

Verbesserung der Toleranz der Gerste gegenüber *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) durch Pyramidisierung von QTL

Christine Riedel^{1*}, A. Habekuss¹ und F. Ordon¹

Abstract

Barley yellow dwarf virus (BYDV) is an economically important pathogen of barley which may become even more important due to global warming. The opportunities to control this disease are up to now mainly limited to chemical measures against the aphid vectors because only the *Ryd2* gene has been incorporated into very few cultivars which gained no economic importance. Meanwhile additional loci conferring tolerance against BYDV were identified, like *Ryd3* and a QTL on chromosome 2H. The aim of the present study is to get information whether the level of tolerance against BYDV in barley can be improved by combining these loci. Therefore, DH-lines were genotyped by molecular markers for the presence of the susceptibility or the resistance encoding allele at respective loci (*Ryd2*, *Ryd3*, QTL on 2H) and were tested for their level of BYDV-tolerance after artificial inoculation with virus bearing aphids in field trials. The results of the first growing period indicate an additive effect of the tolerance alleles concerning some of the parameters analysed. The combination of *Ryd2* and *Ryd3* causes a significant reduction of the virus titre in the winter and spring barley DH-population. The DH-lines of the spring barley population carrying *Ryd2/Ryd3* also showed a significantly higher relative grain yield. In general the QTL of chromosome 2H had only a small effect on the level of tolerance.

Keywords: *Hordeum vulgare*, *Barley yellow dwarf virus*, tolerance, pyramiding, molecular marker

Zusammenfassung

Das Gerstengelverzweigungsvirus (*Barley yellow dwarf virus*, BYDV) ist ein wirtschaftlich wichtiges Pathogen

im Getreideanbau, dessen Bedeutung infolge der prognostizierten Klimaerwärmung in den nächsten Jahrzehnten weiter zunehmen wird. Die Bekämpfungsmöglichkeiten sind auf die chemische Vektorbekämpfung sowie auf ackerbauliche Maßnahmen beschränkt.

In der Gerstenzüchtung wurde bisher das Resistenzgen *Ryd2* genutzt, jedoch wurden inzwischen weitere Toleranz bedingende Loci wie *Ryd3* und ein QTL auf Chromosome 2H identifiziert. Ziel der vorliegenden Arbeiten ist es Erkenntnisse darüber zu gewinnen, ob durch eine markergestützte Kombination dieser Loci das Toleranzniveau der Gerste gegenüber BYDV verbessert werden kann. Hierzu wurden DH-Linien-Populationen zunächst mit bekannten Markern für die entsprechenden Resistenzloci genotypisiert und anschließend nach künstlicher Inokulation mit BYDV-PAV deren Virusbefall sowie Ertragsparameter relativ zur nicht infizierten Kontrolle der gleichen DH-Linie bestimmt.

Die bisher vorliegenden Ergebnisse zur Phänotypisierung dieser DH-Linien aus dem ersten Versuchsjahr lassen bezüglich einiger Parameter einen additiven Effekt der Toleranzallele erkennen. Die Kombination von *Ryd2* und *Ryd3* führte sowohl in den Wintergersten- als auch in den Sommergersten-DH-Linien zu einer signifikanten Verringerung des Virusgehaltes gegenüber den genotypisch anfälligen Linien (*ryd2/ryd3*) und solchen mit den entsprechenden einzelnen positiven Allelen. Ebenso konnte in DH-Linien der Sommergerstenkreuzung für diese Kombination (*Ryd2/Ryd3*) eine höhere Leistung im relativen Kornertrag pro Pflanze gegenüber den anderen Genotypen nachgewiesen werden. Der QTL auf Chromosom 2H zeigte allgemein nur eine geringe Toleranzwirkung.

