

Barley Yellow Dwarf Virus-Toleranz und markergestützte Züchtungsansätze bei der Gerste

W. FRIEDT, C. WEISKORN, K.S. SCHEURER, A. HABEKUSS, W. HUTH und F. ORDON

Zusammenfassung

Das Gersten-Gelbverzwergungsvirus (Barley Yellow Dwarf Virus, BYDV) ist ein bedeutendes Pathogen im Getreideanbau und verursacht eine der wichtigsten Krankheiten der Gerste weltweit. Um erste Informationen über die Vererbung der BYDV-Toleranz zu erhalten, wurden drei DH-Populationen hinsichtlich ihrer Variation in Wuchshöhe, Ertrag und Ertragsstrukturkomponenten getestet. Die Untersuchungen wurden an infizierten und nicht infizierten Pflanzen der gleichen DH-Linien in Feld- und Gefäßversuchen über drei Jahre an zwei Standorten durchgeführt. Die Pflanzen wurden künstlich mit BYDV-PAV tragenden Blattläusen inokuliert. Für alle Merkmale konnte eine kontinuierliche Variation beobachtet werden, die auf eine quantitative bzw. polygenische Vererbung der Toleranz gegenüber BYDV-PAV hindeutet. In der Population 'Post' x 'Vixen' konnten nach BYDV-Infektion zwei QTL für den relativen Kornertrag identifiziert werden, die nahezu 47% der phänotypischen Varianz erklären. Auf dem langen Arm von Chromosom 2H wurde ein QTL mit dem positiven Allel von 'Post' detektiert, der in der Population 'Post' x 'Nixe' in exakt demselben Markerintervall lokalisiert ist. Zusätzlich konnte in diesen zwei Populationen und in einer dritten ('MOB3651' x 'Asorbia') ein QTL in der Region des Gens *Ryd2* nachgewiesen werden. In der Kreuzungspopulation 'MOB3651' x 'Asorbia' wurde ebenfalls ein QTL auf Chromosom 2H detektiert, der aber mehr distal lokalisiert ist als in den Populationen mit 'Post' als Kreuzungselter. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß diese Regionen auf Chromosom 2H und 3H von besonderer Bedeutung für die BYDV-PAV-Toleranz sind. Die flankierenden Marker dieser Regionen könnten

daher effektive Werkzeuge für eine Vorselektion auf BYDV-tolerante Genotypen sein und eventuell sogar Ansatzpunkte für eine Isolierung der beteiligten Gene und eine Analyse ihrer Funktion.

Stichwörter: Gerste (*Hordeum vulgare*), Gelbverzwergung (BYDV-PAV), Toleranz, QTL, molekulare Marker, markergestützte Selektion

Einleitung

Die viröse Gelbverzwergung ist weltweit eine der wichtigsten und ökonomisch bedeutendsten Krankheiten im Getreidebau (z.B. LISTER und RANIERI, 1995). Die isometrischen Viruspartikel werden persistent durch Blattläuse übertragen, und die verschiedenen BYDV-Serotypen werden nach den vorherrschenden Vektoren unterteilt (ROCHOW, 1970; PRINGLE, 1998; MAYO, 1999). In Mittel- und Nordeuropa sind *Rhopalosiphum padi* und *Macrosiphum (Sitobion) avenae* die am häufigsten vorkommenden Blattlausarten. Aus diesem Grund haben die von ihnen übertragenen Serotypen BYDV-PAV und MAV hier eine besondere Bedeutung (PLUMB und JOHNSTONE, 1995). Die durch BYDV hervorgerufenen Symptome bestehen zum einen in einer Stauchung von Spross und Wurzel sowie einer Vergilbung der Blätter. Des weiteren sind die Anzahl der Ähren pro Pflanze und der Kornertrag reduziert, die Entwicklung (Ährenschiebedatum) ist verzögert, und die Pflanzen sind im Vergleich zu gesunden Pflanzen anfälliger für abiotischen Stress und Pilzpathogene (D'ARCY, 1995; HUTH, 1995). Um eine BYDV-Infektion zu vermeiden, kann die Aussaat zu einem Zeitpunkt geringer Blattlaus-Abundanz erfolgen oder eine prophylaktische Insektizidbehandlung durchgeführt werden. Aus ökologischer und ökonomischer

Sicht sind jedoch BYDV tolerante Sorten am günstigsten zu bearbeiten.

