

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

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

Literatur:

- Clark, M.F., Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J.Gen. Virol.* **34**, 475-483.
- Dorokhov, D.B., Klocke, E. (1997). A rapid and economic technique for RAPD analysis of plant genomes. *Russ. J. Gen.* **33**, 358-365.
- Habekuss, A., Kühne, T., Krämer, I., Rabenstein, F., Ehrig, F., Ruge-Wehling, B., Huth, W., Ordon, F. (2008). Identification of Barley mild mosaic virus isolates in Germany Breaking rym5 Resistance. *J. Phytopathology* **156**, 36-41.
- Künzel, G., Korzun, L., Meister, A. (2000). Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps of the barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics* **154**, 397-412.
- Niks, R.E., Habekuss, A., Bekele, B., Ordon, F. (2004). A novel major gene on chromosome 6H for resistance of barley against the barley yellow dwarf virus. *Theor Appl Genet* **109**, 1536-1543.
- Nissan-Azzouz, F., Graner, A., Friedt, W., Ordon, F. (2005). Fine-mapping of the BaMMV, BaYMV-1 and BaYMV-2 resistance of barley (*Hordeum vulgare*) accession PI1963. *Theor Appl Genet* **110**, 212-218.
- Perovic, D., Stein, N., Zhang, H., Dresche, A., Prasad, M., Kota, R., Kopahnke, D., Graner, A. (2004). An integrated approach for comparative mapping in rice and barley with special reference to the Rph16 resistance locus. *Funct. Integr. Genomics* **4**, 74-83.
- Sato, K., Nankaku, N., Takeda, K. (2009). A high-density transcript linkage map of barley derived from a single population. *Heredity* **103**, 110-117.
- Stein, N., Graner, A. (2004). Map based gene isolation in cereal genomes. In: *Cereal genomics*, eds. Gupta, P., Varshney, R., pp. 331-360. Kluwer Academic Publishers.
- Stein, N., Herren, G., Keller, B. (2001). A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large genome species such as *Triticum aestivum*. *Plant Breeding* **120**, 354-356.
- Stein, N., Prasad, M., Scholz, U., Thiel, T., Zhang, H., Wolf, M., Kota, R., Varshney, K., Perovic, D., Grosse, I., Graner, A. (2007). A 1000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. *Theor Appl Genet* **114**, 823-839.
- Varshney, R.K., Marcel, T.C., Ramsay, L., Russell, J., Röder, M.S., Stein, N., Waugh, R., Langridge, P., Niks, R.E., Graner, A. (2007). A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theor Appl Genet* **114**, 1091-1103.

Riedel, Christine; Habekuss, Antje; Ordon, Frank

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

Verbesserung der BYDV-Toleranz der Gerste durch Pyramidisierung von Toleranzallelen

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

Zusammenfassung

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

Virusbefall (DAS-ELISA), sowie Wuchs- und Ertragsparameter bestimmt. Die Kombination von *Ryd2* und *Ryd3* führte zu einer signifikanten Verringerung des Virusgehaltes in den Pflanzen im Vergleich zu den genotypisch anfälligen Linien (*ryd2/ryd3*) und solchen mit den entsprechenden einzelnen positiven Allelen. Ebenso konnte zum Teil für diese Kombination (*Ryd2/Ryd3*) im ersten Versuchsjahr eine höhere Leistung im relativen Körnertrag pro Pflanze gegenüber den anderen Genotypen nachgewiesen werden. Der QTL auf Chromosom 2H zeigte hingegen nur eine vergleichsweise geringe Toleranzwirkung.

Stichwörter: Gerstengelverzweigung, BYDV, Gerste, Toleranz, Resistenz, *Ryd2*, *Ryd3*, QTL, Pyramidisierung, molekulare Marker

Abstract

The aphid-transmitted *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) is an important pathogen in cereals. Due to the predicted global warming the importance of this virus will increase in the future. In cereal growing systems this virus is mainly combated by spraying insecticides and by a later sowing date in autumn. In barley breeding the gene *Ryd2* was mainly used, but in the meantime additional sources of tolerance were identified, like the gene *Ryd3* and a QTL on chromosome 2H. The aim of this work is the combination of the tolerance alleles of these three loci by marker assisted selection to improve the level of tolerance against BYDV in barley. To achieve this, doubled haploid (DH) lines out of a cross of tolerant parental lines were genotyped by specific PCR markers with regard to the above mentioned loci. Furthermore, DH lines were investigated in field tests after inoculation with BYDV-PAV to characterize virus attack, growth and yield parameters. The combination of *Ryd2* and *Ryd3* results in a significantly decreased virus attack compared to all other allele combinations. In spring barley this combination leads to a significantly increased relative grain yield.