Einleitung

Vor dem Hintergrund des Klimawandels ist aufgrund von milderem Herbst- sowie Wintertemperaturen mit einer sich zeitlich ausdehnenden Flugaktivität von Insekten zu rechnen. Dies wird auch Folgen für die Übertragung von insektenübertragbaren Viren wie z.B. für das durch Blattläuse übertragene *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) haben. Die in Mitteleuropa vorherrschenden relevanten Blattlausarten *Rhopalosiphum padi* und *Sitobion avenae* sind die Hauptvektoren für das hier dominierende BYDV-PAV (HABEKUSS et al. 2002). BYDV gehört zur Familie

der *Luteoviren* und befällt nahezu alle *Poaceae*, darunter auch viele wichtige Getreidearten wie Weizen, Gerste, Hafer, Roggen, Triticale und Mais (D'ARCY und DOMIER 2005). Es nimmt durch sein periodisch-epidemisches Auftreten vor allem in Wintergerste und Winterweizen und den daraus resultierenden erheblichen Ertragsverlusten mit bis zu 40% eine bedeutende Stellung im Getreideanbau ein (LISTER und RANIERI 1995, RIEDELL et al. 1999, OBERFORSTER 2002).

Je früher die Infektion in der Pflanzenentwicklung stattfindet, desto größer werden die zu erwartenden Schäden, so

¹ Julius Kühn-Institut - Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Erwin-Baur-Straße 27, D-06484 QUEDLINBURG

* Ansprechpartner: Christine RIEDEL, christine.riedel@jki.bund.de

dass ein Schutz vor einer BYDV-Infektion insbesondere im Jungpflanzenstadium von Bedeutung ist. Eine effektive Bekämpfung des Virus ist zurzeit nur indirekt durch die Bekämpfung der Vektoren durch Insektizide möglich. Ebenso kann zur Reduzierung des Infektionsrisikos die Aussaat der Winterkultur in eine Zeit verschoben werden, in der der Blattlausflug bereits reduziert ist, d.h. in den Spätherbst (HUTH 2002). Diese Maßnahmen sind jedoch stark witterungsabhängig und häufig betriebswirtschaftlich nicht zu realisieren. Eine sichere und kostengünstigere Alternative zur Verringerung des Anbaurisikos sind resistente bzw. tolerante Sorten. Die Grundlage zur Züchtung solcher Sorten ist durch die Identifizierung von effektiven Toleranzgenen oder QTL gegeben. Bisher wurde das Resistenzgen *ryd1* (SUNESON 1955) identifiziert, welches aber wegen seiner nur sehr geringen Wirksamkeit in der Gerstenzüchtung nicht verwendet wurde. Des Weiteren wurde das unvollständig dominante Gen *Ryd2* (SCHALLER et al. 1964) auf Chromosom 3HL (COLLINS et al. 1996) lokalisiert. Dieses Gen bedingt eine Toleranz gegenüber BYDV-PAV und BYDV-MAV. Sein Toleranzeffekt ist jedoch stark abhängig vom genetischen Hintergrund und den Umweltbedingungen (SCHALLER 1984). In der äthiopischen Gerstenlinie 'L94' konnte ein zweites wirksames Gen, *Ryd3*, auf Chromosom 6H identifiziert werden, welches 75% der Varianz in der Symptomausprägung erklärt (NIKS et al. 2004). Ein QTL aus der Herkunft 'Post', auf den 19% der Variation im relativen Kornertrag/Pflanze zurückzuführen ist, wurde auf Chromosom 2HL lokalisiert (SCHEURER et al. 2001).

Bisher wurde zur Züchtung von toleranten Sorten lediglich *Ryd2* genutzt, wie z.B. in den Sorten 'Vixen' und 'Naturel'. Ziel der Arbeit ist es, im Hinblick auf eine weitere Verbesserung des Toleranzniveaus und als Ausgangspunkt für die Züchtung von BYDV-toleranten Sorten, die bekannten Toleranzallele (*Ryd2*, *Ryd3*, QTL 2H) sowohl in Winter- als auch in Sommergersten markergestützt zu kombinieren und deren Effekte auf den Virusbefall und die Ertragsleistung zu analysieren.

