

# **Genetische Analyse und Markierung von Zwergrost- und BaYMV-Resistenzgenen der Gerste (*Hordeum vulgare* L.)**

Dem Fachbereich Biologie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades einer

**Doktorin der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.

genehmigte

**Dissertation**

von

Dipl.-Biol. Sandra Hunger

geboren am 8. Juni 1969 in Hagen

1999

Referent: Prof. Dr. G. Wricke  
Korreferent: Prof. Dr. H.-J. Jacobsen  
Tag der Promotion: 15. Juli 1998

# Kurzfassung

## Genetische Analyse und Markierung von Zwergrost- und BaYMV-Resistenzgenen der Gerste (*Hordeum vulgare* L.)

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, gekoppelte Marker für „Barley Yellow Mosaic Virus“ (BaYMV)-2- und Zwergrost-Resistenzgene der Gerste zu finden. Dazu wurden zwei verschiedene für BaYMV-2-Resistenz spaltende DH-Populationen (Bezeichnungen: 163 und 361) bezüglich ihrer BaYMV-2- und BaYMV-1- bzw. „Barley Mild Mosaic Virus“ (BaMMV)-Resistenz über Feldtests bonitiert. Aufgrund der Spaltungsergebnisse wird angenommen, daß in beiden Populationen ein Gen für die Vermittlung der BaYMV-1 und BaMMV-Resistenz und ein weiteres Gen für die BaYMV-2-Resistenz verantwortlich ist. In der Population 163 sind diese mit einer Rekombinationsrate von  $0,04 \pm 0,02$  gekoppelt. Die BaYMV-2-Resistenz der Nachkommenschaft 361 wird dominant vererbt.

Desweiteren standen vier für Zwergrost-Resistenz spaltende F<sub>2</sub>-Populationen (Bezeichnungen: 3, 5, 38/39, 40/41) zur Verfügung, die aus Kreuzungen zwischen *Hordeum vulgare* und *Hordeum spontaneum* stammen. Die Populationen 38/39 und 40/41 besitzen ein rezessives Allel, das die Zwergrost-Resistenz vermittelt, während in den Nachkommenschaften 3 und 5 wahrscheinlich zwei komplementär wirkende dominante Allele vorliegen.

Zur Suche nach Markern, die mit den Resistenzgenen gekoppelt sind, wurden Isoenzyme, Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLPs), Mikrosatelliten-Marker und „Inverse sequence-tagged repeats“ (ISTRs) eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, daß in den aus interspezifischen Kreuzungen hervorgegangenen Populationen 3, 5, 38/39 und 40/41 ein höherer Polymorphiegrad vorlag als in der DH-Population 361. Nur bei den ISTR-Analysen konnte mit 73 - 84 % in der DH-Population bzw. 50 - 84 % in den F<sub>2</sub>-Populationen ein etwa gleicher Anteil polymorpher Marker festgestellt werden. Durch weitere Untersuchungen muß jedoch geklärt werden, ob alle Polymorphismen der ISTR-Analysen für Markierungen bzw. Kartierungen ausgewertet werden können. In dem untersuchten Material waren 32 bzw. 53 - 84 % der RFLP-Sonden polymorph. Dies ist ein höherer Anteil als für die Mikrosatelliten-Marker festgestellt wurde (24 % in der DH-Nachkommenschaft 361 bzw. 36 - 52 % in den F<sub>2</sub>-Populationen). Die Isoenzyme zeigten den niedrigsten Polymorphiegrad. Der Einsatz verschiedener Markertechniken wird diskutiert.

Die gefundenen polymorphen Marker sind auf Kopplung mit den in den Populationen vorliegenden Resistenzen geprüft worden. Keiner der in der Population 361 untersuchten 45 Marker zeigte eine Kopplung zu dem Resistenzgen. Jedoch konnten durch die vorliegenden Untersuchungen einige aus der Literatur bekannte BaYMV-2-Resistenz-Loci ausgeschlossen werden. Das in der Population 163 vorhandene BaYMV-2-Resistenzgen zeigte eine Rekombinationsrate von  $0,08 \pm 0,03$  mit dem *Est1-Est2-Est4*-Komplex auf dem langen Arm von Chromosom 3H.

Es wurde eine Kopplung zwischen dem auf Chromosom 2H kartierten Mikrosatelliten-Marker HVBKASI und den Zwergrost-Resistenzgenen in den Populationen 40/41 und 3 festgestellt. Die Rekombinationsraten lagen bei  $0,17 \pm 0,05$  für die Population 40/41 bzw.  $0,22 \pm 0,10$  für die Population 3. Durch RFLP-Analysen in der Nachkommenschaft 40/41 konnte der Marker ABG602 20 cM vom Resistenzgen entfernt kartiert werden. Der Einsatz von Markern in der Züchtung, die mit Resistenzgenen gekoppelt sind, wird diskutiert.

*Schlagwörter:* Gerstengelbmosaikvirose, *Puccinia hordei*, Molekulare Marker

## Abstract

### „Genetic analysis and mapping of leaf rust- and BaYMV-resistance genes in barley (*Hordeum vulgare* L.)“

In the present study novel resistance genes of barley, which confer resistance to barley yellow mosaic virus 2 (BaYMV-2) and leaf rust (*Puccinia hordei* Otth.) were mapped using molecular markers.

Two different double haploid progenies (named 361 and 163) were evaluated for their BaYMV-2 and BaYMV-1 / barley mild mosaic virus (BaMMV) resistance. Due to the segregation results both progenies possess one gene, which confers resistance to BaYMV-1 / BaMMV and a second gene, which is responsible for BaYMV-2-resistance. For the population 163 both genes are tightly linked with a recombination value of  $0,04 \pm 0,02$ , whereas there is no linkage in the progeny 361. In the population 361 the allele in respect of the BaYMV-2-resistance is dominant.

Four different F<sub>2</sub>-progenies (named 3, 5, 38/39 and 40/41) were investigated to find markers for novel leaf rust resistance genes. They descend from a cross between *Hordeum vulgare* and wild barley (*Hordeum spontaneum*). The resistance of the progenies 38/39 and 40/41 is inherited monogenic and recessive whereas those of population 3 and 5 is digenic and the resistant plants carry two complementary dominant alleles.

Isozymes, restriction-fragment-length-polymorphisms (RFLPs), simple sequence repeats (SSRs) and inverse sequence-tagged repeats (ISTRs) were applied for marker analysis. More polymorphism were detected in interspecific crosses than in the DH-progeny, except for the ISTRs, where 73 - 84 % of the bands were polymorphic in the DH-progeny 361 and 50 - 84 % in the F<sub>2</sub>-progenies. For RFLPs 32 and 53 -84 % of the probes were polymorphic in the DH- and F<sub>2</sub>-progenies, respectively. This amount is higher than found for the SSRs (24 and 36 - 52 % in the DH- and F<sub>2</sub>-progenies, respectively). For the isozymes only up to two out of 17 different systems were polymorphic. The application of different marker techniques is discussed.

The polymorphic markers were tested for linkage with the resistance genes of the different progenies. None of the 45 markers was linked to the BaYMV-2-resistance gene in the progeny 361. That one of progeny 163 was linked with the esterase locus on the long arm of the chromosome 3H with a recombination value of  $0,08 \pm 0,03$ .

Linkage was found between the SSR-marker HVBKASI on chromosome 2H and the leaf rust resistance genes in the progenies 40/41 and 3 with recombination values of  $0,17 \pm 0,05$  and  $0,22 \pm 0,010$ , respectively. The RFLP-marker ABG602 is linked to the resistance gene of the progeny 40/41 with a distance of 20 cM. Benefits of mapping resistance genes are discussed.

*Keywords:* Barley yellow mosaic virus, *Puccinia hordei*, molecular markers

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Gerstengelbmosaikvirose.....	2
1.2	Zwergrost .....	4
1.3	Molekulare Markertechniken.....	7
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1	Pflanzenmaterial.....	11
2.2	Resistenztests.....	12
2.2.1	BaYMV-Resistenz .....	12
2.2.2	Zwergrost-Resistenz .....	13
2.3	Isoenzym-Untersuchungen .....	14
2.4	DNA-Isolierung .....	16
2.5	„Bulked segregant“-Analyse.....	18
2.6	Restriktion und Southern Blot.....	18
2.6.1	Restriktion .....	18
2.6.2	Southern Blot.....	19
2.7	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen .....	19
2.7.1	Herkunft der Sonden .....	19
2.7.2	Transformation kompetenter Zellen .....	20
2.7.3	Minipräparation der Plasmide .....	20
2.7.4	Digoxigenin-Markierung der Inserts mittels PCR.....	21
2.7.5	Southern-Hybridisierung und Detektion.....	22
2.8	Mikrosatelliten-Marker .....	23
2.9	Inverse sequence-tagged repeats (ISTRs) .....	25
2.10	Spaltungs- und Kopplungsanalyse .....	26

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
3.1	BaYMV-Resistenz .....	31
3.1.1	Boniturergebnisse.....	31
3.1.2	Isoenzym-Untersuchungen .....	35
3.1.3	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen.....	38
3.1.4	Mikrosatelliten .....	41
3.1.5	ISTR-Untersuchungen.....	45
3.1.6	Kopplungsanalysen .....	48
3.2	Zwergrost-Resistenz.....	49
3.2.1	Boniturergebnisse.....	49
3.2.2	Isoenzym-Untersuchungen .....	52
3.2.3	Mikrosatelliten .....	52
3.2.4	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen.....	55
3.2.5	ISTR-Untersuchungen.....	59
3.2.6	Kopplungsanalysen.....	62
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
4.1	Marker-Untersuchungen .....	64
4.1.1	Isoenzyme .....	64
4.1.2	RFLP-Analysen.....	65
4.1.3	Mikrosatelliten .....	67
4.1.4	ISTR-Marker .....	68
4.1.5	Vergleich verschiedener Markertechniken.....	70
4.2	Markierung von Resistenzgenen.....	72
4.2.1	BaYMV-2-Resistenz .....	72
4.2.1.1	Vererbung der Resistenz.....	72
4.2.1.2	Kopplungsanalysen.....	74
4.2.2	Zwergrost-Resistenz .....	77
4.2.2.1	Vererbung der Resistenz.....	77
4.2.2.2	Kopplungsanalysen.....	77
4.2.3	Nutzen der Markierung von Resistenzgenen .....	82

<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>86</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>88</b>
<b>Anhang</b>	<b>99</b>
A    Verwendete Sonden .....	99
B    Genotypen der untersuchten Pflanzen.....	101
C    Spaltungsergebnisse .....	111

## Abkürzungsverzeichnis

ACO	Aconitase
ACP	Saure Phosphatase
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BaMMV	Barley Mild Mosaic Virus
BaYMV	Barley Yellow Mosaic Virus
bp	Basenpaare
C	Crosslinker-Anteil im Acrylamidgel
cM	centi-Morgan
CSPD	3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'chloro)tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decan}-4-yl) Phenylphosphat, Dinatriumsalz
CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DH	Doppelhaploide
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EST	Esterase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
ISTR	Inverse sequence-tagged repeat
kbp	Kilobasenpaare
M	Molar
Mbp	Megabasenpaare
MTT	3-[4,5-Dimethylthiaziaol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NLS	N-Lauroylsarcosin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGD	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
PMS	Phenazinmethosulfat
PVP	Polyvinyl-Pyrrolidon
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSR	Simple sequence repeats
T	Gesamt-Anteil an Acrylamid im Gel
<i>Taq</i>	thermostabile DNA-Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
U	Units
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
X-Gal	5-Bromo-4 chloro-indolyl- $\beta$ -D-Galactosid

# Kapitel 1

## Einleitung

Die Gerste gehört zu den ältesten Kulturpflanzen. Sie wurde schon ca. 8000 v. Chr. im Nahen Osten angebaut (HARLAN 1995). Heute beträgt die Anbaufläche mit 66,2 Millionen Hektar weltweit etwa 9,4 % der gesamten Getreideackerfläche, die Weltproduktion entspricht etwa 25 % der Weizenproduktion. In Europa, Rußland und Nordafrika liegen die wichtigsten Anbauggebiete; wobei in Deutschland Gerste mit 2,3 Millionen Hektar nach Weizen die zweitgrößte Anbaufläche belegt (FAO 1997). Der Ertrag ist mit 59 dt/ha in Deutschland sehr hoch und seit 1961 um das 2,5fache gestiegen, was einerseits in der Intensivierung der Landwirtschaft, andererseits auch in der Verbesserung der angebauten Sorten begründet liegt. So konnte z. B. durch züchterische Maßnahmen die Kornzahl je Ähre im Vergleich zu Sorten des letzten Jahrhunderts um etwa 60 % erhöht werden. Neben der Ertragssteigerung sind als weitere Zuchtziele Qualitätsverbesserungen zu nennen. Für die Futtergerste sind ein hoher Lysin- und Eiweißgehalt und für die Braugerste ein niedriger Eiweißgehalt und hohe Malzextraktausbeuten anzustreben. Eine Verbesserung der Streßtoleranz gegenüber Trockenheit, Hitze, Kälte und schlechte Bodenverhältnisse sind weitere wichtige Zuchtziele. Bedeutsam für die züchterische Verbesserung der Gerste ist ebenso die Etablierung von Krankheitsresistenzen. In Mitteleuropa gehören der Gerstenmehltau (*Erysiphe graminis* DC. f. *sp. hordei* March.), der Zwergrost (*Puccinia hordei* Otth) und in den letzten Jahren die Netzfleckenkrankheit (*Drechslera teres* Sacc. Shoemaker) zu den wirtschaftlich bedeutendsten Blattpathogenen. Unter den Virose haben die Gelbmosaik- und Gelbverzwergungs-Viren die größte wirtschaftliche Bedeutung. Ziel dieser Arbeit war es, molekulare Marker für neue Gelbmosaikvirus- und Zwergrost-Resistenzgene zu finden, die bei der Züchtung neuer resistenter Sorten eingesetzt werden können. Im folgenden sollen daher diese beiden Krankheiten und molekulare Markertechniken näher beschrieben werden.

## 1.1 Gerstengelbmosaikvirose

Die durch die Gelbmosaikvirose verursachten Ertragseinbußen liegen im Bereich von 10 - 80 % und zeigen damit die wirtschaftliche Bedeutung dieser Krankheit. Zudem gibt es keine Möglichkeit für chemische Pflanzenschutzmaßnahmen, so daß die Entwicklung resistenter Sorten die einzig wirksame Bekämpfung dieser Virose darstellt (HUTH 1988). Das Virus wurde zum erstenmal 1940 in Japan beschrieben (IKATA und KAWAI 1940, zit. in INOUE und SAITO 1975) und breitet sich dort seit 1950 aus. Ende der 70er Jahre konnten die Symptome, die aus charakteristischen strich- oder punktförmigen gelblichen Aufhellungen auf den jüngsten Blättern bestehen, auch an Wintergerste in Deutschland festgestellt und das Gerstengelbmosaikvirus als Verursacher identifiziert werden (HUTH und LESEMANN 1978). Die Ertragseinbußen konnten jedoch in den folgenden Jahren durch den Anbau schon vorhandener resistenter Sorten begrenzt werden, die das rezessiv vererbte Virusresistenzgen *ym4* trugen, das wahrscheinlich durch die Verwendung der dalmatinischen Landgerste 'Ragusa' im Zuchtprogramm in den damaligen Sorten vorhanden war (HUTH 1985). 1988 ist auf einigen Anbauflächen ein resistenzbrechender Virusstamm aufgetreten (HUTH 1989). Inzwischen werden drei verschiedene Stämme der Gerstengelbmosaikvirose unterschieden, die aus dem Barley Mild Mosaic Virus (BaMMV), dem Barley Yellow Mosaic Virus-1 (BaYMV-1) und BaYMV-2 bestehen. Alle drei gehören zu den Bymoviren, sind stäbchenförmig und besitzen ein bipartites, einzelsträngiges RNA-Genom von ca. 7,3 und 3,5 kb Größe, das vollständig sequenziert wurde (KASHIWAZAKI 1996; MEYER und DESSENS 1996, PEERENBOOM et al. 1992, 1996, 1997). Zwischen BaMMV und den BaYMV-Stämmen kann eine eindeutige serologische Unterscheidung getroffen werden, obwohl eine 25 - 58 %ige Aminosäuresequenz-Homologie zwischen den beiden Typen besteht (KASHIWAZAKI 1996). Die beiden BaYMV-Stämme sind sich hingegen so ähnlich, daß keine spezifischen Antikörper entwickelt werden konnten und eine Unterscheidung nur durch die unterschiedlichen Virulenzeigenschaften getroffen werden kann. In Japan wurden zwei verschiedene BaMMV und sechs verschiedene BaYMV-Stämme beschrieben (KASHIWAZAKI et al. 1989), so daß die Bildung neuer Virulenzen auch in Europa zu befürchten ist.

Das Virus wird durch den ubiquitär vorkommenden bodenbürtigen Pilz *Polymyxa graminis* übertragen und kann auch nach über zehn Jahren noch in den Dauersporen des Pilzes nachgewiesen werden (MIYAMOTO et al. 1965, zit. in USUGI 1988). Durch den Anbau resistenter Sorten kann der Virusgehalt im Boden verringert werden, da sich das Virus in solchen Pflanzen nicht vermehrt und die neu freigesetzten Zoosporen des pilzlichen Vektors weitgehend

virusfrei sind (ADAMS et al. 1987). Daher ist der Anbau von resistenten Sorten auch aus pflanzenschutzhygienischer Sicht wünschenswert. Für die Suche nach neuen Resistenzquellen wurden verschiedene Gerstenherkünfte aus Genbanken Japans und Landgersten aus verschiedenen europäischen Ländern auf ihr Resistenzspektrum und ihre Genetik untersucht (GÖTZ 1991, ORDON 1992). Für die so neu gefundenen Gene werden derzeit molekulare Marker gesucht, um den Einsatz der Resistenzen in den Zuchtprogrammen zu erleichtern. Eine Übersicht über bisher charakterisierte Gerstengelbmosaikvirus-Resistenzen gibt Tab. 1.1.

**Tab. 1.1:** Resistenzgene gegen die Gerstengelbmosaikvirose.

Sorte	Gen	Chr. <sup>a</sup>	Ver- erbung	Reaktion <sup>b</sup> gegen			Marker <sup>c</sup>	Ref. <sup>d</sup>
				BaMMV	BaYMV -1	BaYMV -2		
Mokusekko3	<i>ym1</i>	4H	rezessiv	r	r	r	<i>gl3</i> (9,7 %)	[1]
	<i>ym5</i>	3HL	rezessiv	r	r	r	<i>Est1-Est2-Est4</i> (1,9 %)	[1]
Mihori Hadaka 3	<i>Ym2</i>	7H	dominant	r	r	r	<i>n</i> (31,4 %)	[2]
Ea52	<i>ym3</i>		rezessiv	a	r	r		[3]
Ragusa	<i>ym4</i>	3HL	rezessiv	r	r	a	MWG838 (3,3 cM), MWG010 (0,9 cM)	[4]
W122/37.1	<i>ym5</i>	3HL	rezessiv	r	r	r	MWG010 (1,1 cM)	[5]
Iwate Omugi 1	<i>ym5'</i>	3HL	rezessiv	r	r	a	MWG085 (3,4 cM)	[5]
Miho Golden	<i>ym6</i>	3HL	rezessiv	r	r	r	<i>Est1-Est2-Est4</i> (7-10 %)	[6]
H. Hor3365	<i>ym7</i>	1H	rezessiv	r	a	a	RWTHAT13 (< 1,5 %)	[5]
'10247'	<i>ym8</i>	4HL	rezessiv	r	r	a	MWG2307 (5,5 cM), MWG517	[5], [7]
Bulgarian347	<i>ym9</i>	4HL	rezessiv	r	a	a	MWG517, MWG2037 (beide < 1,5 %)	[7]
Russia 57	<i>ym11</i>	4HL	rezessiv	r	r	r	MWG2134, MWG948 (beide < 1 %)	[7]

<sup>a</sup> Chromosom

<sup>b</sup> r = resistent, a = anfällig

<sup>c</sup> Rekombinationsrate mit dem Resistenzgen in % bzw. genetischer Abstand in cM sind in der Klammer angegeben

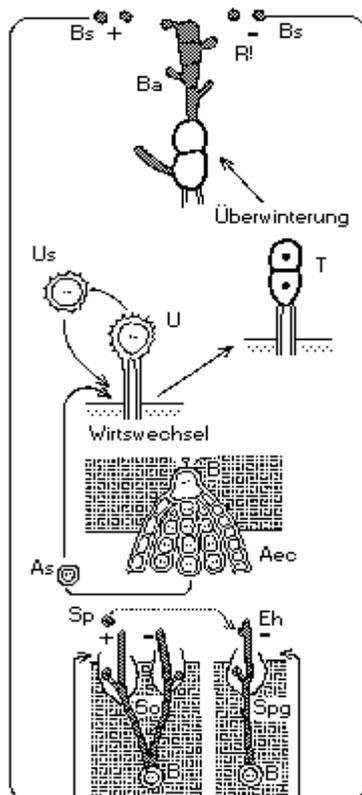
<sup>d</sup> Referenz: [1] KONISHI et al. 1997, [2] TAKAHASHI et al. 1973, [3] UKAI 1984, [4] BAUER und GRANER 1995, [5] GRANER et al. 1995, [6] IIDA und KONISHI 1994, [7] BAUER et al. 1997

Ziel dieser Arbeit war es, ein gegen den resistenzbrechenden Stamm BaYMV-2 wirksames Resistenzgen näher zu charakterisieren und einen molekularen Marker für dieses Gen zu finden.

## 1.2 Zwergrost

Der durch Zwergrost verursachte Ertragsverlust kann 5 bis 8 % bei schwachem Befall (KING und POLLEY 1976) und in extremen Befallsjahren bis zu 36 % erreichen (GRIFFEY et al. 1994). Auf Sommergerste erreicht er oft gleichen wirtschaftlichen Schaden wie der Echte Mehltau. Neben den Ertragsverlusten haben jedoch auch die durch die Krankheit verursachten Qualitätsverluste, wie z. B. eine unzureichende Korngröße und stark differierende Kornfraktionen, eine große Bedeutung (NEWTON et al. 1945, ARNST et al. 1979, TENG et al. 1979).

Der Erreger *Puccinia hordei* (Othh) gehört zur Klasse der Basidiomyceten, die sich durch einen zweigeteilten Entwicklungszyklus auszeichnet, der aus einer vegetativen und einer generativen Phase besteht. Die Ontogenese des zur Ordnung der Uredinales gehörenden Pilzes ist in Abb. 1.1 schematisch dargestellt.



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung der Entwicklung von *Puccinia hordei* (verändert nach SITTE et al. 1991). R! Reduktionsteilung, Ba Basidie, Bs Basidiospore, Spg Spermogonium, Sp Spermatorium, Eh Empfängnishyphe, So Somatogamie, B Basalzelle, Aec Aecidium, As Aecidiospore, U Uredosporenlager, Us Uredospore, T Teleutosporenlager (Sporenzahl jeweils verringert dargestellt). Dicht gerastert Ornithogalum und Liliaceen, punktiert Gerste als Wirt. Haploide Phase: graue Färbung, dikaryotische Phase: doppelte schwarze Linien, diploide Phase: dicke schwarze Linie.

Nach dem vollständigen Absterben des Wirtes überdauert der Pilz nur in Form der widerstandsfähigen Teleutosporen im Gerstenstroh. Mit dem Einsetzen günstiger Witterung keimen die diploiden Teleutosporen aus und bilden durch Reduktionsteilung Basidiosporen. Diese befallen die Blätter von Ornithogalum-Arten und Liliaceen, die als Zwischenwirte dienen (ANIKSTER und WAHL 1972). Dort werden die Spermogonien gebildet, die Spermastien freisetzen, welche durch Insekten zu anderen Spermogonien übertragen werden. Nach Eindringen der Spermastien in die Empfängnishyphen und Dikaryotisierung wird die Aecidienbildung initiiert. Die in den Aecidien gebildeten Aecidiosporen können nun den Hauptwirt Gerste infizieren, auf dem sich Uredosporenlager bilden. Durch den Wind verbreitete Uredosporen können nun weitere Gerstenpflanzen infizieren. Die auf den Blättern gebildeten rotbraunen bis orangegelben Uredosporenpusteln sind daher die für den Zwergrost typischen Symptome. Am Ende der Vegetationsperiode werden punktförmige bis längliche tiefschwarze Teleutosporen gebildet.

In Mitteleuropa konnte jedoch trotz Bildung von Teleutosporen auf der Gerste die generative Phase des Pilzes nicht beobachtet werden. Die Überwinterung erfolgt in Form von Uredosporen oder als ruhendes Mycel an Winter- und Ausfallgetreide (TAN 1976). Im Frühjahr setzt der Pilz seine Entwicklung bei geeignetem Wetter zuerst auf der Wintergerste fort und befällt im Verlauf der Vegetationsperiode die Sommergerste. Der Anbau von Winter- und Sommergerste mit verschiedenen Resistenzeigenschaften würde daher eine Möglichkeit bieten, die schnelle Ausbreitung des Zwergrostes zu verhindern.

Zwei Haupttypen von Resistenzen werden unterschieden: quantitative und qualitative. Die quantitative Resistenz der Gerste gegen den Zwergrost wirkt gegen alle Virulenztypen des Erregers und zeichnet sich durch einen verzögerten Befallsbeginn, eine reduzierte Sporenproduktion und eine niedrigere Infektionsrate aus, wodurch es zu einem geringeren Endbefall und einer langsameren Ausbreitungsgeschwindigkeit kommt (PARLEVLIE 1986, STATLER und PARLEVLIE 1987). Die Vererbung der quantitativen Resistenz erfolgt polygen und ist somit im Zuchtbetrieb schwieriger zu handhaben als die mono- oder oligogen vererbte qualitative Resistenz. Diese ist rassenspezifisch und wirkt nach dem von FLOR (1971) aufgestellten Gen-für-Gen-Prinzip. Danach steht jedem Resistenzgen des Wirtes ein entsprechendes Virulenzgen des Parasiten gegenüber, das den Befall einer resistenten Wirtspflanze durch diesen Pathotyp ermöglicht. Das Auftreten virulenter Rassen führt dazu, daß qualitative Resistenzen meist nicht dauerhaft sind. In Europa wurden gegen Zwergrost resistente Sorten in großem Umfang angebaut. Dadurch wird ein starker Selektionsdruck auf die Pathogenpopulation ausgeübt, so daß neue Virulenzen gebildet wurden. LEVINE und

CHEREWICK (1952) konnten 52 verschiedene physiologische Rassen weltweit durch Einsatz eines Testsortimentes zur Differenzierung nachweisen. Einen Überblick über die bisher charakterisierten qualitativen Zwergrost-Resistenzgene gibt Tab. 1.2.

**Tab. 1.2:** Charakterisierte Zwergrost-Resistenzgene.

Gen	Sorte/Linie	Vererbung	Chr. <sup>a</sup>	Marker <sup>b</sup>	Referenz <sup>c</sup>
<i>Rph1</i>	Oderbrucker, Manchuria	monogen, unvollst. dominant	2H		[1], [2], [3]
<i>Rph2</i>	Peruvian	monogen, unvollst. dominant	5HS	CDO749 (3,5 cM)	[4], [5]
<i>Rph3</i>	Estate	monogen, dominant	7HL	xantha seedling (9,7 cM)	[6], [3], [7]
<i>Rph4</i>	Gold	monogen, dominant	1HS	<i>m1a</i> (16 cM)	[1], [8], [9]
<i>Rph5</i>	Magnif 102	monogen, unvollst. dominant	5H	<i>Rph2</i> (30,5 cM)	[2], [5]
<i>Rph6</i>	Bolivia (+ <i>Rph2</i> )	monogen, dominant			[6], [2]
<i>Rph7</i>	Cebada Capa	monogen, dominant	3HS	anthocyanin-less 17 (24 cM)	[10], [11]
<i>Rph8</i>	Egypt 4	monogen, dominant			[1]
<i>Rph9</i>	HOR 2596	monogen dominant	5HL	HVDHN9 (10,2 cM), <i>Est9</i> (9,3 cM)	[12], [13]
<i>Rph10</i>	Clipper C8	monogen, dominant	3HL	<i>Est2</i> (15,0 cM)	[14]
<i>Rph11</i>	Clipper C67	monogen, dominant	6HL	<i>Acp3</i> (7 cM)	[14]
<i>Rph12</i>	Triumph	monogen, dominant	5HL	OPA19(1,5) (17,8 cM) ABC155 (24,4 cM)	[15], [13]
<i>Rph13</i>	PI 531849	monogen, dominant		<i>Rph9</i> (30,4 cM)	[16]
<i>Rph14</i>	PI 584760	monogen, unvollst. dominant			[16]
<i>Rph15</i>	PI 355447	monogen, dominant	2HL	<i>v1</i> six rowed spike (32,5 cM)	[17]

<sup>a</sup> Chromosom

<sup>b</sup> Rekombinationsrate mit dem Resistenzgen in % bzw. genetischer Abstand in cM sind in der Klammer angegeben

<sup>c</sup> Referenz:

[1] ROANE 1962, [2] ROANE und STARLING 1967, [3] TULEEN und McDONALD 1971, [4] LEVINE und CHEREWICK 1952, [5] BOROVKOVA et al. 1997, [6] HENDERSON 1945, [7] JIN et al. 1993, [8] MCDANIEL und HATHCOCK 1969, [9] MOSEMANN und REID 1961, [10] ROANE und STARLING 1970, [11] FALK 1985, [12] TAN 1977, [13] BOROVKOVA et al. 1998, [14] FEUERSTEIN et al. 1990, [15] CLIFFORD 1985, [16] JIN et al. 1996, [17] CHICAIZA 1996

Das Gen *Rph7* ist in Europa derzeit das einzige noch wirksame Resistenzgen. Da es aber wahrscheinlich sehr eng mit negativen Ertrags- und Qualitätsmerkmalen gekoppelt ist, konnte es in europäische Sorten noch nicht eingebaut werden. In Israel ist jedoch seit 1975 eine *Rph7*-virulente Rasse isoliert worden (GOLAN et al. 1978) und in den USA wurde 1990 die Überwindung dieser Resistenz beobachtet (STEFFENSON et al. 1993). Somit ist es notwendig, neue Quellen für Resistenzgene zu suchen, wobei sich Wildformen am ergiebigsten gezeigt haben (MANISTERSKI et al. 1986, JIN et al. 1995). PROCHNOW (1998) konnte z. B. aus einem 500 Sippen umfassenden Sortiment von *H. spontaneum* 40 Herkünfte mit voll wirksamer Zwergrost-Resistenz gegen alle in Deutschland nachgewiesenen Virulenzen identifizieren, die nun als Ausgangsmaterial für neue Züchtungen zur Verfügung stehen. In dieser Arbeit wurden spaltende Populationen, die auf vier dieser resistenten Herkünfte zurückgehen, mit Hilfe von molekularen Markern untersucht.

### 1.3 Molekulare Markertechniken

Neue Resistenzgene sind häufig in Wildformen zu finden. Daher ist zur Einlagerung in moderne Sorten ein umfangreiches Rückkreuzungsprogramm notwendig, bei dem der Einsatz von Markern eine schnelle Erkennung von Resistenzträgern schon im Keimlingsstadium ermöglicht. Desweiteren kann durch markergestützte Selektion ein stark umweltabhängiger Resistenztest ersetzt werden. Gerade bei der BaYMV-Resistenz tritt häufig das Problem auf, daß die Symptomausbildung bei Temperaturen über 18 °C ausbleibt und somit eine Bonitur nicht möglich ist. Sehr hilfreich können Marker auch bei der Pyramidisierung von Resistenzgenen sein, so daß eine Überwindung der Resistenzen durch Kombination verschiedener Gene erschwert wird (KELLY 1995).

Der Wert eines genetischen Markers hängt von der Reproduzierbarkeit und der Enge der Kopplung mit dem Merkmal ab. Ersteres wird unter anderem von der Art des verwendeten Markers beeinflusst. WEBER und WRICKE (1994) weisen auf die schon sehr frühe Nutzung morphologischer Marker für die Selektion in der Zierpflanzenzüchtung hin (SAUNDERS 1915). Morphologische Marker stehen jedoch nur in einer sehr begrenzten Anzahl zur Verfügung, so daß die Entwicklung von anderen Markertechniken zur Absättigung der Pflanzengenome mit Markern notwendig wurde. Die erste Gruppe dieser Marker sind Isoenzyme, die darauf beruhen, daß die in Pflanzen vorkommenden Isoformen eines Enzyms gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Isoformen der Proteine, die durch die verschiedenen Allele kodiert

werden, unterscheiden sich in ihrem Wanderungsverhalten und können für genetische Analysen ausgewertet werden. Doch auch Isoenzyme sind nur in begrenzter Anzahl vorhanden. Marker hingegen, die auf Unterschieden in der DNA basieren, sollten keiner zahlenmäßigen Beschränkung unterliegen. Ein weiterer Vorteil liegt darin begründet, daß sie keinen Einfluß auf die Physiologie des Organismus haben. Die erste dieser Techniken waren Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLPs), bei denen die DNA eines Organismus mit Restriktionsenzymen geschnitten wird. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung, Southern Blotting und der Hybridisierung mit einer zufällig ausgewählten Sonde, kann es zu einem unterschiedlichen Bandenmuster kommen, das nach den Mendelschen Regeln vererbt wird und zur Kartierung eingesetzt werden kann (BOTSTEIN et al. 1980). Dieser Polymorphismus wird durch den Wegfall einer Restriktionsschnittstelle durch Punktmutation oder Deletion in der Erkennungssequenz oder durch eine in diesem Bereich stattgefundene Insertion oder Inversion verursacht. Diese Technik wird auch heute noch angewendet, da sie, obwohl recht zeitaufwendig, sich leicht reproduzieren läßt und eine Übertragung der Marker zwischen verschiedenen Populationen oder sogar auf verwandte Arten möglich ist.

Wesentlich schnellere Analysen sind durch Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) möglich, zu denen u. a. die Markertechniken Random Amplified Polymorphic DNA (RAPDs), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs), Mikrosatelliten (Simple Sequence Repeats, SSRs) und Inverted sequence-tagged repeats (ISTRs) gehören.

Die RAPD-Technik wurde von WILLIAMS et al. (1990) entwickelt. Die PCR wird hierbei meist mit Decamer-Primern, deren Sequenzen einen GC-Gehalt von über 50 % besitzen und keine Möglichkeit zum Selbstannealing bieten, aber sonst zufällig gewählt werden, durchgeführt. Befinden sich zwei Primeranlagerungsstellen in einem Abstand von ca. 200 bp bis 2 kbp, so kommt es zu einer Amplifikation und die entsprechenden Banden werden nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar. Durch Mutationen kann es zum Wegfall oder einer Verschiebung einer Primeranlagerungsstelle kommen, so daß das entsprechende Amplifikationsprodukt in diesen Pflanzen fehlt. RAPDs sind daher dominant-rezessive Marker, bei denen der Polymorphismus in dem Vorhandensein bzw. Fehlen einer Bande besteht. Die Methode ist sehr einfach, hat aber den Nachteil, daß es durch die Kürze der Primer häufig Schwierigkeiten mit der Reproduzierbarkeit gibt (JONES et al. 1997).

Mikrosatelliten sind kurze, tandemartig wiederholte Sequenzen, die über das ganze Genom zufällig verteilt sind. Durch Konstruktion von ca. 20 bp langen Primern, die komplementär zu

den flankierenden Sequenzen sind, können die Mikrosatelliten enthaltenden Fragmente in der PCR spezifisch amplifiziert werden. Da die Anzahl der Sequenzwiederholungen zwischen Individuen variieren kann, besteht der Polymorphismus darin, daß unterschiedlich große Fragmente amplifiziert werden. Da in Heterozygoten von beiden Allelen ein Fragment entsteht, gehört diese Markerklasse zu den kodominant vererbten. Mikrosatelliten sind leicht zu reproduzieren und können auch auf andere Populationen und z. T. über Artgrenzen hinweg übertragen werden (GROBEN 1997, RÖDER et al. 1995). Der Nachteil besteht in der sehr aufwendigen Suche nach den flankierenden Sequenzen, die über Screening von genomischen Banken mit Mikrosatellitenmotiven als Sonden gefunden werden müssen, falls sie nicht aus Datenbanken oder der Literatur verfügbar sind. Sind hingegen die Primersequenzen erst einmal bekannt, ist der Einsatz dieser Marker sehr effektiv. Im Gegensatz zu den RAPDs wird jedoch meist nur ein Locus pro Reaktionsansatz analysiert.

AFLPs bieten dagegen die Möglichkeit einer Multiplex-Analyse. Bei der von der Firma Keygene (Wageningen, Niederlande) entwickelten Methode wird die DNA zunächst mit zwei Restriktionsenzymen, meist *EcoRI* mit einer 6 bp langen Erkennungsstelle und *MseI* mit einer 4 bp Erkennungsstelle, verdaut und anschließend mit Adaptoren ligiert (ZABEAU und VOS 1993, VOS et al. 1995). Die Adaptoren dienen als Primeranlagerungsstelle, wobei die Primer noch eine zusätzliche selektive Base besitzen, um die Anzahl der amplifizierten Fragmente zu reduzieren. Mit diesem PCR-Ansatz als Template wird nun durch Verwendung von Primern mit insgesamt drei selektiven Basen eine zweite PCR durchgeführt. Anschließend werden die Amplifikationsprodukte auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Da ein Primer radioaktiv markiert wurde, werden nach Autoradiographie die Banden sichtbar. Der Polymorphismus kann nun einerseits wie bei den RFLPs durch Veränderung der Restriktionsschnittstellen oder durch eine Punktmutation in den selektiven Basen entstehen. AFLPs können durch spezielle Software auch kodominant ausgewertet werden. Je nach Primerkombination und Spezies können ca. 50 bis 150 Fragmente entstehen und ausgewertet werden. Durch die Komplexität ist eine Übertragung der Marker zwischen Spezies allerdings schwierig. Es konnte jedoch bei Gerste gezeigt werden, daß die Fragmentgröße zwischen verschiedenen Populationen konserviert ist und somit die Marker übertragen werden können (WAUGH et al. 1997). Für den Einsatz in den Zuchtbetrieben ist jedoch die Umwandlung dieser Marker durch Konstruktion allelspezifischer Primer (ASAP) wünschenswert, da diese zum Teil sogar eine Analyse der Pflanzen ohne Gelelektrophorese erlauben würden (GU et al. 1995).

Bei Untersuchung mit den von ROHDE (1996) entwickelten ISTRs ist ebenfalls eine Multiplex-Analyse möglich. Hier werden zur Amplifikation ca. 20 bp lange Primer, die zu den Enden des bei Pflanzen und Tieren vorkommenden Retrotransposons der *copia*-Gruppe komplementär sind, verwendet. Die Primer sind dabei so ausgewählt, daß sie den Bereich zwischen den tandemartig angeordneten Retrotransposons amplifizieren. Die amplifizierten Sequenzen werden gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch den radioaktiv markierten Primer nach Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Retrotransposons zeigen eine Transpositionsfrequenz von  $10^{-7}$  bis  $10^{-3}$  pro Generation und liegen damit im Bereich von natürlichen Mutationen. Sie kommen ubiquitär im Pflanzenreich vor (FLAVELL et al. 1992) und die Kopienzahl variiert je nach Spezies von 100 bis zu Millionen (KUMAR 1996). Häufig sind im Genom jedoch auch nur noch unvollständige, nicht mehr springende Retrotransposons vorhanden, die auch im Bereich aktiver Gene liegen können (WHITE et al. 1994). Neben einer Transition der Retrotransposons kann der Polymorphismus natürlich auch durch Deletionen, Insertionen oder Punktmutationen in den Primeranlagerungssequenzen verursacht werden. Bisher wurden nur phylogenetische Untersuchungen mit ISTRs veröffentlicht (ROHDE 1996, SENSI et al. 1996). Zum Einsatz als Marker in spaltenden Populationen oder zur Übertragbarkeit zwischen Populationen oder verwandten Spezies ist daher noch nichts bekannt.

Neben den hier erwähnten Markertechniken gibt es noch weitere, die z. B. in den Reviews von STAUB et al. (1996) und MALYSHEV und KARTEL (1997) erläutert werden. Alle diese Techniken können prinzipiell zur Suche nach Markern, die mit bestimmten Merkmalen gekoppelt sind, eingesetzt werden. Die Wahl der Markertechnik hängt u. a. von der Art des Vorwissens über die Spezies und der gegebenen Laborausstattung ab.