Keywords: *Barley yellow dwarf virus*, barley, tolerance, resistance, pyramiding, molecular marker, aphid

Einleitung

Das *Barley yellow dwarf virus* (BYDV), gehört zur Gattung *Luteovirus*, Familie *Luteoviridae*, und besitzt ein ssRNA-Genom. Wirtspflanzen sind neben der Gerste alle weiteren Süßgräser (*Poaceae*). BYDV ist weltweit verbreitet und wird persistent durch verschiedene Blattlausarten übertragen, wobei das jeweilige Virusisolat nach dem Hauptvektor benannt ist. In Deutschland und Mitteleuropa ist BYDV-PAV mit den Hauptvektoren *Rhopalosiphum padi* und *Sitobion avenae* am bedeutendsten. Zu den Virussympptomen an der Gerste zählen neben der Verzweigung und Vergilbung der Pflanzen auch eine reduzierte Anzahl ährentragender Halme, ein verzögertes Ährenschieben, sowie eine reduzierte Winterfestigkeit. Durch das periodisch epidemische Auftreten können die genannten Symptome im Anbau zu erheblichen Ertragsverlusten von bis zu 40 % (Lister und Ranier, 1995) führen. Außerdem ist durch die prognostizierten milderen Herbst- und Wintertemperaturen mit einer steigenden Bedeutung zu rechnen, da sich dadurch die Aktivitätsperiode der Blattläuse verlängert. Im Moment stützt sich die Bekämpfung von BYDV in der Praxis hauptsächlich auf die chemische Blattlausbekämpfung, die aber ebenso wie ergänzende ackerbauliche Maßnahmen, wie die Vernichtung des Ausfallgetreides als mögliche Virusquellen und spätere Aussaattermine im Herbst, um einen hohen Infektionsdruck auf die Jungpflanze zu vermeiden, oft aus witterungstechnischen oder betriebswirtschaftlichen Gründen nicht immer erfolgreich durchzuführen sind. Eine Lösung wäre ein direkter Schutz der Pflanze vor dem Virus, wie er durch eine Resistenz bzw. Toleranz gegenüber BYDV gegeben wäre. Es sind mehrere Quellen für eine Toleranz gegen BYDV aus dem primären Genpool der Kulturgerste bekannt, allerdings wurde in der Züchtung bisher nur das Gen *Ryd2* in Gerstensorten eingelagert ('Vixen', 'Naturel'). *Ryd2* (Schaller et al. 1964) auf Chromosom 3H (Collins et al. 1996) stammt ebenso aus Äthiopien, wie das erst vor wenigen Jahren auf Chromosom 6H identifizierte Gen *Ryd3* (Niks et al. 2004). Des Weiteren wurde ein QTL (*Quantitative trait locus*) auf Chromosom 2H in der Akzession 'Post' identifiziert (Scheurer et al. 2001). Für alle drei Loci sind PCR-basierte molekulare Marker bekannt, wodurch eine markergestützte Selektion auf diese Toleranz möglich wird.

Ziel dieser Arbeiten ist die Frage zu klären, ob durch die Kombination der bekannten Toleranzallele *Ryd2*, *Ryd3*, QTL-2H in doppelhaploiden Gerstenlinien eine Erhöhung des Toleranzniveaus gegenüber BYDV erreicht wird, um damit aussichtsreiches Pflanzenmaterial als Grundlage für die Entwicklung toleranter Sorten zur Verfügung zu stellen.