Schon bald nach der Entdeckung des Pathogens wurden bei Gerstensorten Unterschiede in der Befallsstärke festgestellt. Darauf hin wurde in der Sorte 'Rojo' das Gen *ryd1* identifiziert (SUNESON, 1955) und das aus einer äthiopischen Landsorte stammende Gen *Ryd2* beschrieben. Beide Gene vermitteln eine gewisse Toleranz gegenüber BYDV. Aufgrund seiner geringen Wirksamkeit wird *ryd1* allerdings in der praktischen Gerstenzüchtung nicht genutzt, während *Ryd2* bereits in einige Zuchtsorten eingelagert wurde, wie z.B. in die als BYDV-tolerant eingestuften Sorten 'Atlas 68' (SCHALLER und CHIM, 1969) und 'Vixen' (PARRY und HABGOOD, 1986) sowie in neuere Zuchtlinien (BURNETT et al., 1995; DELOGU et al., 1995). Für dieses Gen, welches auf dem langen Arm von Chromosom 3H in Centromer-Nähe kartiert wurde (COLLINS et al., 1996), stehen verschiedene PCR-basierte Marker zur Verfügung (FORD et al., 1998). Die Toleranz wird neben dem genetischen Hintergrund auch vom Virusisolat und den Umweltbedingungen beeinflusst (CATHERALL und HAYES, 1966; QUALSET, 1975; SCHALLER, 1984). Für eine effektive Züchtung auf Toleranz gegen BYDV ist daher das Wissen um den genetischen Hintergrund eine unabdingbare Voraussetzung. Aus diesen Gründen war es das erste Ziel unserer Arbeiten, die Vererbung der Toleranz gegen ein deutsches BYDV-PAV-Isolat zu analysieren, und in einem zweiten Schritt sollten Gene bzw. QTL (*Quantitative Trait Loci*) für dieses Merkmal identifiziert werden. QTL-Analysen gefolgt von einer markergestützten Selektion sind wichtige Werkzeuge für die Züchtung auf BYDV-Toleranz und einfacher und zeitsparen-

Autoren: Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang FRIEDT, Claudia WEISKORN, Konstanze S. SCHEURER, Dr. Frank ORDON, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I, Justus-Liebig-Universität Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 GIESSEN; Antje HABEKUSS, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Messeg 11-12, D-38104 BRAUNSCHWEIG; Dr. Winfried HUTH, Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ), Institut für Epidemiologie und Resistenz, Postfach 15 05, D-06435 ASCHERSLEBEN



Tabelle 1: Agronomische Eigenschaften der DH-Population 'MOB3561' x 'Asorbia' nach BYDV-PAV Infektion, differenziert nach *Ryd2*- und *ryd2*- tragenden DH-Linien, welche mit Hilfe des CAPS-Markers YlpPCR (FORD et al., 1998) identifiziert wurden. Relative Leistung BYDV-infiziert/nicht infiziert; 3-jährige Mittelwerte der Standorte Braunschweig und Aschersleben.

Leistungsmerkmal	Braunschweig		Aschersleben	
	<i>Ryd2</i>	<i>ryd2</i>	<i>Ryd2</i>	<i>ryd2</i>
Kornertrag [%]	79,4	42,5	113,4	29,2
Ähren/Pfl. [%]	91,2	54,4	111,9	38,7
TKG [%]	95,5	86,4	97,5	83,0
Körner/Ähre [%]	94,6	80,8	104,5	78,4
Wuchshöhe [%]	100,3	87,7	95,7	68,6

der zu handhaben, als eine nur schwer vorhersehbare Virusinfektion in Verbindung mit Blattlausflug.

Identifizierung der QTL für Toleranz gegen BYDV-PAV

Die Vererbung der Toleranz gegen BYDV-PAV wurde anhand von DH-Linien aus drei Kreuzungen, 'Post' x 'Vixen' (76 DH-Linien), 'Post' x 'Nixe' (70 DH-Linien) sowie 'MOB3561' x 'Asorbia' (61 DH-Linien) untersucht. Die Sorte 'Post' ist als tolerant einzustufen, wobei der zugrundeliegende Toleranzmechanismus bisher nicht beschrieben ist. 'Vixen' und 'MOB3561' sind beide Träger des tolerant bedingenden Gens *Ryd2*, während es sich bei 'Nixe' und 'Asorbia' um BYDV anfällige Sorten handelt.

