



Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-Programm

## BIOLOGIE

**Forschungsvorhaben:** GABI – PLANT-KBBE II- Verbundvorhaben:  
‘Identifikation neuer Anfälligkeitsfaktoren deren Modifikation rezessiv vererbte  
Virusresistenz bedingt und deren Nutzung in Gerste, Tomate und Melone  
(ViReCrop) (Teilprojekt B)’

**Förderkennzeichen:** 0315708B

**Zuwendungsempfänger:** Julius Kühn-Institut Bundesforschungsinstitut  
für Kulturpflanzen (JKI), Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg

**Ausführende Stelle:** Julius Kühn-Institut Bundesforschungsinstitut für  
Kulturpflanzen (JKI) - Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz,  
Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg

**Projektleitung:** Prof. Dr. Frank Ordon

Laufzeit: 01.04.2010 bis 30.11.2013

"Das diesem Bericht zugrundeliegende Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des  
Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen  
0315708B gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung  
liegt beim Autor".

## Schlussbericht

ZE: Julius Kühn-Institut (JKI), Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg	Förderkennzeichen: 0315708 B
Vorhabensbezeichnung: GABI – PLANT - KBBE II	
Verbundvorhaben: ViReCrop: Identifikation neuer Anfälligkeitsfaktoren deren Modifikation rezessiv vererbte Virusresistenz bedingt und deren Nutzung in Gerste, Tomate und Melone – Teilvorhaben B	
Laufzeit des Vorhabens: 01.04.2010 – 30.11.2013	
Berichtszeitraum: 01.04.2010 – 30.11.2013	

### I. Kurze Darstellung zu

#### 1. Aufgabenstellung

Ziel des Projektes war es, für das Gelbmosaikvirusresistenzgen *rym13*, welches auf Chromosom 4H der Gerste lokalisiert ist, eine hochauflösende Kartierungspopulation als Voraussetzung für eine Isolation dieses Resistenzgens zu erstellen (Arbeitspunkt 1.7). Des Weiteren sollten mögliche Virusresistenz-Kandidatengene im Genom der Gerste kartiert (Arbeitspunkt 1.6) und eine RNA Isolation von verschiedenen Virusisolaten als Voraussetzung für eine Sequenzierung dieser durchgeführt werden, um Erkenntnisse über die Variation innerhalb eines Feldes sowie zwischen geographischen Regionen zu gewinnen (Arbeitspunkt 2.6).

#### 2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Mit der Isolation des *rym4/rym5* Locus in Gerste (Pellio et al. 2005; Stein et al. 2005) konnte gezeigt werden, dass auch in komplexen Genomen eine Genisolation mittels kartengestützter Klonierung möglich ist. Im Verlauf des Projektes wurden genomische Ressourcen publiziert, welche insbesondere eine Markerabsättigung effizienter gestalten (IBSC 2012; Mascher et al. 2013b; Mayer et al. 2011; Mayer et al. 2009; Poland et al. 2012). Da in verschiedenen viralen Pathosystemen Gene des Translationsinitiationskomplexes als Resistenzgene identifiziert wurden (Le Gall et al. 2011), und der *rym4/rym5* Locus für den Translationsinitiationsfaktor 4E codiert, stellten entsprechende Gene aus diesem Bereich Kandidatengene für den *rym13*-Locus dar. Des Weiteren war das TOR-Gen (Target of

Rapamycin) (Schepetilnikov et al. 2011) bekannt, welches an der Resistenz gegen das *Cauliflower mosaic virus (CaMV)* beteiligt ist.

Für die Kartierung des Resistenzgens *rym13* stand F<sub>2</sub> Saatgut zum Aufbau einer segmentalen RIL-Population zur Verfügung und die Lokalisation dieses Resistenzgens war bekannt (Humbroich et al. 2010). Langjährige Expertise im Aufbau hochauflösender Kartierungspopulationen, der mechanischen Übertragung des *Barley mild mosaic virus* (BaMMV) und der Erfassung der Resistenzreaktion mittels ELISA stand im JKI zur Verfügung ebenso wie in der Durchführung von Feldphänotypisierungen. Weiterhin lag weitreichende Expertise in der Nutzung genomischer Ressourcen zur Markerabsättigung vor (Lüpken et al. 2013).

### 3. Planung und Ablauf des Vorhabens

#### Arbeitspunkt 1.6

Zur Kartierung von Kandidatengenomen sollten mit Hilfe der vorhandenen Sequenzdaten *in-silico* Kartierungen durchgeführt werden. Des Weiteren sollten Weizen/Gerste Additionslinien und Substitutionslinien für eine erste chromosomale Lokalisierung verwendet werden. In einem nächsten Schritt sollten die Kandidatengene auf den Elterlinien der Standard-Kartierungspopulationen analysiert und im Falle von Polymorphismen die Kandidatengene in einer spaltenden Population kartiert werden.

#### Arbeitspunkt 1.7

Zur Erstellung einer hochauflösenden Kartierungspopulation sollten 5000 F<sub>2</sub>-Pflanzen mit bereits bekannten flankierenden Markern analysiert werden. Für das Zielintervall nicht rekombinante Linien sollten verworfen werden. Von den heterozygot rekombinanten Pflanzen sollten je 12 Nachkommen ausgesät und ebenfalls genotypisch analysiert werden. Die homozygot rekombinanten Pflanzen aus F<sub>2</sub> und aus F<sub>3</sub> sollten jeweils als segmentale Rekombinante Inzucht-Linien (RILs) weitergeführt und für die Markerabsättigung und die phänotypischen Tests herangezogen werden. Die Markerabsättigung sollte mit Hilfe bereits publizierter hochauflösender Kartierungspopulationen und neuerer Sequenzinformationen, basierend auf der physischen Karte der Gerste, durchgeführt werden. Kosegregierende BAC-contigs sollen zur Kandidatengen-Identifikation sequenziert werden.

## Arbeitspunkt 2.6

Zum Verständnis der Resistenzbrechung durch BaMMV/BaYMV sollten Virusisolate von verschiedenen natürlichen Infektionsstellen gesammelt, die Viren gereinigt und die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben werden, die dann an das IPK zur Sequenzierung (NGS) abgegeben werden sollte.

