

Entwicklung und Validierung von diagnostischen Markern für das *Rrs2*-Resistenzgen gegen *Rhynchosporium secalis* in Gerste

Development and validation of diagnostic markers for the *Rrs2* gene in barley conferring resistance to *Rhynchosporium secalis*

Anja Hanemann^{1*}, Günther F. Schweizer² und Marion S. Röder¹

Abstract

The *Rrs2* gene conferring dominant resistance to scald (*Rhynchosporium secalis*) in barley was fine mapped using 9179 F₂-plants (Atlas × Steffi) to the distal end of chromosome 7HS. Additionally, two barley BAC contigs flanking the resistance gene were established by chromosome walking. A sequence analysis of 58 barley genotypes revealed a large linkage block at the *Rrs2* locus extending over several hundred kb which is present only in *Rrs2* carrying cultivars. The variety analysis also led to the identification of eight SNPs which were diagnostic for the *Rrs2* phenotype. Based on these SNPs diagnostic molecular markers (CAPS and pyrosequencing markers) were developed. All markers have been successfully tested in a diverse set of common barley varieties and landraces. They are a highly useful tool for marker-assisted selection in resistance gene pyramiding programmes for *Rhynchosporium secalis* resistance in barley.

Keywords

Hordeum vulgare, resistance gene *Rrs2*, *Rhynchosporium secalis*, scald

Einleitung

Die *Rhynchosporium*-Blattfleckenkrankheit, welche durch den Pilz *Rhynchosporium secalis* (Oudem.) J.J. Davis verursacht wird, zählt zu einer der wichtigsten Gerstenkrankheiten der gemäßigten Klimazonen (SHIPTON 1974). Bisher wurden mehrere Resistenzgene gegen *R. secalis* in Gerste kartiert. Zu den vier wirksamsten ist neben *Rrs1* (3H; BJØRNSTAD et al. 2002), *Rrs13* (6H; ABBOTT et al. 1992; GINGER et al. 2003) und *Rrs15* (2H; SCHWEIZER et al. 2004) auch *Rrs2* einzustufen. Das Gen kartiert am distalen Ende des kurzen Arms von Gerstenchromosom 7H (SCHWEIZER et al. 1995; SCHMIDT et al. 2001). Die durch das *Rrs2*-Gen vermittelte Resistenz wurde von dem sehr anpassungsfähigen Pilz *R. secalis* in Deutschland bisher noch nicht durchbrochen und könnte daher zur Pyramidisierung von Resistenzgenen gegen die *Rhynchosporium*-Blattfleckenkrankheit eingesetzt werden.

Die Klonierung von *Rrs2* bzw. die Entwicklung diagnostischer molekularer Marker würde diesen Züchtungsaufwand erheblich erleichtern.

Im Folgenden soll neben der Feinkartierung des *Rrs2*-Gens und der Erstellung der physikalischen Karte vor allem auf die Sortenanalyse und die Entwicklung diagnostischer Marker für den Einsatz in der Resistenzzüchtung eingegangen werden.

Material und Methoden

Die Kartierungspopulation bestand aus einer Kreuzung der resistenten, sechszeiligen, amerikanischen Sorte Atlas (CI 4118) mit der für *Rhynchosporium* anfälligen, bayerischen, zweizeiligen Braugerstensorte Steffi (Saatzucht Ackermann, Irlbach). Die Pflanzen der F₁-Generation wurden geselbstet und die F₂-Nachkommenschaft auf Rekombination zwischen flankierenden Markern untersucht. Pflanzen ab der F₄-Generation, in denen die identifizierten Rekombinationsereignisse im homozygoten Zustand vorlagen, wurden auf *Rhynchosporium*-Resistenz getestet. Die Tests wurden an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft in Freising/Weißenstephan (LfL Bayern) nach SCHWEIZER et al. (1995) durchgeführt.

Zur Erstellung der physikalischen Karte wurde hauptsächlich eine BAC-Bibliothek der Sorte Morex (YU et al. 2000) verwendet. Zusätzlich stammt ein BAC-Klon aus der Cebada Capa BAC-Bibliothek (ISIDORE et al. 2005) und jeweils ein Klon aus zwei unveröffentlichten BAC-Bibliotheken der Sorte Morex, welche in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Genomdiversität des IPK Gatersleben identifiziert wurden.