Material und Methoden

Als tolerante Eltern zur Produktion von Wintergersten- bzw. Sommergersten-DH-Linien wurden die Linien 'RIL K4-56' (*Ryd3*) x 'DH136' (*Ryd2*, QTL-2H) und 'RIL K4-56' (*Ryd3*) x 'Coracle' (*Ryd2*) gekreuzt. Durch Mikrosporen- und Antherenkultur wurden anschließend durch die KWS-Lochow GmbH (Bergen) und die Saaten-Union Biotec GmbH (Leopoldshöhe) 474 Wintergersten DH-Linien und 295 Sommergersten DH-Linien *in vitro* erstellt. Die DNA der DH-Linien zur Genotypisierung wurde mit einer Miniprep-Methode nach Stein et al. (2002) extrahiert und für anschließende PCR-Reaktionen in aqua tridest auf 25ng/µl verdünnt. Zur Identifikation des Allels an den Loci *Ryd3* und QTL-2H wurden die SSR-Marker HVM74 (Niks et al. 2004) und HVCSG (Scheurer et al. 2001) verwendet. In beiden Fällen entsteht in der PCR beim Vorhandensein des Toleranzallels ein kürzeres Fragment, als beim Vorliegen des Anfälligkeitsallels (HVM74: 180 bzw. 188; HVCSG: 211 bzw. 219bp). Für den

Nachweis des *Ryd2*-Gens wurde der CAPS-Marker Ylp (Ford et al. 1998) verwendet, dessen PCR-Fragment (311bp) anschließend bei Vorliegen des Anfälligkeits-allels mit einem spezifischen Restriktionsenzym verdaut und somit um 58 Basen verkürzt wird.

Zur Phänotypisierung wurden von 200 DH-Linien je zehn Pflanzen beider Kreuzungen im Feld an vier Standorten in Deutschland (JKI, Quedlinburg; KWS-Lochow GmbH, Bernburg; Nordsaat, Gudow; Saatzucht Ackermann & Co, Irlbach), in zwei Wiederholungen und in zwei Vegetationsperioden (2007/2008, 2008/2009) nach Inokulation mit BYDV-PAV und parallel zum Vergleich als gesunde Kontrollpflanzen untersucht. Die Virusinokulation fand mit Hilfe von virustragenden *Rhopalosiphum padi* (ca. 10 Aphiden/Pflanze) statt, die im Gewächshaus auf die Keimpflanzen aufgebracht wurden. Nach fünf Tagen wurde mit dem Insektizid Confidor behandelt. Ausgepflanzt wurde entsprechend der Witterung an den Standorten Anfang bis Mitte Oktober (Wintergersten) bzw. Anfang April (Sommergersten). Zur Vermeidung von spontanen Virusinfektionen wurden die Feldversuche regelmäßig mit Insektizid behandelt.

Nach Abschluss der Bestockung wurden eine Symptombonitur (1: ohne Symptome, 9: abgestorben) und ein DAS-ELISA nach der Methode von Clark und Adams (1977) durchgeführt. Im weiteren Verlauf wurde die Wuchshöhe, der Termin für das Ährenschieben, sowie zur Ernte die Ährenzahl, der Kornertrag und das Tausendkorngewicht erfasst. Die Toleranz der einzelnen DH-Linien wurde als relative Leistung der infizierten Variante zur gesunden Kontrollvariante berechnet. Für den ELISA wurden 3 (2008) bzw. 10 (2009) Wintergersten DH-Linien und 6 (2008) bzw. 20 (2009) Sommergersten DH-Linien mit je 40 Pflanzen beprobt.

Alle statistischen Analysen wurden mit der Software SAS 9.1 durchgeführt. Die Daten, mit Ausnahme der Boniturnoten, wurden mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Test ($\alpha=0,05$) analysiert. Die ordinal-skalierten Boniturnoten wurden mit einer Bootstrap-Methode nach Neuhäuser und Jöckel (2006) und anschließendem t-Test ausgewertet. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf das erste Jahr der Feldversuche (2007/2008), da die Auswertung des zweiten Jahres noch nicht abgeschlossen ist.

Ergebnisse und Diskussion

Die Genotypisierung aller vorhandenen DH-Linien für die untersuchten Loci ergab eine gleichmäßige Aufspaltung (χ^2 3,04) der Sommergersten-DH-Linien auf die vier möglichen Genotypklassen, wohingegen in den Wintergersten-DH-Linien eine deutliche Abweichung von einer Gleichverteilung festzustellen war (χ^2 74,61).