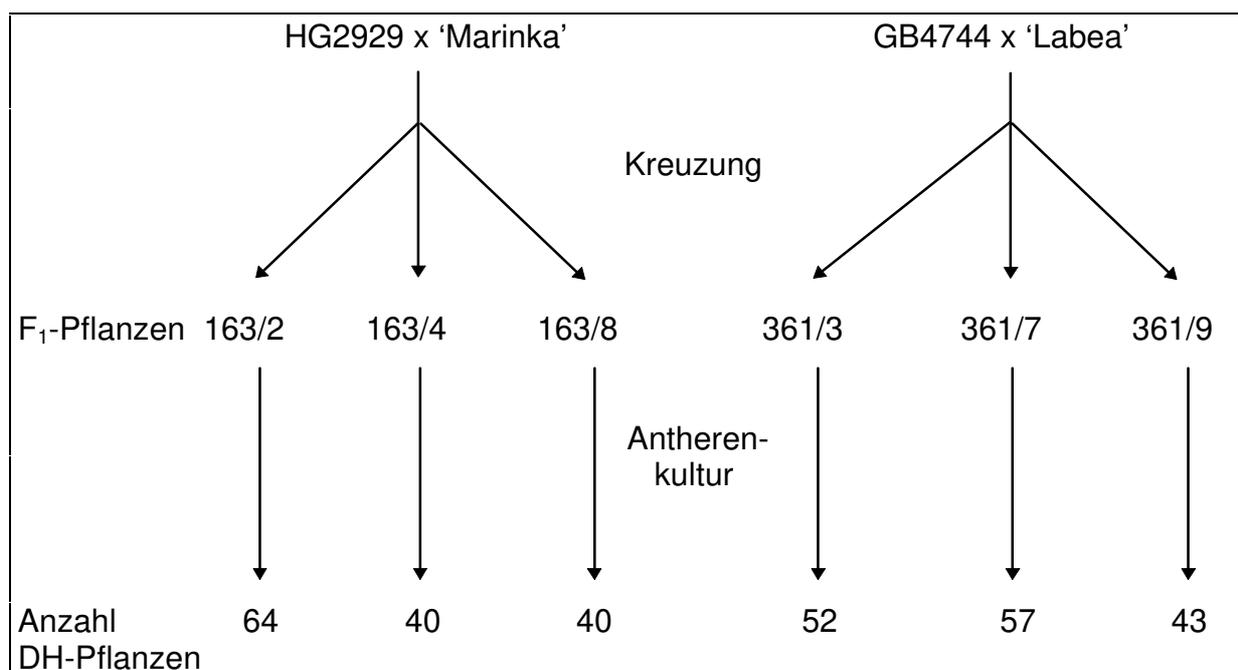
In dieser Arbeit wurden zur Suche nach Markern für Zwergrost- und BaYMV-2-Resistenzgenen Isoenzyme, RFLPs, Mikrosatelliten und ISTRs eingesetzt.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Pflanzenmaterial

Für die Untersuchungen der BaYMV-2-Resistenz wurden von der Deutschen Saatveredelung GmbH, Lippstadt, zwei verschiedene Populationen aus Doppelhaploiden zur Verfügung gestellt. Die Population 163 entstand aus einer Kreuzung zwischen der anfälligen Sorte 'Marinka' und dem gegenüber BaMMV, BaYMV-1 und BaYMV-2 resistenten Elter HG2929. Die Eltern der Population 361 waren die für BaYMV-2 anfällige, jedoch gegen BaYMV-1 und BaMMV resistente Sorte 'Labea' und die gegen alle drei Virusstämme resistente Linie GB4744. Die BaYMV-1 und BaMMV-Resistenz der Sorte 'Labea' wird durch das *ym4*-Gen vermittelt. Aus jeweils drei Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generation wurden mittels Antherenkultur Doppelhaploide hergestellt. Ein Schema der Pflanzenabstammung zeigt Abb. 2.1.



**Abb. 2.1:** Schema zur Abstammung des Pflanzenmaterials für die Untersuchungen zur BaYMV-2-Resistenz.

Die spaltende Nachkommenschaft einer  $F_1$ -Pflanze wird im folgenden als DH-Linie bezeichnet. Zur Untersuchung der Zwergrost-Resistenz wurden spaltende  $F_2$ -Populationen von der Bundesanstalt für Züchtungsforschung, Aschersleben, hergestellt, die dem Institut für Angewandte Genetik zur Analyse mit molekularen Markern überlassen wurden. Dabei handelt es sich um Nachkommenschaften, die aus der Kreuzung von vier verschiedenen *Hordeum spontaneum* conv. Koch-Rassen (mit den Bezeichnungen 632, 684, 803 und 829) mit der für alle Pathotypen des Zwergrostes anfälligen äthiopischen Landgerste 'L94' hervorgegangen sind (Tab. 2.1).

**Tab. 2.1:** Für Zwergrost-Resistenz spaltende  $F_2$ -Populationen.

Kreuzung	Populationsname	Pflanzenanzahl
L94 x 632	3	89
L94 x 684	5	78
L94 x 803	38/39	120
L94 x 829	40/41	101

Die Nachkommenschaften wurden im Zweiblattstadium auf ihre Resistenz gegen Zwergrost (*Puccinia hordei* Otth) überprüft (s. Kap. 2.2.2).

## 2.2 Resistenztests

### 2.2.1 BaYMV-Resistenz

Zur Bonitur der DH-Populationen bezüglich ihrer Resistenz gegen die Gerstengelbmosaik-virose wurden Feldtests an zwei verschiedenen Standorten durchgeführt, an denen die Erregerviren vorkommen. In Höhefeld (Baden-Württemberg) wurde durch Anbau eines Testsortiments nachgewiesen, daß die Pflanzen von BaMMV und BaYMV-1 befallen werden. In Eikeloh (Nordrhein-Westfalen) tritt zusätzlich noch der Virusstamm BaYMV-2 auf. Zur Prüfung wurde eine Standardanlage angelegt, in der jeweils ein resistenter und anfälliger Standard alle 20 Parzellen ausgedrillt wurde. Die Prüfglieder wurden mit ca. 20 Körnern in einer Reihe ausgesät. Im Jahr 1995 sind die Populationen 163 und 361 in Eikeloh in zwei und in Höhefeld in einer Wiederholung getestet worden. Die Population 361 wurde 1996 in zwei und 1997 in 3 Wiederholungen erneut in Eikeloh ausgebracht. Die Population 163 wurde 1997

in zwei Wiederholungen sowohl in Eikeloh als auch in Höhefeld ausgedrillt. Nach visueller Bonitur sind die Pflanzen in Anfällige, die die typischen Symptome für die Gelbmosaikvirose aufzeigten, d.h. gelbliche Striche auf den Blättern, und in Resistente ohne Symptome unterteilt worden.

Zur Absicherung der Bonitur wurde von einem Teil der Pflanzen Blattmaterial an die Bundesanstalt für Züchtungsforschung, Aschersleben, gegeben. Mit Hilfe des ELISA-Tests konnte dort mit spezifischen Antikörpern der Befall mit BaYM- und BaMM-Viren nachgewiesen werden.

### 2.2.2 Zwergrost-Resistenz

Die Resistenztests bezüglich der für Zwergrost-Resistenz spaltenden F<sub>2</sub>-Populationen sind von PROCHNOW (1998) durchgeführt worden. Zur Infektion wurde nach der vollständigen Entfaltung des Primärblattes das Zwergrostisolat I 80 eingesetzt, das eine breite Virulenz gegenüber den bisher bekannten Resistenzen mit Ausnahme von *Rph7* aufweist. Die verwendeten, resistenten Elternpflanzen wurden zusätzlich an der Tel-Aviv-University mit vier verschiedenen *Rph7*-virulenten Isolaten, von denen eines aus Marokko, eines aus Israel und zwei aus den USA stammen, überprüft (PROCHNOW 1998).

Die Bonitur erfolgte nach dem Schlüssel von LEVINE und CHEREWICK (1952; s. Tab. 2.2), wobei die Klassifizierung in resistente bzw. anfällige Pflanzen in Abhängigkeit von der Symptomausprägung der Eltern erfolgte.

**Tab. 2.2:** Boniturskala zur Bestimmung der Zwergrost-Resistenz (PROCHNOW 1998).

Boniturnote	Reaktion der Prüfglieder
i	keine Reaktion, keine Nekrosen oder Chlorosen
0	hochresistent, keine Pusteln, deutlich ausgebildete Nekrosen und chlorotische Flecke
1	sehr kleine Pusteln, die in deutlich ausgebildete nekrotische Flächen eingebettet sind
2-	kleine, wenig sporulierende Uredolager, die von nekrotischem und z.T. chlorotischem Blattgewebe umgeben sind
2+	Pusteln unterschiedlicher Größe, von denen ein Teil zum anfälligen Typ tendiert, umgeben von nekrotischem aber vorwiegend von chlorotischem Blattgewebe
3	mittelgroße, gut sporulierende Pusteln, das Blattgewebe ist chlorotisch, aber es treten keine Nekrosen auf
4	große, gut sporulierende Pusteln, keine Nekrosen, kaum Chlorosen

## 2.3 Isoenzym-Untersuchungen

Die Populationen wurden mit 17 verschiedenen Isoenzymssystemen auf Polymorphismen überprüft. Dazu wurde etwa 400 mg junges Blattmaterial in einer Blattpresse unter Zugabe von 400 µl Extraktionspuffer (5 % Saccharose, 0,1 % 2-Mercaptoethanol) mazeriert. Nach 10 minütiger Zentrifugation der Extrakte bei 4 °C und 15000 U/min konnten die Überstände direkt für die Elektrophorese verwendet werden.

Je nach System kamen dabei die Isoelektrische Fokussierung (Esterase, *Est*, E.C. 3.1.1.1.; Peroxidase, E.C. 1.11.1.7.), die vertikale Polyacrylamidgelelektrophorese (Phosphoglucomutase, E.C. 2.7.5.1.; Leucin-Aminopeptidase, E.C. 3.4.11.1.; β-Galaktosidase, E.C. 3.2.1.23.; Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, *Got*, E.C. 2.6.1.1.; Hexokinase, E.C. 2.7.1.1.; β-Glucosidase, E.C. 3.2.1.21.; Saure Phosphatase, E.C. 3.1.3.2.) und die Stärkegelelektrophorese (Malat-Dehydrogenase, E.C. 1.1.1.37.; Phosphogluco-Isomerase, E.C. 5.3.1.9.; Isocitrat-Dehydrogenase, E.C. 1.1.1.42.; Shikimat-Dehydrogenase, E.C. 1.1.1.25.; 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, E.C. 1.1.1.43.; Diaphorase, E.C. 1.6.4.3.; Triosephosphat-Isomerase, E.C. 5.3.1.1.; Aconitase, *Aco*, E.C. 4.2.1.3.) zum Einsatz. Die Trennbedingungen und Färbungen erfolgten in Anlehnung an NIELSEN und JOHANSEN (1985) und PASTEUR et al. (1988).

Nur bei den Zymogrammen der Esterase (DH-Linien 163 und 361), der GOT (DH-Linien 163) und der ACO (Population 40/41) konnten Polymorphismen festgestellt werden. Die Untersuchungen an den DH-Linien 163 wurden von Frau Dr. Esch am Institut für Angewandte Genetik, Hannover, durchgeführt.

Die Auftrennung der Esterase erfolgte in einer DESAPHOR-HF-Kammer (Fa. Desaga).

Zu 7,1 ml einer 7 % T / 3 % C Acrylamidlösung wurden folgende Ampholine (Fa. Pharmacia) hinzugegeben:

150 µl	Ampholine pH 3,5 - 10
100 µl	Ampholine pH 3,5 - 5
50 µl	Ampholine pH 6 - 8
150 µl	Ampholine pH 8 - 10,5

Nach dem Entgasen der Acrylamidlösung erfolgte die Zugabe von 0,05 % APS zur Polymerisation. Die Anode wurde mit 0,5 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, die Kathode mit 1 N NaOH getränkt und das Gel bei 7 mA bis 400 V vorfokussiert. 10 µl des Probenextraktes wurden 3,1 cm vor der Kathode aufgetragen und das Gel bis 1800 V fokussiert. Anschließend erfolgte eine Anfärbung

der Esterase bei Raumtemperatur modifiziert nach BERGMANN und MAAN (1973) in folgender Lösung:

100 mg Fast Blue RR Salz  
50 mg  $\alpha$ -Naphthylacetat  
2,5 ml Aceton  
50 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,5

Für die Analyse der Aconitase wurden die Proben in 12 %igen Stärkegelen (Stärke: Fa. Sigma S-4501; Gelpuffer: 7,92 mM Tris, 2,34 mM Zitronensäure) in einer DESAPHOR-HE-200 Kammer aufgetrennt, wobei als Elektrodenpuffer 220 mM Tris / 65 mM Zitronensäure pH 7,0 diente, der während der Elektrophorese auf 4 °C gekühlt worden ist. Ein mit Probenextrakt getränktes Filterpapierstück wurde ca. 6 cm von der Kathode entfernt in das Gel gesteckt. Die Gelelektrophorese erfolgte zunächst für 15 min bei 150 V und anschließend 3 h bei 300 V. Die Anfärbung wurde nach 10 min Umpuffern in 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 in folgender Lösung durchgeführt (mod. nach SHAW und PRASAD 1970) :

70 mg *cis*-Aconitic acid  
6 mg NADP  
1 ml MTT (5 mg/ml)  
1 ml PMS (2 mg/ml)  
1,4 ml MgCl<sub>2</sub> (0,25 g/ml)  
400  $\mu$ l Isocitrat-Dehydrogenase  
25 ml 0,4 M Tris/HCl pH 8,1  
25 ml 2 %ige Agarlösung

Das Gel wurde mit der Färbelösung überschichtet und für ca. 1 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert.

Die Trennung des Isoenzym Glutamat-Oxalacetat-Transaminase erfolgte in 8 % T / 3 % C Polyacrylamidgelen in DESAPHOR-VA-Kammern (Fa. Desaga). Als Gel- und Elektrodenpuffer wurde 125 mM Tris / 19 mM Borsäure pH 8,9 verwendet (STEGEMANN et al. 1983). Zur Polymerisation sind der Acrylamid-Lösung nach dem Entgasen 6,2 % TEMED und 5,6 % Ammoniumperoxodisulfat zugesetzt worden. Nach 10 minütigem Einlaufen bei 25 mA erfolgte die Gelelektrophorese bei 50 mA pro Gel für 4 h. Während der Elektrophorese wurde der Elektrodenpuffer auf 4 °C gekühlt.

Die Färbung erfolgte modifiziert nach JAASKA (1981) zunächst für 10-15 min bei 37 °C in folgender Lösung:

34 ml	0,1 M Tris/HCl pH 7,5
0,5 g	PVP-40
8,5 ml	0,2 M L-Asparaginsäure pH 7,5
2,5 ml	0,2 M $\alpha$ -Ketoglutarat pH 7,5
5 ml	0,1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

Die Färbung war dann nach Abgießen der Substratlösung in 75 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 mit 150 mg gelöstem, tetrazotierten o-Dianisidin bei 37 °C im Dunkeln unter Schütteln abgeschlossen.

## 2.4 DNA-Isolierung

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von HOISINGTON et al. (1994). Das geerntete Blattmaterial wurde dabei zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einer Schwingmühle (Fa. Retsch) gemörsert. Jeweils 1,2 g des pulverisierten Materials sind zu 6 ml vorgewärmtem CTAB-Extraktionspuffer I gegeben worden. Alternativ wurde 400 mg gefriergetrocknetes, gemörsertes Material mit 9 ml CTAB-Extraktionspuffer II vermischt. Nach 60 bis 90 minütiger Inkubation bei 65 °C im Schüttelwasserbad wurde ein Volumen eines Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)-Gemisches hinzugegeben. Durch 10 minütiges Schütteln bei RT und Zentrifugation bei 3500 U/min (Rotor A24.24, Fa. Kontron Instruments) entstanden zwei Phasen. Die obere Phase wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, ein Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt und 10 min geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation bei 3500 U/min wurde die obere Phase in ein 15 ml Falcontube überführt, mit 10  $\mu$ l einer RNaseA-Lösung (10 mg/ml) vermischt und für 30 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol ist die DNA gefällt und mit einem Glashaken in 3-4 ml Waschlösung I überführt worden. Nach zwanzig Minuten wurde die DNA kurz in 1-2 ml Waschlösung II gegeben und dann in 300  $\mu$ l 1 x TE-Puffer über Nacht bei RT unter Schütteln gelöst.

Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch durch die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm sowie durch Vergleich mit bekannten Konzentrationen in einem Agarosegel.

Es wurden folgende Lösungen verwendet:

**CTAB-Extraktionspuffer I**

67 mM Tris/HCl pH 8,0  
13,4 mM EDTA pH 8,0  
0,93 M NaCl  
1,34 % CTAB  
0,67 % PVP-40

**Waschlösung I**

76 % Ethanol  
0,2 M NaOAc

**1x TE**

10 mM Tris/HCl pH 8,0  
1 mM EDTA pH 8,0

**CTAB-Extraktionspuffer II**

100 mM Tris/HCl pH 7,5  
50 mM EDTA pH 8,0  
0,7 M NaCl  
1 % CTAB  
140 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

**Waschlösung II**

76 % Ethanol  
10 mM NH<sub>4</sub>OAc

Bei einigen Pflanzen, die nicht genügend Blattmaterial lieferten, ist eine vereinfachte DNA-Isolierungsmethode verwendet worden, die für die PCR geeignete DNA-Qualität liefert (UPHOFF 1994). Hierzu wurde Blattmaterial mit einem Plastikpistill in einem 2 ml Eppendorfgefäß zermörsert und nach Zugabe von 1 ml CTAB-Puffer für 1 h bei 64 °C inkubiert. Nachdem 750  $\mu$ l Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben und für 5 min bei 15000 U/min zentrifugiert wurde, konnte die obere wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt und die DNA mit  $\frac{1}{10}$  Volumen 3 M NaAcetat und 1 Volumen Isopropanol gefällt werden. Die DNA wurde 30 min bei 15000 U/min bei 4 °C abzentrifugiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100  $\mu$ l A. bidest aufgenommen. Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte durch Vergleich mit bekannten Konzentrationen von  $\lambda$ -DNA in einem Agarosegel.

Der CTAB-Puffer setzte sich wie folgt zusammen:

**CTAB-Puffer**

100 mM Tris/HCl pH 8,0  
20 mM EDTA pH 8,0  
1,4 M NaCl  
2 % CTAB  
1 % PVP-40

## 2.5 „Bulked segregant“-Analyse

Für eine möglichst effektive Suche nach einem molekularen Marker wurde eine „bulked segregant“-Analyse nach MICHELMORE et al. (1991) angewendet, bei der die DNA mehrerer Individuen des gleichen Phäno- bzw. Genotyps für ein bestimmtes Merkmal zu einer einzigen Probe („Bulk“) vermischt wird. Die Individuen eines Bulks haben an dem für das Merkmal verantwortlichen Genort alle den gleichen Zustand, während die Allele an den anderen Loci zufällig verteilt sind. Dadurch treten Unterschiede bei einem Vergleich der beiden Bulks nur bei dem merkmals-bestimmenden Genort sowie aufgrund des Kopplungsungleichgewichtes bei eng gekoppelten Markern auf. Der genetische Abstand eines so gefundenen Markers wird anschließend durch Analyse der einzelnen Individuen bestimmt.

Für die Bulks resistenter bzw. anfälliger Pflanzen wurde die DNA von jeweils 10 Pflanzen in gleichen Mengenanteilen vermischt.

## 2.6 Restriktion und Southern Blot

### 2.6.1 Restriktion

Die genomische DNA wurde mit 2 U Restriktionsenzym (Fa. Gibco BRL) pro  $\mu\text{g}$  DNA in dem entsprechenden Reaktionspuffer und 2,5 mM Spermidin für mindestens 5 Stunden bei 37 °C verdaut. Für die Ermittlung polymorpher Sonden-Enzym-Kombinationen wurden von der Population 361 jeweils 18 Pflanzen mit den Enzymen *Hind*III, *Eco*RI, *Bam*HI, *Xba*I und *Eco*RV, sowie die Eltern der Zwergrost-Populationen mit *Eco*RI, *Bam*HI und *Xba*I verdaut. Nach der Fällung der DNA durch Zugabe von  $1/20$  Volumen 5 M NaCl, 2,5 Volumen Ethanol und zweistündiger Inkubation bei -20 °C erfolgte die Aufnahme der DNA in 1x TE-Puffer, so daß die Lösung eine Endkonzentration von 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  besaß. Je 15  $\mu\text{g}$  der restringierten DNA sind über Nacht in einem 0,8 %igen Agarosegel in 1x TAE-Puffer aufgetrennt worden (SAMBROOK et al. 1989). Als Größenstandard diente mit *Hind*III verdaute  $\lambda$  Phagen-DNA sowie der DIG-Molecular-Weight-Marker II (Fa. Boehringer Mannheim). Durch Zugabe von 0,1  $\mu\text{g}$  Ethidiumbromid pro ml Gellösung wurde die DNA angefärbt, unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert.

#### 1x TAE

40 mM Tris-Acetat

1 mM EDTA pH 8,0

## 2.6.2 Southern Blot

Die DNA wurde mittels Southern-Kapillarblot auf ungeladene Nylonmembran (Hybond N-Nylonmembran, Fa. Amersham oder Porablot NY amp-Membran, Fa. Machery-Nagel) transferiert. Dafür ist das Gel jeweils eine halbe Stunde in Denaturierungspuffer (0,4 N NaOH, 0,6 M NaCl) und in Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris/HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl) geschüttelt worden. Als Transferpuffer für den Kapillarblot diente 25 mM NaPO<sub>4</sub> pH 6,5. Nachdem der Transfer über Nacht stattgefunden hatte, wurde die Membran kurz luftgetrocknet und anschließend die DNA durch zweistündiges Backen bei 80 °C fixiert. Die Filter wurden bei 4 °C aufbewahrt.

## 2.7 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen

### 2.7.1 Herkunft der Sonden

Als Sonden für die RFLP-Analysen wurden von GRANER et al. (1991) entwickelte Klone aus einer genomischen *Pst*I-Bibliothek (Bezeichnung MWG) bzw. *Eco*RI-cDNA-Bank (Bezeichnung cMWG) der Gerste verwendet. Für beide wurde der Plasmidvektor „Bluescript“ (Stratagene, San Diego) eingesetzt und in den *E. coli*-Stamm SURE transformiert. Die Sonden wurden so ausgewählt, daß sie eine gute Abdeckung über das gesamte Gerstengenom bilden. Insgesamt standen 50 verschiedene lowcopy- und singlecopy-Klone zur Verfügung, von denen sechs Klone cDNA enthielten. Desweiteren wurden zwei cDNA-Klone aus *Avena sativa* (Bezeichnung CDO), deren Insert mit *Eco*RI und *Xho*I in den Vektor pBluescript SK<sup>-</sup> (Firma Stratagene) ligiert wurde (HEUN et al. 1991), sowie von Andy Kleinhofs (Department of Crop and Soil Sciences, Washington State University, Pullman) zur Verfügung gestellte homologe Sonden aus *Hordeum vulgare* verwendet. Von diesen Sonden enthielten drei cDNA in der *Eco*RI-Schnittstelle des Plasmids pBluescript (Bezeichnung ABC) und fünf (Bezeichnung ABG) ein *Pst*I-Fragment der genomischen DNA in dem Vektor pGEM (Fa. Promega). Die genannten Sonden wurden vom Wheat Probe Repository, United States Department of Agriculture, Albany, California bezogen. Eine Übersicht über die verwendeten Klone gibt Tab. A.1 im Anhang.

### 2.7.2 Transformation kompetenter Zellen

Zur Transformation des *E. coli*-Stammes SURE wurde eine nach SAMBROOK et al. (1989) modifizierte Methode angewendet. Dazu wurden zu 100 µl kompetenter Zellen 1,7 µl einer frischen 1,44 M β-Mercaptoethanol-Lösung gegeben und nach dem Mischen für 10 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von ca. 50 ng Plasmid-DNA und einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen einem Hitzeschock von 45 s bei 42 °C ausgesetzt. Nach weiteren 2 min auf Eis und dem Mischen des Ansatzes mit 0,9 ml LB-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Jeweils 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Platten mit Ampicillin (50 mg/l), X-Gal (40 µl einer 20 mg/ml-Stammlösung pro Platte) und IPTG (40 µl einer 20 mg/ml-Stammlösung pro Platte) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Weiße Einzelkolonien wurden zum Animpfen für die Plasmidpräparation eingesetzt.

#### LB-Medium

1 %	Bactotrypton
0,5 %	Hefe-Extrakt
1 %	NaCl
(1,5 %	Agar)

### 2.7.3 Minipräparation der Plasmide

Die Bakterienklone wurden über Nacht in 3 ml ampicillinhaltigem LB-Medium (50 µg/ml Medium) bei 37 °C im Schüttler angezogen. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode von HOLMES und QUIGLEY (1981). Nach 5 minütigem Abzentrifugieren der Bakterien bei 10000 U/min wurden die pelletierten Bakterien in 160 µl STET-Puffer und 14 µl Lysozymlösung (10 mg/ml) wieder gelöst und 45 s im Wasserbad aufgeköcht. Nach 15 minütiger Abkühlung auf Eis konnten die Zelltrümmer für 15 min bei 4 °C und 15000 U/min abzentrifugiert, durch einen Zahnstocher entfernt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 160 µl Isopropanol und Inkubation für 1 h bei -20 °C gefällt werden. Die DNA wurde abzentrifugiert (15 min, 15000 U/min, 4 °C) und anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 20 µl 1x TE-Puffer gelöst.

Zur Kontrolle wurde je 1 µl mit dem entsprechenden Enzym restringiert, mit dem das Insert inkloniert worden war und in einem 0,8 %igem Agarosegel aufgetrennt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch einen Vergleich mit bekannten Mengen an λ-DNA im Agarosegel.

**STET-Puffer**

8 % Saccharose  
50 mM Tris/HCl pH 8,0  
50 mM EDTA pH 8,0  
5 % Triton X-100

**2.7.4 Digoxigenin-Markierung der Inserts mittels PCR**

Die Inserts der Plasmide wurden zunächst durch PCR mit den Primern M13 und M13Revers voramplifiziert.

Der Ansatz von 50 µl setzte sich dabei wie folgt zusammen:

je 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP  
4 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM KCl  
10 mM Tris/HCl pH 9,0  
0,2 µM M13-Primer  
0,2 µM M13Revers-Primer  
1 U *Taq* DNA-Polymerase (Fa. Pharmacia Biotech)  
0,5-1 ng Plasmid-DNA

Der Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet. Die PCR erfolgte in einem Thermocycler der Fa. Perkin Elmer Cetus unter folgenden Bedingungen:

1 min bei 94 °C  
30 Zyklen: 1 min bei 92 °C  
1 min bei 50 °C  
2 min bei 72 °C  
5 min bei 72 °C

Jeweils 10 µl des Ansatzes wurden in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und die Konzentration bestimmt. Ca. 1 ng des Amplifikationsproduktes wurden für die eigentliche Markierungsreaktion mit Digoxigenin als Template eingesetzt. Der PCR-Ansatz besaß ein Volumen von 100 µl und enthielt die gleichen Bestandteile wie für die Voramplifikation, mit der Ausnahme, daß die Nukleotide durch den PCR-DIG-Labeling-Mix (Fa. Boehringer Mannheim) ersetzt wurden. Somit enthielt der PCR-Ansatz neben je 0,2 mM dATP, dCTP und dGTP auch 0,19 mM dTTP und 0,01 mM DIG-11-dUTP. Die PCR erfolgte unter den oben genannten Bedingungen. Um das Mineralöl nach Beendigung der Reaktion zu entfernen, wurden 50 µl 1x TE und 40 µl Chloroform zu dem Ansatz gegeben und nach Mischen und kurzer Zentrifugation die obere Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Kontrolle

wurden 20 µl des Ansatzes in einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Konzentration durch Vergleich mit bekannten Mengen an λ-DNA bestimmt.

### 2.7.5 Southern-Hybridisierung und Detektion

Die Hybridisierung und Detektion erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von HOISINGTON et al. (1994). Dazu wurden die Filter in Hybridisierungsröhren mit je 25 ml Hybridisierungslösung bei 65 °C für 4 h inkubiert. Die markierte Sonde wurde in 6 ml Hybridisierungslösung gegeben (Endkonzentration ca. 100 - 200 ng Sonde/ml) und durch 20 minütiges Kochen denaturiert. Mit dieser Lösung erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei 65 °C.

Anschließend wurden die Filter zweimal 5 min bei RT und für 15 min bei 65 °C in Waschpuffer geschüttelt.

Zum Nachweis der DIG-markierten Sonde nach der Chemilumineszenz-Methode schlossen sich folgende Inkubationen bei RT unter Schütteln an:

- 2 min in Puffer 1
- 30 min in Puffer 2
- 30 min in einer 1:15000 Verdünnung des Anti-Digoxigenin-AP-Fab-Fragments (Fa. Boehringer Mannheim) in Puffer 2
- 2 x 15 min in Puffer 2
- 2 x 15 min in Puffer 1
- 5 min in Puffer 3
- 20 min lichtgeschützt in einer 1:600 CSPD-Verdünnung in Puffer 3 (Fa. Boehringer Mannheim)

Die Filter wurden in Frischhaltefolie eingeschlagen. Die Exposition von Fuji RX-Röntgenfilmen erfolgte bei RT für ein bis zwei Tage.

Vor einer erneuten Hybridisierung wurden die Filter kurz in bidestilliertem Wasser inkubiert und für 10 min in Strip-Lösung bei 37 °C gewaschen, wodurch die alkalilabile Bindung zwischen dem Digoxigenin und dem dUTP gespalten wird. Nach kurzem Schütteln in 2x SSC wurden die Filter in Frischhaltefolie bei 4 °C aufbewahrt.

Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

**Hybridisierungslösung**

5 x SSC  
 0,01 % NLS  
 0,02 % SDS  
 0,3 % Blocking-Reagent  
 (Fa. Boehringer Mannheim)

**Waschpuffer**

0,3 x SSC  
 0,1 % SDS

**Puffer 1**

0,01 M Tris/HCl pH 7,5  
 0,15 M NaCl

**Puffer 2**

0,01 M Tris/HCl pH 7,5  
 0,15 M NaCl  
 0,1 % Blocking-Reagent  
 (Fa. Boehringer Mannheim)

**Puffer 3**

0,01 M Tris/HCl pH 9,5  
 0,1 M NaCl  
 0,05 M MgCl<sub>2</sub>

**20 x SSC**

3 M NaCl  
 0,3 M NaCitrat  
 pH 7,0

**Strip-Lösung**

0,2 N NaOH  
 0,1 % SDS

## 2.8 Mikrosatelliten-Marker

Zur Erstellung von Mikrosatelliten-Markern wurden Primerpaare eingesetzt, die von LIU et al. (1996) und BECKER und HEUN (1995) entwickelt und in Gerste kartiert werden konnten. Die Primersequenzen sind entweder durch Analyse von Datenbanksequenzen oder durch Sequenzierung Mikrosatelliten-enhaltender Klone aus genomischen Bibliotheken entstanden. Es wurden bevorzugt solche Marker ausgewählt, die in den Veröffentlichungen einen hohen Polymorphiegrad aufwiesen. Die als Primer eingesetzten Oligonukleotide sind von der Fa. Gibco BRL synthetisiert worden. In Tab. 2.2 sind die Namen, das Mikrosatelliten-Motiv, die Größe des in der Literatur charakterisierten Allels sowie die Lokalisation des Markers im Gerstengenom angegeben.

**Tab. 2.3:** Verwendete Mikrosatelliten-Marker.

Markername	Mikrosatelliten-Motiv	Größe [bp] (Literatur)	Chromosom	PCR-Bed.	Referenz
HVACL1	(AT) <sub>7</sub>	150	5H	4	[2]
HVBKASI	(C) <sub>10</sub> , (A) <sub>11</sub>	197	2H	4	[1], [2]
HVCMA	(AT) <sub>9</sub>	141	7H	4	[2]
HVCSG	(GT) <sub>4</sub> , (G) <sub>17</sub>	196	2H	4	[1], [2]
HVLEU	(ATTT) <sub>4</sub>	166	5H	4	[2]
HVM2	(GA) <sub>11</sub>	201	5H,7H	1	[1]
HVM20	(GA) <sub>19</sub>	151	1H	1	[1]
HVM22	(AC) <sub>13</sub>	167	6H	3	[1]
HVM23	(GA) <sub>9</sub>	246	2H	6	[1]
HVM26	(CA) <sub>11</sub>	206	2H	6	[1]
HVM27	(GA) <sub>14</sub>	192	3H	1	[1]
HVM36	(GA) <sub>13</sub>	114	2H	1	[1]
HVM40	(GA) <sub>6</sub> (GT) <sub>4</sub> (GA) <sub>7</sub>	160	4H	1	[1]
HVM43	(CA) <sub>9</sub>	239	1H	1	[1]
HVM44	(GA) <sub>8</sub>	114	3H	1	[1]
HVM54	(GA) <sub>14</sub>	159	2H	1	[1]
HVM60	(AG) <sub>11</sub> , (GA) <sub>14</sub>	115	3H	1	[1]
HVM62	(GA) <sub>11</sub>	251	3H	1	[1]
HVM67	(GA) <sub>11</sub>	116	4H	1	[1]
HVM68	(GA) <sub>22</sub>	204	4H	1	[1]
HVM70	(CA) <sub>8</sub>	154	1H	2	[1]
HVPRP1B	(GT) <sub>6</sub> (AT) <sub>16</sub>	167	7H	5	[2]
HVRCABG	(AT) <sub>29</sub>	182	4H	4	[2]
HVSIP1A	(CTT) <sub>5</sub>	149	3H	5	[2]
HVWAXYG	(AT) <sub>9</sub>	205	7H	4	[2]

Referenz: [1]: LIU et al. 1996

[2]: BECKER und HEUN 1995

PCR-Bedingungen:

1: 5 min bei 94 °C

5 Zyklen: 1 min bei 92 °C, 0,5 min bei 64 °C, 1 min bei 72 °C

5 Zyklen: 1 min bei 92 °C, 0,5 min bei 60 °C, 1 min bei 72 °C

30 Zyklen: 1 min bei 94 °C, 1 min bei 55 °C, 1 min bei 72 °C

10 min bei 72 °C

2: 3 min bei 94 °C

30 Zyklen: 1 min bei 92 °C, 2 min bei 55 °C, 1,5 min bei 72 °C

10 min bei 72 °C

3: wie Nr. 5; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>

4: 5 min bei 94 °C

42 Zyklen: 1 min bei 92 °C, 1 min bei 60 °C, 1 min bei 72 °C

10 min bei 72 °C

5: 5 min bei 94 °C

42 Zyklen: 1 min bei 92 °C, 1 min bei 55 °C, 1 min bei 72 °C

10 min bei 72 °C

6: 5 min bei 94 °C

5 Zyklen: 1 min bei 92 °C, 0,5 min bei 69 °C, 1 min bei 72 °C

5 Zyklen: 1 min bei 92 °C, 0,5 min bei 65 °C, 1 min bei 72 °C

30 Zyklen: 1 min bei 94 °C, 1 min bei 60 °C, 1 min bei 72 °C

10 min bei 72 °C

Für den PCR-Ansatz wurde folgende Zusammensetzung in einem Endvolumen von 25  $\mu$ l gewählt:

je 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP  
1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (sofern nicht anders vermerkt)  
50 mM KCl  
10 mM Tris/HCl pH 9,0  
0,2  $\mu$ M Forward-Primer  
0,2  $\mu$ M Backward-Primer  
1 U *Taq* DNA-Polymerase (Fa. Pharmacia Biotech)  
ca. 50 ng genomische DNA

Der Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet. Die PCR erfolgte in einem Thermocycler der Fa. Perkin Elmer Cetus nach den in Tab. 2.3 aufgeführten Bedingungen.

Nach der PCR-Reaktion wurden 3  $\mu$ l Ladepuffer (50 % Glycerin, 0,4 % Bromphenolblau, 1 mM EDTA pH 8,0) zu dem Ansatz gegeben und der Ansatz in einem 3,5 %igen MetaPhor™-Agarosegel (Fa. FMC BioProducts, Rockland) in 1x TBE-Puffer (90 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA pH 8,0) elektrophoretisch bei 5 V/cm aufgetrennt. Als Marker diente dabei die 100 bp-Leiter (Fa. Pharmacia) oder mit *Msp*I verdaute pBR322-Plasmid-DNA (Fa. Biolabs, New England).

## 2.9 Inverse sequence-tagged repeats (ISTRs)

Die ISTR-Untersuchungen wurden am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, nach dem Protokoll von ROHDE (1996) durchgeführt. Die ISTR-Primer können über die Fa. GreenTec GmbH, Köln, bezogen werden. Zunächst wurden beide zum Einsatz kommenden Primer nach folgender Methode mit  $\gamma$ -<sup>33</sup>P-ATP endmarkiert:

20 pmol ISTR-Primer  
1 x Polynukleotid-Kinase-Reaktionspuffer  
(Fa. Boehringer)  
20  $\mu$ Ci  $\gamma$ -<sup>33</sup>P-ATP  
2 U Polynukleotid-Kinase (Fa. Boehringer)

Der Reaktionsansatz (20  $\mu$ l) wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend 10 min bei 70 °C erhitzt und auf Eis gestellt.

Für die PCR-Reaktion wurde ein 20 µl Ansatz mit folgender Zusammensetzung gewählt:

10-25	ng	genomische DNA
1	pmol	markierter Forward-Primer
1	pmol	markierter Backward-Primer
2,5	mM	Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
je 0,2	mM	dATP, dTTP, dGTP, dCTP
1	x	PCR-Reaktionspuffer (Fa. Gibco/BRL)
1	U	Taq-DNA-Polymerase (Fa. Gibco/BRL)

Der Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet. Die PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen:

3 min bei 95 °C

40 Zyklen: 0,5 min bei 95 °C  
0,5 min bei 50 °C  
2 min bei 72 °C

10 min bei 72 °C

Kurz vor dem Auftragen auf ein 4 %iges PAGE-Sequenzierungsgel wurden die Proben bei 95 °C für 2-5 min denaturiert und auf Eis gestellt. Ca. 2 µl des PCR-Ansatzes wurden pro Spur aufgetrennt. Nach der Elektrophorese sind die DNA-Banden durch Auflegen eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht worden.

## 2.10 Spaltungs- und Kopplungsanalyse

Für die Populationen 361 und 163 wird, da es sich um DH-Linien handelt, für einen Marker-Locus eine Aufspaltung im Verhältnis 1:1 erwartet. Mit Hilfe des  $\chi^2$ -Tests kann überprüft werden, ob eine Abweichung von der erwarteten Spaltung auftritt. In diesem Fall kann die Rekombinationsrate ( $r$ ) zu einem evtl. vorhandenen Letalfaktor nach folgender Formel berechnet werden:

$$r = \frac{hom2}{n} \quad \text{mit der Standardabweichung } s_r = \pm \sqrt{\frac{r(1-r)}{n}}$$

Dabei bezeichnet *hom2* die Klasse mit reduzierter Häufigkeit und  $n$  die Gesamtanzahl der Individuen.

Bei den für Zwergrost-Resistenz spaltenden Populationen wird, da es sich hier um F<sub>2</sub>-Populationen handelt, bei kodominantem Erbgang eine 1:2:1 bzw. bei dominantem Erbgang

eine 3:1 Spaltung der Genotypklassen erwartet. Als Signifikanzgrenze wurde in allen Fällen eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % zugrunde gelegt. Eine signifikante Abweichung kann auftreten, wenn entweder am Markerlocus selbst oder an einem gekoppelten unbekanntem Genort bestimmte Gameten oder Genotypen selektiv benachteiligt sind. Bei kodominantem Erbgang in einer F<sub>2</sub>-Population kann eine Zerlegung des Gesamt-  $\chi^2$ -Wertes ( $\chi_1^2$ ) in die zwei Komponenten  $\chi_2^2$  und  $\chi_3^2$  mit jeweils einem Freiheitsgrad Aufschluß darüber geben, ob eine Gameten- oder Zygotenselektion vorliegt.

Dabei gilt:

$$\chi_2^2 = \frac{(hom1 - het + hom2)^2}{n}$$

$$\chi_3^2 = \frac{2(hom1 - hom2)^2}{n}$$

$$\chi_1^2 = \chi_2^2 + \chi_3^2$$

*hom1* und *hom2* bezeichnen die Pflanzenanzahl der zwei Homozygotenklassen und *het* die Anzahl der heterozygoten Pflanzen. Die Summe dieser drei Klassen ergibt die Gesamtanzahl *n* der untersuchten Individuen.

Im Falle einer Gametenselektion in einem Geschlecht wird eine der Homozygotenklassen stark vermindert, was zu einer Signifikanz der  $\chi_3^2$ -Komponente führt. Das Verhältnis der Homozygoten zu den Heterozygoten ändert sich hingegen nicht, so daß kein signifikanter  $\chi_2^2$ -Wert zu beobachten ist. Bei Vorliegen einer vollständigen Selektion kommt es bei absoluter Kopplung zwischen dem Markerlocus und einem Letalgen zu einer 1:1:0-Aufspaltung. Liegt hingegen Zygotenselektion gegen eine der Homozygotenklassen vor, erwartet man bei absoluter Kopplung eine Aufspaltung von Heterozygoten zu Homozygoten von 2:1, so daß sowohl für  $\chi_2^2$  als auch für  $\chi_3^2$  signifikante Werte auftreten. Eine Schätzung der Rekombinationswerte zwischen einem Marker und einem angenommenen, der Selektion unterliegenden Locus kann mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Methode vorgenommen werden (WAGNER et al. 1992).

Für die DH-Populationen 361 und 163 wird bei unabhängiger Vererbung eines Markers und des Resistenzgens eine Aufspaltung der vier möglichen Klassen (*resistent/hom1*, *resistent/hom2*, *anfällig/hom1*, *anfällig/hom2*) in einem Verhältnis von 1:1:1:1 erwartet.