Die in der Sortenanalyse untersuchten 58 Gerstengenotypen wurden entweder in Form von Saatgut von verschiedenen Genbanken (Genbank Gatersleben, Australian Winter Cereals Collection und BBSCR Cereals Collection des John Innes Centres) oder als DNA-Proben von Dr. Günther Schweizer (LfL Bayern) bezogen. Sechs Genomregionen aus der unmittelbaren Umgebung von *Rrs2* wurden von allen Akzessionen sequenziert und mithilfe des Alignment-Programms Sequencher™ vers. 4.5 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) auf Polymorphismen untersucht.

¹ Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Corrensstraße 3, D-06466 GATERSLEBEN

² Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), IPZ1b Genomanalyse, Am Gereuth 2, D-85354 FREISING

* Ansprechpartner: Anja HANEMANN, hanemann@ipk-gatersleben.de

Die statistische Analyse der Assoziation der gefundenen SNPs mit dem *Rrs2*-Phänotyp fand unter Annahme eines General Linear Models (GLM) mit dem Programm TASSEL vers. 2.0.1 (BRADBURY et al. 2007; <http://www.maizegenetics.net>) statt.

Für die CAPS-Markerentwicklung wurde das Programm SNP2CAPS (THIEL et al. 2004) verwendet, welches Restriktionsschnittstellen an SNP-Positionen detektiert. Die Pyrosequenziermarkerentwicklung erfolgte mit der Assay Design Software vers. 1.0.6 (Biotage AB, Uppsala, Sweden).

Ergebnisse und Diskussion

Feinkartierung und Erstellung einer physikalischen Karte der *Rrs2*-Region

Mit einer 9179 F₂-Pflanzen umfassenden Kartierungspopulation aus einer Kreuzung der resistenten Sorte Atlas mit der anfälligen Sorte Steffi wurde das *Rrs2*-Gen in einen 0,08 cM großen Bereich zwischen die Marker 693M6_6 und P1D23R feinkartiert. Zugleich konnte das distale BAC-Contig der bereits vorhandenen physikalischen Karte der *Rrs2*-Region um vier zusätzliche BAC-Klone erweitert werden.

Alle in dem 0,08 cM großen Bereich zwischen den Markern 693M6_6 und P1D23R befindlichen Marker co-segregieren mit dem *Rrs2*-Gen. Allerdings liegen die flankierenden Marker der co-segregierenden Region mehrere hundert Kilobasen voneinander entfernt, da sie auf zwei nicht überlappenden BAC-Contigs lokalisiert sind. Die Ergebnisse der Feinkartierung und physikalischen Kartierung führen zu dem Schluss, dass die Region um das *Rrs2*-Gen in der Atlas × Steffi Kartierungspopulation eine unterdrückte Rekombination aufweist. Eine genauere Lokalisation von *Rrs2* war deshalb mittels Map Based Cloning Strategie nicht möglich (HANEMANN et al. 2009).

Sequenzanalyse von Sorten

Mithilfe von Populationen aus verschiedenen Stämmen oder Sorten kann, im Gegensatz zu klassischen Kartierungspopulationen, ein deutlich breiterer genetischer Hintergrund aufgrund mehr informativer Meiosen untersucht, und damit eine höhere genetische Auflösung erreicht werden (GAUT und LONG 2003). Die Sequenzanalyse wurde gezielt für die Region um den *Rrs2*-Locus mit 58 Gerstengenotypen unterschiedlichster Resistenzeigenschaften gegenüber *R. secalis* durchgeführt. Die Gerstensorten wurden auf Polymorphismen (SNPs und INDELS) in sechs Genomregionen aus dem mit *Rrs2* co-segregierenden Bereich bzw. aus dessen unmittelbarer Umgebung untersucht. Da alle 11 bekannten *Rrs2*-Träger (und nur diese) für alle sechs untersuchten Bereiche immer demselben Haplotyp angehörten, konnte, entgegen der ursprünglichen Erwartung, auch die Sequenzanalyse der Sorten keine zusätzlichen Hinweise auf die genaue Position von *Rrs2* liefern. Alle Sorten ohne *Rrs2*-Resistenz gehörten für jede untersuchte Region unterschiedlichen Haplotypen an. Somit besteht die Annahme, dass nur bei *Rrs2*-Resistenz tragenden Sorten ein Haplotypenblock vorliegt, der ohne Rekombination immer geschlossen weitervererbt wird. Neben den bereits als *Rrs2*-Trägern bekannten Sorten fanden sich noch drei weitere Sorten mit dem für *Rrs2*-Sorten charakteristischen SNP-Muster (Tabelle 1). Da diese Sorten, namentlich Atlas 54 (CI 9556), Turk × Atlas (CI 7189) und Wisconsin Winter × Glabron (CI 8162), auch resistent gegen *R. secalis* sind, wird angenommen, dass auch sie das *Rrs2*-Gen tragen. Dies muss jedoch durch Kartierungsstudien bestätigt werden.