Material und Methoden

Zur Kombination der drei bekannten Toleranzallele in Gerste wurden doppelhaploide Linien der Kreuzungen 'RIL K4-56' (*Ryd3*; Sommergerste) x 'DH21-136' (*Ryd2* + QTL 2H; Wintergerste) und 'RIL K4-56' x 'Coracle' (*Ryd2*; Sommergerste) durch Mikrosporen- und Antherenkultur von der KWS-Lochow GmbH und der Saaten-Union Resistenzlabor GmbH hergestellt.

Die Extraktion der DNA zur Genotypisierung der vorhandenen 470 Wintergersten und 295 Sommergersten DH-Linien erfolgte durch eine Miniprep-Methode nach STEIN et al. (2002). Für den Nachweis von *Ryd2* wurde der Capsmarker YLP verwendet (FORD et al. 1998), dessen Produkt anschließend mit dem Restriktionsenzym *Hsp92II* geschnitten wurde. *Ryd3* wurde durch den Mikrosatellitenmarker HVM74 (NIKS et al. 2004) und der QTL auf Chromosom 2H mit HVCSG (SCHEURER et al. 2001) in einer vollautomatischen Kapillarelektrophorese (Beckman Coulter CEQ 8000) identifiziert.

Je zweihundert DH-Linien (inkl. Elternlinien) beider DH-Populationen wurden in der Vegetationsperiode 2007/2008 an vier Standorten in Deutschland (JKI, Quedlinburg; KWS-Lochow GmbH, Bernburg; Nordsaat, Gudow; Saatzucht Ackermann & Co, Irlbach) nach BYDV-Inokulation phänotypisiert. Nach der Aussaat im Gewächshaus von insgesamt 40 Körnern pro DH-Linie und pro Standort für die Varianten (Kontrolle/Infiziert) und zwei Wiederholungen wurden die Pflanzen der infizierten Variante im Einblattstadium zur Inokulation mit BYDV-PAV mit virustragenden Blattläusen der Art *Rhopalosiphum padi* (10 Aphiden/Pflanze) besetzt, welche nach einer Inokulationsdauer von fünf Tagen mit dem Insektizid Confidor abgetötet wurden. Zeitnah wurden die Pflanzen an den vier Versuchsorten ausgepflanzt, die Wintergerstenpopulation Mitte Oktober 2007, die Sommergersten Anfang April 2008.

Als erster Schritt der Phänotypisierung wurden bei den Wintergersten Mitte April und bei den Sommergersten sechs Wochen später, im Stadium zwischen Bestocken und Schossen, eine Symptombewertung (Boniturnote (BN) 1=ohne Symptome, BN 9=abgestorben) der infizierten Variante an den vier Versuchsorten durchgeführt. Zeitgleich wurden aus der infizierten Variante Blattproben für den DAS-ELISA zur Bestimmung des Virustiters in ausgewählten Linien aller auftretenden Allelkombinationen von bis zu zehn Einzelpflanzen je Linie von zwei Wiederholungen an zwei Standorten genommen (Wintergersten: 3 Linien je 8 Allelkombinationen in Quedlinburg und Gudow; Sommergersten: 6 Linien je 4 Allelkombinationen in Quedlinburg und Irlbach). Im weiteren Versuchsverlauf wurden das Ährenschieben sowie die Wuchshöhe erfasst. Zur Ernte wurden der Kornertrag sowie die Ertragstrukturparameter Ährenzahl und Tausendkorngewicht (TKG) bestimmt und für die Einzelpflanze berechnet. In der Verrechnung wurde jeweils die Leistung der BYDV-inokulierten Variante in Relation zur gesunden Kontrollvariante gesetzt. Die hier dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf den Standort Quedlinburg bei der Sommergerste, und die Standorte Quedlinburg, Bernburg und Gudow bei der Wintergerste.

