

Thomas Lüpken
Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz

Hochauflösende Kartierung
der Virusresistenzgene
rym11 und *Ryd3*
der Gerste (*Hordeum vulgare* L.)



Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut

Kontakt/Contact:
Thomas Lüpken
Mägdebrink 7
37574 Einbeck

Die Schriftenreihe „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ veröffentlicht Doktorarbeiten, die in enger Zusammenarbeit mit Universitäten an Instituten des Julius Kühn-Instituts entstanden sind

The publication series „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ publishes doctoral dissertations originating from research doctorates completed at the Julius Kühn-Institut (JKI) either in close collaboration with universities or as an outstanding independent work in the JKI research fields.

Der Vertrieb dieser Monographien erfolgt über den Buchhandel (Nachweis im Verzeichnis lieferbarer Bücher - VLB) und OPEN ACCESS im Internetangebot www.jki.bund.de Bereich Veröffentlichungen.

The monographs are distributed through the book trade (listed in German Books in Print - VLB) and OPEN ACCESS through the JKI website www.jki.bund.de (see Publications)

Wir unterstützen den offenen Zugang zu wissenschaftlichem Wissen.
Die Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut erscheinen daher OPEN ACCESS.
Alle Ausgaben stehen kostenfrei im Internet zur Verfügung:
<http://www.jki.bund.de> Bereich Veröffentlichungen

We advocate open access to scientific knowledge. Dissertations from the Julius Kühn-Institut are therefore published open access. All issues are available free of charge under <http://www.jki.bund.de> (see Publications).

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation
In der Deutschen Nationalbibliografie: detaillierte bibliografische
Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek (German National Library)

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.dnb.de>.

ISBN 978-3-95547-018-0
DOI 10.5073/dissjki.2015.003

Herausgeber / Editor

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, Deutschland
Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany

© Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen sowie der genannten Universität, 2015.
Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersendung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf fotomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten.

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I
Justus-Liebig-Universität Giessen
Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung
Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt

**Hochauflösende Kartierung der Virusresistenzgene *rym11* und *Ryd3*
der Gerste (*Hordeum vulgare* L.)**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Agrarwissenschaften
- Dr. agr. -

Im Fachbereich
Agrarwissenschaften, Ökotropologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
Thomas Lüpken
aus Thuine (Niedersachsen)

Gießen 2014

Mitglieder der Prüfungskommission:
Vorsitzende: Prof. Dr. Gesine Lühken
Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt
Gutachter: Prof. Dr. Frank Ordon
Prüfer: Prof. Dr. Matthias Frisch
Prüfer: Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel
Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2014

Diese kumulative Dissertation basiert auf folgenden Artikeln in wissenschaftlichen Fachzeitschriften:

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 126: 1201-1212

Lüpken T, Stein N, Perovic D, Habekuß A, Serfling A, Krämer I, Hähnel U, Steuernagel B, Scholz U, Ariyadasa R, Martis M M, Mayer KFX, Niks RE, Collins NC, Friedt W, Ordon F (2014) High-resolution mapping of the barley *Ryd3* locus controlling tolerance to BYDV. Molecular Breeding 33: 477-488

 Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG.....	6
1.1.	Die Kulturgerste (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	6
1.1.1.	Entstehung der Kulturgerste	6
1.1.2.	Anbau und wirtschaftliche Bedeutung.....	8
1.2.	Viruskrankheiten des Getreides.....	9
1.2.1.	Bedeutung wichtiger Virosen und Methoden zum Virusnachweis.....	9
1.2.2.	Gerstengelbverzwergung	13
1.2.3.	Gelbmosaikvirose der Gerste	16
1.3.	Nutzung molekularer Marker in der Gerste	20
1.3.1.	Molekulare Marker für Resistenz gegen die Gelbverzwergung der Gerste	21
1.3.2.	Molekulare Marker für Resistenz gegen die Gelbmosaikvirose der Gerste	21
1.3.3.	Genisolierung	22
1.3.4.	Kartengestützte Genisolierung.....	23
1.3.5.	Ressourcen für die kartengestützte Genisolierung.....	24
1.3.5.1	Genetische Karten der Gerste	25
1.3.5.2	Syntänie-basierte Markerabsättigung	25
1.3.5.3	Die physische Karte der Gerste	27
1.3.6.	Isolierte Resistenzgene der <i>Triticeae</i>	28
1.3.6.1	Isolierte Virusresistenzgene der Gerste.....	29
1.4	Ziele der Arbeit	30
1.5	Literatur zur Einleitung	31
2.	VERÖFFENTLICHUNGEN	54
2.1.	Genomics based high resolution mapping of the BaMMV/BaYMV resistance gene <i>rym11</i> in barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	54
	Abstract.....	55
	Introduction	55
	Material and methods.....	56
	Results	59
	Discussion.....	62
	Acknowledgements.....	64
	References	64

2.2.	High resolution mapping of the barley <i>Ryd3</i> locus controlling tolerance to BYDV	67
	Abstract	68
	Introduction	69
	Material and Methods	70
	Results	72
	Discussion	75
	Acknowledgements	77
	References	77
3.	DISKUSSION	80
3.1.	Kartierungspopulationen	81
3.1.1.	Aufbau einer hochauflösenden Kartierungspopulation	82
3.2.	Resistenztestung	85
3.3.	Feinkartierung der Resistenzgene	87
3.3.1.	Nutzung genomischer Marker	87
3.3.2.	Nutzung genbasierter Marker und syntäniebasierte Markerabsättigung	87
3.4.	Möglichkeiten einer Isolierung von <i>Ryd3</i>	90
3.5.	Allgemeiner Ausblick	93
4.	ZUSAMMENFASSUNG	96
5.	ABSTRACT	98
5.1.	Literatur zur Diskussion	100
6.	TABELLENVERZEICHNIS	110
7.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	110

1. Einleitung

1.1. Die Kulturgerste (*Hordeum vulgare* L.)

1.1.1. Entstehung der Kulturgerste

Die Gattung *Hordeum* gehört zu der Familie der *Poaceae* und bildet mit 30 weiteren Gattungen die Unterfamilie der *Triticeae*, von der sich vor rund 31 Millionen Jahren die Gattung *Avena* trennte. Von den beiden ebenfalls agronomisch genutzten Gattungen *Triticum* und *Secale* spaltete sich die Gattung *Hordeum* vor ca. 11,6 Millionen Jahren ab (Chalupska et al. 2008). Derzeit werden dieser weltweit verbreiteten Gattung insgesamt 33 Arten zugerechnet (Blattner 2009).

Hordeum vulgare L. ($2n=2x=14$) ist eine einjährige, selbstbefruchtende Art und besteht aus den beiden Unterarten *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* und der Kulturgerste (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgaris*) (Bothmer et al. 1992). Letztere ist durch Domestikation der zweizeiligen Wildgerste (Salamini et al. 2002) möglicherweise vor rund 10.500 Jahren im Gebiet des 'Fruchtbaren Halbmond' entstanden (Zohary und Hopf 2001; vgl. Abbildung 1), wobei auch das westliche Mittelmeer und das Horn von Afrika als weitere mögliche Zentren der Entstehung der Kulturgerste gelten (Molina-Cano et al. 2005, Orabi et al. 2007).



Abbildung 1: Der Fruchtbare Halbmond (grün, aus Feuillet et al. 2008).

Aus der zweizeiligen Gerste entwickelte sich durch einen spontanen Funktionsverlust des Genes *Vrs1* sechszeilige Gerste (Komatsuda et al. 2007), welche vor rund 9.000 bis 8.000 Jahren die am

häufigsten angebaute Form der Kulturgerste im Nahen Osten wurde (Zohary und Hopf 2001). Die Kulturgerste ist damit eine der ältesten Kulturpflanzen und gilt als eine der Ursprungsarten der Landwirtschaft in der Alten Welt (Badr et al. 2000).

Zum primären Genpool der Kulturgerste gehören sowohl die im Laufe der Domestikation entstandenen Landrassen und moderne Hochleistungssorten als auch die Wildgerste (vgl. Abbildung 2). Innerhalb dieses primären Genpools gibt es keinerlei Kreuzungsbarrieren, und ein uneingeschränkter Gentransfer ist somit möglich (Bothmer et al. 1992). Damit kann in der Züchtung neuer Gerstensorten auf mögliche agronomisch vorteilhafte Allele sowohl alter Landgersten als auch der Wildgerste zurückgegriffen werden, die im Laufe der Domestikation bzw. der weiteren Züchtung verloren gegangen sind (Ellis et al. 2000, Newton et al. 2011).

Der sekundäre Genpool beinhaltet mit *Hordeum bulbosum* L. nur eine einzige Art (Bothmer et al. 1992), von der sowohl diploide als auch tetraploide Formen existieren. Kreuzungen der Kulturgerste mit beiden Formen (Lundqvist 1962) von *H. bulbosum* sind möglich, aber aufgrund präzygotischer Kreuzungsbarrieren wie inkompatibler Narben-Pollen-Interaktion (Linder und Midgley 1996) und postzygotischer Kreuzungsbarrieren sehr schwierig und mit einem erheblichen Aufwand (Kuckuck 1934, Pickering 1991) sowie mit erheblichen Leistungseinschränkungen verbunden (Koch et al. 2009). Dennoch konnten agronomisch interessante Resistenzgene aus *H. bulbosum* L. in die Kulturgerste eingebracht werden, z.B. gegen den Echten Mehltau (Pickering et al. 1995), gegen die Gelbmosaikvirose (Ruge et al. 2003, Ruge-Wehling et al. 2006), gegen *Rhynchosporium commune* (Pickering et al. 2006), gegen die viröse Gelbverzweigung (Scholz et al. 2009) oder den Zwergrost der Gerste (Johnston et al. 2013).

Zum tertiären Genpool gehören alle übrigen *Hordeum* Arten, welche über die gesamte nördliche Hemisphäre sowie die gemäßigten Zonen Südafrikas und Südamerikas verbreitet sind und diploide ($2n=2x=14$), tetraploide ($2n=4x=28$), oder hexaploide ($2n=6x=42$) Chromosomensätze aufweisen können (Bothmer et al. 1995, Blattner 2009). Ein Gentransfer zwischen diesem und dem primären Genpool gestaltet sich sehr schwierig, da starke Kreuzungsbarrieren überwunden werden müssen und sich keine fertilen Hybride ergeben (Bothmer et al. 1995), so dass die Nutzung potentiell wertvoller Gene/Allele aus diesem Genpool für die Züchtung neuer Gerstensorten bisher ausgesprochen limitiert ist (Valkoun 2008) und nur über Techniken wie somatische Hybridisation oder Gen-Transfer erreichbar ist (Bara et al. 2006).

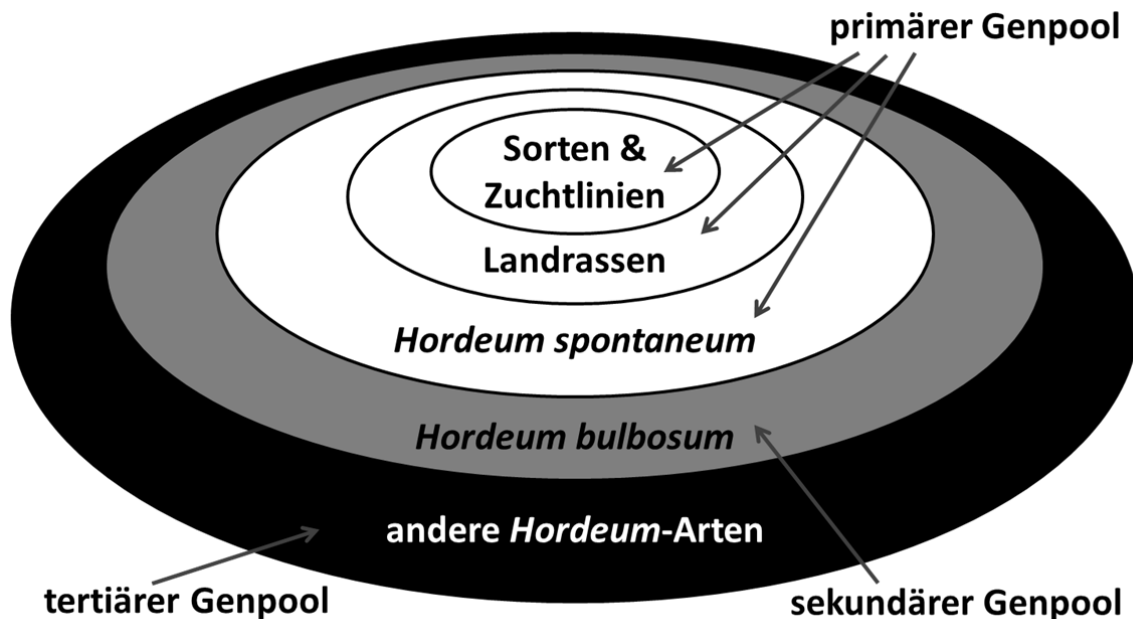


Abbildung 2: Schema zur Verwandtschaft innerhalb der Gattung *Hordeum* (modifiziert nach Bothmer et al. 1992).

1.1.2. Anbau und wirtschaftliche Bedeutung

Gerste nimmt nach Weizen, Mais und Reis sowohl hinsichtlich der Anbaufläche als auch der Erntemenge einen bedeutenden Stellenwert in der globalen Landwirtschaft ein - mit Europa als dem Hauptproduktionsgebiet (<http://faostat.fao.org>). Dabei ist die Anbaufläche in den letzten Dekaden stetig gefallen, von ca. 80 Millionen Hektar in den 1970-er Jahren (Friedt und Ordon 2013) auf knapp 50 Millionen Hektar im Jahr 2012 (<http://faostat.fao.org>). Während die sehr anpassungsfähige Gerste (Horsley et al. 2009) in Regionen mit extremeren Klimaten wie bspw. dem Himalaya, Äthiopien oder Marokko in erster Linie als Nahrungsmittel genutzt wird (Baik und Ullrich 2008), ist diese Nutzung in den westlichen Staaten unbedeutend (weniger als 2 %), und Gerste wird hier als Tierfutter (65 %) und als Ausgangsprodukt für die Erzeugung von Malz und Alkohol genutzt (30 %; Newman und Newman 2006). Dabei liegen die Erträge der als Viehfutter genutzten, zumeist mehrzeiligen Wintergerste 10-20 % über den Erträgen der als Sommerungen angebaute, zumeist zweizeiligen, Braugersten (Blake et al. 2010). So betrug in Deutschland der Ertrag der Wintergerste im Mittel der Jahre 2007-2012 63,8 dt/ha gegenüber 49,6 dt/ha bei der Sommergerste. (http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Markt-Statistik/Ernte2013_Bericht+Anlagen.pdf?__blob=publicationFile). Insgesamt wurden in den Jahren 2007-2013 im Durchschnitt auf 1,31 Mio Hektar 8,35 Mio Tonnen Wintergerste pro Jahr geerntet und 2,33 Mio Tonnen Sommergerste auf 0,47 Mio Hektar. Der Anteil der Braugerste beträgt etwa drei Viertel der

Sommergerstenfläche (http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Markt-Statistik/Ernte2013_Bericht+Anlagen.pdf?__blob=publicationFile).

Die Nährstoffzusammensetzung des Ernteprodukts ist vergleichbar mit der von Weizen, mit 73,5 % Kohlenhydraten, 12,5 % Protein und 2,3 % Fett in Gerstenkörnern gegenüber 72,5 % Kohlenhydraten, 13,7 % Protein und 1,9 % Fett in Weizen (Narwal 2012). Für Braugerste wird dabei über die Sortenwahl und Kulturführung ein eher geringer Proteingehalt von 9 – 11,5 % angestrebt, da ein zu hoher Proteingehalt in einer geringeren Extraktausbeute resultiert. Ein weiteres wichtiges Qualitätskriterium der Braugerste ist eine hohe und gleichmäßige Keimfähigkeit für das Erreichen eines optimalen Mälgergebnisses (Kumar 2012).

1.2. Viruskrankheiten des Getreides

1.2.1. Bedeutung wichtiger Virose und Methoden zum Virusnachweis

Virose gehören zu den wichtigsten Krankheiten des Getreides und ihre Erreger lassen sich je nach Übertragungsweise in die bodenbürtigen und die insektenübertragenen Viren unterteilen (Ordon et al. 2009). Die bodenbürtigen Viren werden dabei durch Nematoden (Brown et al. 1995) oder den weltweit verbreiteten Plasmodiophoriden *Polymyxa graminis* übertragen (Rao und Brakke 1969, Adams et al. 1988). Die Dauersporen dieses pilzähnlichen Vektors bietet den Viren bei unvorteilhaften Lebensbedingungen Schutz. Wie dabei die Virus-Aufnahme durch *Polymyxa graminis* erfolgt, ist noch nicht abschließend geklärt, genauso wenig wie die anschließende Übertragung der Viren auf die Pflanze, welche bei der Reproduktion von *P. graminis* innerhalb der Wurzeln von Gräsern stattfindet (Kanyunka et al. 2003). Die von *P. graminis* übertragenen Pflanzenviren gehören dabei zwei verschiedenen Genera von Viren an: Zu dem Genus *Furovirus* gehören das *Soilborne cereal mosaic virus* (SBCMV), das *Soilborne wheat mosaic virus* (SBWMV), von dem das in Ostasien vorkommende *Chinese wheat mosaic virus* (CWMV) unterschieden wird, und das *Oat golden stripe virus* (OGSV) (Kühne 2009, Ordon et al. 2009, King et al. 2012). Zu dem Genus der *Bymoviren* gehören das *Wheat yellow mosaic virus* (WYMV), das *Wheat spindle streak mosaic virus* (WSSMV), das *Oat mosaic virus* (OMV), das *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV), das *Barley mild mosaic virus* (BaMMV) und das *Rice necrosis mosaic virus* (RNMV) (Kühne 2009, Ordon et al. 2009, King et al. 2012).

Die Viren beider Genera können dabei entweder verschiedene Wirte befallen oder sind wirtsspezifisch. So kann das SBWMV neben dem Weizen auch Roggen, Triticale und Gerste befallen, das SBCMV und das WSSMV nur Weizen, Roggen und Triticale, während CWMV und WYMV nur Weizen infizieren. Wirtsspezifisch sind weiterhin BaYMV und BaMMV, die nur die Gerste befallen, OGSV und OMV, die den Hafer als einzigen Wirt besitzen (Kühne 2009), sowie RNMV, welches nur Reis befällt (Kanjunka et al. 2003).

Während OGSV und OMV aufgrund der beschränkten Haferanbauflächen von eher geringerer wirtschaftlicher Bedeutung sind (Hariri et al. 1996), sind die den Weizen befallenden *Furoviren* (SBCMV, SBWMV, CWMV) wirtschaftlich bedeutende Krankheitserreger, welche bei nicht vorhandenen Resistenzen zu erheblichen Ertragsverlusten in der Weizenproduktion führen können (Kanyuka et al. 2003). Dagegen spielen die ebenfalls den Weizen befallenden Viren WSSMV und WYMV eine weniger bedeutende ökonomische Rolle. Zu bemerken ist hierbei, dass bei den meisten Weizensorten eine Resistenz gegenüber den *Furoviren* mit einer Resistenz gegenüber diesen *Bymoviren* einhergeht (Kühne 2009).

Die Gelbmosaikvirose der Gerste, verursacht durch BaYMV und BaMMV, ist mittlerweile eine der bedeutendsten Krankheiten der Wintergerste (Ordon et al. 2009), wobei der Befall bei anfälligen Sorten einen Ertragsverlust von bis zu 50% verursachen kann (Huth 1989).

Aufgrund der bodenbürtigen Übertragung durch *P. graminis* sind chemische Bekämpfungsmaßnahmen ineffektiv bzw. aus ökologischer und ökonomischer Sicht inakzeptabel, so dass der Anbau resistenter Sorten das einzig wirksame Mittel ist, um in Befallsgebieten erhebliche Ertragsverluste zu vermeiden (Ordon et al. 2009, Kühne 2009).

Die insektenübertragenen Viren stellen ebenfalls ein erhebliches Problem in der globalen Getreideproduktion dar, wobei die beiden blattlausübertragenen Viren *Barley yellow dwarf virus* (BYDV; Genus *Luteovirus*) und *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV; Genus *Polerovirus*) zusammen mit dem durch Zikaden übertragenen *Wheat dwarf virus* (WDV; Genus *Mastrevirus*) die agronomisch wichtigsten insektenübertragenen Viren darstellen (Ordon et al. 2009).

Weitere wichtige Vektoren von Pflanzenviren sind Milben, welche das *Wheat streak mosaic virus* (WSMV), das *Brome streak mosaic virus* (BrSMV) und das *Oat necrotic mottle virus* (ONMV; alle Genus *Tritimovirus*) auf Gräser und Getreide übertragen (Ordon et al. 2009). Unter diesen drei letztgenannten Viren ist WSMV ein bedeutender Erreger, der zu erheblichen Ernteeinbußen bei anfälligen Weizensorten führen kann (French und Stenger 2003), und außer in den USA mittlerweile auch in Europa und Australien nachgewiesen wurde (Rabenstein et al. 2008, Dwyer et al. 2007). Von geringer Bedeutung ist dagegen das ONMV (Ordon et al. 2009).

Vor dem Hintergrund einer globalen Erderwärmung ist davon auszugehen, dass sich in der nördlichen Hemisphäre die Schäden insbesondere durch insektenübertragene Viren für die Landwirtschaft noch vergrößern werden. Gründe hierfür sind in einem Wechsel von einem holozyklischen in einen anholozyklischen Lebenszyklus der Blattlausvektoren (Habekuss et al. 2009, Strazynski et al. 2011) zu sehen, wie auch mit einer zeitlich verlängerten Flugaktivität (Swaminathan 2011) und einer beschleunigten Reproduktionsrate für Insekten allgemein (Yamamura und Kiritani 1998).

Der Einsatz von gebeiztem Saatgut und die Applikation von Insektiziden in kritischen Perioden der Kulturführung kann zwar den Befall mit saugenden und beißenden Insekten reduzieren (Kennedy und

Connery 2011), aber der Anbau von toleranten oder resistenten Sorten ist aus Umweltaspekten einer chemischen Bekämpfung vorzuziehen. Daher kommt auch hier der Züchtung toleranter bzw. resistenter Sorten eine bedeutende Rolle zu.

Die Unterscheidung toleranter bzw. resistenter Genotypen von anfälligen allein anhand einer Symptomausprägung ist problematisch, da andere Stressoren (Nährstoffmangel, unvorteilhafte Wetterbedingungen, nicht virale Pathogene, Insekten- / Nematoden-Befall) ähnliche Symptome wie bestimmte Viren hervorrufen können. Desweiteren erlaubt eine Erfassung der phänotypischen Reaktion keine Differenzierung von einzelnen Stämmen eines Virus (D'Arcy 1995, Naidu und Hughes 2003). Aus diesem Grund sind serologische und molekulare Techniken notwendig, um Pflanzenviren zu untersuchen und zu charakterisieren (Fabre et al. 2002).

Bei Übertragungsversuchen werden Viren experimentell mittels Vektoren oder durch direkte Übertragung des Pflanzensaftes bzw. Gewebes von befallenen Pflanzen auf anfällige Indikatorpflanzen übertragen (Jones 1993). Charakteristische Symptome erlauben den Nachweis und die Identifikation einer Vielzahl von Viren (Horvath 1993). Ein Schwachpunkt dieser Nachweismethode ist neben dem hohen Arbeitsaufwand das Auftreten der beschriebenen Schwierigkeiten wie sie im Feld bei der visuellen Bestimmung von Viren anhand der Symptomausprägung auftreten (Naidu und Hughes 2003).

Eine visuelle Bestimmung des Virus selbst ist mittels Elektronenmikroskopie anhand der Partikelmorphologie möglich (Milne 1993). Nachteil dieser Methodik ist der Umstand, dass sich isometrisch geformte Viren schlechter bestimmen lassen als stabförmige Viren und eine geringe Viruskonzentration im Pflanzensaft die Bestimmung von Viren zusätzlich erschwert. Bei der *immunosorbent electron microscopy* (Roberts und Harrison 1979) findet vor der Mikroskopie eine Immobilisierung der im Pflanzensaft vorhandenen Viruspartikel an einer mit virusspezifischen Antikörpern beschichteten Oberfläche statt, wodurch die Virusart bestimmbar ist und somit eine höhere Sensitivität gegenüber der normalen Elektronenmikroskopie erreicht wird.

Jedoch gehen mit der visuellen Bestimmung mittels Elektronenmikroskopie neben einem hohen Anschaffungspreis für das Elektronenmikroskop selber ein hoher Arbeitsaufwand einher (Naidu und Hughes 2003), so dass diese Untersuchungsmethode für Großversuche bzw. Routinetestungen nicht geeignet ist.

Weniger kostenintensiv ist der Einsatz von serologischen Verfahren, die auf den antigenen Eigenschaften der Virusproteine beruhen. Je nachdem wo die Antigen-Antikörper-Reaktion stattfindet, unterscheidet man hier zwischen Agglutinations- und Geldiffusionstests, in denen das Antigen-Antikörper-Produkt als Verklumpung bzw. Ausfällung sichtbar wird und Tests in Mikrotiterplatten oder auf Nitrocellulosemembranen, bei denen die Antigen-Antikörper-Reaktion mittels enzymmarkierter Antikörper sichtbar gemacht wird. Sowohl die Agglutinations- als auch die

Geldiffusionstests eignen sich für den Nachweis von Viren, die sich einfach und praktikabel durchführen lassen, wobei sie jedoch nicht die Sensitivität anderer serologischer Verfahren erreichen (Naidu und Hughes 2003). Diese Testmethodik wird aber mittlerweile nicht mehr angewandt und wurde durch den *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ersetzt (H. Ziebell, pers. Mitteil.). Bei diesem Verfahren findet indirekt mittels eines Antikörpers oder direkt eine Sorption von Viruspartikeln an einer festen Oberfläche (gewöhnlich Mikrotiter-Platten) statt, und diese Methodik wurde zum ersten Mal in Form eines Double Antibody Sandwich-ELISA von Clark und Adams (1977) für den Nachweis von Pflanzenviren eingesetzt. Es gibt diverse Varianten dieser Nachweismethodik, die sich u.a. hinsichtlich der Detektionsart des Antigen-Antikörper-Produktes unterscheiden. Aufgrund seiner einfachen Durchführung, vielseitigen Anwendbarkeit, Sensitivität und Wirtschaftlichkeit wird ELISA vielfach für die Virustestung im Hochdurchsatz genutzt (Fabre et al. 2002, Naidu und Hughes 2003) und für Routinetestungen eingesetzt (vgl. Riedel et al. 2011, Lüpken et al. 2013).

Der *Dot Immunoblotting Assay* (DIBA) und der *Tissue Immunoblotting Assay* (TIBA) sind ähnliche Techniken wie der ELISA, nur dass hier der Sorptionsprozess auf Nitrocellulosemembranen stattfindet anstatt auf Mikrotiterplatten. Auch diese Techniken zeichnen sich durch ihre Sensitivität, Wirtschaftlichkeit und Schnelligkeit für einen hohen Probendurchsatz aus, wobei hier vor allem auch die Möglichkeit einer Probenahme direkt im Feld für die anschließende weitere Analyse in einem Zentrallabor zu erwähnen ist (Naidu und Hughes 2003, Gallitelli 2004).

Obwohl die letztgenannten serologischen Methoden des Virusnachweises hinsichtlich ihrer Wirtschaftlichkeit, Praxistauglichkeit, Spezifität und Sensitivität eine deutliche Verbesserung gegenüber den eingangs genannten Nachweisverfahren darstellen, liegen sie bezüglich der Detektion von Viroiden, oder der Differenzierung von sehr eng verwandten Virusstämmen hinter den Möglichkeiten von Virus-Nachweisverfahren, die auf Unterschieden in der viralen Nukleinsäure beruhen, zurück (Gallitelli 2004). Denn während bei serologischen Nachweisverfahren nur die immunologischen Eigenschaften der Virushülle ausgenutzt werden, steht für die Nukleinsäure-basierten Techniken das gesamte Virusgenom zur Verfügung, um einen diagnostischen Test für das jeweilige Virus zu entwickeln (Naidu und Hughes 2003, Gallitelli 2004). Dabei nutzen die Nukleinsäure-basierten Hybridisierungs-Assays die Affinität einer DNA-Sequenz zu ihrer Komplementär-Sequenz, welche eine sehr spezifische Interaktion darstellt (Naidu und Hughes 2003), und Anfang der 1980er Jahre wurden auf dieser Basis die ersten Assays zur Detektion von Pflanzenviren entwickelt (Owens und Diener 1981).

Mit der Entwicklung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durch Mullis et al. (1986) wurde ein neuer Meilenstein hinsichtlich der Sensitivität von Nukleinsäure-basierten Techniken des Virusnachweises erreicht. So lässt sich in Proben mit einer nur geringen Ausgangskonzentration an Viren mittels einer

PCR der Anteil der Nukleinsäure des jeweiligen Virus auf einen Wert oberhalb des Detektionslimits erhöhen, wodurch ein anschließender Nachweis des Virus erbracht werden kann (Gallitelli 2004). Während beim ELISA ein Nachweis von wenigstens 1-10 ng Viruspartikel pro Probe erbracht werden kann und dies die Möglichkeit von falsch-negativen Befunden beinhaltet (Canning et al. 1996), ist der Detektions-Schwellenwert bei PCR-basierten Techniken deutlich niedriger, und mittels einer sogenannten Real-time-PCR lässt sich eine 10.000fach erhöhte Sensitivität im Vergleich zum ELISA realisieren (Fabre et al. 2002), wobei die Real-time-PCR neben dieser hohen Sensitivität auch eine Quantifizierung der Viruspartikel in einer Probe zulässt (Eun et al. 2000).

Da verschiedene Virusarten oder Virusstämme mittels spezifischer Primer simultan innerhalb einer PCR-Reaktion (sog. *Multiplexing*) amplifiziert werden können, ist es sogar möglich, bei Mischinfektionen verschiedene Viren gleichzeitig zu identifizieren (Bertolini et al. 2001, Deb und Anderson 2008). Eine noch größere Anzahl an simultanen Virustestungen ist durch den Einsatz von Microarrays gegeben, mit denen sich alle Viren nachweisen lassen, deren Sequenz bekannt ist (Gallitelli 2004), wobei diese Microarrays hinsichtlich ihrer Sensitivität jedoch mit dem ELISA vergleichbar sind, und damit nicht an die Sensitivität der PCR-basierten Methoden heranreichen (Boonham et al. 2007).

1.2.2. Gerstengelbverzwergung

Die wahrscheinlich erste Beschreibung von Symptomen der durch das *Barley Yellow Dwarf Virus* (BYD) verursachten virösen Gelbverzwergung erfolgte bereits Ende des vorletzten Jahrhunderts durch Galloway und Southword (1890), die von einer bisher unbekanntem Krankheit des Hafers berichteten, welche die Haferproduktion der gesamten östlichen und mittleren US-Staaten stark in Mitleidenschaft zog. Da die Existenz von viralen Krankheitserregern (Iwanowskij 1892) noch nicht bekannt war, vermuteten diese beiden Autoren als Ursache eine bakterielle Infektion. Erst Oswald und Houston (1951) konnten nach einer Infektion von Gerstenbeständen im nördlichen Teil des Kalifornischen Längstals beweisen, dass es sich bei der Gelbverzwergung um eine Virose handelt, deren Wirtsspektrum die gesamten Süßgräser einschließt (D´Arcy 1995) und damit neben der Gerste auch die drei weltweit wichtigsten landwirtschaftlichen Kulturarten (Weizen, Reis, Mais) befallen kann. Kurz nach der Veröffentlichung von Oswald und Houston (1951) konnte auch außerhalb von Kalifornien das Virus in Australien und Europa nachgewiesen werden (Smith 1955, Rademacher und Schwarz 1958). Mittlerweile ist die viröse Gelbverzwergung weltweit eine der wirtschaftlich bedeutendsten Getreidekrankheiten (Lister und Ranieri 1995) und auch in Deutschland ist die Krankheit in manchen Regionen Ostdeutschlands so weit verbreitet, dass der prozentuale Anteil infizierter Pflanzen in für die Ausbreitung der Krankheit günstigen Jahren stellenweise annähernd 100 % betragen kann (Habekuss et al. 2002). Die Symptomausprägung ist dabei abhängig von dem

Entwicklungsstadium, in dem die Infektion mit dem Erreger erfolgt (Jensen und D'Arcy 1995) und ist bei anfälligen Gerstpflanzen durch eine mehr oder minder stark ausgeprägte Stauchung des Sprosses und des Wurzelapparates, einhergehend mit einer auffälligen Vergilbung der Blätter gekennzeichnet. Weiterhin kommt es zu einer Reduktion der Ertragsparameter und zu einer verringerten Fitness gegenüber biotischen und abiotischen Stressoren (D'Arcy 1995, Huth 1995), welche bei nichttoleranten Sorten zu starken Ertragsverlusten von mehr als 70 % führen können (Suneson und Ramage 1957).

Der entscheidende Faktor für das Ausmaß einer BYDV-Epidemie ist dabei der Zeitpunkt des ersten Einflugs von Blattläusen und die Aktivität der Vektoren im Bestand, welche wiederum in einem direkten Zusammenhang mit den Witterungsbedingungen stehen (Thackray et al. 2005), so dass sich auf dieser Datenbasis nutzbare Simulationsmodelle für den Verlauf einer BYDV-Infektion ableiten lassen (Thackray et al. 2009). Aufgrund dieser engen Korrelation des Auftretens der Gelbverzwergung mit den klimatischen Gegebenheiten ist in Zukunft von einer stärkeren Gefährdung der globalen Getreideproduktion durch BYDV auszugehen, da infolge der prognostizierten Klimaerwärmung eine früher beginnende und später endende Flugaktivität zu erwarten ist (Swaminathan 2011), sowie mit einem Anstieg ihrer Reproduktionsrate (Yamamura und Kiritani 1998) und einem Wechsel des holo- in einen anholozyklischen Lebenszyklus von Blattläusen der Nordhalbkugel (Strazynski et al. 2011, Habekuss et al. 2009) zu rechnen ist. Als Vektoren für das BYDV gelten dabei wenigstens 25 Blattlausarten (Halbert und Voegtlin 1995), wobei die einzelnen Stämme von BYDV nicht von allen Arten gleichermaßen effizient übertragen werden können (Watson und Mulligan 1960). Eine erste Einteilung des BYDV in verschiedene Isolate erfolgte daher anhand der unterschiedlichen Vektor-Eignung der einzelnen Blattlausarten (Rochow 1969). Heute unterscheidet man in der Wissenschaft neun verschiedene Isolate, die dem Genus *Luteovirus* (BYDV-PAV, BYDV-MAV, BYDV-PAS), dem Genus *Polerovirus* (*Cereal yellow dwarf virus*; CYDV-RPV, CYDV-RPS) zugeordnet werden, bzw. die innerhalb der Familie der *Luteoviridae* noch keinem Genus zugeordnet wurden (BYDV-GAV, BYDV - GPV, BYDV-RMV, BYDV-SGV; Domier 2008, King et al. 2012). Dabei haben für Mittel- und Nordeuropa die beiden Serotypen BYDV-PAV und BYDV-MAV die größte Bedeutung, da ihre Vektoren *Rhopalosiphum padi* und *Sitobion avenae* die hier am häufigsten vorkommenden Blattlausarten sind (Plumb und Johnstone 1995).

Mittels des Einsatzes von Insektiziden lässt sich die viröse Gelbverzwergung indirekt bekämpfen, ebenso vermindert eine frühe Aussaat von Sommerungen eine Infektion mit BYDV in einem sensitiven Entwicklungsstadium (Kennedy und Connery 2005), wohingegen für Winterungen eine späte Aussaat das Risiko eines Vektoreinfluges minimiert (McKirdy und Jones 1997). Darüber hinaus ergibt sich mit dem Anbau von toleranten bzw. resistenten Sorten eine Möglichkeit, einer BYDV-Infektion zu begegnen, und ein erstes Screening von Gerstengenotypen auf Resistenz geschah kurz

nach der Veröffentlichung von Oswald und Houston (1951). Bereits wenige Jahre später wurde eine erste Resistenz beschrieben (*ryd1*, Suneson 1955), deren Wirkung aber eher gering war und die daher kaum Eingang in die Züchtung neuer Sorten fand. Nach einem weiteren groß angelegten Screening konnte in äthiopischen Akzessionen mit *Ryd2* ein weiteres Resistenzgen in der centromerischen Region von Chromosom 3H lokalisiert werden (Schaller et al. 1963, 1964, Collins et al. 1996), dessen Wirksamkeit jedoch von den vorherrschenden Umweltbedingungen beeinflusst wird, sowie von dem vorliegenden BYDV-Isolat und dem genetischen Hintergrund des Pflanzenmaterials (Larkin et al. 1991, Schaller 1984, Šip et al. 2004).

Es wird vermutet, dass *Ryd2* multiallelisch ist (Catherall et al. 1970, Chalhoub et al. 1995) und obwohl es nur gegen einige Isolate von CYDV-RPV wirksam ist (Banks et al. 1992), vermittelt es eine hinreichende Toleranz gegenüber den beiden wichtigen Isolaten BYDV-PAV und BYDV-MAV (Domier 2008) und hat aus diesem Grund Verwendung in der Züchtung gefunden (Burnett et al. 1995). Aus den Bemühungen um die Züchtung auf BYDV-Toleranz sind im Lauf der Zeit verschiedene Sorten wie bspw. 'Sutter' (Schaller et al. 1973), 'Coracle' (Catherall und Wilkins 1977), 'Vixen' (Parry und Habgood 1986), 'Venus' (Brown et al. 1988), 'Franklin' (Vertigan 1991) oder 'Paroli' (Habekuss 2012) hervorgegangen.

Als ein weiteres Hauptgen wurde *Ryd3* durch Zufall im Rahmen eines Zwergrost-Feldversuchs in der äthiopischen Landsorte 'L94' entdeckt (Niks et al. 2004). Dieses Gen kartiert in enger Kopplung mit dem gegen *Puccinia hordei* wirksamen QTL *Rphq3* (Marcel et al. 2007a, 2007b) in der Nähe des Centromers von Chromosom 6H und erklärt 75 % der phänotypischen Varianz der Toleranz gegenüber BYDV-PAV und BYDV-MAV (Niks et al. 2004). Auch dieses Gen wird mittlerweile allein oder in Kombination mit *Ryd2* in der Züchtung von BYDV-tolerantem Elitematerial genutzt (Sayed et al. 2006).

Neben diesen Hauptgenen konnten im primären Genpool der Gerste weitere gegen BYDV wirksame QTL identifiziert werden (Toojinda et al. 2000, Scheurer et al. 2001, Friedt et al. 2001). Von diesen wurden zwei QTL in der Kartierungspopulation 'Post' x 'Vixen' identifiziert. Ein QTL, dessen positives Allel aus dem *Ryd2*-Donor 'Vixen' stammt, kartiert dabei in der Nähe von *Ryd2* und erklärt mehr als 30 % der phänotypischen Varianz des relativen Kornertrages pro Pflanze. Der andere QTL erklärt nahezu 20 % der phänotypischen Varianz und kartiert auf Chromosom 2HL. Das positive Allel stammt von dem Elter 'Post' (Scheurer et al. 2001), einer Sorte, die als tolerant beschrieben ist (Grafton et al. 1982), deren Toleranzmechanismus jedoch nicht bekannt ist (Friedt et al. 2001). Auch in einer weiteren Kartierungspopulation ('Post' x 'Nixe') konnte der QTL mit dem größten Effekt (27,6 %) an der phänotypischen Varianz auf Chromosom 2HL in dem gleichen Markerintervall kartiert werden und weist somit diese Region als bedeutend für die BYDV-Toleranz der Sorte 'Post' aus (Scheurer et al. 2001). Ebenfalls auf Chromosom 2H konnte in der Kartierungspopulation 'MOB3561' x 'Asorbia'

ein weiterer QTL für den relativen Kornertrag lokalisiert werden, der zusammen mit einem anderen QTL in der Region von *Ryd2* annähernd 80 % der phänotypischen Varianz erklärt, womit auch der centromerischen Region von Chromosom 3H nicht nur in Hinblick auf *Ryd2* eine besondere Bedeutung hinsichtlich einer Toleranz gegenüber BYDV zukommt (Friedt et al. 2001).

Mit *Ryd4^{Hb}*, einem Resistenzgen aus der tetraploiden Wildgerste *Hordeum bulbosum* L., konnte mittlerweile eine Resistenz gegen BYDV aus dem sekundären Genpool in *H. vulgare* L. übertragen werden. Der zugrundeliegende Mechanismus dieser Resistenz könnte dabei ein verändertes Saugverhalten von Blattläusen an Genotypen mit vorhandener *Ryd4^{Hb}*-Resistenz sein (Schliephake et al. 2013). Nach Hallmann et al. (2007) versteht man unter Resistenz die Nichtbeeinflussung einer Pflanze durch abiotische und biotische Stressoren, während eine Toleranz durch eine weitgehende Kompensation der durch den Stressoren ausgelösten Schäden definiert ist. Im Falle von Virose zeigen damit tolerante Genotypen eine nur geringe Symptomausprägung, können aber als Wirtspflanzen zu einer Verbreitung des Virus beitragen. Diese Immunität gegenüber BYDV hat aber aufgrund einer Kopplung mit einem Sublethalfaktor bisher noch keinen Eingang in die Züchtung von Elitematerial gefunden (Scholz et al. 2009).

1.2.3. Gelbmosaikvirose der Gerste

Die Gerstengelbmosaikvirose, verursacht durch BaYMV und BaMMV, wurde erstmals 1940 in Japan beschrieben (Ikata und Kawai 1940). Sie hat sich seitdem dort weit verbreitet (Kashiwazaki et al. 1989) und konnte auch in Südkorea (Lee 1981) und China (Yili und Dengdi 1983) nachgewiesen werden. Zuvor wurde sie schon in Mittel- und Nordeuropa (Huth und Lesemann 1978, Hill und Evans 1980, Lapierre 1980) nachgewiesen, später auch in Osteuropa (Fantakhun et al. 1987, Szunics et al. 1989, Bakardijeva et al. 2004, Jeżewska und Trzmiel 2009) und Südeuropa (Rubies-Autonell et al. 1995, Katis et al. 1997, Achon et al. 2003, 2005).

Anders als das BYDV sind sowohl das BaYMV als auch das BaMMV auf *H. vulgare* als natürliche Wirtspflanze beschränkt, wobei BaMMV mittels mechanischer Inokulation auch auf Roggen (Ordon et al. 1992) und Hartweizen (Proeseler 1993) übertragen werden kann. Die natürliche Übertragung geschieht durch den Plasmodiophoriden *Polymyxa graminis* (Adams et al. 1988, Kanyunka et al. 2003). Dieser obligat biotrophe Wurzelparasit tritt nicht nur als Vektor auf, sondern bietet den Viren auch außerhalb der eigentlichen Wirtspflanzen über Jahrzehnte Schutz in seinen Dauersporen, so dass stark befallene Felder mindestens bis 20 Jahre, je nach Bodentyp sogar bis zu 50 Jahre verseucht bleiben können (Huth, 2000). Damit bringt ein Fruchtfolgewechsel keinen Bekämpfungserfolg mit sich, während eine Begasung von Freiflächen mit Chemikalien wie Brommethan praktisch weder möglich noch ökologisch vertretbar ist (Kanyunka et al. 2003). Eine erfolgte Virusinfektion äußert sich durch mosaikartige, chlorotische Streifen auf den jüngsten Blättern, mit denen eine Vergilbung und

schließliches Absterben der Blätter einhergehen kann (Hill und Evans 1980, Friedt 1983). Bei Temperaturen über 20°C ist der Neuzuwachs frei von Symptomen. Auch der Pflanzenwuchs ist nach einer Virusinfektion reduziert, die stärkste Reduktion ist bei Temperaturen zwischen 12 und 14°C zu beobachten. Weiterhin bilden befallene Pflanzen weniger Ähren aus, die Korngröße kann stärker variieren und insgesamt ist der Kornertrag deutlich reduziert (Huth 1984). Im Feld zeigt sich im Winter oder zeitigen Frühjahr ein Befall mit der Gerstengelbmosaikvirose je nach Verseuchungsgrad und Verteilung als ein nesterweises Auftreten von Vergilbungen bis hin zu einer völligen Vergilbung des gesamten Bestandes. Besonders betroffen sind dabei Stellen mit Bodenstrukturproblemen und dem Auftreten von Staunässe (Huth 1984).

