

## Themen zur Züchtungsforschung/Züchtung

Moderation: Janine König

Fischer, Kristin<sup>1</sup>; Ruge-Wehling, Brigitte<sup>1</sup>; Scholz, Margret<sup>1</sup>; Habekuss, Antje<sup>2</sup>; Wehling, Peter<sup>1</sup>

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI); <sup>1</sup> Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen (ZL); <sup>2</sup> Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz (RS)

### Molekulare Charakterisierung einer Wildgerstenintrogression mit dem Gelbverzweigungsresistenzgen *Ryd4<sup>Hb</sup>* im Genom der Kulturgerste

Molecular characterization of an introgression from wild barley carrying the resistance gene *Ryd4<sup>Hb</sup>*

#### Zusammenfassung

Aus einer interspezifischen Kreuzung der Wintergerste *Hordeum vulgare* cv. 'Igri' mit der virusresistenten Wildgerste *H. bulbosum* wurden spaltende Kartierungspopulationen entwickelt, die eine 3HL-Introgression tragen, welche Resistenz gegenüber BYDV vermittelt. Die genetische Analyse einer BC<sub>2</sub>F<sub>4</sub>-Familie zeigte eine monohybride Aufspaltung der Resistenz mit dominanter Merkmalsausprägung. Es konnten bisher vier Gersten-Ankermarker und vier TC-Marker um das Resistenzgen *Ryd4<sup>Hb</sup>* kartiert werden. Zwei der aus den orthologen Bereichen des Reisgenoms abgeleiteten TC-Marker kosegregieren mit dem Resistenzgen *Ryd4<sup>Hb</sup>*.

Sichwörter: *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, BYDV, Resistenz, Selektionsmarker

#### Abstract

Interspecific crosses between winter barley *H. vulgare* cv. 'Igri' and a virus-resistant accession of the wild species *H. bulbosum* yielded mapping populations segregating with individuals resistant towards barley yellow dwarf virus. Genetic analysis of a BC<sub>2</sub>F<sub>4</sub> family revealed a dominant inheritance of the resistance. GISH analysis indicated an *Hb* introgression on chromosome 3HL. Four 3HL barley anchor markers and four TC markers of the orthologous rice genome region, respectively, were mapped on either side of the resistance locus *Ryd4<sup>Hb</sup>*. Two of the TC markers cosegregated with the BYDV resistance.

Keywords: *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, BYDV, resistance, selection markers

#### Einleitung

Die Gelbverzweigung der Gerste wird durch das *Barley Yellow Dwarf Virus* (BYDV) verursacht und kann weltweit zu hohen wirtschaftlichen Verlusten führen. Die Infektion der Pflanzen erfolgt über verschiedene Blattlausarten als Vektoren: befallene Pflanzen weisen gelbliche Blätter und einen Zwergwuchs auf. Das Virus ist durch einen ELISA sicher in der Pflanze nachweisbar. Durch die zunehmend milde Witterung im Winter kann es zu einem verstärkten Auftreten von Blattläusen im Wintergerstenbestand kommen. So verursachte das warme, feuchte Klima im Winter 2006 im darauffolgenden Erntejahr 2007 in Deutschland Ertragseinbußen von bis zu 40 % (Wellie-Stephan, 2007). Eine Alternative zur chemischen Bekämpfung der Blattläuse kann die Entwicklung von resistenten Sorten darstellen.