Die Pflanzen wurden im Gewächshaus angezogen und mit einem deutschen BYDV-PAV-Isolat mittels *R. padi* im Einblattstadium infiziert. In den Vegetationsperioden 1996/97 und 1998/1999

wurden mit den beiden erstgenannten Kreuzungen (gemeinsamer Elter 'Post') in Braunschweig Feldversuche und mit den entsprechenden Linien in Gießen Gefäßversuche durchgeführt (vgl. SCHEURER et al., 2000). Die DH-Linien der Kreuzung 'MOB3561' x 'Asorbia' wurden im Rahmen von Feldversuchen in Braunschweig und Aschersleben geprüft (SCHEURER, 2001). Da der Virustiter nur schwach mit dem Ertragsverlust des verwendeten Isolats korrelieren (SCHEURER et al., 2000), wurden zur Ermittlung der Toleranz der Eltern und der DH-Linien der Kornertrag pro Pflanze, das Tausendkorngewicht (TKG), die Anzahl Ähren pro Pflanze sowie Körner pro Ähre und die Wuchshöhe infizierter Pflanzen im Vergleich zu gesunden Kontrollpflanzen der gleichen DH-Linien angezogen. Zusätzlich wurde der Zeitpunkt des Ährenschiebens in den Gefäßversuchen erfasst.

In allen Experimenten zeigten sich signifikante genotypische Effekte und ein

Einfluß der Virusinfektion auf den relativen Kornertrag und alle weiteren Untersuchungsparameter (Tabelle 1, vgl. SCHEURER, 2001). Der Kolmogorov-Smirnoff-Anpassungstest ergab Übereinstimmung mit einer Normalverteilung (Abbildung 1) und somit einen Hinweis auf eine quantitative Vererbung (vgl. SCHEURER et al., 2001). Aus diesem Grund wurden QTL-Analysen für BYDV-Toleranz mit den Kreuzungen 'Post' x 'Vixen', 'Post' x 'Nixe' und 'MOB3561' x 'Asorbia' durchgeführt. Zur Erstellung der genetischen Kopplungskarten wurden Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs, EcoRI/MseI) und Simple Sequence Repeats (SSRs) verwendet, wobei SSRs als Ankermarker eingesetzt wurden. Die genetische Karte der Kreuzung 'Post' x 'Vixen' hat eine Länge von 1328cM mit einem mittleren Markerabstand von 12,1 cM. Die Karte der Kreuzung 'Post' x 'Nixe' umfasst 958,5 cM mit einem mittleren Markerabstand von 8,4 cM, und die genetische Karte der Kreuzung 'MOB3561' x 'Asorbia' beinhaltet bei einem durchschnittlichen Markerabstand von 13,2 cM insgesamt 1211,6 cM. Zudem wurden mit dem CAPS-Marker YlpPCR (FORD et al., 1998) die Populationen 'Post' x 'Vixen' und 'MOB3561' x 'Asorbia' auf *Ryd2* überprüft. Aufbauend auf diesen phänotypischen und genotypischen Daten wurden QTL-Analysen durchgeführt (SCHEURER et al., 2001, WEISKORN unveröffentlicht).