Für die F<sub>2</sub>-Populationen 38/39, 40/41 sowie 3 und 5 sind die für freie Spaltung theoretisch zu erwartenden Verhältnisse der Klassen in den Tabellen 2.4 und 2.5 dargestellt. Durch

Überprüfung der Unabhängigkeit der Randsummen mit Hilfe des  $\chi^2$ -Testes kann bei einer signifikanten Abweichung des  $\chi^2$ -Wertes (Signifikanzgrenze  $P \leq 0,05$ ) auf eine Kopplung zwischen dem Marker und einem oder zwei die Resistenz vermittelnden Loci geschlossen werden.

**Tab. 2.4:** Theoretisch zu erwartende Aufspaltungen in den für Zwergrost-Resistenz spaltenden  $F_2$ -Nachkommenschaften für kodominante Marker.

a) Population 38/39 und 40/41

Bonitur	Markergenotyp			$\Sigma$
	AA	Aa	aa	
resistent	1	2	1	4
anfällig	3	6	3	12
$\Sigma$	4	8	4	16

b) Population 3 und 5

Bonitur	Markergenotyp			$\Sigma$
	AA	Aa	aa	
resistent	9	18	9	36
anfällig	7	14	7	28
$\Sigma$	16	32	16	64

**Tab. 2.5:** Theoretisch zu erwartende Aufspaltungen in den für Zwergrost-Resistenz spaltenden  $F_2$ -Nachkommenschaften für dominante Marker.

a) Population 38/39 und 40/41

Bonitur	Markergenotyp		$\Sigma$
	A.	aa	
resistent	3	1	4
anfällig	9	3	12
$\Sigma$	12	4	16

b) Population 3 und 5

Bonitur	Markergenotyp		$\Sigma$
	A.	aa	
resistent	27	9	36
anfällig	21	7	28
$\Sigma$	48	16	64

Bei der Kopplungsanalyse zwischen den Markern und dem Resistenzgen der Population 40/41 wurde das Programm MAPMAKER/EXP 3.0 (LANDER et al. 1987 und LINCOLN et al. 1992) eingesetzt. Zunächst ist ein LOD-Wert von 3,0 als Grenzwert für die Signifikanz von Kopplung gewählt worden. Der LOD-Wert berechnet sich aus dem  $\log_{10}$  des Quotienten aus der Wahrscheinlichkeit dafür, daß die beobachteten Daten bei Kopplung der beiden Loci mit dem geschätzten Rekombinationswert vorliegen, und der Wahrscheinlichkeit für diese Daten unter der Annahme, daß die Loci ungekoppelt sind (MORTON 1995). Alle Marker, für die unter diesen Bedingungen keine Kopplung nachgewiesen werden konnte, wurden entsprechend ihrer aus der Literatur bekannten Lage in die Kopplungsgruppe eingefügt. Für die Berechnung der Austauschwerte in centiMorgan (cM) wurde die Kosambi-Funktion (KOSAMBI 1944) verwendet. Die  $\chi^2$ - und Rekombinationswerte der Markerpaare wurden mit Hilfe des Programms LINKAGE-1 berechnet (SUITER et al. 1983). Die Rekombinationswerte sind zusammen mit dem Standardfehler angegeben.

Für die Population 3 erfolgte die Berechnung des Rekombinationswertes mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Methode nach der bei ALLARD (1956) angegebenen Gleichung für diesen Spaltungsfall (1:2:1 / 9:7).

Dabei erfolgt die Schätzung des Rekombinationswertes  $r$  so, daß die beobachtete Verteilung die höchste Wahrscheinlichkeit  $L$  erfährt, womit sich ergibt, daß:

$$\frac{dL}{dr} = a_1 \frac{d \ln m_1}{dr} + a_2 \frac{d \ln m_2}{dr} + \dots + a_t \frac{d \ln m_t}{dr} = 0$$

Für  $a_1$  bis  $a_t$  werden die beobachtete, und für  $m_1$  bis  $m_t$  die erwartete Anzahl der Individuen in den  $t$  Klassen eingesetzt. Aus den in Tab. 2.6 angegebenen erwarteten Frequenzen in dieser Population ergibt sich folgende, zur Schätzung des Rekombinationswertes einzusetzende Gleichung:

$$a_1 \left[ \frac{2(1-r)}{r(2-r)} \right] + a_2 \left( \frac{2r-1}{1-r+r^2} \right) + a_3 \left( \frac{-2r}{1-r^2} \right) + a_4 \left[ \frac{6(r-1)}{4-6r+3r^2} \right] + a_5 \left[ \frac{3(1-2r)}{1+3r-3r^2} \right] + a_6 \left( \frac{6r}{1+3r^2} \right) = 0$$

**Tab. 2.6:** Zu erwartende Frequenzen der Phänotypen in einer  $F_2$ -Population mit dem aufspaltenden Marker A und bei Vererbung der Resistenz durch zwei komplementär wirkende Gene B und C (verändert nach ALLARD 1956).

Phänotyp (Genotyp <sup>a</sup> ) Marker <sup>b</sup> / Resistenzbonitur	beobachtete Anzahl	erwartete Frequenz
<i>hom2</i> / resistent (AABC)	$a_1$	$3/16(2r-r^2)$
<i>het</i> / resistent (AaBC)	$a_2$	$3/8(1-r+r^2)$
<i>hom1</i> / resistent (aaBC)	$a_3$	$3/16(1-r^2)$
<i>hom2</i> / anfällig (AABc[bC, bc])	$a_4$	$1/16(4-6r+3r^2)$
<i>het</i> / anfällig (AaBc[bC, bc])	$a_5$	$1/8(1+3r-3r^2)$
<i>hom1</i> / anfällig (aaBc[bC, bc])	$a_6$	$1/16(1+3r^2)$

<sup>a</sup> B bzw. C stehen für die Genotypen BB und Bb bzw. CC und Cc

b bzw. c stehen für die Genotypen bb bzw. cc

<sup>b</sup> *hom1*: Homozygotenklasse mit dem Allel des resistenten Elters

*hom2*: Homozygotenklasse mit dem Allel des anfälligen Elters

Die Standardabweichung ( $s_r$ ) von  $r$  berechnet sich aus der Wurzel der Varianz  $V_r$ , welche dem Kehrwert des Informationsgehaltes  $I_r$  der  $F_2$ -Nachkommenschaft entspricht.  $I_r$  ist nur von der Anzahl der Individuen und dem geschätzten Rekombinationswert abhängig und kann somit aus Tabellen entnommen werden (ALLARD 1956). Allgemein ergibt sich:

$$s_r = \sqrt{V_r} = \sqrt{\frac{1}{I_r}} = \sqrt{\frac{1}{ni_r}} \quad , \text{ mit } \quad i_r = \sum \left[ \frac{1}{m} \left( \frac{dm}{dr} \right)^2 \right]$$

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 BaYMV-Resistenz

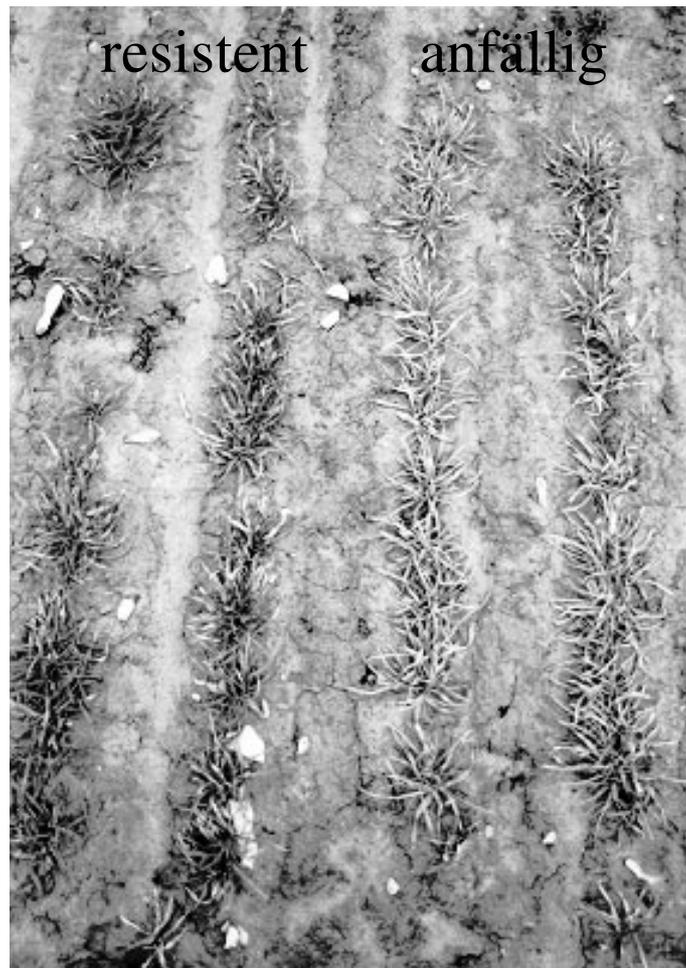
#### 3.1.1 Boniturergebnisse

Im Gegensatz zum BaMMV, das auch mechanisch übertragbar ist und bei dem somit die Resistenz im Gewächshaustest überprüft werden kann (GÖTZ und FRIEDT 1993), besteht die derzeit einzige Möglichkeit zur Überprüfung der BaYMV-Resistenz in der Aussaat auf entsprechenden Versuchsfeldern. Eine künstliche Inokulation durch Aufsprühen BaYMV enthaltenden Pflanzenpreßsafts führt zu keiner ausreichenden Infektionsrate, da das Virus in Lösungen nicht stabil ist. Die natürliche Infektion erfolgt über den Bodenpilz *Polymyxa graminis*.

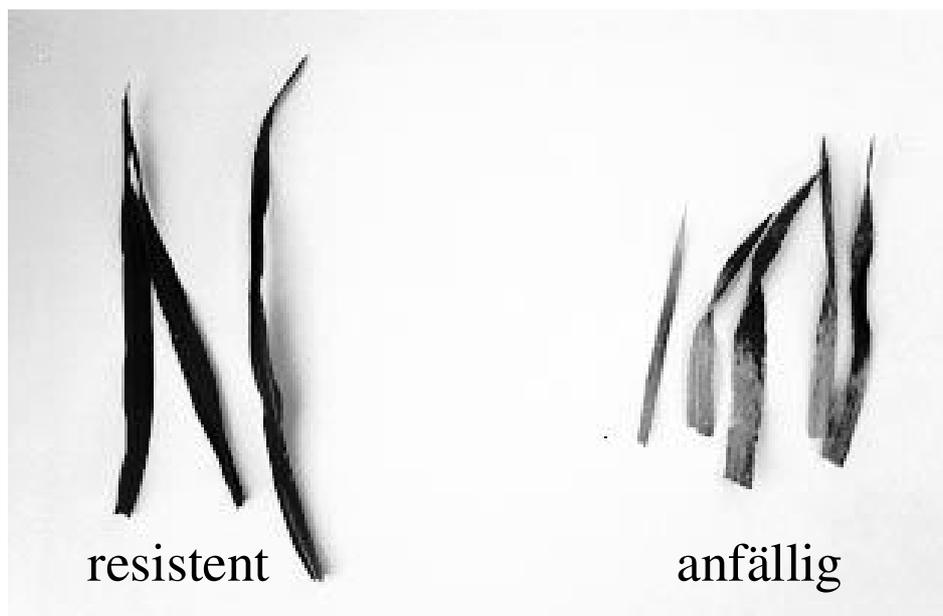
Bei der Bonitur auf den Versuchsfeldern wurden die Pflanzen in die beiden Klassen anfällig bzw. resistent eingeteilt. Eine weitere Unterteilung der Klassen ist problematisch, da die Symptome der Gelbmosaikvirose durch andere Faktoren, z. B. Frostschäden oder Nährstoffmangel, zu stark beeinflusst werden. In Zweifelsfällen wurde daher die Bonitur durch einen ELISA-Test des Blattsaftes auf Vorkommen von BaMMV und BaYMV überprüft. Eine Unterscheidung zwischen Befall durch das BaYMV-1 oder BaYMV-2 war mit dem ELISA-Test nicht möglich, da die beiden Stämme serologisch nicht differenzierbar sind. Die überprüften anfälligen Pflanzen zeigten ausschließlich eine Infektion durch die BaYMV-Stämme. Nur in zwei Fällen wurde eine Mischinfektion von BaYMV und BaMMV und bei drei Pflanzen ein Befall nur durch das BaMMV nachgewiesen.

In Abb. 3.1 sind die in Eikeloh gewachsenen anfälligen und resistenten Linien zu erkennen. An den Blättern ist deutlich die durch den Virusbefall verursachte gelblichere Färbung der anfälligen Pflanzen im Vergleich zu den resistenten Linien zu beobachten.

a)



b)



**Abb. 3.1:** Resistente und anfällige Pflanzen (a) und Blätter (b) aus der Feldprüfung in Eikeloh.

Die durch die Feldtests erhaltenen Boniturergebnisse an den Standorten Höhefeld und Eikeloh sind für die Population 163 in den Tabellen 3.1 und 3.2 dargestellt.

**Tab. 3.1:** Boniturergebnisse der DH-Linien aus der Kreuzung 163 für die BaMMV- und BaYMV-1-Resistenz (Standort Höhefeld, 1995).

Bonitur <sup>a</sup>	DH-Linie			Summe
	163/2	163/4	163/8	
resistent?	0	1	0	1
resistent	29	18	15	62
anfällig	32	20	13	65
anfällig?	1	0	0	1

<sup>a</sup> ? Phänotyp war nicht eindeutig

**Tab. 3.2:** Boniturergebnisse der DH-Linien aus der Kreuzung 163 für die BaYMV-2-Resistenz (Standort Eikeloh, 1995).

Bonitur <sup>a</sup>	DH-Linie			Summe
	163/2	163/4	163/8	
resistent?	1	0	0	1
resistent	26	17	16	59
anfällig	35	22	12	69

<sup>a</sup> ? Phänotyp war nicht eindeutig

Die Überprüfung auf eine 1:1-Spaltung, die erwartet wird, wenn ein Gen für die Vermittlung der BaMMV- und BaYMV-1- bzw. BaYMV-2-Resistenz verantwortlich ist, ergibt einen nicht signifikanten  $\chi^2$ -Wert von 0,07 bzw. 0,78. Fast alle Nachkommen waren wie die Elternlinien resistent bzw. anfällig gegen alle Virustypen. Jedoch wurden vier Nachkommen als anfällig gegen BaYMV-2 und resistent in Höhefeld und eine Linie als anfällig gegen BaMMV und BaYMV-1, aber in Eikeloh als resistent bonitiert. Die beiden Resistenzen könnten daher von zwei eng gekoppelten Genen vermittelt werden. Handelt es sich bei diesen fünf Pflanzen um Austauschtypen, beträgt die Rekombinationsrate der beiden Resistenzgene  $0,039 \pm 0,017$ . Zur Absicherung der Ergebnisse sollte eine weitere Bonitur dieser Linien im Jahr 1997 erfolgen, die aber aufgrund des harten Winters und der dadurch bedingten Ausfälle am Standort Eikeloh nicht durchgeführt werden konnte.

Die Spaltungsergebnisse für die DH-Linien aus der Kreuzung 361 sind in den Tabellen 3.3 und 3.4 aufgeführt. Durch die Beobachtung, daß in Höhefeld Pflanzen der Population 361 als resistent, in Eikeloh jedoch als anfällig bonitiert wurden, wird das Vorkommen des resistenzbrechenden BaYMV-2 in Eikeloh bestätigt.

**Tab. 3.3:** Boniturergebnisse der DH-Linien aus der Kreuzung 361 bezüglich BaMMV- und BaYMV-1-Resistenz (Standort Höhefeld, 1995).

Bonitur	DH-Linie			Summe
	361/3	361/7	361/9	
resistent	50	57	44	151
anfällig	2	0	0	2

In Höhefeld zeigten fast alle Pflanzen eine Resistenz gegen die Gelbmosaikvirose. Da beide Elternpflanzen Resistenzgene gegen BaMMV und BaYMV-1 besitzen, würde in einer DH-Population bei unabhängiger Vererbung der beiden Resistenzgene aus den Elternpflanzen eine 3:1-Aufspaltung von resistenten zu anfälligen Pflanzen erwartet werden. Aus der fehlenden Aufspaltung läßt sich schließen, daß entweder dasselbe Resistenzgen in den Elternlinien vorliegt oder zwei Resistenzgene, die eng gekoppelt sind. Werden die beiden als anfällig bonitierten Pflanzen als Austauschtypen betrachtet, liegt die Rekombinationsrate der beiden Resistenzgene bei  $0,08 \pm 0,05$ , sofern sie nur auf Grundlage der Ergebnisse aus der Nachkommenschaft 361/3 berechnet werden. Werden die Ergebnisse der Linien 361/7 und 361/9 mit einbezogen, so ergibt sich eine Rekombinationsrate von  $0,026 \pm 0,018$ .

**Tab. 3.4:** Boniturergebnisse der DH-Linien aus der Kreuzung 361 bezüglich BaYMV-2-Resistenz (Standort Eikeloh, 1995).

Bonitur	DH-Linie		
	361/3	361/7	361/9
resistent?	3	2	1
resistent	26	1	21
anfällig	22	48	20
anfällig?	1	6	1

In Eikeloh zeigte sich eine deutliche Aufspaltung der Nachkommenschaften in den DH-Linien 361/3 und 361/9 (Tab. 3.4). Bei Zugrundelegen einer 1:1-Spaltung überschreitet der  $\chi^2$ -Wert mit 0,33 bzw. 0,02 nicht die Signifikanzgrenze von 5 %. Im Gegensatz dazu traten in der Nachkommenschaft der F<sub>1</sub>-Pflanze 361/7 fast nur anfällige Pflanzen auf. Auch im darauffolgenden Jahr wurden keine Pflanzen aus der Nachkommenschaft 361/7 in Eikeloh als resistent bonitiert (Tab. 3.5). Die Symptome der Gerstengelbmosaikvirose waren 1996 nicht so klar ausgeprägt, so daß neben eindeutig resistenten bzw. anfälligen Pflanzen auch mäßig resistente bzw. mäßig anfällige Pflanzen bonitiert wurden. Insgesamt kann eine Verschiebung des Verhältnisses von resistenten bzw. mäßig resistenten Pflanzen zur Anfälligkeit hin

festgestellt werden. Eine Ursache hierfür könnte die Schwächung resistenter Pflanzen durch ungünstige Umweltbedingungen sein, so daß sie einem leichten Virusbefall ausgesetzt waren. Werden die mäßig resistenten und die resistenten Pflanzen bzw. die anfälligen und mäßig anfälligen zusammengefaßt, ergibt sich bei Prüfung auf eine 1:1-Spaltung ein  $\chi^2$ -Wert von 1,56 für die Nachkommenschaft der F<sub>1</sub>-Pflanze 361/3 und ein signifikanter Wert von 9 für die DH-Linie 361/9.

**Tab. 3.5:** Boniturergebnisse der DH-Linien aus der Kreuzung 361 für die BaYMV-2-Resistenz (Standort Eikeloh, 1996).

Bonitur	DH-Linie		
	361/3	361/7	361/9
resistent	2	0	1
mäßig resistent	19	0	8
mäßig anfällig	10	19	14
anfällig	20	38	13

Zur Überprüfung der Boniturergebnisse wurde 1997 ein weiterer Feldtest mit isoliertem Saatgut aus dem Gewächshaus durchgeführt. Leider konnten durch einen strengen Winter nur 23 % der Pflanzen im Frühjahr bonitiert werden. Die beobachteten Bonituren stimmten jedoch sehr gut mit den Ergebnissen aus dem Jahr 1995 überein, so daß von einer monogenen Vererbung der BaYMV-2-Resistenz ausgegangen werden kann.

Die Kreuzungsnachkommenschaften von resistenten und anfälligen Pflanzen der Linien 361/3 und 361/9 erwiesen sich in Eikeloh bei einer Bonitur im Jahr 1998 als resistent gegen BaYMV-2, so daß eine dominante Vererbung der Resistenz angenommen werden muß.

### 3.1.2 Isoenzym-Untersuchungen

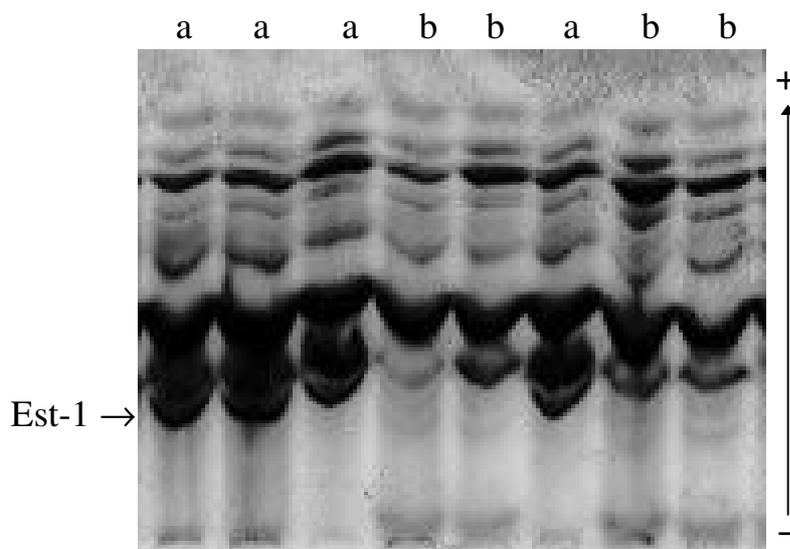
Von den 17 überprüften Isoenzymssystemen konnten in der Population 163 nur bei der Esterase und der GOT Polymorphismen festgestellt werden. Die jeweiligen Zymogramme sind in Abb. 3.2 und 3.3 dargestellt.



Bei der Esterase konnten vier spaltende Loci ausgewertet werden (Abb. 3.2), wobei in der Linie 163/8 der Locus *Est-9* keinen Polymorphismus aufwies. Die Nomenklatur der Esterase-Loci erfolgte nach HVID und NIELSEN (1977). Da es sich bei dieser Population um DH-Pflanzen handelt, treten nur die jeweiligen homozygoten Klassen auf.

Eine Überprüfung mit dem  $\chi^2$ -Test ergab bei der *Got-1* eine signifikante Abweichung von der erwarteten 1:1-Spaltung (Tab. 3.6). Wird eine vollständige Selektion eines Genotyps durch einen mit diesem Locus gekoppelten Letalfaktor vorausgesetzt, ergibt sich ein Rekombinationswert von  $0,33 \pm 0,06$ . Bei einer DH-Population kann jedoch nicht unterschieden werden, ob eine Selektion gegen die Gameten vorliegt oder die Pflanzen erst bei der anschließenden Regeneration selektiert werden.

In der Population 361 konnten nur bei der Esterase polymorphe Banden in den Zymogrammen beobachtet werden. Ein entsprechendes Zymogramm für die beiden Homozygoten-Klassen ist in Abb. 3.4 dargestellt. Anders als in der Population 163 spaltet hier nur der *Est-1*-Locus auf.



**Abb. 3.4:** Zymogramm der Esterase aus Pflanzen der Population 361 mit den Genotypen *Est-1-11* (a) und *Est-1-22* (b).

Wie aus der Tab. 3.6 entnommen werden kann, wich das gefundene Spaltungsverhältnis nicht von der erwarteten 1:1-Spaltung ab.

**Tab. 3.6:** Spaltungsergebnisse der DH-Linien 163 und 361 für die Esterase und GOT.

Linie	Locus	<i>hom1</i> : <i>hom2</i>	$\chi^2$ -Wert
163	<i>Est-1</i>	51 : 42	0,87
163	<i>Est-2</i>	44 : 50	0,38
163	<i>Est-4</i>	44 : 50	0,38
163 <sup>†</sup>	<i>Est-9</i>	47 : 34	2,09
163	<i>Got-1</i>	48 : 24	8,00**
361	<i>Est-1</i>	64 : 63	0,01

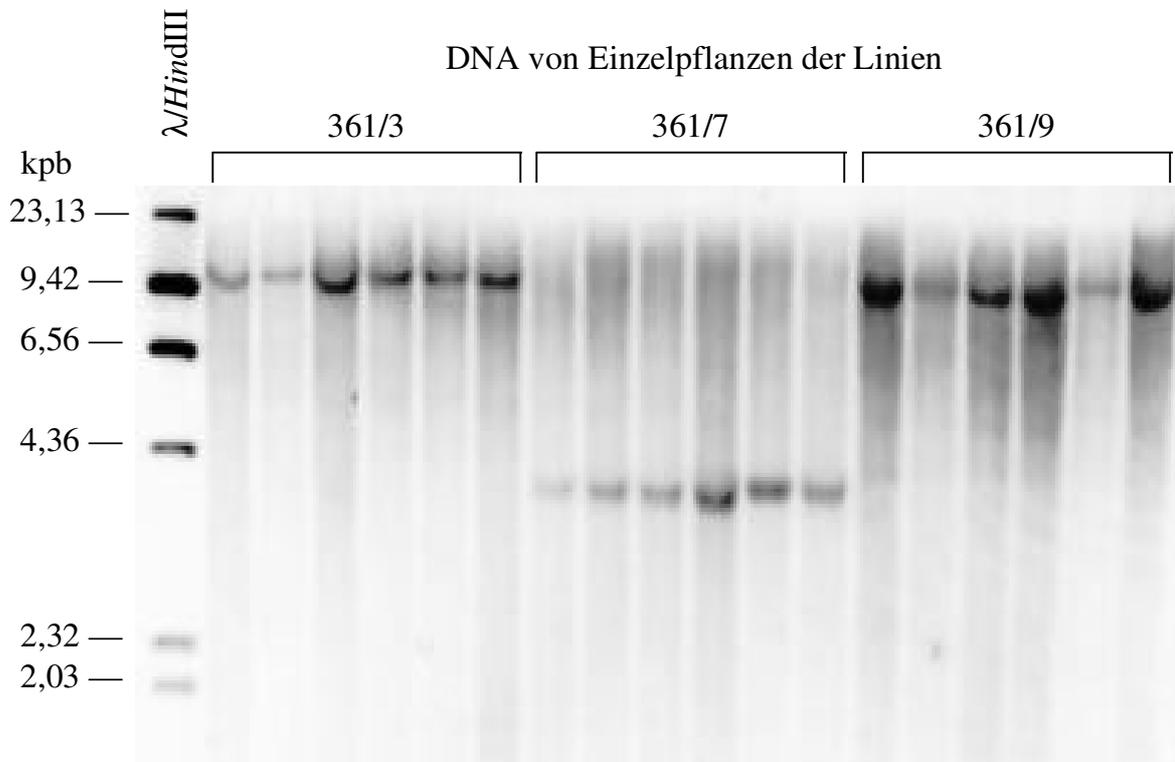
<sup>†</sup> spaltet nicht in Linie 163/8

\*\* signifikant bei  $\alpha = 0,01$

### 3.1.3 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen

Für die RFLP-Untersuchungen wurde zunächst überprüft, welche Enzym-Sonden-Kombinationen in dem vorliegenden Pflanzenmaterial Polymorphismen aufweisen. Dazu wurde die genomische DNA aus je sechs Pflanzen der Populationen 361/3, 361/7 und 361/9 mit bis zu fünf verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, auf Membranen übertragen und mit 53 verschiedenen Sonden hybridisiert. Nach der Detektion wurden ein bis sieben Fragmente sichtbar, die eine Größe von 0,5 bis 23 kbp besaßen. 17 Sonden (32 %) zeigten einen Polymorphismus in allen drei Linien. Sechs Sonden waren nur in der Nachkommenschaft einer einzigen, zwei Sonden nur in der Nachkommenschaft zweier  $F_1$ -Pflanzen polymorph. Bei drei Sonden trat der Polymorphismus nur bei Vergleich zwischen den drei verschiedenen Nachkommenschaften auf, während innerhalb der Nachkommenschaft einer  $F_1$ -Pflanze das Bandenmuster monomorph war. Ein Beispiel für einen solchen Polymorphismus zeigt Abb. 3.5. Durch die RFLP-Analysen wird damit bestätigt, daß die drei verwendeten  $F_1$ -Pflanzen nicht uniform waren.

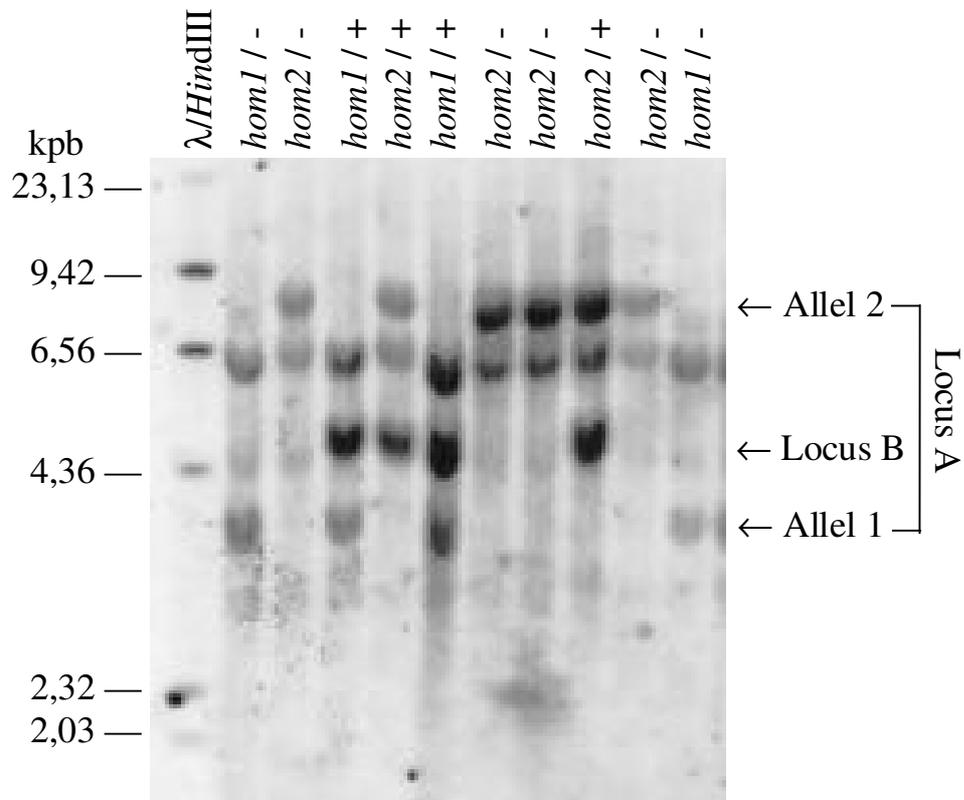
Bei zwölf Sonden konnte der Polymorphismus nur mit einem Enzym erkannt werden, so daß der Einsatz mehrerer Restriktionsenzyme die Anzahl der für die Analyse einsetzbaren Sonden wesentlich erhöht. Bei den verwendeten Enzymen zeigte *EcoRI* mit vier Polymorphismen die geringste Anzahl, die damit ca. um die Hälfte niedriger war als bei *HindIII* mit acht bzw. *BamHI* und *XbaI* mit sieben.



**Abb. 3.5:** Bandenmuster nach Hybridisierung *Bam*HI restringierter DNA der Population 361 mit der Sonde MWG041.

Zwei der Polymorphismen beruhen darauf, daß ein Nullallel vorliegt. Dieses kann verschiedene Gründe haben. Neben einer Deletion des Bereichs, in dem die Sonde hybridisiert, kann es auch durch Mutation zur Entstehung eines sehr kleinen Fragmentes kommen, das aus dem Gel auswandert und somit nicht mehr nachgewiesen werden kann. Bei Sonden mit komplexen Hybridisierungsmustern ist es möglich, daß das Fragment des zweiten Allels durch andere Banden verdeckt wird.

Zur Suche nach einem mit dem Resistenzgen gekoppelten Marker, wurden die Einzelpflanzen der Linien 361/3 und 361/9 mit den gefundenen polymorphen Enzym-Sonden-Kombinationen analysiert. Ein Beispiel für einen RFLP zeigt Abb. 3.6, wobei die Sonde MWG063 zwei spaltende Loci detektiert.



**Abb. 3.6:** Bandenmuster nach Hybridisierung *Xba*I restringierter DNA der Linie 361/3 mit der Sonde MWG063. Die Genotypen der Einzelpflanzen sind bezüglich des Locus A (*hom1*, *hom2*) und Locus B (+, -) angegeben.

Mit den Sonden MWG546, MWG596, MWG634, MWG865, ABC167 und ABC256 wurde eine „bulked segregant“-Analyse durchgeführt, die keine Kopplung zum Resistenzgen ergab. Der Marker MWG003 spaltete nicht in der DH-Linie 361/7, MWG596 nicht in der DH-Linie 361/9. Die Spaltungsergebnisse und  $\chi^2$ -Werte können der Tab. 3.7 entnommen werden.

Bei drei Markern kommt es zu einer abweichenden Spaltung durch Unterbesetzung einer Homozygotenklasse. Wird eine vollständige Selektion durch einen mit dem Marker gekoppelten Letalfaktor vorausgesetzt, beträgt der Rekombinationswert für den Marker MWG63A  $0,38 \pm 0,05$ , für MWG595  $0,30 \pm 0,06$  und für MWG932  $0,38 \pm 0,05$ . Werden die beiden Nachkommenschaften 361/3 und 361/9 getrennt betrachtet, kommt es nur in letzterer zu einer signifikanten Abweichung, während die  $\chi^2$ -Werte in der Linie 361/3 bei 1,60 für MWG595, 0,00 für MWG063A und 0,08 für MWG932 liegen. Die Abweichungen werden daher hauptsächlich durch die Nachkommenschaft 361/9 verursacht, mit  $\chi^2$ -Werten von 13,4, 10,9 und 10. Werden die Nachkommenschaften getrennt ausgewertet, weicht zusätzlich der

Marker MWG878 ( $\chi^2$ -Wert 4,8) in der Population 361/9 signifikant von der erwarteten Spaltung ab. Allerdings ist hier der Stichprobenumfang mit 30 Pflanzen recht gering.

**Tab. 3.7:** Spaltungsergebnisse der RFLP-Marker in der Population 361.

Sonde	Restriktionsenzym	Markerallel <i>hom1 : hom2</i>	$\chi^2$ -Wert 1:1-Spaltung
MWG003	<i>Bam</i> HI	37 : 34	0,13
MWG010	<i>Bam</i> HI	24 : 17	1,19
MWG063A	<i>Xba</i> I	49 : 30	4,56*
MWG063B	<i>Xba</i> I	37 : 40	0,12
MWG514	<i>Xba</i> I	31 : 27	0,27
MWG517	<i>Hind</i> III	41 : 42	0,01
MWG530	<i>Hind</i> III	44 : 39	0,30
MWG595	<i>Bam</i> HI	47 : 20	10,88**
MWG652	<i>Bam</i> HI	43 : 29	2,72
MWG703	<i>Xba</i> I	25 : 31	0,64
MWG706	<i>Eco</i> RI	35 : 31	0,24
MWG720	<i>Eco</i> RI	46 : 37	0,98
MWG878	<i>Eco</i> RI	40 : 37	0,12
MWG932	<i>Bam</i> HI	30 : 50	5,00*

\*signifikant bei  $\alpha = 0,05$

\*\*signifikant bei  $\alpha = 0,01$

### 3.1.4 Mikrosatelliten

18 Pflanzen der Population 361 wurden mit Hilfe von 25 bei der Gerste entwickelten Mikrosatelliten-Markern überprüft. Eine Übersicht über die gefundenen Polymorphismen und die amplifizierten Fragmentgrößen gibt Tab. 3.8.

Wie schon die RFLP-Analysen zeigten, gibt es auch hier Marker, die nur in der Linie 361/7 (HVM20, HVM62) bzw. in der Linie 361/3 (HVM60) polymorph sind oder wie bei dem Marker HVPRP1B nur zwischen den Linien unterschiedliche Allele aufweisen. Dieses bestätigt die durch die Boniturergebnisse und RFLP-Analysen gewonnene Annahme, daß die drei  $F_1$ -Pflanzen, von denen die Linien abstammen, nicht uniform waren. Werden nur die Mikrosatelliten berücksichtigt, die in allen drei Linien Polymorphismen aufweisen, so beträgt deren Anteil 24 %.

**Tab. 3.8:** Fragmentgröße der Amplifikationsprodukte durch Mikrosatelliten-Primer. Die den Polymorphismus bedingenden Fragmente sind fett gedruckt.

\* Fragment wird nur in der Linie 361/7 amplifiziert.

+ Fragment wird nur in der Linie 361/3 amplifiziert.

† Fragment wird nur in den Linien 361/3 und 361/9 amplifiziert.

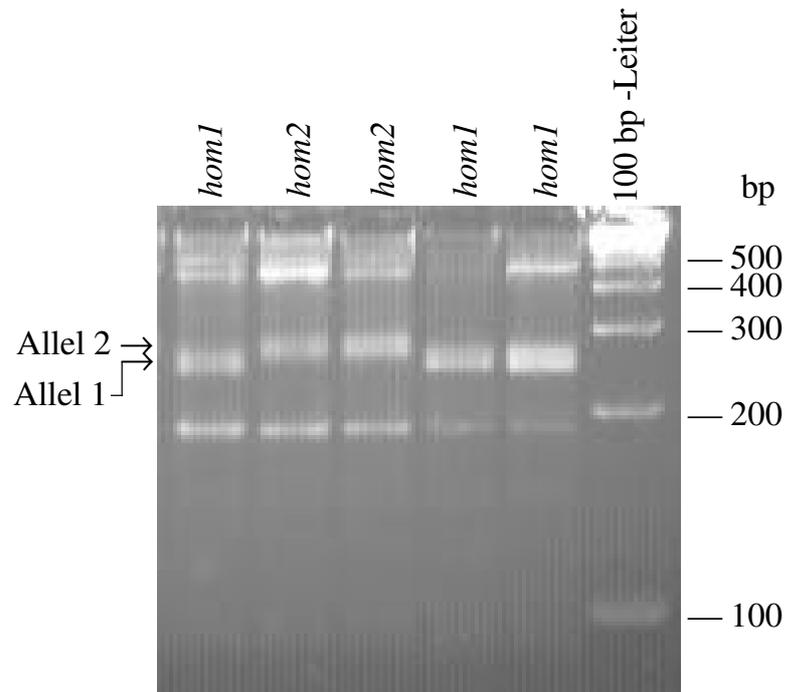
Mikrosatellit	Motiv	Chromosom	Fragmentgr. in Literatur [bp]	Fragmentgröße in Population 361 [bp]
HVM20	(GA) <sub>19</sub>	1H	151	Allel 1 <b>135*</b> Allel 2 <b>155</b>
HVM43	(CA) <sub>9</sub>	1H	239	240
HVM70	(CA) <sub>8</sub>	1H	154	150
HVBKASI	(C) <sub>10</sub> , (A) <sub>11</sub>	2H	197	198
HVCSG	(GT) <sub>4</sub> , (G) <sub>17</sub>	2H	196	199 332
HVM23	(GA) <sub>9</sub>	2H	246	238
HVM26	(CA) <sub>11</sub>	2H	206	198 205 218
HVM36	(GA) <sub>13</sub>	2H	114	Allel 1 <b>106</b> Allel 2 <b>137</b>
HVM54	(GA) <sub>14</sub>	2H	159	158
HVM27	(GA) <sub>14</sub>	3H	192	196
HVM44	(GA) <sub>8</sub>	3H	114	114
HVM60	(AG) <sub>11</sub> , (GA) <sub>14</sub>	3H	115	Allel 1 <b>112+</b> Allel 2 <b>115</b>
HVM62	(GA) <sub>11</sub>	3H	251	Allel 1 <b>220*</b> Allel 2 <b>240</b>
HVSIP1A	(CTT) <sub>5</sub>	3H	149	147
HVM40	(GA) <sub>6</sub> (GT) <sub>4</sub> (GA) <sub>7</sub>	4H	160	149
HVM67	(GA) <sub>11</sub>	4H	116	116
HVM68	(GA) <sub>22</sub>	4H	204	Allel 1 <b>192</b> Allel 2 <b>207</b>
HVRCABG	(AT) <sub>29</sub>	4H	182	Allel 1 <b>185</b> 194 Allel 2 <b>200</b>
HVACL1	(AT) <sub>7</sub>	5H	150	140

Tab. 3.8: Fortsetzung.

Mikrosatellit	Motiv	Chromosom	Fragmentgr. in Literatur [bp]	Fragmentgröße in Population 361 [bp]	
HVLEU	(ATTT) <sub>4</sub>	5H	166	Allel 1	<b>165</b>
				Allel 2	<b>170</b>
HVM2	(GA) <sub>11</sub>	5H, 7H	201	Allel 1	140
					<b>166</b>
					190
					200
HVM22	(AC) <sub>13</sub>	6H	167		151
HVCMA	(AT) <sub>9</sub>	7H	141		140
HVPRP1B	(GT) <sub>6</sub> (AT) <sub>16</sub>	7H	167		128*
					147 <sup>†</sup>
					163
					177
HVWAXYG	(AT) <sub>9</sub>	7H	205	Allel 1	190
				Allel 2	<b>245 / 264</b>
					<b>269 / 285</b>
					500

Die Größe der amplifizierten Fragmente wich zum Teil bis zu 80 bp von den in der Literatur beschriebenen ab. Die Differenz der polymorphen Allele reicht von nur 3 bp (HVM60) bis zu 31 bp (HVWAXYG) Unterschied.