### 4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Gerste ist eine der wichtigsten Getreidearten weltweit. Die Anbaufläche betrug 2012 in Deutschland 1,68 mio ha mit einem Durchschnittsertrag von 61,9 dt/ha. In der Europäischen Union ist Deutschland als Erzeugerland an zweiter Stelle nach Frankreich (Ertrag von 66,4 dt/ha) zu finden (AMI Markt Bilanz, 2014). Neben weiteren Pathogenen, die den Ertrag bei Gerste limitieren, hat sich die Gelbmosaikvirose der Gerste zu einer bedeutenden Krankheit der Wintergerste entwickelt. Diese Krankheit wird hervorgerufen durch verschiedene Stämme des *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) und des *Barley mild mosaic virus* (BaMMV) und kann zu Ernteaussfällen von bis zu 50% (Plumb et al. 1986) führen. Da diese Viren durch den bodenbüdigen Plasmodiophorid *Polymyxa graminis* übertragen werden (Adams et al. 1988), sind chemische Maßnahmen zur Bekämpfung der Krankheit weder effektiv noch ökologisch sinnvoll. Daher ist die Züchtung resistenter Sorten die einzige Möglichkeit zur Verhinderung erheblicher Ertragsverluste. Die Mehrzahl der zugelassene Sorten tragen das *rym4/5* Resistenzgen (Bundessortenamt 2013), welches jedoch durch BaYMV-2 bzw. BaMMV-Teik überwunden wurde (Habekuss et al. 2008; Kühne et al. 2003). Gegenüber der Gelbmosaikvirose ist jedoch eine Vielzahl von Resistenzgenen bekannt. Bisher konnten 18 Gene für die Bymovirusresistenz in Gerste identifiziert werden (Kai et al. 2012; Ordon et al. 2009). Das Gen der *rym4/5* vermittelten Resistenz konnte von Stein et al. (2005) als Translationsinitiationsfaktor *Hv-eIF4E* identifiziert werden. Die Feinkartierung dieses Resistenzgens wurde ebenfalls mit Hilfe einer hochauflösenden segmentalen RIL-Kartierungspopulation durchgeführt (Pellio et al. 2005). Das Resistenzgen *rym13* konnte bereits auf Chromosom 4HL lokalisiert werden und entsprechende flankierende Marker standen zur Verfügung (Humbroich et al. 2010). Daten zur Gersten-Reis-Brachypodium-Synthänie standen mit dem „Genome Zipper“ (Mayer et al. 2009) zur Verfügung und die physische Karte von Gerste ist im Aufbau (Mayer et al. 2009, IBGS 2012). Darüber hinaus

waren verschiedene dichte Markerkarten bekannt (Sato et al. 2009; Thiel et al. 2003; Varshney et al. 2007). In einem Projekt zur Feinkartierung des Resistenzgens *rym11* und durch Resistenzprüfungen verschiedener Gerstensorten waren am JKI Resistenztests auf BaMMV und BaYMV etabliert (Lüpken et al. 2013).

#### 5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Projekt wurde in Zusammenarbeit des Julius Kühn-Instituts (JKI) in Quedlinburg mit dem Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben, dem CEBAS-CSIS (Murcia, Spanien), IBMCP-CSIC (Valencia, Spanien), INRA-UGAFL (Montfavet, Frankreich) und mit den Firmen Syngenta (Saint Sauveur, Frankreich) und Bioproductos (Murcia, Spanien) durchgeführt.

## **II. Eingehende Darstellung**

### 1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

#### Arbeitspunkt 1.6 Kartierung von Kandidatengenen

Zunächst wurden Primerpaare für Gene mit Beteiligung an der Translation, d.s. *eIF(iso)4E*, *eIF4G*, *eIF(iso)4G* und *nCBP* entwickelt und diese in Gerste/Weizen-Additionslinien kartiert. Mit diesem Vorgehen konnten ein Translationsinitiationsfaktor auf Chromosom 2H und ein weiterer auf Chromosom 5H lokalisiert werden. In einem nächsten Schritt wurden die entsprechenden Primerpaare auf den Eltern verschiedener im Institut vorhandener Kartierungspopulationen ('Haruna Nijo' x 'H602', 'Vixen' x 'Post' und 'Borwina' x 'HOR3365') auf Polymorphismen untersucht, um diese Gene exakt kartieren zu können. Da die abgeleiteten Primer keinen Polymorphismus zwischen den Eltern zeigten, wurden die entsprechenden Fragmente allelspezifisch sequenziert. Mit diesem Vorgehen konnte jedoch lediglich ein Polymorphismus in *eIF(iso)4E* zwischen den Eltern der Populationen 'Vixen' x 'Post' und 'Borwina' x 'HOR3365' nachgewiesen werden, mit dessen Hilfe dieses Gen auf Chromosom 1H in der Region des Resistenzgens *rym7* lokalisiert werden konnte. Da der SNP

jedoch in einem Intron lokalisiert ist, gibt dieses Ergebnis keinen Hinweis auf eine Beteiligung von *eIF(iso4)E* an der *rym7* Resistenz.

Insgesamt konnten letztendlich durch komparative Kartierung, d.h. einen *in-silico* Vergleich der Kartenpositionen der bearbeiteten EST-Sequenzen in Gerste, Reis, Brachypodium und Sorghum, acht an der Translation beteiligte Gene lokalisiert werden (Abb. 1). Sowohl mittels genetischer als auch komparativer Kartierung wurde *eIF(iso)4E* auf Chromosom 1H lokalisiert.

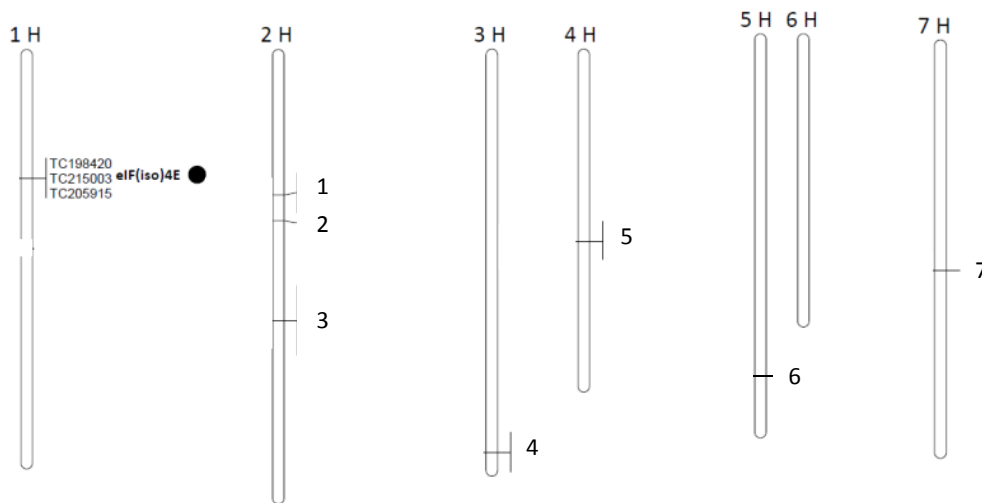


Abb. 1: Kartierung von Translationsinitiationsfaktoren mittels komparativer Kartierung