Alle statistischen Analysen wurden mit der Software SAS 9.1 durchgeführt. Die Daten - außer die Boniturnoten - wurden mittels ANOVA und anschließenden Tukey-Test ($\alpha=0,05$) analysiert. Die ordinalskalierten Boniturnoten wurden mit einer Bootstrap-Methode nach Neuhäuser und Jöckel (2006) und anschließendem T-Test ausgewertet.

Ergebnisse und Diskussion

Genotypisierung

Die sich aus den drei beziehungsweise zwei Toleranzloci ergebenden Allelkombinationen für beide DH-Populationen und die Aufspaltung der DH-Linien zeigt die Tabelle 1. Die Ergebnisse des Chi²-Tests zeigen für die Sommergersten-DH-Population (Chi²=3,04) im Gegensatz zu der Wintergersten-DH-Population (Chi²=74,61) eine Anpassung an die erwartete Aufspaltung.

Tabelle 1: Ergebnisse der Genotypisierung

<i>Ryd2/Ryd3</i> /QTL	rrr	rrs	rsr	srr	ssr	srs	rss	sss
Anzahl DH-Linien	93	49	43	92	52	76	37	28
<i>Ryd2/Ryd3</i>		rr		rs		sr		ss
Anzahl DH-Linien		68		66		76		85

r: Toleranzallel, s: Anfälligkeitsallel

Symptomausprägung und Virusgehalt

In der Wintergersten-DH-Population zeigte sich bei den genotypisch anfälligen Linien (sss) im Mittel die stärkste Symptomausprägung (BN 6) mit einer deutlichen Verzweigung der Pflanzen sowie stark reduzierter Triebzahl und Blattvergilbungen. Bei den DH-Linien der Genotypen mit dem QTL 2H (ssr) und *Ryd2* (rss) war mit mittleren BN von vier und drei ebenfalls noch eine Wuchsdepression und Vergilbungen zu sehen. Die DH-Linien der restlichen Genotypen, also alle mit *Ryd3* und die mit *Ryd2*+QTL 2H wiesen im Mittel nur Blattvergilbungen (BN 2) auf und zeigten statistisch keine signifikanten Unterschiede. In der Sommergersten-DH-Population ergab sich hinsichtlich wachsender Symptomausprägung für die vier Genotypen die Reihenfolge von *Ryd2*+*Ryd3*, *ryd2*+*Ryd3*, *Ryd2*+*ryd3* und *ryd2*+*ryd3*, wobei zwischen allen Genotypen statistisch gesicherte Unterschiede nachzuweisen waren.

Übereinstimmend in beiden Populationen war der Virusgehalt in den Pflanzen der Genotypen mit *Ryd2*+*Ryd3* gegenüber denen mit nur einem Toleranzallel deutlich reduziert (Abbildung 1), sodass diese Kombination als epidemiologisch vorteilhaft einzustufen ist. In den Sommergersten zeigte *Ryd3* als Einzelgen einen gesichert höheren Einfluss auf den Virustiter als *Ryd2*. In der Wintergersten DH-Population lässt sich tendenziell ähnliches erkennen, die Unterschiede zwischen den Genotypen sind hier jedoch nur teilweise signifikant. Der reduzierte Virusgehalt in den Genotypen mit allen Anfälligkeitsallelen ist vermutlich auf die starke Symptomexpression und die damit stark verringerte Vitalität der Pflanzen zurückzuführen. Aufgrund der Ergebnisse der Bonitur und des ELISA kann auf eine sehr gute Infektionsrate mit BYDV-PAV geschlossen werden, was eine entscheidende Voraussetzung für diese Arbeiten ist.

Ährenschieben und Wuchshöhe

Eine Verzögerung im Ährenschieben von durchschnittlich fünf Tagen ergab sich bei DH-Linien mit allen Anfälligkeitsallelen in der Wintergersten-Population am Standort Quedlinburg. Die Linien mit ausschließlich dem positiven Allel des QTL auf 2H oder am *Ryd2* Locus wiesen in dieser Population eine Verzögerung im Ährenschieben von durchschnittlich zwei bis drei Tagen auf. In der Sommergersten-DH-Population traten in der Allelkombination *ryd2/ryd3* sehr viele Pflanzen auf, bei denen die Ähren in den Blattscheiden stecken blieben und somit das Ährenschieben im Wesentlichen unterblieb.