Es wird vermutet, dass der Haplotypenblock und die unterdrückte Rekombination in der Kartierungspopulation Folge einer chromosomalen Veränderung (z.B. chromosomale Inversion) in den Sorten mit *Rrs2*-Resistenz sind. Aufgrund des identischen SNP-Musters in diesen Sorten liegt die Abstammung von einer einzigen Gerstenlinie nahe. Hinweise auf einen gemeinsamen Vorfahren aus Nordafrika lassen

Tabelle 1: Liste der resistenten Sorten, welche das *Rrs2*-Gen tragen

Table 1: List of resistant varieties carrying the *Rrs2* gene

<i>Rrs2</i> -Träger (Sortenname mit CI-Nummer bzw. Abstammung)	Nachweis des Vorliegens von <i>Rrs2</i>
Atlas (CI 4118)	Kartierung (LfL Bayern, unveröff.) und Sequenzanalyse
Atlas 46 (CI 7323)	Kartierung (LfL Bayern, unveröff.) und Sequenzanalyse
Atlas 54 (CI 9556)	Sequenzanalyse
CI 2235	Kartierung (LfL Bayern, unveröff.) und Sequenzanalyse
Digger (Magnif-E-105/Universe (MMG-68-5-11)//Aramir)	W. Thomas (SCRI, Dundee, UK, pers. Mitt.) und Sequenzanalyse
Escaladura 15 (Landsorte)	Kartierung (LfL Bayern, unveröff.) und Sequenzanalyse
Forrest (Atlas 57//Prior/Ymer)	Infektion mit differenziellen Pilzisolaten (H. Wallwork, SARDI, Adelaide, pers. Mitt.) und Sequenzanalyse
Gloria LB Iran × Harrington (LBIran/Una827//Gloria/Come/3/Harrington)	Kartierung (LfL Bayern, unveröff.) und Sequenzanalyse
Livet (22746C041/TSS 311-54E) bzw. (Dera/Digger//TS-42-3-5/Armelle)	W. Thomas (SCRI, Dundee, UK, pers. Mitt.) und Sequenzanalyse
Osiris (CI 1622)	Kartierung (LfL Bayern, unveröff.) und Sequenzanalyse
Pewter (NFC 94-20/NFC 94-11)	Kartierung (LfL Bayern, unveröff.) und Sequenzanalyse
PI 452395 (Züchterlinie aus England)	Kartierung (LfL Bayern, unveröff.) und Sequenzanalyse
Turk × Atlas (CI 7189)	Sequenzanalyse
Wisconsin Winter × Glabron (CI 8162)	Sequenzanalyse

sich auch in den entsprechenden Stammbäumen finden (HANEMANN et al. 2009).

Markerentwicklung für *Rrs2*

In der Sortenanalyse wurden insgesamt acht diagnostische SNPs für den *Rrs2*-Phänotyp in drei Genomregionen des co-segregierenden Bereichs entdeckt. Die statistische Analyse (GLM) konnte eine hoch signifikante Beziehung der acht SNPs mit dem *Rrs2*-Phänotyp aufzeigen (Tabelle 2).

Infolgedessen wurden, basierend auf fünf SNPs, acht diagnostische molekulare Marker für das *Rrs2*-Gen entwickelt und getestet. Alle Marker konnten erfolgreich aus insgesamt 54 getesteten Genotypen alle 13 Genotypen diskriminieren, welche eine *Rrs2*-Resistenz trugen (Abbildung 1). Diese fünf CAPS-Marker und drei Pyrosequenziermarker können zur Selektion auf *Rrs2*-Resistenz in Gerstenlinien während des Züchtungsprozesses eingesetzt werden und sind vor allem für Pyramidisierungsprogramme von *Rhynchosporium*-Resistenzgenen ein wertvoller Hinzugewinn.

