

Hybrid Assembly of Whole Genome Shotgun Sequences of Two Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Translocation Lines Carrying the Beet Cyst Nematode Resistance Gene *Hs1-2* and Functional Analysis of Candidate Genes

MSc Sarah Jäger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Jung

Die Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.) ist ein Wirt des Rübenzystennematoden *Heterodera schachtii* Schmidt, welcher für hohe Ertragsverluste verantwortlich ist. Resistenz gegen *H. schachtii* konnte in der Wildart *Patellifolia procumbens* festgestellt und durch Translokation an das Ende von Chromosom 9 der Zuckerrübe übertragen werden. Bisher sind zwei nematodenresistente (TR520 und TR363) und zwei anfällige Translokationslinien (TR320 und TR659) bekannt, die teilweise homolog zueinander sind. Die Position eines zweiten Nematodenresistenzgens (*Hs1-2*) wird in einer gemeinsamen Region der beiden resistenten Linien vermutet. Als Ergebnis einer früheren Arbeit war in Bezug auf diese Hypothese der offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) 702 als Kandidatensequenz vorgeschlagen worden.

Das Ziel meiner Arbeit war die Klonierung des *Hs1-2* Gens. Zunächst wurde hierzu eine funktionelle Analyse des ORF 702 durchgeführt und weitere translokationsspezifische Sequenzen und Genkandidaten mittels *whole-genome-shotgun* (WGS) Sequenzierung der Translokationslinien TR520 und TR363 identifiziert.

Im ersten Teil dieser Arbeit präsentiere ich die Vollängensequenz des ORF 702, welcher 1110 bp (370 aa) lang ist und sieben Exons enthält, sowie eine funktionelle Analyse des ORFs in zwei Modellsystemen. Die kodierende Sequenz wurde in den binären Vektor pAM194 unter der Kontrolle des CaMV 35S Promoters kloniert und durch *Agrobacterium*-vermittelte Transformation in Zuckerrüben *hairy roots* und in *Arabidopsis thaliana* übertragen. Die Expression des Transgens habe ich über GUS-Färbung und durch RT-PCR untersucht und die Nematodentests mit Zuckerrüben-*hairy root* Klonen und spaltendenden *A. thaliana* T₂ Familien durchgeführt. Hierbei habe ich keine signifikanten Unterschiede in der Nematodenentwicklung zwischen Transgenen- und Kontrollpflanzen festgestellt und deshalb ORF 702 als Kandidat für das *Hs1-2* Gen ausgeschlossen.

Im zweiten Teil meiner Arbeit erweiterte ich die Sequenz der BAC-basierten physischen Karte der Translokationslinie TR520. Da die Ausweitung der BAC-basierten physischen Karte durch *chromosome walking* limitiert ist, wurde eine *whole genome shotgun* (WGS) -Sequenzierung der Translokationslinien TR520 und TR363 mit einem Illumina HiSeq 2000 Sequenzierer durchgeführt. Es wurden ~ 87 Gbp Rohsequenzen produziert mit einer ~110-fachen Genomabdeckung je Translokationslinie. Mit den resultierenden kurzen Sequenzstücken (*short reads*) habe ich eine Hybridassemblierung zusammen mit 1032 kbp BAC- und YAC-Sequenzen, die auf der physischen Karte verankert sind, und vorläufigen *assemblies* eines Zuckerrüben- und eines Wildrübengenoms durchgeführt. In Folge dessen konnten 477 kbp neue Sequenzen, die auf der physischen Karte verankert sind, identifiziert werden. Daraus ergibt sich eine Gesamtlänge von 1509 kbp. Zusätzlich konnte ich 13 neue Sequenz-*scaffolds* assemblieren, in denen Sequenzen von *P. procumbens* und aus der WGS der Translokationslinien TR520 und TR363 integriert sind. Die so identifizierten 716 kbp erhöhen die Gesamtlänge der Translokation (Linie TR520) auf 2226 kbp, was etwa 150% des zuvor geschätzten Wertes (1500 kbp) entspricht. Darüber hinaus konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Translokation von langen Zuckerrübensequenzen unterbrochen wird. Damit erübrigt sich die Identifizierung des Translokationsbruchpunktes als Referenzpunkt für das proximale Ende der Translokation. Zusätzlich konnten Sequenzen identifiziert werden, die exklusiv nur auf der Translokation der Linie TR363 vorkommen. Weitere Sequenzanalysen ergaben 320 vorhergesagte ORFs, aus denen ich elf ORFs als mögliche Kandidatensequenzen für das *Hs1-2*-Gen entsprechend ihrer Position auf der physikalischen Karte und aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zu anderen bekannten Resistenzgenen selektierte. ORF 803 liegt auf beiden resistenten Translokationen und auf der anfälligen Translokation TR659. Dagegen zeigte die Analyse mittels RT-PCR eine unterschiedliche Expression für die anfälligen und resistenten Translokationslinien. Die Aminosäuresequenz von ORF 803 hat 34% Ähnlichkeit zu einer *mitogen-activated* Protein Kinase Kinase Kinase (MAP3K). Zusätzlich konnte ich ORF 801 und ORF 802 in direkter Nähe zu ORF 803 lokalisieren. Beide weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Rezeptorkinasen und Phosphatidylinositolkinasen auf. Diese

Anhäufung von Genen innerhalb einer kritischen Region der Translokation könnte auf den *Hsl-2*-Locus hinweisen.