In der relativen Wuchshöhe der Sommergersten zeigten die Genotypen mit *ryd2/ryd3* im Mittel eine deutlich stärkere Wuchsminderung (60%) als die Linien mit Toleranzallelen (95%). Gleiches ergab sich bei den Wintergersten am Standort Quedlinburg und Bernburg. Hier reagierten zusätzlich die Linien mit nur dem QTL auf 2H mit einer leichten Verzögerung der Pflanzen (86%).

Ertragsparameter

Im relativen Kornertrag/Pflanze zeigten die Linien der verschiedenen Genotypen der Sommergersten-DH-Population signifikante Unterschiede, wohingegen sich bei der Wintergersten-Population nur zwischen den Genotypen mit allen Anfälligkeitsallelen sowie denjenigen mit dem positiven Allel am QTL auf Chromosom 2H statistisch gesicherte Differenzen zu den restlichen Linien ergaben (Abbildung 2).

In der Sommergersten-Population zeigten Linien mit *Ryd2*+*Ryd3* eine erhöhte Leistung im relativen Kornertrag/Pflanze und tendenziell auch bei den Ertragsstrukturparametern relative Ährenzahl/Pflanze und relatives TKG.

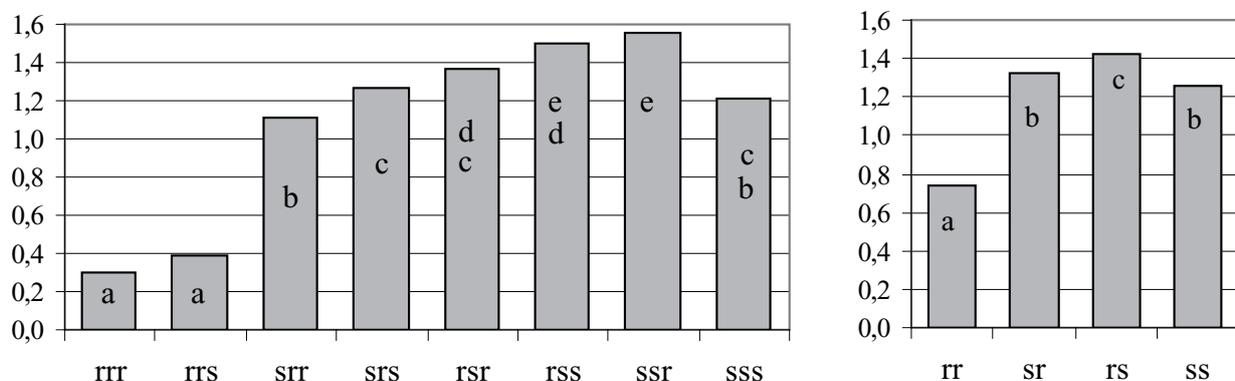


Abbildung 1: Mittlere ELISA-Extinktionen (405 nm) von Winter- (links) und Sommergersten-DH-Linien (rechts) mit verschiedenen Allelkombinationen. Unterschiedliche Buchstaben stehen für signifikante Unterschiede. Reihenfolge der Allele für Wintergerste: *Ryd2/Ryd3*/QTL, Sommergerste: *Ryd2/Ryd3*