Wurde zunächst BaYMV als Erreger der Gerstengelbmosaikvirose verantwortlich gemacht (Ikata und Kawai 1940), ergaben spätere Untersuchungen bezüglich der biologischen und serologischen Eigenschaften als auch der Übertragungsraten auf verschiedenen Gerstenherkünften, dass es sich bei einem 'BaYMV-Isolat' tatsächlich um einen separaten, weiteren Vertreter der Bymoviren handelt, welcher fortan als BaMMV bezeichnet wurde (Huth und Adams 1990). In Japan wurden für BaYMV sieben und für BaMMV zwei Isolate unterschieden (Nomura et al. 1996). Darüber hinaus konnten in China diverse Isolate des BaYMV (vgl. Chen et al. 1999) und in Korea ein neues BaMMV-Isolat identifiziert werden (Lee et al. 1996). In Europa dagegen sind zwei Isolate des BaYMV und drei Isolate des BaMMV bekannt (BaMMV, BaMMV-Sil und BaMMV-Teik), wobei BaMMV-Sil erst im Jahre 2003 in Frankreich identifiziert wurde (Huth und Adams, 1990; Hariri et al. 2003). Inzwischen ist dieser Stamm von BaMMV auch auf Ackerflächen in Deutschland festgestellt worden (Huth et al. 2005). Mit BaMMV-Teik konnte danach ein weiteres Isolat identifiziert werden (Habekuss et al. 2008).

Die einzelnen Virusstämme können in verschiedener Weise mit den vorliegenden Resistenzgenen interagieren. Bisher wurden 18 Resistenzgene identifiziert, die auf den sieben Chromosomen verteilt sind (Tabelle 1) und die, außer *Rym14^{Hb}* (Ruge et al. 2003) und *Rym16^{Hb}* (Ruge-Wehling et al. 2006), dem primären Genpool der Gerste entstammen.

Tabelle 1: Kartierte Resistenzgene gegen die Gelbmosaikvirose (modifiziert nach Werner et al. 2003a)

Resistenzgen	Chromosom	Donor	Resistenz gegenüber europäischen Erregern der Gelbmosaikvirose	für Phänotypisierung genutztes Virus	Referenz
<i>rym1</i>	4HL	Mokusekko 3	<i>BaMMV*</i> , <i>BaYMV</i> , <i>BaYMV-2</i>	<i>BaYMV**</i>	Takahashi et al. (1973), Götz und Friedt (1993), Ordon et al. (1993), Konishi et al. (1997), Okada et al. (2004)
<i>Rym2</i>	7HL	Mihori Hadaka 3	<i>BaMMV*</i> , <i>BaYMV</i> , <i>BaYMV-2</i>	<i>BaYMV**</i>	Takahashi et al. (1973), Götz und Friedt (1993), Ordon et al. (1993)
<i>rym3</i>	5HS	Ea 52, Ishuku Shirazu	<i>BaYMV</i> , <i>BaYMV-2</i>	<i>BaYMV**</i>	Götz und Friedt (1993), Ordon et al. (1993), Saeki et al. (1999)
<i>rym4</i>	3HL	Ragusa, Franka	<i>BaMMV*</i> , <i>BaYMV</i>	<i>BaMMV</i> , <i>BaYMV</i>	Götz und Friedt (1993), Graner und Bauer (1993), Ordon et al. (1993, 1995), Pellio et al. (2005), Stein et al. (2005), Kanyuka et al. (2005), Stracke et al. (2007), Tyrka et al. (2008), Séclatek et al. (2010), Hofinger et al. (2011), Perovic et al. (2014)
<i>rym5</i>	3HL	Mokusekko 3, Resistant Ym No.1, W122/37.1	<i>BaMMV*</i> , <i>BaYMV</i> , <i>BaYMV-2</i>	<i>BaYMV**</i>	Götz und Friedt (1993), Ordon et al. (1993), Graner et al. (1995, 1999a), Konishi et al. (1997), Pellio et al. (2005), Stein et al. (2005), Kanyuka et al. (2005), Stracke et al. (2007), Tyrka et al. (2008), Séclatek et al. (2010), Hofinger et al. (2011), Perovic et al. (2014)
<i>rym6</i>	3HL	Prior, Amagi Nijo	<i>anfällig</i>	<i>BaYMV**</i>	Iida & Konishi (1994), Iida et al. (1999), Konishi et al. (2002)
<i>rym7</i>	1HS	HHor 3365	<i>BaMMV*</i>	<i>BaMMV</i>	Graner et al. (1999b), Yang et al. (2013)
<i>rym8</i>	4HL	10247	<i>BaMMV*</i> , <i>BaYMV</i>	<i>BaMMV</i>	Götz und Friedt (1993), Ordon et al. (1993), Bauer et al. (1997), Graner et al. (1999b)
<i>rym9</i>	4HL	Bulgarian 347	<i>BaMMV*</i>	<i>BaMMV</i>	Götz und Friedt (1993), Ordon et al. (1993), Bauer et al. (1997), Werner et al. (2000, 2005)
<i>rym10</i>	3HL	Hiberna	<i>BaYMV</i> , <i>BaYMV-2</i>	<i>BaYMV</i> , <i>BaYMV-2</i>	Graner et al. (1995, 1999a)
<i>rym11</i>	4HL	Russia 57	<i>BaMMV*</i> , <i>BaYMV</i> , <i>BaYMV-2</i>	<i>BaMMV</i>	Götz und Friedt (1993), Ordon et al. (1993), Bauer et al. (1997), Nissan-Azzouz et al. (2005), Lüpken et al. (2013), Yang et al. (2014)
<i>rym12</i>	4HL	Muju covered 2	<i>BaMMV*</i> , <i>BaYMV</i> , <i>BaYMV-2</i>	<i>BaMMV</i>	Götz und Friedt (1993), Ordon et al. (1993), Graner et al. (1996)
<i>rym13</i>	4HL	Taihoku A	<i>BaMMV*</i> , <i>BaYMV</i> , <i>BaYMV-2</i>	<i>BaMMV</i>	Götz und Friedt (1993), Ordon et al. (1993), Werner et al. (2003b), Humbroich et al. (2010)
<i>Rym14Hb</i>	6HS	Hordeum bulbosum	<i>BaMMV*</i> , <i>BaYMV</i> , <i>BaYMV-2</i>	<i>BaMMV</i> , <i>BaYMV</i> , <i>BaYMV-2</i>	Ruge et al. (2003)
<i>rym15</i>	6HS	Chikurin Ibaraki 1	<i>BaMMV*</i> , <i>BAYMV</i> , <i>BaYMV-2</i>	<i>BaMMV</i>	Le Gouis et al. (2004)
	5HS	Chikurin Ibaraki 1	<i>BaMMV*</i> , <i>BAYMV</i> , <i>BaYMV-2</i>	<i>BaYMV</i> , <i>BaYMV-2</i>	Werner et al. (2003a)
<i>Rym16Hb</i>	2HL	Hordeum bulbosum	<i>BaMMV*</i> , <i>BaYMV</i> , <i>BaYMV-2</i>	<i>BaMMV</i> , <i>BaYMV</i> , <i>BaYMV-2</i>	Ruge et al. (2004)
<i>Rym17</i>	3H	PK23-2	?	<i>BaYMV**</i>	Kai et al. (2012)
<i>rym18</i>	4H	PK23-2	?	<i>BaYMV**</i>	Kai et al. (2012)

* auch wirksam gegen BaMMV-Sil und BaMV-Teik (Habekuss et al. 2008)

** japanischer Stamm

Aktuelle japanische Hochleistungssorten vereinen die beiden rezessiven Resistenzgene *rym3*, aus der 'Chikurin Ibaraki 1'-Mutante 'Ea52' (Kawada 1991), und *rym5*, das aus der chinesischen Landgerste 'Mokusekko 3' stammt (Konishi et al. 1997); damit sind sie gegenüber allen bisher in Japan identifizierten BaYMV-Stämmen resistent (Kai et al. 2012).

Die Resistenzzüchtung in Europa basierte die erste Zeit ausschließlich auf dem rezessiven Gen *rym4*, welches vermutlich aus der dalmatinischen Landgerste 'Ragusa' in die Wintergerste eingekreuzt wurde (Huth 1985) und eine Resistenz gegenüber BaMMV und BaYMV verleiht. Ende der 1980iger

Jahre trat mit BaYMV-2 ein neuer Virusstamm auf, welcher die *rym4* vermittelte Resistenz überwandt (Huth 1989b), so dass vermehrt das Resistenzgen *rym5* eingekreuzt wurde, welches gegen BaMMV, BaYMV und BaYMV-2 wirksam ist. Dieses Gen ist wie *rym4* ein Allel des eukaryotischen Translations-Initiationsfaktors 4E der Gerste (*Hv-eIF4E*), der auf Chromosom 3HL lokalisiert ist (Stein et al. 2005). Anfang der 2000er Jahre wurde aber auch *rym5* sowohl durch den erstmals in Frankreich neu aufgetretenen Stamm BaMMV-Sil (Hariri et al. 2003) als auch den wenig später in Deutschland auftretenden Stamm BaMMV-Teik überwunden, während *rym4* wiederum gegen diese Stämme wirksam ist (Habekuss et al. 2008).

Die weiterhin bestehende Resistenz des *rym5*-Donors 'Mokusekko 3' gegenüber diesen neu identifizierten BaMMV-Stämmen lässt sich durch das Zusammenwirken mit *rym1* erklären, welches auf Chromosom 4HL lokalisiert wurde (Konishi et al. 1997). Die gleichermaßen noch wirksame Resistenz des Donors 'Mihori Hadaka 3' ist nicht aufgeklärt, es wird aber ein Zusammenwirken von *rym1* und dem auf Chromosom 7H lokalisierten Resistenzgen *Rym2* (Takahashi et al. 1973) mit *rym4* angenommen (Götz und Friedt 1993).

Weitere gegenüber BaMMV-Sil und BaMMV-Teik wirksame Resistenzdonoren des primären Genpools (vgl. Habekuss et al. 2008) sind 'HHOR 3365' mit dem auf Chromosom 1HS lokalisierten Gen *rym7* (Graner et al. 1999b), 'Bulgarian 347' mit dem Resistenzgen *rym9* auf Chromosom 4HL (Werner et al. 2000), 'Russia 57' mit *rym11* (Bauer et al. 1997), 'Muju covered 2' mit *rym12* (Graner et al. 1996), 'Taihoku A' mit *rym13* (Werner et al. 2003b) und 'Chikurin Ibaraki' mit dem auf 6HS lokalisierten *rym15* (Le Gouis et al. 2004). Ebenfalls gegen BaMMV-Sil und BaMMV-Teik wirksame Resistenzgene sind das aus *H. bulbosum* stammende Resistenzgen *Rym14^{Hb}* (Ruge et al. 2003), das auf Chromosom 6HS lokalisiert ist, und das gleichfalls aus *H. bulbosum* eingekreuzte Gen *Rym16^{Hb}*, welches auf Chromosom 2HL lokalisiert ist (Ruge-Wehling 2006).

Während die beiden letztgenannten, aus *H. bulbosum* stammenden Resistenzgene aufgrund eines noch vorhandenen, beträchtlichen *linkage drag* sich nur schwer in der praktischen Resistenzzüchtung nutzen lassen, sind für die europäische Gerstenzüchtung vor allem die Donoren der Resistenzgene *Rym2*, *rym11*, *rym12* und *rym13* von großem Interesse, da sie nicht nur gegen alle bisher in Europa bekannten BaMMV-Stämme eine Resistenz besitzen, sondern zusätzlich auch gegenüber den in Europa bekannten Stämmen von BaYMV (Ordon et al. 1993, Bauer et al. 1997, Werner et al. 2003b, Habekuss et al. 2008).

Dagegen ist *rym6* gegenüber allen europäischen Stämmen der Gelbmosaikvirose unwirksam (Konishi et al. 2002), *rym8* ist nicht gegen BaYMV-2 wirksam (Bauer et al. 1997) und *rym10* nicht gegenüber BaMMV (McGrann und Adams 2004). Für die beiden Resistenzgene *Rym17* und *rym18* liegen bisher keine Erkenntnisse zur Resistenz gegenüber europäischen Stämmen des BaMMV und BaYMV vor (Kai et al. 2012).

1.3. Nutzung molekularer Marker in der Gerste

Molekulare Marker sind identifizierbare DNA-Polymorphismen, die eng mit einem bestimmten Gen gekoppelt oder innerhalb des Genes selbst lokalisiert sind und damit eine genotypische Charakterisierung eines Organismus erlauben (Brumlop und Finckh, 2011). Durch eine solche genotypische Charakterisierung können mittels markergestützter Selektion (*marker assisted selection*, MAS) bereits zu einem sehr frühen Stadium der Pflanzenentwicklung, ggf. auch vor der Aussaat, gewünschte Genotypen identifiziert werden (Gao et al. 2008). Dies ist besonders für Merkmale interessant, die sonst nur an der erwachsenen Pflanze phänotypisch erfasst werden können oder aufgrund einer geringen Heritabilität phänotypisch schwer erfassbar sind (Collard und Mackill 2008, Brumlop und Finckh 2011). Allerdings gibt es derzeit noch wenige diagnostische bzw. funktionelle Marker (Miedaner und Korzun 2012, Andersen und Lübberstedt 2003), und viele der in der Züchtung eingesetzten Marker basieren auf Polymorphismen, die sich nicht in unmittelbarer Nähe des Zielgens befinden, so dass Rekombinationsereignisse zu falschen Selektionsergebnissen führen können (Ordon et al. 2009). Weiterhin ist es mithilfe co-dominanter Marker möglich, innerhalb einer Generation auch ohne phänotypische Testung der Nachkommenschaft rezessiv vererbte Merkmale zielgerichtet weiterzuverfolgen, was die MAS besonders in Rückkreuzungsprogrammen zu einem wertvollen Instrument macht (Herzog und Frisch 2011, Brumlop und Finckh 2011, Palloix und Ordon 2011). Auch bei der Pyramidisierung von Resistenzgenen ist der Einsatz von Markertechnologien häufig notwendig, da eine Kombination diverser Resistenzgene in einem Genotypen allein mittels phänotypischer Selektion nur sehr schwer bzw. unmöglich zu erreichen ist (Werner et al. 2005, Riedel et al. 2011).

Im Vergleich zu diesen Möglichkeiten molekularer Marker und den Bemühungen seitens der Forschung, immer neue Marker-Merkmal-Beziehungen zu identifizieren (vgl. Blake et al. 2012), war der Einsatz der MAS in der praktischen Pflanzenzüchtung gegen Ende des letzten Jahrhunderts eher beschränkt (Collard und Mackill 2008, Xu und Crouch 2008, Smýkal et al. 2012). Dies trifft auch für die Gerste und den Weizen zu, wobei bei der Gerste aufgrund ihres weniger komplexen, diploiden Genoms der Einsatz molekularer Marker weiter fortgeschritten ist als beim Weizen (Brumlop und Finckh 2011), dessen Polyploidie und genetische Komplexität den Einsatz molekularer Techniken schwieriger gestaltet als in anderen Kulturarten (Hoisington et al. 2002). So stehen Gerstenzüchtern schon seit den 1990er Jahren mehrere Markersysteme zur Identifizierung von Resistenzgenen gegenüber diversen Pilzkrankheiten und Virose zur Verfügung (vgl. Chelkowski et al. 2003), und mittlerweile sind auch erste kommerzielle Sorten mithilfe der Nutzung von MAS entwickelt worden (Brumlop und Finckh 2011), wie etwa eine australische Sorte mit Nematodenresistenz (Eglinton et al. 2006) und eine US-Sorte mit Resistenz gegenüber Gelbrost (Hayes et al. 2003). Noch vor anderen Resistenzen steht die Anwendung von MAS bei der Resistenzzüchtung gegenüber der

Gelbmosaikvirose im Fokus der Gerstenzüchtung (Brumlop und Finckh 2011), und entsprechende molekulare Marker werden mittlerweile routinemäßig für die Identifizierung der *rym4/rym5* vermittelten Resistenz eingesetzt (Miedaner und Korzun 2012). Weiterhin hat sich der Einsatz molekularer Marker bei der Identifizierung von Resistenzgenen gegenüber dem Echten Mehltau und der *Rhynchosporium*-Blattfleckenkrankheit in der Gerstenzüchtung etablieren können (Miedaner und Korzun 2012).

1.3.1. Molekulare Marker für Resistenz gegen die Gelbverzweigung der Gerste

Die Wirkung des von Suneson (1955) identifizierten Resistenzgens *ryd1* war so schwach, dass es kaum Eingang in die Züchtung neuer Sorten fand und infolgedessen später auch keine molekularen Marker für dieses Gen entwickelt wurden. Für das von Schaller et al. (1963, 1964) identifizierte Resistenzgen *Ryd2* wurde von Holloway und Heath (1992) ein erster Proteinmarker mit dazugehörigem Immunoassay entwickelt, allerdings konnte sich dieser Marker nicht in der Züchtung etablieren. Auf der Basis dieses Proteinmarkers wurde ein einfacher zu handhabender PCR-basierter CAPS-Marker entwickelt (Ford et al. 1998).

Für *Ryd3* konnten mehrere SSR-Marker identifiziert werden, die mit dem Gen co-segregieren (Niks et al. 2004) und neben diesen beiden Hauptgenen sind auch eng gekoppelte Marker für wirksame QTLs gegen BYDV identifiziert worden (Toojinda et al. 2000, Scheurer et al. 2001, Friedt et al. 2001).

Mittels dieser zur Verfügung stehenden Markerressourcen erfolgte eine Pyramidisierung von *Ryd2*, *Ryd3* und eines QTLs aus der Sorte 'Post' in DH-Linien, welche in der Testung mit BYDV-PAV einen signifikant reduzierten Virustiter gegenüber Linien mit nur einem dieser Gene aufwiesen (Riedel et al. 2011).

Für das aus *H. bulbosum* stammende und eine vollständige Resistenz vermittelnde Resistenzgen *Ryd4^{Hb}* sind ebenfalls gekoppelte Marker bekannt. Allerdings schließt die *H. bulbosum* Introgression, welche *Ryd4^{Hb}* trägt, auch einen sublethalen, das Wachstum reduzierenden Faktor ein, so dass die *H. bulbosum*-Introgression zunächst mittels einer markergestützten rekurrenten Selektion und enger gekoppelter Marker minimiert werden muss, um sie züchterisch nutzen zu können (Scholz et al. 2009).

1.3.2. Molekulare Marker für Resistenz gegen die Gelbmosaikvirose der Gerste

Bisher wurden 18 gegen die Gelbmosaikvirose wirksame Resistenzgene aus dem primären und sekundären Genpool der Gerste kartiert (vgl. Ordon et al. 2005, Ruge-Wehling et al. 2006, Kai et al. 2012; <http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/bgn/42/CoordinatorsReport.htm>). Somit steht für die meisten Gene ein eng gekoppelter Marker für eine markergestützte Selektion hinsichtlich Gelbmosaikvirose-Resistenz zur Verfügung (vgl. Palloix und Ordon 2011). Für die Resistenzgene

rym4/rym5 wird der einfach zu handhabende SSR-Marker Bmac29 (Graner et al. 1999a) schon seit vielen Jahren von Wintergerstenzüchtern genutzt (Rae et al. 2007). Allerdings ist dieser Marker ca. 1,3 cM von *Hv-elf4E* entfernt (Graner et al. 1999a), und es wurden daher schon frühzeitig Rekombinationsereignisse zwischen diesem Marker und dem Gen identifiziert (Kühne et al. 2003). Da das Gen bereits isoliert ist und für *rym4* und *rym5* diagnostische SNPs identifiziert wurden (Stein et al. 2005), bestand die Möglichkeit, aus den Sequenzmotiven des Gens, welche für die phänotypische Variation verantwortlich sind, funktionelle Marker (Andersen und Lübberstedt 2003) für einfache Handhabung abzuleiten. Ein solcher leicht zu handhabender, funktioneller CAPS-Marker wurde von Sedláček et al. (2010) für die *rym4/rym5* vermittelte Resistenz entwickelt.

1.3.3. Isolierung von Resistenzgenen

Seit der erstmaligen Isolierung eines Gens aus einem Bakterium (Shapiro et al. 1969) sind in diversen Arten eine Vielzahl an Genen isoliert worden, und mit dem gegen den Pilz *Cochliobolus carbonum* wirksamen Maisgen *HM1* wurde erstmals ein Resistenzgen aus einer Pflanze isoliert (Johal und Briggs 1992). Für Gene, von denen weder das Produkt noch ein orthologes Gen bekannt ist, lassen sich mit dem vorwärts-gerichteten genetischen Ansatz und der reversen Genetik zwei verschiedene Vorgehensweisen der Genisolierung unterscheiden.

Bei dem Ansatz der reversen Genetik sind bereits Gene oder Sequenzinformationen aus vorangegangenen Genom- oder EST-Sequenzierungen bzw. *transkript profiling* vorhanden und bilden den Ausgangspunkt der genetischen Analyse (Peters et al. 2003). Die zugrunde liegende Funktion des Gens wird dann durch eine induzierte Mutation ausgeschaltet und mittels einer daran anschließenden Identifizierung des daraus resultierenden Phänotyps bestimmt (McKinney et al. 1995). Dafür wurden im Laufe der Jahre verschiedene Möglichkeiten der Mutationsauslösung entwickelt (vgl. Meissner et al. 1999, An et al. 2005). Mithilfe von TILLING-Populationen (*Targeting Induced Local Lesions in Genomes*) können im Hochdurchsatz die Auswirkungen von Punktmutationen in Genen mit bekannter Sequenz identifiziert werden (Greene et al. 2003). Solche Populationen sind mittlerweile für die Gerste (Caldwell et al. 2004b) und viele andere Kulturarten erstellt worden (vgl. Uauy et al. 2009).

In dem vorwärts-gerichteten genetischen Ansatz ist der Phänotyp der Ausgangspunkt der Analyse, bei der anhand einer bestimmten Mutante das zugrundeliegende Sequenzmotiv identifiziert werden soll. Dabei kann es sich um eine künstlich induzierte oder natürlich vorkommende Mutation handeln (Peters et al. 2003). Bei der künstlichen Mutagenese mittels Insertion einer T-DNA oder eines Transposons in den codierenden Bereich ist eine rasche Identifizierung des gesuchten Gens mittels Lokalisierung einer Erkennungssequenz (*'sequence tag'*) möglich (Jones et al. 1994; Whitham et al. 1994). Auch in der Gerste konnte ein Transposon-tagging-System etabliert und routinemäßig

eingesetzt werden (Cooper et al. 2004; Singh et al. 2006; 2012), welches auf den von McClintock (1950) im Mais entdeckten Aktivator (Ac) and Dissoziations (Ds) Elementen beruht. Weiterhin konnte in der Zwischenzeit auch für die Insertionsmutagenese mittels T-DNA ein effizientes Transformationsprotokoll bei der Gerste etabliert werden (Bartlett et al. 2008).

1.3.4. Kartengestützte Genisolierung

Die kartengestützte Genisolierung ist eine weitere Methode des vorwärts-gerichteten genetischen Ansatzes, und seit der ersten kartengestützten Isolierung eines Gens aus *Arabidopsis* (Giraudat et al. 1992) wird diese Methode in der Pflanzengenetik vielfach für die Isolation von Genen eingesetzt. Die Genisolierung mittels Transposon-tagging Systemen oder T-DNA erlaubt theoretisch eine schnelle Genisolierung durch Lokalisierung der Erkennungssequenz und anschließende Analyse der benachbarten Sequenzen. Diese Methode ist jedoch nicht anwendbar, wenn die künstliche Mutationsauslösung mittels Chemikalien oder Bestrahlung geschieht, da hierbei auf keine Erkennungssequenz zurückgegriffen werden kann (Peters et al. 2003). Weiterhin gab es für viele Kulturarten, wie z. B. den Weizen und die Gerste, längere Zeit weder ein funktionierendes Transposon-tagging System noch war die Transformation mittels *Agrobacterium* effizient, so dass die kartengestützte Genisolierung als 'universelle' Strategie in solchen Kulturarten die beste Option darstellte (Stein et al. 2000, Huang et al. 2003). Während bei Gerste ein Transposon-tagging System aus Mais etabliert werden konnte (Cooper et al. 2004), steht bei Weizen ein solches funktionierendes System noch immer nicht zur Verfügung (Nagarajan 2013). Verglichen mit dem Transposon-tagging System kommt der kartengestützten Genisolierung durch den Zuwachs an Sequenzdaten eine immer größere Bedeutung zu, und selbst im Mais mit seinem erfolgreichen Transposon-tagging System ist die kartengestützte Isolierung von Genen häufig schneller (Bortiri et al. 2006).

Die Vorgehensweise ist dabei wie folgt (vgl. Krattinger et al. 2009):

- 1) Kreuzung zweier Eltern mit gegensätzlicher Ausprägung des gesuchten Merkmals und Aufbau einer spaltenden Kartierungspopulation.
- 2) Phänotypische Analyse der Nachkommenschaft und Markerabsättigung des mit flankierenden Markern definierten Zielintervalls. Aus der Kombination der genotypischen und der phänotypischen Daten resultiert eine hochauflösende genetische Karte der Zielregion mit der Identifizierung von eng gekoppelten oder co-segregierenden Markern.
- 3) Verankerung der genetischen Karte mit der physischen Karte und Identifizierung eines einzelnen BAC-Klons (*Bacterial Artificial Chromosome*) oder eines Contigs (*chromosome landing* bzw. *chromosome walking*) mittels eng gekoppelter Marker und Isolierung von potentiellen Kandidatengenen.
- 4) Verifizierung der (des) Kandidatengene(s) mittels Komplementation oder Mutantanalyse.

Die kartengestützte Genisolierung nutzt also die Tatsache, dass sich mit einer Abnahme der Rekombinationsereignisse (gemessen in cM) zwischen dem gesuchten Gen und einem bestimmten Marker auch die tatsächliche physische Distanz (gemessen in bp) verringert (Peters et al. 2003), und dass es somit möglich ist, innerhalb eines BAC-Inserts von 80 - 200 kb Länge (Schulte et al. 2011) neben dem analysierten Marker auch das gesuchte Gen selbst zu identifizieren.

Die Verankerung der genetischen Karte mit der physischen Karte ist der entscheidende Schritt auf dem Weg zur kartengestützten Klonierung eines Genes, und je nach Pflanzenart kann hierbei das Verhältnis von cM zu kb beträchtlich variieren. So kann bspw. für die Modelnpflanze *Arabidopsis* mit ihrem relativ kleinen Genom 1 cM ca. 200 kb gleichgesetzt werden (Nam et al. 1989), während bei dem 5,1 Gb großen Genom der Gerste (Doležel et al. 1998) je nach genetischer Karte 1 cM ca. 4.000 kb entsprechen. Weiterhin gibt es je nach subchromosomaler Region beträchtliche Unterschiede hinsichtlich der Rekombinationsereignisse; so zeigt die centromerische Region eines Chromosomes eine beträchtlich reduzierte Rekombinationsfrequenz gegenüber anderen (distalen) Regionen (vgl. Künzel et al. 2000, IBSC 2012). Dies bedeutet, dass je nach Kulturart und Lokalisierung des Genes im Genom beträchtliche Unterschiede hinsichtlich der notwendigen Populationsgröße bestehen, um diejenige genetische Auflösung zu erzielen, mit der ein Marker identifiziert werden kann, der physisch sehr eng mit dem gesuchten Gen gekoppelt ist.

Die Verifizierung potentieller Kandidatengene ist der letzte Schritt der kartengestützten Genisolierung. Diese Aufgabe ist mit einem beträchtlichen Arbeitsaufwand verbunden und in ihrem Ausmaß stark von der Größe und der Gendichte des eingegrenzten Zielintervalls abhängig, da jedes einzelne der Kandidatengene einer sorgfältigen Analyse unterzogen werden muss, um das Zielgen zu identifizieren (Krattinger et al. 2009). Dabei können verschiedene Methoden genutzt werden: Komplementationsanalyse mittels *Agrobacterium*-vermittelte Transformation (Stein et al. 2005, Yang et al. 2014) oder durch Partikel-Bombardment (Huang et al. 2003, Hurni et al. 2013); Analyse von bereits vorliegenden Mutanten (Büschges et al. 1997, Zhou et al. 2001, Komatsuda et al. 2007); Allelie-Testung bei Vorliegen weiterer Allele des betreffenden Gens (Periyannan et al. 2013, Yang et al. 2014); Virus induzierte Genabschaltung (VIGS; Tanaka et al. 2010, Lee et al. 2012); Genstilllegung mittels RNA-Interferenz (RNAi; Chen et al. 2013); Genausschaltung mittels Mutagenese und anschließender Filteruntersuchung im Hochdurchsatz (TILLING; Fu et al. 2009, Saintenac et al. 2013, Periyannan et al. 2013, Yang et al. 2014).

1.3.5. Ressourcen für die kartengestützte Genisolierung

Da bei BAC-Klonen weniger häufig Chimären beobachtet wurden als bei YAC-Klonen, werden BAC-Bibliotheken vorrangig eingesetzt (Luo und Wing 2003). BAC-Bibliotheken sind inzwischen neben der Modelnpflanze *Arabidopsis* (Choi et al. 1995) für viele Kulturarten verfügbar, z.B. Reis (Ammiraju et al.

2006), Sojabohne (Wu et al. 2004), Mais (O'Sullivan et al. 2001), Weizen (Allouis et al. 2003) und Gerste (Yu et al. 2000, Saisho et al. 2007, Schulte et al. 2011).

Weiterhin sind ausreichende Markerressourcen notwendig, um möglichst eng mit dem gesuchten Gen gekoppelte Marker zu identifizieren. Dabei ist zu unterscheiden zwischen genomischen und genbasierten Markern. Letztere sind essentiell für die Verankerung der genetischen Karte mit der physischen Karte (Stein et al. 2007). Obwohl die genbasierten Marker vor allem bei den wirtschaftlich wichtigen Kulturarten eingesetzt werden (Varshney et al. 2009), gibt es auch schon für „kleinere“ Kulturarten wie Erbse und Ackerbohne (Zhukov et al. 2007, Ellwood et al. 2008) genetische Karten mit genbasierten Markern.

1.3.5.1 Genetische Karten der Gerste

In der Pflanzenwissenschaft wurde die Gerste als eine der genetisch diversesten Getreidearten (Baik und Ullrich 2008) aufgrund ihres vielgestaltigen Phänotyps schon lange als Modellpflanze für Kopplungsanalysen bei diploiden Selbstbefruchtern genutzt (Robertson 1929, Martini und Harlan 1942). Anfang der 1990er Jahre entstanden erste molekulargenetische Karten mit RFLP- (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) Markern (Graner et al. 1991, Kleinhofs et al. 1993), welche später mehr und mehr von weniger arbeitsaufwändigen PCR-basierten Markern abgelöst wurden, mit denen schließlich hochdichte Konsensus-Karten (Varshney et al. 2007, Stein et al. 2007, Close et al. 2009) oder Einzelpopulations-Karten (Sato et al. 2009) mit einer Vielzahl genbasierter Marker generiert wurden. Aber auch neue, auf Hybridisierung basierte *whole genome profiling* Technologien wie DArT (*Diversity Arrays Technology*) trugen zur Entwicklung hochdichter genetischer Karten der Gerste bei (Wenzl et al. 2006, Hearnden et al. 2007). In jüngster Vergangenheit wurde mit dem Illumina® 9K Infinium iSELECT Bead Chip ein auf 9.000 SNPs basierender Assay entwickelt (Comadran et al. 2012), welcher mittlerweile auch in der Züchtung eingesetzt wird (Miedaner und Korzun 2012). Mittels der direkten Genotyping by sequencing (GBS) Technik wurden bereits genetische Karten mit mehr als 34.000 kartierten SNPs (Poland et al. 2012) erstellt. Auch mit der Methode des exome capture, welches nur auf die Resequenzierung der Exons des Organismus abzielt, lassen sich hochdichte Karten generieren (Mascher et al. 2013). Weiterhin sind neue chip-assays in der Entwicklung, die auf 90.000 SNPs basieren (<http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/plant-sciences/discovery-of-high-density-molecular-markers.html>), so dass mit einer weiteren, starken Verdichtung von genetischen Karten gerechnet werden kann.

1.3.5.2 Syntänie-basierte Markerabsättigung

Die Entstehung der Gräser (*Poaceae*) kann durch fossile Pollenfunde nachvollzogen werden, und es wird angenommen, dass die Entwicklung der einzelnen Arten der Poaceae vor 55 – 70 Millionen

Jahren von einem gemeinsamen Vorfahren ausgehend begann (Kellogg 2001). Im Laufe der Evolution kam es dabei zu einer zunehmenden Differenzierung der einzelnen Arten hinsichtlich des Genotyps und auch des Phänotyps mit beträchtlichen Unterschieden bezüglich der Ploidie, der Chromosomenzahl und der Genomgröße insgesamt.

Mit den neu entstandenen Möglichkeiten molekularer Techniken konnte erstmals eine vergleichende Genomanalyse auf molekularer Ebene und die Identifizierung von Homologien zwischen den Chromosomen der einzelnen Gattungen der *Triticeae* innerhalb der *Poaceae* erfolgen (Appels et al. 1980, May und Appels 1980, Hart et al. 1980). Doch erst der Einsatz von RFLP-Markern erbrachte eine genomweite Entschlüsselung des Syntäniegrades der Genome und damit der Verwandtschaftsgrade zwischen den einzelnen Gattungen. Mit der Modellpflanze Reis (Bennetzen und Freeling 1993) als Referenzgenom wurden dann die Genome von sieben weiteren Arten zusammen in einem syntänischen Modell integriert (Moore et al. 1995). Diese und weitere Arbeiten (van Deynze et al. 1995, Gale und Devos 1998) lieferten Erkenntnisse, dass trotz der im Laufe der Evolution erfolgten starken Differenzierung der Arten nach wie vor syntäne Beziehungen zwischen den Arten vorliegen, d.h. dass die einzelnen Chromosomen der Gräser wie Lego-Steine aus subchromosomalen Blöcken aufgebaut sind, die hinsichtlich der Funktion der Gene als auch der Genanordnung selber zwischen den Arten vergleichbar sind. Aufgrund der Konservierung der Sequenz-Homologie als auch der Genanordnung innerhalb dieser subchromosomalen Blöcke können Syntänie Modelle für verschiedene Arten entwickelt werden (Moore et al. 1995).

Diese Kollinearität der Genome in der Modellpflanze Reis und anderen Gräsern konnte deshalb als Basis für die Markerabsättigung von Genloci in der Gerste genutzt werden (Kilian et al. 1995), und mit der Sequenzierung des Reisgenoms (Yu et al. 2002, Goff et al. 2002) nahm die Bedeutung von Reissequenzen für die syntänische Markerabsättigung von einzelnen Genen und QTLs der Gerste zu (vgl. Brunner et al. 2003, Gottwald et al. 2004, Perovic et al. 2004, Mammadov et al. 2005, Marcel et al. 2007a).

Doch obwohl durch die Syntänie-basierte Markerabsättigung mittels des Reis-Referenzgenoms einige Gene isoliert werden konnten, wie *ROR2* (Collins et al. 2003), *rym4/rym5* (Stein et al. 2005), *CsIF* (Burton et al. 2006), gibt es andere Beispiele, in denen zwar eine hohe Kollinearität zu Reis nachgewiesen werden konnte, das letztendlich isolierte Gerstengen aber kein Ortholog im Reisgenom aufwies (Brueggeman et al. 2002), oder aber von vornherein eine gestörte Kollinearität zu Reis vorlag (Caldwell et al. 2004a, Pourkheirandish et al. 2007). Weiterhin konnten Stein et al. (2007) in ihrer Arbeit weniger als die Hälfte der zuvor von Gaut (2002) beschriebenen syntänischen Beziehung zwischen Gerste und Reis bestätigen.

Sorghum als C4-Modellpflanze (Paterson et al. 2009) dagegen gehört zur Unterfamilie der *Panicoideae*, deren Entwicklung vor ca. 60 Millionen Jahren von den anderen *Poaceae* abzweigte

(Chalupska et al. 2008). Sorghum hat damit rund 10 Millionen Jahre weniger gemeinsame Entwicklung mit den *Triticeae* als Reis, einem anderen Vertreter der *Panicoideae*, und komparative Genkartierungen fanden v.a. im Bezug auf den nahen Verwandten Mais statt (Li und Gill 2002, Ilic et al. 2003).

Mit *Brachypodium distachyon* wurde in jüngerer Zeit eine neue Modellpflanze für Getreide propagiert (Draper et al. 2001), da sie enger mit den Getreidearten der gemäßigten Zonen verwandt ist als Reis und aus diesem Grund ein wesentlich höherer Syntäniegrad angenommen wurde (Garvin et al. 2008), wie sich auch schon in der Arbeit von Turner et al. (2005) gezeigt hatte. In der Folgezeit gewann *Brachypodium* für die syntänie-basierte Markerabsättigung von Gerstenloci immer mehr an Bedeutung (Chen et al. 2009, Vu et al. 2010), und ab 2010 stand die komplette Genomsequenz von *B. distachyon* (*International Brachypodium Initiative* 2010) für die Nutzung zur Verfügung.

Im Jahr 2006 war mit der physischen Kartierung der Gerste durch das *International Barley Sequencing Consortium* (IBSC) begonnen worden (<http://barleygenome.org>). Als erstes Ergebnis dieser Arbeiten wurde ein Syntänie-Modell geschaffen, welches die Gene der drei sequenzierten Genome von Reis, *Brachypodium* (*International Brachypodium Initiative* 2010) und *Sorghum bicolor* (Paterson et al. 2009) mit den gewonnenen Sequenzinformationen und der genetischen Karte der Gerste (Close et al. 2009) in einer virtuellen linearen Anordnung verknüpft (Thiel et al. 2009, Mayer et al. 2011). Mit dieser linearen Anordnung von orthologen Genen der drei Arten mit ESTs, cDNAs und genomischen Sequenzen der Gerste kann eine automatisierte und damit stark vereinfachte syntänie-basierte Markerabsättigung erfolgen (vgl. Ordon und Perovic 2013). Eine erfolgreiche Anwendung dieses automatisierten Syntänie-Modells findet sich unter anderem bei Shahinnia et al. (2012), Silvar et al. (2012, 2013) und Yang et al. (2013).

1.3.5.3 Die physische Karte der Gerste

Aufgrund der syntänischen Beziehung zu Roggen (*Secale cereale*) und Weizen (*Triticum aestivum*) (Linde-Laursen et al. 1997, Cho et al. 2006) und des viel kleineren und einfacheren diploiden Genoms der Gerste ($2n=2x=14$), welches weniger als ein Drittel der Größe des hexaploiden Weizengenoms besitzt, wurde die Gerste als ein genomisches Modell für die *Triticeae* ausgewählt. Die Grundvoraussetzung für das Erstellen einer physischen Karte ist das Vorhandensein einer BAC-Bibliothek. Mittels fingerprinting werden einzelne BAC-Klone einer Bibliothek analysiert, um Sequenzen zu identifizieren, die bei zwei oder mehr BAC-Klone aufgrund gleicher chromosomalen Verortung identisch sind. Durch die Identifizierung solcher Überlappungen können dann aus einzelnen BAC-Klonen größere BAC-contigs assembliert werden, wobei die Anzahl der BAC-Klone pro contig für den anschließenden Sequenzierungsprozess durch eine Bestimmung des *Minimum Tiling Path* möglichst gering gehalten wird (Schulte et al. 2011). Die entstandene physische Karte ist als

rekonstruiertes Modell eines Chromosoms anzusehen, wobei erst durch die Verankerung mit der genetischen Karte die Positionen der jeweiligen BAC-contigs auf den einzelnen Chromosomen identifiziert werden können (Poursarebani 2012). Nach solch einer Verankerung mit der genetischen Karte erlaubt die physische Karte einen Einblick in die Lokalisierung von Genen und repetitiven Sequenzen (IBSC 2012). Damit wird die physische Karte zu einem Schlüssel-Instrument bei der Isolierung von Genen, denn erst durch den Übergang auf die physische DNA-Ebene ist eine erfolgreiche Genisolation des vorab durch genetische Kartierung bestimmten Zielintervalls gegeben. So konnten mittlerweile mehrere Gene in den *Triticeae* isoliert werden, indem mittels *chromosome walking*, locus-spezifische physische Karten geschaffen wurden (vgl. Krattinger et al. 2009). Mittlerweile konnte eine physische Karte generiert werden, die mit einer Länge von 4,98 Gb mehr als 95% des gesamten Gerstengenoms repräsentiert (IBSC 2012).

1.3.6. Isolierte Resistenzgene der *Triticeae*

Seit der ersten Isolation eines Resistenzgens in Gerste (Büschges et al. 1997) sind mehrere Resistenzgene der *Triticeae* isoliert worden (vgl. Tabelle 2).

Während sowohl in Gerste als auch im Weizen schon für 11 bzw. 12 Resistenzgene eine funktionale Verifizierung erfolgt ist, konnte für den Roggen mit *Pm8* erst kürzlich das erste Resistenzgen isoliert werden (Hurni et al. 2013). Dieses Gen ist ein Ortholog des ebenfalls isolierten Resistenzgenes *Pm3* des Weizen (Yahiaoui et al. 2004) und wie dieses gegen *Blumeria graminis* (Getreidemehltau) wirksam. Einschließlich des auch gegen die Rostpilze *Puccinia triticina* und *P. striiformis* wirksamen Resistenzgenes *Lr34* (Krattinger et al. 2009b) konnten für *Blumeria graminis* bisher 10 Resistenzgene identifiziert werden. Damit sind für dieses Pathogen bislang die meisten Resistenzgene bekannt (vgl. Tabelle 2). Für *Puccinia graminis* konnten bisher im Weizen zwei (Periyannan et al. 2013, Saintenac et al. 2013) und in der Gerste drei Resistenzgene (Brueggeman et al. 2002, 2008) isoliert werden. Für *P. striiformis* (Gelbrost) war eine funktionale Verifizierung von Kandidatengenen bisher nur im Weizen möglich (Laroche et al. 2000, Fu et al. 2009, Krattinger et al. 2009b, Jiang et al. 2013). Für *P. triticina* (Braunrost) wurden bisher vier Resistenzgene entschlüsselt (Feuillet et al. 2003, Huang et al. 2003, Cloutier et al. 2007, Qiu et al. 2007, Krattinger et al. 2009b). Mit dem gegen die Blattkrankheiten *Stagonospora nodorum* und *Pyrenophora tritici-repentis* wirksamen Weizengen *Tsn1* (Faris et al. 2010) und dem gegen *Magnaporthe oryzae* wirksamen Gerstengen *HvCEBiP* (Tanaka et al. 2010) ist die Klonierung von zwei weiteren, gegen pilzliche Pathogene wirksamen Resistenzgenen erfolgt. Damit ist das von Stein et al. (2005) isolierte Virusresistenzgen *rym4/rym5* das einzige bisher klonierte Resistenzgen der *Triticeae*, welches nicht gegen ein pilzliches Pathogen wirksam ist.

Tabelle 2: Isolierte Resistenzgene der Triticeae (modifiziert nach Hanemann 2009).