In der Symptombonitur zeigten die DH-Linien mit *Ryd2* und/oder *Ryd3* im Durchschnitt eine lediglich schwache bis starke Vergilbung (Boniturnoten 2-3). Im Gegensatz dazu führte die Virusinfektion bei DH-Linien ohne Toleranzallele und Linien mit nur dem QTL-2H zu einer deutlichen Verzweigung der Pflanzen (Abbildung 1). Bei der relativen Wuchshöhe, dem Tausendkorngewicht und im Termin des Ährenschiebens zeigte sich ebenfalls nur bei diesen anfälligen Linien ein deutlicher Einfluss der Virusinfektion. Wintergersten und Sommergersten DH-Linien ohne Toleranzallele wiesen im Mittel Ertragsseinbußen von etwa 70 % auf. Bei den Sommergersten ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen allen Allelkombinationen, wobei die Linien mit den beiden Toleranzallelen *Ryd2* und *Ryd3* den höchsten relativen Kornertrag zeigten, gefolgt von Linien mit nur *Ryd3* und jenen mit nur *Ryd2*. In den Wintergersten waren die Linien mit *Ryd2* und/oder *Ryd3* auf einem relativen Ertragsniveau von 90 bis 100 %, der QTL 2H zeigte hier einen deutlich geringeren Effekt (50 %). Die relative Ährenzahl pro Pflanze verhielt sich übereinstimmend mit dem relativen Ertrag.

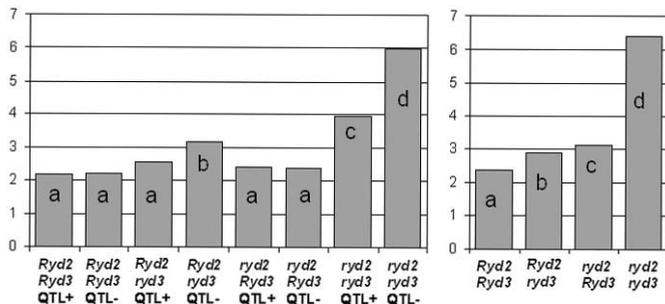


Abb. 1 Mittlere Boniturnote der Wintergersten (links) und der Sommergersten DH-Linien (rechts) für die Allelkombinationen; 1: ohne Symptome, 9: abgestorben

Im ELISA ergab sich in beiden Populationen und in beiden Versuchsjahren eine deutlich verringerte Virusextinktion bei den infizierten Pflanzen der Allelkombinationen mit *Ryd2* und *Ryd3*. Wintergersten mit dieser Kombination erreichten im Mittel lediglich 25 % der ELISA-Extinktion im Vergleich zu den Pflanzen der anderen Allelkombinationen, bei den Sommergersten waren es 50 %. Aufgrund der signifikant reduzierten Werte im ELISA für die DH-Linien mit *Ryd2* und *Ryd3* kann auf einen Einfluss dieser Kombination auf die Virusvermehrung in der

Pflanze geschlossen werden. Das heißt, durch diese Allelkombination wird eine „quantitative Resistenz“ gegenüber BYDV-PAV erzielt. Im Gegensatz dazu konnten Scholz et al. (2009) in *Hordeum bulbosum* ein Majorgen für eine absolute Resistenz identifizieren, das sie als *Ryd4^{thb}* bezeichnen. Im Vergleich zu *Ryd2* und *Ryd3*, die aus dem primären Genpool der Kulturgerste stammen, ist bei *Ryd4^{thb}* zur Beseitigung negativer Effekte aus *Hordeum bulbosum* weitere Züchtungsforschung notwendig, wie zum Beispiel zur Eliminierung eines aufgetretenen Letalfaktors, bis diese Resistenzquelle in der Sortenzüchtung genutzt werden kann.

Danksagung: Die dargestellten Arbeiten sind Teil eines Projektes (PGI-06.01-28-1-41.002-06), das im Rahmen des Programms zur Innovationsförderung durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV), sowie die Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V. (GFP) finanziert wurde. Für diese finanzielle Unterstützung danken wir ebenso wie den kooperierenden Züchtungsunternehmen Dr. J. Ackermann & Co – Saatzucht Irlbach, KWS Lochow GmbH, Nordsaat Saatzuchtgesellschaft mbH und Saaten-Union Biotec GmbH für die Erstellung der DH-Linien bzw. Durchführung der Feldversuche.