Schepetilnikov et al. (2011) zeigten, dass TOR- (target-of-rapamycin) defiziente Pflanzen resistent gegenüber einer Infektion mit CaMV sind. Daraufhin wurde das TOR-Gen in die Kandidatengenanalyse einbezogen. In Gerste wurde dieses Gen mittels komparativer Kartierung vom Projektpartner IPK dem Chromosom 1H zugeordnet und die entsprechenden Sequenzen zur Verfügung gestellt. Nachdem die 2011 entwickelten Primerpaare keine Sequenzunterschiede auf den Elterlinien der DH-Populationen für *rym7*, welches auch auf Chromosom 1H lokalisiert ist, zeigten, wurden 12 neue Primerpaare entwickelt und diese auf Polymorphismen untersucht. Hierbei konnte ein Sequenzunterschied detektiert und zwischen den Elterlinien 'HOR3365' und 'Borwina' validiert werden. Anschließend wurde das Gen mit Hilfe der entsprechenden DH-Population kartiert (Abb. 2) und es konnte gezeigt werden, dass das TOR-Gen nicht mit dem Resistenzlocus cosegregiert und somit kein Kandidatengen für *rym7* darstellt.

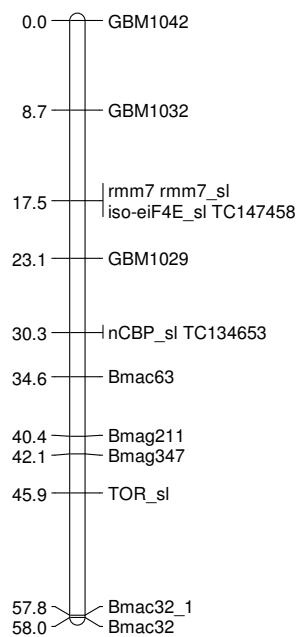


Abb. 2: Kartierung des TOR-Gens auf der Grundlage von 48 DH-Linien der DH-Population 'HOR3365' x 'Borwina'

### Arbeitspunkt 1.7

Es wurde eine Kartierungspopulation bestehend aus 5191 F<sub>2</sub>-Pflanzen erstellt und diese mit den flankierenden Markern WMS06, GBM1015 und HVM67 analysiert. Die Auflösung der Population beträgt 0,0096 cM. Innerhalb der Kartierungspopulation konnten 26 homozygote und 1302 heterozygot rekombinante Pflanzen detektiert werden. Die Marker wurden daraufhin durch Auszählung der Rekombinationsereignisse in einem Abstand von 13,05 cM kartiert (Abb. 2). Dies ist in Übereinstimmung mit der ursprünglichen genetischen Karte für *rym13* von Humbroich et al. (2010).

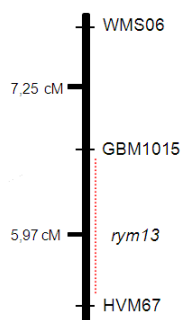


Abb. 2: Partielle Karte von Chromosom 4H nach Analyse von 5191 F<sub>2</sub>-Pflanzen

Um *rym13* auf einen Bereich von 0,01 cM einzugrenzen, wurden alle heterozygot rekombinanten Pflanzen weitergeführt und RILs für das Zielintervall entwickelt. Da die Resistenz auf Grund erster ELISA-Ergebnisse in dem Intervall zwischen den Markern ‚GBM1015‘ und ‚HVM67‘ lokalisiert werden konnte, wurden nur Linien, welche eine Rekombination in diesem Intervall aufwiesen für die weitere Markerabsättigung herangezogen. Homozygot rekombinante Pflanzen aus dem Intervall ‚WMS06‘ und ‚GBM1015‘ wurden für nachfolgende Analysen nicht weiter verwendet. Zur Markerabsättigung und für phänotypische Tests wurden 447 F<sub>3</sub>-Familien des Zielintervalls analysiert, woraus 432 unabhängige rekombinante segmentale Inzuchtlinien entstanden. Insgesamt standen nun 458 RILs zur Verfügung, welche auf 4346 F<sub>2</sub>-Pflanzen zurückgehen, wodurch sich eine genetische Auflösung von 0,011 cM ergibt.

Zur Markersaturation wurden die flankierenden Marker ‚GBM1015‘ und ‚HVM67‘ in verschiedene hochauflösende Standardkartierungspopulationen kartiert und alle im Zielintervall liegenden Marker und deren Sequenzinformation wurden zur Entwicklung neuer Primerpaare verwendet und anschließend allelspezifisch sequenziert. Bei vorhandenen Polymorphismen zwischen den Elterlinien ‚Taihoku A‘ und ‚Plaisant‘ wurden diese Marker unter Nutzung aller RILs kartiert. Durch Kartierung der flankierenden Marker in die Standardkartierungspopulationen ‚H602‘ x ‚Haruna Nijo‘ (Sato et al. 2009), ‚MBR1012‘ x ‚Scarlett‘ (Perovic, unveröffentlicht) sowie ‚Morex‘ x ‚Barke‘ (Thiel et al. 2009) und der Daten des 9k iSelect Chips konnten 20 polymorphe Marker identifiziert und kartiert werden.

Als nächsten Schritt der Markersaturation wurden Daten des „Genome Zipper“ (Mayer et al. 2011) verwendet. Dafür wurden die neu entwickelten, flankierenden Marker in diesem verankert und die genetischen Informationen aus synthänen Brachypodium-, Reis- und Sorghumgenen zur weiteren Primerentwicklung verwendet. Dafür wurden die Gene mit Hilfe des IPK-barley BLAST Servers Gersten-contigs auf dem entsprechenden Chromosom 4HL zugeordnet (<http://webblast.ipk-gatersleben.de/barley/viroblast.php>) und Primer zur Sequenzierung abgeleitet. Mit Hilfe dieses Werkzeuges konnten 27 neue Primer abgeleitet werden, wobei fünf Polymorphismen aufzeigten und in der RIL-Population kartiert werden konnten.

Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, ergibt sich eine nahezu gleichmäßige Verteilung der entwickelten Marker in dem Zielbereich, bis auf das Intervall SCRI\_RS\_1xxx2 und Bxxx4, in dem eine Lücke erkennbar ist, in der keine weiteren Marker kartiert werden konnten. Diese



Lücke kann als Hinweis auf eine besonders hohe Rekombinationsrate in diesem Bereich gesehen werden.

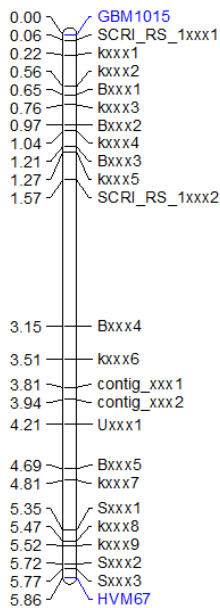


Abb. 3: Karte von Chromosom 4HL im Intervall HVM67 – GBM1015 basierend auf 4084 F<sub>2</sub>-Pflanzen mit einer Auflösung von 0,01cM

Zur Kartierung des Resistenzgens *rym13* wurden an 437 entwickelten RILs Tests für die BaMMV-Resistenz in der Klimakammer durch mechanische Inokulation durchgeführt. Hierfür wurden jeweils zehn Pflanzen einer Linie mechanisch inokuliert und mittels DAS-ELISA anhand der Virusextinktion die Resistenzreaktion erfasst. Zur Kartierung der BaYMV Resistenz wurden die RILs an zwei natürlich kontaminierten Standorten (Schladen und Bornum) im Feld auf deren Resistenzeigenschaften getestet. Den Resistenzdaten liegen ebenfalls DAS-ELISA-Werte zugrunde. Hierbei konnten über drei Jahre Resistenzdaten von 447 RILs erhoben werden die zeigen, dass die BaMMV- und die BaYMV- Resistenz in dem Elter 'Taihoku A' nicht durch denselben Locus vererbt werden.

Die BaMMV-Resistenz konnte zwischen den flankierenden Markern auf Chromosom 4H kartiert werden. Bei fortlaufender Kartierung weiterer Marker traten allerdings oft Doppelrekombinationsereignisse im Bereich der Resistenz auf. Um zu überprüfen, ob dies ein Fehler im Populationsaufbau ist, oder ob das Resistenzgen in einem anderen Intervall kartiert, wurden die Marker mit Hilfe der ursprünglichen DH-Population von Humbroich et al. (2010) und mit Hilfe einer weiteren Population, deren Mosaikresistenz ebenfalls durch das Gen *rym13* bedingt ist, kartiert (Abb. 4).

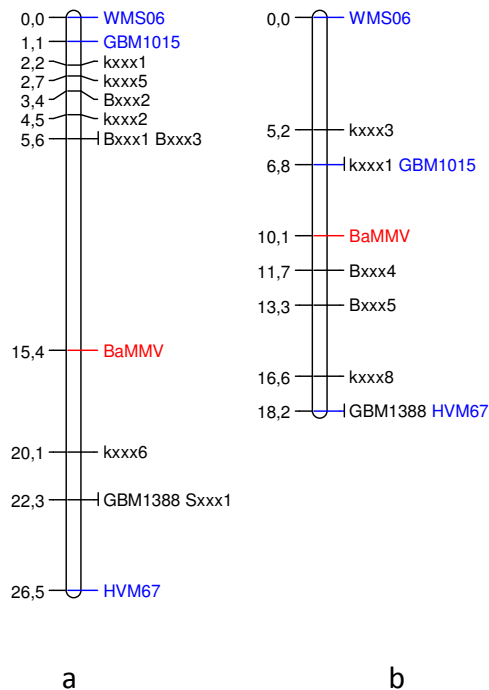


Abb. 4: Karte von Chromosom 4HL a) basierend auf 90 DH-Linien der Population 'HOR11019' x 'F<sub>11</sub> Rubina x Post', b) basierend auf 63 DH-Linien der Original-DH-Population 'Taihoku A' x 'Plaisant' von Humbroich et al. (2010)

Die Lokalisation des Resistenzgens konnte durch diese Kartierungen bestätigt werden.

Für die weitere Markerentwicklung wurde die Methode der Genotypisierung durch Sequenzierung (Genotyping-By-Sequencing, GBS) in Zusammenarbeit mit dem IPK in Gatersleben durchgeführt. Dafür wurden 90 Linien (38 RILs, 25 Linien der DH-Population 'Taihoku A' x 'Plaisant' von Humbroich et al. (2010) und 23 Linien der Kreuzung 'HOR11019' x 'F<sub>11</sub> Rubina x Post') analysiert und die SNPs an der POPSEQ-Karte (Mascher et al. 2013a) verankert. Mit Hilfe der Verankerung der Daten der RILs konnten anschließend contigs sowie fingerprinted contigs identifiziert werden, welche in dem Bereich der Resistenz liegen. Weiterhin wurde nach möglichen Kandidatengenen auf diesen contigs gesucht (Abb. 5). Wie bereits oben beschrieben, konnte das Resistenzgen zwischen den Markern SCRI\_RS\_1xxx2 und Bxxx4 lokalisiert werden. Es zeigt sich auch hier, dass keine contigs im Bereich des Resistenzgens bekannt sind wodurch die Hypothese einer hohen Rekombinationswahrscheinlichkeit in dem Bereich gestützt wird.