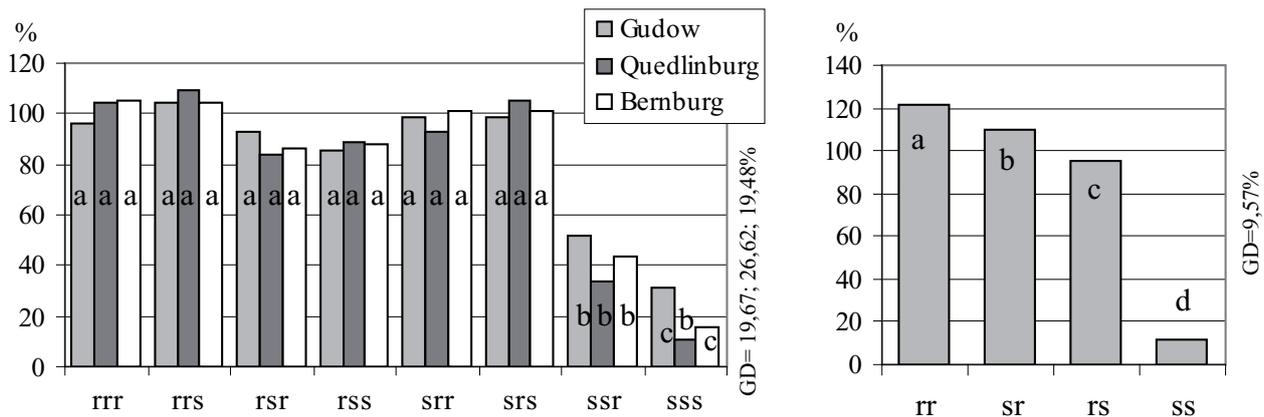


Abbildung 2: Relativer Kornertrag/Pflanze von Winter- (links) und Sommergersten-DH-Linien (rechts) mit verschiedenen Allelkombinationen. Unterschiedliche Buchstaben stehen für signifikante Unterschiede. Reihenfolge der Allele für Wintergerste: *Ryd2/Ryd3*/QTL, Sommergerste: *Ryd2/Ryd3*

Übereinstimmend in diesen Merkmalen hat *Ryd3* eine höhere Toleranzwirkung als *Ryd2*, die genotypisch anfälligen Linien reagierten mit einem starken Leistungsabfall im relativen Kornertrag/Pflanze und der relativen Ährenzahl/Pflanze. Tendenziell zeigte sich für die Wintergersten-DH-Linien ein ähnliches Ergebnis, wobei allerdings die relativ geringe Toleranzwirkung des QTL auf 2H noch berücksichtigt werden muss.

Die bisher vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass durch die Kombination der Resistenzallele *Ryd2* und *Ryd3* die Widerstandsfähigkeit der Gerste gegenüber der Infektion mit BYDV-PAV deutlich verbessert wird. Auf Grund der signifikanten Reduktion im Virusgehalt sind Linien mit dieser Genkombination als quantitativ resistent zu beschreiben. Im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen konnte dies in früheren Arbeiten für *Ryd2* und den QTL auf Chromosom 2H nicht nachgewiesen werden (SCHEURER et al. 2000). Die für die Genotypisierung der DH-Linien eingesetzten molekularen Marker haben ihre Eignung zum sicheren Nachweis der drei Resistenzallele in den verschiedenen Genotypen bestätigt und erlauben somit eine Pyramidisierung dieser Resistenzloci im praktischen Zuchtbetrieb (vgl. WERNER et al. 2006). Zur Verifizierung der Ergebnisse werden die Feldversuche in dieser Vegetationsperiode an den genannten Standorten wiederholt. Am Ende der Arbeiten werden somit phänotypisch und genotypisch charakterisierte DH-Linien beider Kreuzungskombinationen mit hoher BYDV-Toleranz bzw. -Resistenz stehen, die gemeinsam mit den entsprechenden Markern als Ausgangspunkt für eine züchterische Verbesserung der BYDV Toleranz dienen können.