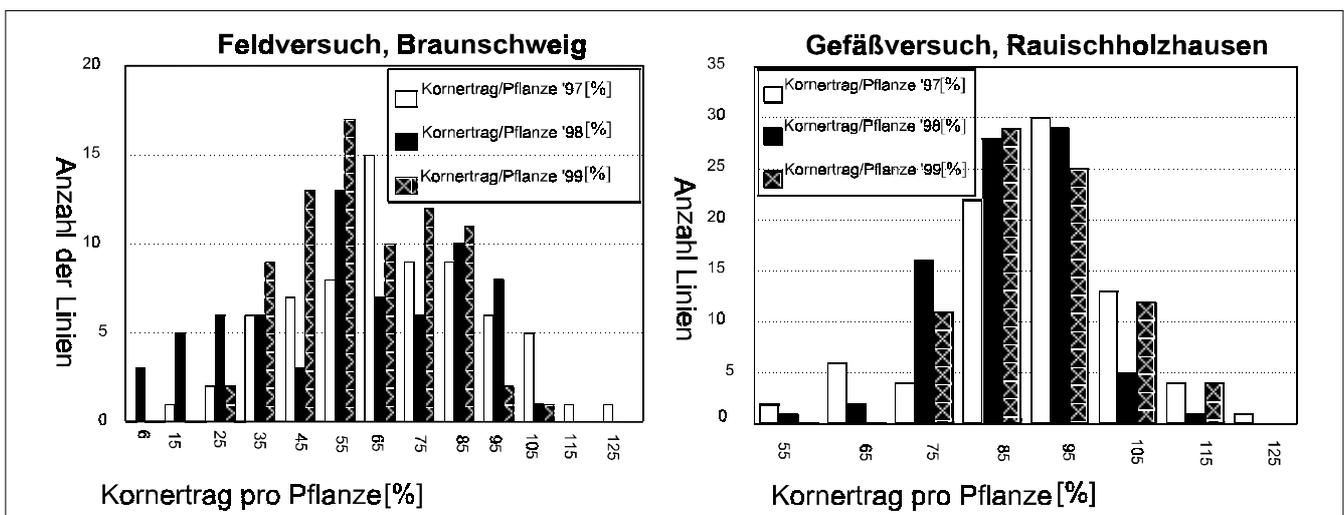


Abbildung 1: Häufigkeitsverteilungen des Kornertrags pro Pflanze [%] nach BYDV-PAV Infektion der DH-Population 'Post' x 'Vixen' im Feldversuch in Braunschweig (links) sowie im Gefäßversuch in Rauschholzhausen (rechts) in den Versuchsjahren 1996/97 bis 1998/99.

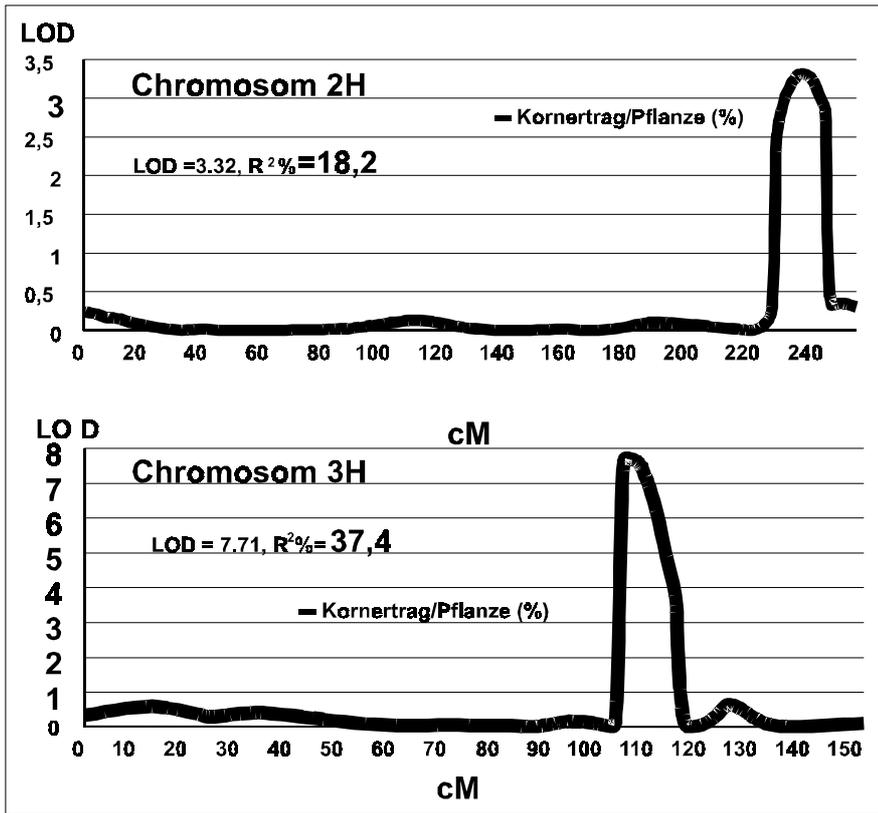


Abbildung 2: QTLs für den relativen Kornertrag in der Population 'Post' x 'Vixen' auf den Chromosomen 2H (oben) und 3H (unten).