Art	Gen	Protein	Pathogen	Krankheit	Referenz
Gerste	<i>rym4/rym5</i>	eukaryotic translation initiation factor 4E	<i>BaYMV, BaMMV</i>	Gelbmosaikvirose	Stein et al. (2005)
	<i>mlo</i>	transmembrane protein	<i>Blumeria graminis</i>	Echter Mehltau	Büschges et al. (1997)
	<i>Mla 1</i>	NBS-LRR	<i>Blumeria graminis</i>	Echter Mehltau	Zhou et al. (2001)
	<i>Mla6</i>	NBS-LRR	<i>Blumeria graminis</i>	Echter Mehltau	Halterman et al. (2001)
	<i>Rar1</i>	Zn ²⁺ -binding domain	<i>Blumeria graminis</i>	Echter Mehltau	Shirasu et al. (1999)
	<i>Ror2</i>	Syntaxin	<i>Blumeria graminis</i>	Echter Mehltau	Collins et al. (2003)
	<i>HvNAC6</i>	Binding Protein	<i>Blumeria graminis</i>	Echter Mehltau	Chen et al. (2013)
	<i>HvCEBiP</i>	Chitin Elicitor Binding Protein	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Reisbrand	Tanaka et al. (2010)
	<i>Rpg1</i>	protein kinase	<i>Puccinia graminis</i>	Schwarzrost	Brueggeman et al. (2002)
	<i>rpg4</i>	actin depolymerizing factor-like protein	<i>Puccinia graminis</i>	Schwarzrost	Brueggeman et al. (2008)
	<i>Rpg5</i>	NBS-LRR	<i>Puccinia graminis</i>	Schwarzrost	Brueggeman et al. (2008)
Roggen	<i>Pm8</i>	NBS-LRR	<i>Blumeria graminis</i>	Echter Mehltau	Humi et al. (2013)
Weizen	<i>Pm3</i>	NBS-LRR	<i>Blumeria graminis</i>	Echter Mehltau	Yahiaoui et al. (2004)
	<i>Stpk-V</i>	Serine/threonine kinase	<i>Blumeria graminis</i>	Echter Mehltau	Cao et al. (2011)
	<i>Sr33</i>	NBS-LRR	<i>Puccinia graminis</i>	Schwarzrost	Periyannan et al. (2013)
	<i>Sr35</i>	NBS-LRR	<i>Puccinia graminis</i>	Schwarzrost	Saintenac et al. (2013)
	<i>RLP1. 1</i>	receptor-like protein	<i>Puccinia striiformis</i>	Gelbrost	Jiang et al. (2013)
	<i>Yr10</i>	NBS-LRR	<i>Puccinia striiformis</i>	Gelbrost	Laroche et al. (2000)
	<i>Yr36</i>	kinase-START	<i>Puccinia striiformis</i>	Gelbrost	Fu et al. (2009)
	<i>Lr1</i>	NBS-LRR	<i>Puccinia triticina</i>	Braunrost	Qiu et al. (2007); Cloutier et al. (2007)
	<i>Lr10</i>	NBS-LRR	<i>Puccinia triticina</i>	Braunrost	Feuillet et al. (2003)
	<i>Lr21</i>	NBS-LRR	<i>Puccinia triticina</i>	Braunrost	Huang et al. (2003)
	<i>Lr34</i>	ABC transporter	<i>Puccinia triticina, Puccinia striiformis, Blumeria graminis</i>	Braunrost, Gelbrost, Echter Mehltau	Krattinger et al. (2009b)
	<i>Tsn1</i>	Serine/threonine kinase; NBS	<i>Stagonospora nodorum, Pyrenophora tritici-repentis</i>	Blatt- und Spelzenbräune, DTR-Blattdürre	Faris et al. (2010)

Die größte Gruppe der isolierten Resistenzgene kodiert dabei für Proteine, die als Rezeptoren für Avirulenz-Genprodukte dienen und die als strukturelle Domänen *Leucine Rich Repeats* (LRR) und eine *Nucleotide Binding Site* (NBS) aufweisen (Baker et al. 1997). In den meisten Fällen interagiert das Produkt eines Resistenzgenes nur mit einem bestimmten Avirulenz-Genprodukt und das betreffende Resistenzgen ist damit nur gegen eine bestimmte Rasse des Pathogens wirksam (Ayliffe und Lagudah 2004).

Beispiele für eine nicht rassenspezifische Resistenz sind dagegen das *mlo*-Gen der Gerste (Büschges et al. 1997) und die Resistenzgene *Lr34* bzw. *Yr36* des Weizens (Krattinger et al. 2009b, Fu et al. 2009).

1.3.6.1 Isolierte Virusresistenzgene der Gerste

Das rezessive Gen *rym4/rym5* ist bisher das einzige Virusresistenzgen, welches bei der Gerste isoliert wurde. Sowohl *rym4* als auch *rym5* sind Allele des eukaryotischen *Translation Initiation Factor* 4E der Gerste (*Hv-eIF4E*), welcher auf 3HL lokalisiert ist (Stein et al. 2005, Kanyuka et al. 2005).

Für eine rezessiv vererbte Resistenz wird die Abwesenheit eines bestimmten Wirtsfaktors angenommen, welcher für den Entwicklungszyklus eines Virus unabdingbar ist (Revers et al. 1999). Diese Hypothese wurde in den letzten Jahren durch die Identifizierung und Analyse von natürlich aufgetretenen oder künstlich induzierten Mutationen des eukaryotischen Translations-Initiations-

Komplexes und insbesondere der *eIF4E* and *eIF4G* Proteinfamilie bestätigt, welche mit einer Resistenz gegenüber *Potyviren* einhergeht (Robaglia und Caranta 2006, Maule et al. 2007). Die Identifizierung des eukaryotischen TranslationsInitiations Faktors *4E* der Gerste, welcher für die *rym4/5*-vermittelte Resistenz gegenüber der Gelbmosaikvirose verantwortlich ist, beweist anschaulich, dass Mutationen in solchen Basis-Komponenten des eukaryotischen Translationskomplexes einen grundsätzlichen Mechanismus der rezessiven Resistenz gegenüber *Potyviren* nicht nur in dikotylen sondern auch in monokotylen Pflanzen darstellen (Stein et al. 2005).

1.4 Ziele der Arbeit

Bisher konnte in der Gerste allein das Virusresistenzgen *rym4/rym5* isoliert werden. Indes wurden jedoch bei der Gerste in den vergangenen Jahren in erheblichem Maße Sequenz- und Markerinformationen generiert, welche effiziente Hilfsmittel für die Genisolation mittels kartengestützter Klonierung darstellen. Ziel der Arbeit war daher:

- Die Erstellung einer hochauflösenden Kartierungspopulation für das auf Chromosom 4H in Centromernähe lokalisierte, gegen BaMMV/BaYMV wirksame Resistenzgen *rym11*.
- Die Erstellung einer hochauflösenden Kartierungspopulation für das auf Chromosom 6H in Centromernähe lokalisierte, gegen BYDV wirksame Resistenzgen *Ryd3*.
- Die Markerabsättigung dieser Regionen unter Nutzung neuester genomischer Informationen und Werkzeuge.
- Die Identifikation von diesbezüglichen Kandidatengen.

Um diese Ziele zu Erreichen, wurden im Einzelnen die folgenden Arbeiten durchgeführt:

Die F_2 -Pflanzen wurden mit co-dominanten Markern, die das jeweilige Zielintervall flankieren, analysiert, um F_2 -Pflanzen zu identifizieren, die ein Rekombinationsereignis im Zielintervall aufwiesen.

In der F_3 -Generation erfolgte für 12 Nachkommen einer jeden identifizierten heterozygot rekombinanten F_2 -Pflanze eine nochmalige Analyse mit den gleichen das Zielintervall flankierenden, co-dominanten Markern, um homozygot-rekombinante F_3 -Pflanzen zu identifizieren, die als segmentale Rekombinante Inzuchtlinien (RILs) für das Zielintervall genetisch fixiert waren.

Diese segmentalen RILs wurden sowohl phänotypisch mit dem jeweiligen Virus getestet, als auch für eine Markerabsättigung genutzt.

Die aus den phänotypischen und genotypischen Daten resultierenden hochauflösenden genetischen Karten für *Ryd3* und *rym11* wurden anschließend mit der physischen Karte der Gerste verankert um mögliche, das jeweilige Zielgen tragende BAC-Klone zu identifizieren.

1.5 Literatur zur Einleitung

- Achon MA, Marsinach M, Ratti C, Rubies-Autonell C (2005) First report of Barley yellow mosaic virus in barley in Spain. *Plant Dis* 89: 101-105
- Achon, MA, Ratti C, Rubies-Autonell C (2003) Occurrence of Barley mild mosaic virus on barley in Spain. *Plant Dis* 87: 1004
- 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
- Allouis S, Moore G, Bellec A, Sharp R, Faivre Rampant P, Mortimer K, Pateyron S, Foote TN, Griffiths S, Caboche M, Chalhoub B (2003) Construction and characterisation of a hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) BAC library from the reference germplasm 'Chinese Spring'. *Cereal Res Commun* 31: 331-338
- Ammiraju JSS, Luo M, Goicoechea JL, Wang W, Kudrna D, Mueller C, Talag J, Kim HR, Sisneros NB, Blackmon B, Fang E, Tomkins JB, Brar D, MacKill D, McCouch S, Kurata N, Lambert G, Galbraith DW, Arumuganathan K, Rao K, Walling JG, Gill N, Yu Y, SanMiguel P, Soderlund C, Jackson S, Wing RA (2006) The *Oryza* bacterial artificial chromosome library resource: construction and analysis of 12 deep-coverage large-insert BAC libraries that represent the 10 genome types of the genus *Oryza*. *Genome Res* 16: 140-147
- An G, Jeong DH, Jung KH, Lee S (2005) Reverse genetic approaches for functional genomics of rice. *Plant Mol Biol* 59: 111–123
- Andersen JR, Lübberstedt T (2003) Functional markers in plants. *Trends Plant Sci* 8: 554–560
- Appels R, Gerlach WL, Dennis ES, Swift H, Peacock WJ (1980) Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals. *Chromosoma* 78: 293-311
- Ayliffe MA, Lagudah ES (2004) Molecular genetics of disease resistance in cereals. *Ann Bot* 94:765-773
- Badr A, Müller K, Schäfer-Pregl R, El Rabey H, Effgen S, Ibrahim HH, Pozzi C, Rohde W, Salamini F (2000) On the origin and domestication history of barley. *Mol Biol Evol* 17: 499-510
- Baik BK, Ullrich SE (2008) Barley for food: characteristics, improvement, and renewed interest. *J Cereal Sci* 48: 233–242
- Bakardijeva N, Krasteva C, Habekuss A, Rabenstein F (2004) Detection of cereal viruses and study of aphid population in Bulgaria. *Bulgarian J Agric Sci* 10: 161–164
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726-733
- Banks PM, Waterhouse PM, Larkin PJ (1992) Pathogenicity of 3 RPV isolates of Barley yellow dwarf virus on barley, wheat and wheat alien addition lines. *Ann Appl Biol* 121: 305–314
- Bara I, Capraru G, Maxim E (2006) *Hordeum vulgare* L. – cytotaxonomical aspects. *Analele Stiintifice ale Universitatii "Alexandru Ioan Cuza" din Iasi Sec. II a. Genetica si Biologie Moleculara* 7: 227-234

-
- Bartlett JG, Alves SC, Smedley M, Snape JW, Harwood WA (2008) High-throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation. *Plant Methods* 4: 22
- Bauer E, Weyen J, Schiemann A, Graner A, Ordon F (1997) Molecular mapping of novel resistance genes against barley mild mosaic virus (BaMMV). *Theor Appl Genet* 95: 1263–1269
- Bennetzen JL, Freeling M (1993) Grasses as a single genetic system: genome composition, colinearity and compatibility. *Trends Genet* 9: 259–261
- Bertolini E, Olmos A, Martinez MC, Gorris MT, Cambra M (2001) Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *J Virol Methods* 96: 33–41
- Blake T, Blake VC, Bowman JGP, Abdel - Haleem H (2010) *Barley Feed Uses and Quality Improvement*. Barley. Wiley-Blackwell: 522-531
- Blake VC, Kling JG, Hayes PM, Jannink J-L, Jillella SR, Lee J, Matthews DE, Chao S, Close TJ, Muehlbauer GJ, Smith KP, Wise RP, Dickerson JA (2012) The Hordeum Toolbox: the barley coordinated agricultural project genotype and phenotype resource. *Plant Genome* 5: 81–91
- Blattner FR (2009) Progress in phylogenetic analysis and a new infrageneric classification of the barley genus *Hordeum* (Poaceae: Triticeae). *Breeding Sci* 59: 471-480
- Boonham N, Tomlinson J, Mumford R (2007) Microarrays for rapid identification of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 45: 307-328
- Bortiri E, Jackson D, Hake S (2006) Advances in maize genomics: the emergence of positional cloning. *Curr Opin Plant Biol* 9: 164-171
- Bothmer von R, Seberg O, Jacobsen N (1992) Genetic resources in the *Triticeae*. *Hereditas* 116: 141-150
- Bothmer von R, Jacobsen N, Rikke CB, Jørgensen B, Linde-Laursen I (1995) An ecogeographical study of the genus *Hordeum*. IPGRI, Rome, Italy: 1-129
- Brown AR, Johnson JW, Rothrock CS, Bruckner PL (1988) Registration of Venus barley. *Crop Sci* 28: 718–719
- Brown DJF, Robertson WM, Trudgill DL (1995) Transmission of viruses by plant nematodes. *Annu Rev Phytopathol* 33: 223-249
- Brueggeman R, Rostoks N, Kudrna D, Kilian A, Han F, Chen J, Druka A, Steffenson B, Kleinhofs A (2002) The barley stem rust-resistance gene *Rpg1* is a novel disease-resistance gene with homology to receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9328–9333
- Brueggeman R, Druka A, Nirmala J, Cavileer T, Drader T, Rostoks N, Mirlohi A, Bennypaul H, Gill U, Kudrna D, Whitelaw C, Kilian A, Han F, Sun Y, Gill K, Steffenson B, Kleinhofs, A (2008) The stem rust resistance gene *Rpg5* encodes a protein with nucleotide-binding-site, leucine-rich, and protein kinase domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 14970-14975

-
- Brumlop S, Finckh MR (2011) Applications and potentials of marker assisted selection (MAS) in plant breeding. Final report of the F+E project "Applications and potentials of Smart Breeding". Bund für Naturschutz (BfN), 298
- Brunner S, Keller B, Feuillet C (2003) A large rearrangement involving genes and low-copy DNA interrupts the microcolinearity between rice and barley at the *Rph7* locus. *Genetics* 164: 673–683
- Burnett PA, Comeau A, Qualset CO (1995) Host plant tolerance or resistance for control of barley yellow dwarf. pp. 321-343. In: D'Arcy CJ, Burnett PA (eds) *Barley Yellow Dwarf: 40 Years of Progress*. APS Press, St. Paul, MN, USA
- Burton RA, Wilson SM, Hrmova M, Harvey AJ, Shirley NJ, Medhurst A, Stone BA, Newbigin EJ, Bacic A, Fincher GB (2006) Cellulose synthase-like *Cs/F* genes mediate the synthesis of cell wall (1,3;1,4)- β -d-glucans. *Science* 311: 1940–1942
- Büschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk J, Töpsch S, Vos P, Salamini F, Schulze-Lefert P (1997) The barley *Mlo* gene: A novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88: 695-705
- Caldwell KS, Langridge P, Powell W (2004a) Comparative sequence analysis of the region harboring the hardness locus in barley and its colinear region in rice. *Plant Physiol* 136: 77–3190
- Caldwell DG, McCallum N, Shaw P, Muehlbauer GJ, Marshall DF, Waugh R (2004b) A structured mutant population for forward and reverse genetics in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant J* 40: 143-150
- Canning ESG, Penrose MJ, Barker I, Coates D (1996) Improved detection of barley yellow dwarf virus in single aphids using RT-PCR. *J Virol Methods* 56: 191-197
- Cao A, Xing L, Wang X, Yang X, Wang W, Sun Y, Qian C, Ni J, Chen Y, Liu D, Wang X, Chen, P (2011) Serine/threonine kinase gene *Stpk-V*, a key member of powdery mildew resistance gene *Pm21*, confers powdery mildew resistance in wheat. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 7727-7732
- Catherall PL, Jones AT, Hayes JD (1970) Inheritance and effectiveness of genes in barley that condition tolerance to barley yellow dwarf virus. *Ann Appl Biol* 65: 153-161
- Catherall PL, Wilkins PW (1977) Barley yellow dwarf virus in relation to breeding and assessment of herbage grasses for yield and uniformity. *Euphytica* 26: 385–391
- Chalhoub BA, Sarrafi A, Lapierre HD (1995) Partial resistance in the barley (*Hordeum vulgare* L) cultivar 'Chikurin-Ibaraki-1' to two PAV-like isolates of Barley yellow dwarf virus: allelic variability at the *Yd2* gene locus. *Plant Breed* 114: 303–307
- Chalupska D, Lee HY, Faris JD, Evrard A, Chalhoub B, Haselkorn R, Gornicki P (2008) *Acc* homoeoloci and the evolution of wheat genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 9691-9696
- Chelkowski J, Tyrka M, Sobkiewicz A (2003) Resistance genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) and their identification with molecular markers. *J Appl Genet* 44: 291-309

-
- Chen A, Baumann U, Fincher GB, Collins NC (2009) *Flt-2L*, a locus in barley controlling flowering time, spike density, and plant height. *Funct Integr Genomics* 9: 243–254
- Chen J, Shi N, Cheng Y, Diao A, Chen J, Wilson TMA, Antoniw JF, Adams MJ (1999) Molecular analysis of barley yellow mosaic virus isolates from China. *Virus Res* 64: 13–21
- Chen YJ, Perera V, Christiansen MW, Holme IB, Gregersen PL, Grant MR, Collinge DB, Lyngkjær MF (2013) The barley *HvNAC6* transcription factor affects ABA accumulation and promotes basal resistance against powdery mildew. *Plant Mol Biol* 83: 577–590
- Cho S, Garvin DF, Muehlbauer GJ (2006) Transcriptome analysis and physical mapping of barley genes in wheat–barley chromosome addition lines. *Genetics* 172: 1277–1285
- Choi S, Creelman RA, Mullet JE, Wing RA (1995) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Bio Rep* 13: 124–128
- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34: 475–483
- Close TJ, Bhat PR, Lonardi S, Wu YH, Rostoks N, Ramsay L, Druka A, Stein N, Svensson JT, Wanamaker S, Bozdog S, Roose ML, Moscou MJ, Chao SAM, Varshney RK, Szucs P, Sato K, Hayes PM, Matthews DE, Kleinhofs A, Muehlbauer GJ, DeYoung J, Marshall DF, Madishetty K, Fenton RD, Condamine P, Graner A, Waugh R (2009) Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics* 10: 582
- Cloutier S, McCallum BD, Loutre C, Banks TW, Wicker T, Feuillet C, Keller B, Jordan MC (2007) Leaf rust resistance gene *Lr1*, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large *psr567* gene family. *Plant Mol Bio* 65: 93–106
- Collard BCY, Mackill DJ (2008) Marker assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philos T Roy Soc B* 363: 557–572
- Collins NC, Paltridge NG, Ford CM, Symons RH (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
- Collins NC, Thordal-Christensen H, Lipka V, Bau S, Kombrink E, Qiu JL, R. Hüchelhoven R, Stein M, Freialdenhoven A, Somerville SC, Schulze-Lefert P (2003) SNARE protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* 425: 973–77
- Comadran J, Kilian B, Russell J, Ramsay L, Stein N, Ganai M, Shaw P, Bayer M, Thomas W, Marshall D, Hedley P, Tondelli A, Pecchioni N, Francia E, Korzun V, Walther A, Waugh R (2012) Natural variation in a homolog of *Antirrhinum CENTRORADIALIS* contributed to spring growth habit and environmental adaptation in cultivated barley. *Nat Genet* 44: 1388–1392

-
- Cooper LD, Marquez-Cedillo L, Singh J, Sturbaum AK, Zhang S, Edwards V, Johnson K, Kleinhofs A, Rangel S, Carollo V, Bregitzer P, Lemaux PG, Hayes PM (2004) Mapping Ds insertions in barley using a sequence-based approach. *Mol Gen Genom* 272: 181–193
- D’Arcy CJ (1995) Symptomatology and host range of barley yellow dwarf. In: D’Arcy CJ, Burnett PA (eds) *Barley Yellow Dwarf: 40 Years of Progress*, APS Press: 9-28
- Deb M, Anderson JM (2008) Development of a multiplexed PCR detection method for Barley and Cereal yellow dwarf viruses, Wheat spindle streak virus, Wheat streak mosaic virus and Soil-borne wheat mosaic virus. *J Virol Methods* 48: 17–24
- Doležel J, Greilhuber J, Lucretti S, Meister A, Lysák MA, Nardi L, Obermayer R (1998) Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Ann Bot* 82: 17-26
- Domier LL (2008) Barley yellow dwarf virus. In: Mahy BWJ, van Regenmortel MHV (eds) *Encyclopedia of virology*, Elsevier, Oxford: 279-286
- Draper J, Mur LA, Jenkins G, Ghosh-Biswas GC, Bablak P, Hasterok R, Routledge AP (2001) *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol* 127: 1539–1555
- Dwyer GI, Gibbs MJA, Gibbs J, Jones RAC (2007) Wheat streak mosaic virus in Australia: relationships to isolates from the Pacific Northwest of the USA and its dispersion via seed transmission. *Plant Dis* 91: 164–170
- Eglinton JK, Coventry SJ, Chalmers K (2006) Breeding outcomes from molecular genetics. - Breeding for success: Diversity in action: Proceedings of the 13th Australasian Plant Breeding Conference, 18-21 April, 2006, Christchurch, New Zealand: 743-749
- Ellis RP, Forster BP, Robinson D, Handley LL, Gordon DC, Russell JR, Powell W (2000) Wild barley: a source of genes for crop improvement in the 21st century? *J Exp Bot* 51: 9-17
- Ellwood SR, Phan HTT, Jordan M, Hane J, Torres AM, Avila CM, Cruz-Izquierdo S, Oliver RP (2008) Construction of a comparative genetic map in faba bean (*Vicia faba* L.); conservation of genome structure with *Lens culinaris*. *BMC genomics* 9: 380
- Eun AJC, Seoh ML, Wong SM (2000) Simultaneous quantification of two orchid viruses by the TaqMan® real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 87: 151–160
- Fabre F, Kervarrec C, Mieuze L, Vialatte A, Jacquott E (2002) Improvement of BYDV-PAV detection in single aphid by using real-time RT-PCR fluorescent method. In: Henry M, McNab A (eds) *Barley Yellow Dwarf Disease: Recent advances and future strategies*. Mexico, D.F.; CIMMYT: 104–105
- Fantakhun AT, Pavlenko LA, Bobyr AD(1987) Barley yellow mosaic agent in the Ukraine. *Mikrobiol Zh* 49: 76–80
- Faris JD, Zhang Z, Lu H, Lu S, Reddy L, Cloutier S, Fellers JP, Meinhardt SW, Rasmussen JB, Xu SS, Oliver RP, Simons KJ, Friesen TL (2010) A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 13544-13549

-
- Feuillet C, Travella S, Stein N, Albar L, Nublát A, Keller B (2003) Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15253-15258
- Feuillet C, Langridge P, Waugh R (2008) Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends Genet* 24: 24–32
- Ford CM, Paltridge NG, Rathjen JP, Moritz RL, Simpson RJ, Symons RH (1998) Rapid and informative assays for *Yd2*, the Barley yellow dwarf virus resistance gene, based on the nucleotide sequence of a closely linked gene. *Mol Breed* 4: 23–31
- French R, Stenger DC (2003) Evolution of wheat streak mosaic virus: dynamics of population growth within plants may explain limited variation. *Annu Rev Phytopathol* 41: 199–214
- Friedt W (1983) Mechanical transmission of soil-borne Barley Yellow Mosaic Virus. *J Phytopathol* 106: 16-22
- Friedt W, Weiskorn C, Scheurer KS, Habekuss A, Huth W, Ordon F (2001): Barley yellow dwarf virus-Toleranz und markergestützte Züchtungsansätze bei der Gerste. 52. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs. BAL Gumpenstein, 117-120
- Friedt W Ordon F (2013) Barley Production and Breeding in Europe: Modern Cultivars Combine Disease Resistance, Malting Quality and High Yield. pp. 389-400. In: Zhang G, Li C, Liu X (eds) *Advance in Barley Sciences*. Springer Netherlands
- Fu D, Uauy C, Distelfeld A, Blechl A, Epstein L, Chen X, Sela H, Fahima T, Dubcovsky J (2009) A kinase-START gene confers temperature-dependent resistance to wheat stripe rust. *Science* 323: 1357-1360
- Gale MD, Devos KM (1998) Comparative genetics in the grasses. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1971-1974
- Galloway BT, Southword EA (1890) Preliminary notes on a new and destructive oat disease. *J Mycol* 6:72-73
- Gallitelli D (2004) Nucleic acid-based assay for the diagnosis of viral pathogens. *Phytopathol Mediterr* 43: 221-227
- Gao S, Martinez C, Skinner DJ, Krivanek AF, Crouch JH, Xu Y (2008) Development of a seed DNA-based genotyping system for marker-assisted selection in maize. *Mol Breed* 22: 477-494
- Garvin DF, Gu YQ, Hasterok R, Hazen SP, Jenkins G, Mockler TC, Mur LAJ, Vogel JP (2008) Development of genetic and genomic research resources for *Brachypodium distachyon*, a new model system for grass crop research. *Crop Sci* 48: 69– 84
- Gaut BS (2002) Evolutionary dynamics of grass genomes. *New Phytol* 154: 15–28
- Giraudat J, Hauge BM, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman HM (1992) Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* 4: 1251-1261
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange M, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J,

-
- Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296: 92–100
- Gottwald S, Stein N, Börner A, Sasaki T, Graner A (2004) The gibberellic-acid insensitive dwarfing gene *sdw3* of barley is located on chromosome 2HS in a region that shows high colinearity with rice chromosome 7L. *Mol Genet Genomics* 271: 426–436
- Götz R, Friedt W (1993) Resistance to the barley yellow mosaic virus complex –differential genotypic reactions and genetics of BaMMV-resistance of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breed* 111: 125-13
- Grafton KF, Poehlman JM, Sechler DT, Sehgal OP (1982) Effect of barley yellow dwarf virus infection on winter survival and other agronomic traits in barley. *Crop Sci* 22: 596-600
- Graner A, Jahoor A, Schondelmaier J, Siedler H, Pillen K, Fischbeck G, Wenzel G, Herrmann RG (1991) Construction of an RFLP map of barley. *Theor Appl Genet* 83: 250-256
- Graner A, Bauer E (1993) RFLP mapping of the *ym4* virus resistance gene in barley. *Theor Appl Genet* 86: 689-693
- Graner A, Bauer E, Kellermann A, Proeseler G, Wenzel G, Ordon F (1995) RFLP analysis of resistance to the barley yellow mosaic virus complex. *Agronomie* 15: 475-479
- Graner A, Bauer E, Chojecki J, Tekauz A, Kellermann A, Proeseler A, Michel M, Valkov V, Wenzel G, Ordon F (1996) Molecular mapping of disease resistance in barley. In: G. Scoles, B. Rosnagel (eds) *Proc VI Intern Oat Con & VII Intern Barley Genetics Symp, Poster Sessions Vol 1*, Saskatoon, Canada, University Extension Press, Saskatoon, Saskatchewan, 253-255
- Graner A, Streng S, Kellermann A, Schiemann A, Bauer E, Waugh R, Pellio B, Ordon F (1999a) Molecular mapping of the *rym5* locus encoding resistance to different strains of the barley yellow mosaic virus complex. *Theor Appl Genet* 98: 285-290
- Graner A, Streng S, Kellermann A, Proeseler G, Schiemann A, Peterka H, Ordon F (1999b) Molecular mapping of genes conferring resistance to soil-borne viruses in barley. An approach to promote understanding of host-pathogen interactions. *J Plant Dis Protect* 106: 405-410
- Greene EA, Codomo CA, Taylor NE, Henikoff JG, Till BJ, Reynolds SH, Enns LC, Burtner Ch, Johnson JE, Odden AR (2003) Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics* 164: 731-740
- Habekuss A, Schliephake E, Matthes P, Hartleb H, Mehner S, Gruntzig M, Fuchs E (2002) Zum Auftreten des Gerstengelverzweigungsvirus und seiner Vektoren in Sachsen-Anhalt. 53. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, BAL Gumpenstein: 111-114

-
- Habekuss A, Kühne T, Krämer I, Rabenstein F, Ehrig F, Ruge-Wehling B, Huth W, Ordon F (2008) Identification of barley mild mosaic virus isolates in Germany breaking *rym5* resistance. *J Phytopathol* 156: 36-41
- Habekuss A, Riedel C, Schliephake E, Ordon F (2009) Breeding for resistance to insect-transmitted viruses in barley - an emerging challenge due to global warming. *J Cultiv Plants* 61: 53–61
- Habekuss A (2012) Gerstengelverzweigung - Ein vermeidbares Problem? *Praxisnah* 2: 4-5
- Halterman D, Zhou F, Wie F, Wise RP, Schulze-Lefert (2001) The *MLA6* coiled-coil, *NBS-LRR* protein confers *AvrMla6*-dependent resistance specificity to *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in barley and wheat. *Plant J* 25: 335-348
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, von Tiedemann A (2007) *Phytomedizin, Grundwissen Bachelor*, Ulmer Verlag
- Halbert S, Voegtlin D (1995) Biology and taxonomy of vectors of Barley Yellow Dwarf Virus. In: D'Arcy CJ, Burnett PA (eds) *Barley Yellow Dwarf: 40 Years of Progress*, APS Press: 217-258
- Hanemann A (2009) Fine mapping and marker development for the resistance gene *Rrs2* against *Rhynchosporium secalis* in Barley. Doktorarbeit, Technische Universität München. 216 S.
- Hariri D, Lapiere H, Filleur S, Plovie C, Delaunay T (1996) Production and characterization of monoclonal antibodies to barley yellow mosaic virus and their use in detection of four bymoviruses. *J Phytopathol* 144: 331–336
- Hariri D, Meyer M, Prud'homme H (2003) Characterization of a new Barley mild mosaic virus pathotype in France. *Eur J Plant Pathol* 109: 921–928
- Hart GE, Islam AKMR, Shepherd KW (1980) Use of isozymes as chromosome markers in the isolation and characterization of wheat-barley chromosome addition lines. *Genet Res* 36: 311-325
- Hayes PM, Corey AE, Mundt C, Toojinda T, Vivar H (2003) Registration of 'Tango' Barley. *Crop Science* 43: 729-731
- Hearnden PR, Eckermann PJ, McMichael GL, Hayden MJ, Eglinton JK, Chalmers KJ (2007) A genetic map of 1,000 SSR and DArT markers in a wide barley cross. *Theor Appl Genet* 115: 383-391
- Herzog E, Frisch M (2011) Selection strategies for marker-assisted backcrossing with high-throughput marker systems. *Theor Appl Genet* 123: 251-260
- Hill SA, Evans J (1980) Barley yellow mosaic virus. *Plant Pathol* 29: 197 – 199
- Hofinger BJ, Russel JR, Bass CG, Baldwin T, Dos Reis M, Hedley PE, Li YD, Macaulay M, Waugh R, Hommond-Kosack KE, Kanyuka K (2011) An exceptional high nucleotide and haplotype diversity and a signature of positive selection for the *eIF4E* resistance gene in barley are revealed by allele mining and phylogenetic analyses of natural populations. *Mol Ecology* 20: 3653-3668
- Hoisington D, Bohorova N, Fennell S, Khairallah M, Pellegrineschi A, Ribaut J M (2002) The application of biotechnology to wheat improvement. *FAO plant production and protection series* 30: 175-198

-
- Holloway PJ, Heath R (1992) Identification of polypeptide markers of barley yellow dwarf virus resistance and susceptibility genes in non-infected barley (*Hordeum vulgare*) plants. *Theor Appl Genet* 85: 346–352
- Horsley RD, Franckowiak JD, Schwarz PB (2009) Barley. In: MJ Carena (ed) *Handbook of plant breeding: Cereals*. Springer, New York, NY
- Horvath J (1993) Host plants in diagnosis. In: Matthews REF (ed) *Diagnosis of plant virus diseases*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA: 15–48
- Huang L, Brooks SA, Li W, Fellers JP, Trick HN, Gill BS (2003) Map-based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploid genome of bread wheat. *Genetics* 164: 655–664
- 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 breed* 129: 346–348
- Hurni S, Brunner S, Buchmann G, Herren G, Jordan T, Krukowski P, Wicker T, Yahiaoui N, Mago R, Keller B (2013) Rye *Pm8* and wheat *Pm3* are orthologous genes and show evolutionary conservation of resistance function against powdery mildew. *Plant J* 76: 957–969
- Huth W, Lesemann DE (1978) Eine für die Bundesrepublik neue Virose an Wintergerste. *Nachrichtenbl. Nachrichtenbl Deut Pflanzenschutz* 30: 184–185
- Huth W (1984) Gelbmosaikvirose der Gerste in der Bundesrepublik Deutschland - Beobachtungen seit 1978. *Nachrichtenbl Deut Pflanzenschutz* 36: 49–55
- Huth W (1985) Versuche zur Virusdiagnose und Resistenzträgererstellung in Gerste gegen Barley Yellow Mosaic Virus. *Vortr Pflanzzüchtg* 9: 107–120
- Huth W (1989) Management of yellow-mosaic-inducing viruses on barley by selection of resistant cultivars. *EPPO Bull* 19: 547–553
- Huth W (1989b) Ein weiterer Stamm des Barley Yellow Mosaic Virus in der Bundesrepublik Deutschland. *Nachrichtenbl Deut Pflanzenschutz* 40: 49–55
- Huth W, Adams MJ (1990) Barley yellow mosaic virus BaYMV and BaYMV-M: Two different viruses. *Intervirology* 31: 38–42
- Huth W (1995) Möglichkeiten und Grenzen der Züchtung von Getreidesorten mit Resistenz gegenüber den Gelbverzwergungsviren – aus virologischer Sicht. 46. Tagung der Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, BAL Gumpenstein: 1–14
- Huth W (2000) Bodenbürtige Viren der Gerste. In: *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft, Heft 373*: 38–40
- Huth W, Habekuss A, Ordon F (2005) Neue Stämme des Barley mild mosaic virus auch in Deutschland *Nachrichtenbl Deut Pflanzenschutz* 57: 152–154

-
- Iida Y, Konishi T (1994) Linkage analysis of a resistance gene to barley yellow mosaic virus strain II in two-rowed barley. *Breeding Sci* 44: 191-194
- Iida Y, Ban T, Konishi T (1999) Linkage analysis of the *rym6* resistance gene to Japanese strain II of *barley yellow mosaic virus* (BaYMV-II) in barley. *Barley Genetics Newsletter* 29: 31-32
- Ikata S, Kawai I (1940) Studies on wheat yellow mosaic disease. *Noji Kairyō Shiryo* 154: 1–123
- Ilic K, SanMiguel PJ, Bennetzen JL (2003) A complex history of rearrangement in an orthologous region of the maize, sorghum, and rice genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12265-12270
- International Brachypodium Initiative (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463: 763–768
- Iwanowskij D (1892) Über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze. *Bulletin Scientifique publié par l'Académie Impériale des Sciences de Saint-Petersbourg / Nouvelle Serie III* 35: 67–70
- Jensen SG, D'Arcy CJ (1995) Effects of Barley Yellow Dwarf on Host Plants. In: D'Arcy CJ, Burnett PA (eds) *Barley Yellow Dwarf: 40 Years of Progress*, APS Press: 55-74
- Jeżewska M, Trzmiel K (2009) First report of Barley yellow mosaic virus infecting barley in Poland. *Plant Path* 58: 784-784
- Jiang Z, Ge S, Xing L, Han D, Kang Z, Zhang G, Wang X, Wang X, Chen P, Cao, A (2013) *RLP1. 1*, a novel wheat receptor-like protein gene, is involved in the defence response against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *J Exp Bot* 64: 3735-3746
- Johal GS, Briggs SP (1992) Reductase activity encoded by the *HM1* disease resistance gene in maize. *Science* 258: 985-987
- Jones AT (1993) Experimental transmission of viruses in diagnosis. In: Matthews REF (ed) *Diagnosis of plant virus diseases*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA: 49–72
- Jones DA, Thomas CM, Hammond-Kosack KE, Balintkurti PJ, Jones JDG (1994) Isolation of tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266: 789-793
- Johnston PA, Niks RE, Meiyalaghan V, Blanchet E, Pickering R (2013) *Rph22*: mapping of a novel leaf rust resistance gene introgressed from the non-host *Hordeum bulbosum* L. into cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 126: 1613-1625
- 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.. *Theor Appl Genet* 124: 577–583
- Kanyuka K, Ward E, Adams MJ (2003) *Polymyxa graminis* and the cereal viruses it transmits: a research challenge. *Mol Plant Pathol* 4: 393–406
- Kanyuka K, Druka A, Caldwell DG, Tymon A, McCallum N, Waugh R, Adams MJ (2005) Evidence that the recessive bymovirus resistance locus *rym4* in barley corresponds to the eukaryotic translation initiation factor *4E* gene. *Mol Plant Pathol* 6: 449-458

-
- Kashiwazaki S, Ogawa K, Usugi T, Omura T, Tsuchizaki T (1989) Characterization of several strains of barley yellow mosaic virus. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 55: 16-25
- Katis N, Tzavella-Klonari, Adams MJ (1997) Occurrence of barley yellow mosaic and barley mild mosaic bymovirus in Greece. *Eur J Plant Pathol* 103: 281-284
- Kawada N (1991) Resistant cultivars and genetic ancestry of the resistance genes to barley yellow mosaic virus in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Bull Kyushu Natl Agric Exp Stn* 27: 65-79
- Kellogg EA (2001) Evolutionary history of the grasses. *Plant Phys* 2001, 125:1198-1205
- Kennedy TF, Connery J (2005) Grain yield reductions in spring barley due to barley yellow dwarf virus and aphid feeding. *Irish J Agr Food Res* 44: 111–128
- Kennedy TF, Connery J (2011) Control of *barley yellow dwarf virus* in minimum-till and conventional-till autumn-sown cereals by insecticide seed and foliar spray treatments. *J Agr Sci* 150:249-262
- Kilian A, Kudrna DA, Kleinhofs A, Yano M, Kurata N, Steffenson B, Sasaki T (1995) Rice-barley synteny and its application to saturation mapping of the barley *Rpg1* region. *Nucleic Acids Res* 23: 2729-2733
- King AM, Adams MJ, Lefkowitz EJ, Carstens EB (2012) Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press
- Kleinhofs A, Kilian A, Saghai-Maroo MA, Biyashev RM, Hayes P, Chen FQ, Lapitan N, Fenwick A, Blake TK, Kanazin V, Ananiev E, Dahleen E, Frankowiak JD, Hoffmann D, Scagsen R, Steffenson BJ (1993) A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theor Appl Genet* 86: 705-712
- Koch M, Vaupel J, Ruge-Wehling B (2009) Einsatz von Markern in der Getreidezüchtung zur Nutzung genetischer Ressourcen. 60. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Pflanzenzüchter Saatgutkaufleute Österreichs: 53 – 56
- Komatsuda T, Pourkheirandish M, He C, Azhaguvel P, Kanamori H, Perovic D, Stein N, Graner A, Wicker T, Tagiri A, Lundqvist U, Fujimura T, Matsuoka M, Matsumoto T, Masahiro YM (2007) Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1424–1429
- Konishi T, Ban T, Iida Y, Yoshimi R (1997) Genetic analysis of disease resistance to all strains of BaYMV in a Chinese barley landrace Mokusekko 3. *Theor Appl Genet* 94: 871-877
- Konishi T, Ordon F, Furusho M (2002) Reactions of barley accessions carrying different *rym* genes to BaYMV and BaMMV in Japan and Germany. *Barley Genetics Newsl* 32: 46-48
- Krattinger S, Wicker T, Keller B (2009) Map-based cloning of genes in *Triticeae* (wheat and barley). In Feuillet C, Muehlbauer GJ (eds) *Genetics and Genomics of the Triticeae*. Springer, Berlin: 337-357

-
- Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeier W, Singh RP, Huerta-Espino J, McFadden H, Bossolini E, Selter LL, Keller B (2009b) A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* 323: 1360-1363
- Kuckuck H (1934) Artkreuzungen bei Gerste. *Der Züchter* 6: 270-273
- Kühne T, Shi N, 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
- Kühne T (2009) Soil-borne viruses affecting cereals—Known for long but still a threat. *Virus Res* 141: 174–183
- Kumar D (2012) Quality requirements for malting barley. pp: 48-50. In: Verma RPS, Kharub AS, Kumar D, Sarkar B, Selvakumar R, Malik R, Sharma I (eds) A compendium of lectures on —Malting Quality Improvement in Barley, Sorghum & Corn. Directorate of Wheat Research, Karnal, India. DWR, Compendium No. 5
- Künzel G, Korzun L, Meister A (2000) Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics* 154: 397–412
- Lapierre H (1980) Nouvelle maladies à virus sur céréales d’hiver. *Product Agr Fr* 270: 11
- Larkin PJ, Young MJ, Gerlach WL, Waterhouse PM (1991) The *Yd2* resistance to barley yellow dwarf virus is effective in barley plants but not in their leaf protoplasts. *Ann Appl Biol* 118: 115-125
- Laroche A, Frick MM, Huel R, Nykiforuk C, Conner B, Kuzyk A (2000) Molecular identification of the wheat stripe rust resistance gene *Yr10*, the first full-length leucine zipper-nucleotide binding site-leucinerich-repeat resistance gene in cereals.
- Lee SH (1981) Studies on virus diseases occurring in various crops in Korea. *Res Rept RDA* 23: 62–74
- Lee KJ, Kashiwazaki S, Hibi T, So IY (1996) Properties and capsid protein gene sequence of a Korean isolate of barley mild mosaic virus. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 62: 397–401
- Lee WS, Hammond-Kosack KE, Kanyuka K (2012) Barley Stripe Mosaic Virus-Mediated Tools for Investigating Gene Function in Cereal Plants and Their Pathogens: Virus-Induced Gene Silencing, Host-Mediated Gene Silencing, and Virus-Mediated Overexpression of Heterologous Protein. *Plant Physiol* 160: 582-590
- Le Gouis J, Devaux P, Werner K, Hariri D, Bahrman N, Beghin D, Ordon F (2004) *Rym15* from the Japanese cultivar ‘Chikurin Ibaraki 1’ is a new Barley Mild Mosaic Virus (BaMMV) resistance gene mapped on chromosome 6H. *Theor Appl Genet* 108: 1521-1525
- Li W, Gill BS (2002) The colinearity of the *Sh2/A1* orthologous region in rice, sorghum and maize is interrupted and accompanied by genome expansion in the Triticeae. *Genetics* 160: 1153-1162

-
- Linde-Laursen I, Heslop-Harrison JS, Shepherd KW, Taketa S (1997) The barley genome and its relationship with the wheat genomes. A survey with an internationally agreed recommendation for barley chromosome nomenclature. *Hereditas* 126: 1-16
- Linder HP, Midgley J (1996) Anemophilous plants select pollen from their own species from the air. *Oecologia* 108: 85-87
- Lister RM, Ranieri R (1995) Distribution and economic importance of barley yellow dwarf. In: D'Arcy CJ, Burnett PA (eds) *Barley Yellow Dwarf: 40 Years of Progress*, APS Press: 29-53
- 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.). *Theor Appl Genet* 126: 1201-1212
- Lundqvist A (1962) Self-incompability in diploid *Hordeum bulbosum* L. *Hereditas* 48: 138-152
- Luo M, Wing RA (2003) An improved method for plant BAC library construction. *Methods Mol Biol* 236: 3-20
- Mammadov JA, Stevenson BJ, Saghai-Marouf MA (2005) High-resolution mapping of the barley leaf rust resistance gene *Rph5* using barley expressed sequence tags (ESTs) and synteny with rice. *Theor Appl Genet* 111: 1651-1660
- Marcel TC, Aghnoum R, Durand J, Varshney RK, Niks RE (2007a) Dissection of the barley *2L1.0* region carrying the 'laevigatum' quantitative resistance gene to leaf rust using near-isogenic lines (NIL) and subNIL. *Mol Plant Microb In* 20: 1604-1615
- Marcel TC, Varshney RK, Barbieri M, Jafary H, de Kock MJD, Graner A, Niks RE (2007b) A high-density consensus map of barley to compare the distribution of QTLs for partial resistance to *Puccinia hordei* and of defence gene homologues. *Theor Appl Genet* 114: 487-500
- Martini ML, Harlan HV (1942) Barley freaks. *J Hered* 33: 339-343
- 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 (2013) Barley whole exome capture: a tool for genomic research in the genus *Hordeum* and beyond. *Plant J* 76: 494-505
- Maule AJ, Caranta C, Boulton MI (2007) Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Mol Plant Pathol* 8: 223-231
- May CE, Appels R (1980) Rye chromosome translocations in hexaploid wheat: a re-evaluation of the loss of heterochromatin from rye chromosomes. *Theor Appl Genet* 56: 17-23
- Mayer KFX, Martis M, Hedley PE, Šimková H, Liu H, Morris JA, Steuernagel B, Taudien S, Roessner S, Gundlach H, Kubaláková M, Suchánková 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, Doležel J, Waugh R, Stein N