Tabelle 2: Übersicht über signifikant mit dem *Rrs2*-Phänotyp assoziierte SNPs aus drei Genomregionen des *Rrs2*-Lokus auf Gerstenchromosom 7HS und die daraus entwickelten Marker (P-Werte für alle SNPs zu finden in HANEMANN et al. (2009))

Table 2: Overview of significantly associated SNPs with the *Rrs2* phenotype originating from three genomic regions of the *Rrs2* locus on barley chromosome 7HS and the developed markers (P values for all SNPs are given in HANEMANN et al. (2009))

SNP-Position	P-Wert Genomregion 2	Marker
9	2.9887×10^{-16}	1 CAPS + 1 Pyro
15	1.12×10^{-04}	1 CAPS
28	3.97×10^{-15}	
	P-Wert Genomregion 4	
4	2.99×10^{-16}	2 CAPS + 1 Pyro
	P-Wert Genomregion 5	
5	2.99×10^{-16}	1 Pyro
13	2.99×10^{-16}	
16	2.99×10^{-16}	1 CAPS
17	2.99×10^{-16}	

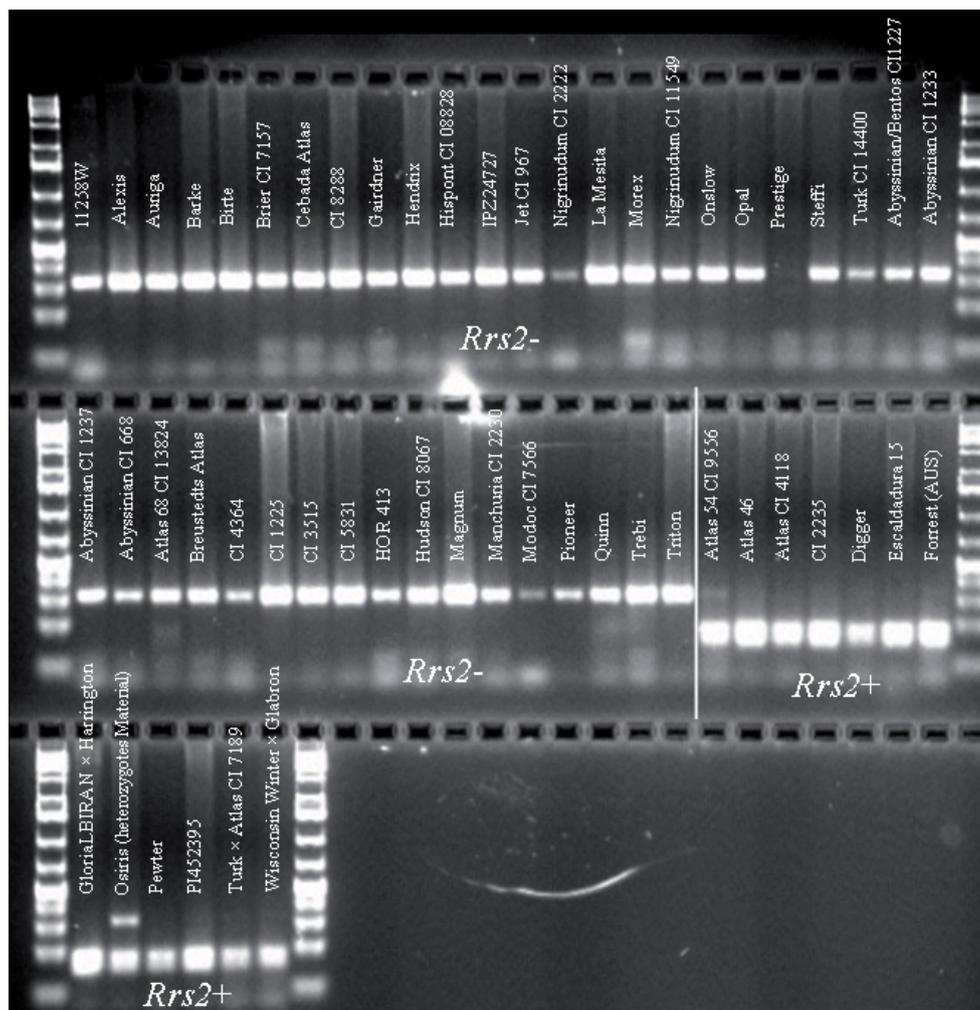


Abbildung 1: Beispiel für den Markertest mit 54 Gerstengenotypen (13 davon tragen das *Rrs2*-Gen) anhand eines CAPS-Markers für Genomregion 4 basierend auf dem Restriktionsverdau mit dem Enzym BspI68