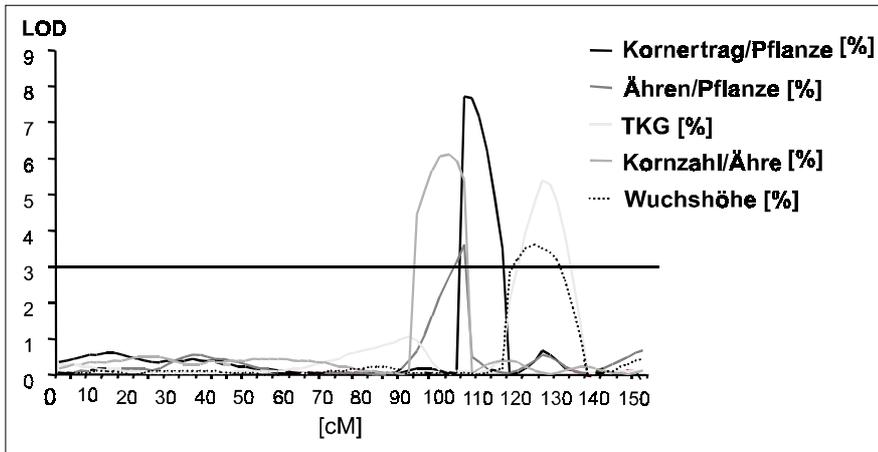


Abbildung 3: QTLs für Ertragsparameter auf Chromosom 3H in der Nähe des *Ryd2*-Gens in der Population 'Post' x 'Vixen'.

Vom Standpunkt des Pflanzenbauers und des Züchters ist der relative Kornertrag nach BYDV-Infektion das wichtigste Kriterium. Über alle Umwelten wurden in der Population 'Post' x 'Vixen' zwei QTLs für den relativen Kornertrag pro Pflanze gefunden (Abbildung 2): Ein QTL auf Chromosom 2H erklärt 19,6% der phänotypischen Varianz; das positive Allel stammt vom Elter 'Post', und der QTL wird flankiert von dem RAPD-Marker W20H480 und dem SSR-Mar-

ker HVCSG. Ein zweiter QTL wurde auf Chromosom 3H in dem Intervall zwischen dem SSR-Marker Bmac067 und dem CAPS-Marker YlpPCRM (*Ryd2*-Locus) lokalisiert. In diesem Fall stammt das positive Allel vom Elter 'Vixen' und erklärt 31,8% der phänotypischen Varianz. Der additive Effekt des QTL auf Chromosom 3H ist mit 7,1% höher als bei dem QTL auf Chromosom 2H (4,0%). Zusammen erklären diese beiden QTL 46,8% der phänotypischen

Varianz bzgl. des relativen Kornertrags nach BYDV-Infektion. Auch für weitere Merkmale wurden QTLs in der Nähe des *Ryd2*-Gens identifiziert (Abbildung 3).

