obwohl die Primersequenzen bis auf wenige Nukleotidaustausche sehr ähnlich waren und mit denselben Motiven hybridisierten. Zur Isolierung des möglichst vollständigen Satzes aller im Genom vorhandener RGA ist es also sinnvoll, mehrere verschiedene Primerkombinationen zu verwenden. Dazu sind zum einen solche, die an verschiedene konservierte Motive hybridisieren, als auch solche, die an dieselben Motive binden und sich in einzelnen Nukleotiden oder im Degeneriertheitsgrad unterscheiden, einzusetzen (Shen et al. 1998).

In allen Rosen-RGA ließen sich die konservierten Motive wiederfinden, die auch in den NBS-Regionen anderer Resistenzgene enthalten sind. Die ‚Kinase 2‘-Domäne enthielt in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit der RGA einen terminalen Asparaginsäure- bzw. Tryptophanrest. Anhand dieses Kriteriums können die RGA in die jeweilige NBS-Gruppe sicher eingeordnet werden und es kann als Primermotiv zur spezifischen Amplifikation von RGA einer bestimmten Gruppe genutzt werden (Bertioli et al. 2003, Hunger et al. 2003, López et al. 2003 a, Meyers et al 1999).

Insgesamt wurden 40 unterschiedliche Rosen-RGA-Familien mit weniger als 80 % Aminosäuresequenz-Übereinstimmung identifiziert. Siebenundzwanzig davon gehörten der TIR- und 13 der LZ-Gruppe an, d. h. es wurden doppelt so viele TIR-RGA identifiziert wie LZ-RGA.

TIR-RGA kommen im Pflanzengenom weit häufiger vor als LZ-RGA (Ellis et al. 2000, Meyers et al. 1999). Bei den insgesamt rund 150 NBS-LRR-Genen in *Arabidopsis* übersteigt der Anteil der TIR-Sequenzen den der LZ-Sequenzen um das Dreifache (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000).

Da in der Rosen-RGA-Bank noch ein erhebliches Potential an neuen TIR-RGA steckt, ist zu vermuten, dass im Rosengenom ein ähnliches Zahlenverhältnis zwischen TIR- und LZ-Sequenzen vorliegt wie bei *Arabidopsis*.

Die durchschnittliche Aminosäuresequenz-Identität zwischen den LZ-RGA untereinander war ebenso niedrig wie die zwischen LZ- und TIR-RGA. Die prozentuale Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Mitgliedern der TIR-Gruppe hingegen war nahezu doppelt so hoch.

In der RGA-Bank war also die Gesamtdiversität der LZ-RGA geringer als die der TIR-RGA, die Distanz zwischen den einzelnen Mitgliedern war jedoch bei der LZ-Gruppe erheblich größer.

Das unbewurzelte Dendrogramm der unterschiedlichen Rosen-RGA mit vier NBS-LRR-Resistenzgenen zeigt die eindeutige phylogenetische Trennung der TIR- und LZ-RGA wie sie von vielen verschiedenen Autoren ebenfalls beschrieben wurde (Pan et al. 2000, Kanazin et al. 1996, Yu et al. 1996).

Dabei weist die LZ-Gruppe gegenüber der TIR-Gruppe längere Astlängen auf, was auf eine größere Distanz der Sequenzen zueinander hindeutet und sich mit den Ergebnissen der Sequenzanalysen deckt.

Dieselben Beobachtungen wurden von Lopéz et al. (2003) mit RGA aus *Cassava* und Cannon et al. (2002) in einer umfangreichen phylogenetischen Studie mit RGA aus 30 Gattungen und neun Familien gemacht. Letztere schlossen aus der größeren Homogenität innerhalb der TIR-Subfamilie, dass entweder die Auseinanderentwicklung der TIR-RGA später stattgefunden hat, sie größeren Zwängen und selektivem Druck ausgesetzt waren oder die Evolution insgesamt gleichförmiger verlief als die der LZ-Subfamilie.

Die Rosen-RGA hatten eine prozentuale Aminosäuresequenz-Identität von 19 - 42 % mit Resistenzgenen der NBS-LRR-Klasse. Dabei waren die TIR-RGA deutlich ähnlicher zu den TIR-NBS-LRR-Genen *N* und *M* als zu *Xa1* und *RPM1*, die der LZ-Gruppe angehören, und umgekehrt.

Die prozentualen Aminosäure-Ähnlichkeiten der Rosen-RGA zu Resistenzgenen lagen im selben Bereich wie sie eine Reihe von Autoren für verschiedene Kulturen gezeigt hat: Rivkin et al. (1999) für *Phaseolus vulgaris*-RGA (22,5 - 45 %), Vicente und King (2001) für *Brassica oleracea*-RGA (31 - 56 %), Graham et al. (2000) und Kanazin et al. (1996) für *Glycine max*-RGA (30 - 39 % bzw. 30 - 66 %), Deng et al. (2000) für *Citrus*-RGA (18 - 48 %), Shen et al. (1998) für RGA aus *Lactuca sativa* (19 - 44 %), Di Gaspero und Cipriani (2002) für RGA aus *Vitis vitifera* (31 - 51 %).

Im bewurzelten Phylogramm der Rosen-RGA mit Resistenzgenen bzw. RGA aus anderen Pflanzen ist die phylogenetische Trennung von TIR- und LZ-NBS-LRR-RGA zu 100 % abgesichert. Die LZ-Gruppe umfasst RGA aus mono- und dikotylen Pflanzen, wohingegen die TIR-Gruppe ausschließlich RGA aus Dikotylen enthält, was sich mit den Beobachtungen von Meyers et al. (1999) und Pan et al. (2000 b) deckt. Es stellt sich die Frage, ob TIR-NBS-LRR-Gene nach der Trennung der Samenpflanzen nur in Dikotylen entstanden sind. Da aber TIR-Sequenzen in Gymnospermen vorhanden sind und ihren Ursprung somit vor deren Trennung von den Angiospermen haben müssen, sind sie vermutlich in Monokotylen im Zuge der Evolution „verloren“ gegangen (Pan et al. 2000 b).

Die deutliche Abgrenzung des TIR-NBS-LRR-Gens *M* aus Flachs von den übrigen TIR-RGA ist auch in den Stammbäumen der phylogenetischen Studien von Cannon et al. (2002) und Lee et al. (2003) zu beobachten, wobei das *M*-Gen dort jeweils zusammen mit dem Flachs-*L6*-Gen clustert, welches hier nicht in die Analysen miteinbezogen wurde.

In beiden NBS-LRR-Gruppen gab es Rosen-RGA, die mit hohen Bootstrap-Werten engere verwandtschaftliche Beziehungen zu RGA aus verschiedenen anderen Pflanzen aufwiesen als zu den übrigen RGA aus Rosen, woraus sich schließen lässt, dass sich die Resistenzgene bzw. RGA aus einem vor der Arttrennung existierenden, gemeinsamen Vorfahren entwickelt haben. Auch die Ergebnisse von Tian et al. (2003) zeigten, dass Zuckerrüben-RGA ähnlicher zu Resistenzgenen aus *Arabidopsis* und anderen Angiospermen waren als untereinander. Tian et al. (2003) postulieren einen gemeinsamen Vorfahren aller Resistenzgene und glauben ebenso wie Pan et al. (2000 a),

dass die moderne Vielfalt der NBS-LRR-Resistenzgene aus wenigen angestammten Loci hervorgegangen ist. Die Ausbreitung einer begrenzten Anzahl angestammter Gene, die sich in den einzelnen Pflanzenarten unterschieden, kann zur Degeneration oder sogar zum kompletten Verlust bestimmter Loci in einigen Arten geführt haben (Noir et al. 2001, Pan et al. 2000 a). Diese Theorie könnte die Abwesenheit von TIR-NBS-LRR Sequenzen in Getreide, Kaffee und Zuckerrübe erklären.

Neben den heterogenen Clustern von RGA aus Pflanzen unterschiedlicher Familien, traten mehrere Cluster auf, die ausschließlich RGA aus *Rosaceae* enthielten. Folgende Hypothesen können das Auftreten der reinen *Rosaceae*-RGA-Cluster erklären:

- 1.) Die orthologen Sequenzen in anderen Arten sind noch nicht identifiziert und in die Gen- bzw. Proteindatenbanken gestellt worden.
- 2.) Einige RGA haben sich nach der Abtrennung der *Rosaceae* von den anderen *Dicotyledonae* entwickelt und innerhalb der Familie hat dann eine Konservierung der RGA-Motive stattgefunden.

Von *Arabidopsis* und Reis sind die Genome komplett sequenziert (Meyers et al. 2003, Goff et al. 2002, Richly et al. 2002) und der komplette Satz an NBS-LRR-Genen ist in den Datenbanken verfügbar. Nach den Ergebnissen der *BLAST*-Analyse ist also davon auszugehen, dass in *Arabidopsis* und Reis keine orthologen Sequenzen für die zusammen clusternden *Rosaceae*-RGA existieren. Das könnte ein Indiz für die „Echtheit“ der *Rosaceae*-Cluster sein, was die zweite Hypothese unterstützen würde.

Ein Rosen-RGA der TIR-Gruppe war eng verwandt mit einem RGA aus *Pinus*. Auch Liu et al. (2003), Cannon et al. (2002) und Meyers et al. (2002) berichteten über enge verwandtschaftliche Beziehungen zwischen RGA aus Gymnospermen und Angiospermen. Das könnte auf die Existenz eines gemeinsamen Vorfahren dieser RGA vor der Teilung der Samenpflanzen vor rund 275 - 300 Millionen Jahren hindeuten.

Bei den meisten Verzweigungen im Phylogramm waren die Bootstrap-Werte zu gering, um eine gesicherte Aussage bezüglich der exakten verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den einzelnen RGA zuzulassen.

Auffällig war jedoch, dass sich das Cluster aus zehn Rosen-RGA der TIR-Gruppe unabhängig von dem zur Berechnung angewandten Algorithmus (Parsimony oder Distanzmatrix) und der eingestellten Berechnungsparameter immer wieder zusammen fand (nicht dargestellt). Geht man wiederum davon aus, dass die *BLAST*-Analyse vollständig war und keine orthologen Sequenzen in den Datenbanken „übersehen“ wurden, könnte dies ein Indiz dafür sein, dass es neben den vor der Arttrennung existierenden RGA auch solche gibt, die sich nach der Entstehung der Gattung *Rosa* entwickelt haben.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass es für die Evolution der Rosen-RGA wahrscheinlich mindestens vier verschiedene Startpunkte gab:

1. vor der Trennung der Gymnospermen und Angiospermen,
2. vor der Abtrennung der *Rosaceae* von den anderen Angiospermen,
3. nach der Abtrennung der *Rosaceae* von den anderen *Rosidae*,
4. nach der Abtrennung der Gattung *Rosa* von den anderen *Rosaceae*.

Auch Meyers et al. (1999) kamen in ihrer umfangreichen phylogenetischen Studie mit über 400 NBS-codierenden Sequenzen aus Mono- und Dikotylen zu dem Schluss, dass einige davon vor, andere nach der Artbildung entstanden sein müssen.

4.3 Kopienzahl einzelner RGA im Genom

Die zwölf auf ihre Kopienzahl hin untersuchten RGA lagen im Rosengenom als ‚single-‘, ‚low-‘ oder ‚multicopy‘ Loci vor.

In keinem Fall kam es zur Kreuzhybridisierung zwischen den Rosen-RGA-Sonden und *P. cerasus*-DNA, d. h. die Sequenzähnlichkeit zwischen den acht untersuchten Rosen-RGA und eventuell vorhandener analoger Sequenzen in Kirsche beträgt weniger als 80 %.

Wie zu erwarten war die Kopienzahl der einzelnen RGA in den beiden *R. multiflora*-Hybriden in der Regel sehr ähnlich. Bei den ‚multicopy‘ Loci ähnelte zudem das *R. rugosa* Hybridisierungsmuster dem der *R. multiflora*-Hybriden auffallend, während in *R. roxburghii* in allen Fällen die Kopienzahl niedriger war. Diese Beobachtung lässt sich bei Betrachtung des Verwandtschaftsgrades der drei Arten erklären: *R. rugosa* und *R. multiflora* gehören zwar zu unterschiedlichen Sektionen (*Cinnamomeaea* bzw. *Synstylae*; Krüssmann 1986), jedoch zu derselben Untergattung (*Eurosa*), wohingegen *R. roxburghii* der Untergattung *Plathyrhodos* angehört und somit von den anderen beiden Arten genetisch weiter entfernt ist. In *R. roxburghii* sind offensichtlich im Zuge der Evolution einige Kopien der untersuchten RGA-Loci unter die 80 % Schwelle gerutscht, so dass keine Kreuzhybridisierung stattfindet.

Zwischen der RGA-Gruppierung im Phylogramm bzw. der Größe der RGA-Familien in der Bank und Kopienzahl der RGA im Rosengenom wurde keine Korrelation festgestellt. Das heißt, dass RGA, die große Subgruppen aus identischen oder ähnlichen Sequenzen bilden, sind im Genom nicht zwangsläufig als ‚multicopy‘ Loci organisiert und solche mit einer sehr geringen Kopienzahl in der Bank liegen nicht immer als genomische ‚singlecopy‘ Loci vor. Wang und Xiao (2002) kamen bei ihrer Untersuchung von RGA aus Reis ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Komplexität der RGA-Loci nicht mit der phylogenetischen Gruppierung im Stammbaum in Zusammenhang steht.