Figure 1: The marker testing with 54 barley genotypes (13 of which carry the *Rrs2* gene) taking CAPS marker for genomic region 4 based on restriction digestion with enzyme BspI68 as an example

Literatur

- ABBOTT DC, BROWN AHD, BURDON JJ, 1992: Genes for scald resistance from wild barley (*Hordeum vulgare* spp. *spontaneum*) and their linkage to isozyme markers. *Euphytica* 61, 225-231.
- BJØRNSTAD Å, PATIL V, TEKAUZ A, MARØY AG, SKINNES H, JENSEN A, MAGNUS H, MACKEY J, 2002: Resistance to scald (*Rhynchosporium secalis*) in barley (*Hordeum vulgare*) studied by near-isogenic lines: I. markers and differential isolates. *Phytopathol* 92, 710-720.
- BRADBURY PJ, ZHANG Z, KROON DE, CASSTEVENS TM, RAMDOSS Y, BUCKLER ES, 2007: TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23, 2633-2635.
- GAUT BS, LONG AD, 2003: The lowdown on linkage disequilibrium. *Plant Cell* 15:1502-1506.
- GENGER RK, BROWN AHD, KNOGGE W, NESBITT K, BURDON JJ, 2003: Development of SCAR markers linked to a scald resistance gene derived from wild barley. *Euphytica* 134, 149-159.
- HANEMANN A, SCHWEIZER GF, COSSU R, WICKER T, RÖDER MS, 2009: Fine mapping, physical mapping and development of diagnostic markers for the *Rrs2* scald resistance gene in barley. *Theor Appl Genet* 119, 1507-1522.
- ISIDORE E, SCHERRER B, BELLEC A, BUDIN K, FAIVRE-RAMPANT P, WAUGH R, KELLER B, CABOCHE M, FEUILLET C, CHALHOUB B, 2005: Direct targeting and rapid isolation of BAC clones spanning a defined chromosome region. *Funct Integr Genomics* 5, 97-103.
- SCHMIDT D, RÖDER MS, DARGATZ H, WOLF N, SCHWEIZER GF, TEKAUZ A, GANAL MW, 2001: Construction of a YAC library from barley cultivar Franka and identification of YAC-derived markers linked to the *Rh2* gene conferring resistance to scald (*Rhynchosporium secalis*). *Genome* 44, 1031-1040.
- SCHWEIZER GF, BAUMER M, DANIEL G, RUGEL H, RÖDER MS, 1995: RFLP markers linked to scald (*Rhynchosporium secalis*) resistance gene *Rh2* in barley. *Theor Appl Genet* 90, 920-924.
- SCHWEIZER G, HERZ M, MIKOLAJEWSKI S, BRENNER M, HARTL L, BAUMER M, 2004: Genetic mapping of a novel scald resistance gene *Rrs15*_{C18288} in barley. In: Spunar J, Janikova J (eds) *Proc 9th Int Barley Genet Symp*, 20-26 June, Brno, Czech Republic, pp 258-265. *Agric Res Inst Kromeriz*.
- SHIPTON WA, 1974: Scald of barley. *Rev Plant Pathol* 53:839-861.
- THIEL T, KOTA R, GROSSE I, STEIN N, GRANER A, 2004: SNP2-CAPS: a SNP and INDEL analysis tool for CAPS marker development. *Nucleic Acids Res* 32:e5: DOI:10.1093/nar/gnh006.
- YU Y, TOMKINS JP, WAUGH R, FRISCH DA, KUDRNA D, KLEINHOF A, BRUEGGEMAN RS, MUEHLBAUER GJ, WISE RP, WING RA, 2000: A bacterial artificial chromosome library for barley (*Hordeum vulgare* L.) and the identification of clones containing putative resistance genes. *Theor Appl Genet* 101, 1093-1099.