

- 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: *Ryd4th*, 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, Thomas¹; Habekuss, Antje¹; Perovic, Dragan¹; Krämer, Ilona¹; Stein, Nils²; Ordon, Frank¹

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsanstalt für Kulturpflanzen (JKI), ¹ Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Quedlinburg; ² 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 F₂-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 F₂-Pflanzen analysiert worden. Für beide Populationen liegen erste phänotypische Daten vor und mehrere mit dem jeweiligen Resistenzgen eng gekoppelte Marker konnten kartiert werden.

Schlüsselwörter: 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 F₂-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 F₂-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

einen bodenbürtigen Pilz übertragen wird, als auch die durch Blattläuse übertragene viröse Gelbverzwergung haben eine große Bedeutung für die Landwirtschaft und können zu Ertragsverlusten von bis zu 50 % führen. Da die Loci beider Resistenzgene sich in unmittelbarer Nähe des Centromers befinden, ist für diese Arbeit eine möglichst hohe genetische Auflösung notwendig. Aus diesem Grund ist eine Kartierungspopulation von jeweils 5000 F₂-Pflanzen vorgesehen, was einer genetischen Auflösung von 0,01 cM entspricht. Aus dieser Kartierungspopulation werden dann segmentale RILs entwickelt, die anschließend einer phänotypischen Testung sowie einer ausgiebigen Analyse mit genbasierten Markern unterzogen werden. Sobald ein Marker mit dem Resistenzgen co-segregiert oder maximal 0,01 Centimorgan (cM) entfernt ist, findet ein Screening von Bacterial Artificial Chromosome (BAC) Bibliotheken und die anschließende Sequenzanalyse der BACs statt, die möglicherweise das jeweilige Resistenzgen tragen.

Material und Methoden

Für die Kartierung von *rym11* wurde eine F₂-Kartierungspopulation der Kreuzung zwischen den resistenten Eltern 'W 757/112' und 'W 757/612' (Nissan-Azzouz et al., 2005) mit der anfälligen Sorte 'Naturel' aufgebaut. Für *Ryd3* entstammt die F₂-Kartierungspopulation einer Kreuzung der resistenten äthiopischen Gerstenlinie 'L94' und dem anfälligen Elter 'L94-QTL3', einer nahisogenen Linie, bei der das Chromosom 6H-Fragment der anfälligen Sorte 'Vada' in die Linie 'L94' eingebracht wurde (Niks et al., 2004). Diese wurde von R. Niks, Wageningen zur Verfügung gestellt. Die F₂-Pflanzen der Populationen wurden in 96'er Quick-pot-platten angezogen und anschließend erfolgte im 2-3 Blattstadium die Entnahme von Blattproben. Die DNA-Extraktion erfolgte semiautomatisch nach Dorokhov und Klocke (1997). Für die Analyse der F₂-Pflanzen der *rym11*-Population wurden die das Resistenzgen flankierenden co-dominanten SSR-Marker HVM03 und HVM68 genutzt, für die Analyse der *Ryd3*-Population die das Resistenzgen flankierenden SSR-Marker GMS006 und GBM1063 (M. Thierry pers. Mitt.). Die Fragmentanalyse der Marker erfolgte mittels Fluoreszenzdetektion auf einem CEQ 8000 (Beckman-Coulter).

Für beide Populationen wurden die teilheterozygot rekombinanten F₂-Pflanzen aus den 96'er Quick-pot-platten in größere Töpfe ausgetopft, im Gewächshaus mittels Crispac-Beuteln geselbstet und das entsprechende Saatgut geerntet. Pro teilheterozygot rekombinanter F₂-Pflanze wurden dann noch einmal 12 F₃-Nachkommen mit den genannten jeweiligen Markern analysiert, um segmental homozygote RILs zu identifizieren. Für die Pflanzen, die schon in der F₂-Generation als homozygot rekombinant identifiziert wurden, entfiel die Analyse der F₃-Nachkommenschaft. Von den identifizierten RILs wurde für die genotypische Analyse DNA nach der Miniprep-Methode von Stein et al. (2001) gewonnen, die anschließende Markeranalyse fand mit in dem Zielintervall liegenden Markern (Stein et al., 2007; Varshney et al., 2007; Sato et al., 2009) statt. Zudem wurden weitere Marker mittels Analyse der Gerste-Reis Syntenie entwickelt (Perovic et al., 2004). Für die Phänotypisierung wurden die RILs geselbstet und weitervermehrt, so dass genügend Saatgut für die Virustestung zur Verfügung stand. Für *rym11* erfolgte eine Virustestung sowohl für BaMMV als auch BaYMV.