4.4 Lage und Anordnung der RGA im Rosengenom

RGA sind im pflanzlichen Genom in großer Anzahl vorhanden. Das komplett sequenzierte Arabidopsisgenom besteht zu etwa 1 % aus NBS-LRR-Genen, von denen mindestens elf als funktionell aktive Resistenzgene identifiziert worden sind (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000). Im Reisgenom sind ungefähr 600 NBS-LRR-Gene vorhanden, die ausschließlich der Nicht-TIR-Gruppe angehören (Goff et al. 2002).

Die vorliegende Studie zeigte, dass auch im Rosengenom NBS-LRR-RGA in großer Anzahl präsent sind. Eine Vielzahl wurde auf den Chromosomenkarten der beiden Rosen-Kartierungspopulationen kartiert.

In der Population 94/1 waren mit Ausnahme von Kopplungsgruppe 3 alle Chromosomen mit RGA besetzt. In der Population 97/7 wurden zwar lediglich auf vier der sieben Kopplungsgruppen RGA identifiziert, allerdings war die Anzahl der kartierten RGA, trotz vergleichbarer Anzahl an RGA-Markern, hier um nahezu die Hälfte geringer als in der Population 94/1. Die RGA, die in der Population 94/1 auf KoGr 2 und 6 lagen, konnten in der Population 97/7 aufgrund mangelnder Aufspaltung bisher nicht kartiert werden. Da die 14 doppelt kartierten RGA in beiden Populationen auf den gleichen Kopplungsgruppen lagen, ist aber zu vermuten, dass auf den Chromosomen 2 und 6 der Population 97/7 auch RGA lokalisiert sind, für die die beiden Eltern aber keine Polymorphismen aufweisen.

In beiden Populationen wurde eine Konzentrierung der RGA-Loci auf zwei der sieben Kopplungsgruppen beobachtet, was sich mit der Verteilung der RGA im Arabidopsisgenom deckt. Auch hier existieren auf zwei der fünf Chromosomen sogenannte ‚Supercluster‘, wohingegen auf den drei anderen Chromosomen kaum RGA lokalisiert sind (Meyers et al. 2003, Richly et al. 2002).

In den SSCP-Analysen zeigte sich, dass es sich bei den Rosen-RGA in 75 % aller Fälle um komplexe Loci handelte. Auch die beiden zuvor durch Southern-blot-Analysen als ‚lowcopy‘ identifizierten RGA zeigten ein komplexes Bandenmuster mit mehr als 10 potentiellen Loci.

Dass diese RGA in den Southern-blot-Analysen weniger als fünf Hybridisierungssignale erzeugten und damit in die Kategorie der ‚lowcopy‘ Loci fielen, mag daran gelegen haben, dass die *EcoRI*- bzw. *HindIII*-Schnittstellen im Genom nicht optimal verteilt waren und die geclusterten Multigenfamilien nicht getrennt werden konnten. Die Anzahl der Hybridisierungssignale ist bei der Southern-blot-Technik ein Schätzwert und gibt nicht die tatsächliche Anzahl der Loci im Genom wieder. Zum einen können, wie bei den als ‚lowcopy‘ identifizierten RGA, Kopien „unterschlagen“ werden, wenn nicht genügend Enzymschnittstellen vorhanden sind. Zum anderen kann es auch vorkommen, dass eine Schnittstelle genau in einem Genfragment liegt, so dass man zwei Signale erhält, obwohl im Genom nur eine Kopie vorliegt.

Nur 9 % der analysierten RGA zeigten vier Banden, wie man es mit der SSCP-Technik in einer diploiden Population für einen ‚singlecopy‘ Locus maximal erwarten würde. Da aber nur die „trennbaren“ Banden als RGA-Marker gewertet wurden, d. h. solche, bei denen in mindestens einem Individuum ein Rekombinationsereignis stattgefunden hat und die sich somit vom Aufspaltungsverhältnis der anderen Loci unterschieden, fiel die tatsächliche Anzahl an kartierten RGA-Loci deutlich geringer aus. Nur 15 bzw. 30 % der potentiellen Loci erwiesen sich in den Populationen 94/1 bzw. 97/7 als polymorph und durch Rekombination trennbar. Der doppelt so hohe Anteil an trennbaren Loci in der Population 97/7 ergab sich wahrscheinlich aus der 2,4-fach höheren Individuenzahl, die hier in die SSCP-Analyse miteinbezogen worden ist. Dadurch konnten auch seltenere Rekombinationsereignisse zwischen zwei Loci detektiert werden.

Die Kartierung der Rosen-RGA wurde mit der SSCP-Technik mit spezifischen Primern durchgeführt. Quint et al. (2003) beschreiben die Unterscheidung zwischen homologen Sequenzen mit PCR-gestützten Verfahren als problematisch aufgrund der simultanen Amplifikation mehrerer Homologer. Tatsächlich ergab die Sequenzanalyse der mit den spezifischen Primern amplifizierten PCR-Produkte, dass die Differenzierung zwischen Mitgliedern einer RGA-Familie nicht möglich war. Wohl aber konnten die Mitglieder der unterschiedlichen RGA-Subgruppen differenziert werden. Bei den kartierten RGA ist also sicher, dass es sich um ein Mitglied der jeweiligen RGA-Familie handelt, die genaue Identität lässt sich jedoch nicht bestimmen.

Pflanzliche RGA sind im Genom zumeist in eng geclusterten Multigenfamilien organisiert (López et al. 2003 a, Meyers et al. 1998 b, Shen et al. 1998). So sind im Arabidopsisgenom 33 % der Resistenzgene paarweise angeordnet und 36 % in Clustern aus drei bis neun Mitgliedern (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000). Resistenzgencluster scheinen sich durch häufige Duplikationsereignisse und verschiedene Rekombinationsmechanismen schneller zu entfalten als andere Genomregionen (Richter und Ronald 2000, Leister et al. 1998) und werden als Reservoir der Pflanze zur Erzeugung neuer Resistenzspezifitäten bei veränderten Virulenzen angesehen (Noir et al. 2001, Ellis und Jones 1998).

Die Mitglieder eines RGA-Clusters ähneln sich häufig in ihrer DNA-Sequenz, woraus sich schließen lässt, dass sie durch Tandem-Duplikationen entstanden sind (Leister 2004, López et al. 2003 a). Im Arabidopsisgenom beispielsweise bestehen rund 75 % der RGA-Cluster aus RGA einer einzigen Subfamilie (Richly et al. 2002).

Eine ähnliche Tendenz ließ sich auch bei den Rosen-RGA beobachten. In den meisten Fällen lagen die RGA einer Subgruppe auf derselben Kopplungsgruppe, oftmals in geclustelter Anordnung. Besonders auffällig war das große LZ-I Cluster auf KoGr 7, das in beiden Populationen auftrat, sich über 9 bzw. 11 cM erstreckte und 19 bzw. 13 RGA-Loci umfasste. Dieses Cluster kann als ‚Hotspot‘-Region für bisher nicht charakterisierte Rosen-Resistenzgene angesehen werden.

In *Lactuca sativa* wurde ein großes Resistenzgencluster mit wenigstens zehn Resistenzspezifitäten identifiziert, welches sich genetisch über eine Region von 20 cM und physikalisch von 6 Mb erstreckt (Michelmore 1995).

Weniger häufig sind heterogene Cluster, in denen TIR- und LZ-RGA zusammen auftreten (Meyers et al. 1999). In *Medicago truncatula* und *Glycine max* wurden trotz Kartierung einer großen Anzahl von RGA keine gemischten Cluster mit Mitgliedern der TIR- und der LZ-Gruppe identifiziert (Zhu et al. 2002, Kanazin et al. 1996, Yu et al. 1996). In Rosen existieren TIR/ LZ-Mischcluster. Auf KoGr 4 der Population 94/1 deuteten zwei TIR- und ein LZ-RGA, die eine Region von 2,1 cM umspannten, auf ein heterogenes Cluster hin und das Cluster um den *Rdr1*-Locus auf KoGr 1 enthielt ebenfalls RGA beider Gruppen. Rivkin et al. (1999) fanden ein Cluster aus vier *Phaseolus vulgaris*-RGA, von denen zwei zur TIR- und zwei zur LZ-Gruppe gehörten.

Aus der Tatsache, dass in Leguminosen einige Genomregionen eng gekoppelte RGA-Cluster enthalten, deren Mitglieder alle eine hohe Sequenzidentität haben, wohingegen andere Cluster aus hochdiversen NBS-Sequenzen bestehen, schließen Rivkin et al. (1999), dass in Leguminosen

vielfältige Arten der Sequenzdispersion auftreten. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass Rivkins Schlussfolgerung nicht auf Leguminosen beschränkt ist, sondern auch auf Rosen zutreffen könnte.

Leister et al. (2004) bezeichnen den Evolutionsmechanismus, durch den heterogene Cluster entstehen, als ektopische Duplikation, d. h. die Duplikation von individuellen Genen oder kleinen Gengruppen an einen ungekoppelten Locus. Die Mechanismen, die dabei eine Rolle spielen, sind bislang allerdings noch ungeklärt.

Hulbert et al. (2001) vermuten, dass die Kopplung von NBS-LRR-Genen aus verschiedenen Subfamilien, welche Resistenz gegen das gleiche oder sogar gegen verschiedene Pathogene verleihen, positiver Selektion unterliegen, da ihre Cosegregation die allgemeine Fitness der Pflanze erhöht.

Neben der Tandem- und ektopischen Duplikation beschreibt Leister (2004) einen dritten Mechanismus der Genvervielfältigung. Bei der sogenannten segmentalen Duplikation werden ganze Blöcke von Genen von einem Chromosom auf ein anderes kopiert, was die Duplikation von Genen an einen neuen Genort zur Folge hat. Verglichen mit der ektopischen Duplikation ist die segmentale ein Ereignis von erheblich größerem Umfang.

In der Population 94/1 waren zwei Loci eines RGA der Subgruppe TIR-I auf zwei verschiedenen Chromosomen (KoGr 2 und 7) lokalisiert. Ein weiteres TIR-I-RGA war ebenfalls auf KoGr 2 lokalisiert, alle anderen Mitglieder dieser Subgruppe kartierten auf KoGr 7. Diese Verteilung der homologen Sequenzen auf verschiedenen Chromosomen könnte durch segmentale Duplikation erfolgt sein.

Leister (2004) beschreibt am Beispiel von *Arabidopsis* die verschiedenen Duplikations- und Rekombinationsmechanismen, die der Genevolution zugrunde liegen. Ob es sich dabei um ein begrenztes Modell handelt oder es als Musterbeispiel für die NBS-LRR-Genevolution allgemein verwendet werden kann, muss durch die Analyse der NBS-LRR-Genorganisation in anderen Pflanzengenomen geklärt werden. Im Rosengenom finden sich Beispiele, die darauf hindeuten, dass auch bei den Rosen-RGA alle drei Duplikationsmechanismen (Tandem-, ektopische und segmentale Duplikation) stattgefunden haben könnten. Das könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass das Modell von Leister auch für andere Gattungen zutreffend ist.

Die einzige bisher bekannte Funktion von NBS-Genen ist die Resistenz gegen bestimmte Pathogene (Di Gaspero und Cipriani 2003, Graham et al. 2002 a, Michelmore 2000, Meyers et al. 1999). RGA sind häufig in der Nähe von Resistenzgenen lokalisiert und für einige wurde bereits nachgewiesen, dass sie Teile funktioneller Resistenzgene sind (Dodds et al. 2001, Aarts et al. 1998, Collins et al. 1998, Speelman et al. 1998). In *Arabidopsis* wurden mindestens 21 Resistenzloci identifiziert, die mit RGA gekoppelt sind (Aarts et al. 1998).

Quint et al. (2003) schreiben den in der Nähe von Resistenzgenen lokalisierten RGA verschiedene Funktionen zu : Sie können (1) Resistenzgene für Isolat-spezifische Resistenzen sein, (2) als Pseudogene eine wichtige Quelle für die Evolution neuer Resistenzspezifitäten durch Rekombination oder Genkonversion mit funktionellen Genen darstellen oder (3) Rudimente bereits vergangener Resistenzen sein.

Neben der Korrelation zwischen RGA und qualitativen Resistenzgenen wurde deren gemeinsames Auftreten in Chromosomenregionen zusammen mit QTL für Resistenz gegen bestimmte Pathogene oft beschrieben (Backes et al. 2003, Ferrier-Cana et al. 2003, Pflieger et al. 2001, Kanazin et al. 1996).