In der Literatur sind bisher Gene und QTLs für BYDV Resistenz beschrieben, die aus dem primären Genpool der Gerste stammen (Suneson et al., 1955, Schaller et al., 1963, Scheurer et al., 2001, Niks et al. 2004). Die genetische Variabilität des primären Genpools der Gerste ist jedoch im Hinblick auf Krankheitsresistenzen beschränkt. Eine neue Quelle zur Verbesserung des Resistenzniveaus der Gerstensorten stellt der sekundäre Genpool der Gerste, *Hordeum bulbosum*, dar. In der Vergangenheit wurden beispielsweise zwei neue Resistenzgene gegenüber dem Gelbmosaikviruskomplex (BaMMV, BaYMV-1, -2) aus *H. bulbosum* markergestützt in die Kulturgerste übertragen (Ruge et al., 2003; Ruge-Wehling et al., 2006). Interspezifische Kreuzungen zwischen der Kulturgerste *H. vulgare* cv. 'Igri' und *H. bulbosum* ermöglichen nun auch die Übertragung einer Resistenz gegenüber BYDV. Genetische Analysen an spaltenden Nachkommenschaften zeigten eine monogene, dominante Vererbung dieser neuen Resistenz. Das Resistenzgen *Ryd4<sup>Hb</sup>* konnte durch molekulargenetische Techniken dem Gerstenchromosom 3HL zugeordnet werden.

#### Material und Methoden

Die Charakterisierung des Resistenzgens *Ryd4<sup>Hb</sup>* erfolgte auf Basis von Kreuzungsnachkommenschaften, die durch eine interspezifische Kreuzung der Kulturgerste *H. vulgare* cv. 'Igri' (*Hv*) mit der resistenten Wildgerste *H. bulbosum* A17 (*Hb*, Abstammung: Botanischer Garten Montevideo, Uruguay) entstanden sind (Scholz et al., 2008). Durch Rückkreuzungen mit *Hv* und mehreren Selbstungsgenerationen sind die Populationen BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub>-2 und 3 (N=37, bzw. N=43) und BC<sub>2</sub>F<sub>4</sub> (Vollgeschwisterfamilie, N=143 Individuen) entwickelt worden, die auf dem Chromosom 3HL eine *Hb*-Introgression mit dem Gen *Ryd4<sup>Hb</sup>* tragen (Scholz et al., 2009).

Die Phänotypisierung erfolgte durch Infektion der Einzelpflanzen mit Blattläusen (*Rhopalosiphum padi*), die das Virusisolat BYDV-PAV1 trugen. Nach sechs Wochen im Gewächshaus wurde der Virustiter der Pflanzen über ELISA bestimmt (Extinktionswerte < 0,1 = resistent, > 0,1 = anfällig).

Die Kartierung des Resistenzgens wurde an der BC<sub>2</sub>F<sub>4</sub>-Familie durchgeführt. Die Introgressionsgröße in den BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub>-Familien wurde ebenfalls mit molekularen Markern bestimmt. Insgesamt wurden 31 EST-basierte 3HL-Gersten-SSR-Marker (Stein et al., 2007, Varshney et al., 2007), fünf STS-Marker (GrainGenes 2.0) sowie 51 TC-Marker aus dem orthologen Bereich des Reisgenoms (Stein et al., 2007) auf Marker-Polymorphismus zwischen *H. vulgare* und *H. bulbosum* gescreent. Die Kopplungsanalyse erfolgte mit der Software JoinMap® 4.0.

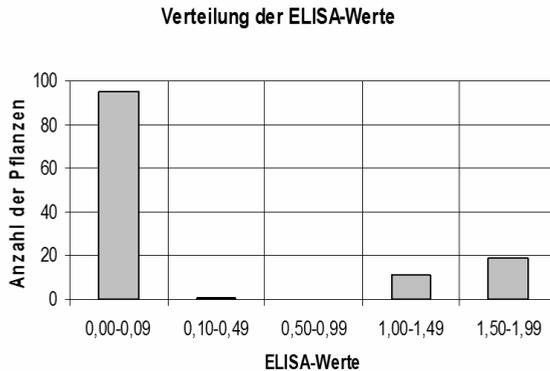
**Ergebnisse**

Die Aufspaltung der Resistenz ergab in der BC<sub>2</sub>F<sub>4</sub>-Familie ein 3:1-Verhältnis von resistenten und anfälligen Phänotypen. In den Familien BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub>-2 und -3 hingegen wurde eine Aufspaltung von 1:1 beobachtet (Tabelle 1).