An zwei verschiedenen Standorten (Schladen und Morgenrot) mit natürlichem Vorkommen der beiden Viren, wurden pro RIL maximal 20 Pflanzen in Doppelreihen zu je 10 Pflanzen in jeweils einer Wiederholung geprüft. Eine resistente Sorte diente hierbei als Negativkontrolle, eine anfällige Sorte als Positivkontrolle für den Virusnachweis. Zusätzlich fand eine weitere Virustestung auf BaMMV in der Klimakammer statt. Hierbei wurden pro RIL 10 Pflanzen getestet, mit einer anfälligen Sorte als Positivkontrolle. Die Inokulation erfolgte dabei im 2-3 Blattstadium von Hand, in der Art, dass infiziertes Pflanzenmaterial in K₂HPO₄ - Buffer homogenisiert und mit feinem Carborundum versetzt wurde, und dieses Gemisch dann in ein Blatt der zu prüfenden Pflanzen gerieben wurde (Habekuss et al., 2008). Der Virusnachweis erfolgt in beiden Fällen mit Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (DAS-ELISA) nach der Methode von Clark und Adams (1977).

Für *Ryd3* erfolgte die Virustestung auf BYDV ausschließlich im Feldversuch. An einem Standort (Quedlinburg) wurden hierbei pro RIL jeweils 10 Pflanzen in der Kontrolle und in der infizierten Variante in zwei Wiederholungen geprüft. Die dafür erforderliche Virusinokulation der zu prüfenden Pflanzen erfolgte dabei vorab im Gewächshaus mittels BYDV-PAV-tragender Blattläuse, die im 1 Blattstadium auf die Pflanzen gebracht wurden. Die Blattläuse wurden mit einem Insektizid abgetötet und die infizierten Pflanzen wurden zusammen mit den Kontrollpflanzen im Feld ausgepflanzt. Danach erfolgte wiederholter Insektizideinsatz, um eine Spontaninfektion der Kontrollpflanzen zu verhindern. Eine Bonitur der Pflanzen anhand von Krankheitssymptomen erfolgte in der Kornfüllungsphase. Zusätzlich wird die Toleranz der einzelnen RILs durch einen Vergleich der infizierten Variante mit der Kontrollvariante bezüglich des Ertrages, der Ertragsparameter und der Wuchshöhe bestimmt werden.

Aus den genotypischen Daten der Markeranalyse und den phänotypischen Daten der Virustestung der jeweiligen Kartierungspopulationen konnte dann eine genetische Karte für das jeweilige Zielintervall erhalten werden.

Ergebnisse und Diskussion

Für *rym11* wurden insgesamt 5102 F₂-Pflanzen mit den Markern HVM03 und HVM68 analysiert und ein Abstand von 10,711 cM zwischen den beiden Markern bestimmt. Für 85 RILs, die aus 1270 F₂-Pflanzen entstanden sind, ist eine Virustestung auf BaMMV in der Klimakammer vorgenommen worden, wobei die Aufspaltung mit 41 resistenten und 44 anfälligen RILs der Erwartung entspricht (Chi²=0,106).

Für die Markerabsättigung des Zielintervalls konnte eine Reihe polymorpher Marker identifiziert und kartiert werden, wobei sich nach den Daten der Phänotypisierung das Resistenzgen *rym11* zwischen den beiden Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) – Markern CAPS 1 und CAPS 2 beziehungsweise CAPS 3 befindet (Abb.1), und damit eine Verkürzung des Zielintervalls von 10,711 cM auf 2,437 cM erreicht werden konnte. Sowohl CAPS 1 als auch CAPS 2 wurden mittels der Syntenie-basierten Markerabsättigung identifiziert. Die enge Kopplung zum Resistenzgen zeigt, dass diese Methode effektiv für eine Markerabsättigung eingesetzt werden kann.