- (2011) Unlocking the Barley Genome by Chromosomal and Comparative Genomics. *Plant Cell* 23: 1249-1263
- McGrann GRD, Adams MJ (2004) Investigating resistance to Barley mild mosaic virus. *Plant Pathol* 53: 161–169
- McKinney EC, Ali N, Traut A, Feldman KA, Belostotsky DA, McDowell JM, Meagher RB (1995) Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in *Arabidopsis*: Actin mutants *act2-1* and *act4-1*. *Plant J* 8: 613–622
- McKirdy SJ, Jones RAC (1997) Effect of sowing time on Barley yellow dwarf virus infection in wheat: virus incidence and grain yield losses. *Aust J Agric Res* 48: 199-206
- McClintock B (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 36: 344-355
- Meissner RC, Jin H, Cominelli E, Denekamp M, Fuertes A, Greco R, Kranz HD, Penfield S, Petroni K, Urzainqui A, Martin C, Paz-Ares J, Smeekens S, Tonelli C, Weisshaar B, Baumann E, Klimyuk V, Marillonnet S, Patel K, Speulman E, Tissier AF, Bouchez D, Jones JJ, Pereira A, Wisman E, Bevan M (1999) Function search in a large transcription factor gene family in *Arabidopsis*: assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in *R2R3 MYB* genes. *Plant Cell* 11: 1827–1840
- Miedaner T, Korzun V (2012) Marker-assisted selection for disease resistance in wheat and barley breeding. *Phytopathol* 102: 560-566
- Milne RG (1993) Electron microscopy of in vitro preparations. In: Matthews REF (ed) *Diagnosis of plant virus diseases*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA: 215–251
- Molina-Cano JL, Russell JR, Moralejo MA, Escacena JL, Arias G, Powell W (2005) Chloroplast DNA microsatellite analysis supports a polyphyletic origin for barley. *Theor Appl Genet* 110: 613-619
- Moore G, Devos KM, Wang Z, Gale MD (1995) Cereal genome evolution: Grasses, line up and form a circle. *Curr Biol* 5: 737-739
- Mullis KF, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol* 51: 263–273
- Nagarajan R (2013) Transferring Maize Transposable Elements to Bread Wheat through Wheat x Maize Crossing. In: *Plant and Animal Genome XXI Conference*. Plant and Animal Genome
- Naidu RA, Hughes Jd'A (2003) Methods for the detection of plant virus diseases. In: Odu BO (eds) *Plant Virology in Sub Saharan Africa*, Proceedings of a conference organized by IITA: 233 – 260
- Nam HG, Giraudat J, den Boer B, Moonan F, Loos WDB, Hauge BM, Goodman HM (1989) Restriction fragment length polymorphism linkage map of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 1: 699 – 704

- Narwal S (2012) Nutritional quality of barley. pp: 51-55. In: Verma RPS, Kharub AS, Kumar D, Sarkar B, Selvakumar R, Malik R, Sharma I (eds) A compendium of lectures on —Malting Quality Improvement in Barley, Sorghum & Corn. Directorate of Wheat Research, Karnal, India. DWR, Compendium No. 5
- Newman CW, Newman RK (2006) A brief history of barley foods. *Cereal Foods World* 51: 4–7
- Newton AC, Flavell AJ, George TS, Leat P, Mullholland B, Ramsay L, Revoredo-Giha C, Russell J, Steffenson BJ, Swanston JS, Thomas WTB, Waugh R, White PJ, Bingham IJ (2011) Crops that feed the world 4. Barley: A resilient crop? Strengths and weaknesses in the context of food security. *Food Sec* 3: 141–178
- Niks RE, Habekuss A, Bekele B, Ordon F (2004) A novel major gene on chromosome 6H for resistance of barley against the Barley yellow dwarf virus. *Theor Appl Genet* 109:1536–1543
- Nissan-Azzouz F, Graner A, Friedt W, Ordon F (2005) Fine-mapping of the BaMMV, BaYMV-1 and BaYMV-2 resistance of barley (*Hordeum vulgare*) accession PI1963. *Theor Appl Genet* 110:212–218
- Nomura K, Kashiwazaki S, Hibino H, Inoue T, Nakata E, Tsuzaki Y, Okuyama S (1996) Biological and serological properties of strains of barley mild mosaic virus. *J Phytopathol* 144:103–107
- Okada Y, Kanatani R, Arai S, Ito K (2004) Interaction between barley yellow mosaic disease-resistance genes *rym1* and *rym5*, in the response to BaYMV strains. *Breeding Sci* 54: 319-325
- Orabi J, Backes G, Wolday A, Yahyaoui A, Jahoor A (2007) The Horn of Africa as a centre of barley diversification and a potential domestication site. *Theor Appl Genet* 114: 1117-1127
- Ordon F, Huth W, Friedt W (1992) Mechanical transmission of barley mild mosaic virus (BaMMV) to rye (*Secale cereale* L). *J Phytopathol* 135: 84-87
- Ordon F, Götz R, Friedt W (1993) Genetic stocks resistant to barley yellow mosaic viruses (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) in Germany. *Barley Genet Newsl* 22: 46–49
- Ordon F, Bauer E, Friedt W, Graner A (1995) Marker-based selection for the *ym4* BaMMV-resistance gene in barley using RAPDs. *Agronomie* 15: 481-485
- Ordon F, Ahlemeyer J, Werner K, Kohler W, Friedt W (2005) Molecular assessment of genetic diversity in winter barley and its use in breeding. *Euphytica* 146: 21–28
- Ordon F, Habekuss A, Kastirr U, Rabenstein F, Kühne T (2009) Virus resistance in cereals: Sources of resistance, genetics and breeding. *J Phytopathol* 157: 535–545
- Ordon F, Perovic D (2013) Virus Resistance in Barley. In: Varshney R, Tuberosa R (eds) Translational genomics for crop breeding: Biotic stress, Volume 1. John Wiley & Sons, 63-75
- O’Sullivan DM, Ripoll PJ, Rodgers M, Edwards KJ (2001) A maize bacterial artificial chromosome (BAC) library from the European flint inbred line F₂. *Theor Appl Genet* 103: 425-432
- Oswald JW, Houston BR (1951) A new virus disease of cereals transmissible by aphids. *Plant Dis Rep* 35: 471-475

- Owens RA, Diener TO (1981) Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. *Science* 213: 670-672
- Palloix A, Ordon F (2011) Advanced breeding for virus resistance in plants. In: Caranta C, Aranda MA, Tepfer M, Lopez-Moya JJ (eds) *Recent advances in plant virology*. Caister Academic Press, UK: 195–218
- Parry AL, Habgood RM (1986) Field assessment of the effectiveness of a barley yellow dwarf virus resistance gene following its transference from spring to winter barley. *Ann Appl Biol* 108: 395–401
- Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J, Gundlach H, Haberler G, Hellsten U, Mitros T, Poliakov A, Schmutz J, Spannagl M, Tang HB, Wang XY, Wicker T, Bharti, AK, Chapman J, Feltus FA, Gowik U, Grigoriev IV, Lyons E, Maher CA, Martis M, Narechania A, Otiillar RP, Penning BW, Salamov AA, Wang Y, Zhang LF, Carpita NC, Freeling M, Gingle AR, Hash CT, Keller B, Klein P, Kresovich S, McCann MC, Ming R, Peterson DG, Mehboob-ur-Rahman, Ware D, Westhoff P, Mayer KFX, Messing J, Rokhsar DS (2009) The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature* 457: 551-556
- 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.). *Theor Appl Genet* 110: 283-293
- Periyannan S, Moore J, Ayliffe M, Bansal U, Wang X, Huang L, Deal K, Luo M, Kong X, Bariana H, Mago R, McIntosh R, Dodds P, Dvorak J, Lagudah E (2013) The gene *Sr33*, an ortholog of barley *Mla* genes, encodes resistance to wheat stem rust race Ug99. *Science* 341: 786-788
- Perovic D, Stein N, Zhang H, Drescher A, Prasad M, Kota R, Kopahnke D, Graner A (2004) An integrated approach for comparative mapping in rice and barley with special reference to the *Rph16* resistance locus. *Funct Integr Genomics* 4: 74-83
- Perovic D, Krämer I, Habekuss A, Perner K, Pickering R, Proeseler G, Kanyuka K, Ordon F (2014) Genetic analyses of BaMMV/BaYMV resistance in barley accession HOR4224 result in the identification of an allele of the *translation initiation factor 4e* (*Hv-eIF4E*) exclusively effective against Barley mild mosaic virus (BaMMV). *Theor Appl Genet* 127: 1061-1071
- Peters JL, Cnudde F, Gerats T (2003) Forward genetics and map-based cloning approaches. *Trends Plant Sci* 8: 484-491
- Pickering RA (1991) The production of fertile triploid hybrids from crosses between *Hordeum vulgare* L. ($2n=4x=28$) and *H. bulbosum* L. ($2n=2x=14$). *Hereditas* 114: 227-236
- Pickering R, Ruge-Wehling B, Johnston PA, Schweizer G, Ackermann P, Wehling P (2006) The transfer of a gene conferring resistance to scald (*Rhynchosporium secalis*) from *Hordeum bulbosum* into *H. vulgare* chromosome 4HS. *Plant Breed* 125: 576-579

-
- Pickering R, Hill AM, Michel M, Timmerman-Vaughan GM (1995) The transfer of a powdery mildew resistance gene from *Hordeum bulbosum* L. to barley (*H. vulgare* L.) chromosome 2 (2l). *Theor Appl Genet* 91: 1288–1292
- Plumb RT, Johnstone GR (1995) Cultural, chemical and biological methods for the control of barley yellow dwarf. In: D'Arcy CJ, Burnett PA (eds) *Barley yellow dwarf. 40 years of progress*, APS Press: 107-127
- 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, e32253
- Pourkheirandish M, Wicker T, Stein N, Fujimura T, Komatsuda T (2007) Analysis of the barley chromosome 2 region containing the six-rowed spike gene *vrs1* reveals a breakdown of rice-barley micro colinearity by a transposition. *Theor Appl Genet* 114: 1357-65
- Poursarebani N (2012) A genetically anchored physical map of barley chromosome 2H. Doktorarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. 107 S.
- Proeseler G (1993) *Triticum durum* Desf. a further host of Barley mild mosaic virus. *J Phytopathol* 138: 262- 264
- Qiu JW, Schürch AC, Yahiaoui N, Dong LL, Fan HJ, Zhang ZJ, Keller B, Ling HQ (2007) Physical mapping and identification of a candidate for the leaf rust resistance gene *Lr1* of wheat. *Theor Appl Genet* 115: 159-168
- Rabenstein F, Götz R, Huth W, French R (2008) Identifizierung und Charakterisierung neuer Viren aus europäischen Weizenherkünften. *Mitteilungen Julius Kühn-Institut* 417:121–122
- Rademacher von B, Schwarz R (1958) Die Rotblättrigkeit oder Blattröte des Hafers – eine Viruskrankheit (*Hordeumvirus nanescens*). *Z Pflanzenkrankh Pflanzenschutz* 65: 641-650
- Rae SJ, Macaulay M, Ramsay L, Leigh F, Matthews D, O'Sullivan DM, Donini P, Morris PC, Powell W, Marshall DF, Waugh R, Thomas WTB (2007) Molecular barley breeding. *Euphytica* 158: 295–303
- Rao AS, Brakke MK (1969) Relation of soil-borne wheat mosaic virus and its fungal vector, *Polymyxa graminis*. *Phytopathology* 59: 581–587
- Revers F, Le Gall OT, Candresse T, Maule AJ (1999) New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Mol Plant Microbe Interact* 12: 367-376
- Riedel C, Habekuß A, Schliephake E, Nix R, Broer I, Ordon F (2011) Pyramiding of *Ryd2* and *Ryd3* conferring tolerance to a German isolate of barley yellow dwarf virus-PAV (BYDV-PAV-ASL-1) leads to quantitative resistance against this isolate. *Theor Appl Genet* 123: 69–76
- Robaglia C, Caranta C (2006) Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci* 11: 40-45
- Roberts IM, Harrison BD (1979) Detection of potato leafroll and potato mop-top viruses by immunosorbent electron microscopy. *Ann Appl Biol* 93: 289–297

- Robertson DW (1929) Linkage studies in barley. *Genetics* 14: 1-36
- Rochow WF (1969) Biological properties of four isolates of barley yellow dwarf virus. *Phytopathology* 59: 1580-1589
- Rubies-Autonell C, Toderi G, Marengi A, Vallega V (1995) Effects of soil tillage and crop rotation on BaYMV and BaMMV mixed infection. *Agronomie* 15: 511–512
- Ruge B, Linz A, Pickering R, Proeseler G, Greif P, Wehling P (2003) Mapping of *Rym14Hb*, a gene introgressed from *Hordeum bulbosum* and conferring resistance to BaMMV and BaYMV in barley. *Theor Appl Genet* 107:965–971
- Ruge B, Linz A, Habekuß A, Flath K, Wehling P (2004) Introgression and mapping of novel resistance genes from the secondary gene pool of barley, *Hordeum bulbosum*. *Proc 9th Int Barley Genet Symp* 20-26 June 2004, Brno, Czech Republic, pp. 729-736
- Ruge-Wehling B, Linz A, Habekuß A, Wehling P (2006) Mapping of *Rym16 (Hb)*, the second soil-borne virus-resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum*. *Theor Appl Genet* 113: 867–873
- Saintenac C, Zhang W, Salcedo A, Rouse MN, Trick HN, Akhunov E, Dubcovsky J (2013) Identification of wheat gene *Sr35* that confers resistance to *Ug99* stem rust race group. *Science* 341: 783-786
- Saeki K, Miyazaki C, Hirota N, Saito A, Ito K, Konishi T (1999) RFLP mapping of BaYMV resistance gene *rym3* in barley (*Hordeum vulgare*). *Theor Appl Genet* 99: 727-732
- Saisho D, Myoraku E, Kawasaki S, Sato K, Takeda K (2007) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for Japanese malting barley 'Haruna Nijo'. *Breed Sci* 57: 29-38
- Salamini F, Özkan H, Brandolini A, Schäfer-Pregl R, Martin W (2002) Genetics and geography of wild cereal domestication in the Near East. *Nature Rev Genet* 3: 429-441
- Sato K, Nankaku N, Takeda K (2009) A high-density transcript linkage map of barley derived from a single population. *Heredity* 103: 110-117
- Sayed H, Kumari S, Baum M, Ghulam W, Grando S, Makkouk K (2006) Marker-assisted selection for barley yellow dwarf virus resistance genes *Yd2* and *Yd3* in barley. In: Ninth Arab congress of plant protection, 19–23 November 2006, Damascus, Syria. p E- 103
- Schaller CW, Rasmusson DC, Qualset CO (1963) Sources of resistance to the yellow-dwarf virus in barley. *Crop Sci* 3: 342-344
- Schaller CW, Qualset CO, Rutger JN (1964) Inheritance and linkage of the *Yd2* gene conditioning resistance to the Barley yellow dwarf disease in barley. *Crop Sci* 4: 544–548
- Schaller CW, Prato JD, Chim CI (1973) Registration of Sutter barley. *Crop Sci* 13: 285
- Schaller CW (1984) The genetics of resistance to barley yellow dwarf virus in barley. pp. 93-99. Burnett PA (ed) Barley yellow dwarf. In: A Proceedings of the workshop. CIMMYT, Mexico

-
- Scheurer KS, Friedt W, Huth W, Waugh R, Ordon F (2001) QTL analysis of tolerance to a German strain of BYDV-PAV in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 103: 1074–1083
- Schliephake E, Habekuss A, Scholz M, Ordon F (2013) Barley yellow dwarf virus transmission and feeding behaviour of *Rhopalosiphum padi* on *Hordeum bulbosum* clones. *Entomol Exp Appl* 146: 347-356
- Scholz M, Ruge-Wehling B, Habekuss A, Schrader O, Pendinen G, Fischer K, Wehling P (2009) *Ryd4Hb*: a novel resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum* into barley and conferring complete and dominant resistance to the Barley yellow dwarf virus. *Theor Appl Genet* 119: 837–849
- Schulte D, Ariyadasa R, Shi B, Fleury D, Saski C, Atkins M, deJong P, Wu CC, Graner A, Langridge P, Stein N (2011) BAC library resources for map-based cloning and physical map construction in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Genomics* 12: 247
- Sedláček T, Mařík P, Chrpová J (2010) Development of CAPS marker for identification of *rym4* and *rym5* alleles conferring resistance to the barley yellow mosaic virus complex in barley. *Czech J Genet Plant Breed* 46: 159–163
- Shapiro J, MacHattie L, Eron L, Ihler G, Ippen K, Beckwith J (1969) Isolation of pure lac operon dna. *Nature* 224: 768-774
- Shahinnia F, Druka A, Franckowiak J, Morgante M, Robbie Waugh R, Stein N (2012) High resolution mapping of *Dense spike-ar* (*dsp.ar*) to the genetic centromere of barley chromosome 7H. *Theor Appl Genet* 124: 373–384
- Shirasu K, Lahaye T, Tan MW, Zhou F, Azevedo C, Schulze-Lefert P (1999) A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. *Cell* 99: 355-366
- Silvar C, Perovic D, Scholz U, Casas AM, Igartua E, Ordon F (2012) Fine mapping and comparative genomics integration of two quantitative trait loci controlling resistance to powdery mildew in a Spanish barley landrace. *Theor Appl Genet* 124: 49-62
- Silvar C, Perovic D, Nussbaumer T, Spannagl M, Usadel B, Casas A, Igartua E, Ordon F (2013) Towards positional isolation of three quantitative trait loci conferring resistance to powdery mildew in two Spanish barley landraces. *PloS One* 8, e67336
- Singh J, Zhang S, Chen C, Cooper L, Bregitzer P, Sturbaum A, Hayes PM, Lemaux PG (2006) High-frequency Ds remobilization over multiple generations in barley facilitates gene tagging in large genome cereals. *Plant Mol Biol* 62: 937–950
- Singh S, Tan HQ, Singh J (2012) Mutagenesis of barley malting quality QTLs with Ds transposons. *Funct Integr Genomics* 12: 131-141
- Šip V, Chrpova J, Vacke J, Ovesna J (2004) Possibility of exploiting the *Yd2* resistance to BYDV in spring barley breeding. *Plant Breed* 123: 24-29
- Smith HC (1955) Barley yellow dwarf virus in New Zealand. *Commonwealth Phytopathol News* 1: 10-11

-
- Smýkal P, Aubert G, Burstin J, Coyne CJ, Ellis NTH, Flavell AJ, Ford R, Hýbl M, Macas J, Neumann P, McPhee KE, Redden RJ, Rubiales D, Weller JL, Warkentin TD (2012) Pea (*Pisum sativum* L.) in the genomic era. *Agronomy* 2: 74-115
- Stein N, Feuillet C, Wicker T, Edith Schlagenhauf E, Keller B (2000) Subgenome chromosome walking in wheat: A 450-kb physical contig in *Triticum monococcum* L. spans the *Lr10* resistance locus in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13436-13441
- 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 J* 42:912–922
- Stein N, Prasad M, Scholz U, Thiel T, Zhang H, Wolf M, Kota R, Varshney RK, Perovic D, Graner A (2007) A 1000 loci transcript map of the barley genome—new anchoring points for integrative grass genomics. *Theor Appl Genet* 114: 823–839
- Stracke S, Presterl T, Stein N, Perovic D, Ordon F, Graner A (2007) Effects of introgression and recombination on haplotype structure and linkage disequilibrium surrounding a locus encoding bymovirus resistance in barley. *Genetics* 175: 805-817
- Strażyński P, Ruskowska M, Jeżewska J, Trzmiel K (2011) Evaluation of the autumn infection of winter barley with barley yellow dwarf viruses transmitted by anholocyclic forms of bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* L. in Poland. *J Plant Protection Res* 51: 314-321
- Suneson CA (1955) Breeding for resistance to yellow dwarf virus in barley. *Agron J* 47: 283
- Suneson CA, Ramage RT (1957) Studies on the importance of the yellow-dwarf virus. *Agron J* 49: 365-367
- Swaminathan SS (2011) Impact of global warming on the insect pest status on plants. *Indian J Sci Technol* 4: 230–235
- Szunics L, Pocsai E, Szunics L, Vida G (1989) Viral diseases on cereals in central Hungary. *Acta Agron Hungarica* 48: 237–250
- Takahashi R, Hayashi J, Inouye T, Moriya I, Hirao C (1973) Studies on resistance to yellow mosaic disease in barley. I. Tests for varietal reactions and genetic analysis of resistance to the disease. *Ber Ohara Inst* 16: 1-17
- Tanaka S, Ichikawa A, Yamada K, Tsuji G, Nishiuchi T, Mori M, Koga H, Nishizawa Y, O'Connell R, Kubo Y (2010) *HvCEBiP*, a gene homologous to rice chitin receptor *CEBiP*, contributes to basal resistance of barley to *Magnaporthe oryzae*. *BMC Plant Biol* 10: 288
- Thackray DJ, Ward LT, Thomas-Carroll ML, Jones RA (2005) Role of winter-active aphids spreading barley yellow dwarf virus in decreasing wheat yields in a mediterranean-type environment. *Crop and Pasture Sci* 56: 1089-1099

- Thackray DJ, Diggle AJ, Jones RAC (2009) BYDV predictor: a simulation model to predict aphid arrival, epidemics of Barley yellow dwarf virus and yield losses in wheat crops in a Mediterranean-type environment. *Plant Pathol* 58: 186-202
- The International Barley Genome Sequencing Consortium (IBSC) (2012) A physical, genetical and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491: 711–716
- 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 Evol. Biol.* 9, 209.
- Toojinda, T, Broers LH, Chen XM, Hayes PM, Kleinhofs A, Korte J, Kudrna D, Leung H, Line RF, Powell W, Ramsay L, Vivar H, Waugh R (2000) Mapping quantitative and qualitative disease resistance genes in a doubled haploid population of barley (*Hordeum vulgare*). *Theor Appl Genet* 101: 580–589
- Turner A, Beales J, Faure S, Dunford RP, Laurie DA (2005) The pseudo-response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley. *Science* 310: 1031–1034
- Tyrka M, Perovic D, Wardynska A, Ordon F (2008) A new diagnostic SSR marker for selection of the *Rym4/Rym5* locus in barley breeding. *J Appl Genet* 49: 127-134
- Uauy C, Paraiso F, Colasuonno P, Tran RK, Tsai H, Berardi S, Comai L, Dubcovsky J (2009) A modified TILLING approach to detect induced mutations in tetraploid and hexaploid wheat. *BMC Plant Biol* 9: 115
- Valkoun, J (2008) Global Strategy for the ex situ conservation and use of barley germplasm. Unveröffentlichter Entwurf. <http://www.croptrust.org/documents/cropstrategies/barley.pdf>
- Van Deynze AE, Nelson JC, Yglesias ES, Harrington SE, Braga DP, McCouch SR, Sorrells ME (1995) Comparative mapping in grasses. Wheat relationships. *Mol Gen Genet* 248: 744-754
- Varshney RK, Marcel TC, Ramsay L, Russell J, Röder M S, Stein N, Waugh R, Langridge P, Niks RE, Graner A (2007) A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theor Appl Genet* 114: 1091-1103
- Varshney RK, Nayak SN, May GD, Jackson SA (2009) Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends Biotechnol* 27: 522-530
- Vertigan WA (1991) Register of Australian winter cereal cultivars *Hordeum vulgare* (Barley) cv. Franklin. *Aust J Exp Agric* 31: 863
- Vu GTH, Wicker T, Buchmann JP, Chandler PM, Matsumoto T, Graner A, Stein N (2010) Fine mapping and syntenic integration of the semi-dwarfing gene *sdw3* of barley. *Funct Integr Genomics* 10: 509-521
- Watson MA, Mulligan T (1960) The manner of transmission of some barley yellow-dwarf viruses by different aphid species. *Ann Appl Biol* 48: 711-720
- Wenzl P, Li HB, Carling J, Zhou MX, Raman H, Paul E, Hearnden P, Maier C, Xia L, Caig V, Ovesna J, Cakir M, Poulsen D, Wang JP, Raman R, Smith KP, Muehlbauer GJ, Chalmers KJ, Kleinhofs A, Huttner E,

-
- Kilian A (2006) A high-density consensus map of barley linking DArT markers to SSR, RFLP and STS loci and agricultural traits. *BMC Genomics* 7: 206
- Werner K, Pellio B, Ordon F, Friedt W (2000) Development of an STS marker and SSRs suitable for marker-assisted selection for the BaMMV resistance gene *rym9* in barley. *Plant Breed* 119: 517-519
- Werner K, Friedt W, Laubach E, Waugh R, Ordon F (2003a) Dissection of resistance to soil-borne yellow mosaic inducing viruses of barley (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) in a complex breeders cross by SSRs and simultaneous mapping of BaYMV/BaYMV-2 resistance of 'Chikurin Ibaraki 1'. *Theor Appl Genet* 106: 1425-1432
- Werner K, Rönicke S, Le Gouis L, Friedt W, Ordon F (2003b) Mapping of a new BaMMV-resistance gene derived from the variety 'Taihoku A'. *J Plant Disease Protec* 110: 304-311
- Werner K, Friedt W, Ordon F (2005) Strategies for pyramiding resistance genes against the barley yellow mosaic virus complex (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2). *Mol Breed* 16: 45-55
- Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B (1994) The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78: 1101-1115
- Wu CC, Nimmakayala P, Santos FA, Springman R, Scheuring C, Meksem K, Lightfoot DA, Zhang HB (2004) Construction and characterization of a soybean bacterial artificial chromosome library and use of multiple complementary libraries for genome physical mapping. *Theor Appl Genet* 109: 1041-1050
- Xu Y, Crouch JH (2008) Marker-assisted selection in plant breeding: From publications to practice. *Crop Sci* 48: 391-407
- Yahiaoui N, Srichumpa P, Dudler R, Keller B (2004) Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. *Plant J* 37: 528-538
- Yamamura K, Kiritani K (1998) A simple method to estimate the potential increase in the number of generations under global warming in temperature zones. *Appl Entomol Zool* 33:289-298
- Yang P, Perovic D, Habekuß A, Zhou R, Graner A, Ordon F, Stein N (2013) Gene-based high-density mapping of the gene *rym7* conferring resistance to barley mild mosaic virus (BaMMV). *Mol Breed* 32: 27-37
- Yang P, Lüpken T, Habekuss A, Hensel G, Steuernagel B, Kilian B, Ariyadasa R, Himmelbach A, Kuhmlehn J, Scholz U, Ordon F, Stein N (2014) *PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE LIKE 5-1* is a susceptibility factor to plant viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 2104-2109
- Yili R, Dengdi J (1983) On Barley Yellow Mosaic (BaYMV). *Acta Phytopathol Sin* 13: 49-55
- Yu J, Hu SN, Wang J, Wong GKS, Li SG, Liu B, Deng YJ, Dai L, Zhou Y, Zhang XQ, Cao ML, Liu J, Sun JD, Tang JB, Chen YJ, Huang XB, Lin W, Ye C, Tong W, Cong LJ, Geng JN, Han YJ, Li L, Li W, Hu GQ, Huang XG, Li WJ, Li J, Liu ZW, Li L, Liu JP, Qi QH, Liu JS, Li L, Li T, Wang XG, Lu H, Wu TT, Zhu M, Ni PX, Han H, Dong W, Ren XY, Feng XL, Cui P, Li XR, Wang H, Xu X, Zhai WX, Xu Z, Zhang JS, He SJ, Zhang JG, Xu JC, Zhang KL, Zheng XW, Dong JH, Zeng WY, Tao L, Ye J, Tan J, Ren XD, Chen XW, He J, Liu DF, Tian W, Tian CG,

-
- Xia HG, Bao QY, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao WM, Li P, Chen W, Wang XD, Zhang Y, Hu JF, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang GY, Xiong YQ, Li ZJ, Mao L, Zhou CS, Zhu Z, Chen RS, Hao BL, Zheng WM, Chen SY, Guo W, Li GJ, Liu SQ, Tao M, Wang J, Zhu LH, Yuan LP, Yang HM (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp *indica*). *Science* 296: 79-92
- Yu Y, Tomkins JP, Waugh R, Frisch DA, Kudrna D, Kleinjohs 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
- Zhou F, Kurth J, Wei F, Elliott C, Valè G, Yahiaoui N, Keller B, Sommerville S, Wise R, Schulze-Lefert P (2001) Cell-autonomous expression of barley *Mla1* confers race-specific resistance to the powdery mildew fungus via a Rar1-independent signaling pathway. *Plant Cell* 13: 337-350
- Zhukov VA, Kuznetsova EV, Ovchinnikova ES, Rychagova TS, Titov VS, Pinaev AG, Borisov AY, Moffet M, Domoney C, Ellis THN, Ratet P, Weeden NF, Tikhonovich IA (2007) Gene-based markers of pea linkage group V for mapping genes related to symbioses. *Pisum Genetics* 39: 19-25
- Zohary D, Hopf M (2001) *Domestication of plants in the old world*, Ed 3. Oxford University Press, Oxford, UK: 1-12

2. Veröffentlichungen

2.1. Genomics based high resolution mapping of the BaMMV/BaYMV resistance gene *rym11* in barley (*Hordeum vulgare* L.)

Thomas Lüpken¹, Nils Stein², Dragan Perovic¹, Antje Habekuß¹, Ilona Krämer¹, Urs Hähnel², Burkhard Steuernagel², Uwe Scholz², Rounan Zhou², Ruvini Ariyadasa², Stefan Taudien³, Matthias Platzer³, Mihaela Martis⁴, Klaus Mayer⁴, Wolfgang Friedt⁵, Frank Ordon^{1,6}

¹Julius Kuehn-Institute (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Resistance Research and Stress Tolerance, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg, Germany

²Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Corrensstr. 3, 06466 Gatersleben, Germany

³Leibniz Institute for Age Research - Fritz-Lipmann-Institute (FLI), Beutenbergstraße 11, 07745 Jena, Germany

⁴Munich Information Center for Protein Sequences/Institute of Bioinformatics and Systems Biology (MIPS/IBIS), Institute for Bioinformatics and Systems Biology, Helmholtz Center Munich, 85764 Neuherberg, Germany

⁵Institute of Crop Science and Plant Breeding I, Justus-Liebig-University, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen, Germany

⁶Corresponding author, E-mail: frank.ordon@jki.bund.de

Telephone: +49(0)394647601

Genomics-based high-resolution mapping of the BaMMV/BaYMV resistance gene *rym11* in barley (*Hordeum vulgare* L.)

Thomas Lüpken · Nils Stein · Dragan Perovic · Antje Habekuß · Ilona Krämer ·
Urs Hähnel · Burkhard Steuernagel · Uwe Scholz · Rounan Zhou ·
Ruvini Ariyadasa · Stefan Taudien · Matthias Platzer · Mihaela Martis ·
Klaus Mayer · Wolfgang Friedt · Frank Ordon

Received: 5 September 2012 / Accepted: 13 January 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Soil-borne barley yellow mosaic virus disease, caused by different strains of Barley yellow mosaic virus (BaYMV) and Barley mild mosaic virus (BaMMV), is one of the most important diseases of winter barley (*Hordeum vulgare* L.) in Europe and East Asia. The recessive resistance gene *rym11* located in the centromeric region of chromosome 4HL is effective against all so far known strains of BaMMV and BaYMV in Germany. In order to isolate this gene, a high-resolution mapping population (10,204 meiotic events) has been constructed. F₂ plants were screened with co-dominant flanking markers and segmental recombinant inbred lines (RILs) were tested for resistance to BaMMV under growth chamber and field conditions. Tightly linked markers were developed by exploiting (1) publicly available barley EST sequences, (2) employing barley synteny to rice, *Brachypodium distachyon* and sorghum and (3) using next-generation sequencing

data of barley. Using this approach, the genetic interval was efficiently narrowed down from the initial 10.72 % recombination to 0.074 % recombination. A marker co-segregating with *rym11* was developed providing the basis for gene isolation and efficient marker-assisted selection.

Introduction

Barley yellow mosaic virus disease caused by different strains of *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) and *Barley mild mosaic virus* (BaMMV) (Huth 1991; Hariri et al. 2000, 2003; Kanyuka et al. 2004; Habekuss et al. 2008; Kühne 2009) has become one of the most important diseases of winter barley in East Asia and in Europe (Ordon et al. 2004; Kanyuka et al. 2003). The area infested is continuously growing and high yield losses of susceptible winter barley crops are frequently observed in Europe. Due to transmission of the viruses via the soil-borne plasmodiophorid *Polymyxa graminis*, breeding for resistant cultivars is the only way to ensure winter barley cultivation in the growing area of infested fields. Up to now, resistance in

Communicated by P. Hayes.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00122-013-2047-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

T. Lüpken · D. Perovic · A. Habekuß · I. Krämer ·
F. Ordon (✉)
Julius Kuehn-Institute (JKI), Federal Research Centre for
Cultivated Plants, Institute for Resistance Research and Stress
Tolerance, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg, Germany
e-mail: frank.ordon@jki.bund.de

N. Stein · U. Hähnel · B. Steuernagel · U. Scholz · R. Zhou ·
R. Ariyadasa
Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research
(IPK), Corrensstr. 3, 06466 Gatersleben, Germany

S. Taudien · M. Platzer
Leibniz Institute for Age Research, Fritz-Lipmann-Institute
(FLI), Beutenbergstraße 11, 07745 Jena, Germany

M. Martis · K. Mayer
Munich Information Center for Protein Sequences/Institute of
Bioinformatics and Systems Biology (MIPS/IBIS), Institute for
Bioinformatics and Systems Biology, Helmholtz Center Munich,
85764 Neuherberg, Germany

W. Friedt
Institute of Crop Science and Plant Breeding I,
Justus-Liebig-University, Heinrich-Buff-Ring 26-32,
35392 Giessen, Germany

Europe mainly relies on the resistance gene *rym4/rym5*. This source of resistance has been overcome meanwhile by BaYMV-2 (*rym4*) and BaYMV-SIL/BaMMV-Teik (*rym5*), respectively (Habekuss et al. 2008). However, several resistance genes against BaMMV/BaYMV are known in the primary gene pool of barley (Friedt et al. 2008) suited to broaden the genetic basis of resistance. Among these, the recessive resistance gene *rym11* has been located in the centromeric region of chromosome 4HL (Bauer et al. 1997; Nissan-Azzouz et al. 2005). To date, this gene confers resistance to all known European strains of BaMMV and BaYMV under field conditions (Kanyuka et al. 2004; Habekuss et al. 2008). However, in a single report on studies conducted in pot trials using air-dried soil collected from different locations in France, *rym11* has been overcome by strains of BaYMV and BaMMV (Hariri et al. 2000). All bymovirus resistance genes derived from the primary gene pool of barley are inherited in a recessive manner (Friedt and Ordon 2007), with the exception of the newly identified dominant resistance gene *Rym17*, which confers resistance against Japanese strains of BaYMV (Kai et al. 2012). Furthermore, resistance genes transferred from *Hordeum bulbosum* are dominantly inherited, i.e., *Rym14^{Hb}* (Ruge et al. 2003) and *Rym16^{Hb}* (Ruge-Wehling et al. 2006).

Recessive inheritance is the common mode of resistance to potyviruses of which bymoviruses are a subgroup (López-Moya and Garcia 2008; Provvidenti and Hampton 1992; Maule et al. 2007). Recessive resistance is indicating a lack of host components vital for a particular step in the virus life cycle (Fraser 1990; Revers et al. 1999). In this respect, mutations in genes of the eukaryotic translation-initiation complex were identified as underlying mechanism of potyvirus resistance in plant species of different genera (Robaglia and Caranta 2006; Maule et al. 2007; Yeam et al. 2007; Hofinger et al. 2011). In barley, *rym4/rym5* mediated bymovirus resistance is conferred by mutations in the eukaryotic translation initiation factor 4E (*Hv-eIF4E*). Independent single nucleotide polymorphisms (SNPs) contribute to the differential genotypic response to different strains of BaMMV and BaYMV (Stein et al. 2005; Kanyuka et al. 2005).

In case no information on the putative function of a gene is available, map-based cloning has proven to be an efficient tool for gene isolation even in plants with complex genomes such as barley and wheat (Stein and Graner 2004). This approach requires the construction of a high-resolution mapping population followed by marker saturation of the target interval (Stein and Graner 2004; Pellio et al. 2005). While previously anonymous marker technologies like AFLPs had been used for marker saturation (e.g., Pellio et al. 2005), today, dense sequence-based marker maps either comprising non-genic (Ramsay et al. 2000; Hearnden et al. 2007; Varshney et al. 2007) or transcript-derived

markers (e.g., Stein et al. 2007; Sato et al. 2009; Close et al. 2009) are available for targeted marker saturation. Moreover, synteny between barley, rice, sorghum and *Brachypodium* (Stein et al. 2007; Thiel et al. 2009; Mayer et al. 2011) can be efficiently employed (Smilde et al. 2001; Gottwald et al. 2004; Perovic et al. 2004; Shahinnia et al. 2009; Vu et al. 2010) especially if combined with sequencing information of flow-sorted barley chromosome arms (barley genome zipper, Mayer et al. 2011).

The aim of the present study was to employ improved genomic tools of barley for (1) the rapid high-resolution mapping of *rym11* providing a starting point for the isolation of this resistance gene and (2) the identification of markers for efficient marker-based selection procedures.

Materials and methods

Plant material and construction of a high-resolution mapping population

For high-resolution mapping of *rym11*, a segregating population comprising 5,102 F₂ plants was constructed based on crosses between the *rym11*-carrying doubled haploid lines (DHs) ‘W 757/112’ and ‘W 757/612’, respectively, tracing back to an accession carrying a resistance gene allelic to the one of Russia 57 (*rym11*, Nissan-Azzouz et al. 2005) and the cultivar Naturel. Semi-automatic DNA-extraction according to Dorokhov and Klocke (1997) was carried out at the two-leaf stage using a 96-deep-well leaf crusher (Thieme et al. 2008). To identify F₂ plants recombinant for the target interval, screening with co-dominant SSR-markers HVM03 and HVM68 (Nissan-Azzouz et al. 2005) was performed as a duplex assay via fluorescence-detection on a CEQ 8000 (Beckman-Coulter; cf. Wang et al. 2009). Homozygous recombinant inbred lines (RILs) were selected among 12 F₃ plants of heterozygous recombinant F₂ plants by applying the same SSR-markers. Unintentionally, cultivar Naturel also exhibited recessive bymovirus resistance which was conferred by an unlinked recessive resistance at the locus *Rym4* (Stein et al. 2005). Therefore, plants carrying the recessive *rym4* allele were identified in F₂ by the closely linked marker Bmac29 (Graner et al. 1999) and were discarded from the further population development. For marker saturation, DNA of segmental RILs was extracted according to Stein et al. (2001) and respective seeds were harvested for repeated phenotyping.

Resistance tests

Resistance to BaMMV was tested in growth chamber experiments by mechanical inoculation of ten plants per each

RIL with the isolate BaMMV-ASL1 (Timpe and Kühne 1994; Habekuss et al. 2008). The presence of virus particles was assessed by double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) according to Clark and Adams (1977). Phenotyping for BaMMV resistance was also conducted in field trials under natural infection conditions at two infested fields (Schladen/Lower Saxony and Morgenrot/Saxony-Anhalt). Twenty plants per RIL were grown in double rows of 10 plants each in two replications. The experimental design contained negative (resistant cultivars Tokyo and Carola carrying resistance genes *rym5* and *rym4*, respectively) and positive controls (susceptible cvs. Uschi and Maris Otter) for monitoring infection.

Marker saturation

Marker saturation of the *rym11* target interval relied on publicly available marker resources. These included SSR (simple sequence repeat) and SNP (single nucleotide polymorphism) markers from published barley genetic maps (Ramsay et al. 2000; Hearnden et al. 2007; Varshney et al. 2007; Close et al. 2009; Stein et al. 2007; Sato et al. 2009; Table 1). Potential markers were amplified on DNA from the parental genotypes of the mapping population and subjected to amplicon sequencing on an ABI377XL sequencer using BigDye terminator sequencing chemistry (ABI Perkin Elmer, Weiterstadt, Germany). For the determination of polymorphisms, sequences were analysed by the help of the software Sequencher v4.9 (Gene Codes, Ann Arbor, MI). Insertion/Deletion (Indel) polymorphisms were directly assayed by PCR and gel electrophoresis. Sequences carrying SNPs were either converted to cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers using NEBcutter v.2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>) and the TAIR (The Arabidopsis Information Resource) restriction tool (<http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/RestrictionMapper.pl>), or to pyrosequencing markers (PSQTM Assay Design, Biotage AB, Uppsala, Sweden). For CAPS analysis, DNA amplicons were cleaved with the respective restriction endonuclease (12 µl reaction volume, 1.25 U, 3 h at appropriate temperature according to manufacturer's instructions, Fermentas or NEB) and subsequently resolved on ethidium bromide stained 1.5 % agarose gels. Pyrosequencing was performed on a PyroMark ID system (Biotage AB) using a biotinylated M13 universal primer according to Silvar et al. (2011).

In case of SNP markers previously mapped on the basis of multiplex SNP detection platforms like the Illumina Golden Gate assay (Close et al. 2009), the underlying EST sequence information (<http://www.harvest-web.org/>) and the corresponding sequences of orthologous rice genes (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) were aligned (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey>) and primers were designed (software:

primer3; <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>; Rozen and Skaletsky 2000).

On the basis of newly developed gene-based markers, the *rym11* target region could be related to the barley genome zipper (Mayer et al. 2011) representing a synteny-informed virtual gene-order map of barley genes detected by survey sequencing of sorted barley chromosomes. For further marker saturation at the *Rym11* locus, Roche/454-survey sequences of barley chromosome 4H (Supplemental data 1) underlying the barley chromosome 4H genome zipper were utilized for primer design using the software batchprimer3 (<http://probes.pw.usda.gov/cgi-bin/batchprimer3/batchprimer3.cgi>). Polymorphisms in amplicon sequences were exploited for marker development as outlined above.

As an additional resource, a preliminary and unpublished whole-genome-shotgun (WGS) sequence assembly of barley cultivar Morex (<http://webblast.ipk-gatersleben.de/barley>; assembly1_morex_rbca) was employed for selecting larger genomic segments for individual Roche/454 reads of the chromosome 4H survey sequences (Mayer et al. 2011) (Supplemental data 1).

PCR for all newly developed markers was performed on a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). PCR for CAPS and Indel-markers (Protocol A; cf. Supplemental data 1) was set up in a 15-µl reaction including 50 ng genomic DNA, 0.6 U Taq DNA polymerase, 1× PCR reaction buffer containing 1.5 mM MgCl₂ (Qiagen, Hilden, Germany), 0.2 mM dNTPs (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), 0.2 µM of each primer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany). PCR amplification conditions were: 5 min at 94 °C, followed by 50 cycles of 30 s at 94 °C; 1 min annealing (annealing temperature was reduced by 0.5 °C/cycle from 62 to 56 °C), 1 min at 72 °C, respectively. PCR finished by 10 min at 72 °C (Silvar et al. 2012).

PCR for pyrosequencing markers (Protocol B; Supplemental data 1) was performed in a 30-µl reaction including 50 ng genomic DNA, 0.6 U AmpliTaq Gold DNA Polymerase, 1× buffer (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany), 2.0 mM MgCl₂, 0.125 mM dNTPs (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), 0.02 µM of M13-tailed F-primer and 0.2 µM each of R-primer and biotin-labeled M13 universal primer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany). PCR amplification conditions were: 15 min at 95 °C, followed by 62 cycles of 30 s at 94 °C; 30 s annealing (annealing temperature was reduced by 0.5 °C/cycle from 62 to 56 °C), 30 s at 72 °C, respectively. PCR finished by 10 min at 72 °C (Silvar et al. 2011).

Linkage analysis

Linkage analysis was performed by setting the number of recombinant gametes in relation to the number of gametes

Table 1 Polymorphism tests of the markers employed for marker saturation on the Naturel x W757-112/612 mapping population

Marker name	Marker type	Polymorphism (yes/no)	Endonuclease for CAPS assay; pyrosequencing primer	References
Bmac0030	SSR	No		1, 2
Bmac0181	SSR	Yes		1, 2, 3
Bmac0186	SSR	Yes		1, 2, 3
Bmac0298	SSR	Yes		1, 2, 3
Bmac0299	SSR	No		1, 2
Bmac0577	SSR	No		1, 2
Bmag0353	SSR	Yes		1, 2, 3
Bmag0375	SSR	No		1, 2, 3
Bmag0490	SSR	Yes		1, 2, 3
EBmac0540	SSR	No		1, 2
EBmac0669	SSR	No		1, 2
EBmac0701	SSR	Yes		1, 2, 3
EBmag0781	SSR	Yes		1, 2, 3
GBM1020	SSR	Yes		2, 3
GBMS049	SSR	Yes		2
GBMS081	SSR	Yes		2
GBS0001	SNP	No		4
GBS0023	SNP	No		4
GBS0026	SNP	No		8
GBS0081	SNP	Yes	<i>BsrG1</i>	5
GBS0177	SNP	No		4
GBS0288	SNP	No		4
GBS0434	SNP	No		4
GBS0448	SNP	No		4
GBS0461	SNP	No		4
GBS0506	SNP	Yes	<i>BsrG1</i>	4
GBS0547	SNP	No		4
GBS0589	SNP	No		4
GBS0692	SNP	Yes	InDel	4
GBS0751	SNP	No		4
GBS0887	SNP	Yes	<i>EcoR1</i>	4
HVM13	SSR	Yes		2, 3
HVM77	SSR	Yes		2, 3
POPA12_2977-1925	SNP	Yes	TGGCATTACCCCTTATTT	6
POPA12_3127-273	SNP	No		6
POPA12_3699-1543	SNP	No		6
POPA12_3716-910	SNP	No		6
POPA12_4276-1082	SNP	No		6
POPA12_7942-948	SNP	No		6
POPA12_9208-919	SNP	No		6
k00391	SNP	No		7
k00813	SNP	No		7
k00824	SNP	No		7
k01212	SNP	Yes	<i>PsyI</i>	7
k01233	SNP	No		7
k01469	SNP	Yes	InDel	7
k02125	SNP	No		7
k02164	SNP	No		7
k02539	SNP	No		7

Table 1 continued

Marker name	Marker type	Polymorphism (yes/no)	Endonuclease for CAPS assay; pyrosequencing primer	References
k02715	SNP	No		7
k02829	SNP	No		7
k03071	SNP	No		7
k03193	SNP	Yes	(not mapped)	7
k03198	SNP	Yes	(not mapped)	7
k03209	SNP	No		7
k03423	SNP	No		7
k03979	SNP	No		7
k04127	SNP	No		7
k04165	SNP	No		7
k04266	SNP	No		7
k04427	SNP	No		7
k04725	SNP	Yes	InDel	7
k04748	SNP	No		7
k04779	SNP	No		7
k06631	SNP	No		7
k06701	SNP	No		7
k06721	SNP	No		7
k06766	SNP	No		7
k07237	SNP	No		7
k07728	SNP	No		7
k07964	SNP	No		7
k08238	SNP	No		7
k08908	SNP	No		7
k09244	SNP	No		7
k09860	SNP	No		7
k09907	SNP	No		7
k09982	SNP	No		7
k10036	SNP	No		7
k10188	SNP	No		7
k10515	SNP	Yes	(not mapped)	7
k10659	SNP	Yes	<i>BfaI</i>	7
k10901	SNP	Yes	<i>DraI</i>	7

Markers originating from:
 Ramsay et al. (2000) (1),
 Varshney et al. (2007) (2),
 Hearnden et al. (2007) (3), Stein
 et al. (2007) (4), Kota et al.
 (2008) (5), Close et al. (2009)
 (6), Sato et al. (2009) (7),
 Perovic et al. (2007) (8)

analyzed (Pellio et al. 2005). To correct for those plants carrying *rym4* and those dying during the cultivation, a 'Corrected genetic resolution' for the remaining RILs was applied by dividing the % recombination identified for the F₂-generation by the number of those remaining RILs.