Auch bei einigen Rosen-RGA konnte eine Assoziation mit dem Resistenzgen *Rdr1* gegen den Sternrußtau sowie mit einigen QTL für Resistenz gegen den Echten Mehltau hergestellt werden. In der vorliegenden Studie wurden auf Chromosom 1, auf dem das Sternrußtau-Resistenzgen *Rdr1* liegt, in der Population 94/1 zwölf, in der Population 97/7 sieben RGA-Loci identifiziert. Da die Population 94/1 nicht eindeutig für Sternrußtau-Resistenz aufspaltete, wurde das Resistenzgen indirekt über eng gekoppelte Marker kartiert. Die beiden *Rdr1*-Marker konnten nur in einem Elter kartiert werden, weshalb sich die Abstände der vom anderen Elter abgeleiteten RGA-Marker nicht absolut mit der *Rdr1*-Position vergleichen lassen. In einer Region von weniger als 10 cM centromerisch und telomerisch um die *Rdr1*-Marker wurden fünf RGA-Loci identifiziert, die zwar nicht in der unmittelbaren Region des Resistenzgens liegen und somit keine direkten Kandidaten darstellen, jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit Mitglieder des Resistenzgenclusters um *Rdr1* sind.

Die *Rdr1*-Region ist im Rahmen eines Projektes zur Positionsklonierung des Resistenzgens *Rdr1* bereits sehr detailliert charakterisiert worden. Kaufmann et al. (2003) konstruierten ein BAC-Contig aus *R. rugosa* um den Resistenzlocus, auf dem mindestens fünf TIR-NBS-LRR-RGA lokalisiert sind. Diese RGA cosegregieren in einer Population aus 540 Individuen mit dem Resistenzgen. Bei einem davon könnte es sich bereits um *Rdr1* handeln (Debener, persönliche Mitteilung).

In der Population 97/7 konnte das Sternrußtau-Resistenzgen direkt kartiert werden. Als dichteste Marker in einem Abstand von 10 und 11 cM centromerisch von *Rdr1* wurden zwei Loci eines LZ-RGA identifiziert, die vermutlich zu dem RGA-Cluster um den Resistenzlocus gehören. Um die *Rdr1*-Region hier näher zu charakterisieren, müsste die Karte in diesem Bereich dichter mit Markern abgesättigt werden. Dazu müssten mehr RGA in die Chromosomenkarte integriert werden, insbesondere solche, die in der Population 94/1 in der näheren Umgebung von *Rdr1* lokalisiert sind.

Auf Kopplungsgruppe 3 der Population 94/1, in der das Resistenzgen *Rpp1* gegen den Echten Mehltau angeordnet ist, wurden bisher keine RGA lokalisiert. Das kann zum einen darin begründet sein, dass noch nicht ausreichend RGA kartiert worden sind. Elf der 40 unterschiedlichen RGA konnten bisher nicht in die Chromosomenkarte für Population 94/1 integriert werden. Auch muss davon ausgegangen werden, dass der in dieser Studie charakterisierte Satz von RGA nur einen Teil der im Rosengenom vorhandenen NBS-LRR-Sequenzen darstellt. Nahezu 50 % der TIR-RGA-Teilbank und ca. 25 % der LZ-RGA-Teilbank sind bisher noch nicht charakterisiert.

Zum anderen ist es durchaus möglich, dass *Rpp1* nicht zur NBS-LRR-Klasse der Resistenzgene gehört. Dann wäre der Ansatz über NBS-LRR-RGA nicht geeignet, um dieses Gen zu erfassen. Falls *Rpp1* beispielsweise der Klasse der Serin-Threonin-Proteinkinase (STPK)-Gene angehörig wäre, könnte man durch Kartierung von STPK-RGA eventuelle Kandidatengene identifizieren,

wie es in anderen Pflanzen bereits vielen Autoren gelungen ist (Maleki et al. 2003, Rossi et al. 2003).

In der Population 97/7 sind einige RGA mit QTL gegen den Echten Mehltau korreliert. Bereits viele Autoren konnten eine solche Korrelation zwischen an Resistenz beteiligten QTL und RGA nachweisen (Ramalingam et al. 2003, Hunger et al. 2002, Toojinda et al. 2001, Zimnoch-Guzowska et al. 2000, Gentzbittel et al. 1998). Die in Regionen mit QTL für Resistenz lokalisierten RGA sind vermutlich direkt an der Abwehrreaktion beteiligt und gelten als gute Kandidaten für Resistenzgene (Zhang et al. 2001).

Die Vergleichbarkeit der beiden Chromosomenkarten ist begrenzt, da bisher zu wenig gemeinsame Marker als Ankerpunkte in beiden Kartierungspopulationen kartiert worden sind. Aufgrund der hohen Komplexität der RGA gestaltete es sich als schwierig, exakt dieselben Loci in den beiden Populationen zu kartieren. Die Positionen der RGA-Marker sind nicht absolut vergleichbar, da in erster Linie verschiedene Loci detektiert und kartiert wurden. Die 14 doppelt kartierten RGA, von denen die RGA-Marker abgeleitet worden sind, wurden aber in beiden Populationen auf den gleichen Kopplungsgruppen lokalisiert, was für die Zuverlässigkeit der Kartierungsergebnisse spricht.

4.5 Expressionsanalysen

Die Expression der Rosen-RGA sollte zunächst mit einem RGA-Makroarray analysiert werden, wie Hunger et al. (2003) dies bei Zuckerrüben-RGA für verschiedene Organe durchgeführt haben.

Mit der cDNA-Sonde, die aus mRNA synthetisiert wurde, schien die Makroarray-Technik zu funktionieren, da bei den beiden Actin-Kontrollen ein Hybridisierungssignal zu sehen war. Kein RGA hybridisierte mit der Rosen-cDNA, obwohl einige der RGA auf dem Array ursprünglich aus Rosen-RNA isoliert wurden und demnach eine wenngleich geringe Expression vorliegen muss.

Bellin et al. (2002) untersuchten die organspezifische Expression verschiedener Gene aus Zuckerrübe mit Hilfe eines Makroarrays. Seine Ergebnisse zeigten, dass das Detektionslimit dieser Technik bei 10 - 50 Einzeltranskript-Kopien pro Zelle liegt. Offensichtlich war die Kopienzahl der Rosen-RGA-Transkripte geringer, so dass sie mit der mäßig sensitiven Makroarray-Technik nicht detektiert werden konnten.

Verschiedene Autoren haben zuvor über das im allgemeinen niedrige Expressionsniveau von NBS-LRR-RGA berichtet (Graham et al. 2002 a, Micheltore 2002, Hammond-Kosack und Jones 1997).

Die meisten RGA-Expressionsstudien wurden mittels der sensitiven RT-PCR-Technik mit spezifischen Primern durchgeführt, wobei die Analyse oft der Einfachheit halber als „ja/ nein“-Untersuchung angelegt wurde (Graham et al. 2002 a).

Manchen Autoren gelang eine semiquantitative RT-PCR-Analyse durch den Intensitätsvergleich des Ziel-RT-PCR-Fragments mit einem „house-keeping“ Gen als interne Kontrolle (He et al. 2003, López et al. 2003 a) oder mit dem genomischen PCR-Produkt als Referenz (Liu und Ekramoddoullah 2003).

In vielen Expressionsanalysen wurde gezeigt, dass RGA in den Pflanzen auf einem niedrigen Level konstitutiv exprimiert vorliegen, durch verschiedene

Bedingungen aber zum Teil eine verstärkte Expression hervorgerufen werden kann (Hammond-Kosack und Jones 1997, Michelmore 1995).

Yoshimura et al. (1998) nutzten die RT-PCR-Technik, um die Induktion des Resistenzgens *Xa1* gegen den bakteriellen Blattfleckenerreger in Reis nach Pathogeninokulation zu zeigen.

Xiao et al. (2001) fanden durch Northern-blot-Analysen heraus, dass *RPW8* in *Arabidopsis* konstitutiv exprimiert ist, aber nach Infektion mit *Erysiphe cichoracearum* vermehrt exprimiert wird.

He et al. (2003) untersuchten die Expression des putativen NBS-LRR-Resistenzgens *KR1* in Soja mittels RT-PCR, da die Transkripte in Northern-Analysen nicht detektiert wurden. *KR1* wurde induziert durch Behandlung mit Salicylsäure (SA) und Infektion mit dem Soja-Mosaikvirus (SMV). SA wirkt als Signalmolekül in bestimmten pflanzlichen Abwehrreaktionen und die Induktion von *KR1* durch SA-Behandlung impliziert eine direkte Beteiligung des Resistenzgens im Signalweg der Resistenzkaskade.

Nachdem sich herausstellte, dass die Makroarray-Technik zur Expressionsanalyse der Rosen-RGA nicht geeignet war, wurde ein semiquantitativer Ansatz mittels RT-PCR gewählt. Die Bestimmung der absoluten Expression der Rosen-RGA war damit nicht möglich, wohl aber konnte das Verhältnis der Expressionsniveaus in unterschiedlichen Gewebetypen und Infektionsstadien als relative Expression bestimmt werden.

Die Kontrolle der Spezifität der RGA-Primer verlief nicht zufriedenstellend, da sich nur ein geringer Prozentsatz der Kartierungsprimer als sicher bei der Differenzierung der verschiedenen RGA erwies. Es wurden daraufhin einige PCR-Produkte dieser Primer mit unterschiedlichen Templates kloniert und sequenziert, um zu überprüfen, ob die „unerwünschte“ PCR-Amplifikation auf mangelnde Spezifität der Primer oder Kontamination mit dem Ziel-RGA zurückzuführen war. Die Sequenzanalyse ergab, dass die PCR-Produkte der spezifischen Primer unabhängig von der Art des PCR-Templates zu 85 - 100 % mit der Ursprungs-RGA-Sequenz, für die der Primer entworfen wurde, identisch waren, d. h. die Primer waren zumindest spezifisch für die unterschiedlichen RGA-Familien. Warum allerdings teilweise auch PCR-Produkte amplifiziert wurden, wenn Plasmide mit RGA anderer Subgruppen als Template in die Reaktion eingesetzt wurden, konnte nicht geklärt werden. Da die PCR-Kontrollreaktionen ohne Plasmid-DNA negativ waren, war zu vermuten, dass die Kontaminationen in den Plasmid-Lösungen vorlagen. Auch die mehrmalig wiederholte Präparation der Plasmid-DNA aus zweimal überimpften Einzelkolonien führte zu keiner Eliminierung der Kontaminationen. Aus Zeitgründen konnte das Problem an dieser Stelle nicht gelöst werden.

Zehn RGA-Familien konnten nach Optimierung der PCR-Bedingungen mit den spezifischen Primern differenziert werden, so dass deren Expression mittels RT-PCR in gesunden und mit Sternrußtau infizierten Blättern sowie in Blüten der Sternrußtau-resistenten *R. multiflora*-Hybride 88/124-46 untersucht werden konnte.

In Blüten war die Hälfte der untersuchten RGA nicht exprimiert, die andere Hälfte zeigte ein geringes Expressionsniveau.

Auch Hunger et al. (2003) konnte in Zuckerrüben unterschiedliche Organspezifität der exprimierten RGA nachweisen.

In den gesunden Kontrollblättern wurde für alle untersuchten Rosen-RGA eine schwache bis mittlere Expression beobachtet. Da Resistenzgene in der Regel direkt oder indirekt für die Wahrnehmung des Avirulenzsignals verantwortlich sind, wird angenommen, dass sie auf einem niedrigen Niveau in gesunden Pflanzen konstitutiv exprimiert werden (Cortese et al. 2003, Hammond-Kosack und Jones 1997).

Bei den TIR-RGA konnte in allen Fällen eine deutliche Erhöhung des Expressionsniveaus nach Sternrußtau-Infektion nachgewiesen werden. Das lässt vermuten, dass diese RGA durch den Sternrußtau-Befall induziert werden und somit direkt als PR („Pathogenesis Related“)-Proteine mit der Resistenzreaktion in Verbindung stehen. Unter den induzierten RGA waren sowohl ‚single-‘ als auch ‚multicopy‘ Loci. Von den beiden am stärksten induzierten RGA (D1-B1, 3g1-P13), die beide nach Infektion ein 8-fach höheres Expressionsniveau hatten als in gesundem Gewebe, lag der eine im Genom als ‚singlecopy‘, der andere als ‚multicopy‘ Locus vor. Durch die Sternrußtau-Infektion kam es also sowohl zur starken Induktion von Einzelgenen (D1-B1) als auch zur weniger starken Induktion vieler Kopien eines RGA-Locus (3g1-P13), so dass für diese beiden RGA ein vergleichbar hohes Expressionsniveau erreicht wurde.

Nur zwei der sechs bezüglich ihrer Expression analysierten TIR-RGA konnten in die Rosen-Chromosomenkarten integriert werden. Eines davon (1g2-D10) war zwar Mitglied des RGA-Clusters um den *Rdr1*-Resistenzlocus, jedoch von dem Resistenzgen noch zu weit entfernt, um als echter *Rdr1*-Kandidat angesehen werden zu können. Es müsste versucht werden, die anderen vier durch Sternrußtau-Befall induzierten RGA zu kartieren. Sollten diese in der unmittelbaren *Rdr1*-Region lokalisiert sein, so wäre die Wahrscheinlichkeit relativ hoch, bereits einen Teil des Resistenzgens identifiziert zu haben. Besonders interessante Kandidaten für monogene Sternrußtau-Resistenzgene sind die bisher noch nicht kartierten RGA 3a-C2 und D1-B1, die im Genom als ‚singlecopy‘ Loci vorliegen und nach Pathogeninfektion 5- bzw. 8-fach verstärkt exprimiert werden.