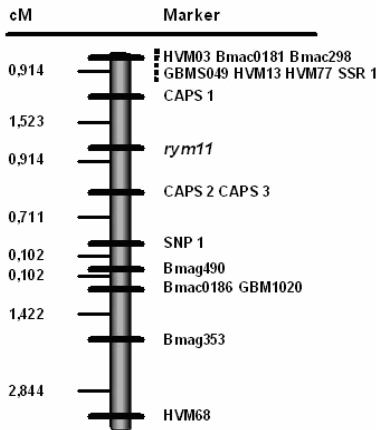


Abb. 1 Vorläufige Karte für *rym11*; basierend auf 85 RILs aus 1270 F₂-Pflanzen

Für *Ryd3* wurden insgesamt 3213 F₂-Pflanzen mit den Markern GMS006 und GBM1063 analysiert, der Abstand zwischen beiden Markern betrug dabei 6,987 cM. Aus diesen F₂-Pflanzen wurden 183 teilheterozygot rekombinante Pflanzen in RILs umgewandelt, für 215 teilheterozygot rekombinante Pflanzen ist noch die F₃-Generation zu analysieren. Eine erste BYDV-Virustestung für 80 RILs, die aus 743 F₂-Pflanzen zurückzuführen sind, zeigte eine sehr gute Unterscheidbarkeit und entspricht mit 42 toleranten und 38 anfälligen RILs der erwarteten 1:1 Aufspaltung ($\chi^2 = 0,113$). Zudem stehen die Ergebnisse der Phänotypisierung und Genotypisierung (siehe Karte in Abb. 2) im Einklang mit der Arbeit von Niks et al. (2004), bei der die SSR-Marker HVM14, HVM22, Bmac0018 und Bmag0009 in deren Kartierungspopulation ebenfalls mit dem Resistenzgen co-segregierten.

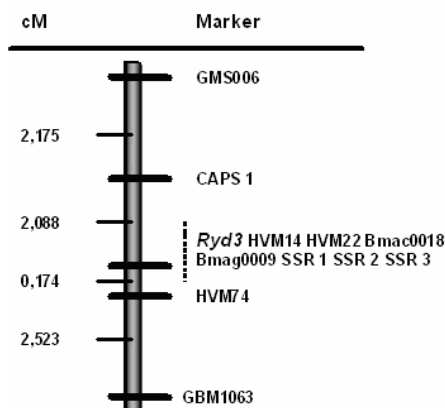


Abb. 2 Vorläufige Karte für *Ryd3*; basierend auf 80 RILs aus 743 F₂-Pflanzen

Der bei Niks et al. (2004) ebenfalls mit dem Resistenzgen co-segregierende Marker HVM74, zeigte allerdings in der vorliegenden Kartierungspopulation bei zwei RILs eine Rekombination zu dem Resistenzgen. Dies ist auf die höhere genetische Auflösung dieser Population zurückzuführen. Somit konnte mit HVM74 und dem nördlich von

dem Resistenzgen kartierten CAPS-Marker CAPS 1 eine Verkürzung des Zielintervalls auf 2,262 cM erreicht werden. Weiterhin konnten mit den Markern SSR 1, SSR 2, SSR 3 weitere Marker identifiziert werden, die mit dem Resistenzgen co-segregieren. Wie die zuvor genannten Marker, entstammen diese Marker allerdings genomischen Sequenzen, so dass kein Gen angesprochen werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass sich beide Gene in centromeren Bereich auf Chromosom 4H und Chromosom 6H befinden und in diesen Bereichen das Verhältnis von genetischer zu physikalischer Karte ungünstig für eine Isolation durch kartengestützte Klonierung ist (Künzel et al., 2000), ist eine weitere Erhöhung der genetischen Auflösung nötig. Dies zeigt sich auch in der Tatsache, dass insbesondere in der Population für das Resistenzgen *Ryd3* eine Vielzahl von Markern co-segregieren. Dass auch im komplexen Genom der Gerste die Isolation von Resistenzgenen mittels kartengestützter Isolation möglich ist, konnte jedoch in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden (Stein und Graner, 2004).