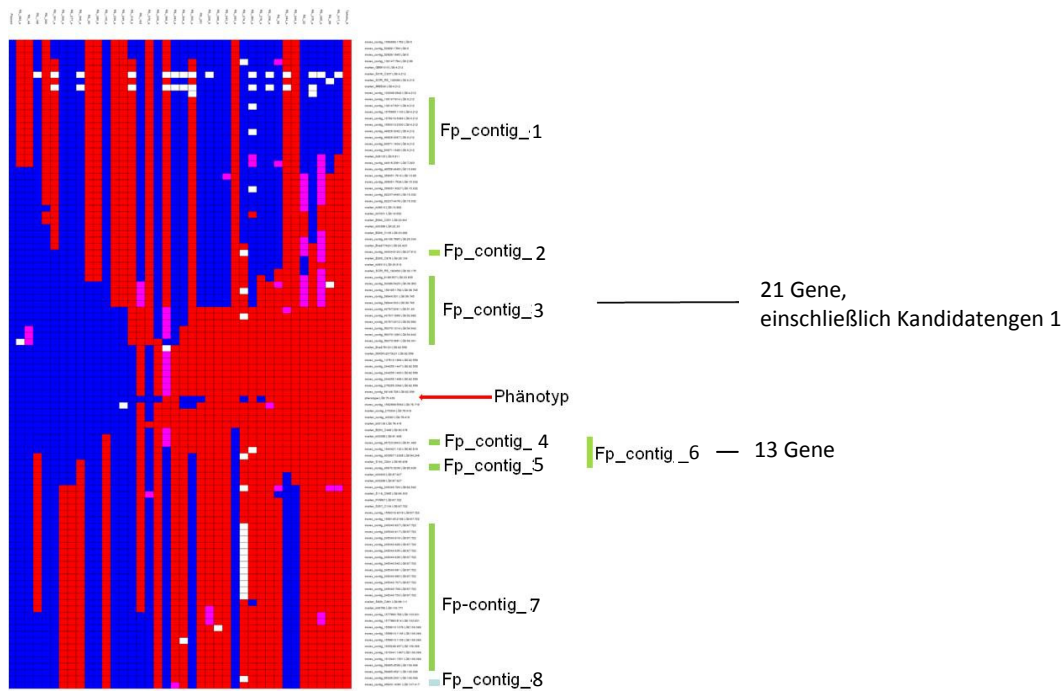


Abb. 5: Graphische Darstellung der RILs nach Verankerung der Daten in der POPSEQ-Karte mit identifizierten Fp-contigs und möglichen Kandidatengen

Dabei wurde in dem interessanten Bereich ein Gen identifiziert, welches im Rahmen des ViReCrop-Projektes bei Partnern in Spanien als Kandidatengen gegen das *Watermelon mosaic virus* identifiziert worden war. Auf Grund dessen wurde dieses Gen amplifiziert und allelspezifisch sequenziert. Dabei konnten SNPs identifiziert werden, welche zur Kartierung des Gens in der RIL-Population verwendet werden konnten. Die Abbildung 6 zeigt die Karte des Intervalls mit dem Kandidatengen.

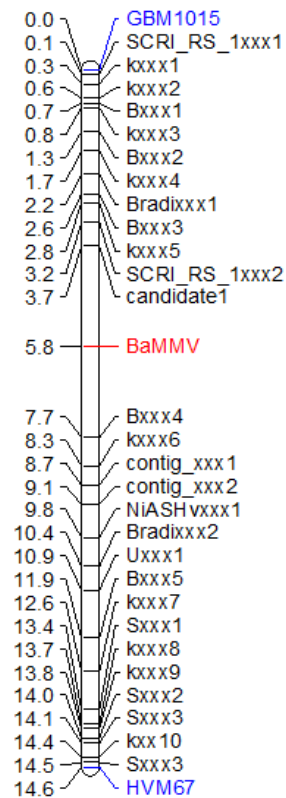


Abb. 6.: Karte des Chromosoms 4HL im Intervall GBM1015 - HVM67 basierend auf 4084 F<sub>2</sub>-Pflanzen mit einer Auflösung von 0,011 cM

Das Kandidatengen cosegregiert nicht mit dem Resistenzgen. Der Abstand der am engsten gekoppelten Marker beträgt 3,94 cM. Somit war es im Rahmen des Projektes möglich, das Zielintervall von 5,8 cM auf 3,94 cM einzugrenzen, aber es konnten aufgrund der erhöhten Rekombinationsrate im Zielbereich (Abb. 3, Abb. 6) keine cosegregierenden Marker entwickelt werden. Auf Grundlage der hochauflösenden Kartierungspopulation sollte jedoch nach vollständiger Sequenzierung des Chromosoms 4HL eine Isolierung des Resistenzgens und somit die Aufklärung des Resistenzmechanismus von *rym13* möglich sein.

Als materielle Voraussetzung für die weitere Markerabsättigung von *rym7*, welches auf Chromosom 1H in der Centromerregion lokalisiert ist (Graner et al. 1999), sowie für die Entwicklung co-dominanter Marker, wurden Kreuzungen der Linie DH 93-04/34 (Linie aus der Kreuzung 'HOR3365' x 'Igrí') bzw. der Genbankherkunft 'HOR3365' mit der Sorte 'Igrí' durchgeführt. Aus vier F<sub>1</sub>-Pflanzen wurde eine DH-Population mit 240 Linien erstellt (Saaten-Union Resistenzlabor) und diese im JKI vermehrt bzw. aus neun F<sub>1</sub>-Pflanzen die F<sub>2</sub>-

Generationen mit insgesamt 6109 Körnern erstellt. Die DH-Population und die F<sub>2</sub>-Generation wurden für die Genotypisierung an das IPK übergeben. Im Ergebnis der GBS-Analysen wurden 53 DH-Linien für die Phänotypisierung ausgewählt und deren Resistenzreaktion gegenüber dem Isolat BaMMV-ASL (Original) in der Klimakammer mit mechanischer Virusinokulation von 10 Pflanzen/Linie ermittelt. 5 Wochen nach der Inokulation wurde mittels DAS-ELISA die Virusextinktion der Einzelpflanzen bestimmt. 20 Linien erwiesen sich als resistent und 33 Linien reagierten anfällig, was einer 1:1-Spaltung für eine monogen bedingte Vererbung entspricht ( $\lambda^2=3,19$ ). Die Untersuchungsergebnisse bildeten die Grundlage für eine weitere Markerabsättigung am IPK Gatersleben.

#### Arbeitspunkt 2.6 Bymovirus Metagenomics

In den Jahren 2011 bis 2013 wurde Blattmaterial von virusanfälligen Sorten und Sorten mit dem *rym4*-Resistenzgen an zwei Standorten (Sunstedt und Lenglern, Niedersachsen) mit drei Wiederholungen im Frühjahr geerntet und für die geplanten Sequenzierungsarbeiten eingefroren (Tabelle 1). Auf Grund großer Auswinterungsschäden konnte im Frühjahr 2012 nur von einem Standort Pflanzenmaterial geerntet und eingefroren werden.