Bei einigen Mikrosatelliten-Primern wurden mehrere Banden amplifiziert, die zum Teil im erwarteten Größenbereich des Mikrosatellitenfragments lagen (z. B. HVPRP1B, HVM26), bei einigen Markern jedoch auch wesentlich größer waren (HVWAXYG, HVCSG). Bei letzteren liegt vermutlich eine unspezifische Amplifikation vor, die durch stringenteren Bedingungen verhindert werden könnte. Mehrere Fragmente können jedoch auch durch Duplikationen der Primeranlagerungssequenzen verursacht werden, wobei jedoch nicht in jedem Amplifikationsprodukt ein Mikrosatellit enthalten sein muß. So entstehen in der PCR-Reaktion mit DNA aus der Population 361 und den Primern HVWAXYG jeweils zwei Banden mit 264 bp und 245 bp bzw. 269 bp und 285 bp sowie nicht polymorphe Fragmente bei 190 bp und 500 bp (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7:** Bandenmuster nach PCR mit den Primern HVWXYG und DNA der Population 361.

Der Polymorphismus beim Marker HVM2 besteht darin, daß das 166 bp Fragment nicht bei allen Pflanzen amplifiziert wurde. Nullallele können durch Deletion oder Insertion in der zum Primer komplementären Sequenz entstehen, wodurch die Anlagerung eines Primers verhindert wird. Auch eine Punktmutation in der zum 3'-Ende komplementären Anlagerungssequenz würde eine Amplifikation dieses Fragments durch die *Taq*-Polymerase verhindern und somit ein Nullallel erzeugen. Im vorliegenden Fall ist es auch möglich, daß das zweite Allel die gleiche Größe besitzt wie die zusätzlich vorhandenen Fragmente und somit im Gel nicht zu erkennen ist.

Die Einzelpflanzen der Nachkommenschaften 361/3 und 361/9 wurden mit den gefundenen polymorphen Mikrosatelliten untersucht. Die Spaltungsergebnisse sind in Tab. 3.9 dargestellt.

**Tab. 3.9:** Spaltungsergebnisse der Mikrosatelliten-Marker in der Population 361.

Mikrosatellit	Markerallel <i>hom1</i> : <i>hom2</i>	$\chi^2$ -Wert 1:1-Spaltung
HVLEU	44 : 37	0,60
HVM60	11 : 16	0,93
HVM68	28 : 23	0,49
HVRCABG	42 : 38	0,20
HVWXYG	35 : 29	0,56

Die Spaltungsergebnisse für die Mikrosatelliten-Loci zeigten keine signifikante Abweichung zu der erwarteten 1:1-Spaltung.

Mit den Markern HVM2 und HVM36 wurde, da zu diesem Zeitpunkt gesicherte Boniturergebnisse vorlagen, eine „bulk segregant“-Analyse durchgeführt, die keine Kopplung zu dem gesuchten Resistenzgen ergab.

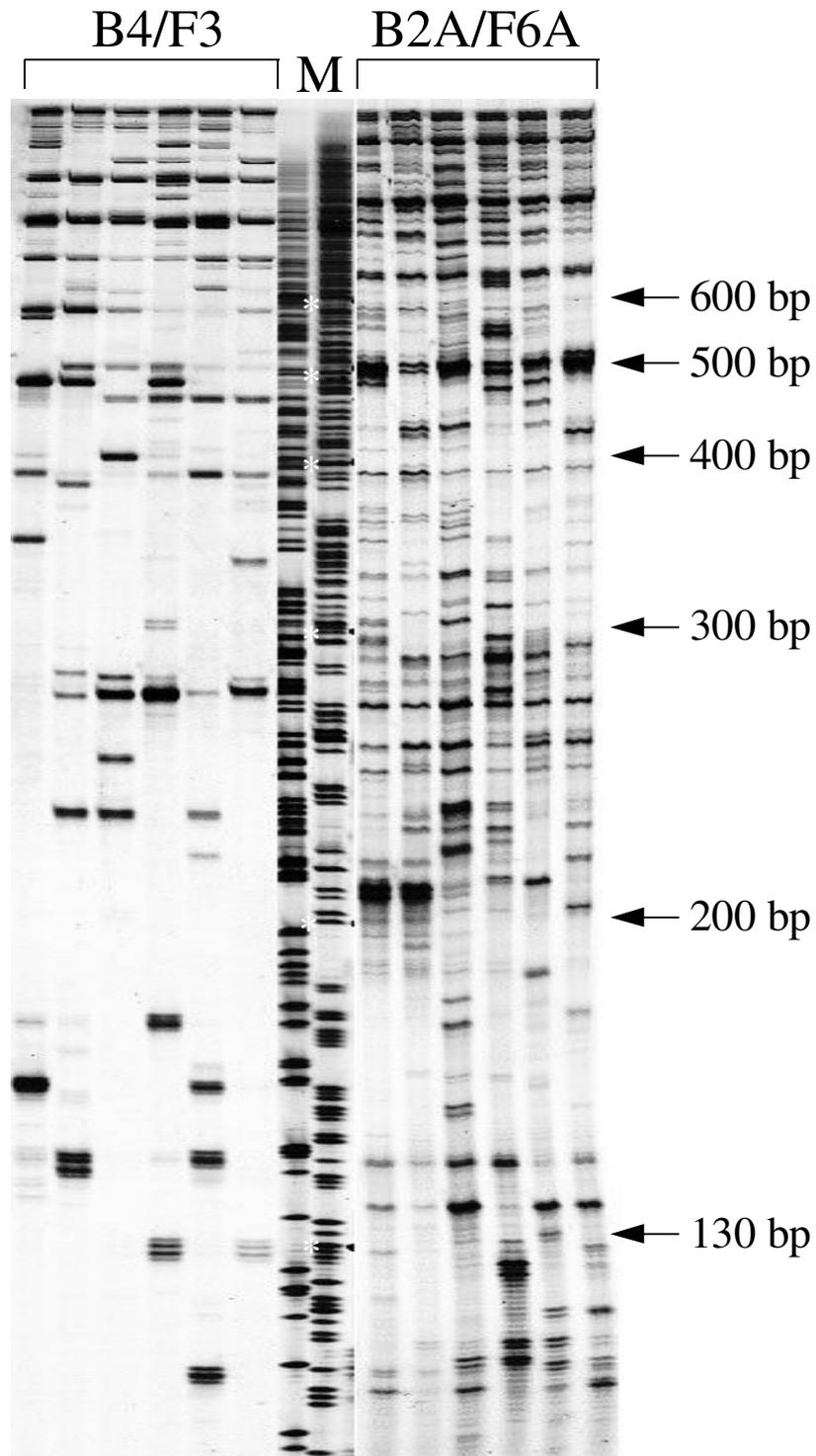
### 3.1.5 ISTR-Untersuchungen

Zunächst wurden für die Untersuchungen zwei verschiedene Primerkombinationen (B4/F3 bzw. B2A/F6A) an sechs Einzelpflanzen eingesetzt. Die Anzahl der Banden lag bei der ersten Primerkombination bei 20 - 30, bei der zweiten um die 30 - 40 (Abb. 3.8). Die Fragmente lagen in einem Größenbereich von etwa 50 bis 1000 bp. Die Anzahl der polymorphen Banden war mit 84 bzw. 73 % sehr hoch.

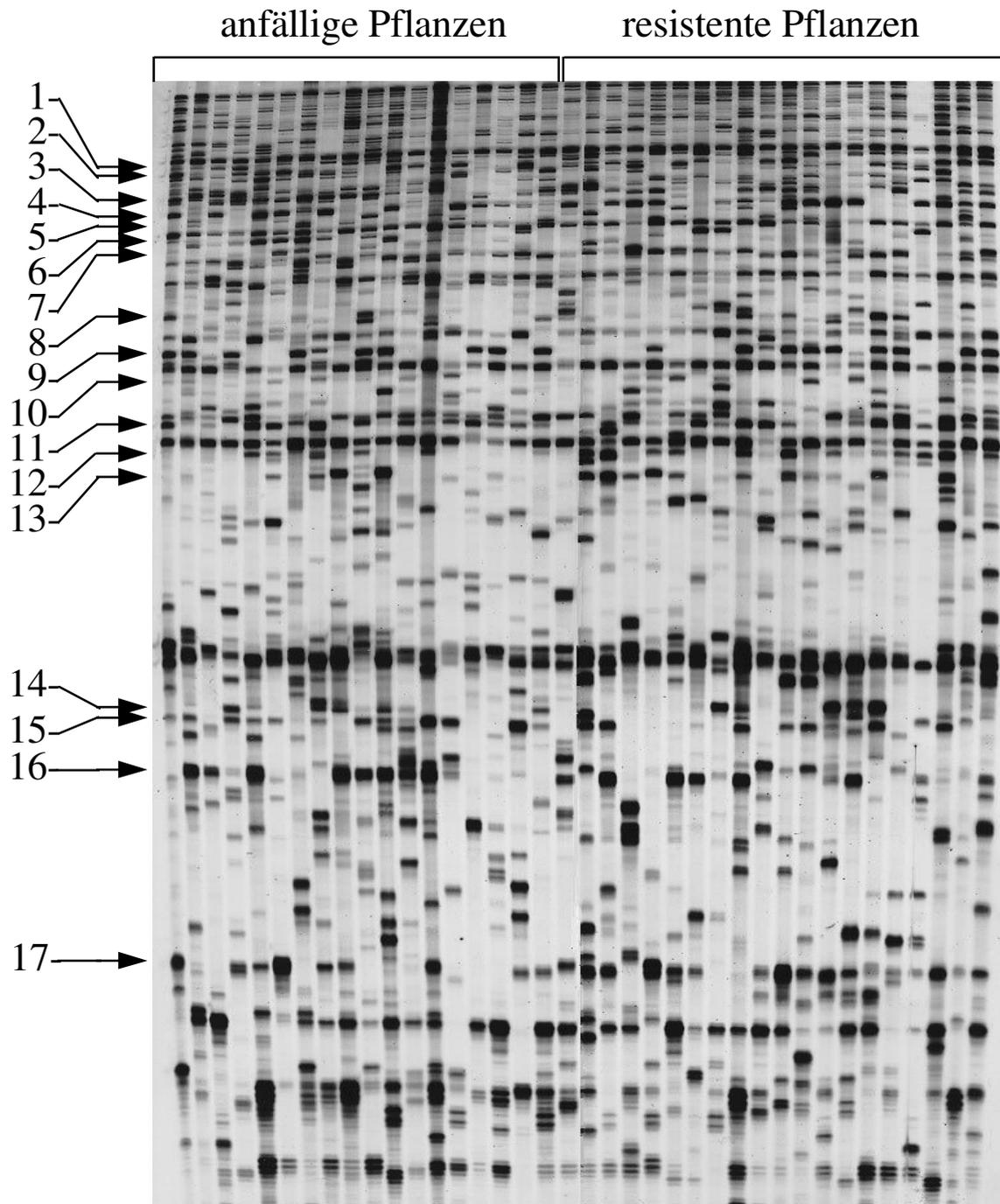
Anschließend wurden 38 Pflanzen der Linien 361/3 und 361/9 mit der Primerkombination B4/F3, die ein einfacher auszuwertendes Bandenmuster ergab, untersucht. Das entsprechende Autoradiogramm ist in Abb. 3.9 dargestellt und die ausgewerteten Banden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Zahlen entsprechen den in Tab. 3.10 verwendeten Bezeichnungen für die ISTR-Marker. Es wurden nicht alle polymorphen Banden zur Analyse ausgewählt, da z. T. durch Überlagerung mehrerer Fragmente mit ähnlicher Größe die Bonitur der Pflanzen problematisch war.

Zu beachten ist, daß das in Abb. 3.8 dargestellte Bandenmuster wesentlich weniger Banden aufweist als das in Abb. 3.9 und insofern bezüglich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse noch weitere Versuche folgen müßten.

Zudem ist in Abb. 3.9 zu erkennen, daß neben normal spaltenden ISTR-Markern auch solche Banden häufig sind, die nur in einzelnen Pflanzen amplifiziert werden bzw. in nur einzelnen Pflanzen fehlen. Da in solchen Fällen nicht von einer den Mendelschen Regeln folgenden Vererbung ausgegangen werden kann, wurden diese Polymorphismen nicht ausgewertet.



**Abb. 3.8:** Bandenmuster der ISTR-Analyse von Pflanzen der Population 361/3 mit den Primerkombinationen B4/F3 und B2A/F6A. Die Größenangaben beziehen sich auf die mit \* gekennzeichneten Banden des Markers (M).



**Abb. 3.9:** Bandenmuster der ISTR-Analyse mit den Primern B4/F3 in der Population 361/3 und 361/9. Die ausgewerteten Banden sind mit Nummern gekennzeichnet.

**Tab. 3.10:** Spaltungsergebnisse der ISTR-Marker in der Population 361.

ISTR-Marker	Markerallel <i>hom1</i> : <i>hom2</i>	$\chi^2$ -Wert 1:1-Spaltung
1	18 : 20	0,11
2	20 : 18	0,11
3	25 : 13	3,79
4	25 : 13	3,79
5	9 : 29	10,53**
6	9 : 29	10,53**
7	9 : 29	10,53**
8	13 : 25	3,79
9	19 : 19	0
10	19 : 19	0
11	30 : 8	12,74**
12	18 : 20	0,11
13	15 : 23	1,68
14	12 : 26	5,16*
15	22 : 16	0,95
16	18 : 20	0,11
17	25 : 13	3,79

\* signifikant bei  $\alpha = 0,05$ \*\* signifikant bei  $\alpha = 0,01$ 

Fünf der ausgewerteten Marker zeigten eine signifikante Abweichung von der erwarteten 1:1-Aufspaltung. Wird als Ursache für die gestörte Spaltung eine Kopplung zu einem Letalfaktor angenommen, beträgt der Rekombinationswert für die Marker ISTR05, ISTR06 und ISTR07  $0,24 \pm 0,07$ , für ISTR11  $0,21 \pm 0,07$  und für ISTR14  $0,32 \pm 0,08$ .

### 3.1.6 Kopplungsanalysen

Für alle spaltenden Marker wurde überprüft, ob eine Kopplung mit dem Resistenzgen vorliegt. In der Population 361 zeigte keiner der 45 polymorphen Marker (1 Isoenzym, 20 RFLPs, 7 Mikrosatelliten und 17 ISTRs) eine signifikante Abweichung, die auf Kopplung hinweisen würde bzw. ein unterscheidbares Muster in der „bulk segregant“-Analyse. Damit kann die Lage des Resistenzgens in den entsprechenden Genomregionen ausgeschlossen werden. Die Genotypen der einzelnen Pflanzen können der Tab. B.1 im Anhang entnommen werden.

Bei der Analyse der ISTR-Marker zeigte sich eine Kopplung zwischen dem Merkmal Zeiligkeit und ISTR08 und ISTR17, in beiden Fällen mit einer Rekombinationsrate von  $0,18 \pm 0,06$  ( $\chi^2$ -

Wert 17,8). Dieses ISTR-Markerpaar zeigt eine Rekombinationsrate von  $0,21 \pm 0,07$  ( $\chi^2$ -Wert 10,8).

Eine Kopplung wurde zwischen dem BaYMV-2-Resistenzgen der Population 163 und dem *Est1-Est2-Est4*-Genkomplex auf dem langen Arm von Chromosom 3H festgestellt. Die Spaltungsergebnisse sind in Tab. 3.11 aufgeführt, die Genotypen der einzelnen Pflanzen können der Tab. B.2 im Anhang entnommen werden. Wie schon KAHLER und ALLARD (1970) nachweisen konnten, sind die Loci *Est-1*, *Est-2* und *Est-4* eng gekoppelt. Auch in der hier untersuchten Stichprobe, die 92 Pflanzen umfaßte, traten keine Austauschtypen auf. Folglich sind auch die Spaltungsverhältnisse mit dem Resistenzgen gleich. Der Rekombinationswert zwischen dem Resistenzgen und dem Esteraselocus wurde auf  $0,08 \pm 0,03$  geschätzt. Die anderen Markerpaare zeigen eine freie Aufspaltung.

**Tab. 3.11:** Spaltungsergebnisse und  $\chi^2$ -Werte für die Unabhängigkeit der Randsummen in der Population 163.

Marker	Genotyp <sup>a</sup>				$\chi^2$ -Wert <sup>b</sup>
	<i>a</i> <sub>1</sub>	<i>a</i> <sub>2</sub>	<i>a</i> <sub>3</sub>	<i>a</i> <sub>4</sub>	
<i>Est-9</i>	17	11	22	21	0,62
<i>Got-1</i>	19	10	26	11	0,17
<i>Est-1</i>	4	44	30	2	57,32**
<i>Est-2</i>	44	4	2	30	57,32**
<i>Est-4</i>	44	4	2	30	57,32**

<sup>a</sup> *a*<sub>1</sub> = resistent / *hom1*

*a*<sub>3</sub> = anfällig / *hom1*

*a*<sub>2</sub> = resistent / *hom2*

*a*<sub>4</sub> = anfällig / *hom2*

<sup>b</sup> \*\* signifikant für  $\alpha = 0,01$

## 3.2 Zwergrostresistenz

### 3.2.1 Boniturergebnisse

Die Bonitur der Zwergrost-Resistenz wurde entsprechend den von PROCHNOW (1998) erarbeiteten Ergebnissen übernommen. Die Pflanzen wurden bei der Bonitur in die Klassen 0 bis 4 eingestuft (vergl. Tab. 2.2). Einen Überblick über die Verteilung der Pflanzen auf die einzelnen Klassen geben die Abbildungen 3.10 und 3.11.

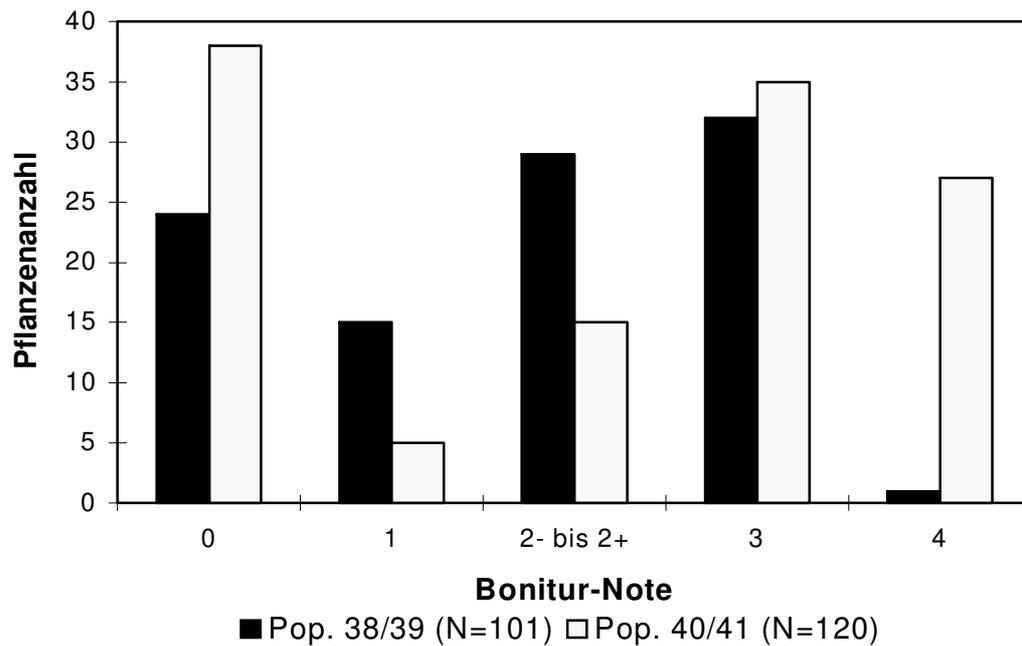


Abb. 3.10: Bonitur der Zwergrost-Resistenz für die Populationen 38/39 und 40/41.

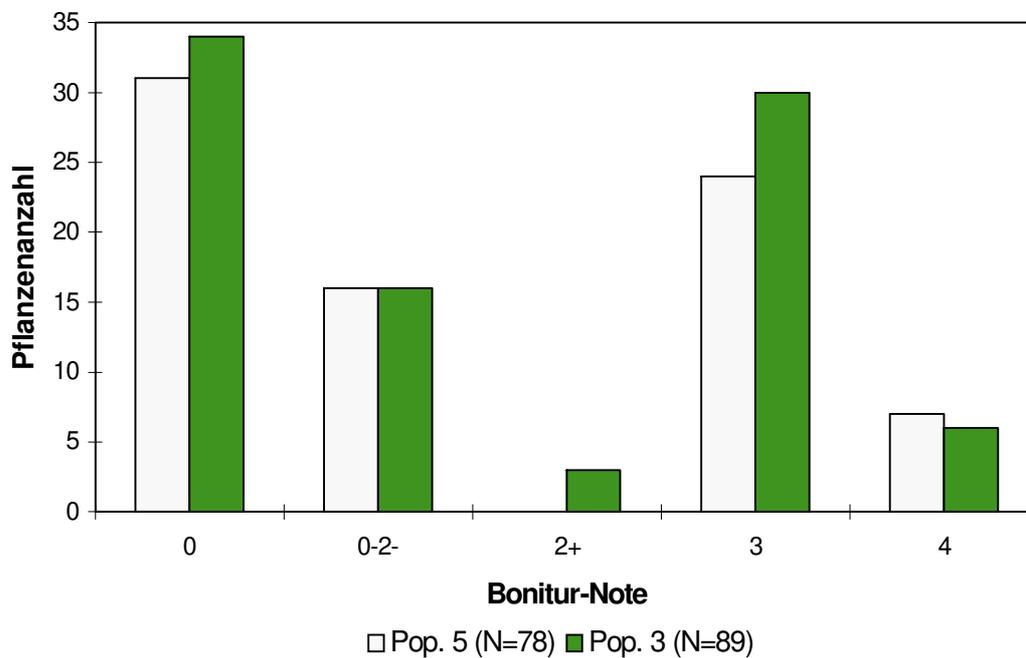


Abb. 3.11: Bonitur der Zwergrost-Resistenz für die Populationen 3 und 5.

Um Rückschlüsse auf die Vererbung der Resistenz zu ziehen, wurden die Pflanzen der Populationen 38/39 und 40/41 mit der Bonitur-Note 0 als resistent und solche mit der Bonitur-Note 1 bis 4 als anfällig eingestuft und mittels des  $\chi^2$ -Tests verschiedene Hypothesen überprüft.

Nur bei Annahme einer 3:1-Spaltung von anfälligen zu resistenten Pflanzen traten nicht signifikante Werte auf (Tab. 3.12). In diesen beiden Populationen kann daher von einer monogenen Vererbung der Resistenz ausgegangen werden, wobei die Resistenz von dem rezessiven Allel vermittelt wird.

In den Populationen 3 und 5 lassen sich bei Einstufung der Pflanzen mit der Bonitur-Note 0 als resistent die gefundenen Verhältnisse als 7:9-Spaltung (resistent zu anfällig) erklären. Diese Spaltung wird bei einer Vererbung der Resistenz durch zwei unabhängige rezessive Gene erwartet. Bei einer Klassifizierung der Pflanzen mit den Bonitur-Noten 0 und 0-2- als resistent bzw. 2+ bis 4 als anfällig ist hingegen eine Vererbung von 9:7 (resistent zu anfällig) am wahrscheinlichsten (Tab. 3.12). In diesem Fall würden zwei komplementär wirkende dominante Allele die Resistenz vermitteln, so daß resistente Pflanzen den Genotyp A.B. besitzen. Der Vergleich mit der Reaktion der resistenten Elternpflanzen läßt letztere Hypothese wahrscheinlicher erscheinen. Die Elternpflanzen wiesen, durch Trockenstreß verursacht, einzelne Pusteln auf und erhielten somit z. T. ebenfalls Bonitur-Noten von 0-2- (PROCHNOW, pers. Mitteilung).

**Tab. 3.12:** Aufspaltungsergebnisse der Populationen und  $\chi^2$ -Werte für verschiedene Hypothesen.

Population	Anzahl Pflanzen resistent : anfällig	$\chi^2$ -Wert für die Spaltung <sup>c</sup>			
		1:3 <sup>d</sup>	7:9 <sup>d</sup>	3:1 <sup>d</sup>	9:7 <sup>d</sup>
3 <sup>a</sup>	50 : 39	46,2**	5,6*	16,8**	<b>0,0</b>
3 <sup>b</sup>	34 : 55	8,3**	<b>1,1</b>	64,8**	11,8**
5 <sup>a</sup>	47 : 31	51,7**	8,6**	9,0**	<b>0,5</b>
5 <sup>b</sup>	31 : 47	9,0**	<b>0,5</b>	51,7**	8,6**
38/39 <sup>b</sup>	24 : 77	<b>0,1</b>	16,4**	-	43,3**
40/41 <sup>b</sup>	38 : 82	<b>2,8</b>	7,1**	-	29,5**

<sup>a</sup> Als resistent eingestuft wurden Pflanzen mit den Bonitur-Noten 0 und 0-2-.

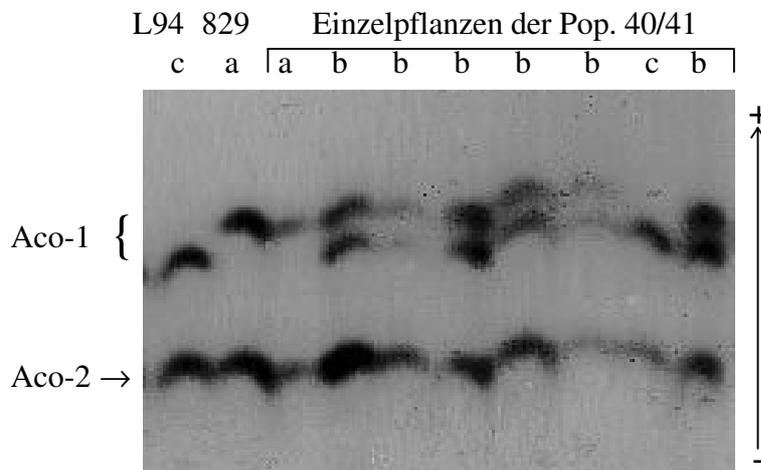
<sup>b</sup> Als resistent eingestuft wurden nur Pflanzen der Bonitur-Note 0

<sup>c</sup> \* signifikant für  $\alpha = 0,05$ ; \*\*signifikant für  $\alpha = 0,01$ ;  
nicht signifikante Werte sind fett gedruckt

<sup>d</sup> Spaltungsverhältnis resistent : anfällig

### 3.2.2 Isoenzym-Untersuchungen

Obwohl die F<sub>2</sub>-Nachkommenschaften 3, 5, 38/39 und 40/41 durch Kreuzungen zwischen *Hordeum vulgare* und *Hordeum spontaneum* entstanden sind, konnte in den 17 untersuchten Isoenzymssystemen ein Polymorphismus nur in der Population 40/41 bei der Aconitase festgestellt werden. Nach Anfärben der Stärkegele konnten zwei Aktivitätszonen unterschieden werden (Abb. 3.12). Die untere Bande entspricht dem Locus *Aco-2*, der keinen Polymorphismus aufwies. Am Locus *Aco-1* zeigte sich hingegen eine Aufspaltung, die mit jeweils einer Bande für die beiden homozygoten Klassen und zwei Banden für die heterozygote Klasse das für ein Monomer typische Muster zeigt.



**Abb. 3.12:** Zymogramm der Aconitase aus Pflanzen der Population 40/41, sowie der Elternlinien L94 und 829 mit den Genotypen *Aco-1-hom1* (a), *Aco-1-het* (b) und *Aco-1-hom2* (c).

Die Aufspaltung dieses Locus in der Population 40/41 ist in der Tab. 3.13 dargestellt und wies keine signifikante Abweichung von der erwarteten 1:2:1-Spaltung auf.

**Tab. 3.13:** Spaltungsergebnisse der Population 40/41 am Locus *Aco-1*.

<i>Aco-1</i>			$\chi^2$ -Wert
<i>hom1</i>	<i>het</i>	<i>hom2</i>	
24	35	19	1,46

### 3.2.3 Mikrosatelliten

25 verschiedene Mikrosatelliten-Primerpaare wurden zur Suche nach Polymorphismen zwischen den Elternlinien der Populationen 3, 5, 38/39 und 40/41 eingesetzt. Der Anteil an

polymorphen Markern lag dabei zwischen 36 - 52 % (Tab. 3.14) und somit höher als in der Population 361 mit 24 % (vergl. Kap. 3.1.4). Die Größe der amplifizierten Fragmente wich bis zu 60 bp (HVPRP1B) von der in der Literatur beschriebenen ab. Hierbei kann es sich jedoch auch um einen anderen Locus als den ursprünglich kartierten handeln, der durch Duplikation der Primeranlagerungssequenzen entstanden ist. Dieses könnte ebenso die Ursache für die Amplifikation mehrerer Fragmente bei Einsatz der Marker HVM26 und HVM2 sein. Bei dem Marker HVM2 entsteht der Polymorphismus, wie schon in der Population 361 beobachtet werden konnte, durch das Vorhandensein eines Nullallels.

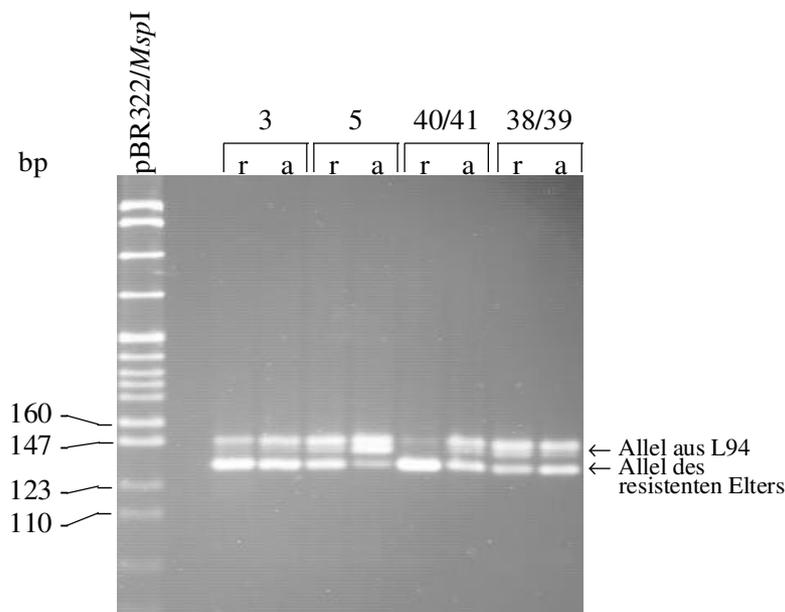
**Tab. 3.14:** Fragmentgröße der Amplifikationsprodukte durch Mikrosatelliten-Primer. Die Fragmente, die den Polymorphismus verursachen sind fett gedruckt.

Marker	Größe <sup>a</sup> [bp]	Fragmentgröße in Elternlinie [bp]				
		L94	632	684	803	829
HVACL1	150	<b>160</b>	<b>144</b>	<b>144</b>	160	160
HVBKASI	197	<b>198</b>	<b>183</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>186</b>
HVCMA	141	<b>141</b>	<b>133</b>	<b>133</b>	<b>133</b>	<b>133</b>
HVCSG	196	319/196	319/196	319/196	319/196	319/196
HVLEU	166	165	165	165	165	165
HVM2	201	190/140	190/ <b>166</b> /140	190/140	190/ <b>166</b> /140	190/ <b>166</b> /140
HVM20	151	<b>147</b>	147	<b>151</b>	<b>151</b> /147	<b>151</b>
HVM22	167	151	151	151	151	151
HVM23	246	238	238	238	238	238
HVM26	206	198/205/218	198/205/218	198/205/218	198/205/218	198/205/218
HVM27	192	194	194	194	194	194
HVM36	114	98	98	98	98	98
HVM40	160	<b>169</b>	169	<b>152</b>	<b>156</b>	<b>156</b>
HVM43	239	235	235	235	235	235
HVM44	114	114	114	114	114	114
HVM54	159	<b>167</b>	167	<b>156</b>	<b>149</b>	167
HVM60	115	<b>115</b>	<b>92</b>	<b>92</b>	115	<b>92</b>
HVM62	251	<b>244</b>	<b>246</b>	<b>246</b>	<b>236</b>	<b>242</b>
HVM67	116	<b>124</b>	<b>116</b>	<b>116</b>	124	124
HVM68	204	<b>200</b>	200	<b>225</b>	<b>209</b>	<b>195</b>
HVM70	154	150	150	150	150	150
HVPRP1B	167	<b>200/150</b>	200/190/153	<b>156/143</b>	<b>227/211</b>	150
HVRCABG	182	<b>177</b>	<b>146</b>	<b>158</b>	177	<b>164</b>
HVSIP1A	149	147	147	147	147	147
HVWAXYG	205	<b>209</b>	<b>220</b>	<b>220</b>	209*	<b>220</b>
% polymorph in F <sub>2</sub> -Population			36	52	40	40

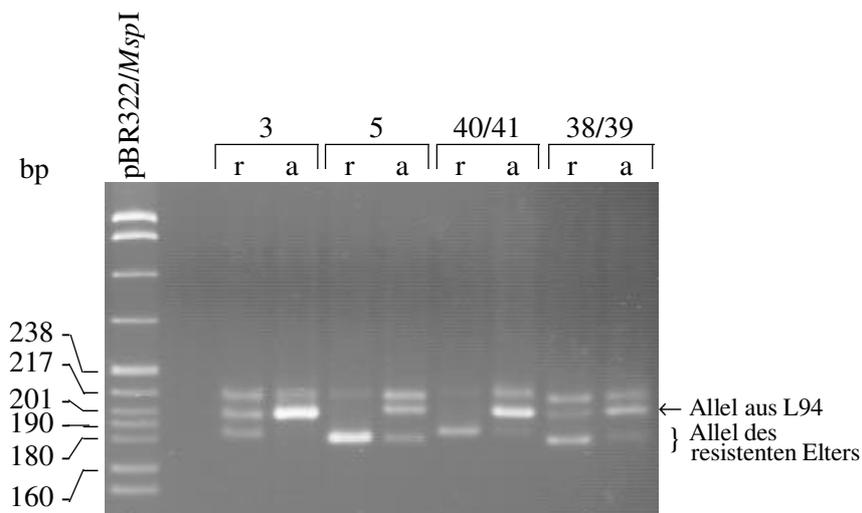
\* in der Population 38/39 werden ein 209 und 220 bp großes Fragment amplifiziert

<sup>a</sup> laut Angabe in der Referenz (s. Tab. 2.3)

Die gefundenen Polymorphismen wurden mit Hilfe der „bulked segregant“-Methode analysiert. Unterschiede zwischen den Bandenmustern wurden bei dem Marker HVCMA in den Populationen 40/41 und 5 beobachtet (Abb. 3.13). Zudem konnte ein Polymorphismus zwischen den Bulks der Populationen 40/41, 5 und 3 bei Amplifikation mit dem Primerpaar HVBKASI festgestellt werden (Abb. 3.14).



**Abb. 3.13:** Bandenmuster nach PCR mit dem Primerpaar HVCMA aus DNA-Bulks resistenter (r) bzw. anfälliger (a) Pflanzen der Populationen 3, 5, 40/41 und 38/39.



**Abb. 3.14:** Bandenmuster nach PCR mit dem Primerpaar HVBKASI aus DNA-Bulks resistenter (r) bzw. anfälliger (a) Pflanzen der Populationen 3, 5, 40/41 und 38/39.

Eine anschließende Analyse der Einzelpflanzen ergab die in Tab. 3.15 aufgeführten Spaltungsverhältnisse, wobei *hom2* die homozygote Klasse mit dem Allel des Elters 'L94' bezeichnet.

**Tab. 3.15:** Spaltungsergebnisse für die Mikrosatelliten-Marker HVCMA und HVBKASI.

Mikrosatelliten-Marker	Population	Genotyp	$\chi^2$ -Wert
		<i>hom1</i> : <i>het</i> : <i>hom2</i>	1:2:1-Spaltung
HVBKASI	3	15 : 22 : 12	0,88
	5	12 : 18 : 14	1,64
	38/39	10 : 31 : 10	2,37
	40/41	12 : 32 : 15	0,73
HVCMA	5	4 : 27 : 5	9,05**
	40/41	14 : 17 : 7	3,00

\*\*signifikant für  $\alpha = 0,01$

Bei dem Marker HVCMA trat eine signifikante Abweichung von der erwarteten 1:2:1-Spaltung auf. Da hier beide homozygoten Klassen unterbesetzt sind, kann keine Berechnung der Rekombinationsrate zu einem eventuell vorhandenen Letalfaktor erfolgen.

Die erhaltenen Spaltungsergebnisse wurden anschließend auf das Vorliegen einer Kopplung mit dem Resistenzgen untersucht (s. Kapitel 3.2.6).

### 3.2.4 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen

Zur Suche nach RFLPs wurden 33 Sonden und drei verschiedene Restriktionsenzyme eingesetzt. In der Population 40/41 konnten bei 25 Sonden, in der Nachkommenschaft 5 bei 26 Sonden polymorphe Bandenmuster festgestellt werden. 23 Sonden zeigten in der Population 3 bzw. 16 Sonden in der Population 38/39 einen Polymorphismus. Damit entspricht der Anteil polymorpher Sonden 53 - 84 % (Tab. 3.16). Bei 38 - 60 % der Sonden konnte der Polymorphismus mit mehr als einem Restriktionsenzym detektiert werden. Dieser Anteil liegt damit höher als in der Nachkommenschaft 361 (34 %). Durch Einsatz des Restriktionsenzym *EcoRI* konnten in den untersuchten Nachkommenschaften in 26 Fällen Unterschiede zwischen den Eltern detektiert werden, während *BamHI* und *XbaI* mit 30 und 36 Polymorphismen einen höheren Anteil hatten. Dies entspricht den Ergebnissen, die bei den RFLP-Analysen in der DH-Population 361 erhalten worden sind.

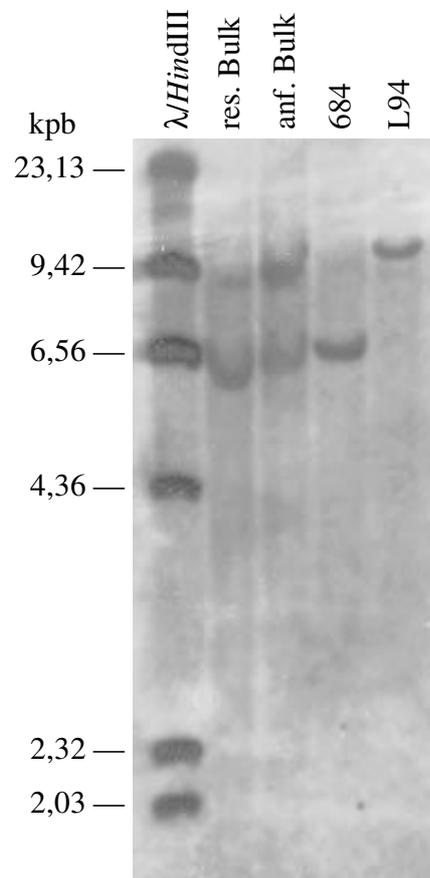
Sechs der gefundenen Marker wurden dominant vererbt.

**Tab. 3.16:** Polymorphe RFLP-Marker in den Populationen 3, 5, 38/39 und 40/41. Marker, für die eine „bulked segregant“-Analyse durchgeführt wurde, sind mit einem fettgedruckten 'ja' gekennzeichnet.

