

Die Übertragung einer hochwirksamen Resistenz gegenüber BYDV aus *Hordeum bulbosum* für die Gersteszüchtung

Introgression of an effective resistance against BYDV from *Hordeum bulbosum* to cultivated barley

Brigitte Ruge-Wehling^{1*}, Janine Wojacki¹, Kristin Fischer¹, Björn Rotter² und Peter Wehling¹

Abstract

Barley yellow dwarf virus (BYDV) causes high yield losses worldwide. Thereby aphids play an important role as virus vectors. Yield losses caused by BYDV may be reduced using virus-tolerance genes from the primary genepool of barley. Additionally, complete resistance to the virus was introgressed from the secondary genepool via interspecific crosses with the tetraploid wild species *Hordeum bulbosum* (*Hb*). Previous studies indicate that this resistance was introgressed to barley chromosome 3HL and is governed by a dominant gene, *Ryd4^{Hb}*. In the present study, a BC₂F₄ mapping population consisting of 140 individuals was used to establish a molecular-marker map for *Ryd4^{Hb}*. To develop molecular markers specific for the introgressed *Hb* segment, three strategies are applied: (i) using anchor markers from the barley genome, (ii) exploiting the orthology of parts of the *Hordeum* genome and the model genome of *Oryza sativa*, and (iii) performing Massive Analysis of cDNA Ends (MACE). Taken together, the approaches provide a potential of approximately 200 markers for the 3HL introgression. So far, 25 markers were mapped on 3HL including ten MACE markers. Three MACE markers are located with a distance of 0.1 to 0.5 cM to *Ryd4^{Hb}* and are of potential use for marker-assisted breeding programmes.

Keywords

Genetic mapping, *Hordeum vulgare*, molecular markers, virus resistance

Einleitung

Eine der bedeutendsten Krankheiten im Wintergersteanbau ist das Gelbverzwergungsvirus (BYDV), welches zu hohen Ertragsverlusten führen kann (LISTER und RANIERI 1995). Das zur Gattung der Luteoviren zählende Virus wird durch Vektoren, am häufigsten durch die Haferblattlaus (*Rhopalosiphum padi*), auf die Gerstepflanzen übertragen. Vor dem Hintergrund des sich vollziehenden Klimawandels ist mit einer wachsenden Bedeutung der Krankheit zu rechnen, weil mit zunehmend warmen Frühwintern ein verstärktes Auftreten der Vektoren zu erwarten ist.

Im aktuellen Getreidesortiment gibt es keine Resistenz, sondern lediglich Toleranz gegenüber BYDV. Die Toleranz vermittelnden Gene *ryd1* (SUNESON 1955), *Ryd2* (SCHALLER et al. 1963) und *Ryd3* (NIKS et al. 2004) wurden in der Sorte 'Rojo' sowie in einer äthiopischen Landrasse nachgewiesen. Die Toleranzreaktionen sind stark umweltabhängig. Während *ryd1* nur eine unzureichende Wirksamkeit zeigt und daher in der Gersteszüchtung nicht genutzt wird, ist *Ryd2* aufgrund seiner Feldtoleranz gegenüber BYDV-PAV, BYDV-MAV und BYDV-SGV (BALTENBERGER et al. 1987) in Gerstesorten eingekreuzt worden (BURNETT et al. 1995). Das kürzlich in einer äthiopischen Landrasse entdeckte Toleranz-Gen *Ryd3* mit Wirksamkeit gegenüber BYDV-PAV and -MAV erklärt 75% der phänotypischen Varianz (NIKS et al. 2004).

Die genannten Resistenzfaktoren entstammen dem primären Genpool der Gerste. Eine relativ neue Quelle zur Verbesserung des Resistenzniveaus der deutschen Wintergerstesorten stellt die Wildart *Hordeum bulbosum* dar, die den sekundären Genpool der Gerste repräsentiert. Aus dem sekundären Genpool wurden unter anderen zwei neue Resistenzgene gegenüber dem Gelbmosaikviruskomplex (BaMMV, BaYMV-1, -2) aus *H. bulbosum* (*Hb*) markergestützt in die Kulturgerste übertragen (RUGE et al. 2003, RUGE-WEHLING et al. 2006). In jüngerer Vergangenheit wurde auch eine hochwirksame Resistenz gegenüber dem Gelbverzwergungsvirus aus *H. bulbosum* in die Kulturgerste übertragen. Genetische Analysen spaltender Nachkommenschaften zeigten, dass diese Resistenz durch ein dominantes Majorgen vererbt wird (SCHOLZ et al. 2009).