In der Population 'Post' x 'Nixe', deren Untersuchung hauptsächlich der Validierung der QTLs der Kreuzung 'Post' x 'Vixen' diente, stammten die positiven Allele der Loci für den relativen Kornertrag pro Pflanze auf den Chromosomen 7H, 2H und 4H von der Sorte 'Post' (SCHEURER et al., 2001). Interessanterweise hat der QTL auf Chromosom 2H den größten Effekt ($\sigma^2_p = 27,6\%$) und kartiert in dem selben Markerintervall (W20H480-HVCSG) wie in der Population 'Post' x 'Vixen' (Abbildung 4). Da weitere QTLs deren positives Allel von 'Post' stammt in dieser Region auf Chromosom 2H detektiert wurden, ist anzunehmen, dass diesem Chromosomen-Segment eine besondere Bedeutung im Hinblick auf die BYDV-Toleranz der Sorte 'Post' zukommt; ähnliches scheint für die Region um das *Ryd2*-Gen zu gelten. Bei einer QTL-Analyse für den relativen Kornertrag pro Pflanze in der Kreuzung 'MOB3561' x 'Asorbia' konnte in der Region des *Ryd2*-Gens ebenfalls ein QTL detektiert und ein weiterer QTL für den relativen Kornertrag auf Chromosom 2H identifiziert werden; diese beiden QTL erklären zusammen 79.1% der phänotypischen Varianz (WEISKORN unveröffentlicht). Im Vergleich zu den QTLs in den Kreuzungen mit 'Post' als Elter ist der QTL auf Chromosom 2H in der Population 'MOB3561' x 'Asorbia' mehr distal lokalisiert.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Aufgrund der Größenordnung der erklärten phänotypischen Varianz und der Tatsache, dass die QTLs in unabhängigen Stichproben ermittelt wurden, sollten diese gut geeignet sein, um eine markergestützte Vorselektion auf BYDV-PAV tolerante Genotypen durchzuführen (vgl. MELCHINGER et al., 1998). Unter diesem Gesichtspunkt ist die Tatsache, dass alle QTL-flankierenden Marker auf der PCR basieren (Abbildung 2) besonders interessant. Dadurch sind sie dafür geeignet in großem Stil in der praktischen Pflanzenzüchtung eingesetzt zu werden. Dies gilt z.B. für die Marker Bmac67 und

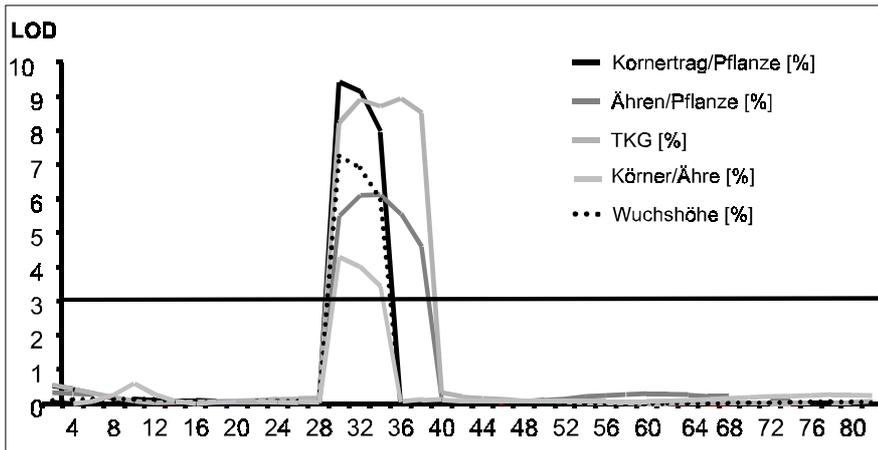


Abbildung 4: QTLs auf Chromosom 2H in der Kreuzung 'Post' x 'Nixe', die in dem selben Markerintervall (W20H480-HVCSG) wie der Population 'Post' x 'Vixen' kartieren.

YlpPCR (FORD et al., 1998) hinsichtlich der *Ryd2*-Region und für HVCSG (LIU et al., 1996) und W20480 bezüglich des QTL auf Chromosom 2H. Auch sind alle Marker mit Ausnahme von W20H480 co-dominant und aus diesem Grunde auch geeignet für den Einsatz in heterozygoten Populationen. Außerdem sind diese Marker hoch polymorph in deutschen Wintergerstensorten (SCHEURER et al., 2001) und daher hierfür generell gut geeignet. Letztendlich könnten diese Marker als Ansatzpunkt für die Isolierung der beteiligten Gene dienen und so eine Aufklärung ihrer Funktion ermöglichen.

Danksagung

Wir danken Kirsten Ramlow, Ines Müller, Annette Plank, Sabine Wagner, Burkhard Lather und Katrin Balke für die ausgezeichnete technische Assistenz. Diese Arbeiten wurden finanziert durch Zuwendungen von dem Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (BMVEL), der Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung (GFP) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), Bonn.

Literatur

BURNETT, P. A., A. COMEAU und C. O. QUALSET, 1995: Host plant tolerance or resistance for control of barley yellow dwarf. In: D'ARCY C.