Pflanzliche Resistenzgenprodukte spielen neben ihrer Funktion als Rezeptoren oder als ‚Guard‘-Proteine auch in der Signalweiterleitung und somit in der Induktion der Resistenzreaktion eine wichtige Rolle. Die verstärkte Expression der RGA nach Sternrußtau-Infektion könnte ein Indiz dafür sein, dass diese eine Rolle bei der ‚Systemic Acquired Resistance‘ (SAR) spielen, welche oftmals nach der hypersensitiven Reaktion (HR) in der Pflanze etabliert wird und unspezifische, längerfristige Resistenz zur Folge hat.

4.6 Ausblick

Durch die Isolierung und Kartierung von RGA können Regionen mit Majorgenen oder QTL in vielen, wenn nicht allen Pflanzen identifiziert werden (Di Gaspero und Cipriani 2003).

Ein wichtiger Schritt zur Isolierung pflanzlicher Resistenzgene ist die Erstellung einer Kollektion von RGA und die Kartierung der zugehörigen Loci, um Kandidaten mit ähnlicher chromosomaler Position wie Resistenzgene zu identifizieren (Dodds 2001, Collins et al. 1998).

Für Rosen wurde eine umfangreiche NBS-LRR-RGA-Bank erstellt und charakterisiert, die zukünftig als Basis für die Isolierung von Rosen-Resistenzgenen genutzt werden kann. Eine Vielzahl der RGA wurde in zwei verschiedenen Rosen-Populationen kartiert.

Da RGA direkt aus Sequenzen von Resistenzgenen abgeleitet sind, kommt ihnen verglichen mit anderen Markertypen eine besondere Rolle zu. Die Wahrscheinlichkeit ist relativ hoch, dass sie bereits sehr dicht im Bereich des Resistenzfaktors lokalisiert sind oder im Idealfall sogar selbst das gesuchte Resistenzgen sein können. Die kartierten RGA stellen somit Kandidaten für noch nicht charakterisierte Rosen-Resistenzgene dar, wobei das große RGA-Cluster auf Chromosom 7 als besonders interessanter ‚Hotspot‘ angesehen werden kann. Ein hochsignifikanter QTL für Resistenz gegen den Echten Mehltau im Freiland im Jahr 2002 liegt in diesem RGA-Cluster. Daraus lässt sich schließen, dass einige Mitglieder des Clusters an der Resistenzreaktion gegen dieses Pathogen involviert sein könnten. Die Expressionsanalyse dieser RGA in mit Echtem Mehltau infiziertem Gewebe könnte deren direkte Beteiligung an der Abwehrreaktion bestätigen.

Viele Autoren schreiben dem RGA-Ansatz ein großes Potential bei der Isolierung von Resistenzgenen zu. Dodds et al. (2001), Aarts et al. (1998) und Feuillet et al. (1997) ist es gelungen, mit dieser Strategie Resistenzgene aus Flachs, *Arabidopsis* und Weizen zu klonieren. Eine entscheidende Einschränkung für die Resistenzgen-Isolierung mit dem RGA-Ansatz ergibt sich allerdings aus der häufig geclusterten Anordnung der RGA im pflanzlichen Genom, wodurch sich die Identifizierung der funktionellen Kopie in einem RGA-Cluster als schwierig gestaltet (Jeong et al. 2002, Wang und Xiao 2002, Graham et al. 2000). Dennoch ist der RGA-Ansatz zumindest eine attraktive Strategie zur Entwicklung molekularer Marker für Resistenz, die für die Markergestützte Selektion eingesetzt werden können (Quint et al. 2003, Mohler et al. 2002, Deng et al. 2000).

Van der Linden et al. (2003) nutzten den RGA-Ansatz zur Entwicklung einer Technik, die sie ‚NBS Profiling‘ nannten. Dabei werden NBS-LRR-RGA eingesetzt, um resistente Genotypen frühzeitig zu selektieren und auf diese Weise Resistenzzüchtung kosteneffektiver und zeitsparender zu machen. Dies wäre auch in der Rosenzüchtung eine interessante Strategie, um Genotypen mit möglichst vielen zusätzlichen Resistenzloci zu erkennen und zu selektieren.

5 Literaturverzeichnis

- Aarts, M. G. M., Lintel-Hekkert, B. T., Holub, E. B., Beynon, J. L., Stiekema, W. J., Pereira, A. (1998 a): Identification of R-gene homologous DNA fragment genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact* 11: 251-258.
- Aarts, N., Metz, M., Holub, E., Staskawicz, B. J., Daniels, M. J. (1998 b): Different requirements for *EDS1* and *NDR1* by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10306-10311.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman D. J. (1997): Gapped *BLAST* and *PSI-BLAST*: a new generation of protein database search programs. *Nucl Aci Res* 25: 3389-3402.
- Ashfield, T., Danzer, J. R., Held, D., Clayton, K., Keim, P., Saghai Maroof, M. A., Webb, D. M., Innes, R. W. (1998): *Rpg1*, a soybean gene effective against races of bacterial blight, maps to a cluster of previously identified disease resistance genes. *Theor Appl Genet* 96: 1013-1021.
- Backes, G., Madsen, L. H., Jaiser, H., Stougaard, J., Herz, M., Mohler, V., Jahoor, A. (2003): Localisation of genes for resistance against *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* and *Puccinia graminis* in a cross between a barley cultivar and a wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) line. *Theor Appl Genet* 106: 353-362.
- Bai, J., Pennill, L. A., Ning, J., Lee, S. W., Ramalingam, J., Webb, C. A., Zhao, B., Sun, Q., Nelson, J. C., Leach, J. E., Hulbert, S. H. (2002): Diversity in nucleotide binding site-leucine rich repeat genes in cereals. *Genome* 12: 1871-1884.
- Bairoch, A., Apweiler, R. (2000): The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucl Aci Res* 28: 45-48.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., Dinesh-Kumar, S. P. (1997): Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726-733.
- Becker, H. (1993): Pflanzenzüchtung. Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Bellin, B., Werber, M., Theis, T., Schulz, B., Weisshaar, B., Schneider, K. (2002): EST sequencing, annotation and macroarray transcriptome analysis identify preferentially root-expressed genes in sugar beet. *Plant Biology* 4: 700-710.
- Bent, A. (1996): Plant disease resistance genes: function meets structure. *The Plant Cell* 8: 1757-1771.
- Bent, A. F., Kunkel, B. N., Dahlbeck, D., Brown, K. L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J., Staskawicz, B. J. (1994): *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265: 1856-1860.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Wheeler, D. L. (2003): GenBank. *Nucl Aci Res* 31: 23-27.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E. (2000): The protein data bank. *Nucl Aci Res* 28: 235-242.
- Bertioli, D. J., Leal-Bertioli, S. C. M., Lion, M. B., Santos, V. L., Pappas Jr, G., Cannon, S. B., Guimarães, P. M. (2003): A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis*. *Mol Gen Genomics* 270: 34-45.

- Bouzidi, M. F., Badaoui, S., Cambon, F., Vear, F., Tourvielle De Labrouhe, D., Nicolas, P., Mouzeyar, S. (2002): Molecular analysis of a major locus for resistance to downy mildew in sunflower with specific PCR-based markers. *Theor Appl Genet* 104: 592-600.
- Bowles, D. J. (1990): Defense-related proteins in higher plants. *Annu Rev Biochem* 58: 873-907.
- Brotman, Y., Silberstein, L., Kovalski, I., Perin, C., Dogimont, C., Pitrat, M., Klingler, J., Thompson, G. A., Perl-Treves, R. (2002): Resistance gene homologues in melon are linked to genetic loci conferring disease and pest resistance. *Theor Appl Genet* 104: 1055-1063.
- Cannon, S. B., Zhu, H., Baumgarten, A. M., Spangler, R., May, G., Cook, D. R., Young, N. D. (2002): Diversity, distribution, and ancient taxonomic relationships within the TIR and Non-TIR NBS-LRR resistance gene subfamilies. *J Mol Evol* 54 (4): 548-562.
- Chen, X. M., Line, R. F., Leung, H. (1998): Genome scanning for resistance gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis. *Theor Appl Genet* 97: 345-355.
- Collins, N., Park, R., Spielmeier, W., Ellis, J., Pryor, A. J. (2001): Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance genes. *Genome* 44: 375-381.
- Collins, N., Drake, J., Ayliffe, M., Sun, Q., Ellis, J., Hulbert, S., Pryor, T. (1999): Molecular characterization of the maize-*Rp1-D* rust resistance haplotype and its mutants. *The Plant Cell* 11: 1365-1376.
- Collins, N. C., Webb, C. A., Seah, S., Ellis, J. G., Hulbert, S. H., Pryor, A. (1998): The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. *Mol Plant-Microbe Interact* 11: 968-978.
- Cortese, M. R., Fanelli, E., De Giorgi, C. (2003): Characterization of nematode resistance gene analogs in tetraploid wheat. *Plant Science* 164: 71-75.
- Dangl, J. L., Jones, J. D. G. (2001): Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833.
- Debener, T., Drewes-Alvarez, R., Rockstroh, K. (1998): Identification of five physiological races of black spot, *Diplocarpon rosae*, Wolf, on roses. *Plant Breeding* 117: 267-270.
- Debener, T., Mattiesch, L. (1999): Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers. *Theor Appl Genet* 99: 891-899.
- Deng, Z., Huang, S., Ling, P., Chen, C., Yu, C., Weber, C. A., Moore, G. A., Gmitter, F. G. Jr. (2000): Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance-gene candidate sequences in citrus. *Theor Appl Genet* 101: 814-822.
- Di Gaspero, G., Cipriani, G. (2003): Nucleotide binding site/leucine-rich repeats, Pto-like and receptor-like kinases related to disease resistance in grapevine. *Mol Gen Genomics* 269: 612-623.
- Di Gaspero, G., Cipriani, G. (2002): Resistance gene analogs are candidate markers for disease resistance genes in grape (*Vitis* spp.). *Theor Appl Genet* 106: 163-172.
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Ellis, J. G. (2001): Contrasting modes of evolution acting on the complex N locus for rust resistance in flax. *The Plant Journal* 25 (5): 439-453.

- Donald, T. M., Pellerone, F., Adam-Blondon, A.-F., Bouquet, A., Thomas, M. R., Dry, I. B. (2002): Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. *Theor Appl Genet* 104: 610-618.
- Ellis, J., Dodds, P., Pryor, T. (2000): Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Cur Opin in Plant Biol* 3: 278-284.
- Ellis, J., Jones, D. (1998): Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogen resistance in plants. *Cur Opin in Plant Biol* 1: 288-293.
- Felsenstein, J. (1989): Phylip – phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
- Ferrier-Cana, E., Geffroy, V., Macadré, C., Creusot, F., Imbert-Bolloré, P., Sévignac, M., Langin, T. (2003): Characterization of expressed NBS-LRR resistance gene candidates from common bean. *Theor Appl Genet* 106: 251-261.
- Feuillet, C., Schachermayr, G., Keller, B. (1997): Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded at the *Lr10* disease resistance locus of wheat. *The Plant Journal* 11(1): 45-52.
- Fitch, W. M. (1977): On the problem of discovering the most parsimonious tree. *Am Nat* 111: 223-257.
- Flor, H. H. (1954): The complementary genetic systems in flax and flax rust. *Advanced Genetics* 8: 29-54.
- Fluhr, R. (2001): Sentinels of disease. Plant resistance genes. *Plant Physiology* 127: 1367-1374.
- Galan, J. E., Collmer, A. (1999): Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284: 1322-1328.
- Garcia-Mas, J., van Leeuwen, H., Monfort, A., de Vicente, M. C., Puigdomènech, P. A. (2001): Cloning and mapping of resistance gene homologues in melon. *Plant Science* 161: 165-172.
- Gentzbittel, L., Mouzeyar, S., Badaoui, S., Mestries, E., Vear, F., Tourvieille De Labrouhe, D., Nicolas, P. (1998): Cloning of molecular markers for disease resistance in sunflower, *Helianthus annuus* L. *Theor Appl Genet* 96: 519-525.
- Glazebrook, J. (2001): Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* - 2001 status. *Cur Opin in Plant Biol* 4: 301-308.
- Goff, S. A., Ricke, D., Lan T. H. et al. (2002): A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 5; 296 (5565): 79-92.
- Gozzo, F. (2004): Systemic acquired resistance in crop protection. *Outlooks on Pest Management* 10: 20-23.
- Graham, M. A., Marek, L. F., Shoemaker, R. C. (2002 a): Organization, expression and evolution of a disease resistance gene cluster in soybean. *Genetics* 162: 1961-1977.
- Graham, M. A., Marek, L. F., Shoemaker, R. C. (2002 b): PCR sampling of disease resistance-like sequences from a disease resistance gene cluster in soybean. *Theor Appl Genet* 105: 50-57.
- Graham, M. A., Marek, L.F., Lohnes, D., Cregan, P., Shoemaker, R. C. (2000): Expression and genome organization of resistance gene analogs in soybean. *Genome* 43: 86-93.
- Gudin, S. (2000): Rose: Genetics and Breeding. *Plant Breeding Rev.* 17: 159-189.

- Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. G. (2000): Responses to plant pathogens. In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R., Eds. *Biochem & Mol Biol of Plants*. American Society of Plant Physiologists: 1102-1143.
- Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. G. (1997): Plant disease resistance genes. *Ann Rev of Plant Physiol and Plant Mol Biol* 48: 575-607.
- Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. G. (1996): Resistance-gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791.
- He, C.-Y., Tian, A.-G., Zhang, J.-S., Zhang, Z.-Y., Gai, J.-Y., Chen, S.-Y. (2003): Isolation and characterization of a full-length resistance gene homolog from soybean. *Theor Appl Genet* 106: 786-793.
- Horst, R. K. (1983): Compendium of rose diseases. *The Am Phytopath Soc*, St. Paul, Minnesota.
- Hulbert, S. H., Webb, C. A., Smith, S. M., Sun, Q. (2001): Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Annu Rev Phytopathol* 39: 313-335.
- Hunger, S., Di Gaspero, G., Möhring, S., Bellin, D., Schäfer-Pregl, R., Borchardt, D. C., Durel, C.-E., Werber, M., Weisshaar, B., Salamini, F., Schneider, K. (2003): Isolation and linkage analysis of expressed disease-resistance gene analogues of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Genome* 46: 70-82.
- Innes, R. W. (1998): Genetic dissection of R gene signal transduction pathways. *Cur Opin in Plant Biol* 1: 229-304.
- Jeong, S. C., Hayes, A. J., Biyashev, R. M., Saghai Maroof, M. A. (2001): Diversity and evolution of a non-TIR-NBS sequence family that clusters to a chromosome "hotspot" for disease resistance genes in soybean. *Theor Appl Genet* 103: 406-414.
- Jones, J. D. G. (2001): Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Cur Opin in Plant Biol* 4: 281-287.
- Kanazin, V., Marek, L. F., Shoemaker, R. C. (1996): Resistance gene analogues are conserved and clustered in soybean. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11746-11750.
- Kaufmann, H., Mattiesch, L., Lörz, H., Debener, T. (2003): Construction of a BAC library of *Rosa rugosa* Thunb. and assembly of a contig spanning *Rdr1*, a gene that confers resistance to black spot. *Mol Gen Genomics* 268: 666-674.
- Kaul, S., Koo, H. L., Jenkins, J. et al. (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Keller, B., Feuillet, C., Messmer, M. (2000): Genetics of disease resistance - basic concepts and application in resistance breeding. In: *Mechanisms of resistance to plant diseases*: 101-160.
- Kobayashi, N., Horikoshi, T., Katsuyama, H., Handa, T., Takayanagi, K. (1998): A simple and efficient DNA extraction method for plants, especially woody plants. *Plant Tiss Cult and Biotech* 4: 76-81
- Krüssmann, G. (1986): Rosen - Rosen - Rosen. Unser Wissen über die Rose. Parey Verlag, Berlin/ Hamburg.
- Kuhn, D. N., Heath, M., Wisser, R. J., Meerow, A., Brown, J. S., Lopes, U., Schnell, R. J. (2003): Resistance gene homologues in *Theobroma cacao* as useful genetic markers. *Theor Appl Genet* 107: 191-202.

- Lee, S.-Y., Seo, J.-S., Rodriguez-Lanetty, M., Lee, D.-H. (2003): Comparative analysis of superfamilies of NBS-encoding resistance gene analogs in cultivated and wild apple species. *Mol Gen Genomics* 269: 101-108.
- Leister, D. (2004): Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes. *Trends in Genetics* 20: 116-122.
- Leister, D., Kurth, J., Laurie, D. A., Yano, M., Sasaki, T., Devos, K. Graner, A., Schulze-Lefert, P. (1998): Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 370-375.
- Leister, D., Ballvora, A., Salamini, F., Gebhardt, C. (1996): A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genetics* 14: 421-429.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., Wang, X. (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489.
- Linde, M., Debener, T. (2003): Isolation and identification of eight races of powdery mildew of roses (*Podosphaera pannosa*) (Wallr.; Fr.) de Bary and the genetic analysis of the resistance gene *Rpp1*. *Theor Appl Genet* 107: 256-262.
- Linde, M., Mattiesch, L., Debener, T. (2004): *Rpp1*, a dominant gene providing race specific resistance to rose powdery mildew (*Podosphaera pannosa*): molecular mapping, SCAR development and confirmation of disease resistance data. *Theor Appl Genet*: in press.
- Linde, M., Shishkoff, N. (2003): Fungi: powdery mildew. In: Roberts, A., Gudin, S., Debener, Eds. *Encyclopedia of rose science*. Academic Press Ltd, London.
- Liu, J.-J., Ekramoddoullah, A. K. M. (2003): Isolation, genetic variation and expression of TIR-NBS-LRR resistance gene analogs from western white pine (*Pinus monticola* Dougl. ex. D. Don.). *Mol Gen Genomics* 270: 432-441.
- López, C. E., Zuluaga, A. P., Cooke, R., Delseny, M., Tohme, J., Verdier, V. (2003 a): Isolation of resistance gene candidates (RGCs) and characterization of an RGC cluster in cassava. *Mol Gen Genomics* 269: 658-671.
- López, C. E., Acosta, I. F., Jara, C., Pedraza, F., Gaitán-Solís, E., Gallego, G., Beebe, S., Thome, J. (2003 b): Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. *Phytopathology* 93: 88-95.
- Madsen, L. H., Collins, N. C., Rakwalska, M., Backes, G., Sandal, N., Krussel, L., Jensen, J., Waterman, E. H., Jahoor, A., Ayliffe, M., Schulze-Lefert, P., Stougaard, J. (2003): Barley disease resistance analogs of the NBS-LRR class: identification and mapping. *Mol Gen Genomics* 269: 150-161.
- Mago, R., Nair, S., Mohan, M. (1999): Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping. *Theor Appl Genet* 99: 50-57.
- Maleki, L., Faris, J., Bowden, R. L., Gill, B. S., Fellers, J. P. (2003): Physical and genetic mapping of wheat kinase analogs and NBS-LRR resistance gene analogs. *Crop Science* 43: 660-670.

- Marone, M., Mozzetti, S., De Ritis, D., Pierelli, L., Scambia, G. (2001): Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol Proced Online* 3: 19-25.
- Martin, G. B. (1999): Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Cur Opin in Plant Biol* 2: 273-279.
- Meyers, B. C., Dickermann, A. W., Michelmoore, R. W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B. W., Young, N. D. (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.
- Meyers, B. C., Shen, K. A., Rohani, P., Gaut, B. S., Michelmoore, R. W. (1998 a): Receptor-like genes in the major resistance locus of lettuce are subject to divergent selection. *The Plant Cell* 11, 1833-1846.
- Meyers, B. C., Chin, D. B., Shen, K. A., Sivaramakrishnan, S., Lavelle, D., Zhang, Z., Michelmoore, R. W. (1998 b): The mayor resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. *The Plant Cell* 10: 1817-1832.
- Michelmore, R. (2000): Genomic approaches to plant disease resistance. *Cur Opin in Plant Biol* 3: 125-131.
- Michelmore, R. W., Meyers, B. C. (1998): Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Research* 8: 1113-1130.
- Michelmore R. W. (1995): Isolation of disease resistance genes from crop plants. *Cur Opin Biotech* 6: 145-152.
- Mohler, V., Klahr, A., Wenzel, G., Schwarz, G. (2002): A resistance gene analog useful for targeting disease resistance genes against different pathogens on group 1S chromosomes of barley, wheat and rye. *Theor Appl Genet* 105: 364-368.
- Noir, S., Combes, M.-C., Anthony, F., Lashermes, P. (2001): Origin, diversity and evolution of NBS-type disease resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.). *Mol Gen Genomics* 265: 654-662.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. (1989): Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879.
- Pan, Q., Wendel, J., Fluhr, R. (2000 a): Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. *J Mol Evol* 50: 203-213.
- Pan, Q., Liu Y.-S., Budai-Hadrian, O., Sela, M., Carmel-Goren, L., Zamir, D., Fluhr, R. (2000 b): Comparative genetics of NBS-LRR resistance-gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and *Arabidopsis*. *Genetics* 155: 309-322.
- Peñuela, S., Danesh, D., Young, N. D. (2002): Targeted isolation, sequence analysis, and physical mapping of nonTIR NBS-LRR genes in soybean. *Theor Appl Genet* 104: 261-272.
- Pflieger, S., Lefebvre, V., Causse, M. (2001): The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Molecular Breeding* 7: 275-291.
- Pflieger, S., Lefebvre, V., Caranta, C., Blattes, A., Goffinet, B., Palloix, A. (1999): Disease resistance gene analogs as candidates for QTLs in pepper-pathogen interactions. *Genome* 42: 1100-1110.
- Prell, H. (1996): Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen. Gustav Fischer Verlag Jena.

- Quint, M., Dußle, C. M., Melchinger, A. E., Lübberstedt, T. (2003): Identification of genetically linked RGAs by BAC screening in maize and implications for gene cloning, mapping and MAS. *Theor Appl Genet* 106: 1171-1177.
- Quint, M., Mihaljevic, R., Dussle, C. M., Xu, M. L., Melchinger, A. E., Lübberstedt, T. (2002): Development of RGA-CAPS markers and genetic mapping of candidate genes for sugarcane mosaic virus resistance in maize. *Theor Appl Genet* 105: 355-363.
- Ramalingam, J., Vera Cruz, C. M., Kukreja, K., Chittoor, J. M., Wu, J.-L., Lee, S. W., Baraoidan, M., George, M. L., Cohen, M. B., Hulbert, S. H., Leach, J. E., Leung, H. (2003): Candidate defense genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. *Mol Plant-Microbe Interact* 16, No. 1: 14-24.
- Richly, E., Kurth, J., Leister, D. (2002): Mode of amplification and reorganization of resistance genes during recent *Arabidopsis thaliana* evolution. *Mol Biol Evol* 19(1): 76-84.
- Richter, T. E., Ronald, P. C. (2000): The evolution of disease resistance genes. *Plant Mol Biol* 42: 195-204.
- Rivkin, M. I., Vallejobs, C. E., McClean, P. E. (1999): Disease-resistance related sequences in common bean. *Genome* 42: 41-47.
- Rommens, C. M., Salmeron, J. M., Oldroyd, G. E., Staskawicz, B. J. (1995): Intergeneric transfer and functional expression of the tomato disease resistance gene Pto. *Plant Cell* 7: 1537-1544.
- Rossi, M., Araujo, P. G., Paulet, F., Garsmeur, O., Dias, V. M., Chen, H., Van Sluys, M.-A., D'Hont, A. (2003): Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs (RGAs) in sugarcane. *Mol Gen Genomics* 269: 406-419.
- Rostoks, N., Zale, J. M., Soule, J., Bruegeman, R., Druka, A., Kudrna, D., Steffenson, B., Kleinhofs, A. (2002): A barley gene family homologous to the maize rust resistance gene *Rp1-D*. *Theor Appl Genet* 104: 1298-1306.
- Salmeron, J., Vernooij, B., Lawton, K., Kramer, C., Frye, C., Oostendorp, M., Knauf-Beiter, G., Staub, T. (2002): Powdery mildew control through transgenic expression of antifungal proteins, resistance genes, and systemic acquired resistance. In: The powdery mildews – a comprehensive treatise. *The Am Phytopath Soc*, St. Paul, Minnesota.
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001): Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, USA.
- Seah, S., Sivasithamparam, K., Karakousis, A., Lagudah, E. S. (1998): Cloning and characterization of a family of disease resistance gene analogs from wheat and barley. *Theor Appl Genet* 97: 937-945.
- Shen, K. A., Meyers, B. C., Islam-Faridi, M. N., Chin, D. B., Stelly, D. B., Michelmore, R. W. (1998): Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. *Mol Plant-Microbe Interact* 11: 815-823.
- Slabaugh, M. B., Huestis, G. M., Leonard, J., Holloway, J. L., Rosato, C., Hongtrakul, V., Martini, N., Toepfer, R., Voetz, M., Schell, J., Knapp, S. J. (1997): Sequence-based genetic markers for genes and gene families: single-strand conformational polymorphisms for the fatty acid synthesis genes of *Cuphea*. *Theor Appl Genet* 94: 400-408.