Das Ziel unserer weiteren Arbeiten ist es, das auf dem Gerstechromosom 3HL introgressierte *Hb*-Segment mit molekularen Markern abzudecken, durch die markergestützte Identifizierung von Rekombinanten dieses Segment zu verkleinern und *Ryd4^{Hb}*-Selektionsmarker für die Resistenzzüchtung zur Verfügung zu stellen.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial und Kartierungspopulation

Die Charakterisierung des Resistenzgens *Ryd4^{Hb}* erfolgte anhand von Kreuzungsnachkommenschaften, die durch eine

¹ Julius Kühn-Institut, Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen, Rudolf-Schick-Platz 3a, D-18190 GROSS LÜSEWITZ

² GenXPro GmbH, Altenhöfer Allee, D-60438 FRANKFURT AM MAIN

* Ansprechpartner: Brigitte RUGE-WEHLING, brigitte.ruge-wehling@jki.bund.de



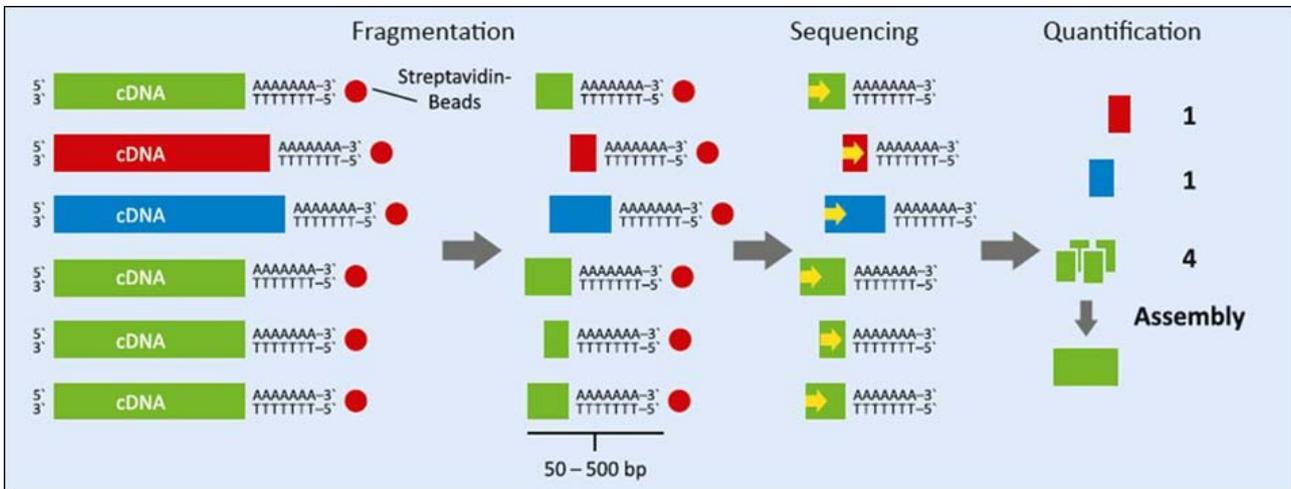


Abbildung 1: MACE-Technologie (GenXPro GmbH)

Figure 1: MACE technology (GenXPro GmbH)

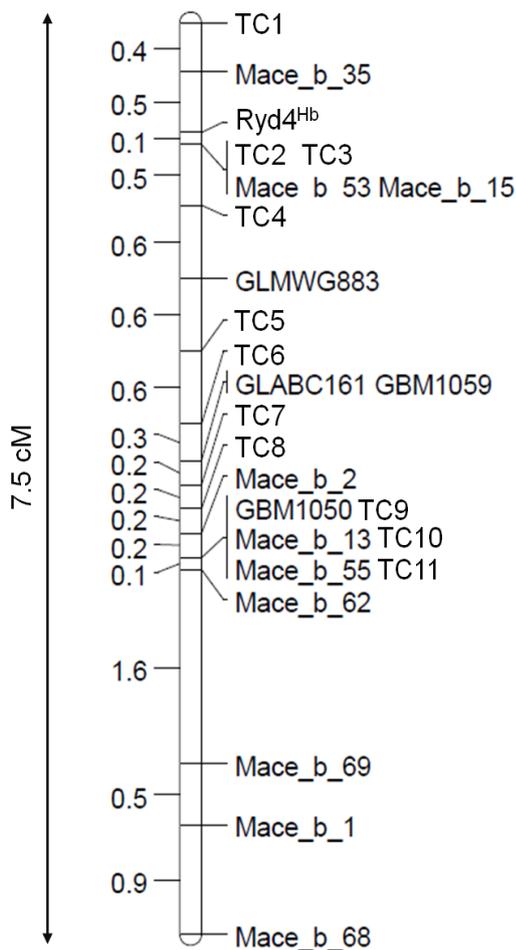


Abbildung 2: Kartierung des Resistenzgens *Ryd4^{Hb}* auf dem Gerstechromosom 3HL (TC1-11: Tentative Consensus Marker; *Mace_b_1*-*Mace_b_68*: Marker auf Basis von MACE-Sequenzen)