Sonde	Chr.	Population			
		3	5	38/39	40/41
cMWG706	1H	nein	ja	nein	n.b.
MWG506	1H	nein	nein	nein	nein
MWG518	1H	n.b.	n.b.	n.b.	ja
ABC162	2H	nein	nein	nein	nein
ABC256	2H	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>	ja
ABG002	2H	<b>ja</b>	ja	ja	ja
ABG014	2H	<b>ja</b>	ja	nein	ja
ABG358	2H	ja	nein	nein	ja
ABG602	2H	<b>ja</b>	ja	nein	ja
CDO0665	2H	ja	<b>ja</b>	nein	ja
cMWG720	2H	ja	nein	nein	n.b.
MWG082	2H	ja	ja	ja	ja
MWG520	2H	nein	nein	nein	nein
MWG865	2H	n.b.	n.b.	ja	n.b.
MWG878	2H	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>	ja
MWG950	2H	<b>ja</b>	<b>ja</b>	ja	ja
ABC167	2H, 7H	<b>ja</b>	ja	ja	ja
MWG010	3H	ja	ja	ja	ja
MWG041	3H	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>	ja
MWG546	3H	ja	<b>ja</b>	nein	nein
MWG584	3H	ja	ja	nein	ja
MWG011	4H	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>	ja
MWG042	4H	<b>ja</b>	<b>ja</b>	nein	ja
MWG058	4H	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>	ja
MWG611	4H	nein	ja	ja	ja
MWG063	5H	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>	ja
MWG502	5H	nein	ja	ja	nein
MWG596	5H	ja	ja	n.b.	ja
cMWG653	6H	nein	ja	nein	ja
MWG514	6H	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>	ja
ABG701	7H	nein	ja	nein	ja
MWG003	7H	ja	ja	ja	ja
MWG530	7H	<b>ja</b>	ja	n.b.	ja
% polymorph		74	84	53	83

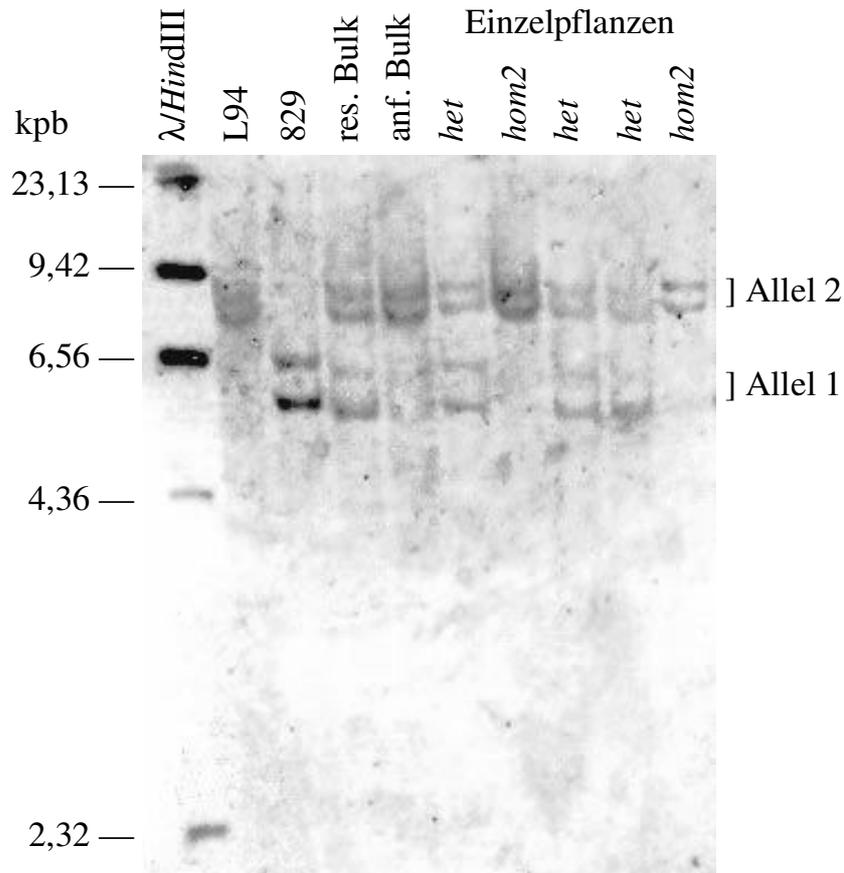
n.b. = wurde noch nicht mit allen drei Restriktionsenzymen auf Polymorphismen überprüft

Mit den ermittelten polymorphen Enzym/Sonden-Kombinationen wurde eine „bulked segregant“-Analyse durchgeführt (Tab. 3.16). Für die Populationen 38/39, 3 und 5 konnten keine Unterschiede in den Bulks festgestellt werden (als Bsp. s. Abb. 3.15).



**Abb. 3.15:** Bandenmuster nach Hybridisierung *Bam*HI restringierter DNA der Eltern (L94, 684) sowie der Bulks resistenter bzw. anfälliger Pflanzen der Population 5 mit der Sonde MWG950.

Wie in Kap. 3.2.3 bereits erwähnt, ergab sich durch die „bulked segregant“-Analyse mit Mikrosatelliten-Markern ein Hinweis auf Kopplung des in der Population 40/41 vorhandenen Resistenzgens mit dem Marker HVBKASI, welcher durch Analyse der Einzelpflanzen bestätigt werden konnte (s. Kap. 3.2.6). Da HVBKASI auf dem Chromosom 2H kartiert ist, wurden die Einzelpflanzen der Population 40/41 mit RFLP-Sonden untersucht, die auf dem Chromosom 2H lokalisiert sind und einen Polymorphismus aufwiesen. Als Beispiel ist in Abb. 3.16 das Bandenmuster nach Hybridisierung mit der Sonde ABG014 dargestellt. Obwohl eine Kopplung dieses RFLP-Markers mit dem Resistenzgen besteht, konnten in diesem Fall keine Unterschiede zwischen dem Bandenmuster der anfälligen und resistenten Bulks festgestellt werden.



**Abb. 3.16:** Bandenmuster nach Hybridisierung *Bam*HI restringierter DNA der Population 40/41 mit der Sonde ABG014.

Die Spaltungsergebnisse der untersuchten RFLP-Marker sind in Tab. 3.17 dargestellt, wobei *hom2* die homozygote Klasse mit dem Allel des anfälligen Elters ‘L94’ bezeichnet.

**Tab. 3.17:** Spaltungsergebnisse der RFLP-Marker in der Population 40/41.

Sonde	Restriktionsenzym	Genotyp			$\chi^2$ -Wert
		<i>hom1</i>	<i>het</i>	<i>hom2</i>	
ABG002	<i>Bam</i> HI	6	33	7	8,74*
ABG014	<i>Bam</i> HI	11	21	13	0,38
ABC256	<i>Xba</i> I	9	22	13	0,72
ABG602	<i>Xba</i> I	8	20	16	3,27
MWG878	<i>Eco</i> RI	11	18	16	2,87
MWG082	<i>Xba</i> I	12	22	9	0,44
ABG358	<i>Bam</i> HI	6	23	11	2,15
		<b>A . : aa</b>			<b>3:1-Spaltung</b>
CDO665	<i>Bam</i> HI	27	14		1,83

\*signifikant bei  $\alpha = 0,05$

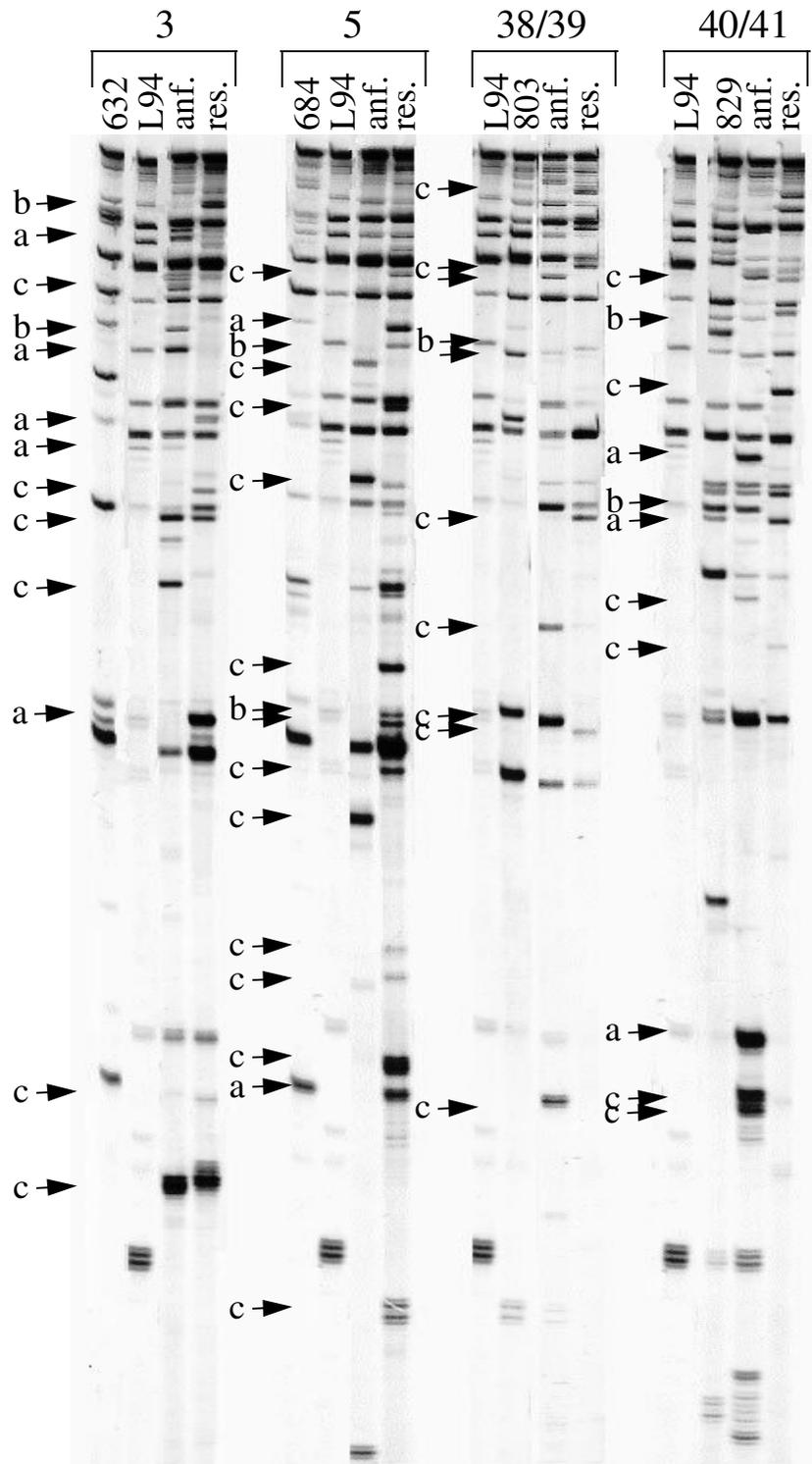
Eine gestörte Spaltung tritt bei dem Marker ABG002 auf, wobei beide homozygoten Klassen unterbesetzt sind. Bei einer Zerlegung des  $\chi^2$ -Wertes ist  $\chi^2_2$  mit 8,7 signifikant, während  $\chi^2_3$  mit 0,04 unterhalb der Signifikanzgrenze liegt. Damit läßt sich keine eindeutige Zuordnung zur Gameten- oder Zygotenselektion treffen und somit auch der Rekombinationswert mit einem möglichen Letalfaktor nicht berechnen.

### 3.2.5 ISTR-Untersuchungen

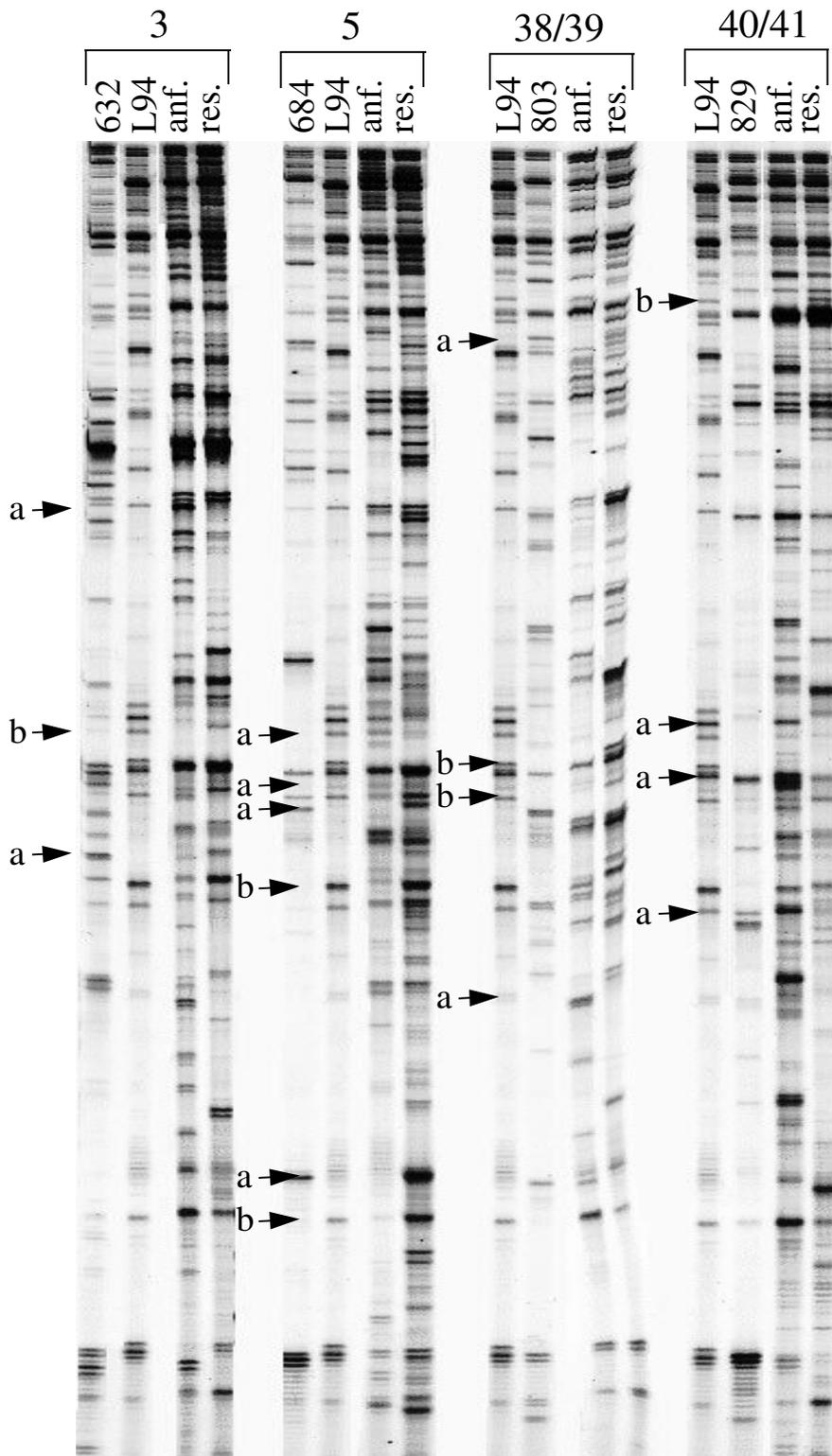
Die DNA-Bulks resistenter und anfälliger Pflanzen wurden mit zwei verschiedenen Primerkombinationen (B4/F3 und B2A/F6A) untersucht. Die Anzahl der Banden pro Reaktionsansatz lag für die Primerkombination B4/F3 zwischen 10 und 40, für B2A/F6A zwischen 25 und 70 (Abb. 3.17 und Abb. 3.18). Zwischen den Eltern der F<sub>2</sub>-Populationen sind 50 -76 % der Banden polymorph. Der Anteil der Banden, die Polymorphismen zwischen den beiden Bulks aufwiesen, war mit 47 - 60 % sehr hoch (Tab. 3.18). Viele dieser Banden haben jedoch kein entsprechendes Fragment im Bandenmuster der Elternlinien. In der Abb. 3.17 sind diese zur Verdeutlichung gekennzeichnet. Desweiteren gibt es polymorphe Banden im anfälligen Bulk, die nur im resistenten Elter amplifiziert werden bzw. Banden im resistenten Bulk, bei denen ein Fragment gleicher Größe nur im anfälligen Elter erscheint (s. Abb. 3.17 und Abb. 3.18). Für jede der Populationen konnten jedoch zwei bis fünf Banden identifiziert werden, die einen Unterschied zwischen den Bulks aufwiesen und bei denen ein entsprechendes Fragment auch in der passenden Elternlinie amplifiziert wurde.

**Tab. 3.18:** Anzahl polymorpher Banden zwischen anfälligen und resistenten DNA-Bulks bei der ISTR-Analyse mit zwei verschiedenen Primerpaaren.

Popu- lation	Primer	Anzahl Banden in den DNA-Bulks	Polymorphe Banden zwischen den Bulks	Polymorphismen mit entsprechenden Fragmenten in den Elternlinien
3	B4/F3	27	14 (52 %)	5
	B2A/F6A	71	34 (48 %)	2
5	B4/F3	38	23 (61 %)	2
	B2A/F6A	80	41 (51 %)	4
38/39	B4/F3	24	12 (50 %)	0
	B2A/F6A	58	27 (47 %)	2
40/41	B4/F3	35	21 (60 %)	3
	B2A/F6A	64	31 (48 %)	3



**Abb. 3.17:** Bandenmuster der ISTR-Analyse mit den Primern B4/F3 von Bulks resistenter (res.) und anfälliger (anf.) Pflanzen und den Elternpflanzen der für Zwergrost-Resistenz spaltenden Populationen. Polymorphe Banden, die in den anfälligen Bulks/Eltern bzw. resistenten Bulks/Eltern auftreten sind mit 'a' gekennzeichnet, solche die nicht in den übereinstimmenden Bulks/Eltern erscheinen mit 'b', und in den Bulks neu auftretende Banden mit 'c'.



**Abb. 3.18:** Bandenmuster der ISTR-Analyse mit den Primern B2A/F6A von Bulks resistenter (res.) und anfälliger (anf.) Pflanzen und den Elternpflanzen der für Zwergrost-Resistenz spaltenden Populationen. Polymorphe Banden, die in den anfälligen Bulks/Eltern bzw. resistenten Bulks/Eltern auftreten sind mit 'a' gekennzeichnet, solche, die nicht in den übereinstimmenden Bulks/Eltern erscheinen, mit 'b'.

### 3.2.6 Kopplungsanalysen

Der bei der „bulked segregant“-Analyse erhaltene Hinweis auf Kopplung zwischen dem Mikrosatelliten-Marker HVCMA und den Resistenzgenen der Populationen 5 und 40/41 hat sich bei Analyse der Einzelpflanzen nicht bestätigen können. Die gefundenen Spaltungsverhältnisse sind in Tab. C.1 im Anhang aufgeführt. Die Genotypen für die Pflanzen der Population 40/41 bezüglich aller untersuchten Marker sind in Tab. B.3 angegeben. Bei der Überprüfung der Unabhängigkeit der Randsummen traten signifikant abweichende  $\chi^2$ -Werte bei den Markern HVBKASI, ABC256, ABG602 und ABG014 in dieser Population auf. Die Rekombinationsraten mit dem Zwergrost-Resistenzgen lagen zwischen  $0,17 \pm 0,05$  und  $0,28 \pm 0,08$  (Tab. 3.19).

**Tab. 3.19:**  $\chi^2$ -Werte bei Prüfung auf Kopplung der Loci mit dem Resistenzgen in der Population 40/41 und geschätzte Rekombinationswerte (r) mit Standardfehler (SF).

Locus	FG <sup>a</sup>	$\chi^2$ -Wert <sup>b</sup>	r	SF
ABC256	2	13,98**	0,18	0,06
ABG014	2	8,96*	0,28	0,08
ABG602	2	8,79*	0,22	0,07
HVBKASI	2	22,07**	0,17	0,05

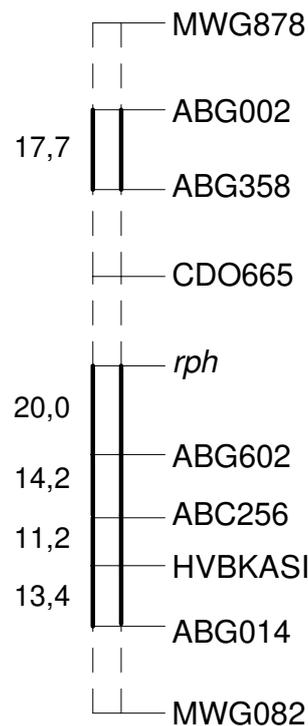
<sup>a</sup> Freiheitsgrade

<sup>b</sup> \* signifikant bei  $\alpha = 0,05$

\*\* signifikant bei  $\alpha = 0,01$

Die auf dem Chromosom 2H lokalisierten Marker wurden mit dem Programm MAPMAKER/EXP 3.0 (LANDER et al. 1987) verrechnet und die wahrscheinlichste Anordnung der Marker bestimmt. Die molekularen Marker, die nach der Berechnung als ungekoppelt eingestuft wurden, wurden entsprechend der aus der Literatur bekannten Lage integriert. Eine Karte des Bereichs mit dem Resistenzlocus, in der die Austauschwerte in cM angegeben sind, ist in Abb. 3.19 dargestellt. Der Resistenzlocus liegt demnach 20 cM von dem RFLP-Marker ABG602 entfernt. Alle mit dem Resistenzgen gekoppelten Marker sind an einer Seite kartiert worden, so daß keine Klammer um den Locus gebildet wird.

Um zu überprüfen, ob das Resistenzgen in den anderen Populationen am gleichen Locus vorliegt, wurden die Einzelpflanzen aller Populationen mit dem Marker HVBKASI analysiert. Die erhaltenen Spaltungsergebnisse sind in Tab. 3.20 aufgeführt.



**Abb. 3.19:** Genetische Karte des Chromosoms 2H im Bereich des Resistenzgens (*rph*). Die Austauschwerte sind in cM angegeben. Benachbarte Marker, die einen LOD-Wert von weniger als 3,0 besitzen, sind mit gestrichelten Linien verbunden.

**Tab. 3.20:** Spaltungsergebnisse und  $\chi^2$ -Werte zur Überprüfung auf Kopplung für den Marker HVBKASI.

Pop.	Genotyp <sup>a</sup>						FG <sup>b</sup>	$\chi^2$ -Wert <sup>c</sup>
	resistent			anfällig				
	<i>hom1</i>	<i>het</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>het</i>	<i>hom2</i>		
3	11	12	3	4	10	9	2	6,29*
5	7	11	6	5	7	8	2	1,15
38/39	4	5	2	6	26	8	2	2,56

<sup>a</sup> *hom1* bezeichnet die Homozygotenklasse mit dem Allel des resistenten Elters

<sup>b</sup> Freiheitsgrade

<sup>c</sup> \* signifikant bei  $\alpha = 0,05$

Der Marker zeigte in keiner der Populationen eine Abweichung von der erwarteten 1:2:1-Spaltung.

In der Population 3 weist der  $\chi^2$ -Wert auf eine Kopplung zwischen dem Marker und einem der beiden komplementär wirkenden Resistenzgene hin. Eine Berechnung nach der in Kap. 2.10 beschriebenen Formel ergibt einen Rekombinationswert von  $0,22 \pm 0,10$ . Die Populationen 5 und 38/39 zeigten keine signifikanten Abweichungen, so daß hier andere Resistenzloci vorliegen müssen.

# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Marker-Untersuchungen

#### 4.1.1 Isoenzyme

In allen untersuchten Populationen waren die Isoenzyme überwiegend monomorph. Ähnliche Ergebnisse bei *Hordeum vulgare* wurden von LEGOUIS et al. (1995) berichtet. Bei der Analyse von 15 verschiedenen Isoenzym-Systemen in 19 F<sub>2</sub>-Populationen stellten sie nur bei der Aconitase, Esterase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase Polymorphismen fest. BROWN (1983) untersuchte mit Isoenzymen verschiedene Gerstensorten und bestimmte deren Diversitätsindex (D<sub>l</sub>). Er kann als eine Maßzahl für die Variation von Markern verwendet werden und wird nach folgender Formel berechnet (NEI 1973):

$$D_l = 1 - \sum_{i=1}^k p_{li}^2$$

Dabei bezeichnet  $p_{li}$  die Frequenz des  $i$ -ten Allels am Locus  $l$  in der untersuchten Stichprobe.

In dem von BROWN (1983) untersuchten Pflanzenmaterial lag der Diversitätsindex zwischen 0 und 0,61. Die höchste Anzahl an Allelen konnte dabei für die Esterase und die Aconitase beobachtet werden, welche auch in dem in dieser Arbeit untersuchten Pflanzenmaterial neben der GOT polymorph waren. Obwohl in der vorliegenden Arbeit in den F<sub>2</sub>-Populationen, die aus der Kreuzung zwischen *H. vulgare* und *H. spontaneum* stammen, nur in einem Fall ein Polymorphismus festgestellt wurde, ist die Diversität bei der Wildform der Gerste für Isoenzyme in der Regel höher. BROWN (1983) ermittelte für *H. spontaneum* bei der Esterase einen Diversitätsindex von 0,86. Auch die Saure Phosphatase und die NADH-Dehydrogenase wiesen mit 0,72 und 0,54 höhere Indizes als in kultivierten Sorten auf.

Isoenzymmarker konnten erfolgreich in molekulare Karten der Gerste integriert werden (z. B. KLEINHOFS et al. 1993). Die Vorteile von Isoenzymen liegen in der einfachen und schnellen

Analysemethode und der meist kodominanten Vererbung. Allerdings ist die Anzahl der Loci begrenzt und die Enzyme werden z. T. nur gewebespezifisch exprimiert (WEBER und WRICKE 1994). Dennoch konnten bereits Resistenzgene der Gerste (FEUERSTEIN et al. 1990, LEGOUIS et al. 1995) und andere wirtschaftlich interessante Gene wie z. B. ein Restorerogen des Roggens (WRICKE et al. 1993) mit Hilfe von Isoenzymmarkern kartiert werden. Infolgedessen wird diese Technik auch erfolgreich in den Zuchtbetrieben eingesetzt.

#### 4.1.2 RFLP-Analysen

In dieser Arbeit wurden die RFLP-Analysen mit Hilfe des am CIMMYT, Mexico, für Untersuchungen an Weizen und Mais entwickelten Protokolls für nicht-radioaktive Hybridisierung und Detektion mit Hilfe der Chemilumineszenz durchgeführt. Dieses Protokoll konnte auch bei Roggen erfolgreich eingesetzt werden (LOARCE et al. 1996). Das DIG-System der Fa. Boehringer besitzt eine geringere Sensitivität als radioaktive Nachweismethoden. Dies läßt sich jedoch durch eine effektive Markierung der Sonde mittels PCR anstelle des sonst üblichen „Random primed labeling“ und einer Exposition über Nacht im Gegensatz zu den vom Hersteller empfohlenen zwei Stunden ausgleichen. Die Vorteile dieser Methode im Vergleich zur radioaktiven Markierung bestehen neben dem Wegfall der Notwendigkeit eines Isotopenlabors auch in der wesentlich kürzeren Expositionszeit, die bei radioaktiven Verfahren z. T. eine Woche dauert. Ebenso ist es möglich, die markierten Sonden bis zu einem Jahr zu lagern und mehrfach wiederzuverwenden. Nachteilig wirkt sich der erhöhte DNA-Verbrauch durch die häufigere Herstellung von Filtern aus, da die Verwendung nichtgeladener Membran für den Transfer und die geringere Sensitivität eine wiederholte Hybridisierung der Filter von vier- bis fünfmal erlaubt. Für den radioaktiven Nachweis können die Filter hingegen bis zu zehnmal wiederverwendet werden (WESTPHAL, pers. Mitteilung).

Der Einsatz von bereits kartierten Sonden führte zu sehr hohen Polymorphiegraden sowohl in der intraspezifischen Kreuzung 361 (32 %) als auch in den Kreuzungen zwischen *H. vulgare* und *H. spontaneum* (53 % bis 84 %). Die Ergebnisse sind vergleichbar mit dem von GRANER et al. (1991) beobachteten Anteil polymorpher RFLP-Marker, der bei Verwendung von sechs bzw. fünf verschiedenen Enzymen in einer DH-Population der Kreuzung ‘Igri’ x ‘Franka’ 26 % und in der Kreuzung ‘Vada’ x *H. spontaneum* 76 % betrug. Bei Kreuzungen zwischen Kulturgerstensorten werden zumeist zwischen 12 und 32 % beobachtet, während in Kreuzungen zwischen *H. vulgare* und *H. spontaneum* bis zu 42 % der Sonden polymorph

vorlagen (LAURIE et al. 1992). Dies liegt im allgemeinen in der größeren genetischen Diversität der Wildformen und der genetischen Distanz zwischen den Elternpflanzen begründet. Untersuchungen an 28 Kulturgerstensorten mit cDNA-Klonen zeigten, daß der Diversitätsindex je nach Sonde zwischen 0,07 und 0,98 variieren kann (DAHLEEN 1997).

Das Genom der Gerste besitzt eine Größe von  $5,3 \times 10^9$  bp (BENNETT und SMITH 1991) und besteht aus 7 Chromosomen ( $2n = 14$ ). Durch die Erstellung von RFLP-Karten der Gerste von mehreren Arbeitsgruppen ist das Gerstengenom mit Markern gut abgedeckt. Die Karten umfassen eine Länge von 1096 bis 1433 cM und bestehen aus 157 bis 500 Markern (GRANER et al. 1991, HEUN et al. 1991, KLEINHOFs et al. 1993, KASHA und KLEINHOFs 1994). Durch gemeinsame Marker konnte eine integrative Karte mit 898 Markern, die 1060 cM umfaßt und in der nur noch 10 Bereiche mit Abständen über 10 cM zwischen zwei Markern verbleiben, erstellt werden (QI et al. 1996). Somit steht für jede Genomregion eine ausreichende Anzahl an RFLP-Markern zur Verfügung, um einen gekoppelten Marker für wirtschaftlich interessante Gene zu finden.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen zeigten in der DH-Population 3 Marker eine gestörte Spaltung, was einem prozentualen Anteil von 21 % entspricht. Der bei Gerste gefundene Anteil gestörter RFLP-Marker liegt im Bereich von 10 -14 % (HEUN et al. 1991, KLEINHOFs et al. 1993). In der von GRANER et al. (1991) analysierten DH-Population lag der Anteil gestörter Spaltungen mit 44 % sehr hoch. Als Grund wird von den Autoren eine unterschiedliche *in vitro*-Kultureignung der Kreuzungseltern angeführt. Bei der Regeneration der DH-Pflanzen haben Genotypen mit besserer *in vitro*-Eignung einen Selektionsvorteil, und unter dieser Annahme wären die Allele des Elters mit schlechterer *in vitro*-Kultureignung in der DH-Population unterrepräsentiert. Die Marker MWG63a und MWG595, bei denen in der vorliegenden Untersuchung eine gestörte Spaltung auftrat, liegen in den Bereichen, in denen auch GRANER et al. (1991) eine abweichende Spaltung fanden. Ob auch hier ein Zusammenhang mit der *in vitro*-Eignung besteht, könnte durch eine Analyse der Häufigkeit der elterlichen Allele erfolgen. Dies konnte jedoch nicht durchgeführt werden, da die Elternlinien nicht mehr zur Verfügung standen. In der Population 40/41, wurde eine abweichende Spaltung für den Marker ABG002 festgestellt. Hier kam es zu einer Unterbesetzung der beiden homozygoten Klassen, so daß eine Berechnung zu einem evtl. vorhandenen Letalfaktor nicht möglich ist. Das Vorliegen einer gestörten Einzelspaltung hat jedoch keinen Einfluß auf die Schätzung der Rekombinationswerte zwischen Markerpaaren, sofern eine Rückkreuzungs-

bzw. DH-Population analysiert oder in einer F<sub>2</sub>-Population zumindest einer der Marker kodominant vererbt wird (WEBER und WRICKE 1994).

### 4.1.3 Mikrosatelliten

Mikrosatelliten-Marker sind durch ihre PCR-gestützte Technik sehr einfach und schnell zu analysieren. In der Literatur ist schon eine ausreichende Anzahl von Mikrosatelliten-Primern beschrieben, die zur gleichmäßigen Abdeckung des Genoms der Gerste ausreichen (SAGHAI-MAROOF et al. 1994, BECKER und HEUN 1995, LIU et al. 1996). Zudem ist es denkbar, auch Mikrosatelliten-Primer, die für Reis (PANAUD et al. 1996, CHEN et al. 1997), Weizen (BRYAN et al. 1997, RÖDER et al. 1995) oder Roggen (SAAL 1997) entwickelt worden sind, bei der Gerste einzusetzen. Hierbei muß gleichwohl bedacht werden, daß die Anzahl der Marker, die homöologe Loci in verwandten Arten nachweisen, begrenzt ist. So konnte GROBEN (1997) zeigen, daß eine Übertragbarkeit von Mikrosatelliten-Markern innerhalb der Gattung *Beta* möglich, hingegen zwischen den Gattungen der Chenopodiaceae sehr problematisch ist.

Mikrosatelliten zeigen eine hohe Diversität, so daß ihr Einsatz gerade bei Kreuzungen zwischen eng verwandten Kultursorten sinnvoll ist. SAGHAI-MAROOF et al. (1994) beobachteten bei der Analyse von 207 Gersten-Accessionen mit Mikrosatelliten-Markern zwei Marker, die mit 28 bzw. 37 Allelen die bisher größte Anzahl von Allelen in diesem Sortiment für einen Locus aufwiesen. Bei zwei weiteren Mikrosatelliten-Markern konnten im gleichen Sortiment jedoch nur drei verschiedene Allele gefunden werden. Die in den eigenen Untersuchungen gefundenen Polymorphiegrade liegen mit 24 % für die Population 361 bzw. 36 - 52 % in den für Zwergrost-Resistenz spaltenden Populationen niedriger als die für die RFLP-Marker gefundenen Werte. Als Ursache dafür wäre denkbar, daß durch die Verwendung von Metaphor-Agarosegelen als Auftrennungssystem geringe Größenunterschiede zwischen den Allelen nicht sichtbar werden. Durch Analyse einer Auswahl von Markern auf einem Polyacrylamidgel konnten jedoch keine neuen Allele gefunden werden, so daß dieser methodische Grund weitgehend ausgeschlossen werden kann. LIU et al. (1996) ermittelten bei Überprüfung von 45 Mikrosatelliten-Markern in vier verschiedenen DH-Kartierungspopulationen, daß 38 - 62 % der Marker polymorph waren. Die mit RFLPs erhaltenen Polymorphismen lagen in den gleichen Populationen mit 28 - 56 % anders als in den eigenen Untersuchungen etwas darunter. Hier konnte jedoch bestätigt werden, daß in interspezifischen Kreuzungen die Diversität wesentlich höher als in intraspezifischen Kreuzungen ist.

Die untersuchten Mikrosatelliten-Marker zeigten keine Abweichungen von den erwarteten Spaltungsverhältnissen. Der von LIU et al. (1996) beobachtete Anteil an gestört spaltenden Mikrosatelliten-Markern in einer DH-Population lag bei 7,5 % und ist damit niedriger als der mit 14 % bestimmte Anteil gestört segregierender RFLP-Marker in der gleichen Population (KLEINHOFS et al. 1993). Hierbei ist jedoch zu bedenken, daß nur halb so viele Mikrosatelliten- wie RFLP-Marker untersucht wurden, so daß die Abdeckung des Genoms nicht gleichzusetzen ist.

Für HVM2 wurden in allen untersuchten Populationen mehrere Banden amplifiziert und ein Nullallel als Ursache des Polymorphismus beobachtet. Ebenfalls mit Nullallelen spaltende Mikrosatelliten wurden auch von SAAL (1997) beim Roggen festgestellt. In diesen Fällen beruht der Polymorphismus offenbar nicht mehr auf einer Variation in der Anzahl der Motiv-Wiederholungen, sondern in einer Deletion im Bereich einer Anlagerungsstelle. Insofern könnten diese Marker auch als „Sequence tagged sites“ (STS) bezeichnet werden. LIU et al. (1996) beobachteten bei diesem Markerpaar zwei Banden und konnte diese auf 2 verschiedene Loci auf Chromosom 7H und 5H zurückführen.

Die Größenbestimmung der Mikrosatelliten-Fragmente erfolgte durch Vergleich mit dem Größenmarker pBR322/*MspI* nach Elektrophorese im Metaphorgel. Bei einigen Markern wurde die Größe zusätzlich durch Auftrennung in einem Polyacrylamidgel bestimmt. Die so erhaltenen Fragmentgrößen wichen bis zu 6 bp von den zuvor bestimmten ab. Jedoch kann eine endgültige Aussage über die Fragmentgröße nur über eine Sequenzierung oder den Vergleich mit einer entsprechenden Allel-Leiter erfolgen. Somit kann bei einer geringen Abweichung der Fragmentgröße von der in der Literatur beschriebenen nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, daß es sich hierbei auch um ein anderes Allel handelt.

#### 4.1.4 ISTR-Marker

Die ISTR-Technik ist eine neue Markertechnik, die bisher hauptsächlich zur Analyse von phylogenetischen Beziehungen eingesetzt wurde. So erhielten SENSI et al. (1996) bei Untersuchungen an *Vitis vinifera* (L.) mit AFLP- und ISTR-Markertechniken vergleichbare Dendrogramme. Erste Versuche zum Einsatz dieser Markertechnik für die Kartierung von Genomen wurden an Gerste und *Cocos nucifera* (L.) durchgeführt (BECKER und ROHDE 1998). Die bei verschiedenen Pflanzenarten beobachtete Anzahl amplifizierter Banden pro Reaktion liegt zwischen 20 und 100, was vergleichbar mit der AFLP-Technik ist. Bei der Analyse von 34 *H. vulgare*- und 31 *H. spontaneum*-Herkünften wurden 79 polymorphe

Banden mit zwei Primerkombinationen gefunden (ROHDE 1996). SENSI et al. (1996) stellten in ihren Untersuchungen fest, daß 50 - 83 % der Banden polymorph waren. Dieser Anteil war damit etwas höher als bei den am gleichen Material durchgeführten Analysen mit AFLP-Markern (32 - 77 %). Dementsprechend wird bei der ISTR-Technologie der Vorteil einer Multiplex-Analyse mit einem hohen Polymorphiegrad verbunden. Zudem ist der methodische Aufwand gering, da die PCR-Ansätze direkt aufgetragen werden können. Anders als bei der AFLP-Technik entfallen somit vorhergehende Restriktions- und Ligationsschritte.

Bei den hier durchgeführten Versuchen an spaltenden Populationen konnte ebenfalls ein hoher Anteil polymorpher Banden festgestellt werden (50 - 84 %). Die Analyse der Spaltungsergebnisse zeigte jedoch, daß einige polymorphe Fragmente eine starke Abweichung von der erwarteten 1:1-Aufspaltung in der DH-Population aufwiesen. Desweiteren gab es eine große Anzahl von Banden, die nur in einzelnen Pflanzen amplifiziert wurden bzw. nur in einzelnen Pflanzen fehlten. Durch Wiederholung der Analysen müßte herausgefunden werden, ob es sich dabei um Artefakte handelt oder ob sie, falls diese Banden reproduzierbar sind, auf einzelne Mutationsereignisse zurückzuführen sind. Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte Kopplung zwischen ISTR-Markern und dem Merkmal Zeiligkeit zeigt, daß mit dieser Methode codierende Sequenzen markiert werden können und somit auch wirtschaftlich wichtige Gene.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der „bulked segregant“-Analyse der für Zwergrost-Resistenz spaltenden Populationen festgestellt. Einige Banden in den Bulks hatten kein entsprechendes Fragment im Bandenmuster der Elternpflanzen. Da die DNA jedoch nur von der gleichen Elternlinie und nicht von der Original-Elternpflanze stammt, ist es möglich, daß diese Unterschiede die Variabilität innerhalb der Elternlinie widerspiegeln. Eine Untersuchung einer Stichprobe aus der gleichen Linie könnte Aufschluß über die Homogenität innerhalb einer Sorte bzw. Varietät geben. Bei Untersuchungen der DNA von Tierfamilien (Schafen, Rindern) und Familien von Menschen konnte auch ROHDE (1996) Banden in den Nachkommen feststellen, die in dem elterlichen Bandenmuster nicht vorhanden waren. Durch weitere Erfahrungen mit dieser neuen Markertechnologie sollte geklärt werden, wie hoch der Anteil dieser neuen Banden ist und inwiefern sich solche gestört spaltenden Loci in eine Karte integrieren lassen. Desweiteren muß überprüft werden, ob eine gleichmäßige Verteilung der ISTR-Marker vorliegt oder eine Clusterung beobachtet werden kann. *In situ*-Untersuchungen mit *Ty1-copia*-ähnlichen Sequenzen zeigen, daß diese Elemente über das gesamte Euchromatin verteilt sind (PEARCE et al. 1996a, 1996b). Bei *Allium cepa* konnte eine Anreicherung in terminalen heterochromatischen Regionen beobachtet werden, während in *Vicia faba* eher eine

seltenere Anzahl in heterochromatischen Bereichen festgestellt wurde. Entsprechende Untersuchungen bei Gerste ergaben, daß im Genom ca.  $3 \times 10^4$  Kopien vorliegen, die mit Ausnahme paracentromerer Regionen, den Telomeren und Nukleolus organisierenden Regionen (NOR) gleichmäßig auf alle Chromosomen verteilt sind (SUONIEMI et al. 1996, HESLOP-HARRISON et al. 1997). Interessanterweise konzentrieren sich die *Ty1-copia* ähnlichen Retrotransposons bei dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* im Gegensatz zu anderen Pflanzenspezies auf centromere Regionen, sind aber auch über das Chromosom verteilt zu finden. Die gleichmäßige Verteilung über das Genom ist Voraussetzung für die Nutzung dieser Technik zur Kartierung der Genome. Ferner konnten Untersuchungen zeigen, daß die Retrotransposons bzw. Teilsequenzen der Transposons in der Nähe von exprimierten Genen zu finden sind (WHITE et al. 1994). Somit wäre es auch möglich, mit wirtschaftlich interessanten Genen eng gekoppelte ISTR-Marker zu finden. Die hier gefundenen Unterschiede in den anfälligen und resistenten Bulks müßten noch durch Untersuchungen an den Einzelpflanzen verifiziert werden. Ein so gefundener eng gekoppelter ISTR-Marker sollte zum Einsatz in der Züchtung gleichwohl in einen spezifischen Marker umgewandelt werden, da trotz der Möglichkeit des nicht-radioaktiven Nachweises der Fragmente durch Markierung mit dem DIG- oder Biotin-Molekül (ROHDE 1996) die Auswertung der Gele im praktischen Zuchtbetrieb vermutlich zu zeitaufwendig ist.