- Speelman, E., Bouchet, D., Holub, E. B., Beynon, J. L. (1998): Disease resistance gene homologs correlate with disease resistance loci of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 14: 467-474.
- Spielmeier, W., Robertson, M., Collins, N., Leister, D., Schulze-Lefert, P., Seah, S., Moullet, O., Lagudah, E. S. (1998): A superfamily of disease resistance gene analogs is located on all homoeologous chromosome groups of wheat (*Triticum aestivum*). *Genome* 41: 782-788.
- Staskawicz, B. J. (2001): Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. *Plant Physiology* 125: 73-76.
- Staskawicz, B. J., Ausubel, F. M., Baker, B., Ellis, J. G., Jones, J. D. G. (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268: 661-667.
- Stoesser, G., Baker, W., van den Broek, A. (2002): The EMBL nucleotide sequence database. *Nucl Aci Res* 30: 21-26.
- Tai, T. H., Dahlbeck, D., Clark, E. T., Gajiwala, P., Pasion, R., Whalen, M. C., Stall, R. E., Staskawicz (1999): Expression of the *Bs2* pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14153-14158.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. (1997): The *CLUSTAL_X* windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Aci Res* 25: 4876-4882.
- Tian, Y., Fan, L. J., Thurau, T., Jung, C., Cai, D. (2003): The absence of TIR type resistance gene analogues in the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) genome. *J Mol Evol* 57: 1-14.
- Timmermann-Vaughan, G. M., Frew, T. J., Weeden, N. F. (2000): Characterization and linkage mapping of R-gene analogous DNA sequences in pea (*Pisum sativum* L.). *Theor Appl Genet* 101: 241-247.
- Toojinda, T., Broers, L. H., Chen, X. M., Hayes, P. M., Kleinhofs, A., Korte, J., Kudrna, D., Leung, H., Line, R. F., Powell, W., Ramsay, L., Vivar, H., Waugh, R. (2000): Mapping quantitative and qualitative disease resistance genes in a doubled haploid population of barley (*Hordeum vulgare*). *Theor Appl Genet* 101: 580-589.
- Toyoda, K., Collins, N. C., Takahashi, A., Shirasu, K. (2002): Resistance and susceptibility of plants to fungal pathogens. *Transgenic Research* 11: 567-582.
- Vallad, G., Rivkin, M., Vallejos, C., McClean, P. (2001): Cloning and homology modelling of a *Pto*-like protein kinase family of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 103: 1046-1058.
- Van der Biezen, E. A., Jones, J. D. G. (1998): Plant disease resistance proteins and the „gene-for-gene“ concept. *Trends Biochem Sci* 23: 454-456.
- Van der Linden, G., Smulders, R., Vosman B. (2003): NBS profiling - new tool simplifies resistance breeding. *Prophyta Annual*: 44-45.
- Van Ooijen, J. W., Voorrips, R. E. (2001): Joinmap ® Version 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.
- Vicente, J. G., King, G. J. (2001): Characterization of disease resistance gene-like sequences in *Brassica oleracea* L. *Theor Appl Genet* 102: 555-563.

- Von Malek, B., Debener, T. (1998): Genetic analysis of resistance to black spot (*Diplocarpon rosae*) in tetraploid roses. *Theor Appl Genet* 96: 228-231.
- Von Malek, B., Weber, W. E., Debener, T. (2000): Identification of molecular markers linked to *Rdr1*, a gene conferring resistance to black spot in roses. *Theor Appl Genet* 101: 977-983.
- Voorrips, R. E. (2002): MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered* 93:77-78.
- Wang, S., Xiao, X. (2002): Isolation and linkage mapping of disease-resistance-like sequences from various rice cultivars, containing different recognition specificities. *Plant Breeding* 121: 203-209.
- Xiao, S., Ellwood, S., Calis, O., Patrick, E., Li, T., Coleman, M., Turner, J. G. (2001): Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by *RPW8*. *Science* 291: 118-120.
- Yoshimura, S., Yamanouchi, U., Katayose, Y., Toki, S., Wang, Z.-X., Kono, T., Kurata, N., Yano, M., Iwata, N., Sasaki, T. (1998): Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1163-1668.
- Young, N. D. (2000): The genetic architecture of resistance. *Cur Opin in Plant Biol* 3: 285-290.
- Yu, Y. G., Buss, G. R., Maroof, S. M. A. (1996): Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11751-11756.
- Zhang, L. P., Khan, A., Niño-Liu, D., Foolad, M. R. (2002): A molecular linkage map of tomato displaying chromosomal locations of resistance gene analogs based on a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon hirsutum* cross. *Genome* 45: 133-146.
- Zhu, H., Cannon, S. B., Young, N. D., Cook, D. R. (2002): Phylogeny and genomic organization of the TIR and non-TIR NBS-LRR resistance gene family in *Medicago truncatula*. *Mol Plant-Microbe Interact* 15: 529-539.
- Zimnoch-Guzowska, E., Marczewski, W., Lebecka, R., Flis, B., Schäfer-Pregl, R., Salamini, F., Gebhardt, C. (2000): QTL Analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP, and resistance-gene-like markers. *Crop Science* 40: 1156-1167.

6 Anhang

A 6.1 Abkürzungen

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CC	Coiled-Coil
CTAB	Cetyltrimethylammonium-bromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
FB	Freezing Broth Medium
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
IRD	Infra Red Dye
LB	Luria-Bertani Medium
LOD	Likelihood of the Odds
LRR	Leucin Rich Repeat
LZ	Leucine-Zipper
MAS	Marker-Assisted Selection
NBS	Nucleotid Binding Site
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglycol
PR	Pathogenesis-Related
PVP	Polyvinylpyrrolidone
QTL	Quantitative Trait Loci
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RGA	Resistenzgenanaloga
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
STS	Sequence-Tagged-Site
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethyldiamin
TIR	Toll/Interleukin-1/Resistenz Motiv
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid

A 6.2 Primer

Tab. A 17: Sequenzen der für die Amplifikation der RGA verwendeten degenerierten Oligonukleotid-Primer

PK	PCR-Template ¹⁾	Primer-Bezeichn.	Position	Motiv	Nukleotidsequenz (5' - 3') ²⁾
1	genom. DNA	P-Loop-1	NBS-I	GGMGKTT	GGI GGI ATI GGI AAA ACI AC
		TIR-1	NBS-IX	FLHIACF	RAA RCA IGC DAT RTG IAR RAA
2	-	P-Loop-5	NBS-I	GGSGKTT	GGI GGI WSI GGI AAR ACI AC
		TIR-1	NBS-IX	FLHIACF	RAA RCA IGC DAT RTG IAR RAA
3	cDNA und genom. DNA	P-Loop-2	NBS-I	GGVGKTT	GGI GGI GTI GGI AAI ACI
		TIR-1	NBS-IX	FLHIACF	RAA RCA IGC DAT RTG IAR RAA
4	genom. DNA	P-Loop-1	NBS-I	GGMGKTT	GGI GGI ATI GGI AAA ACI AC
		TIR-2	NBS-IX	FLDIACF	RAA RCA IGC SAT RTC IAR RAA
5	-	P-Loop-5	NBS-I	GGSGKTT	GGI GGI WSI GGI AAR ACI AC
		TIR-2	NBS-IX	FLDIACF	RAA RCA IGC SAT RTC IAR RAA
6	-	P-Loop-3	NBS-I	GGLGKTT	GGI GGI YTI GGI AAR ACI AC
		TIR-2	NBS-IX	FLDIACF	RAA RCA IGC SAT RTC IAR RAA
7	-	P-Loop-6	NBS-I	GGVGKTT	GGT GGG GTT GGG AAG ACA ACG
		TIR-2	NBS-IX	FLDIACF	RAA RCA IGC SAT RTC IAR RAA
8	-	P-Loop-2	NBS-I	GGVGKTT	GGI GGI GTI GGI AAI ACI
		TIR-2	NBS-IX	FLDIACF	RAA RCA IGC SAT RTC IAR RAA
9	-	P-Loop-2	NBS-I	GGVGKTT	GGI GGI GTI GGI AAI ACI
		nonTIR-2	NBS-IX	FAYCSLF	RAA IAR ISW RCA RTA IGC RAA
10	genom. DNA	P-Loop-1	NBS-I	GGMGKTT	GGI GGI ATI GGI AAA ACI AC
		nonTIR-1	NBS-IX	YCALFPE	YTC IGG RAA IAR IGC RCA RTA
11	cDNA und genom. DNA	P-Loop-3	NBS-I	GGLGKTT	GGI GGI YTI GGI AAR ACI AC
		nonTIR-1	NBS-IX	YCALFPE	YTC IGG RAA IAR IGC RCA RTA
12	genom. DNA	P-Loop-2	NBS-I	GGVGKTT	GGI GGI GTI GGI AAI ACI
		nonTIR-1	NBS-IX	YCALFPE	YTC IGG RAA IAR IGC RCA RTA
13	-	P-Loop-2	NBS-I	GGVGKTT	GGI GGI GTI GGI AAI ACI
		nonTIR-3	NBS-IX	LKRCFLY	RTA IAG RAA RCA ISK YAG
14	-	P-Loop-2	NBS-I	GGVGKTT	GGI GGI GTI GGI AAI ACI
		GLPL-2	NBS-VI	GLPLAL	CAA CGC TAG TGG CAA TCC
15	-	P-Loop-6	NBS-I	GGVGKTT	GGT GGG GTT GGG AAG ACA ACG
		GLPL-2	NBS-VI	GLPLAL	CAA CGC TAG TGG CAA TCC
16 DERES	cDNA	P-Loop-4	NBS-I	GGVGKTT	GGI GGI GTI GGI AAI ACI AC
		GLPL-1	NBS-VI	GLPLAL	AR IGC TAR IGG IAR ICC

¹⁾ PCR-Template für die Isolierung der RGA; fett gedruckt: zur RGA-Isolierung verwendete Primerkombinationen (PK); ²⁾ Codes für degenerierte Positionen: I = Inosin = A/G/C/T; R = A/G; Y = C/T; K = G/T; D = A/G/T; W = A/C; S = G/C.

Tab. A 18: Sequenzen der spezifischen Primer für die Kartierung der RGA

Nr.	RGA	Sequenz ‚forward‘ Primer (5' - 3')	Sequenz ‚reverse‘ Primer (5' - 3')	Länge PCR Prod. [bp]
1	10g2-H1 ¹⁾	TTC CTT TGG CTA TTG TGG CTT TAG	GGC AAA TCA TTG AAA CTC AGC AAC	157
2	11a-G11 ²⁾	AGG CAG GAA TGA CAA ATC AAG	GGA TCA TTG CCA TCT GAA AAC	301
3	11a-G16 ¹⁾	TGT GGA CCG AAG ACG AAA CAA AG	ATC TCC CAA CTC ATC AGC CTC ATC	236
4	11a-G2 ⁴⁾	AGA AAG TTT GGG TTT GTG TC	CAA TAT TAT ACT GCC CTG AGC	251
5	11a-G8 ²⁾	TCT AAG GGT GAC AAC AGC AA	CTT CTT CCC ATT CGT CTA CTC T	455
6	11a-H10 ²⁾	CAA GAT AGA CAA CTC GGA AGT C	CAA ATC ATT GAA ACT CAG CA	378
7	11b-E10 ³⁾	GGA CCG AAG ACA AAA CAA AGT	TTC AGA ACA TCC TGC CAT TC	343
8	11b-L4 ²⁾	AAG AAG GCG TTG TCA GG	CAA TTT TCA ATA CTT GGT TCA G	335
9	11b-M11 ¹⁾	GTG TGG ACC GAA GAC AAA ACT AAG	CTG CAG GAG CCA AAT CAT AAT AAC	430
10	11g1-O5 ⁴⁾	GGA TCC CAA AGC AGT TCC AAT GAG	AAC CCC TTC TTT TCG TGT GGT CAC	201
11	11g2-J15 ¹⁾	GGG TGT CTG TGT CCG ATG ATT TC	GTG TCG TCA CAA GGA TGA TGC TTC	252
12	12g1-E12 ⁴⁾	TGG ACC GAA GAC AAA ACC AAG TG	TTA GTA CAT CCC GCC ATT CCT TTC	343
13	12g1-E15 ³⁾	CCG CCT TTC GTG TTG GAG CAG TAG	AGG ATG CCC ATC TGG TCG GAT AGA	325
14	12g1-M19 ²⁾	GGA TCC CAA AGC AGT TCC AAT GAG	CAT CCC TAT CCA AAA ACG CAA AGC	304
15	1g1-E23 ¹⁾	GTA AGA GCG GTG TAT GAG AGA ATC	CTA CTC CCT AAA CCA AAC CAC TC	284
16	1g1-E24 ³⁾	GGA CGA TTT TCT TGG TTT GGT T	CTT GTT TGG AGG ACT TTT TGG ATA	347
17	1g2-D10 ²⁾	GCT AGA GCT GTT TAT GAC GAA AT	ATA CTC TCT TGA AGG TTG GTT TGT	426
18	33-3-C1 ²⁾	GTT TGT AAT AAA GCG GTT CTT C	TCT GTA GTT TTG CCA ATG C	373
19	33-3-C5 ²⁾	TCA GAA AGG CTC ACG CAG AC	CAA GAA AGG CCC CAA AGT TTT A	446
20	33-4-F24 ⁴⁾	TGA AGG GAT TAG AAG AAG ATG AAG	GTT GGG AGT TTG TTT TAG TTT TTG	215
21	33-help ²⁾	GAT GTT TGC GTC TTT CTT GCT AAT	TGC ATA ATC TTC TTC AGG CTC AC	399
22	3a-A7 ¹⁾	GAA TTT AAT TTC CTT CTT ACG G	TCC CAG TTT TCT CAA TGC	519
23	3a-C12 ¹⁾	ATA AGA CAG TTT TCG GAG CAA C	GCG CTT TCC CAT ACA TCT G	476
24	3a-C2 ¹⁾	GCC AGC TTA GAA TCG GTC AAA	AAC CAG TAA AAC CCC CTG TGT C	548
25	3a-C5 ²⁾	TCA AAA CAA ACT CAT CGC AGA T	GGT AGC CCA CCT GTA AGA GAC	378
26	3a-C8 ⁴⁾	AGA TAA GGC ATA GAT TTC GTC GTA	CTT AAG GCC ATC ATC ACT TTT C	212
27	3a-F8 ¹⁾	TGG ACA TAT ACA GCG TTA GTG AGG	AAA GCG TGC CAA CTG AAG AG	265
28	3a-L19 ²⁾	AAA TAT TTG GCA GGA AGC	CTT TGG CAT AAC TTG TAA CAG	226
29	3a-L5 ¹⁾	GAG TTT ACG TAA CAG AAA GGT G	CAT GAT TCC TCT ATT TGG TG	397
30	3b-E4 ¹⁾	CAG CGT TAG TGA GGG AAT ACC	AGC ATG CCA ACT GAA GAG C	253
31	3b-F15 ¹⁾	AAG CGA GTT CTT CTT GTT CTG	AAA GCA TCT TCC CAT TCC	353
32	3b-F15 ¹⁾	AAG CGA GTT CTT CTT GTT CTG	AAA GCA TCT TCC CAT TCC	288
33	3b-N10 ²⁾	GAA GCC GAA TTA TCA TTA CCA CAC	GAA TCT TAG TCA GTT TGC CCA GAG	270
34	3g1-P13 ¹⁾	GGT TTG GTT CAG GGA GTA GAG T	CAC TGT TCC ATT CAC TTG TAT CAC	359
35	3g2-N10 ²⁾	GAG CTT TTT ACG ATG ACT TTT GTC	TAA CCC GGT AGC ATT GTA TGT AG	416
36	4g1-P23 ¹⁾	GTA AGA GCG GTG TAT GCG AGA ATC	GGG TAA CCT CTT TGG AAT GCT TTC	213
37	4g2-B16 ²⁾	TGG AGG CCT CGT GAA ACT ACA AAG	ATA ACC CTG CTT CCC AAA CCA AAC	366
38	D1-A2 ²⁾	TTG CAC AAG TGG TTT TTG A	CAT CAG TTA ATG GAT TCA CCT T	320
39	D1-D1 ⁴⁾	TCA AAA TCA GCG AAC CAA GAA G	AAA CAA CTC CAA AGC AGC ATC A	327