Figure 2: Mapping of *Ryd4^{Hb}* on the barley chromosome 3HL (TC1-11: Tentative Consensus Marker; *Mace_b_1*-*Mace_b_68*: marker based on MACE sequences)

interspezifische Kreuzung von *H. vulgare* cv. 'Igri' (Hv) mit der BYDV-resistenten Akzession A17 der Wildgerste *H. bulbosum* (*Hb*, Herkunft: Botanischer Garten Montevideo, Uruguay) entstanden sind (SCHOLZ et al. 2008). Durch Rückkreuzungen mit *Hv* und mehrere Selbstungsgenerationen wurde eine BC₂F₄ (Vollgeschwisterfamilie, N = 143 Individuen) erstellt.

Molekulare Marker

Insgesamt wurden 31 EST-basierte 3HL-Gerste-SSR-Marker (STEIN et al. 2007, VARSHNEY et al. 2007), 5 STS-Marker (GrainGenes 2.0) sowie 51 aus dem orthologen Reisgenom abgeleitete TC-Marker (STEIN et al. 2007) auf Marker-Polymorphismus zwischen *H. vulgare* und *H. bulbosum* gescreent. Der Nachweis der Orthologie zum Reischromosom R1 erfolgte durch die BLAST-Analyse (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/Blast/index.cgi>) des auf der 3HL-Introgression lokalisierten EST-Markers *ABC161*. Die daraus resultierende physikalische Position von 40.43 Mbp auf R1 ermöglichte die Entwicklung weiterer, im distalen Bereich von 3HL lokalisierter TC-Marker. Die Entwicklung von MACE-Markern erfolgte auf Basis der von GenXPro entwickelten Methode. Für dieses Experiment wurden resistente und anfällige Gerstepflanzen mit Hilfe von virustragenden Läusen inokuliert und nach 1 h bis 24 h nach der Inokulation Blattmaterial für die RNA-Isolation und cDNA-Synthese entnommen. Die cDNA wurde anschließend fragmentiert. Die Fragmente, welche das poly-A 3'-Ende der cDNA enthalten, wurden über Biotin-Streptavidin fixiert und 94 Basenpaare des 5'-Endes der 100-500 bp Fragmente mittels Illumina HiSeq2000 sequenziert (Abbildung 1). Mit der MACE-Technologie wird nur das im Verhältnis zur gesamten Sequenz SNP-reiche 3'-Ende sequenziert. Aufgrund dieser Konzentration („reduzierte Komplexität der Daten“) ist die notwendige Abdeckung zur SNP-Bestimmung bereits bei geringerer Sequenziertiefe erreicht. Die sequenzierten Bereiche („Tags“) wurden auf das Vorhandensein von solchen SNPs gescreent, die als Punktmutation zwischen dem *H. bulbosum*- und *H. vulgare*-Genom auftreten, und somit als genetische Marker verwendet werden können. Das Prim-