#### 4.1.5 Vergleich verschiedener Markertechniken

Bei einem Vergleich der Markertechniken muß zum einen berücksichtigt werden, wieviele Banden pro Reaktion erhalten werden („Multiplex-Ratio“) und wie groß der Grad an Heterozygotie für die betrachtete Markerklasse ist (Diversitätsindex). VOGEL et al. (1996) haben zur Bewertung eines Markers den Markerindex als Produkt aus Multiplex-Ratio und Diversitätsindex eingeführt, der somit diese beiden Aspekte mit einbezieht. Bei Untersuchungen an der Sojabohne zeigten AFLPs den höchsten Markerindex, was vor allem auf die hohe Multiplex-Ratio zurückzuführen ist. Gefolgt werden die AFLPs von den Mikrosatelliten, die sich durch einen hohen Heterozygotiegrad auszeichnen. Den niedrigsten Markerindex erhielten die RFLPs, was hauptsächlich in der geringen Multiplex-Ratio begründet ist. Bei Vergleich zwischen diesen Markertechniken unter 18 Kultursorten der Gerste fanden RUSSELL et al. (1997) ähnliche Ergebnisse. Obwohl nur 46 % der durch AFLPs generierten Fragmente polymorph sind, hat diese Technik durch die hohe Anzahl an Banden pro Reaktionsansatz und den hohen Diversitätsindex den weitaus größten Markerindex.

Gefolgt werden die AFLPs von den Mikrosatelliten, den RAPDs und den RFLPs mit dem niedrigsten Markerindex. Der Polymorphiegrad der Mikrosatelliten war am höchsten, da für alle Marker unterschiedliche Allele gefunden wurden, und auch die RFLPs zeigten mit 83,2 % einen sehr hohen Grad an Polymorphismen. Jedoch wurden schon kartierte RFLP-Sonden verwendet und in früheren Studien sind in einer ähnlichen Auswahl an Genotypen nur 46 % Polymorphismen beobachtet worden. In der vorliegenden Arbeit haben sich im Gegensatz dazu die RFLP-Marker als informativer als die Mikrosatelliten-Marker erwiesen. Bei beiden wurden solche ausgewählt, die schon kartiert worden sind. Somit ist keine zufällige Stichprobe verwendet worden, was einen Einfluß auf das Ergebnis haben könnte.

Dem Vorteil eines hohen Markerindex steht bei AFLP-Markern der Nachteil gegenüber, daß häufig eine Clusterung in den centromeren Regionen und an den Enden der Chromosomen festgestellt wird. Zudem füllen sie nur selten die in den dichtbesetzten RFLP-Karten noch vorhandenen Lücken (BECKER et al. 1995, WAUGH et al. 1997, QI et al. 1998).

AFLPs eignen sich durch ihre hohe Multiplex-Ratio besonders zur Kartierung quantitativer Eigenschaften und konnten in QTL („Quantitative Trait Loci“)-Analysen erfolgreich eingesetzt werden, um physiologische Merkmale bezüglich Salztoleranz und Gelbrost-Resistenz zu kartieren (ELLIS et al. 1997, TOOJINDA et al. 1998). TOOJINDA et al. (1998) setzten die gefundenen Marker für eine markergestützte Selektion ein, die die Einkreuzung der gefundenen Gelbrost-Resistenz unterstützen sollte. Inwiefern sich die in einer Population gewonnenen Erkenntnisse auf andere übertragen lassen, muß noch untersucht werden.

Erste Ergebnisse zu dieser Fragestellung erhielten WAUGH et al. (1997) bei der Analyse von AFLPs in drei verschiedenen DH-Populationen. Von 850 polymorphen AFLP-Fragmenten spalteten 10,2 % in mehr als einer und 1 % in allen drei Kartierungs-Populationen. Diese gemeinsamen AFLP-Marker kartierten in den unterschiedlichen Population in der gleichen genomischen Region. Ob es sich dabei aber um identische Sequenzen handelt, kann endgültig nur durch eine Sequenzierung der Fragmente geklärt werden. Bei zwei von 81 AFLP-Loci zeigte sich eine signifikante Abweichung zwischen den erstellten Karten. Diese Marker kartierten beide im centromeren Bereich. Auch in den Untersuchungen von QI et al. (1998) konnten alle komigrierenden Banden in zwei verschiedenen Kartierungs-Populationen dem gleichen Locus zugeordnet werden. Gleichermaßen konnten VAN DER VOORT et al. (1997) bei der Analyse von fünf verschiedenen Kartoffel-Populationen mit 733 AFLP-Markern, 131 komigrierende Banden beobachten, von denen 117 (89 %) in der gleichen genomischen Region in unterschiedlichen Populationen kartierten. 20 dieser Banden wurden aus verschiedenen

Genotypen isoliert. Durch anschließende Sequenzierung konnte bei 19 dieser Fragmente eine deutliche Homologie festgestellt werden. Die genannten Ergebnisse zeigen, daß wahrscheinlich einmal gefundene mit wirtschaftlich interessanten Genen eng gekoppelte AFLP-Marker auch in anderen Populationen eingesetzt werden können, sofern sie dort polymorph sind. Aufgrund des niedrigen Diversitätsindex der AFLP-Marker ist dieses häufig nicht gegeben.

Die in dieser Arbeit angewendete Methode der ISTRs hat einen ähnlich hohen Multiplex-Ratio wie AFLP-Marker. Der festgestellte Anteil an polymorphen Banden zwischen den Eltern ist mit 73 - 84 % für die Population 361 bzw. 50 - 76 % für die Eltern der für Zwergrost-Resistenz spaltenden Population sehr hoch. Allerdings konnten, wie schon erwähnt, nicht alle gefundenen Polymorphismen ausgewertet werden. Durch weitere Analysen muß geklärt werden, inwiefern sich ISTR-Marker zur Markierung von Genen und zur Kartierung eignen.

Generell läßt sich sagen, daß sich zur Suche nach Resistenzgenen, über deren Lage keine Information verfügbar ist, am besten solche Markertechniken mit hoher Multiplex-Ratio (AFLPs, ISTRs) eignen. Diese ermöglichen in relativ kurzer Zeit eine Abdeckung des ganzen Genoms. Konnte so ein gekoppelter Marker gefunden werden, empfiehlt sich der Wechsel zu Mikrosatelliten- oder RFLP-Markern, die in der entsprechenden Region kartiert worden sind, um das Gen genauer zu lokalisieren. Eng gekoppelte Marker können dann anschließend in allelspezifische Marker (ASAPs = allele-specific associated primers) umgewandelt werden, die einen effektiven Einsatz in der Züchtung erlauben (GU et al. 1995).

## **4.2 Markierung von Resistenzgenen**

### **4.2.1 BaYMV-2-Resistenz**

#### **4.2.1.1 Vererbung der Resistenz**

Zur Markierung von Resistenzgenen muß zunächst eine eindeutige Charakterisierung der Nachkommenschaften bezüglich ihrer Resistenz erfolgen, um die Vererbung aufzuklären. Dies kann bei der BaYMV-Resistenz durch ungünstige Umweltbedingungen sehr erschwert werden. Um die Bonituren abzusichern, wurden daher die Feldtests über mehrere Jahre wiederholt. Im Jahr 1996 war es schwierig, eindeutig zwischen resistenten und anfälligen Pflanzen zu unterscheiden. Die Bonitur ergab im Vergleich zu der aus dem Jahr 1995 eine größere Anzahl anfälliger Pflanzen, so daß eine signifikante Abweichung von einer 1:1-Spaltung in der Nachkommenschaft 361/9 festzustellen war. Bei der darauffolgenden Bonitur im Jahr 1997

konnten die Ergebnisse nicht nochmals überprüft werden, da ein Großteil der Pflanzen ausgewintert war. Dies liegt an der geringen Winterhärte der Pflanzen, die durch den eingekreuzten resistenten Elter begründet ist. Die Bonitur der Pflanzen, die den Winter überstanden haben, stimmt jedoch gut mit derjenigen aus dem Jahr 1995 überein, so daß zur Suche nach dem Resistenzgen von einer monogenen Vererbung ausgegangen worden ist. ORDON und FRIEDT (1993) stellten durch Kreuzungsanalysen mit BaMMV-resistenten, exotischen Gersten-Rassen ebenfalls eine monogene bzw. digene rezessive Vererbung der Resistenzen fest. Die Nachkommenschaften aus Kreuzungen zwischen anfälligen und resistenten Pflanzen der Population 361 waren resistent, woraus folgt, daß die Resistenz von einem dominanten Allel vermittelt wird. Bisher ist nur ein weiteres dominantes Allel (*Ym2*) bekannt, das aus der japanischen Sorte 'Mihori Hadaka 3' stammt (TAKAHASHI et al. 1973). Es vermittelt eine Resistenz gegen alle drei Stämme des Gelbmosaikvirose-Komplexes (ORDON et al. 1993). Die Resistenz der chinesischen Sorte 'Mokusekko 3', die ebenfalls gegen alle drei Virus-Stämme wirkt, ist zunächst von TAKAHASHI et al. (1973) als partiell dominantes Gen *Ym* beschrieben worden. KONISHI et al. (1997) konnten hingegen nachweisen, daß die Resistenz durch ein rezessives Allel (*ym1*) auf Chromosom 4H zusammen mit einem weiteren rezessiven Allel (*ym5*) auf Chromosom 3H vermittelt wird. Mittels Kreuzungen konnte gezeigt werden, daß 'Misato Golden', eine von 'Mokusekko 3' abstammende Sorte, nur das Gen *ym5* besitzt. Dadurch wurde sie anfällig gegenüber dem in Japan vorkommenden Stamm BaYMV-III. Nur durch die Kombination der beiden Gene *ym1* und *ym5* wird die gesamte Breite der Resistenz vermittelt. Der Grund für den Verlust des *ym1*-Gens in züchterisch bearbeitetem Material könnte in einer Kopplung dieses Gens mit einem negative Qualitätseigenschaften vermittelnden QTL begründet liegen (KONISHI et al. 1997).

Die Resistenztests in der Population 163 haben ergeben, daß einige Pflanzen gegen BaMMV und BaYMV-1 resistent aber gegen BaYMV-2 anfällig sind bzw. umgekehrt (vergl. Kap. 3.1.1). Auch hier könnten deshalb zwei Gene für die Vermittlung der Resistenz gegen alle drei Virus-Stämme verantwortlich sein. Um genauere Aussagen treffen zu können, müßten die aus dem Jahr 1995 erhaltenen Boniturergebnisse durch weitere Versuche bestätigt werden.

Die Resistenztests haben gezeigt, daß die Nachkommenschaft der F<sub>1</sub>-Pflanze 361/7 wahrscheinlich nur das Resistenzgen der Mutterpflanze 'Labea' enthält, da nur wenige Pflanzen bezüglich BaYMV-2 eine Resistenz aufwiesen. Die Markeranalysen zeigten, daß mit Ausnahme dreier Loci (*MWG533*, *MWG596*, *HVM60*) die Pflanzen der Nachkommenschaften 361/3 und 361/9 das gleiche Allel trugen, während 361/7 ein anderes Allel aufwies (vergl. Abb.

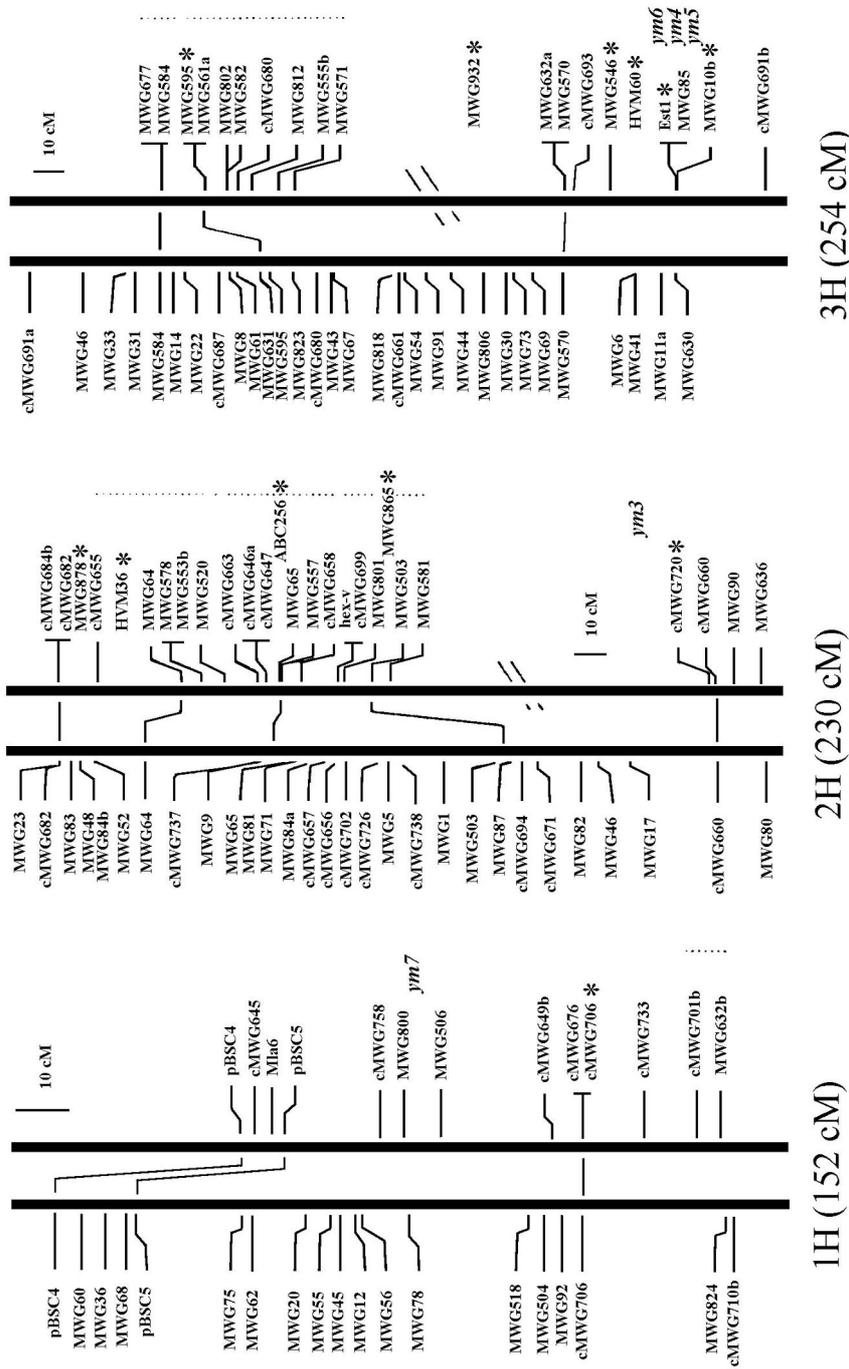
3.5). Jedoch gab es auch Marker, die ausschließlich in der Nachkommenschaft von 361/9 polymorph bzw. nur in dieser DH-Linie monomorph waren. Da die F<sub>1</sub>-Pflanzen nicht uniform sind, muß davon ausgegangen werden, daß mehrere Loci der Elternpflanzen heterozygot waren. Wahrscheinlich war dies beim Vater der Fall, da als Mutter eine Pflanze der Gersten-Sorte 'Labea' diente, welche folglich einen hohen Grad an Homozygotie besitzen sollte. Da das Gen für die BaYMV-2-Resistenz dominant vererbt wird, kann es sein, daß der Vater auch bezüglich der Resistenz heterozygot war und so die anfällige Nachkommenschaft 361/7 entstanden ist. Eine weitere Möglichkeit besteht in einer unerwünschten Fremdbefruchtung der Mutterpflanze von außen. Eine Selbstbefruchtung der Mutterpflanze kann ausgeschlossen werden, da viele der RFLP-Marker auch in der Nachkommenschaft 361/7 aufspalteten.

#### 4.2.1.2 Kopplungsanalysen

In der vorliegenden Arbeit konnte eine enge Kopplung zwischen dem in der Population 163 gefundenen BaYMV-2-Resistenzgen und dem Esterase-Komplex *Est1-Est2-Est4* auf dem langen Arm des Chromosoms 3H festgestellt werden. Dieser Isoenzym-Marker kann in der Züchtung zur markergestützten Selektion eingesetzt werden.

Auf dem Chromosom 3HL wurden schon mehrere Gelbmosaikvirose-Resistenzgene (*ym4*, *ym5* und *ym6*) kartiert (vergl. Tab. 1.1). Das gefundene Resistenzgen könnte daher mit einem dieser schon bekannten Gene identisch sein. Der hier gefundene Austauschwert von  $0,08 \pm 0,03$  % zwischen Resistenzgen und Esterase-Locus liegt in dem Bereich, der auch von IIDA und KONISHI (1994) für das *ym6*-Gen (7 - 10 %) beobachtet wurde. Die Gene *ym4* und *ym5* liegen mit  $4,7 \pm 2,3$  cM und 3,4 cM etwas näher an dem Esterase-Locus (GRANER et al. 1995). Die Gene *ym5* und *ym6* vermitteln ebenfalls eine Resistenz gegen alle drei in Deutschland vorkommenden Virus-Stämme. Eine Aussage, ob hier ein anderes Resistenzgen gefunden wurde, könnte nur nach entsprechenden Testkreuzungen erfolgen.

In der zweiten Population konnte das für die BaYMV-2-Resistenz verantwortliche Gen nicht gefunden werden. Aufgrund der hier durchgeführten Untersuchungen konnten mit Hilfe der RFLP- und Mikrosatelliten-Marker die Regionen des Chromosoms 3HL und 4HL, in denen geclusterte Resistenzgene auftreten, ausgeschlossen werden. Jedoch gibt es auf den Chromosomen 1H, 5H und 6H noch Bereiche, die noch nicht ausreichend untersucht wurden. Dies liegt darin begründet, daß die zur Verfügung stehenden Marker, die in diesen Regionen kartieren, in der vorliegenden Population monomorph sind. Zur Übersicht wurden die überprüften Marker und die ungefähre Lage der Resistenzgene in der Abb. 4.1 eingefügt.



**Abb. 4.1:** RFLP-Karte des Gerstengensoms verändert nach GRANER et al. (1991). Der rechte Balken stellt die Karte dar, die mittels einer DH-Population aus der Kreuzung der Sorten 'Igni' und 'Franka' entstanden ist, auf der linken Seite ist die Karte abgebildet, die aus einer  $F_2F_3$ -Familie der Kreuzung der Sorte 'Vada' mit *H. spontaneum* erhalten wurde. Die Chromosomen sind mit dem kurzen Arm nach oben orientiert. Die Positionen gemeinsamer Marker sind mit Linien zwischen den Balken markiert. Vorhandene Lücken sind mit zwei Schrägstrichen gekennzeichnet. Regionen, in denen die Marker in der Kartierungspopulation eine gestörte Segregation aufwiesen, sind durch gepunktete Linien kenntlich gemacht. Nicht von GRANER et al. (1991) kartierte Marker sowie die Gelbmosaikvirose-Resistenzgene wurden, so weit möglich, durch Vergleich mit Konsensus-Karten in der entsprechenden Region eingefügt. Die in der Population 361 auf Kopplung mit dem BaYMV-2-Resistenzgen überprüften Marker sind mit einem \* versehen.

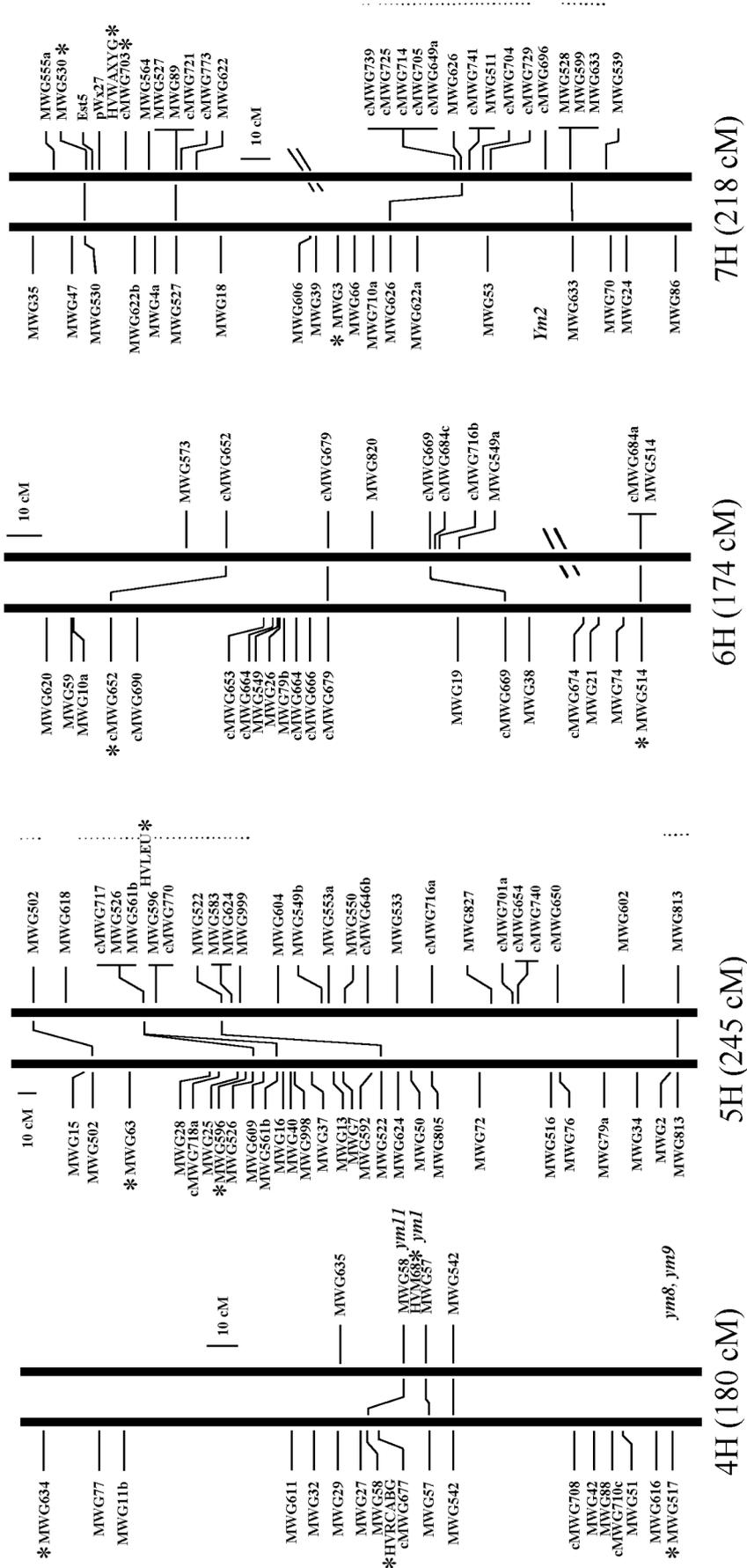


Abb. 4.1. Fortsetzung von S. 75.

Eine weitere Analyse der noch nicht abgedeckten Genomregionen sollte zu einem Auffinden gekoppelter Marker führen.

Neben den hier verwendeten Sonden aus der Karte von GRANER et al. (1991, 1993), die 273 Loci und 1433 cM mit einer durchschnittlichen Distanz von 5,2 cM zwischen zwei Markern umfaßt, wurden weitere Karten der Gerste von KLEINHOFS et al. (1993) mit 500 Markern (1214 cM, KLEINHOFS 1996) und von HEUN et al. (1991) mit 157 Markern (1096 cM) erstellt. Letztere konnte durch Analyse von AFLP-Markern auf 282 Marker, die insgesamt 1873 cM umfassen, erweitert werden. Damit stehen genügend Marker für weitergehende Analysen zur Verfügung.

## **4.2.2 Zwergrost-Resistenz**

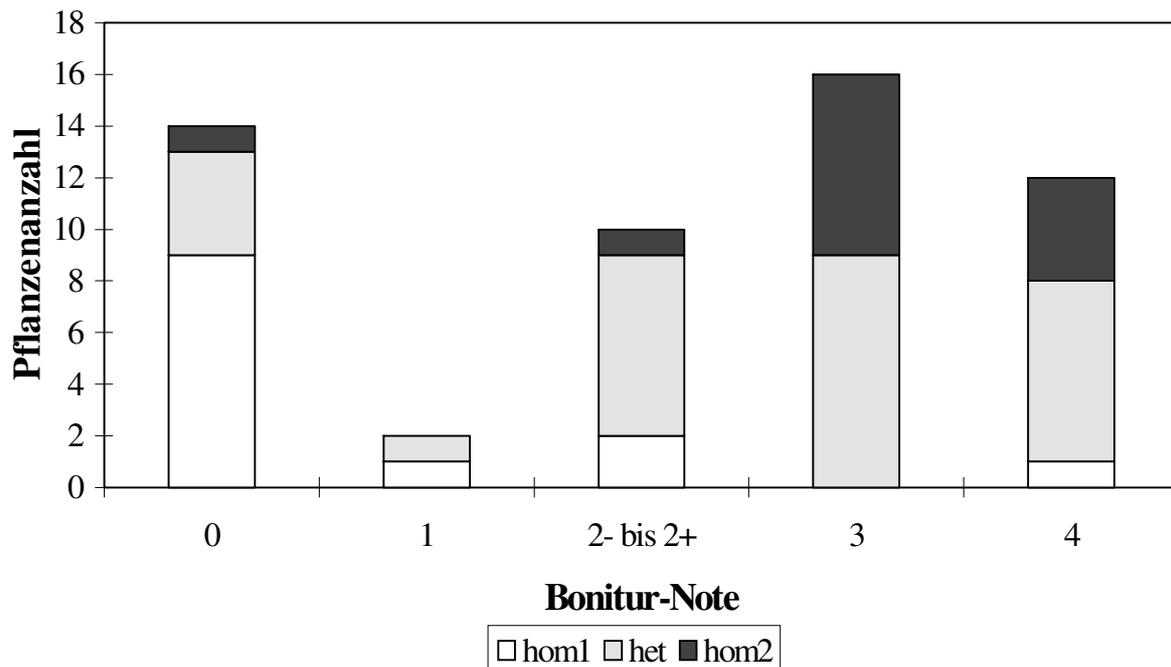
### **4.2.2.1 Vererbung der Resistenz**

PROCHNOW (1998) konnte zeigen, daß die *Hordeum spontaneum*-Eltern der untersuchten F<sub>2</sub>-Populationen Gene tragen, die gegen alle bisher bekannten Pathotypen des Zwergrost-Erregers *Puccinia hordei* eine Resistenz vermitteln. Die Resistenztests der Nachkommenschaften wurden mit einem Zwergrost-Isolat durchgeführt, das eine Virulenz gegenüber allen bisher bekannten Resistenzen mit Ausnahme von *Rph7* aufweist. Insofern müssen in den Populationen neue Resistenzgene spalten. Bisher charakterisierte Zwergrost-Resistenzgene weisen alle einen monogen dominanten bzw. unvollständig dominanten Erbgang auf (vergl. Tab. 1.2). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Nachkommenschaften zeigen hingegen einen monogen rezessiven Erbgang der Resistenz (Pop. 38/39 und 40/41) bzw. in den Populationen 3 und 5 zwei dominante, komplementär wirkende Gene für die Resistenz. Somit kann davon ausgegangen werden, daß in den vier Nachkommenschaften zumindest zwei verschiedene neue Resistenzgene, das heißt ein rezessives und ein dominant komplementär wirkendes, vorhanden sind.

### **4.2.2.2 Kopplungsanalysen**

Die Kopplungsuntersuchungen wurden mit Hilfe der „bulked segregant“-Analyse durchgeführt. In den Populationen 38/39 und 40/41 sollte bei absoluter Kopplung des Markers mit dem Resistenzgen im DNA-Bulk resistenter Pflanzen nur das Allel des resistenten Elters und im DNA-Bulk anfälliger Pflanzen beide Allele vorhanden sein. Das Bandenmuster nach Amplifikation mit dem gekoppelten Mikrosatelliten-Marker HVBKASI in den beiden DNA-

Bulks der Nachkommenschaft 40/41 entspricht nicht ganz der Erwartung, da im Bulk anfälliger Pflanzen das Allel des resistenten Elters nur schwach ausgeprägt ist (vergl. Abb. 3.14). Dies mag darin begründet liegen, daß zur Bildung dieses Bulks hauptsächlich Pflanzen mit hohen Bonitur-Noten (3 und 4) ausgewählt wurden. In diesen Klassen liegt der Anteil an Homozygoten mit dem Allel des anfälligen Elters wesentlich höher als in den Klassen 1 bis 2+ (Abb. 4.2), so daß wesentlich weniger heterozygote Genotypen in dem Bulk vorhanden waren.

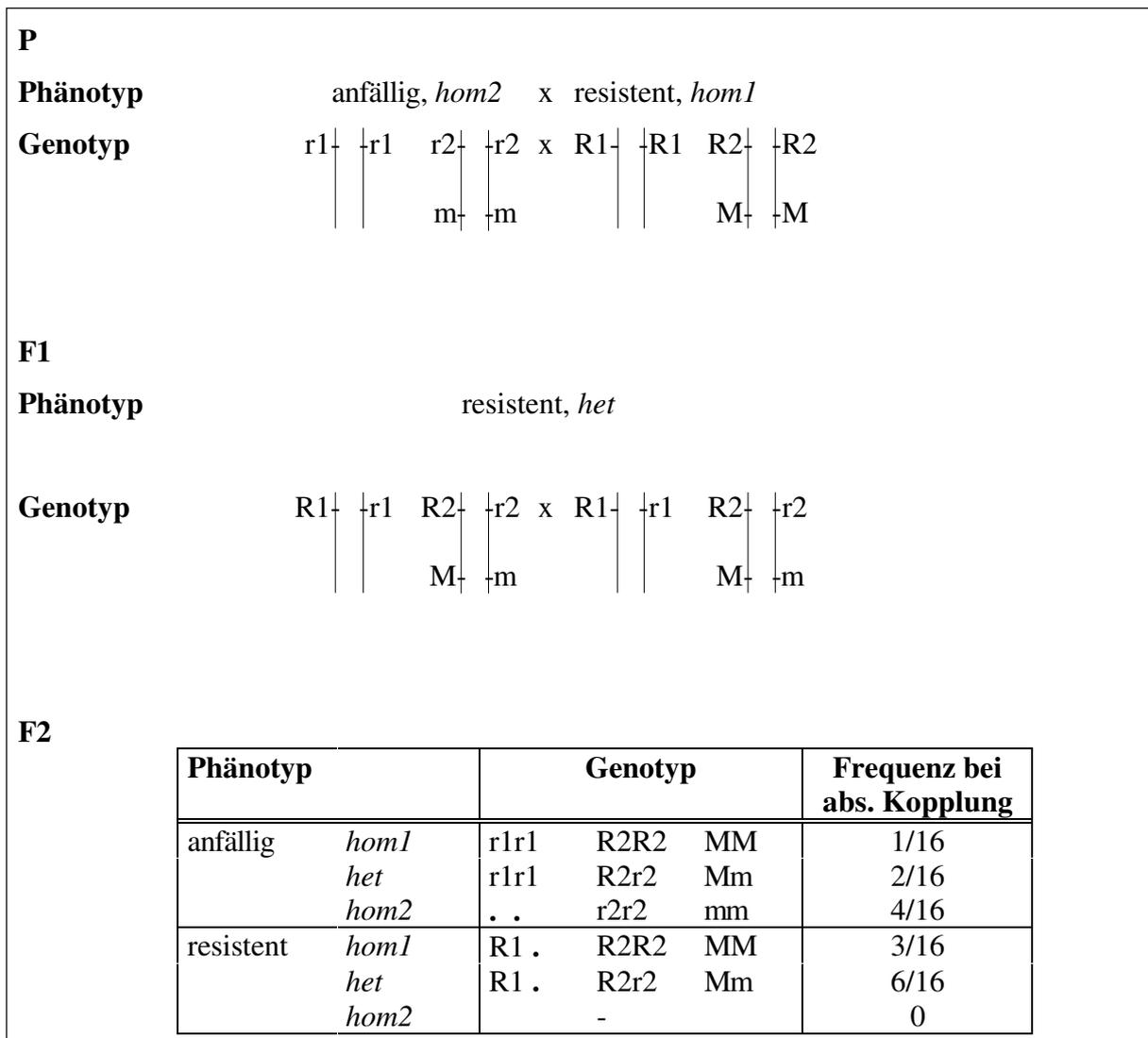


**Abb. 4.2:** Verteilung der Genotypen des Markers HVBKASI auf die Boniturklassen der Population 40/41.

Auch der Polymorphismus zwischen den Bulks nach Amplifikation mit dem Marker HVCMA kann durch eine zufällige Verschiebung der Genotypfrequenzen in der Stichprobe entstanden sein. Zur Bestätigung einer durch „bulked segregant“-Analyse gefundenen Kopplung muß sich daher immer eine Untersuchung der Einzelpflanzen anschließen.

Wenn in den Populationen 3 und 5 eine digene Vererbung der Resistenz vorliegt, würden bei Kopplung eines Markers mit einem Resistenzgen immer die Allele beider Eltern in den Bulks erwartet werden, jedoch mit unterschiedlich starker Ausprägung (Abb. 4.3). So treten in dem Bulk resistenter Pflanzen das Allel des resistenten Elters bei absoluter Kopplung mit einem Resistenzgen mit einer Frequenz von 0,67 und das Allel des anfälligen Elters mit einer Frequenz von 0,33 auf. In dem Bulk anfälliger Pflanzen sind die Unterschiede stärker. Hier

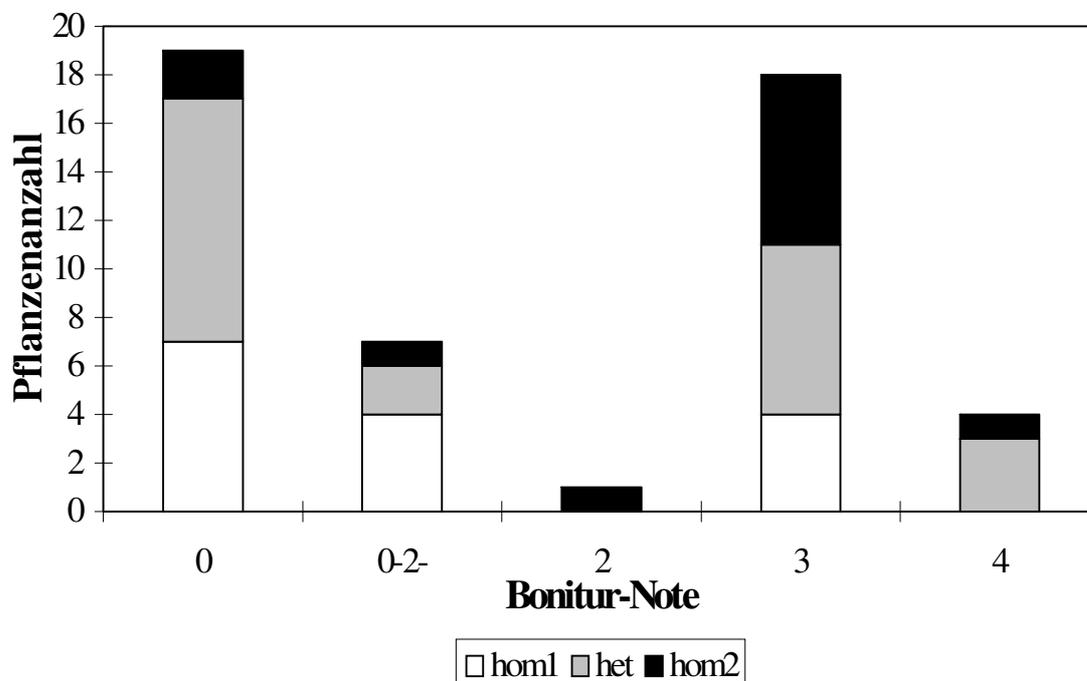
liegt das Allel des anfälligen Elters mit der Frequenz von 0,71 und das des resistenten Elters mit 0,29 vor (Abb. 4.3). Zudem ist in diesem Bulk der Anteil der Pflanzen mit dem Genotyp *hom1* sehr niedrig, so daß hier dieses Markerallel wahrscheinlich weniger stark ausgeprägt wird. Der Unterschied zwischen den Bulks wird jedoch um so kleiner, je weiter der Marker vom Resistenzgen entfernt liegt. Aufgrund der DNA der Austauschtypen kommt es zu einer vermehrten Amplifikation des Allels des anfälligen Elters in dem Bulk resistenter Pflanzen bzw. des Allels des resistenten Elters in dem Bulk anfälliger Pflanzen.



**Abb. 4.3:** Kreuzungsschema bei Vorliegen einer digenen Vererbung der Resistenz und absoluter Kopplung eines kodominanten Markers (M) mit einem Resistenzgen (R2). Die Resistenz wird durch zwei komplementär wirkende, dominante Allele (R1 und R2) vermittelt.

In den Nachkommenschaften 3 und 5 konnten Unterschiede zwischen den Bulks bei der Analyse mit dem Mikrosatelliten-Marker HVBKASI beobachtet werden (vergl. Abb. 3.14). Hier wurde im DNA-Bulk anfälliger Pflanzen der Population 3 das Allel des resistenten Elters nur schwach amplifiziert, während im DNA-Bulk resistenter Pflanzen die Banden der beiden Allele etwa gleich stark waren. Bei der Population 5 trat hingegen der umgekehrte Fall auf, wobei sich der Hinweis auf Kopplung bei der Analyse der Einzelpflanzen aber nicht bestätigte.

Eine Kopplung des Mikrosatelliten-Markers HVBKASI konnte auch in der Population 3 festgestellt werden. Die Verteilung der Markergenotypen auf die Boniturklassen ist in Abb. 4.4 dargestellt.



**Abb. 4.4:** Verteilung der Genotypen des Markers HVBKASI auf die Boniturklassen der Population 3.

In der Boniturklasse 0-2- überwiegt der Anteil der Pflanzen mit dem Allel des resistenten Elters (*hom1*), wodurch die Einstufung dieser Klasse als resistent gefestigt und die Hypothese einer 9:7-Spaltung von resistenten zu anfälligen Pflanzen in dieser Population unterstützt wird (vergl. Kap. 3.2.1 und Tab. 3.12). Marker können insofern eine Hilfe bei der eindeutigen Zuordnung der Pflanzen in die richtige Klasse sein, wenn der Phänotyp durch Umwelteinflüsse einer Variation unterliegt und die Klassifizierung damit erschwert wird (WRICKE 1996).

Die Rekombinationswerte der Resistenzgene aus den Populationen 40/41 und 3 mit dem Marker HVBKASI liegen mit  $0,17 \pm 0,05$  und  $0,22 \pm 0,10$  in einem ähnlichen Bereich, so daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß es sich hierbei um denselben Genort handelt. Da die Vererbung der Resistenz in dem einen Fall durch ein rezessives Allel in dem anderen durch ein komplementär wirkendes, dominantes Allel erfolgt, muß es sich jedoch zumindest um verschiedene Allele handeln. Daß in diesen Populationen zwei verschiedene Loci vorliegen, die gekoppelt sind, ist ebenfalls möglich.

Bei Untersuchungen von F<sub>2</sub>- und DH-Populationen, die von resistenten *Hordeum spontaneum*-Linien abstammen, konnte eine Kopplung der Resistenz mit Markern festgestellt werden, die auf Chromosom 2H kartiert sind (KICHERER et al. 1998, GRANER pers. Mitteilung). Diese Resistenzen werden gleichfalls rezessiv vererbt, so daß eine Identität mit dem hier gefundenen Gen vorliegen kann. Bei der Zwergrost-Resistenz wird aber auch das Vorkommen von mehreren Allelen in unterschiedlichen Varietäten beobachtet. So konnten in 25 verschiedenen Gersten-Accessionen Allele des Locus *Rph2* gefunden werden (JIN und FRANCKOWIAK 1997). Aufgrund der unterschiedlichen Herkunft der Linien, kann davon ausgegangen werden, daß zumindest fünf Allele nicht identisch sind (FRANCKOWIAK et al. 1996).

Multiple Allelie und Gencluster sind auch von anderen Resistenzen gegen pathogene Pilze bekannt. So konnten für den *Mla*-Locus der Gerste, der eine Resistenz gegen den Mehltau (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) vermittelt, mehr als 20 verschiedene Allele aufgrund ihrer pathotypischen Spezifität identifiziert werden (JØRGENSEN 1992, JAHOOOR et al. 1993). SAXENA und HOOKER (1968) konnten beim Mais 16 Spezifitäten gegen den Rostpilz *Puccinia sorghi* innerhalb einer Genomregion feststellen und nachweisen, daß diese auf eng gekoppelten Loci vorliegen müssen. Eine Klärung, ob in den verschiedenen *Hordeum spontaneum*-Linien identische Gene vorliegen, kann für rezessive Allele über Testkreuzungen erfolgen. Jedoch kann nur durch eine exakte Kartierung festgestellt werden, ob das komplementär wirkende, dominante Allel aus der Population 3 am gleichen Locus liegt wie das Allel aus Population 40/41.

Der RFLP-Marker ABG602 wurde mit einem Abstand von 20 cM vom Resistenzgen entfernt kartiert. Um für eine markergestützte Selektion in der Züchtung eingesetzt zu werden, sollte er jedoch nicht weiter als 10 cM vom Resistenzlocus entfernt liegen. Einen flankierenden Marker auf der anderen Seite des Resistenzgens zu finden wäre wünschenswert, da zwei Marker, die eine Klammer um den Resistenzlocus bilden, die Effektivität einer markergestützten Selektion wesentlich erhöhen können (WEBER und WRICKE 1994). Dann können nur solche Pflanzen

selektiert werden, die keine Rekombination zwischen den Markern aufzeigen. Durch weitere Analysen von Markern dieses Chromosomenbereichs sollten eng gekoppelte Marker zu finden sein.