Literatur

- Clark, M.F., Adams, A.N., 1977: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J.Gen. Virol.* **34**, 475-483
- Collins, N.C., Paltridge, N.G., Ford, C.M., Symons, R.H., 1996: The Yd2 gene for barley yellow dwarf virus resistance maps close to the centromere on the long arm of barley chromosome 3. *Theor. Appl. Genet.* **92**, 858-864
- Ford, C.M., Paltridge, N.G., Rathjen, J.P., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Symons, R.H., 1998: Rapid and informative assays for Yd2, the barley yellow dwarf virus resistance gene, based on the nucleotide sequence of a closely linked gene. *Molecular Breeding* **4**, 23-31
- Lister, M.R., Ranieri, R., 1995: Distribution and Economic Importance of Barley Yellow Dwarf. In: D'Arcy, C. J., Burnett, P. A. (eds.): *Barley Yellow Dwarf-40 Years of Progress*. APS Press, St. Paul, 29-53.
- Neuhäuser, M., Jöckel, K.-H., 2006: A Bootstrap Test for the Analysis of Microarray Experiments with a Very Small Number of Replications. *Applied Bioinformatics* **5**, 173-179
- Niks, R.E., Habekuss, A., Bekele, B., Ordon, F., 2004: A novel major gene on chromosome 6H for resistance of barley against the barley yellow dwarf virus. *Theor. Appl. Genet.* **109**, 1536-1543
- Schaller, Qualset, C.O., Rutger, J.N., 1964: Inheritance and linkage of the *Yd2* gene conditioning resistance to barley yellow dwarf virus disease in barley. *Crop Sci.* **4**, 544-548
- Scheurer, K.S., Friedt, W., Huth, W., Waugh, R., Ordon, F., 2001: QTL analysis of tolerance to a German strain of BYDV-PAV in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* **103**, 1074-1083
- Scholz, M., Ruge-Wehling, B., Habekuss, A., Schrader, O., Pendinen, G., Fischer, K., Wehling, P., 2009: *Ryd4^{thb}*: a novel resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum* into barley and conferring complete and dominant resistance to the barley yellow dwarf virus. *Theor. Appl. Genet.* **119**, 837-849
- Stein, N., Herren, G., Keller, B., 2001: A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large genome species such as *Triticum aestivum*. *Plant Breeding* **120**, 354-356

Purfürst, Stephanie; Habekuss, Antje; Kopahnke, Doris; Krämer, Ilona; Perovic, Dragan; Cöster, Hilmar; Ordon, Frank

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

Thinopyrum-Arten als Donoren von Resistenzen gegen wichtige Pathogene im Winterweizen (*Triticum aestivum* L.)

Thinopyrum species as donors of resistance against important pathogens in winter wheat (*Triticum aestivum* L.)

Zusammenfassung

In bekannten Kulturformen des Weizens (*Triticum aestivum* L.) werden immer seltener neue Resistenzen gegen wirtschaftlich bedeutende Krankheitserreger (*Oculimacula* spp, *Fusarium culmorum*, *Puccinia tritica* und *Barley yellow dwarf Virus*) identifiziert. Die Identifikation von Resistenzgenen aus der Wildtypform *Thinopyrum* spp. und deren anschließende Nutzung in der Weizenzüchtung ist somit Ziel dieses Projekts. Für ein markergestütztes Rückkreuzungsprogramm stehen zwei Translokationslinien PI583794 und PI611939, als Träger einer *Thinopyrum*-Introgression auf Chromosom 4D, sowie 3 Weizensorten (Boomer, Esket und Mirage) zur Verfügung. Für die phänotypische Charakterisierung wurden diese Linien auf ihre Resistenz gegen die genannten Erreger getestet. Parallel dazu erfolgte die genotypische Charakterisierung. Mit den spezifischen Primern STSJ15 und 2P1/2P2 konnte die Introgression nachgewiesen werden. Zur Bestimmung der Größe des Introgressionsfragments wurden ausgewählte Genotypen der BC₁F₁ und BC₂F₁ mit polymorphen SSRs analysiert, um auf diese Weise Genotypen zu identifizieren, welche ein möglichst kleines Introgressionsfragment aufweisen, jedoch resistent sind.