40	D1-D13⁴⁾	AAA CAA GGT GCA GTT CAT TTA C	TTT CAA CAA TTC TTT GGA TAG C	378
41	D1-F1³⁾	GGT ACA AGC TCA GTT TGA AG	TGT ATA CTT TAT CCA CTC C	326
42	D1-K1³⁾	TTG AGA ATA TTA GAG AGG AAG CAG	ACC TTG TAT ACT TTA TCC ACT CCA	295
43	D1-M1²⁾	AGG GTA CAG GCT CAG TTT GAA G	AAC CTG CTG GTC TTT CTT GAA G	399
44	D1-N1¹⁾	AGG TTA GCT GCT TTC TTG C	AGA CGT TCA TCT CTT GTT GTG	280
45	D1-O1²⁾	GTT ATT CTT GAT GAT GTG GAC	TCA AAA ATT TCT TGG ATA GC	250
46	D2-D23¹⁾	GGT TAG CTG CTT TCT TGC	AGT TCC AAA TAA TCT TTT TCT G	402
47	L3-D1²⁾	AAA GAT TCT AGG GGG CAA AG	AAC AGT CAA CAA ACG CTT ACC	211
48	L3-D11¹⁾	GGT GGG GAA GAC GAC TAT TGC	CCT ACT CCC TGG ACC AAA CGA	301
49	L3-D2¹⁾	CGG CTT TGT TTC TGA TGT TAG	ATT TTA CAA AAC GCT TGG ACA G	431
50	L3-D5¹⁾	CAG GCT CAG TTT GAA GGT TGC	CCA GCT GGT CTT TCT TGA AGG	391
51	L3-E2¹⁾	CAG GCT CAG TTT GAA GGT TGC	CCA GCT GGT CTT TCT TGA AGG	391
52	L3-E6⁴⁾	ACG ACG ATT GCC AAA GC	TGT GAG TTC CCC ATA AAC CTC	456
53	L3-E9⁴⁾	TGG GGA AGA CGA CTA TTG C	TGG TCT TTC TTG AAG GCT TTC	428
54	L3-F3²⁾	GGT TTT TGA AAG GTT ACA AGC	TCA GCA TCA GTT AGT GGA TTC	360
55	L3-F5¹⁾	GGC TCA GTT TGA AGG TTG C	TGA TGA TTC TAC TCC CTG GAC	263

¹⁾ Nicht kartierte RGA; ²⁾ in Population 94/1 kartierte RGA; ³⁾ in Population 97/7 kartierte RGA; ⁴⁾ in beiden Kartierungspopulationen kartierte RGA.

Tab. A 19: Sequenzen der für die Expressionsanalysen verwendeten spezifischen RGA-Primer

Nr.	RGA	Sequenz ‚forward‘ Primer (5' - 3')	Sequenz ‚reverse‘ Primer (5' - 3')	PCR-Prod. [bp]
1	11a-G11	(siehe Tab. A 18, Primer Nr. 2)		301
2	11a-G16	(siehe Tab. A 18, Primer Nr. 3)		236
3	11a-G8	5' TCT AAG GGT GAC AAC AGC AA 3'	5' CTT CTT CCC ATT CGT CTA CTC T 3'	452
4	11a-H10	5' CAA GAT AGA CAA CTC GGA AGT C 3'	5' CAA ATC ATT GAA ACT CAG CA 3'	378
5	1g2-D10	5' GCT AGA GCT GTT TAT GAC GAA AT 3'	5' ATA CTC TCT TGA AGG TTG GTT TGT 3'	426
6	3a-C2	5' GTT GGT CAT TTT GGG GGA C 3'	5' ACA CAT CCA ACT CCC TGA CC 3'	358
7	3g1-P13	(siehe Tab. A 18, Primer Nr. 34)		270
8	D1-B1	5' CTA AGA TTC TAC CAG GCA AAC AAC 3'	5' CAC ATA TTC ATT CGG ACA TTC TC 3'	320
9	D1-D13	(siehe Tab. A 18, Primer 40)		378
10	D1-N1	(siehe Tab. A 18, Primer 44)		280

Tab. A 20: Andere Primer

Primer	Sequenz	Hersteller	Verwendung
M13-forward	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'	MWG Biotech oder Metabion	Insert-PCR, Sequenzreaktion*
M13-reverse	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'		
Actin-forward	5' CGA GGA AGA TCT GGC ATC A 3'	Metabion	Interner Standard semiquantitative RT- PCRs
Actin-reverse	5' AGG AGC TGC TCT TGG CAG T 3'		

(* für die Sequenzreaktionen mit IRD 700 bzw. 800 markiert)

A 6.3 Hersteller

Hersteller	Standort
Ambion	Cambridgeshire, UK
Amersham Biosciences	Freiburg (D), Uppsala (S), Buckinghamshire (UK)
Bachhofer	Reutlingen (D)
BD (Becton, Dickinson und Co.)	Heidelberg (D)
BioRad	München (D)
Biotec Fischer	Reiskirchen (D)
Biozym Diagnostik	Hessisch Oldendorf (D)
Cambrex Biosciences	Rockland, Maine (USA)
Eppendorf	Hamburg (D)
Fisher Scientific	Schwerte (D) Leics (UK)
GFL (Gesellschaft für Labortechnik)	Burgwedel (D)
Heraeus Sepatech	Osterode (D)
Hettich Zentrifugen	Tuttlingen (D)
Invitek	Berlin (D)
Invitrogen	Karlsruhe (D)
Kendro Laboratory Products	Newtown, Connecticut (USA)
Kodak	Paris (F) Rochester, New York (USA)
LI-COR	Lincoln (USA)
Merck	Darmstadt (D)
Metabion	Planegg-Martinsried (D)
MWG Biotech	Ebersberg (D)
Nunc	Roskilde (DK)
Peqlab Biotechnologie	Erlangen (D)
Promega	Madison, Wisconsin (USA)
Qiagen	Hilden (D)
Renner	Dannstadt (D)

Retsch	Haan (D)
Roche Diagnostics	Mannheim (D)
Roth	Karlsruhe (D)
Sigma-Aldrich	Steinheim (D) St. Louis, Missouri (USA)
Scientific Instruments	Schwäbisch Gmünd (D)
Techne	Burkhardtsdorf (D)
USB (United States Biochemicals)	Cleveland, Ohio (USA)

A 6.4 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Alkalische Lyse Lösung 1 zur Plasmid-Präparation	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM EDTA (15 min autoklavieren)
Alkalische Lyse Lösung 2 zur Plasmid-Präparation	0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS (frisch ansetzen)
Alkalische Lyse Lösung 3 zur Plasmid-Präparation	5 M Kaliumacetat 11,5 % (v/v) Essigsäure
Denaturierungslösung für Southern-blots	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Denhardt's	1 % (w/v) Ficoll 400 1 % (w/v) PVP 1 % (w/v) Albumin Fraktion V (steril filtrieren)
Depurinierungslösung für Southern-blots	0,2 M HCl
Dimethyldichlorosilan-Lösung	5 % (v/v) Dimethyldichlorosilan (Fisher Scientific) in 100 % Chloroform
Entwicklungslösung zur Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	9,4 mM Na ₂ CO ₃ 0,15 % (v/v) Formaldehyd* 6,4 µM Natriumthiosulfat*
Färbelösung zur Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	5,9 mM AgNO ₃ 0,15 % (v/v) Formaldehyd*

Fixierlösung zur Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	7.5 % (v/v) Essigsäure
Hybridisierungspuffer	6 x SSC 5 x Denhardt's 0,5 % (w/v) SDS 20 µg/mL denaturierte Heringsperma-DNA* (Roche) (autoklavieren)
Kobayashi Puffer 1 zur DNA-Extraktion	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 5 mM EDTA 350 mM Sorbitol 1 % (v/v) Mercaptoethanol* 10 % (w/v) PEG 8000 (autoklavieren)
Kobayashi Puffer 2 zur DNA-Extraktion	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 5 mM EDTA 350 mM Sorbitol 1 % (v/v) Mercaptoethanol* 1 % (w/v) Sodiumsarcosyl 710 mM NaCl 0,1 % (w/v) CTAB (autoklavieren)
10 x Ladepuffer für Agarose-Gelelektrophorese	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 30 % (v/v) Glycerin
Methacryloxypropyltrimethoxysilan-Lösung	0,3 % (v/v) Methacryloxypropyl-trimethoxysilan 0,3 % (v/v) Essigsäure in 100 % Ethanol
Neutralisierungslösung für Southern-blots	1 M Tris pH 7,4 1,5 M NaCl
10 x PCR-Puffer von Invitrogen	200 mM Tris-HCl (pH 8,4) 500 mM KCl
1 x SSC	150 mM NaCl 15 mM Natriumcitrat
Stop-Lösung (,Formamid Loading Dye') für SSCP-Polyacrylamid-Elektrophorese	95 % (v/v) Formamid 0,01 M NaOH 0,05 % (w/v) Xylenyanol 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
1 x TAE	40 mM Tris base 1 mM EDTA pH 8,0 mit konzentrierter Essigsäure einstellen

1 x TBE	89 mM Tris base 89 mM Borsäure 2 mM EDTA (pH 8,0)
1 x TBE Long Run	134 mM Tris base 45 mM Borsäure 2.5 mM EDTA (pH 8,0)
1 x Tris-EDTA (TE)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA (pH 8,0) (autoklavieren)
1 x Williams-Puffer	10 mM Tris pH 8,3 50 mM KCl 2 mM MgCl ₂ 0,001 % Gelatine (BioRad) (autoklavieren)

(* Reagenzien erst kurz vor Gebrauch der jeweiligen Lösungen zugeben)

A 6.5 Medien

Medien	Zusammensetzung	Verwendung
FB (,Freezing Broth')	1 % (w/v) Bacto™ Pepton (BD) 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 85,5 mM NaCl 36,2 mM K ₂ HPO ₄ 13,2 mM KH ₂ PO ₄ 1,5 mM Natriumcitrat 6,8 mM Ammoniumsulfat 365 µM MgSO ₄ 4,4 % (v/v) Glycerin (autoklavieren)	Lagerung von <i>E. coli</i> (- 80 °C)
LB (,Luria-Bertani')	1 % (w/v) Bacto™ Pepton (BD) 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 171 mM NaCl pH 7,0 mit 5 M NaOH (autoklavieren)	Anzuchtsmedium für <i>E. coli</i>
LB (,Luria-Bertani')	wie Flüssigmedium + 1,5 % (w/v) Bacto™ Agar (BD)	Anzuchtsmedium für <i>E. coli</i>
SOB	2 % (w/v) Bacto™ Pepton (BD) 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 8,5 mM NaCl 2,5 mM KCl pH 7,0 mit 5 M NaOH (autoklavieren)	Herstellung von SOC