Tabelle 1: Übersicht zum gesammelten und eingefrorenen Blattmaterial

<b>Jahr</b>	<b>Ort</b>	<b>Sorte</b>	<b>Blattmenge (g)</b>
2011	Lenglern	Christa (anfällig)	668
		Uschi (anfällig)	148
		Carola ( <i>rym4</i> )	308
	Sunstedt	Souleyka ( <i>rym4</i> )	2994
2012	Lenglern	Leibniz ( <i>rym4</i> )	1284
2013	Lenglern	Uschi (anfällig)	459
	Sunstedt	Uschi (anfällig)	1191
		Carola ( <i>rym4</i> )	1315

Zur Etablierung der Methode für die Sequenzierung wurden 130g Blattmaterial des Isolates BaMMV-ASL (Original), vermehrt auf der Wintergerstensorte ‚Maris Otter‘, geerntet. Dieses Isolat wird für die Resistenztests in der Klimakammer verwendet.

Die nachfolgend beschriebenen Arbeiten wurden in Kooperation mit dem Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik des JKI (Prof. Thomas Kühne und Dr. Frank Rabenstein) durchgeführt.

Das Virus wurde über einen CsCl-Gradienten gereinigt (Abb. 7) und die Viruspartikel elektronenmikroskopisch identifiziert (Abb. 8).

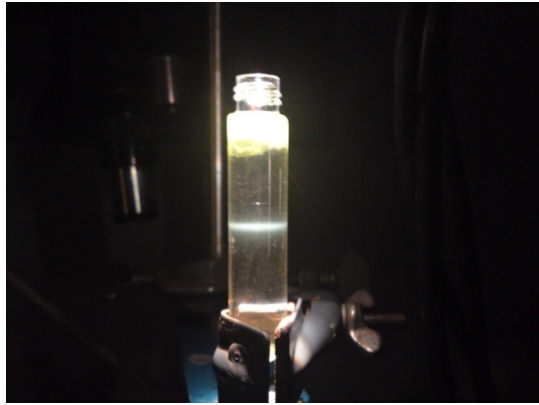


Abb. 7: Gereinigtes BaMMV-Präparat

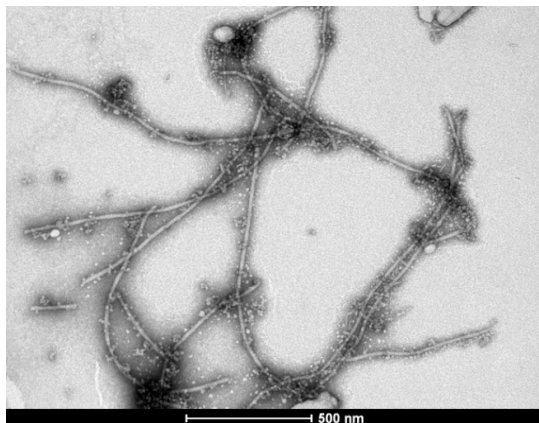


Abb. 8: Nachweis der Partikel des BaMMV durch Dekoration mit dem homologen Antiserum

Aus dem gereinigten Viruspräparat wurde die Virus-RNA isoliert und die cDNA synthetisiert (Abb. 9).

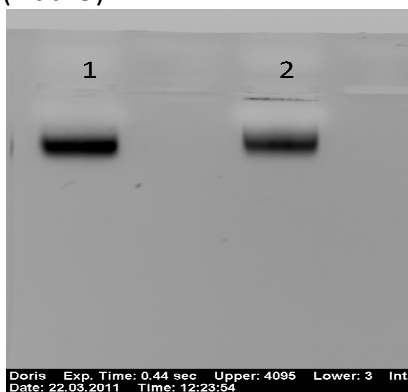


Abb. 9: cDNA-Präparation mit oligo-dt Primer aus RNA-Präparationen vom 18. (1) und 22.03.2011 (2)

Die cDNA wurde dem IPK für die Sequenzierung übergeben

## 2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Siehe gesonderte Darstellung.

## 3. Notwendigkeit und Angemessenheit der Leistungen

Die beschriebenen Arbeiten waren nötig, um die Projektziele zu erreichen. Wie bereits beschrieben konnten alle bisherigen in der Züchtung eingesetzten Virusresistenzgene bereits von verschiedenen Virusstämmen überwunden werden. Dadurch ist es nötig weitere Resistenzgene zu isolieren, um detaillierte Erkenntnisse über die Struktur und Funktion dieser Resistenzgene zu gewinnen und diese über funktionale Marker für die Züchtung nutzbar zu machen. Durch die Isolierung verschiedener rezessiver Virusresistenzgene standen mögliche Kandidatengeninformationen für die Resistenz gegen das Gelbmosaikvirus zur Verfügung.

Mit der Erstellung einer hochauflösenden Kartierungspopulation und der Entwicklung neuer enger gekoppelter Marker wurde die Grundlage für die Isolierung des Resistenzgens *rym13* geschaffen. Die Isolierung des Gens kann durch Nutzung neuer genetischer Informationen (Sequenzierung des Gerstenchromosoms 4H) und aktueller Sequenziertechniken (Whole Genome Shotgun WGS, Genotyping By Sequencing GBS) beschleunigt werden. Durch Kartierung bereits bekannter rezessiver Virusresistenzgene konnte gezeigt werden, dass der *rym13*-Resistenz wahrscheinlich ein unbekannter Resistenzmechanismus zu Grunde liegt. Dies unterstreicht wiederum die Notwendigkeit der Isolierung des Gens *rym13*.