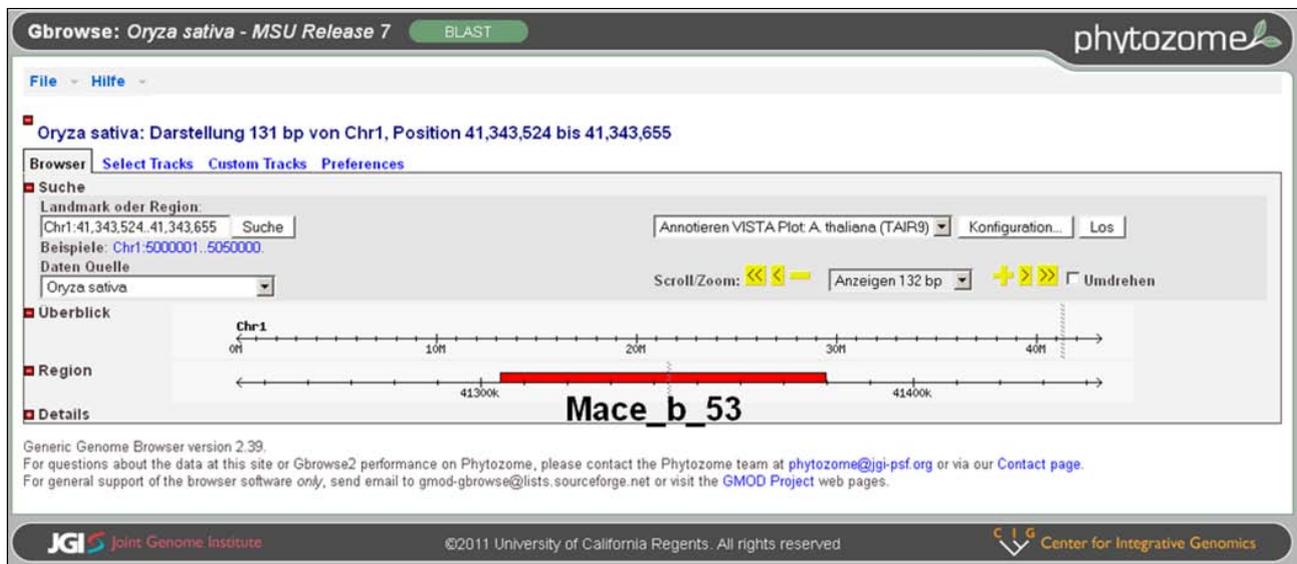


Abbildung 3: *In silico*-Kartierung des MACE-Markers *Mace_b_53* im Reischromosom R1
 Figure 3: *In silico* mapping of MACE marker *Mace_b_53* on R1

erdesign für die Markerentwicklung erfolgte mit Hilfe der Software Primer 3.0 Plus (UNTERGASSER et al. 2012). Die Kopplungsanalyse wurde mit der Software JoinMap[®] 4.1 durchgeführt (VAN OOIJEN 2012).

Die PCR zur Darstellung der Marker wurde mit 50-100 ng genomischer DNA durchgeführt. Die Prä-PCR-Reaktion enthielt 1×Reaction Puffer (Qiagen), 200 µM dNTPs, 5 pmol Primer und 0,5 U Taq DNA-Polymerase (Qiagen). Die PCR-Produkte wurden in 2,5%-Agarosegelen mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung oder in 10%-Polyacrylamidgelen mit anschließender Silbernitrat-Färbung nach BUDOWLE et al. (1991) aufgetrennt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Phänotypisierungsdaten einer BC₂F₄-Kartierungspopulation wurden bereits von SCHOLZ et al. (2009) publiziert. Die monogen dominant vererbte Resistenz ist auf einer *H. bulbosum*-Introgression lokalisiert, die durch genomische *in situ*-Hybridisierung (GISH) dem Gerstechromosom 3HL zugeordnet wurde (SCHOLZ et al. 2009). Die Lokalisation der Introgression auf diesem Chromosomenarm konnte durch die enge Kopplung des Resistenzgens *Ryd4^{Hb}* mit den 3HL-SSR-Ankermarkern *GBM1050* und *GBM1059*, sowie den STS-Markern *ABC161* und *MWG883* bestätigt werden (Abbildung 2).

Die Lokalisation dieser Marker in den experimentellen Familien stimmt mit der in der Literatur beschriebenen Positionen der Marker auf 3HL gut überein (STEIN et al. 2007, VARSHNEY et al. 2007). Die genetischen Positionen der TC-Marker stimmt gut mit der physikalischen Karte von Chromosom R1 überein (nicht gezeigt).

Die MACE-Sequenzdaten enthielten 800 *H. bulbosum* spezifische SNPs, die 395 Contigs zugeordnet werden konnten. Die Sequenzen wurden durch eine BLAST-Analyse (<http://www.phytozome.net/>) auf ihre Orthologie zum Reisgenom überprüft (Abbildung 3) und nach dem Design geeigneter

Primer auf Polymorphismus zwischen *H. bulbosum* und *H. vulgare* untersucht. Bisher wurden 30 polymorphe Marker entwickelt und davon zehn in der BC₂F₄-Familie genotypisiert. Die Kopplungsanalyse bestätigt die Lokalisation sämtlicher Marker auf der *H. bulbosum* Introgression auf dem Gerstechromosom 3HL. Das Markerintervall um den Resistenzlocus beträgt 0,6 cM. Die mit 0,1 cM distal von *Ryd4Hb* lokalisierten TC- und MACE-Marker sowie der proximal gelegene Marker *Mace_b_35* (0,5 cM) sind aufgrund ihrer engen Kopplung zum Resistenzgen gut als Selektionsmarker einsetzbar.