Danksagung

Die dargestellten Arbeiten sind Teil eines Projektes, das im Rahmen des Programms zur Innovationsförderung durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV), sowie durch die Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V. (GFP) finanziert wird. Wir danken für die finanzielle Unterstützung. Unser weiterer Dank gilt der KWS-Lochow GmbH und der Saaten-Union Resistenzlabor GmbH für die

Erstellung der DH-Linien. Für die Durchführung der sehr arbeitsaufwendigen Feldversuche danken wir Herrn Dr. Claus EINFELDT (Dr. J. ACKERMANN und Co - Saatzucht Irlbach), Herrn Dr. Eberhard LAUBACH (Nordsaat Saatzuchtgesellschaft mbH) sowie Herrn Martin KOCH (KWS Lochow GmbH).

Literatur

- COLLINS, N.C., N.G. PALTRIDGE, C.M. FORD and R.H. SYMONS, 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.
- D'ARCY, C.J. and L.L. DOMIER, 2005: Family *Luteoviridae*. In: FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., EIGHTH DESSELBERGER, U., BALL, L.A. (eds): *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Report Internat. Committee Taxonomy of Viruses.* Elsevier, Acad. Press, 891-900.
- FORD, C.M., N.G. PALTRIDGE, J.P. RATHJEN, R.L. MORITZ, R.J. SIMPSON and R.H. SYMONS, 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.
- HABEKUSS, A., E. SCHLIEPHAKE, P. MATTHES, H. HARTLEB, S. MEHNER, M. GRÜNTZIG und E. FUCHS, 2002: Zum Auftreten des Gerstengelverzweigungsvirus und seiner Vektoren in Sachsen-Anhalt. Bericht über die 53. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatzuchtkaufleute Österreichs BAL Gumpenstein, 111-114.
- HUTH, W., 2002: Faktoren, welche die Ausbreitung der Verzweigungsviren im Getreide fördern und Maßnahmen, welche eine Schadensbegrenzung ermöglichen. Bericht über die 53. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatzuchtkaufleute Österreichs BAL Gumpenstein, 95-97.
- LISTER, M.R. and R. RANIERI, 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. and K.-H. JÖCKEL, 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., A. HABEKUSS, B. BEKELE and F. ORDON, 2004: A novel major gene on chromosome 6H for resistance of barley against the barley yellow dwarf virus. *Theor. Appl. Genet.* 109, 1536-1543.

- OBERFORSTER, M., 2002: Viröse Gelbverzwergung bei Wintergetreide in Österreich - Sortenreaktion und Gegenstrategien. Bericht über die 53. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatzuchtkaufleute Österreichs BAL Gumpenstein. 99-106.
- RIEDEL, W.E., R.W. KIECKHEFER, S.D. HALEY, M.A.C. LANGHAM and P.D. EVENSON, 1999: Winter wheat responses to bird cherry-oat aphids and barley yellow dwarf virus infection. *Crop Sci.* 39, 158-163.
- SCHALLER, C.W., 1984: The genetics of resistance to barley yellow dwarf virus in barley. In: *Barley Yellow Dwarf, a Proceeding of the Workshop*. Burnett, P.A. (ed.), CIMMYT, Mexico, 93-99.
- SCHALLER, C.W., C.O. QUALSET and J.N. RUTGER, 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., W. FRIEDT, W. HUTH, R. WAUGH and F. ORDON, 2001: QTL analysis of tolerance to a German strain of BYDV-PAV in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 103, 1074-1083.
- SCHEURER, K.S., W. HUTH, W. FRIEDT and F. ORDON, 2000: First results on BYDV-tolerance in barley estimated in pot experiments. *J. Plant Diseases and Protection* 107, 427-432.
- SUNESON, C.A., 1955: Breeding for resistance to yellow dwarf virus in barley. *Agron. J.* 47, 283.
- STEIN, N., G. HERREN and B. KELLER, 2001: A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large genome species such as *Triticum aestivum*. *Plant Breeding* 120, 254-356.
- WERNER, K., W. FRIEDT and F. ORDON, 2006: Localisation and combination of resistance genes against soil-borne viruses of barley (BaMMV, BaYMV) using doubled haploids and molecular markers. *Euphytica* 158, 323-329.