## 4. Des vorraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschrittenene Verwertungsplans

Durch die Nutzung bereits veröffentlichter hochdichter Markerkarten war es in dem Projekt möglich, eine dichte Markerabsättigung in dem Zielintervall zu erreichen. Die ebenfalls zur Verfügung stehenden Daten des ‚Genome Zipper‘ zeigten in dem Zielbereich eine gute Kolinearität, was dazu führte, dass Informationen aus dieser Datenquelle sehr gut genutzt werden konnten, um neue Marker zu entwickeln. Bessere Möglichkeiten der schnellen Markerentwicklung ergaben sich ebenfalls aus der Nutzung neuester Techniken (GBS), was

dazu führte, dass das Resistenzgen zwischen Fp-contigs kartiert werden konnte und somit nun auch die Sequenzinformationen nutzbar waren, um Kandidatengene zu identifizieren. Die entwickelten Marker können besser zur Selektion resistenter Genotypen genutzt werden als bisher vorhandene, da diese enger mit dem Resistenzlocus gekoppelt sind. Des Weiteren können die erarbeiteten Informationen verwendet werden, um das Resistenzgen zu isolieren. Als Grundlage der Genisolierung dienen hochdichte Markerkarten und eine genaue Eingrenzung des Zielintervalls, wie bereits von Yang et al. (2014) beschrieben. Durch die Lokalisation des Resistenzgens in einem Intervall von 3,94 cM konnte diese Voraussetzung erfüllt werden. Die entwickelten Marker können nun in der physischen Karte der Gerste verankert und gezielt nach überlappenden Fp-contigs gesucht werden. Diese contigs stellen im weiteren Verlauf der Genisolierung die Grundlage für die Suche nach weiteren Kandidatengenen und deren Isolation dar.

#### 5. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Mayer KFX, Martis M, Hedley PE, Simkova H, Liu H, Morris JA, Steuernagel B, Taudien S, Roessner S, Gundlach H, Kubalakova M, Suchankova P, Murat F, Felder M, Nussbaumer T, Graner A, Salse J, Endo T, Sakai H, Tanaka T, Itoh T, Sato K, Platzer M, Matsumoto T, Scholz U, Dolezel J, Waugh R, Stein N (2011) Unlocking the Barley Genome by Chromosomal and Comparative Genomics. *Plant Cell* 23:1249-1263

Virtuelle Genanordnung in verschiedenen Cerealien

Schepetilnikov M, Kobayashi K, Geldreich A, Caranta C, Robaglia C, Keller M, Ryabova LA (2011) Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation. *EMBO J* 30:1343-1356

Identifikation eines weiteren Kandidatengens für Virusresistenz

Lüpken T, Stein N, Perovic D, Habekuß A, Krämer I, Hähnel U, Steuernagel B, Scholz U, Zhou R, Ariyadasa R, Taudien S, Platzer M, Martis M, Mayer K, Friedt W, Ordon F (2013)



Genomics-based high-resolution mapping of the BaMMV/BaYMV resistance gene *rym11* in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*:1-12

Anwendung der hochauflösenden Kartierung zur Kandidatengen-Identifikation für das Gen *rym11*

Mascher M, Muehlbauer GJ, Rokhsar DS, Chapman J, Schmutz J, Barry K, Munoz-Amatriain M, Close TJ, Wise RP, Schulman AH, Himmelbach A, Mayer KFX, Scholz U, Poland JA, Stein N, Waugh R (2013) Anchoring and ordering NGS contig assemblies by population sequencing (POPSEQ). *Plant Journal* 76:718-727

Verankerung und Sortierung von contigs durch gezielte Populationssequenzierung als Grundlage der Verankerung von GBS-Daten

Yang P, Lüpken T, Habekuss A, Hensel G, Steuernagel B, Kilian B, Ariyadasa R, Himmelbach A, Kumlehn J, Scholz U, Ordon F, Stein N (2014) PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE LIKE 5-1 is a susceptibility factor to plant viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

Isolation des Kandidatengens für *rym11* basierend auf vorangegangener Feinkartierung des Resistenzgens

## 6. Der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6

### Bisherige Veröffentlichungen:

Yang P, Perovic D, Habekuss A, Zhou RN, Graner A, Ordon F, Stein N (2013) Gene-based high-density mapping of the gene *rym7* conferring resistance to Barley mild mosaic virus (BaMMV). *Molecular Breeding* 32:27-37

Vortragsveröffentlichung:

Lehmann, S.; Habekuss, A.; Perovic, D.; Stein, N.; Friedt, W.; Ordon, F., 2012: High resolution mapping of the BaYMV/BaMMV resistance gene *rym13*. Berichte aus dem Julius Kühn-Institut 167, 19

Posterpublications:

Lehmann, S.; Perovic, D.; Habekuss, A.; Stein, N.; Friedt, W.; Ordon, F. (2013) Fine mapping of the BaYMV/BaMMV resistance gene *rym13* Seite(n):97. PLANT 2030 Status Seminar, Potsdam

Lehmann, S.; Habekuss, A.; Perovic, D.; Stein, N.; Friedt, W.; Ordon, F. (2012) High resolution mapping of the BaYMV/BaMMV resistance gene *rym13* Seite(n):40. Plant Stress and Genomics: 10. Biennial Conference of the Plant Genome Research Working Group, Halle/Saale

Lehmann, S.; Perovic, D.; Habekuss, A.; Stein, N.; Friedt, W.; Ordon, F. (2012) Towards map based cloning of *rym13*, a resistance gene for BaYMV/BaMMV in winter barley. Seite(n):81. 8th Plant Science Student Conference, Gatersleben

Lehmann, S.; Perovic, D.; Habekuss, A.; Stein, N.; Friedt, W.; Ordon, F. (2012) High-resolution mapping of *rym13*, a resistance gene for BaYMV/BaMMV in winter barley. Seite(n):P 37. Breeding crops for sustainable agricultural production, Giessen

Geplant:

Dissertation zum Vorhaben

Es sind jeweils Veröffentlichungen zu *rym13* („Marker saturation of the BaMMV resistance gene *rym13* using genomic resources“) sowie der durch „Taihoku A“ vermittelten BaYMV-Resistenz („First evidence of two distinct loci conferring BaMMV and BaYMV resistance in Taihoku A“) geplant.