### 4.2.3 Nutzen der Markierung von Resistenzgenen

Ein großes Problem bei der Züchtung neuer resistenter Sorten stellt die Entwicklung neuer Pathotypen des Erregers dar, welche die Resistenzen in den angebauten Sorten durchbrechen und sich durch den Selektionsdruck schnell ausbreiten.

So konnte z. B. nach der Zulassung der Sorte 'Trumpf' im Jahr 1974 und deren intensivem Anbau auf dem Gebiet der ehemaligen DDR in den Folgejahren bei den Zwergrost-Erregern eine Zunahme der entsprechenden Virulenz von 0 % (1974) auf 100 % (1977) beobachtet werden. Derzeit ist *Rph7* das einzige noch wirksame Zwergrost-Resistenzgen in Deutschland, jedoch konnten 1996 schon erste Spuren von *Rph7*-Virulenz in Österreich und Frankreich festgestellt werden (PROCHNOW 1998).

Ähnliches wurde auch bei der Gelbmosaikvirose verzeichnet. Der die *ym4*-Resistenz brechende BaYMV-2-Stamm trat 1988 auf nur vier Feldern in Deutschland und England zum ersten Mal auf. 1990 konnte das Virus schon auf mehr als 60 Feldern nachgewiesen werden (HUTH 1991). Auch in den meisten europäischen Ländern wie Großbritannien, Belgien und Frankreich konnten Gerstengelbmosaikviren gefunden werden (HILL und EVANS 1980, LAPIERRE 1980, MAROQUIN et al. 1982, HILL und WALPOLE 1989, STEYER et al. 1995).

Dies zeigt, wie wichtig die Bereitstellung neuer Resistenzquellen für die Züchtung ist, um eine schnelle Ausbreitung der Krankheiten zu verhindern. Sie können insbesondere durch die Evaluation der in den Genbanken gesammelten Wildformen oder exotischer Landrassen gefunden werden. Durch die Einkreuzung von Wildformen werden jedoch auch unerwünschte Eigenschaften übertragen. Dies kann Probleme bei der Selektion von Resistenzträgern mit sich bringen. So ist z. B. bei der Prüfung der BaYMV-2-Resistenz in manchen Jahren ein hoher Anteil an Auswinterung der Pflanzen zu beobachten, wodurch die Auswertung der Tests erschwert wird. Mit Hilfe von Markern kann hingegen eine schnelle und sichere Selektion erfolgen.

Die bisher beschriebenen Marker für Gelbmosaikvirose-Resistenz sind zumeist RAPD und RFLP-Marker (vergl. Tab. 1.1). Für *ym11* konnte ein diagnostischer RFLP-Marker gefunden werden, der bei Vergleich verschiedener Varietäten ein für diese Resistenz spezifisches Fragment nachweist und somit zwischen *ym11* und anderen Resistenzgenen unterschieden

werden kann (BAUER et al. 1997). Dies ist sehr nützlich, wenn eine Pyramidisierung von Resistenzgenen angestrebt wird. Hier kann nur noch durch sehr umfangreiche Tests zwischen Trägern eines oder mehrerer Gene unterschieden werden, so daß nur aufgrund molekularer Analysen mit diagnostischen Markern eine Identifizierung der multiplen Resistenzträger erfolgen kann. Durch die Pyramidisierung von mehreren Genen in einer Sorte kann ein breiteres Spektrum der Resistenz erreicht werden, die zudem eine schnelle Überwindung der Resistenz verhindern kann. Beim Reis konnte so die Resistenz gegen die bakterielle Weißfleckenkrankheit (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) deutlich verbessert werden (HUANG et al. 1997).

Neben dem Einsatz in der markergestützten Selektion, kann die Kartierung eines Resistenzgens auch den ersten Schritt zur Klonierung des Gens darstellen (TANKSLEY et al. 1995). Hierzu muß zunächst durch eine Feinkartierung ein möglichst eng gekoppelter Marker gefunden werden. Ausgehend von zwei das Resistenzgen flankierenden Markern können aus ca. 1000 F<sub>2</sub>-Pflanzen diejenigen selektiert werden, bei denen eine Rekombination zwischen den flankierenden Markern stattgefunden hat. Mit Hilfe dieser rekombinanten Nachkommen kann dann eine Feinkartierung des Genombereichs, in dem das Resistenzgen liegt, mit dazwischen kartierenden Markern erfolgen. Dadurch ist es möglich, eine Karte mit einer Auflösung bis zu 0,05 cM zu erhalten. Erste Versuche werden z. B. für das *ym4*-Gen (BAUER und GRANER 1995) und ein neues Zwergrost-Resistenzgen (GRANER, pers. Mitteilung) durchgeführt. So erhaltene eng gekoppelte Marker können dann zur Hybridisierung mit hochmolekularen DNA-Banken, wie YAC- („yeast artificial chromosomes“) oder BAC-Banken („bacterial artificial chromosomes“), eingesetzt werden. Entsprechende YAC-Banken der Gerste wurden schon konstruiert. Sie besitzen eine durchschnittliche Insert-Größe von 170 kbp und aus ihnen können Klone mit single-copy Sequenzen isoliert werden (MICHALEK et al. 1995, KLEINE et al. 1997). Über „chromosome-walking“, d. h. das Identifizieren und Isolieren sich überlappender Klone, kann dann derjenige Klon isoliert werden, der das Resistenzgen trägt. In allen diesen Fällen muß jedoch berücksichtigt werden, daß die genetischen Abstände nicht mit einem festen Faktor in physikalische Abstände umgerechnet werden können, sondern dieser Faktor je nach Spezies und Chromosomenbereich stark schwankt, da der in cM gemessene Abstand eine Funktion der Rekombinationsrate im betreffenden Chromosomenabschnitt ist. PEDERSEN et al. (1995) konnte durch *in situ* Hybridisierungen bei Gerste nachweisen, daß 1 cM im Mittel einem Abstand von 4 Mb entspricht. Im Centromer- und Telomer-Bereich von Chromosomen

liegt jedoch eine Suppression der Rekombination vor, während sie im distalen Drittel des Chromosomenarms häufiger vorkommt. Je nach Lage der Marker konnten PEDERSEN et al. (1995) daher Werte zwischen 6 - 46 Mb/cM und 1 - 2,1 Mb/cM beobachten.

Bei Getreiden wird das „chromosome walking“ durch den großen Anteil repetitiver Sequenzen zusätzlich erschwert. Die Konstruktion Chromosomen- oder Chromosomenregion-spezifischer Bibliotheken könnte daher hilfreich sein. Für Roggen konnten aus Weizen-Roggen-Translokationslinien 23 für das Chromosom 1RS spezifische YAC-Klone isoliert werden, die nun für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen (LANGRIDGE et al. 1998). Dieses Chromosomensegment trägt eine Reihe von wirtschaftlich interessanten Genen, darunter Resistenzgene (ZELLER und FUCHS 1983, WRICKE et al. 1996). Weizen-Additionslinien stehen auch für Gerste zur Verfügung (ISLAM et al. 1981), so daß dieser Ansatz auch bei Gerste verfolgt werden könnte.

Über die positionelle Klonierung konnten in der jüngsten Vergangenheit eine Reihe von Resistenzgenen aus Pflanzen isoliert werden, darunter auch das *Xa21*-Gen aus Reis (SONG et al. 1995) und mehrere Allele des *Mlo*-Gens der Gerste (BÜSCHGES et al. 1997).

Die Isolierung von Resistenzgenen bietet die Möglichkeit, diese in andere Pflanzen zu transformieren. Die Gerste konnte schon erfolgreich durch Elektroporation von Protoplasten (SALMENKALLIO-MARTTILA et al. 1995, HANSCH et al. 1996), direkten DNA-Transfer in Protoplasten (FUNATSUKI et al. 1995), Partikelbeschuß (HARWOOD et al. 1995) oder *Agrobacterium tumefaciens* (TINGAY et al. 1997) transformiert werden. Die Transformations-effizienz bei Getreiden ist jedoch noch zu gering und die stabile Expression und Vererbung der eingebrachten Resistenz zu unsicher, als daß dieser Weg wirtschaftlich effektiver wäre als traditionelle Züchtung. Einzig bei Reis ist es bisher gelungen, höhere Transformationsraten durch Einsatz von *Agrobacterium tumefaciens* zu erreichen (HIEI et al. 1997). Die Entwicklung transgener Pflanzen ist interessant, wenn es gilt interspezifische Barrieren zu überwinden und Resistenzgene in nah verwandte Arten, in denen diese Resistenz nicht gefunden werden kann, einzubringen. Daß dies prinzipiell möglich ist, konnten ROMMENS et al. (1995) mit dem *Pto*-Gen aus Tomate zeigen. Tabakpflanzen wurden mit diesem Gen, das eine Resistenz gegen *Pseudomonas syringae* pv *tomato* vermittelt, transformiert. Die transgenen Tabakpflanzen wiesen anschließend eine Resistenz gegen den Erreger *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* auf (THILMONY et al. 1995).

Viele der bisher klonierten Resistenzgene weisen als Gemeinsamkeit eine Domäne mit Leucinreichen Aminosäuresequenz-Wiederholungen („leucine-rich repeat“ (LRR)) oder mit Serin/Threonin-Protein-Kinase-Aktivität auf (Übersicht in BENT 1996). Diese Domänen sind für ihre Funktion bei Protein-Protein-Interaktionen bekannt. Daher wird vermutet, daß die isolierten Resistenzgene eine Rolle in der Signal-Transduktions-Kette bei der Pathogenabwehr spielen. Erste Bestätigung dieser Theorie, konnten ZHOU et al. (1995) bei Untersuchungen an der Tomate finden. Eine mit dem *Pto*-Protein interagierende weitere Serin/Threonin-Protein-Kinase (*Pti1*) konnte isoliert werden, die Teil der nachgeschalteten Kinase-Kaskade ist, welche letztendlich zur Expression der pathogen-abwehrenden Gene führt.

Durch die in Zukunft zu erwartende Isolierung weiterer Resistenzgene und den anschließenden Vergleich können Rückschlüsse auf ihre Funktion gezogen und damit das Wissen über die Pathogen-Pflanzen-Interaktionen vergrößert werden. Es ist vorstellbar, daß mit diesem Wissen eine kontrollierte Kombination von Genen oder sogar deren gezielte Modifizierung erfolgen kann, so daß ein möglichst breites Wirkungsspektrum erreicht und damit die Dauerhaftigkeit der Resistenz erhöht wird.

Trotz dieser vielversprechenden Möglichkeiten zur Züchtung resistenter Sorten wird die folgende von WILHELM RIMPAU 1883 getroffene Aussage wohl noch lange ihre Gültigkeit bewahren (zit. in BECKER 1993):

*„...daß die Sorten sich in bezug auf die Krankheit ganz außerordentlich verschieden verhalten, steht fest, wenn auch bis jetzt noch keine Sorte gezüchtete ist, welche dem Schmarotzerpilze absolut widersteht, wie das in Reklamen wohl hier und da behauptet wird.“*

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

Die Entwicklung neuer resistenter Sorten ist ein wichtiges Zuchtziel, da dies zum einen für einige Krankheiten die einzige Möglichkeit zur Bekämpfung darstellt, zum anderen den Einsatz chemischer Pflanzenschutzmaßnahmen reduziert und damit Kosten und die Umweltbelastung senkt. Zur Einkreuzung neuer Resistenzgene, die zumeist in Wildformen vorliegen, sind mehrere Rückkreuzungsschritte notwendig. Hierbei kann ein mit dem Resistenzgen gekoppelter Marker zur Selektion gewünschter Genotypen eingesetzt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, gekoppelte Marker für „Barley Yellow Mosaic Virus“ (BaYMV)-2- und Zwergrost-Resistenzgene der Gerste zu finden.

Zur Suche nach Markern standen zwei verschiedene für BaYMV-2-Resistenz spaltende DH-Populationen (Bezeichnungen: 163 und 361) sowie vier für Zwergrost-Resistenz spaltende F<sub>2</sub>-Populationen (Bezeichnungen: 3, 5, 38/39, 40/41) zur Verfügung. Letztere entstanden aus Kreuzungen zwischen *Hordeum vulgare* und *Hordeum spontaneum*. Die an den Populationen 163 und 361 durchgeführten Feldbonituren zeigten, daß in beiden Populationen eine monogene Vererbung der BaYMV-2-Resistenz vorliegt. Die Population 163 enthält wahrscheinlich zwei eng gekoppelte Gene mit einer Rekombinationsrate von  $0,04 \pm 0,02$ , wobei ein Gen für die Vermittlung der BaYMV-1- und „Barley Mild Mosaic Virus“ (BaMMV)-Resistenz und ein weiteres Gen für die BaYMV-2-Resistenz verantwortlich ist. In der Population 361 ist ein dominantes Allel für die Vermittlung der BaYMV-2-Resistenz verantwortlich und ein weiteres für die BaMMV- und BaYMV-1-Resistenz. Diese beiden Genloci sind jedoch nicht gekoppelt. Die Populationen 38/39 und 40/41 besitzen ein rezessives Allel, das die Zwergrost-Resistenz vermittelt, während in den Nachkommenschaften 3 und 5 wahrscheinlich zwei komplementär wirkende dominante Allele vorliegen.

Die Populationen wurden mit Hilfe von Isoenzymen, Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLPs), Mikrosatelliten-Markern und „Inverse sequence-tagged repeats“ (ISTRs) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß in den aus interspezifischen Kreuzungen hervorgegangenen Nachkommenschaften 3, 5, 38/39 und 40/41 ein höherer Polymorphiegrad vorlag als in der DH-Population 361. Nur bei den ISTR-Analysen konnte mit 73 - 84 % in der DH-Population bzw. 50 - 84 % in den F<sub>2</sub>-Populationen ein etwa gleicher Anteil polymorpher Marker festgestellt werden. Durch weitere Untersuchungen muß jedoch geklärt werden, ob alle Polymorphismen der ISTR-Analysen für Markierungen bzw. Kartierungen ausgewertet werden können. In dem untersuchten Material waren 32 bzw. 53 - 84 % der RFLP-Sonden polymorph. Dies ist ein höherer Anteil als für die Mikrosatelliten-Marker festgestellt wurde (24 % in der DH-Nachkommenschaft 361 bzw. 36 - 52 % in den F<sub>2</sub>-Populationen). Die Isoenzyme zeigten den niedrigsten Polymorphiegrad, da von 17 untersuchten Systemen nur die Esterase in den Populationen 361 und 163, die GOT in der Population 163 und die Aconitase in der Population 40/41 polymorph waren. Der Einsatz verschiedener Markertechniken zur Suche nach gekoppelten Markern wird diskutiert.

Die gefundenen polymorphen Marker sind auf Kopplung mit den in den Populationen vorliegenden Resistenzen geprüft worden. Keiner der in der Population 361 untersuchten 45 Marker zeigte eine Kopplung zu dem Resistenzgen. Jedoch konnten durch die Analysen einige aus der Literatur bekannte BaYMV-2-Resistenz-Loci ausgeschlossen werden. Das in der Population 163 vorhandene BaYMV-2-Resistenzgen zeigte eine Rekombinationsrate von  $0,08 \pm 0,03$  mit dem *Est1-Est2-Est4*-Komplex auf dem langen Arm von Chromosom 3H.

Eine Kopplung zwischen dem auf Chromosom 2H kartierten Mikrosatelliten-Marker HVBKASI und den Zwergrost-Resistenzgenen in den Populationen 40/41 und 3 konnte nachgewiesen werden. Die Rekombinationsraten lagen bei  $0,17 \pm 0,05$  für die Population 40/41 bzw.  $0,22 \pm 0,10$  für die Population 3. Durch RFLP-Analysen in der Nachkommenschaft 40/41 konnte der Marker ABG602 20 cM vom Resistenzgen entfernt kartiert werden. Der Einsatz von Markern, die mit Resistenzgenen gekoppelt sind, wird diskutiert.

# Literaturverzeichnis

- ADAMS, M. J., P. JONES, A. G. SWABY 1987: The effect of cultivar used as host for *Polymyxa graminis* on the multiplication and transmission of barley yellow mosaic virus (BaYMV). *Ann. Appl. Biol.* **110**, 321-327.
- ALLARD, R. W. 1956: Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. *Hilgardia* **24**, 235-278.
- ANIKSTER, Y., I. WAHL 1972 : Coevolution of the rust fungi on Gramineae and Liliaceae hosts. *Ann. Rev. Phytopathology* **17**, 367 - 403.
- ARNST, B. J., J. W. MARTENS, G. M. WRIGHT, P. A. BURNETT, F. R. SANDERSON 1979: Incidence, importance and virulence of *Puccinia hordei* on barley in New Zealand. *Ann. Appl. Biol.* **92**, 185-190.
- BAUER, E., A. GRANER 1995: Basic and applied aspects of the genetic analysis of the *ym4* virus resistance locus in barley. *Agronomie* **15**, 469-473.
- BAUER, E., J. WEYEN, A. SCHIEMANN, A. GRANER, F. ORDON 1997: Molecular mapping of novel resistance genes against barley mild mosaic virus (BaMMV). *Theor. Appl. Genet.* **95**, 1263-1269.
- BECKER, H. 1993: Pflanzenzüchtung. Ulmer, Stuttgart.
- BECKER, J., M. HEUN 1995: Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant. Mol. Biol.* **27**, 835-845.
- BECKER, J., P. VOS, M. KUIPER, F. SALAMINI, M. HEUN 1995: Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol. Gen. Genet.* **249**, 65-73.
- BECKER, D., W. ROHDE 1998: Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung: ISTR (inverse sequence-tagged repeat) analysis. <http://www.mpiz-koeln.mpg.de/~rohde/istr.html>.
- BENNETT, M. D., J. B. SMITH 1991: Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal-Society of London* **B 334**, 309-345.
- BENT, A. F. 1996: Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell* **8**, 1757-1771.
- BERGMANN, J. W., S. S. MAAN 1973: Genetic control of isozymes in wheat-rye addition lines with rye or wheat cytoplasm. *Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp.*, 329-355
- BOROVKOVA, I. G.; Y. JIN, B. J. STEFFENSON, A. KILIAN, T. K. BLAKE, A. KLEINHOF 1997: Identification and mapping of a leaf rust resistance gene in barley line Q21861. *Genome* **40**, 236-241.
- BOROVKOVA, I. G., Y. JIN, B. J. STEFFENSON 1998: Chromosomal location and genetic relationship of leaf rust resistance genes *Rph9* and *Rph12* in barley. *Phytopathology* **88**, 76-80.
- BOTSTEIN, D., R. L. WHITE, M. H. SKOLNICK, R. W. DAVIS 1980: Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* **32**, 314-331.

- BROWN, A. H. D. 1983: Barley. In: TANKSLEY, S. D., T. J. ORTON (eds.) Isozymes in plant genetics and breeding. Part B, 57-78. Elsevier, Amsterdam.
- BRYAN, G. J., A. J. COLLINS, P. STEPHENSON, A. ORRY, J. B. SMITH, M. D. GALE 1997: Isolation and characterisation of microsatellites from hexaploid bred wheat. *Theor. Appl. Genet.* **94**, 557-563.
- BÜSCHGES, R., K. HOLLRICHER, R. PANSTRUGA, G. SIMONS, M. WOLTER, A. FRIJTERS, R. VAN DAELEN, T. VAN DER LEE, P. DIERGAARDE, J. GROENENDIJK, S. TÖPSCH, P. VOS, F. SALAMINI, P. SCHULZE-LEFERT 1997: The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* **88**, 695-705.
- CHEN, X., S. TEMNYKH, Y. XU, Y. G. CHO, S. R. MCCOUCH 1997: Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **95**, 553-567.
- CHICAIZA, O. 1996: Genetic control of leaf rust in barley. Dissertation, North Dakota State University, Fargo.
- CLIFFORD, B. C. 1985: Barley leaf rust. In: Bushnell, W.R., A.P. Roelfs (eds.) *The Cereal Rusts*, Vol. II., 173-205. Academic Press, New York.
- DAHLEEN, L. S. 1997: Mapped clone sequences detecting differences among 28 North American barley cultivars. *Crop Science* **37**, 952-957.
- ELLIS, R. P., B. P. FORSTER, R. WAUGH, N. BONAR, L. L. HANDLEY, D. ROBINSON, D. C. GORDON, W. POWELL 1997: Mapping physiological traits in barley. *New Phytol.* **137**, 149-157.
- FALK, D. E. 1985: Genetic studies with proanthocyanidin-free barley. *Barley Genet. Newsl.* **15**, 27-30.
- FAO Statistical Database 1997: Internet-Adresse: <http://apps.fao.org/lim500/nhp-wrap.pl?Production.Crops.Primary&Domain=SUA>.
- FEUERSTEIN, U., A. H. D. BROWN, J. BURDON 1990: Linkage of rust resistance genes from wild barley (*Hordeum spontaneum*) with isozyme markers. *Plant Breeding* **104**, 318-324.
- FLAVELL, A. J., E. DUNBAR, R. ANDERSON, S. R. PEARCE, R. HARTLEY, A. KUMAR 1992: *Tyl-copia* group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3639-3644.
- FLOR, H. H. 1971: Current status of the gene for gene concept. *Ann. Rev. Phytopathology* **9**, 275 - 296.
- FRANCKOWIAK, J. D., Y. JIN, B. J. STEFFENSON 1996: Recommended allele symbols for leaf rust resistance genes in barley. *Barley Genet. Newsl.* **27**, 36-44.
- FUNATSUKI, H., H. KURODA, M. KIHARA, P. A. LAZZERI, E. MÜLLER, H. LÖRZ, I. KISHINAMI 1995: Fertile transgenic barley generated by direct DNA transfer to protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* **91**, 707-712.
- GOLAN, T., Y. ANIKSTER, J. G. MOSEMAN, I. WAHL 1978: A new virulent strain of *Puccinia hordei*. *Euphytica* **27**, 185-189.
- GÖTZ, R. 1991: Untersuchungen zur genetischen Diversität der Resistenz gegen den „Gelbmosaikvirus-Komplex“ bei der Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Dissertation, Universität Gießen.

- GÖTZ, R., W. FRIEDT 1993: Resistance to the Barley Yellow Mosaic Virus Complex - Differential genotypic reaction and genetics of BaMMV-resistance of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breeding* **111**, 125-131.
- GRANER, A., A. JAHOR, J. SCHONDELMAIER, H. SIEDLER, K. PILLEN, G. FISCHBECK, G. WENZEL, R. G. HERRMANN 1991: Construction of an RFLP map of barley. *Theor. Appl. Genet.* **83**, 250-256.
- GRANER, A., E. BAUER, A. KELLERMANN, S. KIRCHNER, J. K. MURAYA, A. JAHOR, G. WENZEL 1993: Progress of RFLP-map construction in winter barley. *Barley Genet. Newsl.* **23**, 53-59.
- GRANER, A., E. BAUER, A. KELLERMANN, G. PROESELER, G. WENZEL, F. ORDON 1995: RFLP analysis of resistance to the barley yellow mosaic virus complex. *Agronomie* **15**, 415-479.
- GRIFFEY, C. A., M. K. DAS, R. E. BALDWIN, C. M. WALDENMAIER 1994: Yield losses in winter barley resulting from a new race of *Puccinia hordei* in North America. *Plant Dis.* **78**, 256-260.
- GROBEN, R. 1997: Mikrosatelliten bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.) und ihre Verwendung als molekulare Marker. Dissertation, Universität Hannover.
- GU, W. K., N. F. WEEDEN, J. YU, D. H. WALLACE 1995: Large-scale, cost-effective screening of PCR products in marker-assisted selection applications. *Theor. Appl. Genet.* **91**, 465-470.
- HANSCH, R., T. KOPREK, H. HWYDEMANN, R. R. MENDEL, J. SCHULZE 1996: Electroporation-mediated transient gene expression in isolated scutella of *Hordeum vulgare*. *Physiologia Plantarum* **98**, 20-27.
- HARLAN, J. R. 1995: Barley. In: SMARTT, J., N. W. SIMMONDS (eds.) *Evolution of Crop-Plants*. Second Edition. Longman Scientific & Technical, 93-98.
- HARWOOD, W. A., S. J. BEAN, D. F. CHEN, P. M. MULLINEAUX, J. W. SNAPE 1995: Transformation studies in *Hordeum vulgare* using a highly regenerable microspore system. *Euphytica* **85**, 113-118.
- HENDERSON, M. T. 1945: Studies of the sources of resistance and inheritance of reaction to leaf rust, *Puccinia anomala* Rostr., in barley. Ph.D. Thesis. University of Minnesota, St. Paul.
- HESLOP-HARRISON, J. S., A. BRANDES, S. TAKETA, T. SCHMIDT, A. V. VERSHININ, E. G. ALKHIMOVA, A. KAMM, R. L. DOUDRICK, T. SCHWARZACHER, A. KATSIOTIS, S. KUBIS, A. KUMAR, S. R. PEARCE, A. J. FLAVELL, G. E. HARRISON 1997: The chromosomal distributions of *Ty1-copia* group retrotransposable elements in higher plants and their implications for genome evolution. *Genetica* **100**, 197-204.
- HEUN, M., A. E. KENNEDY, J. A. ANDERSON, N. L. V. LAPITAN, M. E. SORRELLS, S. D. TANKSLEY 1991: Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* **34**, 437-447.
- HIEI, Y., T. KOMARI, T. KUBO 1997: Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant. Mol. Biol.* **35**, 205-218.
- HILL, S. A., E. J. EVANS 1980: New or unusual records of plant diseases and pests. Barley Yellow Mosaic Virus. *Plant Pathology* **29**, 197-199.

- HILL, S. A., B. J. WALPOLE 1989: National and local spread of barley yellow mosaic virus in the United Kingdom. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **19**, 555-562.
- HOISINGTON, D., M. KHAIRALLAH, D. GONZÁLEZ DE LEÓN 1994: *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. Second edition. El Batán, Mexico. DF., CIMMYT.
- HOLMES, D.S., M. QUIGLEY 1981: A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197.
- HUANG, N., E. R. ANGELES, J. DOMINGO, G. MAGPANTAY, S. SINGH, G. ZHANG, N. KUMARAVADIVEL, J. BENNETT, G. S. KHUSH 1997: Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theor. Appl. Genet.* **95**, 313-320.
- HUTH, W. 1985: Versuche zur Virusdiagnose und Resistenzträgererstellung in Gerste gegen Barley Yellow Mosaic Virus. *Votr. Pflanzzüchtg.* **9**, 107-120.
- HUTH, W. 1988: Barley yellow mosaic - a disease in Europe caused by two different viruses. In: COOPER, J. I., M. J. C. ASHER (eds.) *Developments in Applied Biology 2: Viruses with fungal vectors*, 61-70.
- HUTH, W. 1989: Ein weiterer Stamm des Barley yellow mosaic virus (BaYMV) gefunden. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **41**, 6-7.
- HUTH, W. 1991: Verbreitung der Gelbmosaikviren BaYMV, BaMMV und BaYMV-2 und Screening von Gerstensorten auf Resistenz gegenüber BaYMV-2. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **43**, 233-237.
- HUTH, W., D. E. LESEMANN 1978: Eine für die Bundesrepublik Deutschland neue Virose an Wintergerste. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **30**, 184-185.
- HVID, S., G. NIELSEN 1977: Esterase isozyme variants in barley. *Hereditas* **87**, 155-162.
- IIDA, Y., T. KONISHI 1994: Linkage analysis of a resistance gene to Barley Yellow Mosaic Virus strain-II in 2-rowed barley. *Breeding Science* **44**, 191-194.
- IKATA, S., I. KAWAI 1940: Studies on wheat yellow mosaic disease. *Noji Kairyo Shiryo* **154**, 1-123 (zit. in INOUE und SAITO 1975).
- INOUE, T., Y. SAITO 1975: Barley Yellow Mosaic Virus. *CMI/AAB Description Plant Viruses No. 143*, 4 Seiten.
- ISLAM, A. K. R. M., K. W. SHEPHERD, D. H. B. SPARROW 1981: Isolation and characterization of euplasmic wheat-barley chromosome addition lines. *Heredity* **46**, 161-174.
- JAASKA, V. E. 1981: Genetic polymorphism of aspartate aminotransferase in rye species. *Soviet. Genetics* **17**, 372-379.
- JAHOOR, A., A. JACOBI, M. E. SCHÜLLER, G. FISCHBECK 1993: Genetical and RFLP studies at the *Mla* locus conferring powdery mildew resistance in barley. *Theor. Appl. Genet.* **85**, 713-718.
- JIN, Y., G. D. STATLER, J. D. FRANCOWIAK, B. J. STEFFENSON 1993: Linkage between leaf rust resistance genes and morphological markers in barley. *Phytopathology* **83**, 230-233.
- JIN, Y., B. J. STEFFENSON, H. E. BOCKELMAN 1995: Evaluation of cultivated and wild barley for resistance to pathotypes of *Puccinia hordei* with wide virulence. *Genetic Resources and Crop Evolution* **42**, 1-6.

- JIN, Y., G. H. CUI, B. J. STEFFENSON, J. D. FRANCKOWIAK 1996: New leaf rust resistance genes in barley and their allelic and linkage relationships with other *Rph* genes. *Phytopathology* **86**, 887-890.
- JIN, Y., J. D. FRANCKOWIAK 1997: Barley Genetic Stock 88: Reaction to *Puccinia hordei* 2. *Barley Genet. Newsl.* **26**, 126-127.
- JONES, C. J., K. J. EDWARDS, S. CASTAGLIONE, M. O. WINFIELD, F. SALA, C. VAN DE WIEL, G. BREDEMEIJER, B. VOSMAN, M. MATTHES, A. DALY, R. BRETTSCHEIDER, P. BETTINI, M. BUIATTI, E. MAESTRI, A. MALCEVSCI, N. MARMIROLI, R. AERT, G. VOLCKAERT, J. RUEDA, R. LINACERO, A. VAZQUEZ, A. KARP 1997: Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* **3**, 381-390.
- JØRGENSEN, J. H. 1992: Multigene families of powdery mildew resistance genes in locus *Mla* on barley chromosome 5. *Plant Breeding* **108**, 53-59.
- KAHLER, A. L., R. W. ALLARD 1970: Genetics of isozyme variants in barley. I. Esterases. *Crop Science* **10**, 444-448.
- KASHA, K. J., A. KLEINHOF 1994: Mapping of barley cross Harrington x TR306. *Barley Genet. Newsl.* **23**, 65-69.
- KASHIWAZAKI, S., K. OGAWA, T. USUGI, T. OMURA, T. TSUCHIZAKI 1989: Characterization of several strains of barley yellow mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **55**, 16-25.
- KASHIWAZAKI, S. 1996: The complete nucleotide sequence and genome organization of barley mild mosaic virus (Na1 strain). *Archives of Virology* **141**, 2077-2089.
- KELLY, J. D. 1995: Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. *Hortscience* **30**, 461-465.
- KICHERER, S., U. WALTHER, A. GRANER 1998: Untersuchungen von Nachkommenschaften von *Hordeum spontaneum* im Hinblick auf neue Resistenzgene gegen den Zwergrost der Gerste (*Puccinia hordei*). *Vortr. Pflanzenzüchtg.* **42**, 34-35.
- KING, J. E., R. W. POLLEY 1976: Observations on the epidemiology and effect on grain yield of brown rust in spring barley. *Plant Pathology* **25**, 63-73.
- KLEINE, M., W. MICHALEK, T. DIEFENTHAL, H. DARGATZ, C. JUNG 1997: Construction of a *Mlu*I-YAC library from barley (*Hordeum vulgare* L.) and analysis of YAC insert terminal regions. *Genome* **40**, 896-902.
- KLEINHOF, A., A. KILIAN, M. A. SAGHAI-MAROOF, R. M. BIYASHEV, P. HAYES, F. Q. CHEN, N. LAPITAN, A. FENWICK, T. K. BLAKE, V. KANAZIN, E. ANANIEV, L. DAHLEEN, D. KUDRNA, J. BOLLINGER, S. J. KNAPP, B. LIU, M. SORRELLS, M. HEUN, J. D. FRANCKOWIAK, D. HOFFMAN, R. SKADSEN, B. J. STEFFENSON 1993: A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theor. Appl. Genet.* **86**, 705-712.
- KLEINHOF, A. 1996: NABGMP mapping update. *Barley Genet. Newsl.* **25**, 62-71; aktuelle Kartierungsdaten unter der Internet-Adresse: [http://gnome.agrenv.mcgill.ca/maps/sm\\_list.htm](http://gnome.agrenv.mcgill.ca/maps/sm_list.htm).
- KONISHI, T., T. BAN, Y. IIDA, R. YOSHIMI 1997: Genetic analysis of disease resistance to all strains of BaYMV in a Chinese barley landrace, Mokusekko 3. *Theor. Appl. Genet.* **94**, 871-877.

- KOSAMBI, D. D. 1944: The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* **12**, 172-175.
- KUMAR, A. 1996: The adventures of the *Ty1-copia* group of retrotransposons in plants. *Trends in Genetics* **12**, 41-43.
- LANDER, E. S., P. GREEN, J. ABRAHAMSON, A. BARLEOW, M. J. DALY, S. E. LINCOLN, L. NEWBURG 1987: MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**, 174-181.
- LANGRIDGE, P., R. Q. GIO, M. FRANCKI, U. LANGRIDGE 1998: Isolation of lambda and YAC clones from defined regions of the rye genome. *Mol. Gen. Genet.* **257**, 568-575.
- LAPIERRE, H. 1980: Nouvelles maladies à virus sur céréales d'hiver. *Le Productuert Agricole Français* **56**, 11.
- LAURIE, D. A., J. W. SNAPE, M. D. GALE 1992: DNA marker techniques for genetic analysis in barley. In: SHEWRY, P. R. (ed.) *Barley: Genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology*. C A B International, Wallingford, 115-132.
- LEGOUIS, J., M. ERDOGAN, W. FRIEDT, F. ORDON 1995: Potential and limitations of isozymes for chromosomal localization of resistance genes against barley mild mosaic virus (BaMMV). *Euphytica* **82**, 25-30.
- LEVINE, M. N., W. J. CHEREWICK 1952: Studies on dwarf leaf rust of barley. *US Dept. Agr. Techn. Bull.* **1056**, 1-17.
- LINCOLN, S. E., M. J. DALY, E. S. LANDER 1992: Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/EXP version 3.0. Technical Report 2nd Edition Whitehead Institute.
- LIU, Z. W., R. M. BIYASHEV, M. A. S. MAROOF 1996: Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theor. Appl. Genet.* **93**, 869-876.
- LOARCE, Y., R. GALLEGRO, E. FERRER 1996: A comparative analysis of the genetic relationships between rye cultivars using RFLP and RAPD markers. *Euphytica* **88**, 107-115.
- MALYSHEV, S. V., N. A. KARTEL 1997: Molecular markers in mapping of plant genomes. *Molecular Biology* **31**, 163-171.
- MANISTERSKI, J., L. TREEFUL, J. R. TOMERLIN, Y. ANIKSTER, J. G. MOSEMAN, I. WAHL, R. D. WILCOXSON 1986: Resistance of wild barley accessions from Israel to leaf rust collected in the USA and Israel. *Crop Science* **26**, 727-730.
- MAROQUIN, C., M. CAVELIER, A. RASSEL 1982: Premières observations sur le virus de la mosaïque jaune de l'orge en Belgique. *Bulletin des Recherches Agronomique de Gembloux* **17**, 157-176.
- MCDANIEL, M. E., B. R. HATHCOCK 1969: Linkage of the *Pa<sub>4</sub>* and *Ml<sub>a</sub>* loci in barley. *Crop Science* **9**, 822.
- MEYER, M., J. T. DESSENS 1996: The complete nucleotide sequence of barley mild mosaic virus RNA1 and its relationship with other members of the Potyviridae. *Virology* **219**, 268-273.

- MICHALEK, W., G. WENZEL, A. JAHOR 1995: Techniques for the identification of yeast artificial chromosomes (YACs) in a YAC-library with RFLP-markers closely linked to genes of interest. *Barley Genet. Newsl.* **24**, 117-121.
- MICHELMORE, R. W., I. PARAN, R. V. KESSELI 1991: Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 9828-9832.
- MIYAMOTO, Y., S. MIYAMOTO, T. TAKEUCHI, T. GOTO, H. HAYASHI 1965: On the infectious microorganisms in the soil-borne cereal mosaics infested soil stored under dry conditions. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **30**, 300 (zit. in USUGI 1988).
- MORTON, N. E. 1995: Sequential tests for the detection of linkage. *Amer. J. Hum. Genet.* **7**, 277-318.
- MOSEMAN, J. G., D. A. REID 1961: Linkage relationship of genes conditioning resistance to leaf rust and powdery mildew. *Crop Science* **1**, 425-427.
- NEI, M. 1973: Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 3321-3323.
- NEWTON, M., B. PETURSON, O. S. MEREDITH 1945: The effect of leaf rust of barley on the yield and the quality of barley varieties. *Canad. Journ. of Research* **23**, 212 - 218.
- NIELSEN, G., H. B. JOHANSEN 1985: Proposal for the identification of barley varieties based on the genotypes for 2 hordein and 39 isoenzyme loci of 47 reference varieties. *Euphytica* **356**, 717-728.
- ORDON, F. 1992: Genetische Analyse der Resistenz exotischer Gersten gegen bodenbürtige, mosaikinduzierende Viren. Reihe Agrarwissenschaften, Verlag Shaker, Aachen.
- ORDON, F., W. FRIEDT 1993: Mode of inheritance and genetic diversity of BaMMV resistance of exotic barley germplasms carrying genes different from 'ym4'. *Theor. Appl. Genet.* **86**, 229-233.
- ORDON, F., R. GÖTZ, W. FRIEDT 1993: Genetic stocks resistant to barley yellow mosaic viruses (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) in Germany. *Barley Genet. Newsl.* **23**, 44-48.
- PANAUD, O., X. CHEN, S. R. MCCOUCH 1996: Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* **252**, 597-607.
- PARLEVLIT, J. E. 1986: Pleiotrophic association of infection frequency and latent period of two barley cultivars partially resistant to barley leaf rust. *Euphytica* **35**, 267-272.
- PASTEUR, N., G. PASTEUR, F. BONHOMME, J. CATALAN, J. BRITTON-DAVIDIAN 1988: Practical isozyme genetics. Ellis Horwood Limited, England.
- PEARCE, S. R., G. HARRISON, D. LI, J. S. HESLOP-HARRISON, A. KUMAR, A. J. FLAVELL 1996a: The *Ty1-copia* group retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localisation. *Mol. Gen. Genet.* **250**, 305-315.
- PEARCE, S. R., U. PICH, G. HARRISON, A. J. FLAVELL, J. S. HESLOP-HARRISON, I. SCHUBERT, A. KUMAR 1996b: The *Ty1-copia* group retrotransposons of *Allium cepa* are distributed throughout the chromosomes but are enriched in the terminal heterochromatin. *Chromosome Res.* **4**, 357-364.

- PEDERSEN, C., H. GIESE, I. LINDE-LAURSEN 1995: Towards an integration of the physical and the genetic chromosome maps of barley by *in situ* hybridisation. *Hereditas* **123**, 77-88.
- PEERENBOOM, E., M. POLS, J. SCHELL, H. H. STEINBISS, A. D. DAVIDSON 1992: The complete nucleotide sequence of RNA 1 of a German isolate of barley yellow mosaic virus and its comparison with a Japanese isolate. *J. Gen. Virol.* **73**, 1303-1308.
- PEERENBOOM, E., V. JACOBI, J. F. ANTONIW, U. SCHLICHTER, E. J. CARTWRIGHT, H. H. STEINBISS, M. J. ADAMS 1996: The complete nucleotide sequence of RNA-2 of a fungally-transmitted UK isolate of barley mild mosaic bymovirus and identification of amino acid combinations possibly involved in fungus transmission. *Virus Research* **40**, 149-159.
- PEERENBOOM, E., E. J. CARTWRIGHT, I. FOULDS, M. J. ADAMS, R. STRATFORD, A. ROSNER, H. H. STEINBISS, J. F. ANTONIW 1997: Complete RNA1 sequences of two UK isolates of barley mild mosaic virus: A wild-type fungus-transmissible isolate and a non-fungus-transmissible derivative. *Virus Research* **50**, 175-183.
- PROCHNOW, J. 1998: Selektion eines 500 Sippen umfassenden Sortimentes *Hordeum spontaneum* conv. Koch auf qualitative und quantitative Resistenz gegen den Zwergrost (*Puccinia hordei* Otth.) unter Berücksichtigung weiterer pilzlicher Blattpathogene der Gerste. Dissertation, Universität Halle.
- QI, X., P. STAM, P. LINDHOUT 1996: Comparison and integration of four barley genetic maps. *Genome* **39**, 379-394.
- QI, X., P. STAM, P. LINDHOUT 1998: Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. *Theor. Appl. Genet.* **96**, 376-384.
- ROANE, C.W. 1962: Inheritance of reaction to *Puccinia hordei* in barley. I. Genes for resistance among North American race differentiating varieties. *Phytopathology* **52**, 1288-1295.
- ROANE, C.W., T. M. STARLING 1967: Inheritance of reaction to *Puccinia hordei* in barley. II. Gene symbols for loci in differential cultivars. *Phytopathology* **57**, 66-68.
- ROANE, C. W., T. M. STARLING 1970: Inheritance of reaction to *Puccinia hordei* in barley. III. Genes in the cultivars Cebada Capa and Franger. *Phytopathology* **60**, 788-790.
- RÖDER, M. S., J. PLASCHKE, S. U. KÖNIG, A. BÖRNER, M. E. SORRELLS, S. D. TANKSLEY, M. W. GANAL 1995: Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 327-333.
- ROHDE, W. 1996: Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in the plant and animal kingdom. *J. Genet. & Breed.* **50**, 249-261.
- ROMMENS, C. M. T., J. M. SALMERON, G. E. D. OLDROYD, B. J. STASKAWICZ 1995: Intergeneric transfer and functional expression of the tomato disease resistance gene *Pto*. *Plant Cell* **7**, 1537-1544.
- RUSSELL, J. R., J. D. FULLER, M. MACAULAY, B. G. HATZ, A. JAHOR, W. POWELL, R. WAUGH 1997: Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* **95**, 714-722.
- SAAL, B. 1997: Die Nutzung neuerer PCR-gestützter molekularer Markertechniken zur Erstellung einer dicht besetzten Kopplungskarte des Roggens (*Secale cereale* L.). Dissertation, Universität Hannover.