Testing the diagnostic value of identified markers

Closely linked markers were tested for their diagnostic value on a panel of 93 susceptible and resistant cultivars and on accessions carrying different *rym*-genes (Supplemental data 2).

Results

Construction of the high-resolution mapping population and marker saturation

Development of the high-resolution mapping population involved three subsequent steps. Initially, 1,270 F₂-plants providing a genetic resolution of 0.0394 % recombination were screened for the recombination between the flanking markers HVM03 and HVM68 and a genetic distance of 8.94 % recombination was determined. Due to the loss of plants (i.e., homozygous *rym4* or non-survival of recombinant plants) the corrected genetic resolution provided by

83 remaining RILs equalled 0.1077 % recombination (Fig. 1a).

In the aim of marker saturation at the *rym11* target region, 82 markers (Table 1) were selected from seven published genetic maps of barley (Ramsay et al. 2000; Hearnden et al. 2007; Varshney et al. 2007; Kota et al. 2008; Stein et al. 2007; Close et al. 2009; Sato et al. 2009). Twenty-five markers were polymorphic of which, 4 markers (EBmac0701, EBmag0781, GBS0081, GBS0692) mapped outside the target interval and two marker polymorphisms (k03193 and k03198) could not be reproduced in the population. The polymorphic marker k10515 has not been mapped since it co-segregated with marker k04725 in the map of the original publication and marker k01212 was later identified and only mapped at higher resolution (Fig. 1b). So, 17 markers were mapped to the target region (Table 1; Fig. 1a). Sequences of all newly mapped markers were compared to the rice genome. This revealed for the *rym11* region, a highly preserved macro-collinearity to rice chromosome 3 between genes Os03g0223400 and Os03g0327800 (Fig. 1a). On the basis of this information, an additional barley EST unigene marker (U35_15555; Table 2) with sequence similarity to Os03g0273800 was developed and mapped confirming the observed macro-collinear context between barley and rice at the *Rym11* locus. Overall, at this stage, 18 new markers were mapped reducing the *rym11* target interval to 1.72 % recombination (Fig. 1a).

In a second step, the (corrected) genetic resolution of the mapping population could be increased to 0.0481 % recombination by screening additional 1,105 F₂-plants.

Based on the cumulative 2,375 F₂-plants, a genetic distance of 10.11 % recombination was determined between markers HVM03 and HVM068; the newly established markers GBS0887, GBS0506 and k10659 could be resolved at higher genetic resolution flanking the gene *rym11* (Fig. 1b). Based on this result, further marker saturation was restricted to the region flanked by markers GBS0506 and GBS0887 (Fig. 1b). Markers from published maps and barley EST unigenes putatively orthologous to genes of the collinear region in rice (Sato et al. 2009; Table 1; Close et al. 2009; Table 2) were tested. Unigene U32_3699A (similar to Os03g0291500) was mapped proximal to *rym11* whereas k01212 (similar to Os03g0284100) mapped distal to *rym11* delimiting the flanking interval to 0.336 % recombination (Fig. 1b).

By screening additional 2,727 F₂-plants in a third step, the mapping population was further increased to altogether 5,102 F₂-plants and a genetic distance of 10.72 % recombination was determined between markers HVM03 and HVM068. Fifty-seven RILs were selected between flanking markers GBS0506 and GBS0887. Altogether, 100 RILs were detected for this respective marker interval providing a final (corrected) genetic resolution of 0.0187 % recombination. Phenotypic analysis of resistance to BaMMV both under greenhouse and field conditions showing the same results revealed the expected 1:1 segregation ratio among these RILs (52r : 48s; $\chi^2_{(1r,1s)} = 0.163$) and allowed for precise allocation of the resistance gene *rym11* to the final map (Fig. 2).

At this stage, further marker saturation was performed on the basis of information provided by the virtual gene

Fig. 1 High-resolution mapping of the gene *rym11*. **a** In phase I, genetic mapping of *rym11* was based on the analysis of 83 RILs originating from 1,270 F₂-plants. **b** In subsequent steps, the genetic resolution was further increased by extending the population to 210 RILs derived from 2,375 F₂-plants. Gene-based markers are in **bold** and their similarity to rice genes is depicted; underlined markers and rice genes indicate the genetic interval analysed and the syntenic region of interest. The similarity of k10659 to Os03g0282300 was identified via *Triticum aestivum* clone AK336063.1

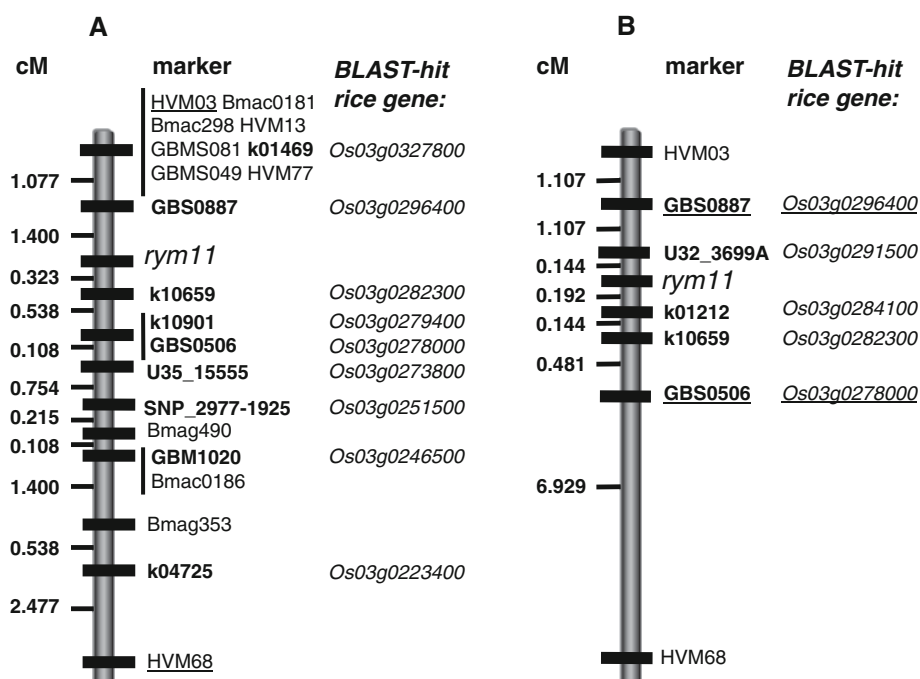


Table 2 Barley unigenes used for marker development and their homology to rice genes

Barley unigene	Chromosome	Best rice hit	<i>e</i> value
U35_13941	4H	Os03g0255200	0
U35_15555	4H	Os03g0273800	0
U35_18478	4H	Os03g0292100	0
U32_7347	4H	Os03g0286900	4,00E-45
U32_2274	4H	Os03g0283100	0
U32_3699	4H	Os03g0291500	4,00E-146
U32_2386	4H	Os03g0294200, Os05g0164100	0
U32_7942	4H	Os03g0294900, Os07g0692900, Os11g0106400	0
U32_1169	4H	Os03g0285700	0
U32_3917	4H	Os03g0285800	0
U32_7539	4H	Os03g0288300	0
U35_6623*	4H	Os03g0280400	1,00E-77
U35_13812*	4H	Os03g0177500, Os03g0177400, Os03g0178000, Os03g0177900	0
U35_5418*	4H	Os03g0288400	2,00E-128
U35_47644*	4H	Os03g0278000	0
U35_5294*	4H	Os03g0271600	0
U35_158*	4H	Os03g0276500, Os01g0840100, Os11g0703900, Os05g0460000	0

Unigenes with an asterisk were selected from the Genome zipper (Mayer et al. 2011)

order map of chromosome 4H (genome zipper; Mayer et al. 2011). Markers k01212 (similar to Os03g0284100; Bradi1g65910.1; Sb01g038820.1) and U32_3699A (similar to Bradi1g65540.1; Sb01g038460.1) delimited in the chromosome 4H genome zipper a 1.38-cM interval comprising 32 barley genes and the orthologs from rice, *Brachypodium* and/or sorghum as well as five additional barley EST-based unigenes without any identified orthologs from the above-mentioned model grass species (Supplemental data 1). Out of this information, 70 sequence-tagged site (STS) markers were amplified (data not shown). Mapping of marker sel.1167 (similar to Os03g0285100; Bradi1g65850.1) shortened further the target interval (Fig. 2, Supplemental data 1). Marker 4HL_1159A mapped outside the initial target interval and marker U35_158_255-414 was co-segregating with GBS0506 (Fig. 2). For marker U35_158, no orthologous gene was indicated in the 4H genome zipper, however, individual sequence similarity analysis identified similarity to rice gene Os03g0276500 (Table 2). All predicted open reading frames between rice and *Brachypodium* genes Os03g0288800-Os03g0287100, and Bradi1g65650.1-Bradi1g65767.1, respectively (Supplemental data 1), were compared to a draft assembly of whole genome shotgun sequence of barley cultivar 'Morex' (<http://webblast.ipk-gatersleben.de/barley>; assembly1_morex_rbca) and eight contig sequences could be identified which were employed for additional marker development. Three polymorphic markers out of 24 amplified STS could be generated with C_1030750_B mapping proximal, C_1012894_B mapping distal to *rym11*, and C_205243_B

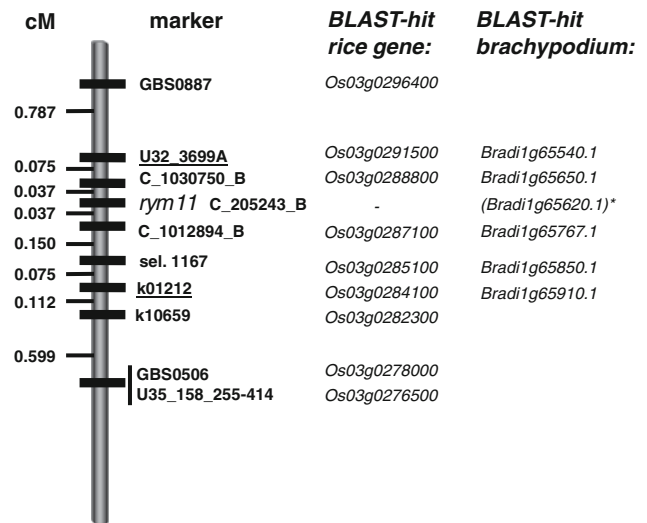


Fig. 2 High-resolution mapping of the gene *rym11*. In the final-phase genetic mapping of *rym11* was based on the analysis of RILs recombinant between GBS0887 and GBS0506. Genetic mapping of *rym11* on a set of 100 RILs providing all informative crossover events in the mapping population of 5,102 F₂-plants. Gene-based markers are in **bold** and their similarity to rice genes is depicted; underlined are markers used for confining the target interval of *rym11* in the genome zipper by Mayer et al. (2011)

co-segregating with *rym11* (Fig. 2). Mapping of C_205243_B was based on a direct size polymorphism due to a deletion in a non-coding region in close proximity to the barley unigene U35_13812 (<http://www.harvest-web.org/hweb/bin/viewsetno.wc?assembly=35&setno=13812>). This gene, according to the genome zipper, is orthologous

to Bradi1g65720.1 (Supplemental data 1) which is most likely coding for an elongation factor 1-alpha activity (cf. <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>, <http://pfam.sanger.ac.uk/>) and was, therefore, considered as a putative candidate gene. However, sequencing of this gene revealed no polymorphism in the coding region of the gene between parental lines. In addition, a test of the gene expression showed that the elongation factor 1-alpha is expressed in both parents and that there are no significant differences in the expression level (Ping Yang, pers. comm.). Nevertheless, this marker provides a starting point for positional cloning of the gene *rym11*.

Improved tool for marker-assisted selection (MAS) of *rym11*-based resistance

The exploitation of genetic resources and the efficient breeding for virus resistance requires access to closely linked or diagnostic markers. Therefore, it was analysed whether any of the newly developed markers could serve this purpose. The newly developed closely flanking markers C_1030750_B, C_1012894_B as well as the co-segregating marker C_205243_B were tested for their diagnostic value for *rym11*-based resistance in a panel of 93 recent cultivars and accessions (Supplemental data 2). Among these, only accession Russia 57 carries resistance conferred by the *Rym11* locus (Götz and Friedt 1993; Ordon et al. 1993; Bauer et al. 1997). The SNP-marker C_1012894_B revealed the same SNP as Naturel (T) on 56 barley cultivars and accessions, and on 33, the same SNP as on W757-112/612 (C) which is the donor of *rym11*. Therefore, this marker is of limited value for marker-assisted selection for *rym11*. The SNP-marker C_1030750_B is better suited as it revealed the SNP of the susceptible parent Naturel (G) in 86 accessions and only in 5 genotypes the SNP of W757-112/612 (A) indicative for *rym11*, i.e., Morex, Uschi, Bulgarien347, BCC No. 2 and No. 4. While nothing is known about the resistance genes present in BCC No. 2 and No. 4, Bulgarian 347 carries *rym9*, and Uschi and Morex are susceptible. For C_205243_B, altogether, 69 accessions and cultivars revealed the fragment of Naturel (614 bp), 21 produced a fragment of about 650 bp (including Russia 57) and 2 genotypes (susceptible cultivar Uschi, and *rym8*-donor 10,247) showed the same fragment as W757-112/612 (513 bp), leading to the conclusion that none of the markers is of absolute diagnostic value for *rym11*. However, MAS C_205243_B performed superior compared to previously available markers.

Discussion

In this paper, we describe high-resolution mapping of the recessive bymovirus resistance gene *rym11* taking

advantage of recently developed genomics resources of barley. Compared with anonymous marker technologies like AFLPs, the exploitation of dense transcript-derived marker maps (e.g., Stein et al. 2007; Sato et al. 2009; Close et al. 2009) in combination with newly acquired sequencing information (Mayer et al. 2011) led to a more straightforward and faster delimitation of the target region and the rapid development of a marker co-segregating with the resistance gene.

After the first linkage map around *rym11* had been constructed (Bauer et al. 1997), initial fine mapping of the resistance gene using RAPD, AFLP and SSR-markers was performed by Nissan-Azzouz et al. (2005) on 352 DH-lines resulting in the identification of two co-segregating AFLP and several closely linked SSR markers. These studies included markers HVM03 and HVM68 providing the basis for the construction of a high-resolution mapping population in this study. Whereas the mapping of HVM03 at 2.36 % recombination proximal to *rym11* is in good accordance with the genetic distance of HVM03 presented by Nissan-Azzouz et al. (2005), the genetic distance of HVM68 to *rym11* (7.75 % recombination) estimated in our study is almost two times larger than that in the DH mapping population of Nissan-Azzouz et al. (2005). Such variation in recombination rates between crosses is well known (Stein and Graner 2004; Langridge 2005). Even in crosses with a comparable genetic background, the recombination rate within a defined interval could vary tremendously such as shown for the calculated distances (0 vs. 13.8 cM) between the markers HVM03 and HVM68 in the map of Ramsay et al. (2000) and Hearnden et al. (2007), respectively. However, Perovic et al. (2009), in their study, came to the conclusion that such differences are not significant. Since stress factors like heat could enhance the somatic recombination rate (Lebel et al. 1993; Pecinka et al. 2009), the cultivation of a mapping population may also have an influence on the genetic map distance, bearing in mind that the temperature in a greenhouse could rise enormously during summer. In addition, a variation in recombination rates between DH and RIL mapping populations derived from the same cross was observed (He et al. 2001).

The screening of parental lines with SSR-markers from the already-published genetic maps of barley (Ramsay et al. 2000; Hearnden et al. 2007; Varshney et al. 2007) identified a fairly high degree of polymorphic markers (12 polymorphic vs. 6 monomorphic) compared to the polymorphism rate described by Nissan-Azzouz et al. (2005). One reason for this is maybe the fact that the DH lines analyzed by Nissan-Azzouz et al. (2005) derived from a cross of susceptible and resistant DH-lines derived from the same F₁, while in our case, one of these lines was crossed to an adapted European barley cultivar. While mapping of

the polymorphic SSRs was in good accordance with the map of Hearnden et al. (2007), different map positions in relation to the maps of Ramsay et al. (2000) and Varshney et al. (2007) were detected. This may be attributed to the clustering of SSRs around the centromere in the individual map of Ramsay et al. (2000), whereas the merging of individual maps into one consensus map is generally problematic (Wu et al. 2008).

The level of polymorphism identified for the already-known gene-based markers (Stein et al. 2007; Close et al. 2009; Sato et al. 2009) as well as those developed in this study is rather low compared with the polymorphism rate of the tested SSR-markers and is in contrast to the results of Stein et al. (2007) who had identified SNP-markers being more polymorphic than the SSRs. Furthermore, the frequency of <1 SNP per 1,000 bp detected for the parental lines is rather low in comparison to the SNP frequency of 1 SNP per 130 bp detected by Kota et al. (2008) or 1 SNP per 240 bp assessed by Duran et al. (2009). In addition, Silvar et al. (2012) detected a higher degree of polymorphic SNP-markers (64 polymorphic vs. 96 monomorphic) derived from Close et al. (2009) in their studies. Besides the different relatedness between the parental lines, this is maybe due to the fact that Silvar et al. (2012) tested SNPs assigned to the whole chromosome 7H for polymorphism while in the present study, only SNPs located in a short centromeric region were of interest. In centromeric regions, loci on average are less polymorphic than loci located on the rest of the chromosome (Dvořák et al. 1998) as rarely recombining haplotype blocks extend across the genetic centromeres (Comadran et al. 2010).

In the synteny-based marker saturation approach, the perfectly conserved inverted collinearity between barley chromosome 4H and rice chromosome 3 (Stein et al. 2007; Thiel et al. 2009; Shahinnia et al. 2009; Mayer et al. 2011) was successfully exploited and, furthermore, verified by mapping of k01212 (similar to Os03g0284100) proximal to k10659 (similar to Os03g0282300). This could be expected but is, however, in contrast to the map of Sato et al. (2009) which was suggesting a disturbed collinearity.

The rice genes depicted in the map-interval of Close et al. (2009) displayed also a perfect collinearity in this region as the orthologs in the much denser genome model of Mayer et al. (2011) for which the map of Close et al. (2009) provided the genetic framework. The deviating assignment of one barley 454-read and one unigene revealed by the mapping of 4HL_1159A and U35_158_255-414 outside the interval in our study does not afflict the damage to the overall value of the genome zipper for synteny-based marker saturation and is much lower than the frequency detected by Shahinnia et al. (2012). The accordance between the genome zipper gene order and the map of *rym11* elucidates that the genome zipper is a very efficient

tool for marker saturation also at high resolution, as has been already proven at lower resolution (Silvar et al. 2012). The usefulness of the genome zipper for map-based cloning will even increase in the future by integrating WGS sequencing data as shown by the contig sequence C_205243 from the Morex-assembly of the IPK Gatersleben (<http://webblast.ipk-gatersleben.de/barley>; assembly1_morex_rbca) which finally led to the development of marker C_205243_B which is co-segregating with *rym11* for 5,102 analysed F₂-plants.

Despite C_205243_B not being a functional marker (Andersen and Lübberstedt 2003), it was shown that the application of next-generation sequencing data can meet the expectations concerning a straightforward delimitation of the gene containing interval and the identification of a marker co-segregating with *rym11*. Like in previous studies (Perovic et al. 2004; Vu et al. 2010), the existence of extensive collinearity between barley and rice or *Brachypodium* was the basis for this. In addition, it was important that *rym11* is not localized in a region of suppressed recombination (Petes 2001), like it holds true for the *Rrs2* scald resistance gene of barley, for which even a mapping population of 9,179 F₂-plants was not sufficient to resolve a co-segregating area of suppressed recombination (Hanemann et al. 2009). In this respect, it has to be mentioned that according to the genetic maps (Bauer et al. 1997; Nissan-Azzouz et al. 2005) and the updated map of Künzel et al. (2000) (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/kuenzel/image6h.gif>) *rym11* is located in a region of moderately suppressed recombination rates of 5.9–8.5 Mb/cM. Nevertheless, marker saturation using the strategy described above could be successfully conducted. During this approach, the barley ortholog of Bradi1g65720.1 was identified. This elongation factor 1-alpha was regarded as the most promising candidate gene for *rym11*, as the already-isolated resistance gene *rym4/rym5* has also a translation-initiation factor activity. But the monomorphic outcome of the sequencing of the exons together with same level of gene expression identified for the parents in an expression study (Ping Yang, pers. comm.) has shown that the resistance encoded by *rym11* is not due to a loss-of-function of this gene.

Anyway, the identification of two flanking co-dominant markers comprising an interval of 0.074 % recombination, in addition to the co-segregation of C_205243_B, are providing an excellent starting point for a rapid identification of further candidate genes. Furthermore, these markers provide useful tools in marker-based breeding strategies for virus resistance (cf. Palloix and Ordon 2011), due to their close linkage to *rym11*. However, they are of limited diagnostic value (Supplemental data 2). Therefore, screening of parental lines for polymorphisms is needed for each combination.

The newly acquired genomic information of barley (Mayer et al. 2011) used in the present study was of great value for marker saturation. The presence of two different resistance genes (*rym11* and *rym4*) harbored by the two parents was entailed with the peril of false-negative outcomes regarding the virus-testing for a *rym11*-conferred resistance. But by an additional selection step, individuals with a *rym4*-conferred resistance were easily separated from the mapping population. Such an approach was beforehand successfully done in the study of Werner et al. (2003) and despite this additional selection step, the high-resolution mapping of *rym11* was much faster and more efficient than the one for the *rym4/rym5* locus (Pellio et al. 2005). Therefore, it may be expected that, based on this resource and the further growing sequence information becoming available for barley, many major genes and QTL for traits of major agronomic importance will be isolated, helping to move breeding and trait analysis in barley to an unprecedented level of precision and productivity (Bevan and Waugh 2007). With regard to *rym11*, a BAC contig harboring this gene has been identified meanwhile and gene isolation and functional analyses is in progress.

Acknowledgments The authors thank Karin Ernst and Dörte Grau (JKI) for excellent technical assistance and Susanne König (IPK) for sequencing service. Furthermore, we thank the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) for funding this project (FKZ 0314000D) within the BARLEX project.

References

- Andersen JR, Lübberstedt T (2003) Functional markers in plants. *Trends Plant Sci* 8:554–560
- Bauer E, Weyen J, Schiemann A, Graner A, Ordon F (1997) Molecular mapping of novel resistance genes against barley mild mosaic virus (BMMV). *Theor Appl Genet* 95:1263–1269
- Bevan M, Waugh R (2007) Meeting report: applying plant genomics to crop improvement. *Genome Biol* 8:302
- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34:475–483
- Close TJ, Bhat PR, Lonardi S, Wu Y, Rostoks N et al (2009) Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics* 10:582
- Comadran J, Ramsay L, MacKenzie K, Hayes P, Close TJ, Muehlbauer G, Stein N, Waugh R (2010) Patterns of polymorphism and linkage disequilibrium in cultivated barley. *Theor Appl Genet* 122:523–531
- Dorokhov DB, Klocke E (1997) A rapid and economic technique for RAPD analysis of plant genomes. *Russ J Gen* 33:358–365
- Duran C, Appleby N, Vardy M, Imelfort M, Edwardsand D, Batley J (2009) Single nucleotide polymorphism discovery in barley using autoSNPdb. *Plant Biotechnol J* 7:326–333
- Dvorák J, Luo MC, Yang ZL (1998) Restriction fragment length polymorphism and divergence in the genomic regions of high and low recombination in self-fertilizing and cross-fertilizing aegilops species. *Genetics* 148:423–434
- Fraser RSS (1990) The genetics of resistance to plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 28:179–200
- Friedt W, Ordon F (2007) Molecular markers for gene pyramiding and disease resistance breeding in barley. In: Varshney R, Tuberosa R (eds) *Genomics assisted crop improvement*. Springer, Berlin, pp 81–101
- Friedt W, Humbroich K, Ordon F (2008) Genetic diversity of resistance against barley yellow mosaic virus complex in barley. In: *Proceedings of the 10th International barley genetics symposium*, Alexandria, Egypt, vol 6, pp 7–12
- Gottwald S, Stein N, Börner A, Sasaki T, Graner A (2004) The gibberellic-acid insensitive dwarfing gene *sdw3* of barley is located on chromosome 2HS in a region that shows high colinearity with rice chromosome 7L. *Mol Genet Genomics* 271:426–436
- Götz R, Friedt W (1993) Resistance to the barley yellow mosaic virus complex—differential genotypic reactions and genetics of BaMMV-resistance of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breeding* 111:125–131
- Graner A, Streng S, Kellermann A, Schiemann A, Bauer E, Waugh R, Pellio B, Ordon F (1999) Molecular mapping and fine structure of the *rym5* locus encoding resistance to different strains of the Barley Yellow Mosaic Virus Complex. *Theor Appl Genet* 98:285–290
- Habekuss A, Kühne T, Krämer I, Rabenstein F, Ehrig F, Ruge-Wehling B, Huth W, Ordon F (2008) Identification of barley mild mosaic virus isolates in Germany breaking *rym5* resistance. *J Phytopathol* 156:36–41
- 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
- Hariri D, Meyer M, Le Gouis J, Bahrman N, Fouchard M, Forget C, Andre A (2000) Characterisation of BaYMV and BaMMV pathotypes in France. *Eur J Plant Pathol* 106:365–372
- Hariri D, Meyer M, Prud'homme H (2003) Characterization of a new barley mild mosaic virus pathotype in France. *Eur J Plant Pathol* 109:921–928
- He P, Li JZ, Zheng XW, Shen LS, Lu CF, Chen Y, Zhu LH (2001) Comparison of molecular linkage maps and agronomic trait loci between DH and RIL populations derived from the same rice cross. *Crop Sci* 41:1240–1246
- Hearnden PR, Eckermann PJ, McMichael GL, Hayden MJ, Eglinton JK, Chalmers KJ (2007) A genetic map of 1,000 SSR and DArT markers in a wide barley cross. *Theor Appl Genet* 115:383–391
- Hofinger BJ, Russell JR, Bass CG, Baldwin T, Dos Reis M, Hedley PE, Li Y, Macaulay M, Waugh R, Hammond-Kosack KE, Kanyuka K (2011) An exceptionally high nucleotide and haplotype diversity and a signature of positive selection for the eIF4E resistance gene in barley are revealed by allele mining and phylogenetic analyses of natural populations. *Mol Ecol*. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05201.x
- Huth W (1991) Verbreitung der Gelbmosaikvirose BaYMV, BaMMV, und BaYMV-2 und Screening von Gerstensorten auf Resistenz gegenüber BaYMV-2. *Nachrichtenbl Deut Pflanzenschutzd* 43:233–237
- 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. *Theor Appl Genet* 124:577–583
- Kanyuka K, Ward E, Adams MJ (2003) *Polymyxa graminis* and the cereal viruses it transmits: a research challenge. *Mol Plant Pathol* 4:393–406
- Kanyuka K, McGrann G, Alhudaib K, Hariri D, Adams MJ (2004) Biological and sequence analysis of a novel European isolate of

- Barley mild mosaic virus* that overcomes the barley *rym5* resistance gene. Arch Virol 149:1469–1480
- Kanyuka K, Druka A, Caldwell DG, Tymon A, McCallum N, Waugh R, Adams MJ (2005) Evidence that the recessive bymovirus resistance locus *rym4* in barley corresponds to the eukaryotic translation initiation factor 4E gene. Mol Plant Pathol 6:449–458
- Kota R, Varshney RK, Prasad M, Zhang H, Stein N, Graner A (2008) EST-derived single nucleotide polymorphism markers for assembling genetic and physical maps of the barley genome. Funct Integr Genomics 8:223–233
- Kühne T (2009) Soil-borne viruses affecting cereals: known for long but still a threat. Virus Res 141:174–183
- Künzel G, Korzun L, Meister A (2000) Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. Genetics 154:397–412
- Langridge P (2005) Molecular breeding of wheat and barley. In: Tuberosa R, Phillips RL, Gale M (eds) In the wake of the double helix: from the green revolution to the gene revolution. Avenue media, Bologna, pp 279–286
- Lebel EG, Masson J, Bogucki A, Paszkowski J (1993) Stress-induced intrachromosomal recombination in plant somatic cells. Proc Natl Acad Sci USA 90:422–426
- López-Moya JJ, Garcia JA (2008) Potyviruses. In: Mahy BWJ, van Regenmortel M (eds) Encyclopedia of virology, 3rd edn. Elsevier, Oxford, pp 313–322
- Maule AJ, Caranta C, Boulton MI (2007) Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. Mol Plant Pathol 8:223–231
- Mayer KFX, Martis M, Hedley PE, Kimková H, Liu H, Morris JA, Steuernagel B, Taudien S, Roessner S, Gundlach H, Kubaláková M, Suchánková 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, Doležel J, Waugh R, Stein N (2011) Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. Plant Cell 23:1249–1263
- Nissan-Azzouz F, Graner A, Friedt W, Ordon F (2005) Fine-mapping of the BaMMV, BaYMV-1 and BaYMV-2 resistance of barley (*Hordeum vulgare*) accession PI1963. Theor Appl Genet 110:212–218
- Ordon F, Götz R, Friedt W (1993) Genetic stocks resistant to barley yellow mosaic viruses (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) in Germany. Barley Genet Newsl 22:46–49
- Ordon F, Friedt W, Scheurer K, Pello B, Werner K, Neuhaus G, Huth W, Habekuss A, Graner A (2004) Molecular markers in breeding for virus resistance in barley. J Appl Genet 45:145–159
- Palloix A, Ordon F (2011) Advanced breeding for virus resistance in plants. In: Caranta C, Aranda MA, Tepfer M, Lopez-Moya JJ (eds) Recent advances in plant virology. Caister Academic Press, UK, pp 195–218
- Pecinka A, Rosa M, Schikora A, Berlinger M, Hirt H, Luschnig C, Mittelsten Scheid O (2009) Transgenerational stress memory is not a general response in Arabidopsis. PLoS One 4:5202
- Pello 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.). Theor Appl Genet 110:283–293
- Perovic D, Stein N, Zhang H, Drescher A, Prasad M, Kota R, Kopahnke D, Graner A (2004) An integrated approach for comparative mapping in rice and barley with special reference to the *Rph16* resistance locus. Funct Integr Genomics 4:74–83
- Perovic D, Tiffin P, Douchkov D, Bäumlein H, Graner A (2007) An integrated approach for the comparative analysis of a multigene family: the nicotianamine synthase genes of barley. Funct Integr Genomics 7:169–179
- Perovic D, Zorić D, Milovanović M, Prodanović S, Yan Y, Janković S, Šurlan-Momirović G (2009) Hordein gene dose effects in triploid endosperm of barley (*Hordeum vulgare* L.). Genetika 41:271–287
- Petes TD (2001) Meiotic recombination hot spots and cold spots. Nat Rev Genet 2:360–369
- Provvidenti R, Hampton RO (1992) Sources of resistance to viruses in the Potyviridae. Arch Virol Suppl 5:189–211
- Ramsay L, Macaulay M, degli Ivanisovich S, MacLean K, Cardle L, Fuller J, Edwards KJ, Tuveson S, Morgante M, Massari A, Maestri E, Marmiroli N, Sjakste T, Ganai M, Powell W, Waugh R (2000) A simple sequence repeat-based linkage map of barley. Genetics 156:1997–2005
- Revers F, Le Gall OT, Candresse T, Maule AJ (1999) New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. Mol Plant Microbe Interact 12:367–376
- Robaglia C, Caranta C (2006) Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. Trends Plant Sci 11:40–45
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, pp 365–386
- Ruge B, Linz A, Pickering R, Proeseler G, Greif P, Wehling P (2003) Mapping of *Rym14Hb*, a gene introgressed from *Hordeum bulbosum* and conferring resistance to BaMMV and BaYMV in barley. Theor Appl Genet 107:965–971
- Ruge-Wehling B, Linz A, Habekuß A, Wehling P (2006) Mapping of *Rym16* (Hb), the second soil-borne virus-resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum*. Theor Appl Genet 113:867–873
- Sato K, Nankaku N, Takeda K (2009) A high-density transcript linkage map of barley derived from a single population. Heredity 103:110–117
- Shahinnia F, Sayed-Tabatabaei BE, Sato K, Pourkheirandish M, Komatsuda T (2009) Mapping of QTL for intermedium spike on barley chromosome 4H using EST-based markers. Breeding Sci 59:383–390
- Shahinnia F, Druka A, Franckowiak J, Morgante M, Robbie Waugh R, Stein N (2012) High resolution mapping of Dense spike-ar (*dsp.ar*) to the genetic centromere of barley chromosome 7H. Theor Appl Genet 124:373–384
- Silvar C, Perovic D, Casas AM, Igartua E, Ordon F (2011) Development of a cost-effective pyrosequencing approach for SNP genotyping in barley. Plant Breeding 130:394–397
- Silvar C, Perovic D, Scholz U, Casas AM, Igartua E, Ordon F (2012) Fine mapping and comparative genomics integration of two quantitative trait loci controlling resistance to powdery mildew in a Spanish barley landrace. Theor Appl Genet 124:49–62
- Smilde WD, Haluskova J, Sasaki T, Graner A (2001) New evidence for the synteny of rice chromosome 1 and barley chromosome 3H from rice expressed sequence tags. Genome 44:361–367
- Stein N, Graner A (2004) Map based gene isolation in cereal genomes. In: Gupta PK, Varshney RK (eds) Cereal genomics. Kluwer, Dordrecht, pp 331–360
- Stein N, Herren G, Keller B (2001) A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large genome species such as *Triticum aestivum*. Plant Breed 120:354–356
- Stein N, Perovic D, Kumlehn J, Pello 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 J 42:912–922
- Stein N, Prasad M, Scholz U, Thiel T, Zhang H, Wolf M, Kota R, Varshney RK, Perovic D, Graner A (2007) A 1000 loci transcript

- map of the barley Genome—new anchoring points for integrative grass genomics. *Theor Appl Genet* 114:823–839
- 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 Evol Biol* 9:209
- Thieme R, Rakosy-Tican E, Gavrilenko T, Antonova O, Schubert J, Nachtigall M, Heimbach U, Thieme T (2008) Novel somatic hybrids (*Solanum tuberosum* L. + *Solanum tarnii*) and their fertile BC₁ progenies express extreme resistance to potato virus Y and late blight. *Theor Appl Genet* 116:691–700
- Timpe U, Kühne T (1994) The complete nucleotide sequence of RNA2 of barley mild mosaic virus (BaMMV). *Eur J Plant Pathol* 100:233–241
- Varshney RK, Marcel TC, Ramsay L, Russell J, Röder MS, Stein N, Waugh R, Langridge P, Nix RE, Graner A (2007) A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theor Appl Genet* 114:1091–1103
- Vu GTH, Wicker T, Buchmann JP, Chandler PM, Matsumoto T, Graner A, Stein N (2010) Fine mapping and syntenic integration of the semi-dwarfing gene *sdw3* of barley. *Funct Integr Genomics* 10:509–521
- Wang ML, Barkley NA, Jenkins TM (2009) Microsatellite markers in plants and insects. Part I: applications of biotechnology. *Genes Genomes Genomics* 3:54–67
- Werner K, Friedt W, Laubach E, Waugh R, Ordon F (2003) Dissection of resistance to soil-borne yellow-mosaic-inducing viruses of barley (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) in a complex breeders' cross by means of SSRs and simultaneous mapping of BaYMV/BaYMV-2 resistance of var. 'Chikurin Ibaraki 1'. *Theor Appl Genet* 106:1425–1432
- Wu Y, Close TJ, Lonardi S (2008) On the accurate construction of consensus genetic maps. *Comput Syst Bioinformatics Conf* 7:285–296
- Yeam I, Cavatorta JR, Ripoll DR, Kang BC, Jahn MM (2007) Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants. *Plant Cell* 19:2913–2928

2.2. High resolution mapping of the barley *Ryd3* locus controlling tolerance to BYDV

Thomas Lüpken¹, Nils Stein², Dragan Perovic¹, Antje Habekuß¹, Albrecht Serfling¹, Ilona Krämer¹, Urs Hähnel², Burkhard Steuernagel², Uwe Scholz², Ruvini Ariyadasa², Mihaela Martis³, Klaus Mayer³, Rients E. Niks⁴, Nicholas C. Collins⁵, Wolfgang Friedt⁶, Frank Ordon^{1,7}

¹Julius Kuehn-Institute (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Resistance Research and Stress Tolerance, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg, Germany

²Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Corrensstr. 3, 06466 Stadt Seeland (OT) Gatersleben, Germany

³Munich Information Center for Protein Sequences/Institute of Bioinformatics and Systems Biology (MIPS/IBIS), Institute for Bioinformatics and Systems Biology, Helmholtz Center Munich, 85764 Neuherberg, Germany

⁴Department of Plant Breeding, Graduate School of Experimental Plant Sciences, Wageningen University, P.O. Box 386, 6700 Wageningen, The Netherlands

⁵Australian Centre for Plant Functional Genomics, School of Agriculture, Food and Wine, University of Adelaide, Glen Osmond, SA 5064, Australia

⁶Institute of Crop Science and Plant Breeding I, Justus-Liebig-University, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen, Germany

⁷Corresponding author, E-mail: frank.ordon@jki.bund.de

High-resolution mapping of the barley *Ryd3* locus controlling tolerance to BYDV

Thomas Lüpken · Nils Stein · Dragan Perovic · Antje Habekuß · Albrecht Serfling · Ilona Krämer · Urs Hähnel · Burkhard Steuernagel · Uwe Scholz · Ruvini Ariyadasa · Mihaela Martis · Klaus Mayer · Rients E. Niks · Nicholas C. Collins · Wolfgang Friedt · Frank Ordon

Received: 12 May 2013 / Accepted: 23 September 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract Barley yellow dwarf disease (BYD) is transmitted by aphids and is caused by different strains of *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) and *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV). Economically it is one of the most important diseases of cereals worldwide. Besides chemical control of the vector, growing of tolerant/resistant cultivars is an effective way of protecting crops against BYD. The *Ryd3* gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) confers tolerance to BYDV-PAV and BYDV-MAV and the locus was previously mapped on the short arm of barley

chromosome 6H near the centromere. We applied a strategy for high-resolution mapping and marker saturation at the *Ryd3* locus by exploiting recent genomic tools available in barley. In a population of 3,210 F2 plants, 14 tightly linked markers were identified, including 10 that co-segregated with *Ryd3*. The centromeric region where *Ryd3* is located suffers suppressed recombination or reduced recombination rate, suggesting potential problems in achieving (1) map-based cloning of *Ryd3* and (2) marker selection of the resistance in breeding programmes without the introduction of undesirable traits via linkage drag.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11032-013-9966-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

T. Lüpken · D. Perovic · A. Habekuß · A. Serfling · I. Krämer · F. Ordon (✉)
Julius Kühn-Institute (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Resistance Research and Stress Tolerance, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg, Germany
e-mail: frank.ordon@jki.bund.de

N. Stein · U. Hähnel · B. Steuernagel · U. Scholz · R. Ariyadasa
Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Corrensstr. 3, 06466 Stadt Seeland (OT) Gatersleben, Germany

M. Martis · K. Mayer
Munich Information Center for Protein Sequences/
Institute of Bioinformatics and Systems Biology (MIPS/IBIS), Institute for Bioinformatics and Systems Biology, Helmholtz Center Munich, 85764 Neuherberg, Germany

R. E. Niks
Department of Plant Breeding, Graduate School of Experimental Plant Sciences, Wageningen University, P.O. Box 386, 6700 Wageningen, The Netherlands

N. C. Collins
Australian Centre for Plant Functional Genomics, School of Agriculture, Food and Wine, University of Adelaide, Glen Osmond, SA 5064, Australia

W. Friedt
Institute of Crop Science and Plant Breeding I, Justus-Liebig-University, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen, Germany

Keywords *Hordeum vulgare* L. · High-resolution mapping · Map-based cloning · *Ryd3* · Barley yellow dwarf virus

Introduction

Symptoms of barley yellow dwarf disease (BYD) include stunting, chlorosis, and reduced tiller fertility. Since the symptoms were first described in oat by Galloway and Southword (1890), BYD has arguably become recognized as the most economically damaging virus disease of cereals worldwide (Lister and Ranieri 1995). The suite of viruses causing the disease, originally referred to as *Barley yellow dwarf virus* (BYDV; Oswald and Houston 1951), have undergone further classification, and include members of the genera *Luteovirus* (BYDV-PAV, BYDV-MAV, BYDV-PAS) and *Polerovirus* (*Cereal yellow dwarf virus*; CYDV-RPV, CYDV-RPS), and some still unassigned viruses (BYDV-GAV, BYDV-GPV, BYDV-RMV, BYDV-SGV; Domier 2008). These viruses are persistently transmitted by aphids, with *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae* being the vectors of one of the most prevalent species, BYDV-PAV (Domier 2008). With global warming, the aphid vectors are expected to show prolonged flight activity during the year (Swaminathan 2011), a switch from the holocyclic to the anholocyclic life-cycle (Habekuß et al. 2009; Strazynski et al. 2011) and accelerated reproduction (Yamamura and Kiritani 1998)—changes that are expected to make BYD an even bigger threat in the future. The use of insecticide-treated seeds, as well as insecticides applied to the crop at critical periods, can reduce aphid infestation (Kennedy and Connery 2011) but is undesirable on environmental grounds. Breeding of tolerant or resistant cultivars is therefore of major importance.

In barley (*Hordeum vulgare* L.), loci conferring tolerance/resistance to BYD have been identified by quantitative trait locus mapping (Toojinda et al. 2000; Scheurer et al. 2001), and there are also several sources of strong monogenic tolerance/resistance known, such as the *Ryd2* gene identified in a number of Ethiopian landraces (Rasmusson and Schaller 1959; Damsteegt and Bruehl 1964; Schaller et al. 1963, 1964). This locus is putatively multiallelic (Catherall et al. 1970; Chalhoub et al. 1995) and maps close to the centromere on the long arm of chromosome 3H

(Schaller et al. 1964; Collins et al. 1996). Several alleles in barley cultivars have conferred tolerance/resistance against BYDV-PAV and BYDV-MAV—the most common BYD-virus species worldwide (Domier 2008)—for several decades, but are largely ineffective against most CYDV-RPV isolates (Skaria et al. 1985; Banks et al. 1992). Furthermore, *Ryd2* effectiveness may depend on genetic background (Jones and Catherall 1970; Schaller 1984). Despite having some limitations, *Ryd2* has provided useful levels of resistance/tolerance in barley cultivars over several decades (Burnett et al. 1995).