**Tab. 1** Spaltungsverhältnisse der Resistenz

Familie	Individuen	Resistente Individuen	Anfällige Individuen	χ <sup>2</sup> -Wert <sub>(3:1)</sub>	χ <sup>2</sup> -Wert <sub>(1:1)</sub>
BC <sub>2</sub> F <sub>3</sub> -2	37	15	22	23,430	1,320
BC <sub>2</sub> F <sub>3</sub> -3	41	25	16	4,300	1,980
BC <sub>2</sub> F <sub>4</sub>	143	104	39	0,397	-

Die Auswertung der ELISA-Werte zeigt eine deutliche bimodale Verteilung ().



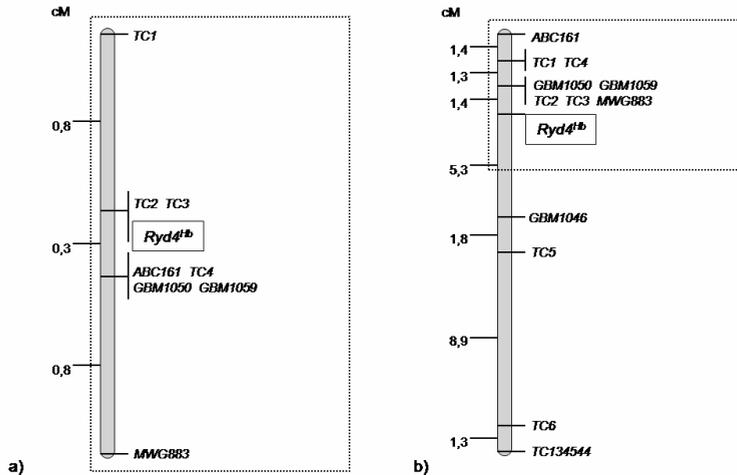
**Abb. 1** Bimodale Verteilung der ELISA-Werte in der Familie BC<sub>2</sub>F<sub>4</sub> (Abszisse: ELISA-Werte im Bereich von 0,00 bis 1,99; Ordinate: Anzahl der Pflanzen)

Die *H. bulbosum*-Introgression wurde bereits durch genomische In-situ-Hybridisierung (GISH) dem Gerstenchromosom 3HL zugeordnet (Scholz et al. 2009). Die Lokalisation der Introgression auf dem Chromosom 3HL konnte durch die enge Kopplung des Resistenzgens *Ryd4<sup>Hb</sup>* mit den 3HL-SSR-Ankermarkern *GBM1050* und *GBM1059* sowie den STS-Markern *ABC161* und *MWG883* bestätigt werden. Aus der orthologen Region des Reisgenoms (R1) konnten vier TC-Marker entwickelt werden, die mit der Resistenz kosegregieren beziehungsweise eine kurze Distanz zum Resistenzlocus *Ryd4<sup>Hb</sup>* zeigen (Tabelle 2, Abbildung 2a).

**Tab. 2** Introgressionsgrößen der Familien BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub>-2, -3 und BC<sub>2</sub>F<sub>4</sub>

Familie	Aufspaltung der Resistenz	ABC161	TC1	TC4	GBM1050	GBM1059	TC2	TC3	MWG883	GBM1046	TC5	TC6	TC134544
BC <sub>2</sub> F <sub>3</sub> -2	1:1	Hv- und Hb-Allel	Hv- und Hb-Allel	Hv- und Hb-Allel	Hb-Allel	Hb-Allel	Hv- und Hb-Allel						
BC <sub>2</sub> F <sub>3</sub> -3	1:1	Hv- und Hb-Allel	Hv- und Hb-Allel	Hv- und Hb-Allel	Hb-Allel	Hb-Allel	Hv- und Hb-Allel						
BC <sub>2</sub> F <sub>4</sub>	3:1	Hv- und Hb-Allel	Hv- und Hb-Allel	Hv- und Hb-Allel	Hb-Allel	Hb-Allel	Hv- und Hb-Allel						

In den Familien BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub>-2 und -3, die eine größere *H. bulbosum*-Introgression tragen, wurden drei zusätzliche TC-Marker (*TC134544*, *TC6* und *TC5*) und ein distal auf 3HL lokalisierter SSR-Marker (*GBM1046*) kartiert (Tabelle 2, Abbildung 2).