SOC	SOB + 20 mM Glukose + 10 mM MgSO ₄ + 10 mM MgCl ₂	Erholungsmedium für <i>E. coli</i> nach der Elektroporation
-----	--	---

A 6.6 Bakterienstamm

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> DH10B	F- mcrA D(mrr-hsd RMS-mcrBC) f80dlacZDM15 DlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 D(ara, leu)7697 galU galK l- rpsL nupG	Invitrogen

A 6.7 Verschiedene Materialien und Geräte

Materialien und Geräte	Hersteller
Biomax Transcreen HE Intensivierungsschirm	Kodak
Biomax TM MS Röntgenfilme	Kodak
Doppellaser-Sequenzsystem 4200	LI-COR
<i>E. coli</i> -Pulser	BioRad
Elektroporationsküvetten (0,2 cm)	Invitrogen
Fotometer	Scientific Instruments
Gummimatte für 96er Polypropylen Mikrotiterplatten	Biozym
Horizontale Elektrophoresekammern	MWG Biotech
Hybond-N Nylonmembranen	Amersham (D)
Hybridisierungsöfen	MWG Biotech
Hybridisierungsröhren	Bachhofer
Hyperfilm TM MP Röntgenfilme	Amersham (UK)
Inkubationsschüttler	Edmund Bühler Labortechnik
Lichttisch	Biotec Fischer
Mikrotiterplatten 384 120 µL-Well Thermo-Fast® 96 Well	Nunc Techne
Petrischalen (Ø 8,5 bzw. 14 cm)	Fisher (D)
Reaktionsgefäße 0,5/ 1,5/ 2 mL-Reaktionsgefäße 15/ 50 mL-Falcon- Zentrifugenröhrchen 250 mL-Nalgene-Zentrifugenbercher	Eppendorf Renner Fisher

Replikationsstempel (96er und 384er)	Nunc
Schwingmühle	Retsch
Thermocycler Genius	Techne
Mastercycler Gradient	Eppendorf
UV-Tisch	Bachofer
Vertikales SSCP-Elektrophoresystem	peQLab
Wasserbad ,Typ 1083'	GFL
X-Omatic-Kassetten	Kodak (USA)
Zentrifugen Biofuge 13 R	Heraeus Sepatech
Sorvall RC-5C Plus Superspeed	Kendro
Universal 16 R	Hettich Zentrifugen

A 6.8 Polyacrylamid-Gele

6 % Polyacrylamid-Sequenzgel (0,25 mm dick)

Laufbedingungen: 1500 V, 35 mA, 40 W, 45 °C; 30 min Vorlauf

Zusammensetzung (40 mL Gesamtvolumen)	Hersteller
6 % RapidGel-XL 40% Acrylamid-Stammlösung (Acrylamid / Bisacrylamid = 19:1)	USB, Ohio, USA
1 x TBE Long Run Puffer	(s. o.)
5,8 M Urea Ultrapure	USB
0,03 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
2,6 µM Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
0,09 % Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma

0,5 x MDE-Gel für SSCP-Analysen (0,4 mm dick)

Laufbedingungen: bei 200 V, 20 mA und 2 W

Zusammensetzung (40 mL Gesamtvolumen)	Hersteller
0,5 x MDE-Gel Stammlösung	Cambrex
0,6 x TBE	(s. o.)
5 % Glycerin	Roth
2,2 µM Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
0,06 % Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma

A 6.9 Software

Software	Zugang bzw. Hersteller
<i>Baseimage IR</i>	LI-COR, Lincoln (USA)
<i>BioEdit</i>	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit/
<i>BLAST</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
<i>CLUSTAL_X</i>	ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/CLUSTALX/
<i>DNASIS</i> , Version 2.1 für Windows	Hitachi Software, Californien (USA)
<i>JoinMap</i> , Version 3.0	PRI (Plant Research International), Wageningen (NL)
<i>MapChart 2.1</i>	PRI (Plant Research International), Wageningen (NL)
<i>Oligo</i> , Version 6.68 für Windows	MBI (Molecular Biology Insights), Plymouth (UK)
<i>PHYLIP</i>	http://evolution/genetics/washington.edu/phylip.html
<i>Quantity One</i> , Version 4.2.1	BioRad, München (D)
<i>TreeView</i>	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview/

A 6.10 Identitätsmatrizen

Tab. A 20: Prozentuale DNA-Sequenzidentität von miteinander hybridisierenden Klonen

a) Sonde: 11a-G16

RGa	11a-G16	11g1-O5	12g1-M19	11a-G2	11a-G10	11a-G17	11a-G23	11a-I3	10g1-A23	12g1-E12	11g2-P10
11a-G16	100	92	87	85	85	85	85	80	81	83	82
11g1-O5	-	100	94	91	91	91	90	84	84	84	83
12g1-M19	-	-	100	93	93	93	92	86	87	84	84
11a-G2	-	-	-	100	100	100	98	88	89	85	85
11a-G10	-	-	-	-	100	100	98	88	89	85	85
11a-G17	-	-	-	-	-	100	98	88	89	85	85
11a-G23	-	-	-	-	-	-	100	88	89	85	85
11a-I3	-	-	-	-	-	-	-	100	97	86	86
10g1-A23	-	-	-	-	-	-	-	-	100	87	88
12g1-E12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	92
11g2-P10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100

b) Sonde: 11a-G8

RGa	11a-G15	11g1-D6	12g2-J8	11g1-F11	11g2-C11	10g2-D12	11a-I1	11a-G8	10g1-A16	12g1-E15	10g2-G5
11a-G15	100	100	100	100	100	100	100	100	99	94	93
11g1-D6	-	100	100	100	100	100	100	100	99	94	93
12g2-J8	-	-	100	99	99	100	100	100	99	94	93
11g1-F11	-	-	-	100	99	100	100	99	99	94	93
11g2-C11	-	-	-	-	100	100	100	99	99	94	93
10g2-D12	-	-	-	-	-	100	100	100	99	94	93
11a-I1	-	-	-	-	-	-	100	100	99	94	93
11a-G8	-	-	-	-	-	-	-	100	99	94	93
10g1-A16	-	-	-	-	-	-	-	-	100	93	94
12g1-E15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	98
10g2-G5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100

c) Sonde: D1-M1

RGa	D2-H20	D2-J4	D1-J1	D1-G1	D1-M1	D2-G20	D1-D13	D1-A2	D1-O1	D1-K1	D1-F1
D2-H20	100	100	100	100	99	92	92	93	91	88	87
D2-J4	-	100	100	100	100	92	92	93	92	88	87
D1-J1	-	-	100	100	100	93	93	94	92	88	88
D1-G1	-	-	-	100	100	93	93	94	92	88	88
D1-M1	-	-	-	-	100	92	92	93	92	88	87
D2-G20	-	-	-	-	-	100	100	92	88	84	84
D1-D13	-	-	-	-	-	-	100	92	88	84	84
D1-A2	-	-	-	-	-	-	-	100	89	87	86
D1-O1	-	-	-	-	-	-	-	-	100	86	85
D1-K1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100
D1-F1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100

d) Sonde: 3a-A7

RGa	1g1-E23	4g1-O15	1g2-A1	4g2-C3	1g1-A10	4g1-D23	4g1-P23	1g2-A22	3a-A7	3g1-P13	3a-L19
1g1-E23	100	95	93	92	89	89	89	90	88	88	89
4g1-O15	-	100	94	92	89	90	89	90	87	87	88
1g2-A1	-	-	100	91	88	89	88	88	87	87	87
4g2-C3	-	-	-	100	90	90	89	90	88	88	90
1g1-A10	-	-	-	-	100	99	95	91	86	86	88
4g1-D23	-	-	-	-	-	100	95	91	86	86	87
4g1-P23	-	-	-	-	-	-	100	90	85	85	86
1g2-A22	-	-	-	-	-	-	-	100	87	87	88
3a-A7	-	-	-	-	-	-	-	-	100	99	91
3g1-P13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	91
3a-L19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100

Tab. A 22: Prozentuale DNA-Sequenzidentität der BAC-RGA mit den anderen Rosen-RGA und den Resistenzgenen *N*, *M*, *RPM1*, *Xa1* (‘P-Loop’ - ,GLPL’ Motiv)

	BAC-3-C1	BAC-3-C5	BAC-help	BAC-4-F24
BAC-3-C1	100	89	86	77
BAC-3-C5	89	100	89	80
BAC-help	86	89	100	81
BAC-4-F24	77	80	81	100
<i>N</i>	41	40	43	42
<i>M</i>	33	32	37	34
D2-K16	47	50	50	48
D2-D14	47	47	51	50
D1-P13	47	45	48	48
D1-N13	66	65	69	64
D1-M1	43	44	45	44
D1-K15	20	18	19	21
D1-H6	21	21	23	22
D1-D1	45	43	46	43
D1-C14	40	39	42	42
D1-B1	48	48	48	42
4g2-M1	36	35	37	37
4g2-I14	32	34	35	35
4G1-J7	45	45	48	46
3g2-O10	37	38	41	42
3g2-I18	44	43	48	44
3g2-E4	51	48	51	48
3g1-M19	48	47	49	48
3g1-E4	49	50	51	48
3b-L16	34	35	38	38
3a-L5	49	48	53	47
3a-C8	48	49	52	51
3a-C2	40	39	42	42
3a-C12	39	40	43	45
3a-A7	52	54	55	52
1g2-M14	42	43	45	43
1g2-J13	35	38	39	40
1G2-D10	43	43	44	42
1g2-C6	42	43	44	45
1G1-E24	41	40	41	38
<i>Xa1</i>	16	19	19	18
<i>RPM1</i>	23	24	27	27
12g2-E8	23	23	23	24
12g2-C8	27	29	30	28
12g1-K16	24	26	26	26
12g1-G10	24	26	27	27
11g1-I16	16	17	18	20
11b-L4	24	27	28	28
11A-H10	26	27	28	27
11a-G8	20	19	22	20
11a-G16	25	27	27	25
11a-G11	21	23	22	22
10g1-F8	16	16	16	18

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Grunewaldt, dem Leiter des Institutes für Zierpflanzenzüchtung in Ahrensburg, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Übernahme des Koreferats bedanken.

Meinem Arbeitsgruppenleiter und Betreuer, Herrn Prof. Dr. Debener, danke ich für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung. Mit hilfreichen Diskussionen und praktischer Unterstützung im Labor hat er mir immer sehr geholfen, wenn ich nicht mehr weiter kam.

Allen Kollegen meiner Arbeitsgruppe, besonders Frau Lore Mattiesch und Frau Dr. Helgard Kaufmann, danke ich für ihre Hilfestellung bei den alltäglichen laborspezifischen Problemen.

Herr Dr. Marcus Linde und Herr Zifu Yan haben mir sehr bei der Kartierung der RGA geholfen. Sie erstellten die Chromosomenkarten für die beiden Kartierungspopulationen, in welche die RGA-Marker integriert wurden, und sie hatten auf meine unzähligen Fragen immer eine Antwort - vielen Dank dafür!

Danke an Oliver Blechert, der mir bei diversen Software-Problemen sowie den phylogenetischen Analysen geholfen hat!

Bei Marcus Linde, Hans Hattendorf und Silke Lesemann möchte ich mich für die kritische Durchsicht meiner Arbeit und die hilfreichen Korrekturvorschläge bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die immer für mich da waren und mir durch ihre finanzielle Unterstützung das Gartenbau-Studium und die abschließende Promotion ermöglicht haben.

Und nicht zuletzt danke ich Thomas dafür, dass er meine Launen ertragen und immer zu mir gehalten hat.

Erklärung

gem. § 6 (5) Nr. 1 - 3 PromO

Ich erkläre, dass ich

1. die Arbeit ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe,
2. keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und
3. die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Lebenslauf

Anja Hattendorf

geboren am 25.11.1975 in Kösching bei Ingolstadt

Schulbildung

1988 - 1990	Otto-Hahn-Gymnasium, Gifhorn
1990 - 1992	Collegio Humboldt, Puebla, Mexiko
1992 - 1995	Otto-Hahn-Gymnasium, Gifhorn
06/1995	Abitur

Hochschulausbildung

09/1995 - 05/2001	Studium der Gartenbauwissenschaften am Fachbereich Gartenbau der Universität Hannover
01/1998 - 05/1998	Studiengebundenes Praktikum an der Lehr- und Versuchsanstalt für Gartenbau in Hannover/Ahlem im Bereich Zierpflanzenbau
06/1998 - 10/1998	Studiengebundenes Praktikum an der ‚Proefstation voor Bloemisterij en Glassgroente‘ in Aalsmeer (Holland) im Bereich Zierpflanzen- und Gemüsebau
11/2000 - 05/2001	Diplomarbeit am Institut für Zierpflanzenzüchtung in Ahrensburg

Berufliche Tätigkeit

05/2001 - 04/2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Zierpflanzenzüchtung der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen in Ahrensburg
05/2004 - 12/2004	Gartenbautechnische Angestellte beim Bundesortenamt in Hannover
Seit 01/2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fachbereich Gartenbau der Universität Hannover, Abteilung angewandte Genetik