- J., P. A. BURNETT (eds.): Barley yellow dwarf. 40 years of progress, pp. 321-343. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- CATHERALL, P. L. and J. D. HAYES, 1996: Assessment of varietal reaction and breeding for barley yellow dwarf virus in barley. - *Euphytica* 15, 39-51.
- 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.
- DELOGU, G., L. CATTIVELLI, M. SNIDARO and A. M. STANCA, 1995: The Yd2 gene and enhanced resistance to barley yellow dwarf virus (BYDV) in winter barley. - *Plant Breeding* 114, 417-420.
- D'ARCY, J. C., 1995: Symptomatology and host range of barley yellow dwarf. In D'ARCY, C. J., P. A. BURNETT (eds.): Barley yellow dwarf. 40 years of progress, pp. 107-127. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- 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, 1998.
- HUTH, W., 1995: Möglichkeiten und Grenzen der Züchtung von Getreidesorten mit Resistenz gegenüber den Gelbverzwergungsviren - aus virologischer Sicht. - Bericht Arbeitstagung Saatzüchtleiter, Gumpenstein, 46, 31-42.
- LIU, Z. W., R. M. BIYASHEV und M. A. SAGHAI MAROOF, 1996: Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. - *Theor. Appl. Genet.* 93, 869-876.
- LISTER, R. M. and R. RANIERI, 1995: Distribution and economic importance of barley yellow dwarf. In D'ARCY, C. J., P. A. BURNETT (eds.):

Barley yellow dwarf. 40 years of progress, pp. 29-53. APS Press, St. Paul, Minnesota.

- MAYO, M. A., 1999: Development in plant virus taxonomy since the publication of the 6th ITCV report. - *Arch. Virol.* 144, 1659-1666.
- MELCHINGER, A. E., H. F. UTZ and C. C. SCHÖN, 1998: Quantitative trait locus (QTL) mapping using different testers and independent population samples in maize reveals low power of QTL detection and large bias in estimates of QTL effects. - *Genetics* 149, 383-403.
- PLUMB, R. T. and G. R. JOHNSTONE, 1995: Cultural, chemical and biological methods for the control of barley yellow dwarf. In: D'ARCY, C. J., P. A. BURNETT (eds.): Barley yellow dwarf. 40 years of progress, pp. 107-127. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- PARRY, A. L. and R. M. HABGOOD, 1986: Field assessment of the effectiveness of a barley yellow dwarf resistance gene following its transference from spring to winter barley. - *Ann. Appl. Biol.* 108, 395-401.
- PRINGLE, C. R., 1988: Virus Taxonomy - San Diego 1988. - *Arch. Virol.* 143, 1449-1459.
- QUALSET, C. O., 1975: Sampling germplasm in a centre of diversity: an example of disease resistance in Ethiopian barley. In FRANKLE, O. H., J. HAWKES (eds): Crop genetic resources of today and tomorrow pp. 81-96. Cambridge Univ. Press, Cambridge UK, 1975.
- RASMUSSEN, D. W. and C. W. SCHALLER, 1959: The inheritance of resistance in barley to the yellow dwarf virus. - *Agron. J.* 51, 661-664.
- ROCHOW, W. F., 1970: Barley yellow dwarf virus: Phenotypic mixing and vector specificity. - *Science* 167, 875-878.
- SCHALLER, C. W., 1984: The genetics of barley yellow dwarf virus in barley. In: P. A. BURNETT (ed): Barley yellow dwarf. Proc. Workshop CIMMYT, Mexico, 93-99.
- SCHALLER, C. W. and C. I. CHIM, 1968: Registration of Atlas 68 barley. - *Crop. Sci.* 9, 521.
- SCHEURER, K. S.: Genetische Analyse der Vererbung von Toleranz der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) gegenüber Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV). Phd thesis Univ. Giessen, Verlag Shaker, Aachen, Germany.
- 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, 2000.
- 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. - *Theor Appl Genet.* 103, 1074-1083.
- SKARIA, M., R. M. LISTER, J. E. FOSTER and G. SHANER, 1985: Virus content as an index of symptomatic resistance to barley yellow dwarf virus in cereals. - *Phytopathology* 75, 212-216.
- SUNESON, C. A., 1955: Breeding for resistance to barley yellow dwarf virus in barley. - *Agron. J.* 47, 283.