**Abb. 2** Genetische Karten der Familien a) BC<sub>2</sub>F<sub>4</sub> und b) BC<sub>2</sub>F<sub>3-2</sub> (Abbildungen nicht maßstabsgerecht)

**Diskussion**

Von Scholz et al., 2009 wurde eine BYDV-Resistenz beschrieben, die aus der Wildgerste *Hordeum bulbosum* durch interspezifische Kreuzungen auf die Kulturgerste *Hordeum vulgare* übertragen wurde. Die genetische Analyse der BC<sub>2</sub>F<sub>4</sub>-Familie zeigte, dass die Resistenz monogen dominant vererbt wird. Die abweichende Aufspaltung in den Familien BC<sub>2</sub>F<sub>3-2</sub> und -3 ist durch einen gameten-selektierenden Faktor (SDL, *segregation distorton locus*) zu erklären, der im distalen Bereich der Introgression lokalisiert ist. Dieses Segment konnte in der Familie BC<sub>2</sub>F<sub>4</sub> bereits rekombinativ entfernt werden. In der Familie BC<sub>2</sub>F<sub>4</sub> wurden insgesamt acht polymorphe Marker identifiziert, die um den Resistenzlocus kartieren. Die *Hb*-Introgression umfasst eine genetische Distanz von 1,9 cM. Die Höhe des *linkage drags*, wie er etwa im Falle des Gelbmosaikvirus-Resistenzgens *Rym14<sup>hb</sup>* beschrieben wurden (Ruge et al., 2003) kann durch die Kartierung weiterer Anker-Marker bestimmt werden.

Es ist die bis heute einzige beschriebene 3HL-Introgression, so dass von einer geringen Rekombinationsrate zwischen *H. vulgare* und *H. bulbosum* im Bereich der homoeologen Chromosomenarme von 3HL auszugehen ist.

Unterschiede im Hinblick auf Reihenfolge und Distanz der in der BC<sub>2</sub>F<sub>4</sub>- und BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub>-Familie kartierten Marker sind wie folgt zu begründen: (I) Unterschiedliche Aufspaltung der Resistenz (3:1 vs. 1:1), (II) unterschiedliche Anzahl Individuen/Kartierungsfamilie (Tabelle 1) und (III) unterschiedliche Anzahl an kartierten Markern (Abbildung 2).

Insgesamt stimmen die Reihenfolge der SSR-Marker in den experimentellen Familien mit den in der Literatur beschriebenen Abfolge der Marker auf 3HL gut überein (Stein et al., 2007, Varshney et al., 2007). Die genetische Anordnung der TC-Marker ist sehr gut mit den physischen Positionen auf dem Reischromosom R1 vergleichbar (nicht gezeigt). In der Familie der BC<sub>2</sub>F<sub>4</sub> koregrieren die TC-Marker *TC2* und *TC3* mit dem Resistenzlocus *Ryd4<sup>hb</sup>*. Diese können demzufolge gut für eine markergestützte Selektion resistenter Individuen genutzt werden. Beide Marker werden kodominant vererbt und sind als PCR-basierte Marker auf Agarose-Gelen kostengünstig und effizient darzustellen.

Für die züchterische Nutzung dieser neuen Resistenz muss zuvor ein Faktor, der die Ausbildung von vitalen, homozygot resistenten Pflanzen verhindert, rekombinativ eliminiert werden. Zurzeit werden Nachkommen der Familie BC<sub>2</sub>F<sub>4</sub> auf Vitalität bonitiert, die laut molekularer Marker homozygot resistent sind.