Eine hochauflösende Kartierung der neuen Introgressionsmarker ermöglicht präzise Aussagen über die Distanzen der Marker zum Zielgen und ihre Eignung als Selektionsmarker, da häufig bei Pflanzen mit translozierten Chromosomensegmenten aus einer verwandten Art eine stark unterdrückte Rekombinationsfrequenz in diesem Genombereich auftritt. Zur Zeit werden ca. 1000 Individuen im Hinblick auf ihren Resistenzphänotyp charakterisiert und mit ca. 100 *H. bulbosum* spezifischen SNP-Markern genotypisiert. Rekombinante Genotypen mit verkleinerter Introgression werden selektiert und in Kombination mit geeigneten Selektionsmarkern für die Resistenzzüchtung zur Verfügung gestellt.

Danksagung

Das Projekt wurde im Rahmen des BMELV-Programms zur Innovationsförderung (Förderkennzeichen: 28-1-45.019-10) unterstützt.

Literatur

- BALTENBERGER DE, OHM HW, FOSTER JE, 1987: Reactions of oat, wheat and barley to infection with BYDV isolates. *Crop Sci* 27, 195-198.
- BUDOWLE B, CHAKRABORTY R, GIUSTI AM, EISENBERG AJ, ALLEN RC, 1991: Analysis of VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48, 137-144.

- BURNETT PA, COMEAU A, QUALSET CO, 1995: Host plant tolerance or resistance for control of barley yellow dwarf. In: D'ARCY CJ, BURNETT PA (Eds.), Barley yellow dwarf: 40 years of progress, 321-343. APS Press, St. Paul.
- LISTER MR, RANIERI R, 1995: Distribution and economic importance of barley yellow dwarf. In: D'ARCY CJ, BURNETT PA (Eds.), Barley yellow dwarf: 40 years of progress, 29-53. APS Press, St. Paul.
- NIKS RE, 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.
- RUGE B, LINZA, PICKERING R, PROESELER G, GREIF P, WEHLING P, 2003: Mapping of *Rym14th*, a gene introgressed from *Hordeum bulbosum* and conferring resistance to BaMMV and BaYMV in barley. Theor Appl Genet 107, 965-971.
- RUGE-WEHLING B, LINZ A, HABEKUSS A, WEHLING P, 2006: Mapping of *Rym16th*, the second soil-borne virus-resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum*. Theor Appl Genet 113, 867-873.
- SCHALLER CW, RASMUSSEN DC, QUALSET CO, 1963: Sources of resistance to the yellow-dwarf virus in barley. Crop Sci 3, 342-344.
- SCHOLZ M, RUGE-WEHLING B, HABEKUSS A, PENDINEN G, SCHRADER O, FLATH K, GROSSE E, WEHLING P, 2008: The secondary gene pool of barley as gene donor for crop improvement. In: MAXTED N, FORD-LLOYD BV, KELL SP, IRIONDO J, DULLOO E, TUROK J (Eds.), Crop wild relative conservation and use, 549-555. CAB Int Publ, Wallingford.
- SCHOLZ M, RUGE-WEHLING B, SCHRADER O, HABEKUSS A, PENDINEN G, FISCHER K, WEHLING P, 2009: *Ryd4th*, a novel resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum* into barley and conferring complete and dominant resistance to the barley yellow dwarf virus (BYDV-PAV). Theor Appl Genet 119, 837-849.
- STEIN N, PRASAD M, SCHOLZ U, THIEL T, ZHANG H, WOLF M, KOTA R, VARSHNEY RK, PEROVIC D, GROSSE I, GRANER A, 2007: A 1,000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. Theor Appl Genet 114, 823-839.
- SUNESON CA, 1955: Breeding for resistance to yellow dwarf virus in barley. Agron J 47, 283.
- UNTERGASSER A, CUTCUTACHE I, KORESSAAR T, YE J, FAIRCLOTH BC, REMM M, ROZEN SG, 2012: Primer3 - new capabilities and interfaces. Nucl Acid Res 40, e115.
- VAN OOIJEN JW, 2012: JoinMap® 4.1 software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations of diploid species. Kyazama BV, Wageningen.
- VARSHNEY RK, MARCEL TC, RAMSAY L, RUSSELL J, RÖDER MS, STEIN N, WAUGH R, LANGRIDGE P, NIKS RE, GRANER A, 2007: A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. Theor Appl Genet 114, 1091-1103.

Anmerkung: Die Online-Version des Tagungsbandes enthält Abbildungen in Farbe und kann über die Homepage der Jahrestagung (<http://www.raumberg-gumpenstein.at/>) - Downloads - Fachveranstaltungen/Tagungen - Saatzüchertagung - Saatzüchertagung 2012) oder den korrespondierenden Autor bezogen werden.