More recently, the *Ryd3* gene was identified in an Ethiopian barley (landrace L94 = C.I. 11797). It is effective against BYDV-PAV and BYDV-MAV, and has been mapped to the centromeric region of barley chromosome 6H (Niks et al. 2004). A genotype combining *Ryd2* and *Ryd3* tested against a German strain of BYDV (Riedel et al. 2011) resulted in quantitative resistance instead of a tolerance, i.e. a lower virus titre compared to those lines with only one of these genes. This combination is also present in the commercial cultivar Laural (Sayed et al. 2006). Another resistance gene, *Ryd4^{Hb}*, was identified on a distal region of the long arm of *Hordeum bulbosum* chromosome 3H. When introgressed into cultivated barley (*H. vulgare*), it can confer complete resistance, but close linkage to a growth-depressing gene may hamper its deployment in breeding (Scholz et al. 2009).

So far no BYDV tolerance/resistance gene has been isolated and for this reason nothing is known about their molecular structure and function. To gather such information, map-based cloning of the underlying genes would be required (Stein and Graner 2004; Stein et al. 2005). Today, there are many genomic resources available to assist positional cloning in barley, such as detailed genetic maps (e.g. Hearnden et al. 2007; Varshney et al. 2007; Stein et al. 2007; Sato et al. 2009; Close et al. 2009; Comadran et al. 2012), a synteny-informed virtual linear gene-order map (“Genome Zipper”; Mayer et al. 2011) as well as a sequence-substantiated physical map (The International Barley Genome Sequencing Consortium 2012). To work towards the map-based isolation of *Ryd3*, we performed high-resolution mapping and marker generation at the *Ryd3* locus using new genomics resources of barley. New markers were developed and their utility for breeding programs was also tested.

Materials and methods

Plant material and construction of a high-resolution mapping population

For high-resolution mapping of the *Ryd3* locus a mapping population of 3,210 F2 individuals was constructed, based on a cross between the *Ryd3*-carrying Ethiopian accession L94 and the near-isogenic line L94-QTL3 (*ryd3*, Niks et al. 2004). The latter carries a chromosome 6H fragment from the Dutch cultivar Vada (carrying the *ryd3*-susceptibility allele) substituted into the L94 background (van Berloo et al. 2001).

For DNA isolation, plants were grown in 96-Quick-Pot trays, leaves harvested and processed at the two-leaf stage by using a 96-deep-well leaf crusher (Thieme et al. 2008), and subjected to semi-automatic DNA extraction by the method of Dorokhov and Klocke (1997). To identify plants carrying a recombination event in the target interval, F2 plants were analysed by co-dominant simple sequence repeat (SSR) markers GMS006 and GBM1063 which flank *Ryd3* (T. Marcel, personal communication). Marker fragments were analysed using fluorescence detection on a CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman-Coulter). Those F2 plants carrying a recombination event within the target interval were allowed to self-pollinate and the seed harvested. For each heterozygous recombinant F2 plant, 12 F3 plants were analysed with the same SSR markers in order to identify segmental homozygous recombinant inbred lines (RILs; cf. Lüpken et al. 2013). DNA of recombinant RILs was extracted from homozygous recombinant F3 plants according to Stein et al. (2001) and seeds harvested for phenotyping in the next generation.

BYDV tolerance assays on mapping lines

Tolerance tests on the selected homozygous recombinant RILs were conducted in the field in Quedlinburg, Saxony-Anhalt (JKI), Germany, during 2009, 2010 and 2011. For each recombinant, 20 F4 individuals were sown in the greenhouse and artificially infested by viruliferous aphids (virus isolate BYDV-PAV-ASL-1; ca. 10 adult *Rhopalosiphum padi* per plant) in the one-leaf stage (cf. Riedel et al. 2011). After an inoculation period of 5 days the aphids were killed using an insecticide and the plants were transferred

into a gauze cage in the field for keeping out insects. The RILs were arranged in a randomised block design with two replications (2×10 plants per RIL) in 2009 and 2010 and one replication in 2011. For each RIL, non-infected control plants were simultaneously cultivated in a separate greenhouse and transferred into the same gauze cage in a randomised block design with two replications (2×10 plants per RIL). Parental lines were also included, two inoculated and control replicates for each, in each year. Additional BYDV infection was prevented by regular spraying with insecticides.

For assessing the level of tolerance, plant height, number of fertile ears per plant, grain yield per plant and thousand-kernel weight was determined. In addition to this, visual scoring of the symptoms on a 1 (minimum) to 9 (maximum) scale was conducted at the end of tillering. The level of tolerance was estimated in percent based on the performance of each RIL relative to its uninfected control (infected/non-infected) $\times 100$ [%]; (Scheurer et al. 2001).

Statistical analysis

For the statistical analyses of the effect of *Ryd3*, the homozygous recombinant RILs were assigned to two groups: group A showing the resistance-associated (L94) allele of the *Ryd3*-co-segregating marker U35_16315_345-563 and group B showing the susceptibility-associated allele of this marker. Each RIL of one group was regarded as a replication of the respective group in a one-way analysis of variance performed on the phenotype traits in SAS software v9.3 (<http://www.sas.com/software/sas9/>). Multiple comparison of means ($\alpha = 0.05$) was performed using the Tukey test.

Marker generation

Markers mapped in the set of recombinants were accessed from several published sources (Ramsay et al. 2000; Hearnden et al. 2007; Varshney et al. 2007; Marcel et al. 2007) and included those previously identified by Niks et al. (2004) as co-segregating with *Ryd3*. Gene-based markers were also selected from a published transcript map (Stein et al. 2007; Table 1). Primers were obtained from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) and gene fragments were PCR-

amplified from the parents and sequenced on an ABIPrism 377xl. Sequence polymorphisms [single nucleotide polymorphisms (SNPs) or insertion/deletions (indels)] were identified by using Sequencher software v4.9 (Gene Codes, Ann Arbor, MI) and discriminating restriction sites identified using NEBcutter v2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>) and the no longer available TAIR (The Arabidopsis Information Resource) restriction tool (<http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/RestrictionMapper.pl>). Polymorphisms were used for development of CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) assays, and after 3 h digestion (12 µl reaction volume, 1.25 U of restriction endonuclease from Fermentas or NEB) PCR products were separated on 1.5 % agarose gels stained with ethidium bromide. If no restriction enzyme could be applied, SNPs were converted into pyrosequencing markers (PSQTM Assay Design, Biotage AB, Uppsala, Sweden) and a pyrosequencing assay was performed on a PyroMark ID system (Biotage AB) using a biotin-labelled M13 universal primer (Silvar et al. 2011).

The anchoring of the *Ryd3* map to the barley map of Close et al. (2009) by closely linked gene-based markers provided access to another source of previously mapped genes. The underlying expressed sequence tag (EST) unigene sequences (<http://www.harvest-web.org/>) of the BOPA markers (Close et al. 2009) and the corresponding sequences of orthologous rice genes (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) were aligned (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey>), and primers were designed based on the barley ESTs by using Primer 3 software (version 0.4.0; <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>; Rozen and Skaletsky 2000).

PCR reactions were performed in a GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Protocols for scoring CAPS, indel or pyrosequencing markers were as described by Silvar et al. (2012) and Perovic et al. (2013).

After selecting barley unigenes representing putatively orthologous genes of the conserved syntenic region of rice chromosome Os02 from the map of Close et al. (2009; Table 2), the genetic map of *Ryd3* was anchored to the virtual linear gene-order map of barley (Mayer et al. 2011) by identifying the corresponding orthologues of new flanking gene-based markers. Further marker generation then focussed on the exploitation of accessed barley

EST sequences in the same way as mentioned before (Table 2).

In a further strategy, tolerant and non-tolerant bulks each consisting of eight RILs with recombination close to *Ryd3* were used to identify Diversity Arrays Technology (DarT) markers closely linked to *Ryd3* (Triticarte Ltd., <http://www.diversityarrays.com>).

Linkage analysis

Linkage analysis was performed by setting the number of recombinant gametes in relation to the number of gametes analyzed (Pellio et al. 2005). To correct for plants that died during cultivation, a 'corrected genetic resolution' for the remaining RILs was applied by dividing the percentage recombination identified for the F2 generation by the number of remaining RILs (Lüpken et al. 2013).

Testing the diagnostic value of new markers for the *Ryd3* gene

Markers from the *Ryd3* region were tested for their diagnostic value on a panel of 33 cultivars and accessions of known *Ryd2* and *Ryd3* status (Supplemental Table 1). DNA of the lines was extracted from young seedlings. Seeds were kindly supplied by Brett Lobsey and Greg Grimes at the Australian Winter Cereals Collection at Tamworth, NSW, Australia Harold Bockelman at the Barley Genetic Stock Collection at Aberdeen, ID, USA and by German plant breeding companies. *Ryd2* and *Ryd3* allele status of the genotypes (Supplemental Table 1) was determined using a range of information (data not shown), including variety pedigrees and published studies (Rasmusson and Schaller 1959; Schaller et al. 1963, 1964, 1973; Damsteegt and Bruehl 1964; Schaller and Chim 1969; Huth 1993; Ovesná et al. 2000; Habekuß 2012), results of BYDV resistance assays performed on selected genotypes using the RNA dot-blot hybridisation procedure of Arundel et al. (1988) and scores for the *Ryd2*-linked marker *Ylp* (Ford et al. 1998). The *Ylp* marker has been found to be diagnostic for *Ryd2* among a collection of cultivars (Paltridge 1998; Ovesná et al. 2000) and Ethiopian landraces (N. Collins, unpublished data).

Table 1 Markers analysed for polymorphism on the L94 × L94-QTL3 mapping population. Markers originate from maps of Ramsay et al. (2000) (1), Varshney et al. (2007) (2), Hearnden et al. (2007) (3), Stein et al. (2007) (4), Marcel et al. (2007) (5), Close et al. (2009) (6), Perovic personal communication (7) and Niks et al. (2004) (8)

Markername	Marker type	Polymorphic	Endonuclease for CAPS assay	Reference
Bmac0018	SSR	Yes		1, 2, 3, 8
Bmag0009	SSR	Yes		1, 2, 3, 8
Bmag0173 ^a	SSR	Yes		1, 2, 3
GBM1063 ^b	EST-SSR	Yes		2
GBM5012	EST-SSR	No		2
GBMS083	SSR	No		2
GBMS107	SSR	Yes		2
GBMS121	SSR	No		2
GBMS135	SSR	Yes		2
GBMS178	SSR	Yes		2
GBMS201	SSR	No		2
GMS006 ^b	SSR	Yes		2
HVM14	SSR	Yes		2, 8
HVM22	SSR	Yes		2, 8
HVM74	SSR	Yes		2, 3, 8
GBS0136	SNP	No		4
GBS0157 ^a	SNP	Yes	<i>AccI</i>	4
GBS0468	SNP	No		4
GBS0655	SNP	Yes	<i>HpyF10VI (MwoI)</i>	4
WBE201	SNP	Yes	<i>MboII</i>	5
1041-1441	SNP	No		6
2041-1317	SNP	No		6
ABC04676-1-1-59	SNP	No		6
5873-880	SNP	No		6
4488-514	SNP	No		6
ABC02895-1-4-231	SNP	No		6
2298-1526	SNP	No		6
ConsensusGBS0325-1	SNP	No		6
GBR0176_s478/as908 ^a	SNP	Yes	<i>TaaI</i>	7
GBR0458_s367/as 612	SNP	No		7
GBR0504_s478/as635 ^a	SNP	Yes	<i>MvaI (BstNI)</i>	7
GBR1597_s113/as264	SNP	No		7
GBR1597_s390/as551	SNP	No		7

^a Markers mapped outside the target interval

^b Initial flanking marker

Results

Construction of the high-resolution mapping population and marker generation

Initially, 183 recombinants for the *Ryd3* chromosome region were selected from a population of 1,629 L94 × L94-QTL3 F2 plants, by screening with the *Ryd3* flanking markers GMS006 and GBM1063. BYD tolerance assays were performed on F4 families

homozygous for the respective recombinant chromosomes and were able to clearly show whether each recombinant chromosome carried the *Ryd3* tolerance or susceptibility allele (see subsequent Results section). *Ryd3* could therefore be mapped as a Mendelian locus. Scoring the recombinants for some additional markers enabled the establishment of a smaller marker interval for *Ryd3*, between the CAPS markers GBS0655 and WBE201 (2.44 vs. 7.31 cM for GMS006–GBM1063). GBS0655 and WBE201 were

Table 2 Details of barley genes surveyed for polymorphism in the L94 × L94-QTL3 mapping population, requiring primer design and sequencing from the parents. Details of markers developed from polymorphisms are also shown. The first six markers were developed from barley unigenes (assembly 35) indicated in a map by Close et al. (2009) whereas the next nine markers originate from barley unigenes clustering at 55.36 cM in an early version of the Genome Zipper of Mayer et al. (2011). The last marker is a converted DArT marker, identified by pooling tolerant and susceptible RILs, respectively

Marker name ^a	Marker type	Forward primer	Reverse primer	Polymorphic	Pryosequencing primer or endonuclease for CAPS assay	PCR protocol	Putative rice orthologue
U35_03909_237-381	SNP	GTGATGAGACCGGGCAA	TGCCACTGTTGAGCAAAAAG	No			<i>Os02g0541700</i>
U35_23234_114-532	SNP	GCAACTCTGCAAGAACACCA	CGCCTGAACCACACAACC	No			<i>Os02g0573200</i>
U35_17493_592-897	SNP	TCATTTGCTCCCGGTCTTAC	GCCGGTTTCCTTTGATAGC	Yes	<i>BseNI (BsrI)</i>	B	<i>Os02g0586800</i>
U35_00006_439-811	SNP	ATCCACAAGGCTCGACATCT	CTTCACCAACCAGCCAAAAA	No			<i>Os02g0591700</i>
U35_02578_540-712	SNP	AACCATCTGAAAGGGTCACG	TGGTCATCCACAATGGAGAA	Yes	<i>MboII</i>	B	<i>Os02g0591800</i>
U35_13709_pyro	SNP	ACGCTTCAGAGAAAGTGAT	CTGAGCCCCATTCTAATT ^b	Yes	<i>GGCGCTTCTCATATCC</i>	A	<i>Os02g0611200</i>
U35_15036_138-346	SNP	GACGAACCGTCTCCTCTCAC	CGGCCTCGAGGTTATCATAG	No			<i>Os02g0229000</i>
U35_26292_328-611	SNP	CTCACCCGACGACTACCATC	GTCTGAGGCCAGCTTATTG	No			<i>Os02g0537500</i>
U35_06916_846-1015	SNP	CTAGGGTCCGGAAACTTCAA	TGCCTGCTGAAGACTAGCAA	No			<i>Os02g0538900</i>
U35_23379_436	SNP	CGAGTTTGGTGTGCAAAAAGA	CAAATGGACCAGCCTGAAAT	No			<i>Os02g0539600</i>
U35_36565_246-380	SNP	GCGGGGACAAGCAGATATT	GGTCATAACCAGCGGACAGT	Yes	<i>HhaI</i>	B	<i>Os02g0543400</i>
U35_07070_66-222	SNP	TGCACCCTGGCATACTACT	ACAGGGATGCCCTCAGAATC	No			<i>Os02g0550000</i>
U35_16315_345-563	indel	CGTTGCAAAAATTGTCCTTCC	TTTGTGGGAACAACCTAACACCT	Yes	(indel)	B	<i>Os02g0572400</i>
U35_20365_208-595	SNP	GAGCTGGAGGAGGAGATGG	CGCAGATATTGCAAAAAGTGG	No			<i>Os02g0573000</i>
U35_21145_515-654	SNP	ACCGTCCACCTCAATCAAAG	CCCAGCCTTTTTCTCCTTCT	No			<i>Os02g0606100</i>
bPb-3722 ^c	SNP	CCAGTATCACCATCGCCTCT	CGGTCAGTGGGTCAAAATCT	Yes	<i>AvaII</i>	B	<i>Os06g0494100</i>

^a U_35 = assembly 35; HarvEST (<http://www.harvest-web.org/>)

^b Sequence without M13 tail

^c Converted DarT marker (<http://www.diversityarrays.com/sequences.html>)

then used to screen 1,581 additional F2 plants, leading to the identification of 60 more recombinants which were then also typed for *Ryd3*. The 183 initial recombinants included 61 recombinants for the GBS0655–WBE201 interval. The total set of 121 GBS0655–WBE201 recombinants was then used for high-resolution mapping of *Ryd3* and new molecular markers.

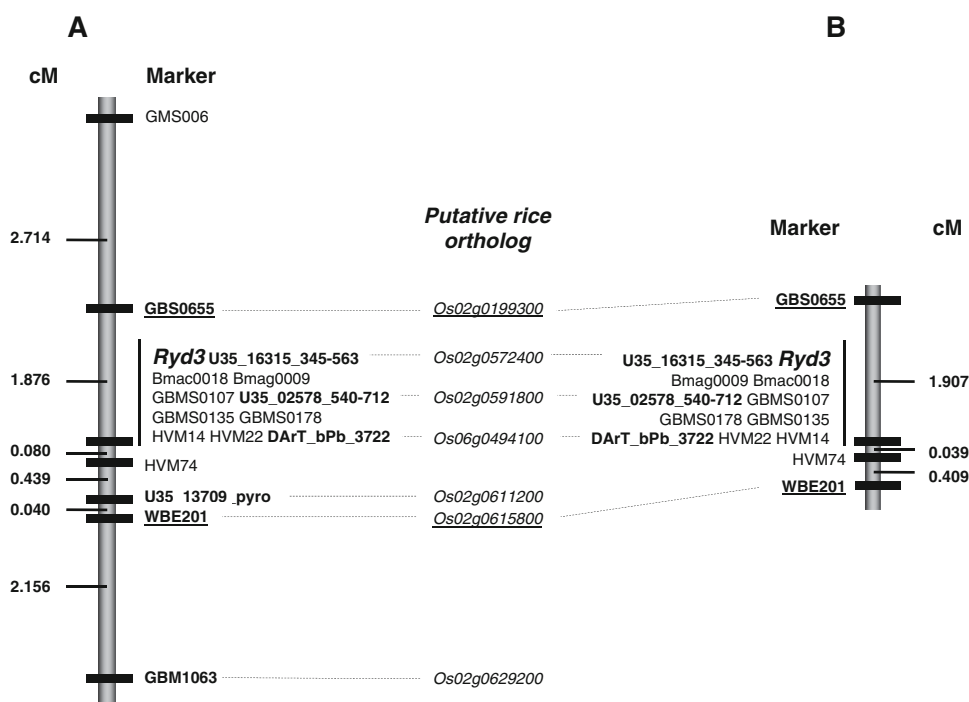
Initially, 33 previously published SSR and gene-based markers were tested (including the two first used for recombinant selection; Table 1). Of these, 14 were found to be polymorphic in the mapping population. Four of these mapped outside the GMS006–GBM1063 interval, while 10 mapped inside it (Fig. 1a). Of the SSR markers previously shown to co-segregate with *Ryd3* (Niks et al. 2004), four (Bmac0018, Bmag0009, HVM14 and HVM22) co-segregated with the *Ryd3* locus in our recombinants, while another (HVM74) was separated from *Ryd3* by two recombination events. Additional SSR markers GBMS0107, GBMS0135, GBMS0178 also co-segregated with *Ryd3*, while the gene-based markers GBS0655 and WBE201 mapped proximal and distal to *Ryd3*, respectively (Fig. 1a, b).

BLAST searches using GBS0655 and WBE201 marker sequences identified a corresponding interval

of 19 Mb on chromosome 2 of the rice genome sequence (Fig. 1a, b). Before the Genome Zipper (see subsequent text) became available, this relationship with rice was used to generate several more markers. When primer sequences of co-segregating markers were BLASTed against barley sequences, the GBMS0107 reverse primer (20 bp) was found to match the barley EST sequence HO17C21S from the IPK Crop EST database (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/cr-est/index.php>). This sequence was then used to search rice gene sequences, identifying Os02g0554000 as a potential orthologue. Rice genes in the vicinity of Os02g0554000 were then used to search barley unigenes from Close et al. (2009). Six were identified and used to search for polymorphism (Table 2). Three were polymorphic and were mapped: U35_17493_592-897 mapped outside the target interval, U35_13709_pyro mapped 0.52 cM from *Ryd3*, between WBE201 and HVM74, and U35_02578_540-712 co-segregated with *Ryd3* (Fig. 1a, b).

Subsequent marker generation was undertaken with the help of an early version of the Genome Zipper (Mayer et al. 2011), which shows gene order in barley predicted by collinearity with the sequenced cereal genomes, as well as genes directly

Fig. 1 High-resolution genetic mapping of *Ryd3*. **a** Map made using 183 GMS006–GBM1063 recombinants selected from 1,629 F2-plants. **b** Map made using 121 GBS0655–WBE201 recombinants selected from 3,210 F2-plants. These include the 61 GBS0655–WBE201 recombinants that were included in the set used to make the first map. Markers based on genes are in *bold* and their similarity to rice genes is depicted. *Underlined* markers and rice genes indicate the genetic interval and syntenic region of interest



mapped in barley. Barley unigenes that occurred with the *Ryd3* co-segregating unigene U35_02578_540-712 at the 55.36 cM position on chromosome 6H in the Genome Zipper were used. Altogether, 238 barley unigenes and the orthologues from rice, *Brachypodium* and/or sorghum as well as nine additional barley unigenes without any identified orthologues from the abovementioned model grass clustered at this locus. Despite an overall pattern of conservation, each of the three model genomes of rice, *Brachypodium* and sorghum displayed distortions in the overall collinearity to this part of chromosome 6H. Out of this cluster nine barley unigenes were used for marker development (Table 2). Two markers were polymorphic: U35_36565_246-380 mapped distal to GBM1063 and U35_16315_345-563 co-segregated with *Ryd3* (Fig. 1a, b).

Using bulked segregant analysis (BSA), two *Ryd3*-linked DArT markers (bPb-5698 and bPb-3722) were identified in addition. Public sequence was available for bPb-3722 but not bPb-5698. The former was converted into a CAPS marker (Table 2) that co-segregated with *Ryd3* (Fig. 1a, b).

Resistance test and yield evaluation

The 121 homozygous RILs used for high-resolution mapping were tested under field conditions in the years 2009, 2010 and 2011. Based on visual symptom expression, lines were classified clearly as being either tolerant or non-tolerant. There were 58 tolerant and 63 non-tolerant RILs, which was consistent with the 1:1 ratio expected for a single major gene ($\chi^2 = 0.207$). When this designation was regarded as being diagnostic for *Ryd3* allele status, *Ryd3* easily mapped to a single locus position on the molecular marker map (Fig. 1a, b). Tolerance with regard to the measurements plant height, yield and yield components showed highly significant correlations with the *Ryd3* genotype ($p < 0.001$). For all tolerance measures, lines carrying the *Ryd3* resistance allele were superior to all those carrying the susceptibility allele. Inoculation caused the severest losses for grain yield (−93.8 % compared to un-inoculated control) followed by number of ears (−79.5 %; Table 3).

Table 3 Tolerance of homozygous RIL lines (inoculated/control), and average visual symptom rating, of the parental lines L94 (*Ryd3*) and L94-QTL3 (*ryd3*) and RILs of the mapping population L94 × L94-QTL3. The RILs are divided into two groups based on the *Ryd3* co-segregating marker U35_16315_345-563. Those carrying the resistance or susceptibility associated allele are assigned to group A or B, respectively. Data for the two parental lines were obtained from one field site and two replications for each of 3 years (2009–2011). Data for the RILs were obtained at the same site, from 24 RILs in 2009, 37 RILs in 2010 and 60 RILs in 2011 (i.e. each RIL tested in 1 year). Different letters denote significant differences between genotypes for a given trait (Tukey test, $\alpha = 0.05$; cf. Scheurer et al. 2001)

Trait	L94	L94-QTL3	Group A	Group B
Grain yield (%)	113.7a	4.4b	130.4a	6.2b
Number of ears (%)	119.3a	14.5b	135.8a	20.5b
Thousand-kernel weight (%)	99.1a	62.3b	98.7a	62.1b
Plant height (%)	93.1a	50.8b	97.3a	48.3b
Symptom expression ^a	2.75a	7.10b	2.51a	6.75b

^a Visual symptom rating (1–9)

Testing markers for their diagnostic value

None of the several co-segregating markers developed by Niks et al. (2004) had been tested for their diagnostic value to date. Within this study HVM22 was found to be not very robust and, therefore, was not tested further. However, the other nine markers that co-segregated with *Ryd3* represent potential candidates for marker-assisted selection of BYD tolerance. To investigate the diagnostic value of these nine markers, they were scored across a panel of 33 cultivars and accessions of known *Ryd2* and *Ryd3* genotypes. Although no single marker alone could consistently discriminate *Ryd3* from non-*Ryd3* genotypes, the combination of the markers GBMS0107 (*Ryd3*: 197 bp) and GBMS0135 (*Ryd3*: 155 bp) could (Supplemental Table 1).

Discussion

In this paper we report on high-resolution mapping of the *Ryd3* locus conferring tolerance to barley yellow dwarf disease, by the use of recently developed barley genomic resources to increase the marker density in this

region. In a population of 103 RILs, *Ryd3* was mapped previously to chromosome 6H and co-segregated with SSR markers HVM22, HVM14, HVM65, HVM74, Bmac0018 and Bmag0009 (Niks et al. 2004). In our larger population representing 6,420 gametes, all these markers except for HVM74 still co-segregated with *Ryd3*. Additional markers that were mapped also co-segregated with *Ryd3* (Fig. 1a, b). Perhaps a factor contributing to this clustering is the proximity of *Ryd3* to the centromere on chromosome 6H. Like other centromeric regions of barley chromosomes, this region shows suppressed recombination (The International Barley Genome Sequencing Consortium 2012). The physical/genetic ratio in this region has been estimated at 14–60 Mb/cM, while the genome-wide average is 4.4 Mb/cM (Künzel et al. 2000).

Our mapped SSR positions largely agree with the maps of Hearnden et al. (2007) and Varshney et al. (2007). Hearnden et al. (2007) grouped some of the *Ryd3*-co-segregating markers including the DArT marker bPb-3722 with the flanking marker GMS006 and the distal marker HVM74 in a large bin at the centromere. Unexpectedly, the consensus map of Varshney et al. (2007) resolves markers that co-segregated in our large population. This separation is possibly an artifact derived from the consensus map construction process.

Markers that were perfectly linked to *Ryd3* in our large mapping population could probably be used in resistance breeding, provided it can be established which marker allele is in coupling with the *Ryd3* resistance allele for a particular mapping population. At least, the SNP polymorphisms described for markers bPb_3722 and U35_02578_540-712 (Supplemental Table 2) could be used to derive a high-throughput marker type (e.g. KASPar) that would be suitable for routine use.

A combination of two co-segregating markers discriminated the three Ethiopian landraces carrying *Ryd3* resistance from the 30 non-*Ryd3* lines, including 17 from Ethiopia. However, a greater number of susceptible cultivars will have to be characterized before it can be concluded that this marker combination is unique to *Ryd3* lines, and therefore whether these markers can be widely applied to reliably test for the presence or absence of *Ryd3* resistance in uncharacterized material.

It should be noted that the part of rice chromosome Os02 corresponding to the *Ryd3* genetic interval of

barley (Os02g0199300 to Os02g0611200) is physically large (ca. 18.5 million bp).

Within this interval, there are multiple exceptions to conserved synteny with barley chromosome 6H and *Brachypodium* (chromosome 3) and sorghum (chromosome 4) (Mayer et al. 2011). *Ryd3* is allocated by co-segregating markers at 55.36 cM on chromosome 6H in the Genome Zipper. The position of 55.36 cM comprises 238 barley genes and their corresponding orthologues as well as nine additional barley unigenes without any identified orthologues, and is defined as the genetic position of the centromere (Mayer et al. 2011).

The current results indicate that it will be more challenging to isolate *Ryd3* than it was to isolate the virus-resistance gene *rym11*, which is also located in a centromeric region (barley chromosome 4HL) and is effective against all known strains of BaMMV and BaYMV in Germany (Lüpken et al. 2013; Ping et al. unpublished data). One way to proceed with the isolation of *Ryd3* may be by expanding the number of gametes analysed, i.e. enhancing resolution. This has proven to be successful, e.g. in the case of the *vrs1* gene (Komatsuda and Tanno 2004; Komatsuda et al. 2007) and the resistance gene *Rpg1* (Han et al. 1999; Brueggeman et al. 2002) in barley or the leaf rust resistance gene *Lr1* in wheat (Ling et al. 2003; Qiu et al. 2007). However, it has to be taken into account that in the case of the *Rrs2* scald resistance gene on chromosome 7HS of barley (Hanemann et al. 2009) a number of co-segregating markers could still not be separated from *Rrs2*, even within a population size of 9,179 F2 plants. As centromeric and peri-centromeric regions of barley chromosomes are known for containing a large number of genes that are locked into recombinationally 'inert' genomic regions (Thiel et al. 2009), the success of this strategy may be limited in regions like the *Ryd3* region (cf. The International Barley Genome Sequencing Consortium 2012).

Another option which may be applied in gene isolation is association genetics. This procedure has been successfully used in the isolation of the *HvCEN* gene in barley, which is related to the control of life-cycle length, i.e. to environmental adaptation (Comdran et al. 2012). However, while in these studies a large number of genotypes differing in growth habit was available for association genetics studies, only three *Ryd3*-containing lines have been detected so far in a large screening of Ethiopian accessions, which

revealed identical haplotypes for all known co-segregating markers and are putatively identical by descent (Nicholas C. Collins, personal communication). Therefore, laborious phenotyping of the worldwide barley collection for BYDV resistance and tests for allelism in order to determine the presence of *Ryd3* are a prerequisite for conducting this approach.

While several genes belonging to the translation initiation machinery for resistance to potyviruses in different plant species have meanwhile been isolated (Le Gall et al. 2011) and a candidate gene approach based on these data has been successfully used to isolate the *Rym4/Rym5* locus in barley (Kanyuka et al. 2005), no resistance genes effective against *Luteoviridae* have so far been isolated, so that this approach cannot be applied with respect to *Ryd3* at the moment.

Furthermore, the isolation of *Ryd3* may be achieved by the development of non-gridded bacterial artificial chromosome (BAC) libraries from resistant lines and the construction of a physical map spanning the resistance locus followed by the identification of candidate genes from sequenced BACs. The non-gridded BAC library strategy (Ma et al. 2000; Lucas et al. 2013) allows focusing on genomic regions of interest in specific genotypes, and the rapid isolation of BAC clones spanning targeted genomic regions.

In summary, the results obtained to date may be the basis for isolating *Ryd3* in the future by applying the strategies described above combined with new techniques like exome sequencing (Maher 2009) and the increasing amount of sequence information available for barley (The International Barley Genome Sequencing Consortium 2012).

Acknowledgments The authors thank Karin Ernst and Dörte Grau (JKI) for excellent technical assistance, Susanne König (IPK) for sequencing, and Calvin Qualset (UC Davis) for generously supplying BYDV resistance field data for Ethiopian accessions. The research was supported by a grant of the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) (project BARLEX: FKZ 0314000) to KFXM, FO and NS. We are grateful to the BMBF for funding this project and to the ARC, GRDC and the South Australian Government for funding N. Collins.

References

- Arundel PH, Van de Velde R, Holloway PJ (1988) Optimal conditions for the use of cDNA probes to measure the concentration of *barley yellow dwarf virus* in barley (*Hordeum vulgare*). J Virol Methods 19:307–318
- Banks PM, Waterhouse PM, Larkin PJ (1992) Pathogenicity of 3 RPV isolates of *Barley yellow dwarf virus* on barley, wheat and wheat alien addition lines. Ann Appl Biol 121:305–314
- Brueggeman R, Rostoks N, Kudrna D, Kilian A, Han F, Chen J, Druka A, Steffenson B, Kleinhofs A (2002) The barley stem rust-resistance gene *Rpg1* is a novel disease-resistance gene with homology to receptor kinases. Proc Natl Acad Sci USA 99:9328–9333
- Burnett PA, Comeau A, Qualset CO (1995) Host plant tolerance or resistance for control of *barley yellow dwarf*. In: D'Arcy CJ, Burnett PA (eds) *Barley Yellow Dwarf: 40 years of progress*. APS Press, St. Paul, pp 321–343
- Catherall PL, Jones AT, Hayes JD (1970) Inheritance and effectiveness of genes in barley that condition tolerance to *barley yellow dwarf virus*. Ann Appl Biol 65:153–161
- Chalhoub BA, Sarrafi A, Lapierre HD (1995) Partial resistance in the barley (*Hordeum vulgare* L) cultivar 'Chikurin-I-baraki-1' to two PAV-like isolates of *Barley yellow dwarf virus*: allelic variability at the *Yd2* gene locus. Plant Breed 114:303–307
- Close TJ, Bhat PR, Lonardi S, Wu Y, Rostoks N, Ramsay L et al (2009) Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. BMC Genomics 10:582
- Collins NC, Paltridge NG, Ford CM, Symons RH (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
- Comadran J, Kilian B, Russell J, Ramsay L, Stein N, Ganai M, Shaw P, Bayer M, Thomas W, Marshall D, Hedley P, Tondelli A, Pecchioni N, Francia E, Korzun V, Walther A, Waugh R (2012) Natural variation in a homolog of *Antirrhinum CENTRORADIALIS* contributed to spring growth habit and environmental adaptation in cultivated barley. Nat Genet 44:1388–1392
- Damsteegt VD, Bruehl GW (1964) Inheritance of resistance in barley to *barley yellow dwarf*. Phytopathology 54:219–224
- Domier LL (2008) Barley yellow dwarf virus. In: Mahy BWJ, van Regenmortel MHV (eds) *Encyclopedia of virology*. Elsevier, Oxford, pp 279–286
- Dorokhov DB, Klocke E (1997) A rapid and economic technique for RAPD analysis of plant genomes. Russ J Gen 33:358–365
- Ford CM, Paltridge NG, Rathjen JP, Moritz RL, Simpson RJ, Symons RH (1998) Rapid and informative assays for *Yd2*, the *Barley yellow dwarf virus* resistance gene, based on the nucleotide sequence of a closely linked gene. Mol Breed 4:23–31
- Galloway BT, Southword EA (1890) Preliminary notes on a new and destructive oat disease. J Mycol 6:72–73
- Habekuß A (2012) Gerstengelverzweigung—ein vermeidbares Problem? Praxisnah. Fachinformationen für die Landwirtschaft 2:4–5
- Habekuß A, Riedel C, Schliephake E, Ordon F (2009) Breeding for resistance to insect-transmitted viruses in barley—an emerging challenge due to global warming. J Cultiv Plants 61:53–61
- Han F, Kilian A, Chen JP, Kudrna D, Steffenson B, Yamamoto K, Matsumoto T, Sasaki T, Kleinhofs A (1999) Sequence

- analysis of a rice BAC covering the syntenous barley *Rpg1* region. *Genome* 42:1071–1076
- 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
- Hearnden PR, Eckermann PJ, McMichael GL, Hayden MJ, Eglinton JK, Chalmers KJ (2007) A genetic map of 1,000 SSR and DArT markers in a wide barley cross. *Theor Appl Genet* 115:383–391
- Huth W (1993) Untersuchungen zum Verhalten mehrerer Sorten Wintergerste nach Inokulation mit dem Gelbverzwergungsvirus der Gerste (*barley yellow dwarf virus*). *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 100:371–378
- Jones AT, Catherall PL (1970) The effect of different virus isolates on the expression of the tolerance to *barley yellow dwarf virus* in barley. *Ann Appl Biol* 65:147–152
- Kanyuka K, Druka A, Caldwell DG, Tymon A, McCallum N, Waugh R, Adams MJ (2005) Evidence that the recessive bymovirus resistance locus *rym4* in barley corresponds to the eukaryotic translation initiation factor 4E gene. *Mol Plant Pathol* 6:449–458
- Kennedy TF, Connery J (2011) Control of *barley yellow dwarf virus* in minimum-till and conventional-till autumn-sown cereals by insecticide seed and foliar spray treatments. *J Agric Sci* 150:249–262
- Komatsuda T, Tanno K (2004) Comparative high resolution map of the six-rowed spike locus 1 (*vrs1*) in several populations of barley, *Hordeum vulgare* L. *Hereditas* 141:68–73
- Komatsuda T, Pourkheirandish M, He C, Azhaguvel P, Kanamori H, Perovic D, Stein N, Graner A, Wicker T, Tagiri A, Lundqvist U, Fujimura T, Matsuoka M, Matsumoto T, Masahiro YM (2007) Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:1424–1429
- Künzel G, Korzun L, Meister A (2000) Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics* 154:397–412
- 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, pp 177–194
- Ling HQ, Zhu Y, Keller B (2003) High-resolution mapping of the leaf rust disease resistance gene *Lr1* in wheat and characterization of BAC clones from the *Lr1* locus. *Theor Appl Genet* 106:875–882
- Lister RM, Ranieri R (1995) Distribution and economic importance of *Barley yellow dwarf*. In: D'Arcy CJ, Burnett PA (eds) *Barley Yellow Dwarf*: 40 years of progress. APS Press, St. Paul, pp 29–53
- Lucas SJ, Akpınar BA, Kantar M, Weinstein Z, Aydınoglu F, Safář J, Simková H, Frenkel Z, Korol A, Magni F, Cattano F, Vautrin S, Bellec A, Bergès H, Doležel J, Budak H (2013) Physical mapping integrated with syntenic analysis to characterize the gene space of the long arm of wheat chromosome 1A. *PLoS One* 8(4):e59542. doi:10.1371/journal.pone.0059542
- 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.). *Theor Appl Genet* 126:1201–1212
- Ma Z, Weining S, Sharp PJ, Liu C (2000) Non-gridded library: a new approach for BAC (bacterial artificial chromosome) exploitation in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Nucl Acids Res* 28:e106. doi:10.1093/nar/28.24.e106
- Maher B (2009) Exome sequencing takes centre stage in cancer profiling. *Nature* 459:146–147
- Marcel TC, Varshney RK, Barbieri M, Jafary H, de Kock MJD, Graner A, Niks RE (2007) A high-density consensus map of barley to compare the distribution of QTLs for partial resistance to *Puccinia hordei* and of defence gene homologues. *Theor Appl Genet* 114:487–500
- Mayer KFX, Martis M, Hedley PE, Kimková H, Liu H, Morris JA, Steuernagel B, Taudien S, Roessner S, Gundlach H, Kubaláková M, Suchánková 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, Doležel J, Waugh R, Stein N (2011) Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. *Plant Cell* 23:1249–1263
- Niks RE, Habekuss A, Bekele B, Ordon F (2004) A novel major gene on chromosome 6H for resistance of barley against the *Barley yellow dwarf virus*. *Theor Appl Genet* 109:1536–1543
- Oswald JW, Houston BR (1951) A new virus disease of cereals transmissible by aphids. *Plant Dis Rep* 35:471–475
- Ovesná J, Vacke J, Kučera L, Chrpová J, Nováková I, Jahoor A, Šíp V (2000) Genetic analysis of resistance in barley to *barley yellow dwarf virus*. *Plant Breed* 119:481–486
- Paltridge NG (1998) The development of molecular markers for barley *Yd2*, the *barley yellow dwarf virus* resistance gene. PhD thesis, The University of Adelaide, Dept of Plant Science
- 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.). *Theor Appl Genet* 110:283–293
- Perovic J, Silvar C, Koenig J, Stein N, Perovic D, Ordon F (2013) A versatile fluorescence-based multiplexing assay for CAPS genotyping on capillary electrophoresis systems. *Mol Breed* 32:61–69
- Qiu JW, Schürch AC, Yahiaoui N, Dong LL, Fan HJ, Zhang ZJ, Keller B, Ling HQ (2007) Physical mapping and identification of a candidate for the leaf rust resistance gene *Lr1* of wheat. *Theor Appl Genet* 115:159–168
- Ramsay L, Macaulay M, Degli Ivanissevich S, MacLean K, Cardle L, Fuller J, Edwards KJ, Tuvevsson S, Morgante M, Massari A, Maestri E, Marmiroli N, Sjakste T, Ganai M, Powell W, Waugh R (2000) A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics* 156:1997–2005
- Rasmusson DC, Schaller CW (1959) The inheritance of resistance in barley to the *barley yellow dwarf virus*. *Agron J* 51:661–664
- Riedel C, Habekuß A, Schliephake E, Niks R, Broer I, Ordon F (2011) Pyramiding of *Ryd2* and *Ryd3* conferring tolerance

- to a German isolate of *Barley yellow dwarf virus*-PAV (BYDV-PAV-ASL-1) leads to quantitative resistance against this isolate. *Theor Appl Genet* 123:69–76
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, pp 365–386
- Sato K, Nankaku N, Takeda K (2009) A high-density transcript linkage map of barley derived from a single population. *Heredity* 103:110–117
- Sayed H, Kumari S, Baum M, Ghulam W, Grando S, Makkouk K (2006) Marker-assisted selection for *Barley yellow dwarf virus* resistance genes *Yd2* and *Yd3* in barley. In: Ninth Arab congress of plant protection, 19–23 November 2006, Damascus, Syria, p E-103
- Schaller CW (1984) The genetics of resistance to *Barley yellow dwarf virus* in barley. In: Burnett PA (ed) *Barley yellow dwarf. A proceedings of the workshop*. CIMMYT, Mexico, pp 93–99
- Schaller CW, Chim CI (1969) Registration of Atlas 68 barley. *Crop Sci* 9:521
- Schaller CW, Rasmusson DC, Qualset CO (1963) Sources of resistance to the *yellow-dwarf virus* in barley. *Crop Sci* 3:342–344
- Schaller CW, Qualset CO, Rutger JN (1964) Inheritance and linkage of the *Yd2* gene conditioning resistance to the *Barley yellow dwarf disease* in barley. *Crop Sci* 4:544–548
- Schaller CW, Prato JD, Chim CI (1973) Registration of Sutter barley. *Crop Sci* 13:285
- Scheurer KS, Friedt W, Huth W, Waugh R, Ordon F (2001) QTL analysis of tolerance to a German strain of BYDV-PAV in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 103:1074–1083
- Scholz M, Ruge-Wehling B, Habekuss A, Schrader O, Pendinen G, Fischer K, Wehling P (2009) *Ryd4^{Hb}*: a novel resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum* into barley and conferring complete and dominant resistance to the *Barley yellow dwarf virus*. *Theor Appl Genet* 119:837–849
- Silvar C, Perovic D, Casas AM, Igartua E, Ordon F (2011) Development of a cost-effective pyrosequencing approach for SNP genotyping in barley. *Plant Breed* 130:394–397
- Silvar C, Perovic D, Scholz U, Casas AM, Igartua E, Ordon F (2012) Fine mapping and comparative genomics integration of two quantitative trait loci controlling resistance to powdery mildew in a Spanish barley landrace. *Theor Appl Genet* 124:49–62
- Skaria M, Lister RM, Foster JE, Shaner G (1985) Virus content as an index of symptomatic resistance to *barley yellow dwarf virus* in cereals. *Phytopathology* 75:212–216
- Stein N, Graner A (2004) Map based gene isolation in cereal genomes. In: Gupta PK, Varshney RK (eds) *Cereal genomics*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 331–360
- Stein N, Herren G, Keller B (2001) A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large genome species such as *Triticum aestivum*. *Plant Breed* 120:354–356
- 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 J* 42:912–922
- Stein N, Prasad M, Scholz U, Thiel T, Zhang H, Wolf M, Kota R, Varshney RK, Perovic D, Graner A (2007) A 1000 loci transcript map of the barley Genome-new anchoring points for integrative grass genomics. *Theor Appl Genet* 114:823–839
- Strażyński P, Ruskowska M, Jeżewska J, Trzmiel K (2011) Evaluation of the autumn infection of winter barley with *Barley yellow dwarf viruses* transmitted by anholocyclic forms of bird chaffy-oat aphid *Rhopalosiphum padi* L. in Poland. *J Plant Prot Res* 51:314–321
- Swaminathan SS (2011) Impact of global warming on the insect pest status on plants. *Indian J Sci Technol* 4:230–235
- The International Barley Genome Sequencing Consortium (IBSC) (2012) A physical, genetical and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491:711–716
- 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 Evol Biol* 9:209
- Thieme R, Rakosy-Tican E, Gavrilenko T, Antonova O, Schubert J, Nachtigall M, Heimbach U, Thieme T (2008) Novel somatic hybrids (*Solanum tuberosum* L. + *Solanum taranii*) and their fertile BC₁ progenies express extreme resistance to potato virus Y and late blight. *Theor Appl Genet* 116:691–700
- Toojinda T, Broers LH, Chen XM, Hayes PM, Kleinhofs A, Korte J, Kudrna D, Leung H, Line RF, Powell W, Ramsay L, Vivar H, Waugh R (2000) Mapping quantitative and qualitative disease resistance genes in a doubled haploid population of barley (*Hordeum vulgare*). *Theor Appl Genet* 101:580–589
- van Berloo R, Aalbers H, Werkman A, Niks RE (2001) Resistance QTL confirmed through development of QTL-NILs for barley leaf rust resistance. *Mol Breed* 8:187–195
- Varshney RK, Marcel TC, Ramsay L, Russell J, Röder MS, Stein N, Waugh R, Langridge P, Niks RE, Graner A (2007) A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theor Appl Genet* 114:1091–1103
- Yamamura K, Kiritani K (1998) A simple method to estimate the potential increase in the number of generations under global warming in temperature zones. *Appl Entomol Zool* 33:289–298

3. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Feinkartierung der beiden Virus-Resistenzgene *Ryd3* und *rym11* der Gerste, welche im centromerischen Bereich von Chromosom 6H bzw. Chromosom 4H lokalisiert sind. Dabei handelt es sich um zwei agronomisch wichtige Gene. *Ryd3* vermittelt eine weitgehende Toleranz gegenüber *Barley yellow dwarf virus* (BYDV), während *rym11* gegenüber allen europäischen Erregern der Gelbmosaikvirose wirksam ist. Zwar lässt sich die durch Blattläuse übertragene viröse Gelbverzwergung indirekt durch den Einsatz von insektizidgebeiztem Saatgut oder auch die Applikation von Insektiziden in ihrem Schadensausmaß reduzieren (Kennedy und Connery 2011), aus ökologischen und ökonomischen Aspekten ist jedoch der Anbau resistenter Sorten dem Einsatz von chemischen Kontrollmaßnahmen vorzuziehen. Die durch den bodenbürtigen Plasmodiophoriden *Polymyxa graminis* übertragene Gelbmosaikvirose lässt sich zwar auch mittels Bodenentseuchungsmaßnahmen indirekt bekämpfen (Henry et al. 1992), aber diese Methode ist auf Feldflächen praktisch nicht durchführbar.