Danksagung: Wir danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die finanzielle Unterstützung der vorliegenden Arbeit, welches ein Teilprojekt (Förderkennzeichen: 0314000D) des Verbundprojektes 'Exploring the Barley Genome (Barlex)' ist.

Literatur:

- Clark, M.F., Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J.Gen. Virol.* **34**, 475-483.
- Dorokhov, D.B., Klocke, E. (1997). A rapid and economic technique for RAPD analysis of plant genomes. *Russ. J. Gen.* **33**, 358-365.
- Habekuss, A., Kühne, T., Krämer, I., Rabenstein, F., Ehrig, F., Ruge-Wehling, B., Huth, W., Ordon, F. (2008). Identification of Barley mild mosaic virus isolates in Germany Breaking rym5 Resistance. *J. Phytopathology* **156**, 36-41.
- Künzel, G., Korzun, L., Meister, A. (2000). Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps of the barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics* **154**, 397-412.
- 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.
- Nissan-Azzouz, F., Graner, A., Friedt, W., Ordon, F. (2005). Fine-mapping of the BaMMV, BaYMV-1 and BaYMV-2 resistance of barley (*Hordeum vulgare*) accession PI1963. *Theor Appl Genet* **110**, 212-218.
- Perovic, D., Stein, N., Zhang, H., Dresche, A., Prasad, M., Kota, R., Kopahnke, D., Graner, A. (2004). An integrated approach for comparative mapping in rice and barley with special reference to the Rph16 resistance locus. *Funct. Integr. Genomics* **4**, 74-83.
- Sato, K., Nankaku, N., Takeda, K. (2009). A high-density transcript linkage map of barley derived from a single population. *Heredity* **103**, 110-117.
- Stein, N., Graner, A. (2004). Map based gene isolation in cereal genomes. In: *Cereal genomics*, eds. Gupta, P., Varshney, R., pp. 331-360. Kluwer Academic Publishers.
- Stein, N., Herren, G., Keller, B. (2001). A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large genome species such as *Triticum aestivum*. *Plant Breeding* **120**, 354-356.
- Stein, N., Prasad, M., Scholz, U., Thiel, T., Zhang, H., Wolf, M., Kota, R., Varshney, K., Perovic, D., Grosse, I., Graner, A. (2007). A 1000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. *Theor Appl Genet* **114**, 823-839.
- Varshney, R.K., Marcel, T.C., Ramsay, L., Russell, J., Röder, 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.

Riedel, Christine; Habekuss, Antje; Ordon, Frank

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Quedlinburg

Verbesserung der BYDV-Toleranz der Gerste durch Pyramidisierung von Toleranzallelen

Improvement of BYDV-tolerance in barley by pyramiding of tolerance alleles

Zusammenfassung

Das durch Blattläuse übertragene Gerstengelbverzwergungsvirus (*Barley yellow dwarf virus*, BYDV) ist ein wichtiges Pathogen im Getreideanbau, dessen wirtschaftliche Bedeutung infolge der prognostizierten Klimaerwärmung in Mitteleuropa in den nächsten Jahrzehnten weiter zunehmen wird. In der Praxis wird derzeit die Virusverbreitung hauptsächlich durch die chemische Bekämpfung der Vektoren und einen nicht zu frühen Aussaattermin der Herbstkultur beeinflusst. In der Gerstenzüchtung wurde bisher das Resistenzgen *Ryd2* genutzt. Inzwischen sind weitere toleranzbedingende Loci wie *Ryd3* und ein QTL (*Quantitative trait locus*) auf Chromosom 2H identifiziert worden. Ziel der Arbeiten ist es, Erkenntnisse darüber zu gewinnen, ob durch eine markergestützte Kombination der Toleranzallele dieser Loci das Toleranzniveau der Gerste gegenüber BYDV erhöht werden kann. Hierzu wurden aus Kreuzungen von toleranten Elternlinien Populationen von doppelhaploiden (DH) Linien erstellt, die zunächst mit bekannten PCR-Markern für die entsprechenden Loci genotypisiert wurden. Nach Inokulation mit dem Virusisolat BYDV-PAV wurden die DH-Linien in Feldversuchen phänotypisch charakterisiert, d.h. deren