- SAGHAI-MAROOF, M. A., R. M. BIYASHEV, G. P. YANG, Q. ZHANG, R. W. ALLARD 1994: Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5466-5470.
- SALMENKALLIO-MARTTILA, M., K. ASPEGREN, S. ÅKERMAN, U. KURTÉN, L. MANNONEN, A. RITALA, T. H. TEERI, V. KAUPPINEN 1995: Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) by electroporation of protoplasts. *Plant Cell Reports* **15**, 301-304.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, T. MANIATIS 1989: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Lab Press, Second Edition.
- SAUNDERS, E. R. 1915: The double stock, its history and behaviour. *J. Roy. Hort. Soc.* **40**, 450-472.
- SAXENA, K. M. S., A. L. HOOKER 1968: On the structure of a gene for disease resistance in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61**, 1300-1305.
- SENSI, E., R. VIGNANI, W. ROHDE, S. BIRICOLTI 1996: Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. *Vitis* **35**, 183-188.
- SHAW, C. R., R. PRASAD 1970: Starch gel electrophoresis - a compilation of recipes. *Biochem. Genet* **4**, 297-320.
- SITTE, P., H. ZIEGLER, F. EHRENDORFER, A. BRESINSKY 1991: *Lehrbuch der Botanik für Hochschule*, begr. von E. STRASBURGER. 33. Aufl. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.
- SONG, W. Y., G. L. WANG, L. L. CHEN, H. S. KIM, L. Y. PI, T. HOLSTEN, J. GARDNER, B. WANG, W. X. ZHAI, L. H. ZHU, C. FAUQUET, P. RONALD 1995: A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* **270**, 1804-1806.
- STATLER, G. D., J. E. PARLEVIET 1987: Factors related to partial resistance of barley to leaf rust. *Phytopathology* **77**, 549-551.
- STAUB, J. E., F. C. SERQUEN, M. GUPTA 1996: Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hortscience* **31**, 729-740.
- STEFFENSON, B. J., Y. JIN, C. A. GRIFFEY 1993: Pathotypes of *Puccinia hordei* with virulence for the barley leaf rust resistance gene *Rph7* in the United States. *Plant Disease* **77**, 867-869.
- STEGEMANN, H., W. BURGERMEISTER, H. FRANCKSEN, E. KRÖGERRECKLENFORT 1983: Gelelektrophorese und Isoelektrische Fokussierung. *PAGE-Manual*. Inst. Biochemie, BBA, Braunschweig.
- STEYER, S., J. KUMMERT, F. FROIDMONT 1995: Characterization of a resistance-breaking BaYMV isolate from Belgium. *Agromomie* **15**, 433-438.
- SUITER, K. A., J. F. WENDEL, J. S. CASE 1983: Linkage-1: A PASCAL computer program for the detection and analysis of genetic linkage. *J. Heredity* **74**, 203-304.
- SUONIEMI, A., K. ANAMTHAWAT-JÓNSSON, T. ARNA, A. H. SCHULMAN 1996: Retrotransposon *BARE-1* is a major, dispersed component of the barley (*Hordeum vulgare* L.) genome. *Plant Mol. Biol.* **30**, 1321-1329.

- TAKAHSHI, R., J. HAYASHI, T. INOUE, I. MORIYA, C. HIRAO 1973: Studies on resistance to yellow mosaic disease in barley. I. Tests for varietal reactions and genetic analysis of resistance to the disease. *Ber. Ohara Inst.* **16**, 1-17.
- TAN, B. H. 1976: Recovery and identification of physiologic races of *Puccinia hordei* from winter barley. *Cereal rusts Bull.* **4**, 36 - 39.
- TAN, B. H. 1977: A new gene for resistance to *Puccinia hordei* in certain Ethiopian barleys. *Cereal Rust Bull.* **5**, 39-43.
- TANKSLEY, S. D., M. W. GANAL, G. B. MARTIN 1995: Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends Genet.* **11**, 63-68.
- TENG, P. S., R. C. CLOSE, M. J. BLACKIE 1979: Comparison of models for estimating yield loss caused by leaf rust (*Puccinia hordei*) on 'Zephyr' barley in New Zealand. *Phytopathology* **69**, 1234-1239.
- THILMONY, R. L., Z. CHEN, R. A. BRESSAN, G. B. MARTIN 1995: Expression of the tomato *Pto* gene in tobacco enhances resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* expressing *avrPto*. *Plant Cell* **7**, 1529-1536.
- TINGAY, S., D. MCELROY, R. KALLA, S. FIEG, M. B. WANG, S. THORNTON, R. BRETTELL 1997: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant Journal* **11**, 1369-1376.
- TOOJINDA, T., E. BAIRD, A. BOOTH, L. BROERS, P. HAYES, W. POWELL, W. THOMAS, H. VIVAR, G. YOUNG 1998: Introgression of quantitative trait loci (QTLs) determining stripe rust resistance in barley: an example of marker-assisted line development. *Theor. Appl. Genet.* **96**, 123-131.
- TULEEN, N. A., M. E. MCDONALD 1971: Location of genes *Pa* and *Pa5*. *Barley Newsl.* **15**, 106-107.
- UKAI, Y. 1984: Genetic analysis of a mutant resistant to barley yellow mosaic virus. *Barley Genet. Newsl.* **14**, 31-33.
- USUGI, T. 1988: Epidemiology and management in Japan of soil-borne cereal mosaic viruses with filamentous particles. In: COOPER, J. I., M. J. C. ASHER (eds.) *Developments in Applied Biology 2. Viruses with fungal vectors*, 213-225.
- UPHOFF, H. 1994: Erstellung einer genetischen Karte bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.) mit Hilfe von RAPD-Markern. Dissertation, Universität Hannover.
- VAN DER VOORT, J. N. A. M. R., P. VAN ZANDVOORT, H. J. VAN ECK, R. T. FOLKERTSMA, R. C. B. HUTTEN, J. DRAAISTRA, F. J. GOMMERS, E. JACOBSEN, J. HELDER, J. BAKKER 1997: Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. *Mol. Gen. Genet.* **255**, 438-447.
- VOGEL, J. M., A. RAFALSKI, W. POWELL, M. MORGANTE, E. ANDRA, M. HANAFEY, S. V. TINGEY 1996: Application of genetic diagnostics to plant genome analysis and plant breeding. *Hortscience* **31**, 1107-1108.
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, M. HORNES, A. FRIJTERS, J. POT, J. PELEMAN, M. KULPER, M. ZABEAU 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4407-4414.

- WAGNER, H., W. E. WEBER, G. WRICKE 1992: Estimation linkage relationships of isoenzyme markers and morphological markers in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) including families with distorted segregations. *Plant Breeding* **108**, 89-96.
- WAUGH, R., N. BONAR, E. BAIRD, B. THOMAS, A. GRANER, P. HAYES, W. POWELL 1997: Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Mol. Gen. Genet.* **255**, 311-321.
- WEBER, W. E., G. WRICKE 1994: Genetic markers in plant breeding. *Advances in Plant Breeding* 16. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin und Hamburg.
- WHITE, S. E., L. F. HABERA, S. R. WESSLER 1994: Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes: a role for *copia*-like elements in the evolution of gene structure and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11792-11796.
- WILLIAMS, J. G. K., A. R. KUBELIK, K. J. LIVAK, J. A. RAFALSKI, S. V. TINGEY 1990: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6531-6535.
- WRICKE, G., P. WILDE, P. WEHLING, C. GIESELMANN 1993: An isozyme marker for pollen fertility restoration in the Pampa cms system of rye (*Secale cereale* L.). *Plant Breeding* **111**, 290-294.
- WRICKE, G. 1996: Use of genetic markers in rye breeding. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* **35**, 263-272.
- WRICKE, G., P. DILL, P. SENFT 1996: Linkage between a major gene for powdery mildew resistance and an RFLP marker on chromosome 1R of rye. *Plant Breeding* **115**, 71-73.
- ZABEAU, M, P. VOS 1993: Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application, Publication number EP 0534858.
- ZELLER, F. J., C. FUCHS 1983: Cytologie und Kranheitsresistenz einer 1A/1R und mehrerer 1B/1R Weizen-Roggen-Translokationssorten. *Z. Pflanzenzüchtg.* **90**, 285-296.
- ZHOU, J., Y. T. LOH, R. A. BRESSAN, G. B. MARTIN 1995: The tomato gene *Pti1* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response. *Cell* **83**, 925-935.

# Anhang A

## Verwendete Sonden

**Tab. A.1:** Für die RFLP-Analysen verwendete Sonden.

Sonde	Vektor	Klonierungs- enzym(e)	DNA-Herkunft	Insertgröße [kbp]	Chr. <sup>a</sup>	Ref. <sup>b</sup>
ABC162	pBS	<i>EcoRI</i>	<i>H. vulgare</i> , cDNA	0,30	2H	[1]
ABC167	pBS	<i>EcoRI</i>	<i>H. vulgare</i> , cDNA	0,25	2H, 7H	[1]
ABC256	pBS	<i>EcoRI</i>	<i>H. vulgare</i> , cDNA	0,65	2H	[1]
ABG002	pGEM	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,34	2H	[1]
ABG014	pGEM	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,70	2H	[1]
ABG358	pGEM	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,38	2H	[1]
ABG602	pGEM	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,50	2H	[1]
ABG701	pGEM	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,30	7H	[1]
CDO580	pBS SK-	<i>EcoRI</i> + <i>XhoI</i>	<i>Avena sativa</i> , cDNA	1,00	1H	[2]
CDO665	pBS SK-	<i>EcoRI</i> + <i>XhoI</i>	<i>Avena sativa</i> , cDNA	0,90	2H	[2]
MWG003	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,90	7H	[3]
MWG010	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,30	3H	[3]
MWG011	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,32	4H	[3]
MWG029	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,59	4H	[3]
MWG032	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,31	4H	[3]
MWG041	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,10	3H	[3]
MWG042	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,88	4H	[3]
MWG058	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,12	4H	[3]
MWG063	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,56	5H	[3]
MWG082	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,72	2H	[3]
MWG502	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,90	5H	[3]
MWG506	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,50	1H	[3]
MWG514	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,00	6H	[3]
MWG517	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,00	4H	[3]
MWG518	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,50	1H	[3]
MWG520	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,80	2H	[3]
MWG530	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,80	7H	[3]
MWG533	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,30	5H	[3]
MWG539	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,20	7H	[3]
MWG546	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,00	3H	[3]
MWG582	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,60	3H	[3]
MWG584	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,90	3H	[3]
MWG595	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,80	3H	[3]
MWG596	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,10	5H	[3]
MWG602	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,50	5H	[3]
MWG604	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,10	5H	[3]
MWG611	pBS	<i>PstI</i>	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,80	4H	[3]

Tab. A.1: Fortsetzung.

Sonde	Vektor	Klonierungs- enzym(e)	DNA-Herkunft	Insertgröße [kbp]	Chr. <sup>a</sup>	Ref. <sup>b</sup>
MWG616	pBS	<i>Pst</i> I	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,60	4H	[3]
MWG620	pBS	<i>Pst</i> I	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,00	6H	[3]
MWG634	pBS	<i>Pst</i> I	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,70	4H	[3]
cMWG652	pBS	<i>Eco</i> RI	<i>H. vulgare</i> , cDNA	1,00	6H	[3]
cMWG653	pBS	<i>Eco</i> RI	<i>H. vulgare</i> , cDNA	0,50	6H	[3]
cMWG669	pBS	<i>Eco</i> RI	<i>H. vulgare</i> , cDNA	2,00	6H	[3]
cMWG703	pBS	<i>Eco</i> RI	<i>H. vulgare</i> , cDNA	1,20	7H	[3]
cMWG706	pBS	<i>Eco</i> RI	<i>H. vulgare</i> , cDNA	0,75	1H	[3]
cMWG720	pBS	<i>Eco</i> RI	<i>H. vulgare</i> , cDNA	0,50	2H	[3]
MWG800	pBS	<i>Pst</i> I	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,80	1H	[3]
MWG808	pBS	<i>Pst</i> I	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,50	7H	[3]
MWG865	pBS	<i>Pst</i> I	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,60	2H	[3]
MWG877	pBS	<i>Pst</i> I	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,60	5H	[3]
MWG878	pBS	<i>Pst</i> I	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,80	2H	[3]
MWG897	pBS	<i>Pst</i> I	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,20	6H	[3]
MWG913	pBS	<i>Pst</i> I	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,45	1H	[3]
MWG932	pBS	<i>Pst</i> I	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,80	3H	[3]
MWG938	pBS	<i>Pst</i> I	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,70	1H	[3]
MWG950	pBS	<i>Pst</i> I	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,40	2H	[3]
MWG973	pBS	<i>Pst</i> I	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,70	3H	[3]
MWG976	pBS	<i>Pst</i> I	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,90	3H	[3]
MWG2033	pBS	<i>Pst</i> I	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	1,00	4H	[3]
MWG2037	pBS	<i>Pst</i> I	<i>H. vulgare</i> , gen. DNA	0,70	4H	[3]

<sup>a</sup> Chromosom<sup>b</sup> Referenz:

[1] A. KLEINHOFS, Department of Crop and Soil Sciences, Washington State University, Pullman

[2] M. SORRELLS, Department of Plant Breeding &amp; Biometry, Cornell University, Ithaca

[3] A. GRANER, IPK Gatersleben, Deutschland

# Anhang B

## Genotypen der untersuchten Pflanzen

Tab. B.1: Genotypen von 102 Pflanzen der Population 361 an 39 spaltenden Loci.

Nr.	BaYMV-2	Zeiligkeit	Isoenzym <i>Est-1</i>	Mikrosatelliten				
				HVLEU	HVM60	HVM68	HVRCABG	HVWAXYG
3/ 1	resistent	zz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	-	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>
3/ 2	resistent	zz	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>
3/ 3	resistent	zz	-	-	<i>hom1</i>	-	-	-
3/ 4	resistent	zz	-	-	-	-	-	-
3/ 5	anfällig	mz	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>
3/ 6	-	zz	-	-	-	-	-	-
3/ 7	anfällig	zz	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>
3/ 8	resistent	mz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>
3/ 9	resistent	mz	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	-
3/ 10	anfällig	zz	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>
3/ 11	resistent	zz	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>
3/ 12	resistent	zz	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>
3/ 13	anfällig	zz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>
3/ 14	anfällig	zz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>
3/ 15	resistent	mz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>
3/ 16	resistent	mz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>
3/ 17	anfällig	zz	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>
3/ 18	resistent	mz	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>
3/ 19	anfällig	zz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>
3/ 20	resistent	mz	-	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>
3/ 21	resistent	zz	<i>hom1</i>	-	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>
3/ 22	-	mz	-	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>
3/ 23	anfällig	mz	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>
3/ 24	anfällig	mz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>
3/ 26	resistent	mz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>
3/ 27	anfällig	mz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>
3/ 28	resistent	mz	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>
3/ 30	resistent	mz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	-
3/ 31	anfällig	zz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>
3/ 32	anfällig	mz	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	-	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>
3/ 33	anfällig	zz	-	-	-	-	-	-
3/ 34	anfällig	mz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	-	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>
3/ 35	resistent	mz	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	-	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>
3/ 36	resistent	mz	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	-	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>
3/ 37	resistent	zz	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	-	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>
3/ 38	anfällig	mz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	-	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>
3/ 39	anfällig	mz	-	<i>hom2</i>	-	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>
3/ 40	anfällig	zz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	-	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>
3/ 41	anfällig	zz	-	-	-	-	-	-
3/ 42	resistent	zz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	-	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>
3/ 43	resistent	zz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	-	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>
3/ 44	anfällig	zz	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	-	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>
3/ 45	resistent	mz	-	<i>hom2</i>	-	-	-	-
3/ 46	anfällig	zz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	-	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>
3/ 47	-	mz	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	-	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>
3/ 48	resistent	zz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	-	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	-

Tab. B.1: Fortsetzung.

Nr.	BaYMV-2	Zeiligkeit	Isoenzym <i>Est-1</i>	Mikrosatelliten				
				HVLEU	HVM60	HVM68	HVRCABG	HVWAXYG
3/ 49	anfällig	mz	<i>hom2</i>	-	-	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>
3/ 50	resistent	zz	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	-	-	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>
3/ 51	anfällig	mz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	-	-	-	<i>hom1</i>
3/ 52	resistent	zz	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	-	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>
3/ 53	anfällig	zz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	-	-	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>
3/ 54	resistent	mz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	-	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>
3/ 55	anfällig	zz	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	-	-	<i>hom2</i>	-
3/ 56	-	-	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	-	-	-	-
3/ 57	resistent	mz	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	-	-	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>
3/ 59	resistent	zz	-	-	-	-	-	-
9/ 1	resistent	zz	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	-	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>
9/ 2	resistent	zz	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	-	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>
9/ 3	resistent	mz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	-	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>
9/ 4	anfällig	zz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	-	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>
9/ 5	resistent	zz	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	-	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>
9/ 6	anfällig	zz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	-	-	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>
9/ 7	anfällig	zz	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	-	-	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>
9/ 8	anfällig	mz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	-	-	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>
9/ 9	resistent	mz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	-	-	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>
9/ 10	anfällig	zz	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	-	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>
9/ 11	resistent	mz	-	-	-	-	-	-
9/ 12	anfällig	zz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	-	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>
9/ 13	resistent	mz	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	-	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>
9/ 14	resistent	mz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	-	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	-
9/ 15	resistent	zz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	-	-	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>
9/ 16	resistent	mz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	-	-	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>
9/ 17	resistent	mz	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	-	-	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>
9/ 18	resistent	zz	-	-	-	-	-	-
9/ 20	anfällig	zz	-	<i>hom1</i>	-	-	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>
9/ 21	anfällig	mz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	-	-	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>
9/ 22	anfällig	zz	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	-	-	<i>hom1</i>	-
9/ 23	anfällig	mz	-	-	-	-	-	-
9/ 25	anfällig	zz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	-	-	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>
9/ 26	resistent	mz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	-	-	<i>hom1</i>	-
9/ 27	-	zz	-	-	-	-	-	-
9/ 28	anfällig	zz	-	-	-	-	-	-
9/ 29	resistent	mz	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	-	-	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>
9/ 30	anfällig	zz	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	-	-	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>
9/ 31	resistent	mz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	-	-	<i>hom1</i>	-
9/ 32	anfällig	zz	-	-	-	-	-	-
9/ 33	resistent	zz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	-	-	<i>hom1</i>	-
9/ 34	anfällig	mz	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	-	-	<i>hom1</i>	-
9/ 35	resistent	zz	<i>hom2</i>	-	-	-	-	-
9/ 36	anfällig	mz	<i>hom2</i>	-	-	-	-	-
9/ 38	resistent	mz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	-	-	<i>hom1</i>	-
9/ 39	resistent	zz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	-	-	<i>hom2</i>	-
9/ 40	anfällig	zz	-	-	-	-	-	-
9/ 41	resistent	zz	-	-	-	-	-	-
9/ 42	anfällig	zz	-	-	-	-	-	-
9/ 43	anfällig	zz	-	-	-	-	-	-
9/ 44	resistent	zz	-	-	-	-	-	-
9/ 45	anfällig	mz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	-	-	<i>hom2</i>	-
9/ 46	resistent	mz	<i>hom2</i>	<i>hom2</i>	-	-	<i>hom1</i>	-
9/ 47	anfällig	mz	<i>hom1</i>	<i>hom1</i>	-	-	<i>hom2</i>	-
9/ 48	anfällig	mz	<i>hom1</i>	<i>hom2</i>	-	-	<i>hom2</i>	-
9/ 49	resistent	zz	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	-	-	<i>hom1</i>	-

Tab. B.1: Fortsetzung.

Nr.	RFLPs									
	MWG 3 <i>Bam</i> HI	MWG 10 <i>Bam</i> HI	MWG 63A <i>Xba</i> I	MWG 63B <i>Xba</i> I	MWG 514 <i>Xba</i> I	MWG 517 <i>Hind</i> III	MWG 530 <i>Hind</i> III	MWG 595 <i>Bam</i> HI	MWG 652 <i>Bam</i> HI	MWG 703 <i>Xba</i> I
3/ 1	hom2	-	-	-	-	hom1	hom1	hom1	-	-
3/ 2	hom1	hom1	hom1	hom1	hom1	hom1	hom2	hom2	hom2	hom1
3/ 3	-	-	-	-	-	hom2	hom1	-	-	-
3/ 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3/ 5	hom1	hom1	hom2	hom2	hom1	hom1	hom1	hom1	hom1	hom2
3/ 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3/ 7	hom1	hom1	hom1	hom2	hom1	-	-	hom1	hom2	hom2
3/ 8	hom1	hom2	hom2	hom1	hom2	hom2	hom2	hom2	hom2	hom2
3/ 9	hom2	hom1	hom2	hom2	hom1	hom2	hom1	hom1	hom1	hom2
3/ 10	-	-	-	-	-	hom2	hom1	hom1	-	-
3/ 11	hom1	hom1	hom1	hom1	hom2	hom1	hom1	hom2	hom2	hom2
3/ 12	hom2	hom2	hom2	hom1	hom1	hom1	hom1	hom1	hom1	hom2
3/ 13	hom2	hom2	hom2	hom2	hom1	hom1	hom1	hom1	hom2	hom2
3/ 14	-	-	-	-	-	hom2	hom2	hom1	-	-
3/ 15	-	-	hom2	hom2	hom2	hom1	hom2	hom1	hom1	hom1
3/ 16	hom1	-	hom2	hom1	hom1	hom2	hom2	hom1	hom2	hom1
3/ 17	hom2	-	hom1	hom1	hom2	hom2	hom2	hom1	hom1	hom1
3/ 18	hom2	-	hom1	hom1	-	hom1	hom1	hom2	hom2	hom2
3/ 19	hom2	hom2	hom2	hom1	hom1	hom1	hom1	hom2	hom1	hom2
3/ 20	hom2	hom2	hom2	hom1	hom2	hom1	hom2	hom2	hom1	hom1
3/ 21	hom2	hom1	hom2	hom1	hom2	hom2	hom2	hom2	hom1	hom1
3/ 22	-	hom1	hom1	hom2	-	hom2	hom1	hom1	hom1	hom2
3/ 23	hom2	hom1	hom1	hom2	-	hom1	hom1	hom1	hom1	hom2
3/ 24	hom2	hom2	hom1	hom1	hom2	hom2	hom2	hom1	hom2	hom1
3/ 26	hom1	hom2	hom1	hom1	-	hom2	hom1	hom2	hom1	hom2
3/ 27	hom2	-	hom2	hom1	-	hom1	hom1	hom1	hom2	hom2
3/ 28	hom2	-	hom2	hom2	hom1	hom1	hom1	hom1	hom1	hom2
3/ 30	hom1	hom1	hom2	hom1	hom2	hom1	hom1	hom2	-	hom2
3/ 31	hom2	-	hom2	hom1	hom1	hom1	hom2	hom1	hom1	hom1
3/ 32	hom1	-	hom1	hom2	hom1	hom2	hom1	hom1	hom1	hom2
3/ 33	-	-	-	-	-	hom1	hom2	-	-	-
3/ 34	hom1	hom2	hom2	hom2	hom1	hom2	hom1	-	hom1	hom2
3/ 35	hom1	hom2	hom1	hom2	hom2	hom2	hom2	hom2	hom2	hom1
3/ 36	hom2	hom1	hom2	hom1	hom1	hom1	hom2	hom2	hom1	hom1
3/ 37	hom2	-	hom1	hom1	hom1	hom1	hom2	hom2	hom2	hom1
3/ 38	hom2	-	hom1	hom1	hom2	hom2	hom1	hom1	hom1	hom2
3/ 39	hom1	-	hom1	hom1	hom2	hom2	hom1	hom1	hom2	hom2
3/ 40	hom2	-	hom2	hom2	hom1	hom2	hom2	hom1	hom2	hom2
3/ 41	-	-	-	-	-	hom2	hom1	-	-	-
3/ 42	hom1	-	hom2	hom2	hom2	hom1	hom2	hom2	hom1	hom2
3/ 43	hom1	-	hom2	hom2	-	hom2	hom1	-	hom1	hom2
3/ 44	hom1	-	hom2	hom2	hom2	hom2	hom2	-	hom2	hom1
3/ 45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3/ 46	hom1	-	hom2	hom2	hom2	hom2	hom2	-	-	hom1
3/ 47	hom1	-	hom1	hom2	hom1	hom2	hom2	hom2	hom1	hom1
3/ 48	hom2	-	hom1	hom1	-	hom2	hom1	-	hom1	hom2
3/ 49	-	-	hom1	hom1	-	hom1	hom1	-	hom1	hom2
3/ 50	-	-	hom1	hom1	hom1	hom2	hom2	hom2	-	hom1
3/ 51	-	-	hom2	hom1	-	hom1	hom2	-	-	hom2
3/ 52	-	-	hom1	hom2	-	hom1	hom1	-	hom1	hom2
3/ 53	hom2	-	hom2	hom2	-	hom1	hom1	-	hom1	hom2
3/ 54	hom1	-	hom1	hom2	-	hom2	hom2	hom1	hom2	hom1
3/ 55	hom1	-	hom1	hom2	-	hom1	hom1	hom2	hom1	hom2
3/ 56	hom1	-	hom1	hom1	-	hom2	hom2	hom1	hom1	hom1

Tab. B.1: Fortsetzung.

Nr.	RFLPs									
	MWG 3 <i>Bam</i> HI	MWG 10 <i>Bam</i> HI	MWG 63A <i>Xba</i> I	MWG 63B <i>Xba</i> I	MWG 514 <i>Xba</i> I	MWG 517 <i>Hind</i> III	MWG 530 <i>Hind</i> III	MWG 595 <i>Bam</i> HI	MWG 652 <i>Bam</i> HI	MWG 703 <i>Xba</i> I
3/ 57	<i>hom</i> 1	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1
3/ 59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9/ 1	<i>hom</i> 1	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1
9/ 2	<i>hom</i> 2	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2
9/ 3	<i>hom</i> 1	-	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1
9/ 4	<i>hom</i> 1	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1
9/ 5	<i>hom</i> 1	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1
9/ 6	<i>hom</i> 1	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1
9/ 7	-	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1
9/ 8	<i>hom</i> 2	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2
9/ 9	<i>hom</i> 1	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2
9/ 10	<i>hom</i> 2	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	-	<i>hom</i> 1
9/ 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9/ 12	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	-				
9/ 13	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	-
9/ 14	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	-	-
9/ 15	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	-
9/ 16	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	-	<i>hom</i> 2	-
9/ 17	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	-
9/ 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9/ 20	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	-
9/ 21	-	-	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	-	<i>hom</i> 1	-
9/ 22	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	-
9/ 23	-	-	-	-	-	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	-	-	-
9/ 25	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	-
9/ 26	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	-
9/ 27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9/ 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9/ 29	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	-
9/ 30	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	-	<i>hom</i> 1	-
9/ 31	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	-	<i>hom</i> 2	-
9/ 32	-	-	-	-	-	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	-	-	-
9/ 33	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	-
9/ 34	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	-	-
9/ 35	-	-	-	-	-	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	-	-	-
9/ 36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9/ 38	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	-	<i>hom</i> 1	-				
9/ 39	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	-
9/ 40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9/ 41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9/ 42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9/ 43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9/ 44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9/ 45	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	-
9/ 46	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	-	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	-
9/ 47	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	-	<i>hom</i> 1	-	-	-	<i>hom</i> 2	-
9/ 48	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	-	-	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	-
9/ 49	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 2	<i>hom</i> 1	-	-	<i>hom</i> 1	<i>hom</i> 1	-

Tab. B.1: Fortsetzung.

Nr.	RFLPs				ISTRs					
	MWG 706 <i>EcoRI</i>	MWG 720 <i>EcoRI</i>	MWG 878 <i>EcoRI</i>	MWG 932 <i>BamHI</i>	ISTR01	ISTR02	ISTR03	ISTR04	ISTR05	ISTR06
3/ 1	hom2	hom2	hom1	-	-	-	-	-	-	-
3/ 2	hom1	hom1	hom2	-	-	-	-	-	-	-
3/ 3	-	hom1	-	-	-	-	-	-	-	-
3/ 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3/ 5	hom2	hom1	hom2	hom1	-	-	-	-	-	-
3/ 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3/ 7	hom1	-	hom2	hom1	hom1	hom1	hom1	hom1	hom2	hom2
3/ 8	-	hom1	hom1	-	-	-	-	-	-	-
3/ 9	hom1	hom2	hom2	hom2	-	-	-	-	-	-
3/ 10	hom1	hom1	hom1	hom1	-	-	-	-	-	-
3/ 11	hom1	hom2	hom2	hom2	-	-	-	-	-	-
3/ 12	hom1	hom1	hom2	hom2	-	-	-	-	-	-
3/ 13	hom1	hom1	hom1	hom2	-	-	-	-	-	-
3/ 14	hom1	hom1	hom1	hom2	hom1	hom1	hom1	hom2	hom1	hom2
3/ 15	-	hom2	hom2	hom2	hom1	hom2	hom1	hom1	hom1	hom2
3/ 16	hom1	hom1	hom2	hom1	hom2	hom2	hom2	hom1	hom2	hom2
3/ 17	hom2	hom1	hom1	hom1	-	-	-	-	-	-
3/ 18	-	hom1	hom2	hom1	-	-	-	-	-	-
3/ 19	hom1	hom2	hom2	hom1	hom1	hom2	hom1	hom1	hom2	hom2
3/ 20	hom1	hom2	hom2	hom2	-	-	-	-	-	-
3/ 21	hom2	hom2	hom2	hom1	hom1	hom2	hom2	hom1	hom2	hom2
3/ 22	hom1	hom1	hom2	hom1	-	-	-	-	-	-
3/ 23	hom2	hom2	hom1	hom1	-	-	-	-	-	-
3/ 24	hom2	hom2	hom1	hom2	-	-	-	-	-	-
3/ 26	hom1	hom1	hom2	hom2	hom2	hom2	hom2	hom2	hom2	hom2
3/ 27	-	hom2	hom1	hom1	-	-	-	-	-	-
3/ 28	hom2	hom1	hom1	hom1	hom2	hom2	hom1	hom2	hom2	hom2
3/ 30	hom2	hom1	hom2	hom2	hom2	hom2	hom2	hom1	hom2	hom1
3/ 31	hom1	hom1	hom1	hom1	hom1	hom1	hom1	hom2	hom2	hom1
3/ 32	hom2	hom1	hom2	hom1	hom2	hom1	hom1	hom1	hom2	hom1
3/ 33	-	hom1	-	hom1	-	-	-	-	-	-
3/ 34	-	hom2	hom2	hom2	-	-	-	-	-	-
3/ 35	hom2	hom1	hom1	hom2	hom2	hom1	hom2	hom1	hom2	hom2
3/ 36	hom1	hom2	hom1	hom2	hom2	hom1	hom1	hom1	hom1	hom2
3/ 37	hom1	hom1	hom2	hom1	hom1	hom1	hom1	hom1	hom2	hom2
3/ 38	hom1	hom2	hom2	hom1	-	-	-	-	-	-
3/ 39	hom1	hom2	hom1	hom2	hom2	hom1	hom2	hom1	hom2	hom1
3/ 40	hom1	hom2	hom2	hom1	hom2	hom1	hom1	hom2	hom1	hom1
3/ 41	-	hom2	-	hom1	-	-	-	-	-	-
3/ 42	hom1	hom2	hom2	hom2	-	-	-	-	-	-
3/ 43	-	hom1	-	hom2	-	-	-	-	-	-
3/ 44	hom2	hom2	hom1	hom2	-	-	-	-	-	-
3/ 45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3/ 46	hom1	hom2	hom1	hom2	hom2	hom2	hom1	hom1	hom2	hom2
3/ 47	hom1	hom2	hom1	hom2	-	-	-	-	-	-
3/ 48	-	hom1	-	hom2	-	-	-	-	-	-
3/ 49	-	hom2	hom2	hom2	-	-	-	-	-	-
3/ 50	hom2	hom2	hom2	hom1	-	-	-	-	-	-
3/ 51	hom2	hom1	hom1	hom2	hom1	hom2	hom1	hom2	hom1	hom1
3/ 52	hom2	hom2	hom2	hom1	-	-	-	-	-	-
3/ 53	-	hom1	hom2	hom2	-	-	-	-	-	-
3/ 54	-	hom2	hom1	hom2	-	-	-	-	-	-
3/ 55	hom2	hom1	hom2	hom2	-	-	-	-	-	-
3/ 56	hom1	hom2	hom2	hom1	-	-	-	-	-	-







**Tab. B.2:** Genotypen von 160 Pflanzen (spaltenweise dargestellt) der Population 163 an 6 spaltenden Loci (zeilenweise dargestellt). Gegen BaYMV-2 resistente Pflanzen sind mit dem Buchstaben H gekennzeichnet, anfällige Pflanzen mit A. Für die Isoenzymloci steht der Buchstabe A für den Genotyp *kom1* und H für *kom2*.

Linie 163/2:									
BaYMV-2	HAA-AHAAHH	AH-A-HA-AH	HH--HHAAAH	-HAAH	AAHAAHHAAA	HHAA-HAAAA	AAHAA	-----	H-
<i>Est-1</i>	-----AAH-	-HHA-HAAAH	HH--HAAAH	AH-HAA	--H	AA-AAHAAAA	HHAA-HAAAA	AAHHAHAAHH	HH
<i>Est-2</i>	-----HHA-	-AAH-AHHHA	AA--AHHHA	HA-AHH	--A	HH-HHAHHHH	AAHH-AHHHH	HHAAHAAHAA	AA
<i>Est-4</i>	-----HHA-	-AAH-AHHHA	AA--AHHHA	HA-AHH	--A	HH-HHAHHHH	AAHH-AHHHH	HHAAHAAHAA	AA
<i>Est-9</i>	-----HAH-	-HAA-AHA-A	AH--AHHHA	AH-AAA	--A	HH-AHHAAAH	AAHA-AAAAH	AHHA---AAA	AH
<i>Got-1</i>	-----AAA-	-AHA-HHHAA	AA--HAHAA	AA-HAA	--AH	AA-AAAAAAH	HHAA-AAAAH	AAHHA	----
Linie 163/4:									
BaYMV-2	HHHHHAAA	A-HAHAA	--	AAAAHAAHHA	AAAHAAHAA	HHH			
<i>Est-1</i>	-----A	AH-AHAAH	-	AAAAHAAHH	AAAHAAHAA	HHH			
<i>Est-2</i>	-----H	HA-HAHAA	-	HHHAAHAA	HHAAHAAHH	AAA			
<i>Est-4</i>	-----H	HA-HAHAA	-	HHHAAHAA	HHAAHAAHH	AAA			
<i>Est-9</i>	-----A	AH-HAAHHA	-	HAHAAHAAH	HHAAHAAAH	HAA			
<i>Got-1</i>	-----	-----	-----	-----A	HAAAHAAHAAH	HAH			
Linie 163/8:									
BaYMV-2	HHA-HA-AA	HAAHAAHA	-A	HHH-H	--AH	HHHAAAH	-A	HA	HH
<i>Est-1</i>	-A	-----	HH--H	HAAH	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Est-2</i>	-HAA	-----	--AA--A	A-AH	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Est-4</i>	-HAA	-----	--AA--A	A-AH	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Est-9</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Got-1</i>	--AHH	-----	--AA--A	AAAH	-----	-----	-----	-----	-----



# Anhang C

## Spaltungsergebnisse

**Tab. C.1:** Spaltungsergebnisse und  $\chi^2$ -Werte für die Unabhängigkeit der Randsummen für die in den F<sub>2</sub>-Populationen analysierten Marker.

Pop. <sup>a</sup>	Marker	Genotyp <sup>b</sup>						FG <sup>c</sup>	$\chi^2$ -Wert <sup>d</sup>
		resistent			anfällig				
		<i>hom1</i>	<i>het</i>	<i>hom2</i>	<i>hom1</i>	<i>het</i>	<i>hom2</i>		
5	HVCMA	3	14	3	1	13	2	2	0,80
40/41	Aconitase	5	7	1	10	20	11	2	2,38
	HVBKASI	9	4	1	3	28	14	2	22,07**
	HVCMA	4	3	3	10	14	4	2	1,68
	HVM2	6		3	18		6	1	0,23
	ABC256/ <i>Xba</i> I	2	4	4	10	14	12	2	0,28
	ABG002/ <i>Bam</i> HI	2	7	1	4	26	6	2	0,71
	ABG014/ <i>Bam</i> HI	6	2	2	5	19	11	2	8,96*
	ABG358 / <i>Bam</i> HI	3	5	1	3	18	10	2	3,74
	ABG602/ <i>Xba</i> I	4	4	0	4	17	15	2	8,79*
	CDO665/ <i>Bam</i> HI	3	6		11	21		1	0,00
	MWG082 / <i>Xba</i> I	2	6	2	10	16	7	2	0,50
	MWG878 / <i>Eco</i> RI	2	4	4	10	14	12	2	0,28

<sup>a</sup> Population

<sup>b</sup> *hom1* bezeichnet die Homozygotenklasse mit dem Allel des resistenten Elters

<sup>c</sup> Freiheitsgrade

<sup>d</sup> \* signifikant bei  $\alpha = 0,05$ ; \*\* signifikant bei  $\alpha = 0,01$

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Wricke für die Überlassung des Themas und seine stete Diskussionsbereitschaft. Frau Dr. E. Esch danke ich herzlich für die ausgezeichnete Betreuung und die wertvollen fachlichen Anregungen und Ratschläge. Bei Herrn Prof. Dr. H.-J. Jacobsen möchte ich mich für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Den Mitarbeitern der Zuchtstationen Thüle und Leutewitz der Deutschen Saatveredelung GmbH und speziell Herrn Dipl.-Ing. agr. H. Busch, Herrn Dr. M. Herrmann und Herrn Dr. P. Senft danke ich für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials und die Hilfe bei der Resistenzbonitur sowie für die konstruktiven Anregungen zu dieser Arbeit. Insbesondere gilt mein Dank auch Frau Dr. U. Walther und Herrn Dr. J. Prochnow von der Bundesanstalt für Züchtungsforschung, Aschersleben, für die Überlassung des charakterisierten Pflanzenmaterials und die gute Zusammenarbeit, sowie Frau Wesemann für die Durchführung der ELISA-Tests. Danken möchte ich auch Herrn Dr. W. Rohde vom Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, für seine Bereitschaft, ISTR-Analysen an dem Material durchzuführen.

Allen meinen derzeitigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen aus der Abteilung für Angewandte Genetik danke ich für die vielseitige Unterstützung und anregenden Diskussionen sowie für das ausgesprochen gute Arbeitsklima. An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei der Studentischen Hilfskraft Frau C. Mihr für ihre zuverlässige Mitarbeit bedanken, die mir eine große Hilfe war. Frau Dipl.-Biol. G. Dewal und Frau Dipl.-Ing. agr. M. Niemann danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts und die vielen gemeinsamen Unternehmungen, die sehr zur netten Arbeits- und Lebensatmosphäre beigetragen haben.

Für die finanzielle Unterstützung des Projektes danke ich der Firma Deutsche Saatveredelung GmbH, Lippstadt.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die auf eine ganz andere Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mir stets eine große Hilfe waren. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

# Lebenslauf

Name: Sandra Hunger  
Geboren: 8. Juni 1969 in Hagen  
Familienstand: ledig

## Schulbildung

1975 - 1979                      Gemeinschafts-Grundschule Grundschtötel  
1979 - 1988                      Städtisches Gymnasium Wetter (Ruhr)

## Hochschulausbildung

Sep. 1988 - Juni 1993                      Studium der Biologie an der Ruhr-Universität-Bochum  
seit Sep. 1995                      Promotionsstudium an der Abteilung Angewandte Genetik der  
Universität Hannover

## Fortbildung

Jan. 1994 - Jan. 1995                      Teilnahme am Fortbildungslehrgang "Technisches Umwelt-  
management" bei der Deutschen Angestellten-Akademie in  
Gelsenkirchen

## Berufstätigkeit

Sep. 1995 - Aug. 1997                      wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Abteilung Angewandte  
Genetik der Universität Hannover