Aufgrund dieser beschränkten Bekämpfungsmöglichkeiten und des hohen Schadpotentials der beiden Virose ist die Isolierung wirksamer Resistenzgene, welche das gezielte Einbringen von Resistenzen in Elite-Material erlaubt, eine vordringliche Aufgabe der Züchtungsforschung. Da zu Anfang dieser Arbeit weder für *Ryd3* noch für *rym11* das Genprodukt bekannt war, wurde der Ansatz der kartengestützten Genisolierung gewählt, um einen Einblick in die Funktion und Struktur der beiden Gene zu erhalten (Stein und Graner 2004).

In den *Triticeae* wird die kartengestützte Isolierung von Genen sowohl durch das sehr große Genom als auch den hohen Anteil repetitiver Sequenzen erschwert, der bei Weizen und Gerste ca. 80 % des Genoms beträgt (SanMiguel et al. 1998, Choulet et al. 2010, Brenchley et al. 2012). Um zukünftig unter anderem auch die Isolation von Genen aus den komplexen *Triticeae*-Genomen zu erleichtern, wurde die Gerste wegen ihres vergleichsweise kleinen Genoms (5,1 Gbp, Doležel et al. 1998) ausgewählt, um die erste genomabdeckende physische Karte der *Triticeae* zu erstellen (IBSC 2012). Nach der Erstellung einer hochauflösenden genetischen Karte für beide Resistenzgene sollte diese Karte mit der physischen Karte der Gerste verankert werden und die Isolierung beider Gene erfolgen. Da beide Resistenzloci sich in Centromernähe befinden, war für die Erreichung der Ziele dieser Arbeit eine möglichst hohe genetische Auflösung notwendig. Aus diesem Grund war die Erstellung einer auf jeweils 5000 F₂-Pflanzen basierenden genetischen Karte vorgesehen; das entspricht einer genetischen Auflösung von 0,01 cM. Zu diesem Zweck wurden segmentale RILs entwickelt, die anschließend einer phänotypischen Testung sowie einer Markerabsättigung unterzogen wurden, um co-segregierende bzw. eng gekoppelte Marker zu identifizieren, welche die Identifikation eines

Resistenzgen-tragenden Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) erlauben (vgl. Stein und Graner 2004).

Während der *Ryd3*-Locus trotz der Verwendung einer hochauflösenden Kartierungspopulation genetisch nicht weiter aufgelöst und das Gen damit nicht in einer Gruppe co-segregierender Marker identifiziert werden konnte, gelang für *rym11* die Identifizierung eines Kandidatengenes, welches sich nach Validierung als *rym11* herausstellte (Yang et al. 2014).

3.1. Kartierungspopulationen

Verschiedene spaltende Populationen können für die Kartierung eines Genes eingesetzt werden. Die einfachste Art der Kartierungspopulation ist die F_2 -Generation, wie sie schon von Mendel (1866) für seine Vererbungsstudien genutzt wurde. Allerdings sind die F_2 -Pflanzen genetisch noch nicht fixierte Individuen, die prinzipiell nur einmal phänotypisch getestet werden können. Kartierungspopulationen aus (segmentalen) Rekombinanten Inzuchtlinien (RILs) dagegen sind für das gesuchte Merkmal vollständig homozygot. Sie können also ohne Änderung der genetischen Konstitution des Merkmals beliebig oft identisch reproduziert werden, was neben einer wiederholten Phänotypisierung auch einen Austausch innerhalb der *Scientific Community* und eine kontinuierliche Verdichtung der bestehenden Karte mit immer neuen Markern erlaubt (Burr et al. 1998, Schneider 2005). Weiterhin haben (segmentale) Rekombinante Inzuchtlinien je nach Inzuchtgrad wenigstens eine Meiose mehr als F_2 -Pflanzen durchlaufen; damit besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit für ein Rekombinationsereignis und damit eine erhöhte genetische Auflösung (Burr und Burr 1991). Einen Nachteil der RIL- gegenüber der F_2 -Kartierungspopulation stellt die Tatsache dar, dass für die Entwicklung einer RIL-Kartierungspopulation mehr Zeit benötigt wird, als für den Aufbau einer F_2 -Population. Je nach gewünschtem Homozygotiegrad der RIL-Population bedarf es bis zu acht Selbstungsgenerationen (Semagn et al. 2006).

Im Gegensatz dazu können doppelhaploide (DH) Linien in einer kürzeren Zeit entwickelt werden. Doppel-Haploide gehen auf haploide Pflanzen zurück, die spontan aufdoppeln oder einer Chromosomen-Verdopplung unterzogen wurden und daher an allen Loci homozygot sind (Schneider 2005). Bisher konnten noch nicht für alle Kulturarten effiziente Protokolle zur Erstellung von Doppel-Haploiden entwickelt werden, allerdings liegen für Kulturarten wie Raps, Weizen und Gerste brauchbare Protokolle vor (Forster et al. 2007).

Bei einem Vergleich (He et al. 2001) der genetischen Karte anhand einer RIL- bzw. einer DH-Kartierungspopulation von Reis mit den gleichen Eltern zeigte sich eine weitestgehend gleiche Anordnung der Marker, wobei aber in der RIL-Population mehr Marker eine gestörte Spaltung aufwiesen, als in der DH-Population. Ebenso war die Größe der genetischen Karte aus der RIL-Population ca. ein Drittel kleiner, als die Karte der DH-Population. Dagegen zeigten sich in der

Kartierung von sechs agronomischen Merkmalen für fünf Merkmale keine signifikanten Unterschiede zwischen den Populationen, so dass He et al. (2001) beide Populationen als gleichermaßen effektiv für genetische Analysen ansahen. Spaltungsabweichungen können jedoch in beiden Populationen zustande kommen - sei es bei der RIL-Population durch das (Zusammen-) Wirken von genetischen und Umwelt-Effekten, die während der langwierigen Entwicklung der jeweiligen RIL-Population aufgetreten sind (Frankie et al. 2008), oder sei es bei der DH-Population durch eine selektive Pollenletalität und/oder eine selektive Regeneration während der Gewebekultur (Xu et al. 1997). Anzumerken bleibt, dass sich eine hohe genetische Auflösung immer noch einfacher durch den Aufbau einer (segmentalen) RIL-Kartierungspopulation generieren lässt, als durch die Entwicklung einer DH-Population.

3.1.1. Aufbau einer hochauflösenden Kartierungspopulation

Für beide Resistenzgene wurde eine genetische Auflösung von 0,01 cM angestrebt, um theoretisch die Möglichkeit zu schaffen, einen Marker zu identifizieren, der zusammen mit dem gesuchten Gen auf einem BAC lokalisiert ist.

Die durchschnittliche Größe eines BAC-Inserts beträgt ca. 80 - 200 kb (Schulte et al. 2011). Da bei dem 5,1 Gb großen Gerstengenom (Doležel et al. 1998) je nach genetischer Karte 0,01 cM durchschnittlich ca. 40 kb gegenüberstehen, ist es auch mit einem Marker möglich, der 0,01 cM vom Gen entfernt ist, einen BAC-Klon zu identifizieren, der sowohl den Marker als auch das gesuchte Gen enthält.

Jedoch ist diese Rechnung theoretisch, denn tatsächlich treten innerhalb eines Genoms zum Teil erhebliche Schwankungen hinsichtlich des Verhältnisses der physischen zur genetischen Karte der einzelnen sub-chromosomalen Regionen auf. Dies konnte bereits in früheren Arbeiten beispielsweise für Reis (Wu et al. 2003), Weizen (Akhunov et al. 2003) und auch für Gerste (Künzel et al. 2000) gezeigt werden.

Innerhalb des Genoms gibt es sogenannte „hot spots“, d.h. Regionen mit einer stark erhöhten Rekombinationsfrequenz, und sogenannte „cold spots“, d.h. Regionen, in denen die Rekombinationsfrequenz stark reduziert ist (Petes 2001). Letztere finden sich vor allem in Centromernähe. So wurde beinahe die Hälfte (48%) der genetisch verankerten physischen Karte der Gerste dem centromerischen Bereich zugeordnet (IBSC 2012).

Dies hat zur Folge, dass bei der kartengestützten Genisolation die Anzahl der Gameten, die für die Identifizierung von informativen Rekombinationen notwendig sind, je nach Lokalisation des Genes im Genom stark variieren kann (Stein et al. 2000, Faris et al. 2003). So reichte beispielsweise für die Kartierung eines Genclusters, welcher für Speicherproteine im Samen codiert, eine Kartierungspopulation von nur 58 F₂-Pflanzen aus, um eine hinreichende Auflösung der Zielregion auf

dem kurzen Arm von Chromosom 1D von *Aegilops tauschii* zu erreichen (Spielmeyer et al. 2000). Für die Isolierung des *Q*-Genes, das u.a. für die Freidreschbarkeit des Weizens verantwortlich ist, reichte schon die Analyse von 930 Gameten aus (Faris et al. 2003), und auch für die Isolierung des Braunrost-Resistenzgenes *Lr21* des Weizens war eine Analyse von 1.040 Gameten hinreichend (Huang et al. 2003).

Gegenüber dieser vergleichsweise geringen Anzahl zu analysierender Gameten für *Lr21* mussten dagegen für die Isolierung von *Lr10* (Stein et al. 2000) und *Lr1* (Qiu et al. 2007) mit 6.240 beziehungsweise 7.300 analysierten Gameten sehr viel größere Weizen-Kartierungspopulationen eingesetzt werden.

In der Gerste musste für das erste mittels kartengestützter Genisolation klonierte Gen, *mlo*, 4.044 Gameten analysiert werden (Büschges et al. 1997), und für die Isolierung des ersten gegenüber der Gelbmosaikvirose isolierte Gen *rym4/rym5* waren 7.772 Gameten zu analysieren (Pellio et al. 2005, Stein et al. 2005).

Für die Isolierung des für Ährenzeitigkeit (mehr- bzw. zweizeilig) codierenden *vrs1*-Genes der Gerste war eine Analyse von 9.831 Gameten notwendig (Komatsuda et al. 2007). Während hier aufgrund der hohen Zahl analysierter Gameten schließlich das Gen isoliert werden konnte, war in anderen Arbeiten selbst mit einer wesentlich höheren Anzahl analysierten Gameten keine Identifizierung des Genes möglich. So wurden für die Feinkartierung des gegen die Zikade *Nilaparvata lugens* wirksamen Resistenzgenes *Bph15* von Reis insgesamt 18.944 Gameten analysiert, ohne dass das Gen isoliert werden konnte, obwohl das gentragende Intervall auf 47 kb eingegrenzt werden konnte (Yang et al. 2004). Auch war es in der Arbeit von Hanemann et al. (2009) nicht möglich, das auf Gerstenchromosom 7H lokalisierte Resistenzgen *Rrs2* gegen *Rhynchosporium commune*, selbst nach Analyse von 18.358 Gameten von anderen co-segregierenden Genen zu differenzieren. Anders als bei der Feinkartierung von *Bph15* war die Länge des eingegrenzten *Rrs2*-Zielintervalls mit mehreren 100 kb noch immer sehr groß, wobei die genetische Distanz zwischen den beiden flankierenden Markern lediglich 0,08 cM betrug. Das darin zum Ausdruck kommende, sehr ungünstige Verhältnis der physischen zur genetischen Karte ist überraschend, da die das *Rrs2*-tragende Region nach Hanemann et al. (2009) ein moderates Verhältnis von physischer zur genetischer Karte aufweist.

Allerdings ist eine solche Unterdrückung der Rekombinationsrate bei mehreren Resistenz-Loci beobachtet worden, wie etwa dem *Mi*-Nematodenresistenzgen und dem gegen Tabakmosaikvirus (TMV) wirksamen Resistenzlocus *Tm2a* der Tomate (Ganal und Tanksley, 1996), dem Rostresistenzgen *MXC3*- der Pappel (Stirling et al. 2001) und dem gegen Braunrost und Echten Mehltau wirksamen *Lr20Pm1*-Locus des Weizen (Neu et al. 2002).

Auch bei der Feinkartierung des gegen den Echten Mehltau wirksamen *Mla*-Resistenzclusters der Gerste war das Verhältnis der physischen zur genetischen Karte innerhalb dieses Clusters zehnmal

höher als das Verhältnis der physischen zur genetischen Karte zwischen den angrenzenden Markern (Wei et al. 1999), wobei diese Arbeit dennoch Ausgangspunkt für die Isolierung von *Mla1* bzw. *Mla6* war (Zhou et al. 2001; Halterman et al. 2001).

Während eine Gegenüberstellung der gesamten genetischen Karte mit der gesamten physischen Karte nur einen globalen Einblick in die für die Isolierung eines Gens erforderliche Anzahl zu analysierender Gameten liefern kann, haben hierzu Dinka et al. (2007) eine Formel entwickelt, mit der man mittels des lokalen Verhältnisses von Mb/cM die Anzahl an Gameten berechnen kann, die analysiert werden müssen, um ein 100 kb großes Zielintervall einzugrenzen (vgl. Hanemann 2009). Nimmt man für *rym11* die das Gen flankierenden Marker MWG058 (Bauer et al. 1997) und MWG2134 (Nissan-Assouz et al. 2005) als Ortungspunkte, so zeigt die Karte von Künzel et al. (2000) für diese Region ein Verhältnis der physischen zur genetischen Karte von 5,9 – 8,5 Mb/cM.

Nach der Formel von Dinka et al. (2007):

$$N = \text{Log}(1 - P) / \text{Log}(1 - T / (100R))$$

(N = die Anzahl an benötigten Gameten; P = Wahrscheinlichkeit; T = erwartete Distanz zwischen den flankierenden Markern (Mb) R = regionales Verhältnis der physischen zur genetischen Karte)

beträgt bei einem regionalen Verhältnis von 5,9 – 8,5 Mb/cM die Anzahl der benötigten Gameten für die Eingrenzung von *rym11* innerhalb eines 100 kb großen Intervalls zwischen 17.673 und 25.462 Gameten, sodass insgesamt zwischen 8.837 bis 12.731 F_2 Pflanzen analysiert werden müssen, um mit einer 95 % Sicherheit das gentragende Intervall auf 100 kb eingrenzen zu können.

Yang (2014) hat für das von Lüpken et al. (2013) auf 0,074 cM eingegrenzte Zielintervall eine physische Distanz von 3 Mb identifiziert und für das noch mal auf 0,0196 cM eingekürzte Intervall eine physische Distanz von 1,25 Mb (Yang 2014; Yang et al. 2014). Daraus ergibt sich für den *rym11*-Locus ein regionales Verhältnis der physischen zur genetischen Karte von 40,5 bzw. 63,7 Mb/cM. Setzt man diese Werte in die Formel von Dinka et al. (2007) ein, so kommt man auf 60.723 bzw. 95.526 F_2 Pflanzen, die analysiert werden müssten, um mit einer 95 % Sicherheit das gentragende Intervall auf 100 kb eingrenzen zu können.

Verglichen mit diesem Resultat scheint das vorab bestimmte Verhältnis (Künzel et al. 2000) der genetischen zur physischen Karte für die *rym11*-Region zu gering zu sein. Ähnlich verhielt es sich bei der hochauflösenden Kartierung des *Rar1* Locus der Gerste. Auch hier bestätigte sich das vorab

bestimmte Verhältnis der physischen zur genetischen Karte von 1,1 Mb/cM nicht, sondern es war mit 12,6 Mb/cM mehr als zehnmal so hoch (Lahaye et al. 1998). Und auch für die Feinkartierung von *Rrs2* war vorab für die Zielregion ein durchschnittliches Verhältnis der physischen zur genetischen Karte von 1 Mb/cM bestimmt worden, wohingegen Hanemann et al. (2009) in ihrer Arbeit ein durchschnittliches Verhältnis der physischen zur genetischen Karte von 2,8 Mb/cM für die Region um den Genlocus beobachtet hatten, während der Locus selbst ein noch viel ungünstigeres Verhältnis aufwies. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass in der Arbeit von Künzel et al. (2000) eine vergleichsweise geringe Anzahl an physischen Ortungspunkten in eine genetische Karte mit vergleichsweise geringer Dichte integriert wurde, und somit nur ein grobes Abbild des tatsächlichen Verhältnisses der physischen zur genetischen Karte generiert wurde.

Für *Ryd3* sind in dieser Arbeit insgesamt 3.210 F₂-Pflanzen analysiert worden (Lüpken et al. 2014). Nach Niks et al. (2004) ist *Ryd3* in einer Region lokalisiert, in der das Verhältnis der physischen zur genetischen Karte bei 14 bis 60 Mb/cM (Künzel et al. 2000) liegt. Danach müssten für *Ryd3* 20.970 bis 89.871 F₂ Pflanzen analysiert werden, um mit einer 95%igen Sicherheit das gentragende Intervall auf 100 kb eingrenzen zu können.

Bedenkt man den Aufwand, der mit dem Aufbau solch großer Kartierungspopulationen verbunden wäre, dürfte es sehr schwierig sein, das *Ryd3*-tragende Intervall auf 100 kb eingrenzen zu können. Allerdings zeigt das Ergebnis der Arbeit von Yang et al. (2014), dass für Kulturpflanzen, bei denen auf eine physische Karte zurückgegriffen werden kann, auch mit der Identifizierung eines weitaus größeren Intervalls als 100 kb als Grundlage für eine erfolgreiche Genisolierung geschaffen ist.

3.2. Resistenztestung

Bei der kartengestützten Genisolierung ist die Phänotypisierung eine der wichtigsten Einflussgrößen für den Erfolg der Feinkartierung des gesuchten Genes. Dies gilt vor allem für Merkmale mit einer geringen Heritabilität bzw. solche, die einer starken Genotyp x Umwelt-Interaktion unterliegen (Langridge und Fleury 2011, Miedaner et al. 2001). Ein weiteres Problem bei der Phänotypisierung ist die stets gegebene Möglichkeit, dass eine genetisch anfällige Pflanze einer Virusinfektion entgeht und somit als resistent eingestuft wird ("escape"; vgl. Bauer et al. 1997, Yang et al. 2014).

Für die Erfassung der Resistenz gegenüber BaMMV erfolgte deshalb sowohl in der Klimakammer eine Resistenztestung mittels mechanischer Inokulation mit dem Isolat BaMMV-ASL1 (Habekuss et al. 2008), als auch eine Phänotypisierung der gleichen Linien in einem Feldtest mit natürlichem Vorkommen des Virus. Anfällige Standards dienten zur Kontrolle des Erfolges der Virusinfektion. Der Virus-Nachweis erfolgte mittels DAS-ELISA (Clark und Adams 1977). Für die Resistenz gegenüber

BaMMV ergab sich für die 100 getesteten informativen Linien eine Aufspaltung von 52 resistenten zu 48 anfälligen RILs und somit eine gesicherte Anpassung an das erwartete 1r:1s Spaltungsverhältnis ($\text{Chi}^2_{(1r:1s)} = 0,163$).

Die Erfassung der Resistenz gegenüber BaYMV wurde dagegen nur im Feldtest durchgeführt, da weder BaYMV-1 noch BaYMV-2 durch mechanische Inokulation in ausreichendem Maße übertragen werden können (Huth und Adams 1990, Graner et al. 1999), so dass kein Vergleich mit Daten aus einer Klimakammer möglich war. Bei diesen erfassten Felddaten konnte für viele gegenüber BaMMV-anfälligen Pflanzen kein BaYM-Virus nachgewiesen werden. In diesen Fällen musste von einer nicht erfolgten Virusinfektion ausgegangen bzw. die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass aufgrund von Veränderungen im Temperaturverlauf nach einer tatsächlich erfolgreichen Virusinfektion dennoch keine Viruspartikel mehr nachgewiesen werden konnten.

Obwohl im vorliegenden Fall mit den aus der Kartierungspopulation entwickelten segmentalen RILs die Möglichkeit einer wiederholten Phänotypisierung gegeben war, erwies sich das für die Evaluierung einer Resistenz gegenüber BaYMV dennoch als schwierig, da im Laufe der Zeit nicht mehr hinreichend kühle Temperaturen für eine erfolgreiche BaYMV-Infektion vorherrschten.

Aus diesem Grund wurden vorrangig die Werte aus der BaMMV-Testung berücksichtigt. Auch in der Arbeit von Nissan-Azzouz et al. (2005) wurde nur die Resistenz gegenüber BaMMV erfasst (vgl. Ordon und Friedt 1993), da in Vorarbeiten bezüglich der verschiedenen Viren keine Differenzierung der Resistenz beobachtet werden konnte (Nissan-Azzouz et al. 2005).

Für die Erfassung der Resistenz gegenüber BYDV wurden RILs nach einer Inokulation mittels virustragender Blattläuse in der Klimakammer zusammen mit nicht infizierten Pflanzen der gleichen RILs (Kontrolle) in Gazehäuser ins Feld gestellt. Für beide Behandlungen erfolgte neben einer visuellen Bonitur des Habitus, eine Erfassung der Pflanzenhöhe, des Kornertrages und der Ertragsparameter. Zur Erfassung des Toleranzlevels gegenüber BYDV wurde die agronomische Leistung der infizierten Variante in Relation zu der Kontrolle gesetzt und die Toleranz einer Linie in Prozent ausgedrückt (Scheurer et al. 2001). Ebenfalls mit getestet wurden der anfällige und der resistente Elter.

Dabei konnte eine klare Unterscheidung zwischen anfälligen und toleranten RILs beobachtet werden, wobei der Unterschied für das Merkmal Kornertrag am größten war und hier keine einzige der getesteten RILs einen intermediären Wert aufwies. Bezüglich der BYDV-Toleranz konnte somit für 121 informative RILs eine Aufspaltung von 58 toleranten zu 63 nicht toleranten RILs beobachtet und damit eine Anpassung an das erwartete 1:1 Spaltungsverhältnis festgestellt werden ($\text{Chi}^2_{(1r:1s)} = 0,207$).

3.3. Feinkartierung der Resistenzgene

Sowohl für *Ryd3* als auch *rym11* der Gerste waren schon vorab genetische Karten vorhanden, auf die als Markerressourcen zurückgegriffen werden konnte. Zudem wiesen beide Zielregionen syntänische Beziehungen zu den Reischromosom Os02 bzw. Os03 auf, womit eine syntäniebasierte Markerabsättigung möglich war.

3.3.1. Nutzung genomischer Marker

Die Basis für die Feinkartierung der Resistenzgene *Ryd3* und *rym11* lieferten die genetischen Karten von Niks et al. (2004) und Nissan-Azzouz et al. (2005). Aus diesen Karten wurden jeweils zwei das Resistenzgen flankierende Marker ausgewählt und mittels dieser Marker hochauflösende Kartierungspopulationen aufgebaut (vgl. Stein und Graner 2004). Für die Markerabsättigung der definierten Zielintervalle wurden zu Anfang potentiell informative Marker aus weiteren vorhandenen Kopplungskarten der Gerste (Ramsay et al. 2000, Hearnden et al. 2007, Varshney et al. 2007) identifiziert und in die jeweiligen genetischen Karten von *Ryd3* und *rym11* kartiert. Dabei zeigten sich teilweise beträchtliche Unterschiede hinsichtlich der Markerordnung und der genetischen Distanzen zwischen einzelnen Markern. Dies traf vor allem auf die Konsensus-Karte von Varshney et al. (2007) zu. Konsensus-Karten haben zwar den Vorteil eines höheren Polymorphie-Grades (Stein et al. 2007), was die Erstellung von genetischen Karten höchstmöglicher Dichte erlaubt (Varshney et al. 2007). Bei der Zusammenführung der einzelnen genetischen Karten zu einer Konsensus-Karte ergibt sich jedoch das Problem, die unterschiedlichen Markerdistanzen und zum Teil auch Markieranordnung der Einzelkarten in Übereinstimmung zu bringen (Wu et al. 2008). Eine Idealsituation wäre daher die Kartierung aller Marker in einer einzigen Kartierungspopulation (Varshney et al. 2007), da hierbei die Position eines jeden Markers auf dem Spaltungsverhältnis in dieser einen Kartierungspopulation beruht (Sato et al. 2009). Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass mit der Konzentration auf eine einzige Kartierungspopulation viele Marker aufgrund fehlender Polymorphie in der ausgewählten Kartierungspopulation nicht kartiert werden könnten.

3.3.2. Nutzung genbasierter Marker und syntäniebasierte Markerabsättigung

Die bei früheren Markerabsättigungen von Zielintervallen in der Gerste genutzten Markersysteme, wie RAPDs und AFLPs (vgl. Pellio et al. 2005, Nissan-Azzouz et al. 2005) sind anonym (Krutovskii und Neale 2001). Sie basieren auf zufällig identifizierten Polymorphismen im Genom, und eine physische Verortung dieser Zufallsmarker ist nicht möglich (Andersen und Lübberstedt 2003, van Treuren und van Hintum 2009). Bei der Entwicklung solcher Marker gibt es bis zur tatsächlichen genetischen Kartierung keinerlei Anhaltspunkte bezüglich der Markerloci, und somit ist mit der Absättigung eines Zielintervalls mit neu entwickelten anonymen Markern ein langwieriger und ungerichteter

Sichtungsprozess verbunden. Werden anonyme Marker dagegen anhand ihrer Position in schon bestehenden Karten ausgewählt, geht die Kartierung solcher Marker aufgrund der unterschiedlichen genetischen Auflösung und Rekombinationshäufigkeit von Kartierungspopulation (Stein und Graner 2004, Bauer et al. 2013) nicht zwangsläufig mit einer (physischen) Einkürzung des Zielintervalls einher.

Genbasierte Marker hingegen beruhen auf Polymorphismen in definierten Genen (Stackelberg et al. 2006). Damit ist ihre physische Verortung möglich und diese Marker können von daher als Fixpunkt für die Selektion weiterer genbasierter Marker genutzt werden. Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein einer hochdichten genetischen Transkriptkarte (Stein et al. 2007, Sato et al. 2009, Close et al. 2009). Weiterhin sind die Gene verwandter Arten häufig ortholog (Krutovskii und Neale 2001). Damit ist bspw. für die Gerste mittels genbasierter Marker und dem Reis als Referenzgenom eine syntäniebasierte Markerabsättigung möglich, d.h. sobald eine syntänische Region im Reisgenom identifiziert worden ist, können Marker aus Gersten-EST-Sequenzen abgeleitet werden, die eine hohe Sequenzähnlichkeit zu der entsprechenden Reisregion aufweisen (vgl. Brunner et al. 2003, Gottwald et al. 2004, Perovic et al. 2004, Mammadov et al. 2005, Marcel et al. 2007a).

Erste genbasierte Marker für *rym11* wurden nach der Kartierung der flankierenden Marker HVM03 und HVM68 in die Kartierungspopulationen 'Steptoe' x 'Morex' und 'Oregon Wolfe Barley' (Stein et al. 2007) identifiziert, und mit der Veröffentlichung der Karten von Sato et al. (2009) und Close et al. (2009) standen weitere Ressourcen genbasierter Marker zur Verfügung. Ein Sequenzvergleich der kartierten genbasierten Marker mit dem Reisgenom bestätigte eine hochkonservierte invertierte Makro-Kollinearität der *rym11*-Region mit Reischromosom Os03. Diese Kollinearität erlaubte eine zielgerichtete Identifizierung weiterer Marker, durch welche das Zielintervall für *rym11* sehr schnell verkürzt werden konnte. Weiterhin bestätigte sich mit der Kartierung dieser Marker nicht nur die schon angenommene Makro-Kollinearität, sondern auch eine konservierte Mikro-Kollinearität zwischen diesen beiden syntänischen Regionen auf Chromosom 4H und Os03. Diese konservierte Mikro-Kollinearität der *rym11*-Region findet sich auch weitestgehend in dem virtuellen Modell von Chromosom 4H des *Genome-Zipper* (Mayer et al. 2011) wieder. Nach der Verankerung der genetischen Karte von *rym11* mit dem *Genome-Zipper* konnten zudem drei der in dieser Region im *Genome-Zipper* aufgezeigten Unterbrechungen der Mikro-Kollinearität durch Kartierung in die *rym11*-Karte als Artefakte nachgewiesen werden. Diese Artefakte lassen sich einerseits mit der geringen genetischen Auflösung als auch dem Konsensus-Charakter der genetischen Karte (Close et al. 2009) erklären, auf welcher der *Genome Zipper* beruht.

Damit konnte für *rym11*, anders als bspw. bei der Analyse von Gerstengen, welche für die Endosperm-Textur verantwortlich sind (Caldwell et al. 2004), oder etwa bei der *vrs1*-Region der Gerste (Pourkheirandish et al. 2007), während des gesamten Prozesses der Markerabsättigung bis

hin zu der Identifizierung des Kandidatengenes *HvPDIL5-1* (Yang et al. 2014) auf eine hochkonservierte Syntanie zu Reis zurückgegriffen werden. Eine solch hohe Kollinearität mit dem *Genome Zipper* konnte auch bei der Feinkartierung eines gegen *Blumeria graminis* wirksamen QTLs auf dem langen Arm von 6H identifiziert werden, während die parallel durchgeführte Feinkartierung zweier ebenfalls gegen *B. graminis* wirksamer QTLs auf Chromosom 7H größere Unterschiede zum *Genome Zipper* aufwies (Silvar et al. 2013). Auch bei der Feinkartierung des Gens *dsp.ar* durch Shahinnia et al. (2012) ergab sich keine hohe Kollinearität zu der Anordnung der Gene im *Genome Zipper*. Ein möglicher Grund hierfür kann in dem Umstand gesehen werden, dass das Gen *dsp.ar* genau im centromerischen Bereich von Chromosom 7H lokalisiert, und allein an dieser einen Genomposition sind im *Genome Zipper* 478 Gene lokalisiert (vgl. Mayer et al. 2011).

Demgegenüber waren nach Verankerung der *rym11*-Karte in den *Genome Zipper* dem 1,38 cM großen Zielintervall nur 32 orthologe Gene von Gerste, Reis, *Brachypodium* und Sorghum sowie fünf Gersten-Unigenes ohne ein Ortholog zugeordnet, obwohl sich dieser Locus ebenfalls in der Nähe des Centromers von Chromosom 4H befindet. Die Sequenzdaten aus dieser stark eingegengten Anzahl von Kandidatengenen konnten dann für eine weitere Markerabsättigung genutzt werden. Ebenso wurden diese Sequenzdaten mit der Sequenz der Gerstensorte 'Morex' verglichen und acht informative Contigs identifiziert und für die weitere Markernutzung herangezogen. Aus diesen Ressourcen gingen mit C_1030750_B und C_1012894_B zwei neue flankierende Marker hervor, die das Intervall auf 0,074 cM eingrenzten. Zudem konnten mit C_205243_B und C_205243_E1f&4730r zwei Marker identifiziert werden, die in der Kartierungspopulation von 5.102 F₂-Pflanzen mit *rym11* co-segregierten. Während der Polymorphismus des Markers C_205243_B auf einer Deletion im nicht codierenden Bereich in unmittelbarer Nähe des Gerstengens *HvPDIL5-1* basiert, beruht der Polymorphismus des Markers C_205243_E1f&4730r auf einer 1.375 bp großen Deletion, die bei den resistenten Eltern W757-112 und W757-612 die ersten drei Exons dieses Gens umfasst. Die Hypothese, dass die *rym11*-vermittelte Resistenz gegenüber BaYMV und BaMMV auf einem Funktionsverlust dieses Gens beruht, wurde durch vorausgegangene Arbeiten bestärkt, in der eine Interaktion von Genen aus der Familie der Protein-Disulfid-Isomerasen mit Viren festgestellt werden konnte (Gilbert et al. 2006, Schelhaas et al. 2007, Wang et al. 2010). Weiterhin wurde der Marker C_205243_E1f&4730r mit dem gleichen Gerstenset hinsichtlich seines diagnostischen Wertes untersucht, mit dem auch die Marker C_1030750_B, C_1012894_B und C_205243_B analysiert wurden, und keiner der 93 Genotypen zeigte die 1.375 bp große Deletion der resistenten Elter W757-112 und W757-612. Die darauf folgende Resequenzierung des *HvPDIL5-1*-Gens des *rym11*-Donors Russia57 untermauerte die aufgestellte Hypothese mit der Identifizierung einer 17 bp großen Deletion im codierenden Bereich des Gens. Danach erfolgte schließlich die funktionale Verifikation,

dass das Gen *HvPDIL5-1* einen Wirtsfaktor für eine erfolgreiche Infektion mit BaYMV und BaMMV darstellt (Yang et al. 2014).

Mit der Isolierung von *rym11* konnte der Nutzen des *Genome Zipper* für die Feinkartierung eindrucksvoll demonstriert werden, wobei die Effektivität auch immer von den Gegebenheiten der jeweiligen sub-chromosomalen Region abhängig sind (Silvar et al. 2013). So kommt der Nutzen des *Genome Zipper* für den Prozess der Feinkartierung in Regionen mit einem ungünstigen Verhältnis der physischen zur genetischen Karte an seine Grenzen, wie bspw. die Arbeit von Shahinnia et al. (2012) zeigt.

Für die Absättigung des *Ryd3*-Intervalls wurden genbasierte Marker aus den Karten von Stein et al. (2007), Marcel et al. (2007b) und Close et al. (2009) analysiert. Durch einen Sequenzvergleich der engsten flankierenden Marker mit dem Reisgenom konnte eine syntänische Region auf Reischromosom Os2 identifiziert werden, die allerdings 19 Millionen Basenpaare umfasste. Innerhalb dieser makro-kollinearen Region gab es wiederkehrende mikro-kollineare Verwerfungen zwischen der Genanordnung von Gerstenschromosom 6H, Reischromosom Os2, *Brachypodium* Chromosom 3 und Sorghum Chromosom 4 (vgl. Mayer et al. 2011). Eine solche Unterbrechung der syntänischen Beziehung ist bei steigender genetischer bzw. physischer Auflösung ein bekanntes Phänomen, und aus diesem Grund unterscheidet man bei der Beschreibung einer Konservierung der Genanordnung über Artgrenzen hinweg zwischen einer makro-kollinearen und einer mikro-kollinearen Ebene (Gottwald 2004).

Nach Kartierung weiterer genbasierter Marker konnten mit dem Resistenzgen co-segregierende Marker identifiziert werden und diese Marker kartierten im *Genome Zipper* genau an der als Centromer definierten Position von Chromosom 6H (55,36 cM). An dieser Position sind 238 Gersten Unigenes und ihre korrespondierenden orthologen Gene von Reis, *Brachypodium* und Sorghum lokalisiert. Vor diesem Hintergrund stößt der *Genome Zipper*, anders als es bei *rym11* der Fall war, als effizientes Werkzeug für eine schnelle und zielführende Genisolierung von *Ryd3* an seine Grenzen. Mit dem Vorliegen dieser Ergebnisse und angesichts der Tatsache, dass bei einer Kartierungspopulation von 3.210 F₂-Pflanzen noch immer 10 Marker mit dem Resistenzgen co-segregieren, ist eine baldige Genisolierung bei der derzeitigen genetischen Auflösung für *Ryd3* wohl nicht zu erwarten.

3.4. Möglichkeiten einer Isolierung von *Ryd3*

Dass mit einer höheren genetischen Auflösung häufig doch noch entscheidende Rekombinationsereignisse identifiziert werden können, haben in der Vergangenheit diverse Arbeiten gezeigt.

So konnte zu Beginn der hochauflösenden Kartierung des für die Zeiligkeit codierenden *vrs-1* Genes in zwei Kartierungspopulationen mit 384 und 3.129 analysierten Gameten kein Rekombinationsereignis zwischen *vrs-1* und dem Marker ABC311 identifiziert werden. Durch die Analyse weiterer 2.212 Gameten konnten dann zwei Rekombinationsereignisse nachgewiesen (Komatsuda und Tanno 2004) und schließlich das Gen isoliert werden (Komatsuda et al. 2007). Für die Isolierung des QTLs *Gpc-B1*, der im Weizen mit einem erhöhten Gehalt an Protein, Zink und Eisen im Korn assoziiert ist, war es durch eine zehnfache Erhöhung der Anzahl analysierter Gameten (9.000 vs. 935) möglich, den zuvor 250 kb großen genträgenden BAC-Contig (Distelfeld et al. 2006) physisch mehr als 30 mal zu verkleinern (7,4 kb), wodurch schließlich der QTL isoliert werden konnte (Uauy et al. 2006).

Ein weiteres Beispiel dafür, dass durch eine höhere genetische Auflösung entscheidende Rekombinationsereignisse identifiziert werden können, ist die hochauflösende Kartierung des Braunrostresistenzgenes *Lr1* des Weizens. Ling et al. (2003) analysierten zwei Kartierungspopulationen mit 5.652 und 1.664 Gameten. Während in der kleinen Kartierungspopulation kein Rekombinationsereignis zwischen *Lr1* und dem Marker PSR567 identifiziert werden konnte, wurden in der Kartierungspopulation mit der höheren genetischen Auflösung zwei Rekombinationsereignisse zwischen dem Gen und PSR567 detektiert. Dieser Marker war dann entscheidend für die nachfolgende Verkürzung des Zielintervalls und die Isolation von *Lr1* (Qiu et al. 2007).

Weiterhin war für die Kartierung des Schwarzrost-Resistenzgens *Rpg1* der Gerste eine Analyse von 3.000 Gameten nicht erfolgreich (Han et al. 1999), jedoch konnten Brueggeman et al. (2002) mit einer hochauflösenden Kartierungspopulation von 8.518 Gameten das Gen schließlich isolieren.

Durch eine Erhöhung der genetischen Auflösung können häufig entscheidende Rekombinationsereignisse identifiziert werden und mittels Formeln (Durrett et al. 2002, Dinka et al. 2007) und dem jeweiligen lokalen Verhältnis der physischen zur genetischen Karte lässt sich die hierfür ungefähr nötige Anzahl Gameten im Vorfeld abschätzen. Dabei ist festzustellen, dass mit einer Erhöhung der Populationsgröße generell eine Erhöhung der Genauigkeit der genetischen Karte einhergeht (Ferreira et al. 2006). Allerdings steigt mit einer Erhöhung der genetischen Auflösung nur die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten von weiteren Rekombinationsereignissen, und deren Auftreten lässt sich nicht durch das Erreichen einer bestimmten Populationsgröße bestimmen. So wurden während der Feinkartierung von *rym11* (Lüpken et al. 2013) für die beiden am engsten flankierenden Markern C_1030750_B und C_1012894_B jeweils das zweite weitere Rekombinationsereignis zum Gen in segmental Rekombinanten Inzuchtlinien identifiziert, die aus dem letzten Sechstel der 5.102 F₂ großen Kartierungspopulation entwickelt wurden (Lüpken et al. unpublished).

Das Ergebnis der Isolierung des *Rrs2*-Genes (Hanemann et al. 2009) ist allerdings ein Beispiel für eine Situation in der eine Erhöhung der genetischen Auflösung nicht zielführend war. Diese Arbeit ist jedoch eine Ausnahme, da selbst 18.358 analysierte Gameten nicht ausreichten, um eine Gruppe von 11 co-segregierenden Gene aufzulösen.

Mit 6.420 bisher analysierten Gameten für *Ryd3* sind weniger als zwei Drittel der Gameten analysiert worden, die für die Isolierung von *vrs1* (Komatsuda et al. 2007) bzw. *rym11* (Lüpken et al. 2013) eingesetzt werden mussten. Obwohl diese Gametenzahl schon eine beachtliche genetische Auflösung repräsentiert, ist diese Auflösung im Hinblick auf die Lokalisation des Genes in einer eher rekombinationsarmen Region (Thiel et al. 2009) als noch nicht ausreichend anzusehen (Dinka et al. 2007). Aus diesem Grund stellt eine Erhöhung der genetischen Auflösung für *Ryd3* eine unabdingbare Voraussetzung für die Isolation von *Ryd3* dar.

Eine weitere Möglichkeit zur Isolation von *Ryd3* stellt die Nutzung der Assoziationskartierung (Gaut und Long 2003, Aranzana et al. 2005, Abdurakhmonov und Abdugarimov 2008) dar. Diese Strategie wird mittlerweile auch bei der Gerste genutzt (Waugh et al. 2009), und es konnten schon mehrere Genotyp-Phänotyp-Beziehungen identifiziert werden, z.B. ein Kandidatengen für die Anthocyan-Färbung (*HvbHLH1*; Cockram et al. 2010), das für die Ährchenfertilität codierende Gen *INT-C* (Ramsay et al. 2011) und das u.a. für den Blühbeginn verantwortliche Gen *HvCEN* (Comadran et al. 2012). Es ist unwahrscheinlich, dass eine solche Strategie im Falle von *Ryd3* schnell und effektiv zum Ziel führt. Bisher konnten nämlich nur drei *Ryd3*-Donoren identifiziert werden, die allerdings für die co-segregierenden Marker die gleichen Fragmentmuster aufweisen und daher mutmaßlich identischen Ursprungs sind (Nicholas C. Collins, persönliche Mitteilung). Um möglicherweise *Ryd3*-Donoren mit nicht identischen Haplotypen identifizieren zu können, müssten daher eine große Menge an Gersten-Akzessionen auf das Vorhandensein von *Ryd3* getestet werden.

Eine Möglichkeit die Kopplungsgruppe um *Ryd3* genetisch aufzulösen und Rekombinationsereignisse zu identifizieren, wäre ein globaler Ansatz künstlicher Manipulation der Rekombinationsrate mittels chemischer Substanzen oder physischer Stressoren wie UV-Strahlung oder Temperaturerhöhung, oder auch eine gezielte Überexpression oder aber Stilllegung von Genen, deren Beteiligung am *Crossing over* schon bekannt ist (Martinez-Perez und Moore 2008, Wijnker und de Jong 2008, Crismani et al. 2013).

Eine weitere Möglichkeit zur Isolation ist in einer deletionsauslösenden Mutagenese von *Ryd3*-Trägern und der Resequenzierung der Nachkommenschaft zu sehen, um mithilfe der zur Verfügung stehenden neuen physischen Karte der Gerste (IBSC 2012) *Ryd3* näher einzugrenzen (vgl. Yang et al. 2013). Anders als bei *rym7*, welches nur eine verzögerte Anfälligkeit gegenüber bestimmten Isolaten der Gelbmosaikvirose bewirkt (Yang et al. 2013), dürfte sich dabei für *Ryd3* aufgrund der

eindeutigeren Befallssymptome keine große Schwierigkeit hinsichtlich der Identifizierung der für diese Strategie notwendigen *ryd3*-Mutanten ergeben.

Mit dem Vorliegen der physischen Karte der Gerste und 24.243 verorteten Gen-Loci (IBSC 2012) wäre weiterhin nun auch für diese wichtige Nutzpflanze ein effizienter *in silico*-mapping Ansatz denkbar (vgl. Chagné et al. 2012). Allerdings sind bisher noch in keiner Kulturart Resistenzgene gegen ein Mitglied der Familie der *Luteoviridae* isoliert worden, so dass hier jegliche Information über Struktur und Produkt eines potentiellen Genes fehlt.