**Literatur**

Ruge, B., Linz, A., Pickering, R., Proeseler, G., Greif, P., Wehling, P., 2003: Mapping of *Rym14<sup>hb</sup>*, a gene introgressed from *Hordeum bulbosum* and conferring resistance to BaMMV and BaYMV in barley, *Theor. Appl. Genet.* **107**, 965-971  
 Ruge-Wehling, B., Linz, A., Habekuss, A., Wehling, P., 2006: Mapping of *Rym16<sup>hb</sup>*, the second soil-born virus-resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum*, *Theor. Appl. Genet.* **113**, 867-873  
 Niks, R.E., Habekuss, A., Bekele, B., Ordon, F., 2004: A novel major gene on chromosome 6H for resistance of barley against the barley yellow dwarf virus, *Theor. Appl. Genet.* **109**, 1536-1543  
 Schaller, C.W., Rasmusson D.C., Qualsef C.O., 1963: Sources of resistance to the yellow-dwarf virus in barley, *Crop. Sci.* **3**, 342-344  
 Scheurer, K.S., Friedt, W., Huth, W., Waugh, R., Ordon, F., 2001: QTL analysis of tolerance to a German strain of BYDV-PAV in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Theor. Appl. Genet.* **103**, 1074-1083

- Scholz, M., Ruge-Wehling, B., Habekuss, A., Pendinen, G., Schrader, O., Flath, K., Große, E., Wehling, P., 2008: The secondary gene pool of barley as gene donor for crop improvement In: Maxted N., Ford-Lloyd B.V., Kell S.P., Iriondo J., Dulloo E., Turok J. (Hrsg), Crop Wild Relative Conservation and Use, CABI Publishing, Wallingford, S. 549-555
- Scholz, M., Ruge-Wehling, B., Schrader, O., Habekuss, A., Pendinen, G., Fischer, K., Wehling, P., 2009: *Ryd4<sup>th</sup>*, a novel resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum* into barley and conferring complete and dominant resistance to the barley yellow dwarf virus (BYDV-PAV), Theor. Appl. Genet. **119**, 837-849
- Stein, N., Prasad, M., Scholz, U., Thiel, T., Zhang, H., Wolf, M., Kota, R., Varshney, R.K., Perovic, D., Grosse, I., Graner, A., 2007: A 1,000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics, Theor. Appl. Genet. **114**, 823-839
- Suneson, C.A., 1955: Breeding for resistance to Yellow Dwarf Virus in barley, Agron. J. **47**, 283
- Varshney, R.K., Marcel, T.C., Ramsay, L., Russell, J., Röde, M.S., Stein, N., Waugh, R., Langridge, P., Niks, R.E., Graner, A., 2007: A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci, Theor. Appl. Genet. **114**, 1091-1103
- Wellie-Stephan, O., 2007: 2007 – Das Jahr des Gelbverzwergungsvirus, Innovation 3/2007, Deutsche Saatgutveredelung, Lippstadt, <http://www.dsv-saaten.de/content.php?f,10280/o,article,132/>

**Lüpken, Thomas<sup>1</sup>; Habekuss, Antje<sup>1</sup>; Perovic, Dragan<sup>1</sup>; Krämer, Ilona<sup>1</sup>; Stein, Nils<sup>2</sup>; Ordon, Frank<sup>1</sup>**

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), <sup>1</sup> Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Quedlinburg; <sup>2</sup> Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben

### **Hochauflösende Kartierung der Virusresistenzgene *rym11* und *Ryd3* in Gerste (*Hordeum vulgare* L.)**

High resolution mapping of resistance genes *rym11* and *Ryd3* in barley (*Hordeum vulgare* L.)