## Zitierte Literatur:

- Adams MJ, Swaby AG, Jones P (1988) CONFIRMATION OF THE TRANSMISSION OF BARLEY YELLOW MOSAIC-VIRUS (BaYMV) BY THE FUNGUS POLYMYXA-GRAMINIS. *Ann Appl Biol* 112:133-141
- Bundessortenamt (2013) Beschreibende Sortenliste Getreide, Mais Öl- und Faserpflanzen Leguminosen Rüben Zwischenfrüchte, ISSN 2190-6130
- Burghardt B, Schaack S, von Schenck W (2014) AMI Markt Bilanz Getreide Ölsaaten Futtermittel
- Graner A, Streng S, Kellermann A, Proeseler G, Schiemann A, Peterka H, Ordon F (1999) Molecular mapping of genes conferring resistance to soil-borne viruses in barley - an approach to promote understanding of host-pathogen interactions. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 106:405-410
- Habekuss A, Humbroich K, Jacobi A, Cselenyi L, Leroy N, Friedt W, Ordon F (2008) Genotypes resistant to new strains of Barley mild mosaic virus (BaMMV-Teik, BaMMV-Sil). Proceedings of the Seventh Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, Julius Kuhn-Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany, 1-4 September 2008
- Humbroich K, Jaiser H, Schiemann A, Devaux P, Jacobi A, Cselenyi L, Habekuss A, Friedt W, Ordon F (2010) Mapping of resistance against Barley mild mosaic virus-Teik (BaMMV) - an rym5 resistance breaking strain of BaMMV - in the Taiwanese barley (*Hordeum vulgare*) cultivar 'Taihoku A'. *Plant Breeding* 129:346-348
- IBSC TIBGSC (2012) A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491:711-716
- Kai H, Takata K, Tsukazaki M, Furusho M, Baba T (2012) Molecular mapping of Rym17, a dominant and rym18 a recessive barley yellow mosaic virus (BaYMV) resistance genes derived from *Hordeum vulgare* L. *Theoretical and Applied Genetics* 124:577-583
- Kühne T, Shi NG, Proeseler G, Adams MJ, Kanyuka K (2003) The ability of a bymovirus to overcome the rym4-mediated resistance in barley correlates with a codon change in the VPg coding region on RNA1. *J Gen Virol* 84:2853-2859
- Le Gall O, Aranda MA, Caranta C (2011) Plant resistance to viruses mediated by translation initiation factors. In: Caranta C, Aranda MA, Tepfer M, Lopez-Moya JJ (eds) *Recent advances in plant virology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp 177-194
- Lüpken T, Stein N, Perovic D, Habekuß A, Krämer I, Hähnel U, Steuernagel B, Scholz U, Zhou R, Ariyadasa R, Taudien S, Platzer M, Martis M, Mayer K, Friedt W, Ordon F (2013) Genomics-based high-resolution mapping of the BaMMV/BaYMV resistance gene rym11 in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*:1-12

- Mascher M, Muehlbauer GJ, Rokhsar DS, Chapman J, Schmutz J, Barry K, Munoz-Amatriain M, Close TJ, Wise RP, Schulman AH, Himmelbach A, Mayer KFX, Scholz U, Poland JA, Stein N, Waugh R (2013a) Anchoring and ordering NGS contig assemblies by population sequencing (POPSEQ). *Plant Journal* 76:718-727
- Mascher M, Richmond TA, Gerhardt DJ, Himmelbach A, Clissold L, Sampath D, Ayling S, Steuernagel B, Pfeifer M, D'Ascenzo M, Akhunov ED, Hedley PE, Gonzales AM, Morrell PL, Kilian B, Blattner FR, Scholz U, Mayer KFX, Flavell AJ, Muehlbauer GJ, Waugh R, Jeddelloh JA, Stein N (2013b) Barley whole exome capture: a tool for genomic research in the genus *Hordeum* and beyond. *Plant Journal* 76:494-505
- Mayer KFX, Martis M, Hedley PE, Simkova H, Liu H, Morris JA, Steuernagel B, Taudien S, Roessner S, Gundlach H, Kubalaková M, Suchanková P, Murat F, Felder M, Nussbaumer T, Graner A, Salse J, Endo T, Sakai H, Tanaka T, Itoh T, Sato K, Platzer M, Matsumoto T, Scholz U, Dolezel J, Waugh R, Stein N (2011) Unlocking the Barley Genome by Chromosomal and Comparative Genomics. *Plant Cell* 23:1249-1263
- Mayer KFX, Taudien S, Martis M, Simkova H, Suchanková P, Gundlach H, Wicker T, Petzold A, Felder M, Steuernagel B, Scholz U, Graner A, Platzer M, Dolezel J, Stein N (2009) Gene Content and Virtual Gene Order of Barley Chromosome 1H. *Plant Physiology* 151:496-505
- Ordon F, Habekuss A, Kastirr U, Rabenstein F, Kuehne T (2009) Virus Resistance in Cereals: Sources of Resistance, Genetics and Breeding. *Journal of Phytopathology* 157:535-545
- Pellio B, Streng S, Bauer E, Stein N, Perovic D, Schiemann A, Friedt W, Ordon F, Graner A (2005) High-resolution mapping of the Rym4/Rym5 locus conferring resistance to the barley yellow mosaic virus complex (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) in barley (*Hordeum vulgare* ssp *vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 110:283-293
- Plumb RT, Lennon EA, Gutteridge RA (1986) THE EFFECTS OF INFECTION BY BARLEY YELLOW MOSAIC-VIRUS ON THE YIELD AND COMPONENTS OF YIELD OF BARLEY. *Plant Pathology* 35:314-318
- Poland JA, Brown PJ, Sorrells ME, Jannink JL (2012) Development of High-Density Genetic Maps for Barley and Wheat Using a Novel Two-Enzyme Genotyping-by-Sequencing Approach. *Plos One* 7
- Sato K, Nankaku N, Takeda K (2009) A high-density transcript linkage map of barley derived from a single population. *Heredity* 103:110-117
- Schepetilnikov M, Kobayashi K, Geldreich A, Caranta C, Robaglia C, Keller M, Ryabova LA (2011) Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation. *EMBO J* 30:1343-1356

- Stein N, Perovic D, Kumlehn J, Pellio B, Stracke S, Streng S, Ordon F, Graner A (2005) The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in *Hordeum vulgare* (L.). *Plant Journal* 42:912-922
- Thiel T, Graner A, Waugh R, Grosse I, Close TJ, Stein N (2009) Evidence and evolutionary analysis of ancient whole-genome duplication in barley predating the divergence from rice. *Bmc Evolutionary Biology* 9
- Thiel T, Michalek W, Varshney RK, Graner A (2003) Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 106:411-422
- Varshney RK, Marcel TC, Ramsay L, Russell J, Roeder MS, Stein N, Waugh R, Langridge P, Niks RE, Graner A (2007) A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theoretical and Applied Genetics* 114:1091-1103
- Yang P, Lüpken T, Habekuss A, Hensel G, Steuernagel B, Kilian B, Ariyadasa R, Himmelbach A, Kumlehn J, Scholz U, Ordon F, Stein N (2014) PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE LIKE 5-1 is a susceptibility factor to plant viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*