Eine weitere Möglichkeit, mit der *Ryd3* isoliert werden könnte, ist die Entwicklung einer *non-gridded* bzw. *pooled* BAC-Bibliothek, wie sie für Weizen (Ma et al. 2000) oder Gerste (Isidore et al. 2005) beschrieben wurde. Obwohl bei Gerste schon seit mehr als 10 Jahren eine BAC-Bibliothek verfügbar ist (Yu et al. 2000) und in der Zwischenzeit weitere Bibliotheken hinzugekommen sind (Saisho et al. 2007, Schulte et al. 2011), kann das Vorhandensein des gesuchten Genes in einer BAC-Bibliothek nur garantiert werden, wenn diese Bibliothek auch tatsächlich aus dem spezifischen Donor entstanden ist (Marcel et al. 2010). Im Gegensatz zu herkömmlichen BAC-Bibliotheken, in denen jeder Clon als Individuum abgelegt ist, sind in *non-gridded* BAC-Bibliotheken BAC-Clone zu pools zusammengefasst (Ma et al. 2000). Diese Strategie erlaubt es mit einem Minimum an Zeit und technischem Aufwand BAC-Bibliotheken für bestimmte Gerstenherkünfte zu errichten. Im Falle von *Ryd3* ließe sich bspw. mit der Schaffung einer *non-gridded* BAC-Bibliothek der Gerstenlinie L94 die Generierung einer physischen Karte speziell für den *Ryd3*-Locus bewerkstelligen. Die Kosten und der Arbeitsaufwand hierfür lägen dabei weit unterhalb der Kosten für die Erstellung einer herkömmlichen BAC-Bibliothek. Bei dieser Strategie werden dann aus einem Pool von BAC-Clonen mittels spezifischer Marker diejenigen BAC-Klone identifiziert, die diese Markersequenzen tragen. Anschließend werden diese BAC-Klone sequenziert und mögliche Kandidatengene identifiziert (Marcel et al. 2010). Dabei könnte zudem eine effiziente Auslese möglicher Kandidatengene stattfinden, in der Weise, dass alle Gene, die zwischen der *Ryd3*-Donor BAC-Bibliothek und einer nicht *Ryd3*-Donor BAC-Bibliothek identisch sind, verworfen werden; nur verschiedene oder zusätzliche Gene wären dann als direkte Kandidaten anzusprechen (Hanemann 2009).

Auch wenn mit den oben dargestellten Strategien noch weitere Möglichkeiten für eine Isolierung von *Ryd3* gegeben sind, so ist doch davon auszugehen, dass eine solche Isolation mit einem erheblichen Aufwand verbunden ist, und wahrscheinlich nur durch den Einsatz verschiedener Strategien zum Erfolg führen wird.

3.5. Allgemeiner Ausblick

Obwohl in der jüngeren Vergangenheit schon einige Gerstengene isoliert werden konnten (vgl. Krattinger et al. 2009), ohne dass das gesamte Gerstengenom sequenziert worden war oder auch nur

eine physische Karte vorgelegen hat, waren die Möglichkeiten der Genisolierung durch das Fehlen einer solchen Ressource doch eingeschränkt, wie sich durch den deutlichen Anstieg der kartengestützten Genisolierung nach der Sequenzierung der Modelnpflanze *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative 2000) erkennen lässt (Jander et al. 2002).

Bis vor Kurzem galt das Genom der Gerste noch als zu komplex, um es zu sequenzieren, und die Modelnpflanze Reis (Bennetzen und Freeling 1993) wurde als Referenzgenom für eine syntäniebasierte Markerabsättigung bei der kartengestützten Genisolierung genutzt.

Mit der Entwicklung von *Next Generation Sequencing* (NGS) Techniken (Schuster 2007) war es in jüngerer Zeit möglich, auch komplexere Genome wie das der Gerste zu sequenzieren und mittlerweile liegt mit dem *Genome Zipper* (Mayer et al. 2011) ein virtuelles Genmodell für die Gerste vor, welches einen enormen Fortschritt hin zu einer effizienteren kartengestützten Genisolierung bedeutet.

Mithilfe der Pilotversion des *Genome Zipper* konnte in der vorliegenden Arbeit die Markerabsättigung des *rym11*-tragenden Intervalls stark vereinfacht werden, und der Wert dieses Genmodells erhöhte sich nochmals beträchtlich durch die Integration von *whole genome sequencing* Daten der Sorte 'Morex' des IPK Gatersleben (http://webblast.ipk-gatersleben.de/barley;assembly1_morex_rbca). Mit diesen Sequenzdaten gelang die entscheidende physische Eingrenzung des getragenden Intervalls und schließlich die Isolierung des Genes selbst.

So konnte mittels dieser neu zur Verfügung stehenden genomischen Ressource der Gerste innerhalb eines dreijährigen Projektes gezeigt werden, dass *rym11* für eine Proteindisulfisomerase codiert (Yang et al. 2014), während wenige Jahre zuvor für die Isolierung des Locus von *rym4/5* (Pellio et al. 2005, Stein et al. 2005) noch mehr als 10 Jahre benötigt wurden (Ordon und Perovic 2013).

Seit Ende November 2012 ist die physische Karte der Gerste publiziert, die mehr als 95% des gesamten Gerstengenoms repräsentiert (IBSC 2012). Mit dieser und weiteren neuen Ressourcen wie dem 9k SNP chip (Comadran et al. 2012), dem geplanten 90k SNP chip (<http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/plant-sciences/discovery-of-high-density-molecular-markers.html>), der GBS-Methode (vgl. Poland et al. 2012) oder dem *Exomcapture* (Mascher et al. 2013) stehen der Züchtungsforschung neue Möglichkeiten zur Verfügung, welche die baldige Isolierung weiterer Hauptgene bzw. QTLs in der Gerste erwarten lassen.

Dabei kann die Sequenzinformation eines agronomisch bedeutenden Gens als Ausgangspunkt für die Resequenzierung weiteren Gersten-Genotypen dienen, um verschiedene Allele für dieses agronomisch wertvolle Gen zu identifizieren (Bhullar et al. 2009, Hofinger et al. 2011, Yang et al. 2014). Dadurch besteht die Möglichkeit, Allele zu identifizieren, die sich bspw. in ihrer Resistenzwirkung gegenüber dem Pathogen unterscheiden (Stein et al. 2005), so dass dem Züchter

eine größere Auswahl an geeigneten Allelen für die Entwicklung neuer überlegener Sorten zur Verfügung steht (Kumar et al. 2010).

Weiterhin können mit der Isolierung eines Genes funktionale Marker für jedes einzelne Allel des betreffenden Gens entwickelt (Andersen und Lübberstedt 2003) und letztendlich diese Gene auch mittels gentechnischer Verfahren von Sorte zu Sorte transferiert werden (Schouten et al. 2006, Espinoza et al. 2013).

4. Zusammenfassung

Die durch *Barley Yellow Mosaic Virus* (BaYMV) und *Barley Mild Mosaic Virus* (BaMMV) verursachte Gelbmosaikvirose der Gerste und die durch das *Barley Yellow Dwarf Virus* (BYDV) sowie das *Cereal Yellow Dwarf Virus* (CYDV) verursachte viröse Gelbverzwergung können bei anfälligen Gerstensorten zu erheblichen Ertragsverlusten führen. Dabei sind für beide Krankheiten chemische Bekämpfungsmaßnahmen weder ökonomisch noch ökologisch sinnvoll, so dass der Anbau toleranter/resistenter Sorten das wirksamste Mittel darstellt, um Ertragsverluste zu vermeiden.

Hierfür stehen der Gerstenzüchtung gegenüber beiden Krankheitserregern verschiedene Resistenzgene zur Verfügung, wobei *Ryd3* 75 % der phänotypischen Varianz der Toleranz gegenüber BYDV-PAV und BYDV-MAV erklärt, während *rym11* gegen alle europäischen Erreger der Gelbmosaikvirose Resistenz verleiht.

Um sowohl die Struktur der beiden Gene und ihren Resistenzmechanismus aufzuklären, als auch in Zukunft ein zielgerichteteres Einbringen der Resistenzgene in Elitematerial zu gewährleisten, war es Ziel dieser Arbeit die Grundlagen für die Isolierung dieser Gene zu schaffen. Da keine Informationen über das Genprodukt selbst vorlagen, wurde hierfür die Strategie der kartengestützten Genisolierung gewählt. Dabei mussten beide Gene aufgrund ihrer unmittelbaren Nähe zum centromerischen Bereich von Chromosom 4H bzw. 6H möglichst hochauflösend kartiert werden.

Für *Ryd3* wurden 3.210 F₂-Pflanzen einer Kreuzung des anfälligen Elters 'L94-QTL3' mit dem resistenten Elter 'L94' mit den co-dominanten flankierenden Markern GMS006 und GBM1063 analysiert. Von 31 getesteten öffentlichen Markern kartierten 10 Marker in dem 7,31 cM großen Intervall von GMS006 – GBM1063 und sieben Marker co-segregierten mit *Ryd3*. Für das auf 2,44 cM eingekürzte Markerintervall GBS0655 - WBE201 zeigten 121 RILs ein Rekombinationsereignis und die phänotypische Analyse der Toleranz (t) versus Anfälligkeit (s) gegenüber BYDV ergab die erwartete 1t:1s Aufspaltung (58r : 63s; $\chi^2_{(1t:1s)} = 0,207$) eines Hauptgenes.

Ein Sequenzabgleich mit dem Reisgenom identifizierte auf Reischromosom Os02 eine syntäne Region von 19 Mb, und weitere Marker wurden unter Nutzung einer weitgehenden Makrokollinearität zu Reis, *Brachypodium* und *Sorghum* aus öffentlichen EST-Sequenzen und Sequenzen aus dem *Genome Zipper* entwickelt. Von 15 informativen Gersten-Unigenes co-segregierten U35_02578_540-712 und U35_16315_345-563 mit *Ryd3*. Ein weiterer co-segregierender Marker konnte mit dem DArT-Marker bPb-3722 mittels Bulk Segregant Analysis (BSA) identifiziert werden.

Eine diagnostische Testung der identifizierten Marker auf 33 Genotypen, bestehend aus *Ryd2*- und *Ryd3*-Donoren sowie anfälligen Linien zeigte, dass kein einzelner Marker in der Lage ist, zwischen *Ryd2*- und *Ryd3*-Donoren zu unterscheiden, dies aber mit einer Kombination der Marker GBMS0107 und GBMS0135 möglich ist.

Für *rym11* wurden 5.102 F₂-Pflanzen einer Kreuzung der anfälligen Sorte 'Naturel' mit dem resistenten Elter 'W757/112' bzw. 'W757/612' mit den co-dominanten flankierenden Markern HVM03 und HVM68 analysiert. Von 82 getesteten öffentlichen Markern kartierten 18 Marker in dem 10,72 cM großen Intervall von HVM03 und HVM68.

Für das auf 1,87 cM eingekürzte Markerintervall GBS0887 - GBS0506 zeigten 100 RILs ein Rekombinationsereignis und die phänotypische Analyse der Resistenz (r) versus Anfälligkeit (s) gegen BaMMV ergab die erwartete 1r:1s Aufspaltung (52r : 48s; $\chi^2_{(1r:1s)} = 0,163$).

Eine hochkonservierte Kollinearität mit Reischromosom Os03 konnte für eine Syntänie-basierte Markerabsättigung genutzt und nach Verankerung der genetischen Karte von *rym11* mit dem *Genome Zipper* automatisiert werden. Neben der Markerentwicklung aus 17 informativen Unigenes wurden aus Sequenzinformationen aus dem *Genome Zipper* 70 sequence-tagged-site (STS) Marker entwickelt und die Marker U32_3699A und sel.1167 kartiert. In einem letzten Schritt der Markerabsättigung wurden aus acht informativen Contigs der Gerstensorte 'Morex' Marker abgeleitet, und die Marker C_1030750_B und C_1012894_B grenzten das getragende Intervall auf 0,074 cM ein, während C_205243_B und C_205243_E1f&4730r mit *rym11* co-segregierten. Der Polymorphismus des Markers C_205243_E1f&4730r beruht auf einer 1.375 bp großen Deletion, die bei den resistenten Eltern 'W757-112' und 'W757-612' zu einem Funktionsverlust des Gerstengens *HvPDIL5-1* führt, damit eine erfolgreiche Infektion mit BaYMV und BaMMV ausschließt und somit Resistenz vermittelt.

5. Abstract

Barley yellow mosaic virus disease, caused by *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) and *Barley mild mosaic virus* (BaMMV), as well as Barley yellow dwarf disease which is caused by *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) and *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV) lead to severe yield losses in susceptible cultivars. For both diseases chemical control is neither economically nor ecologically reasonable, so rendering the cultivation of tolerant/resistant varieties is the most effective way to prevent yield losses.

In barley several resistance genes are available for resistance breeding against both virus diseases, with *Ryd3* explaining 75 % of the phenotypic variance regarding tolerance against BYDV-PAV and BYDV-MAV, while *rym11* confers resistance against all European agents of Barley yellow mosaic virus disease.

In order to get detailed information on the structure and the underlying resistance mechanism of both genes as well as providing a better targeted introgression of the resistance genes into elite material, the aim of this study was to isolate these genes. Since no information about the gene product was available, a mapped based cloning strategy was applied. Because of the gene's proximity to the centromere of barley chromosome 4H and 6H, respectively, the genes had to be mapped at high resolution.

For *Ryd3* 3,210 F₂-plants of a cross between the susceptible line 'L94-QTL3' with the resistant line 'L94' were analysed with the co-dominant flanking markers GMS006 and GBM1063. Out of a set of 31 public markers, 10 markers mapped in the 7.31 cM interval of GMS006 – GBM1063 and 7 markers co-segregated with *Ryd3*. For the shortened marker-interval GBS0655 – WBE201 121 RILs showed a recombination event and the phenotypical analysis for tolerance (t) vs. susceptibility (s) against BYDV was consistent with the expected 1r:1s ratio for a major gene (58t vs. 63s; $\chi^2_{(1t:1s)} = 0.207$).

A sequence comparison with the rice genome identified a syntenic region of 19 Mb on rice chromosome Os02 and further marker were developed by exploitation of a widely existing macrocollinearity to rice, *Brachypodium* and sorghum from public EST sequences and from the Genome Zipper. Out of 15 barley ESTs the unigenes U35_02578_540-712 and U35_16315_345-563 co-segregated with *Ryd3*. With DArT-marker bPb-3722 another co-segregating marker was identified by means of a bulked segregant analysis (BSA).

A test of the diagnostic value of the developed markers on a panel of 33 barley genotypes consisting of known *Ryd2* and *Ryd3* donors as well as susceptible cultivars showed that no single marker alone could consistently discriminate *Ryd3* from non-*Ryd3* genotypes, but the combination of the markers GBMS0107 and GBMS0135 could.

For *rym11* 5,102 F₂-plants of a cross between the susceptible cv. 'Naturel' with the resistant lines 'W757/612' and 'W757/112' were analysed with the co-dominant flanking markers HVM03 and

HVM68. Out of a set of 82 public markers 18 markers mapped in the 10.72 cM interval of HVM03 – HVM68. For the shortened marker-interval GBS0887 – GBS0506 100 RILs had a recombination event and the phenotypical analysis for resistance (r) vs. susceptibility (s) against BaMMV was consistent with the expected 1r:1s ratio (52r vs. 48s; $\text{Chi}^2_{(1r:1s)} = 0.163$).

A well preserved collinearity with rice chromosome Os03 was exploited for a synteny based marker saturation approach and could be automated after anchoring the genetic map of *rym11* with the Genome Zipper.

Besides marker development out of 17 informative unigenes additional 70 sequence-tagged-site (STS) markers were developed out of sequence information from the Genome Zipper and the markers U32_3699A and sel.1167 could be mapped. In the last step of marker saturation markers were developed out of 8 informative contigs of the cultivar 'Morex' and the markers C_1030750_B and C_1012894_B shortened the gene carrying interval to 0,074 cM, whereas the markers C_205243_B and C_205243_E1f&4730r were co-segregating with *rym11*. The polymorphism of marker C_205243_E1f&4730r is based on a 1,375 bp large deletion which causes in the resistant parents 'W757-112' und 'W757-612' a loss of function of the barley gene *HvPDIL5-1* so denying BaYMV and BaMMV a host factor.

5.1. Literatur zur Diskussion

- Abdurakhmonov IY, Abdulkarimov A (2008) Application of association mapping to understanding the genetic diversity of plant germplasm resources. *Int J Pl Genomic*: doi:10.1155/2008/574927
- Akhunov ED, Goodyear AW, Geng S, Qi L-L, Echaliier B, Gill BS, Miftahudin, Gustafson JP, Lazo G, Chao S, Anderson OD, Linkiewicz AM, Dubcovsky J, La Rota M, Sorrells ME, Zhang D, Nguyen HT, Kalavacharla V, Hossain K, Kianian FS, Peng J, Lapitan NVL, Gonzales-Hernandez JL, Anderson JA, Choi D-W, Close TJ, Dilbirigli M, Gill KS, Walker-Simmons MK, Steber C, McGuire PE, Qualset CO, Dvorak J (2003) The organization and rate of evolution of wheat genomes are correlated with recombination rates along chromosome arms. *Genome Res* 13:753-763
- Andersen JR, Lübberstedt T (2003) Functional markers in plants. *Trends Plant Sci* 8: 554–560
- Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815
- Aranzana MJ, Kim S, Zhao K, Bakker E, Horton M, Jakob K, Lister C, Molitor J, Shindo C, Tang C, Toomajian C, Traw B, Zheng H, Bergelson J, Dean C, Marjoram P, Nordborg M (2005) Genome-wide association mapping in *Arabidopsis* identifies previously known flowering time and pathogen resistance genes. *PLoS Genet* 1, e60. doi: 10.1371/journal.pgen.0010060
- Bauer E, Falque M, Walter H, Bauland C, Camisan C, Campo L, Meyer N, Ranc N, Ricent R, Schipprack W, Altmann T, Flament P, Melchinger AE, Menz M, Moreno González J, Ouzunova M, Revilla P, Charcosset A, Martin OC, Schön CC (2013) Intraspecific variation of recombination rate in maize. *Genome Biol* 14: R103
- Bauer E, Weyen J, Schiemann A, Graner A, Ordon F (1997) Molecular mapping of novel resistance genes against barley mild mosaic virus (BaMMV). *Theor Appl Genet* 95: 1263–1269
- Bennetzen JL, Freeling M (1993) Grasses as a single genetic system: genome composition, colinearity and compatibility. *Trends Genet* 9: 259–261
- Bhullar NK, Street K, Mackay M, Yahiaou N, Keller B (2009) Unlocking wheat genetic resources for the molecular identification of previously undescribed functional alleles at the *Pm3* resistance locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 9519-9524
- Brenchley R, Spannagl M, Pfeifer M, Barker GLA, D'Amore R, Allen AM, McKenzie N, Kramer M, Kerhornou A, Bolser D, Kay S, Waite D, Trick M, Bancroft I, Gu Y, Huo N, Luo MC, Sehgal S, Gill B, Kianian S, Anderson O, Kersey P, Dvorak J, McCombie WR, Hall A, Mayer KFX, Edwards KJ, Bevan MW, Hall N (2012) Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature* 491: 705-710
- Bruggeman R, Rostoks N, Kudrna D, Kilian A, Han F, Chen J, Druka A, Steffenson B, Kleinjohs A (2002) The barley stem rust-resistance gene *Rpg1* is a novel disease-resistance gene with homology to receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9328–9333

- Brunner S, Keller B, Feuillet C (2003) A large rearrangement involving genes and low-copy DNA interrupts the microcolinearity between rice and barley at the *Rph7* locus. *Genetics* 164: 673–683
- Burr B, Burr FA (1991) Recombinant inbreds for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations. *Trends in Genet* 7: 55–60
- Burr B, Burr FA, Thompson KH, Albertson MC and Stuber CW (1998) Gene mapping with recombinant inbreds in maize. *Genetics* 118: 519-526
- Büschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk J, Töpsch S, Vos P, Salamini F, Schulze-Lefert P (1997) The barley *Mlo* gene: A novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88: 695-705
- Caldwell KS, Langridge P, Powell W (2004) Comparative sequence analysis of the region harboring the hardness locus in barley and its colinear region in rice. *Plant Physiol* 136: 77–3190
- Chagné D, Krieger C, Rassam M, Sullivan M, Fraser J, André C, Pindo M, Troglio M, Gardiner SE, Henry RA, Allan AC, McGhie TK, Laing WA (2012) QTL and candidate gene mapping for polyphenolic composition in apple fruit. *BMC Plant Biol* 12: 12
- Choulet F, Wicker T, Rustenholz C, Paux E, Salse J, Leroy P, Schlub S, Le Paslier MC, Magdelenat G, Gonthier C, Couloux A, Budak H, Breen J, Pumphrey M, Liu S, Kong X, Jia J, Gut M, Brunel D, Anderson JA, Gill BS, Appels R, Keller B, Feuillet C (2010) Megabase level sequencing reveals contrasted organization and evolution patterns of the wheat gene and transposable element spaces. *Plant Cell* 22: 1686–1701
- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34: 475–483
- Close TJ, Bhat PR, Lonardi S, Wu YH, Rostoks N, Ramsay L, Druka A, Stein N, Svensson JT, Wanamaker S, Bozdog S, Roose ML, Moscou MJ, Chao SAM, Varshney RK, Szucs P, Sato K, Hayes PM, Matthews DE, Kleinhofs A, Muehlbauer GJ, DeYoung J, Marshall DF, Madishetty K, Fenton RD, Condamine P, Graner A, Waugh R (2009) Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics* 10: 582
- Cockram J, White J, Zuluaga DL, Smith D, Comadran J, Macaulay M, Luo Z, Kearsley MJ, Werner P, Harrap D, et al (2010) Genome-wide association mapping to candidate polymorphism resolution in the unsequenced barley genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 21611–21616
- Comadran J, Kilian B, Russell J, Ramsay L, Stein N, Ganai M, Shaw P, Bayer M, Thomas W, Marshall D, Hedley P, Tondelli A, Pecchioni N, Francia E, Korzun V, Walther A, Waugh R (2012) Natural variation in a homolog of *Antirrhinum CENTRORADIALIS* contributed to spring growth habit and environmental adaptation in cultivated barley. *Nature Genet* 44: 1388-1392
- Crismani W, Girard C, Mercier R (2013) Tinkering with meiosis. *J Exp Bot* 64: 55-65

- Dinka SJ, Campbell MA, Demers T, Raizada MN (2007) Predicting the size of the progeny mapping population required to positionally clone a gene. *Genetics* 176: 2035-2054
- Distelfeld A, Uauy C, Fahima T, Dubcovsky J (2006) Physical map of the wheat high-grain protein content gene *Gpc-B1* and development of a high-throughput molecular marker. *New Phytol* 169: 753-763
- Doležel J, Greilhuber J, Lucretti S, Meister A, Lysák MA, Nardi L, Obermayer R (1998) Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Ann Bot* 82: 17-26
- Durrett RT, Chen KY, Tanksley SD (2002) A simple formula useful for positional cloning. *Genetics* 160: 353-355
- Espinoza C, Schlechter R, Herrera D, Torres E, Serrano A, Medina C, Arce-Johnson P (2013) Cisgenesis and intragenesis: New tools for improving crops. *Biol Res* 46: 323-331
- Faris JD, Fellers JP, Brooks SA, Gill BS (2003) A bacterial artificial chromosome contig spanning the major domestication locus *Q* in wheat and identification of a candidate gene. *Genetics* 164: 311-321
- Ferreira A, Flores da Silva M, da Costa e Silva L, Damião Cruz C (2006) Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genet Mol Biol* 29: 187-192
- Forster BP, Herberle-Bors E, Kasha KJ, Touraev A (2007) The resurgence of haploids in higher plants. *Trends Plant Sci* 12: 368-375
- Franckie M G, Walker E, Crawford A C, Broughton S, Ohm H W, Barclay I, Wilson R E, McLean R (2008) Comparison of genetic and cytogenetic maps of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR and DArT markers. *Mol Genet Genomics* 281: 181-191
- Ganal MW, Tanksley SD (1996) Recombination around the *Tm2a* and *Mi* resistance genes in different crosses of *Lycopersicon peruvianum*. *Theor Appl Genet* 92: 101-108
- Gaut BS, Long AD (2003) The lowdown on linkage disequilibrium. *Plant Cell* 15: 1502-1506
- Gilbert J, Ou W, Silver J, Benjamin T (2006) Downregulation of protein disulfide isomerase inhibits infection by the mouse polyomavirus. *J Virol* 80: 10868-10870
- Gottwald S (2004) Genetische und physische Feinkartierung im Bereich des *gai* Verzweigungsgens auf dem Chromosom 2HS der Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Doktorarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. 169 S.
- Gottwald S, Stein N, Börner A, Sasaki T, Graner A (2004) The gibberellic-acid insensitive dwarfing gene *sdw3* of barley is located on chromosome 2HS in a region that shows high colinearity with rice chromosome 7L. *Mol Genet Genomics* 271: 426-436
- Graner A, Streng S, Kellermann A, Schiemann A, Bauer E, Waugh R, Pellio B, Ordon, F (1999) Molecular mapping and genetic fine-structure of the *rym5* locus encoding resistance to different strains of the barley yellow mosaic virus complex. *Theor Appl Genet* 98: 285-290

- Habekuss A, Kühne T, Krämer I, Rabenstein F, Ehrig F, Ruge-Wehling B, Huth W, Ordon, F (2008) Identification of barley mild mosaic virus isolates in Germany breaking *rym5* resistance*. J Phytopathol 156: 36-41
- Halterman D, Zhou F, Wie F, Wise RP, Schulze-Lefert (2001) The *MLA6* coiled-coil, NBS-LRR protein confers *AvrMla6*-dependent resistance specificity to *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in barley and wheat. Plant J 25: 335-348
- Han F, Kilian A, Chen JP, Kudrna D, Steffenson B, Yamamoto K, Matsumoto T, Sasaki T, Kleinjans A (1999) Sequence analysis of a rice BAC covering the syntenous barley *Rpg1* region. Genome 42: 1071-1076
- Hanemann A (2009) Fine mapping and marker development for the resistance gene *Rrs2* against *Rhynchosporium secalis* in barley. Doktorarbeit, Technische Universität München. 216 S.
- 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
- He P, Li JZ, Zheng XW, Shen LS, Lu CF, Chen Y, Zhu LH (2001) Comparison of molecular linkage maps and agronomic trait loci between DH and RIL populations derived from the same rice cross. Crop Sci 41: 1240-1246
- Hearnden PR, Eckermann PJ, McMichael GL, Hayden MJ, Eglinton JK, Chalmers KJ (2007) A genetic map of 1,000 SSR and DArT markers in a wide barley cross. Theor Appl Genet 115: 383-391
- Henry CM, Bell GJ, Hill SA (1992) The effect of methyl bromide fumigation on rhizomania inoculum in the field. Plant Pathol 41: 483-489
- Hofinger BJ, Russell JR, Bass CG, Baldwin T, Dos Reis M, Hedley PE, Li YD, Macaulay M, Waugh R, Hammond-Kosack KE, Kanyuka K (2011) An exceptionally high nucleotide and haplotype diversity and a signature of positive selection for the *eIF4E* resistance gene in barley are revealed by allele mining and phylogenetic analyses of natural populations. Mol Ecol: 3653-3668
- Huang L, Brooks SA, Li W, Fellers JP, Trick HN, Gill BS (2003) Map-based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploid genome of bread wheat. Genetics 164: 655-664
- Huth W, Adams MJ (1990) Barley yellow mosaic virus BaYMV and BaYMV-M: Two different viruses. Intervirology 31: 38-42
- Isidore E, Scherrer B, Bellec A, Budin K, Faivre-Rampant P, Waugh R, Keller B, Caboche M, Feuillet C, Chalhouh, B (2005) Direct targeting and rapid isolation of BAC clones spanning a defined chromosome region. Funct Integr Genomics 5: 97-103
- Jander G, Norris SR, Rounsley SD, Bush DF, Levin IM, Last RL (2002) *Arabidopsis* map-based cloning in the post-genome era. Plant Physiol 129: 440-450

- Kennedy TF, Connery J (2011) Control of *barley yellow dwarf virus* in minimum-till and conventional-till autumn-sown cereals by insecticide seed and foliar spray treatments. *J Agr Sci* 150:249-262
- Komatsuda T, Tanno K (2004) Comparative high resolution map of the six-rowed spike locus 1 (*vrs1*) in several populations of barley, *Hordeum vulgare* L. *Hereditas* 141:68–73
- Komatsuda T, Pourkheirandish M, He C, Azhaguvel P, Kanamori H, Perovic D, Stein N, Graner A, Wicker T, Tagiri A, Lundqvist U, Fujimura T, Matsuoka M, Matsumoto T, Masahiro YM (2007) Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1424–1429
- Krattinger S, Wicker T, Keller B (2009) Map-based cloning of genes in *Triticeae* (wheat and barley). In Feuillet C, Muehlbauer GJ (eds) *Genetics and Genomics of the Triticeae*. Springer, Berlin: 337-357
- Krutovskii KV, Neale DB (2001) Forest genomics for conserving adaptive genetic diversity. *Forest Genetic Resources Working Papers, Working Paper FGR/3*. Forest Resources Development Service, Forest Resources Division. FAO, Rome
- Kumar GR, Sakthivel K, Sundaram RM, Neeraja CN, Balachandran SM, Rani NS, Viraktamath BC, Madhav MS (2010) Allele mining in crops: prospects and potentials. *Biotechnol Adv* 28: 451-461
- Künzel G, Korzun L, Meister A (2000) Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics* 154: 397–412
- Lahaye T, Hartmann S, Töpsch S, Freialdenhoven A, Yano M, Schulze-Lefert P (1998) High-resolution genetic and physical mapping of the *Rar1* locus in barley. *Theor Appl Genet* 97: 526-534
- Langridge P, Fleury D (2011) Making the most of 'omics' for crop breeding. *Trends Biotechnol* 29: 33-40
- Ling HQ, Zhu Y, Keller B (2003) High-resolution mapping of the leaf rust disease resistance gene *Lr1* in wheat and characterization of BAC clones from the *Lr1* locus. *Theor Appl Genet* 106: 875–882
- 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 (2013a) Genomics-based high-resolution mapping of the BaMMV/BaYMV resistance gene *rym11* in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 126: 1201-1212
- Lüpken T, Stein N, Perovic D, Habekuß A, Serfling A, Krämer I, Hähnel U, Steuernagel B, Scholz U, Ariyadasa R, Martis M, Mayer KFX, Niks RE, Collins NC, Friedt W, Ordon F (2014) High resolution mapping of the barley *Ryd3* locus controlling tolerance to BYDV. *Mol Breed* 33: 477-488
- Ma Z, Weining S, Sharp PJ, Liu C (2000) Non-gridded library: a new approach for BAC (bacterial artificial chromosome) exploitation in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Nucl Acids Res* 28:e106. doi:10.1093/nar/28.24.e106

- Mammadov JA, SteVenson BJ, Saghai-Maroofof MA (2005) High-resolution mapping of the barley leaf rust resistance gene Rph5 using barley expressed sequence tags (ESTs) and synteny with rice. *Theor Appl Genet* 111: 1651–1660
- Marcel TC, Aghnoum R, Durand J, Varshney RK, Niks RE (2007a) Dissection of the barley 2L1.0 region carrying the '*Laevigatum*' quantitative resistance gene to leaf rust using Near-Isogenic Lines (NIL) and subNIL. *Mol Plant Microbe In* 20: 1604–1615
- Marcel TC, Varshney RK, Barbieri M, Jafary H, de Kock MJD, Graner A, Niks RE (2007b) A high-density consensus map of barley to compare the distribution of QTLs for partial resistance to *Puccinia hordei* and of defence gene homologues. *Theor Appl Genet* 114: 487–500
- Marcel TC, Kohutova Z, Huneau C, Niks RE, Chalhoub B (2010) Two non-gridded BAC libraries of barley for the identification of genes involved in basal resistance to cereal rusts. In: Proceedings of the 10th International Barley Genetics Symposium. Alexandria, Egypt 5-10 Apr 2008. (p. 367). ICARDA
- Martinez-Perez E, Moore G (2008) To check or not to check? The application of meiotic studies to plant breeding. *Curr Opin Plant Biol* 11: 222-227
- 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 (2013) Barley whole exome capture: a tool for genomic research in the genus *Hordeum* and beyond. *Plant J* 76: 494-505
- Mayer KFX, Martis M, Hedley PE, Šimková H, Liu H, Morris JA, Steuernagel B, Taudien S, Roessner S, Gundlach H, Kubaláková M, Suchánková 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, Doležel J, Waugh R, Stein N (2011) Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. *Plant Cell* 23: 1249-1263
- Mendel G (1866) Versuche über Pflanzenhybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brunn* 44: 3 - 47
- Miedaner T, Reinbrecht C, Lauber U, Schollenberger M, Geiger H H (2001) Effects of genotype and genotype-environment interaction on deoxynivalenol accumulation and resistance to Fusarium head blight in rye, triticale, and wheat. *Plant Breed* 120: 97-105
- Neu C, Stein N, Keller B (2002) Genetic mapping of the *Lr20 Pm1* resistance locus reveals suppressed recombination on chromosome arm 7AL in hexaploid wheat. *Genome* 45: 737-744
- Niks RE, Habekuss A, Bekele B, Ordon F (2004) A novel major gene on chromosome 6H for resistance of barley against the barley yellow dwarf virus. *Theor Appl Genet* 109: 1536–1543

- Nissan-Azzouz F, Graner A, Friedt W, Ordon F (2005) Fine-mapping of the BaMMV, BaYMV-1 and BaYMV-2 resistance of barley (*Hordeum vulgare*) accession PI1963. *Theor Appl Genet* 110: 212–218
- Ordon F, Friedt W (1993) Mode of inheritance and genetic diversity of BaMMV-resistance of exotic barley germplasm carrying genes different from 'rym4'. *Theor Appl Genet* 86: 229–230
- Ordon F, Perovic D (2013) Virus Resistance in Barley. In: Varshney R, Tuberosa R (eds) *Translational Genomics for Crop Breeding: Biotic Stress, Volume 1*. John Wiley & Sons, 63-75
- 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.). *Theor Appl Genet* 110: 283–293
- Perovic D, Stein N, Zhang H, Drescher A, Prasad M, Kota R, Kopahnke D, Graner A (2004) An integrated approach for comparative mapping in rice and barley with special reference to the *Rph16* resistance locus. *Funct Integr Genomics* 4: 74-83
- Petes TD (2001) Meiotic recombination hot spots and cold spots. *Nat Rev Genet* 2: 360–369
- 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, e32253
- Pourkheirandish M, Wicker T, Stein N, Fujimura T, Komatsuda T (2007) Analysis of the barley chromosome 2 region containing the six-rowed spike gene *vrs1* reveals a breakdown of rice-barley micro colinearity by a transposition. *Theor Appl Genet* 114: 1357-65
- Qiu JW, Schürch AC, Yahiaoui N, Dong LL, Fan HJ, Zhang ZJ, Keller B, Ling HQ (2007) Physical mapping and identification of a candidate for the leaf rust resistance gene *Lr1* of wheat. *Theor Appl Genet* 115: 159-168
- Ramsay L, Macaulay M, degli Ivanissevich S, MacLean K, Cardle L, Fuller J, Edwards KJ, Tuveesson S, Morgante M, Massari A, Maestri E, Marmioli N, Sjakste T, Ganai M, Powell W, Waugh R (2000) A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics* 156: 1997–2005
- Ramsay L, Comadran J, Druka A, Marshall DF, Thomas WT, Macaulay M, MacKenzie K, Simpson C, Fuller J, Bonar N, Hayes PM, Lundqvist U, Franckowiak JD, Close TJ, Muehlbauer GJ, Waugh R (2011) *INTERMEDIUM-C*, a modifier of lateral spikelet fertility in barley, is an ortholog of the maize domestication gene *TEOSINTE BRANCHED 1*. *Nat Genet* 43: 169–172
- Saisho D, Myoraku E, Kawasaki S, Sato K, Takeda K (2007) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for Japanese malting barley 'Haruna Nijo'. *Breed Sci* 57: 29-38

- SanMiguel P, Gaut BS, Tikhonov A, Nakajima Y, Bennetzen JL (1998) The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nat Genet* 20: 43-45
- Sato K, Nankaku N, Takeda K (2009) A high-density transcript linkage map of barley derived from a single population. *Heredity* 103: 110-117
- Schelhaas M, Malmström J, Pelkmans L, Haugstetter J, Ellgaard L, Grünewald K, Helenius A (2007) Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell* 131: 516-529
- Scheurer KS, Friedt W, Huth W, Waugh R, Ordon F (2001) QTL analysis of tolerance to a German strain of BYDV-PAV in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 103: 1074–1083
- Schneider K (2005) Mapping populations and principles of genetic mapping. In: Meksem K, Kahl G (eds) *The Handbook of Plant Genome Mapping*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim: 3-19
- Schouten HJ, Krens FA, Jacobsen E (2006) Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO reports* 7: 750-753
- Schulte D, Ariyadasa R, Shi B, Fleury D, Saski C, Atkins M, deJong P, Wu CC, Graner A, Langridge P, Stein N (2011) BAC library resources for map-based cloning and physical map construction in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Genomics* 12: 247
- Schuster SC (2007) Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods* 5: 16-18
- Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjioudjop M N (2006) Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *Afr J Biotechnol* 5: 2569-2587
- Shahinnia F, Druka A, Franckowiak J, Morgante M, Waugh R, Stein N (2012) High resolution mapping of *Dense spike-ar (dsp. ar)* to the genetic centromere of barley chromosome 7H. *Theor Appl Genet* 124: 373-384
- Silvar C, Perovic D, Nussbaumer T, Spannagl M, Usadel B, Casas A, Igartua E, Ordon F (2013) Towards positional isolation of three quantitative trait loci conferring resistance to powdery mildew in two Spanish barley landraces. *PLoS one*, 8(6), e67336
- Spielmeier W, Moullet O, Laroche A, Lagudah ES (2000) Highly recombinogenic regions at seed storage protein loci on chromosome 1DS of *Aegilops tauschii*, the D-genome donor of wheat. *Genetics* 155: 361–367
- Stackelberg M von, Rensing SA, Reski R (2006) Identification of genic moss SSR markers and a comparative search in twenty-four algal and plant gene indices reveal species-specific rather than group-specific characteristics of microsatellites. *BMC Plant Biol* 6: 9
- Stein N, Feuillet C, Wicker T, Schlagenhauf E, Keller B (2000) Subgenome chromosome walking in wheat: A 450-kb physical contig in *Triticum monococcum* L. spans the *Lr10* resistance locus in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13436-13441

- Stein N, Graner A (2004) Map based gene isolation in cereal genomes. In: Gupta PK, Varshney RK (eds) Cereal genomics. Kluwer, Dordrecht: 331–360
- Stein N, Perovic D, Kumlehn J, Pellio B, Stracke S, Steng S, Ordon F, Graner A (2005) The eukaryotic translation initiation factor *4E* confers multiallelic recessive bymovirus resistance in *Hordeum vulgare* (L.). Plant J 42: 912–922
- Stein N, Prasad M, Scholz U, Thiel T, Zhang H, Wolf M, Kota R, Varshney RK, Perovic D, Graner A (2007) A 1000 loci transcript map of the barley Genome — new anchoring points for integrative grass genomics. Theor Appl Genet 114: 823–839
- Stirling B, Newcombe G, Vrebalov J, Bosdet I, Bradshaw HD (2001) Suppressed recombination around the *MXC3* locus, a major gene for resistance to poplar leaf rust. Theor Appl Genet 103: 1129–1137
- Treuren R van, van Hintum TJJ (2009) Comparison of anonymous and targeted molecular markers for the estimation of genetic diversity in ex situ conserved *Lactuca*. Theor Appl Genet 119: 1265–1279
- The International Barley Genome Sequencing Consortium (IBSC) (2012) A physical, genetical and functional sequence assembly of the barley genome. Nature 491: 711–716
- 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 Evol Biol 9:209
- Uauy C, Distelfeld A, Fahima T, Blechl A, Dubcovsky J (2006) A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. Science 314: 1298–1301
- Varshney RK, Marcel TC, Ramsay L, Russell J, Röder M S, Stein N, Waugh R, Langridge P, Niks RE, Graner A (2007) A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. Theor Appl Genet 114: 1091–1103
- Wang Z, Zhou Z, Guo ZY, Chi CW (2010) Snapshot of the interaction between HIV envelope glycoprotein 120 and protein disulfide isomerase. Acta Bioch Bioph Sin 42: 358–362
- Waugh R, Jannink JL, Muehlbauer GJ, Ramsay L (2009) The emergence of whole genome association scans in barley. Curr Opin Plant Biol 12: 218–222
- Wei F, Gobelman-Werner K, Morroll SM, Kurth J, Mao L, Wing R, Leister D, Schulze-Lefert P, Wise RP (1999) The *Mla* (powdery mildew) resistance cluster is associated with three NBS-LRR gene families and suppressed recombination within a 240-kb DNA interval on chromosome 5S (1HS) of barley. Genetics 153: 1929–1948
- Wijnker E, de Jong H (2008) Managing meiotic recombination in plant breeding. Trends Plant Sci 13: 640–646
- Wu J, Mizuno H, Hayashi-Tsugane M, Ito Y, Chiden Y, Fujisawa M, Katagiri S, Saji S, Yoshiki S, Karasawa W, Yoshihara R, Hayashi A, Kobayashi H, Ito K, Hamada M, Okamoto M, Ikeno M,

- Ichikawa Y, Katayose Y, Yano M, Matsumoto T, Sasaki T (2003) Physical maps and recombination frequency of six rice chromosomes. *Plant J* 36: 720-730
- Wu Y, Close TJ, Lonardi S (2008) On the accurate construction of consensus genetic maps. *Comput Syst Bioinformatics Conf* 7: 285-96
- Xu Y, Zhu L, Xiao J, Huang N, McCouch SR (1997) Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F₂, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.) *Mol Gen Genet* 253: 535-545
- Yang HY, You AO, Yang ZF, Zhang F, He RF, Zhu L, He G (2004) High-resolution genetic mapping at the *Bph15* locus for brown planthopper resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 110: 182–191
- Yang P, Perovic D, Habekuß A, Zhou R, Graner A, Ordon F, Stein N (2013) Gene-based high-density mapping of the gene *rym7* conferring resistance to Barley mild mosaic virus (BaMMV). *Mol Breed* 32: 27-37
- Yang P, Lüpken T, Habekuss A, Hensel G, Steuernagel B, Kilian B, Ariyadasa R, Himmelbach A, Kuhmlehn J, Scholz U, Ordon F, Stein N (2014) *PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE LIKE 5-1* is a susceptibility factor to plant viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 2104-2109
- Yang (2014) Map-based cloning of susceptibility factors for *Bymovirus* in barley (*H. vulgare* L.). Doktorarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. 138 S.
- Yu Y, Tomkins JP, Waugh R, Frisch DA, Kudrna D, Kleinhofs 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
- Zhou F, Kurth J, Wei F, Elliott C, Valè G, Yahiaoui N, Keller B, Sommerville S, Wise R, Schulze-Lefert P (2001) Cell-autonomous expression of barley *Mla1* confers race-specific resistance to the powdery mildew fungus via a Rar1-independent signaling pathway. *Plant Cell* 13: 337-350

6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kartierte Resistenzgene gegen die Gelbmosaikvirose (modifiziert nach Werner et al. 2003a)

Tabelle 2: Isolierte Resistenzgene der Triticeae (modifiziert nach Hanemann 2009)

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Fruchtbare Halbmond (grün). (Abbildung Feuillet et al. 2008).

Abbildung 2: Der Genpool der Gerste (modifiziert nach Bothmer et al. 1992).

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. hc. Wolfgang Friedt für die wissenschaftliche Begleitung an der Justus-Liebig-Universität Giessen bedanken. Auch allen Kolleginnen und Kollegen am Julius Kühn-Institut möchte ich für ihre Hilfe, Ideen und Begleitung danken, hier ganz besonders Frau Karin Ernst, Frau Dr. Antje Habekuss und Frau Dörte Grau, Frau Dr. Ilona Krämer und Frau Ilona Renneberg, Herrn Dr. Dragan Perovic und Frau Marlis Weilepp. Riesendank auch an Nina Meyer.

Herrn Dir. und Prof. Prof. Dr. Ordon gilt mein Dank für die Überlassung des Themas und die Betreuung während der Zeit am Julius Kühn-Instituts und der Promotion.

Weiterhin möchte ich mich bei den einzelnen Mitgliedern des BARLEX-Projekts, hier vor allem bei Herrn Dr. Nils Stein, Herrn Dr. Uwe Scholz und Herrn Dr. Burkhard Steuernagel, Herrn Dr. Klaus Mayer und Frau Dr. Mihaela Martis bedanken, besonders auch für die Bereitstellung unveröffentlichter Informationen.

Dem BMBF gilt mein Dank für die finanzielle Unterstützung des zugrunde liegenden Forschungsprojektes.

Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich: Die vorgelegte Dissertation habe ich selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus Liebig Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Thomas Lüpken