#### **Zusammenfassung**

Zwei landwirtschaftlich bedeutende Resistenzgene der Gerste (*Hordeum vulgare* L.), - *rym11*, welches Resistenz gegen die Gelbmosaikvirose [*Barley mild mosaic virus* (BaMMV), *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV)] bedingt, und *Ryd3*, das gegen die viröse Gelbverzwergung [*Barley yellow dwarf virus* (BYDV)] wirksam ist, sollen mittels hochauflösender Kartierungspopulationen von jeweils 5000 F<sub>2</sub>-Pflanzen kartiert und isoliert werden. Zu diesem Zweck werden die aus den Kartierungspopulationen entstandenen und für das jeweilige Zielintervall genetisch fixierten segmental rekombinanten Inzuchtlinien (RIL) einer ausgiebigen Markeranalyse sowie einer wiederholten Virustestung sowohl im Gewächshaus als auch im Feld unterzogen. Für *rym11* sind 5102, für *Ryd3* 3213 der F<sub>2</sub>-Pflanzen analysiert worden. Für beide Populationen liegen erste phänotypische Daten vor und mehrere mit dem jeweiligen Resistenzgen eng gekoppelte Marker konnten kartiert werden.

**Stichwörter:** Gerste, Resistenz, Gelbmosaikvirose, viröse Gelbverzwergung, *rym11*, *Ryd3*, RIL, Kartierung

#### **Abstract**

Two important resistance genes of barley (*Hordeum vulgare* L.) - *rym11*, which confers resistance against the Barley yellow mosaic virus complex [*Barley mild mosaic virus* (BaMMV), *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV)] and *Ryd3*, which is effective against Barley yellow dwarf [*Barley yellow dwarf virus* (BYDV)] - are to be mapped at high resolution by analyzing 5000 F<sub>2</sub>-plants each as a prerequisite for isolating these genes via a map based cloning approach. For this purpose segmental recombinant inbred lines (RIL), originated from the mapping populations and genetically fixed for the respective target interval, undergo an extensive marker analysis as well as repeated virus testing both in the greenhouse and in the field. For *rym11* 5102 and for *Ryd3* 3213 F<sub>2</sub>-plants have been analysed up to now. For both populations first phenotypic data is present and several closely linked markers could be mapped.

**Keywords:** Barley, resistance, Barley yellow mosaic virus complex, Barley yellow dwarf, *rym11*, *Ryd3*, RIL, mapping

#### **Einleitung**

Gerste ist nach Weizen die Kulturart mit der größten Bedeutung in Deutschland und nimmt auch global eine bedeutende Rolle vor allem als Viehfutter und Braugerste ein. Mit einer Genomgröße von etwa 5 Gbp besitzt Gerste das kleinste Genom unter den agronomisch genutzten Triticeae, und wurde deshalb gewählt, um die erste genomabdeckende physikalische Karte der Triticeae zu erstellen. Ziel dieses Projektes ist es, den Nutzen der entstehenden physikalischen Karte zu demonstrieren, indem zwei agronomisch bedeutende Resistenzgene mittels einer hochauflösenden Kartierungspopulation zunächst in einer genetischen Karte kartiert und nach anschließender Verankerung der genetischen Karte mit der physikalischen Karte isoliert werden. Dabei handelt es sich um das Resistenzgen *rym11*, das in der Nähe des Centromers von Chromosom 4H lokalisiert ist (Nissan-Azzouz et al., 2005), und welches als einziges aus *Hordeum vulgare* stammendes Resistenzgen gegen alle bisher in Europa bekannten Erreger der Gelbmosaikvirose (BaMMV; BaYMV) wirkt, und das Resistenzgen *Ryd 3*, welches auf Chromosom 6H ebenfalls in unmittelbarer Nähe zum Centromer kartiert werden konnte (Niks et al., 2004), und eine Toleranz gegenüber *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) bedingt. Sowohl die Gelbmosaikvirose, die durch