

USING MOLECULAR MARKERS FOR GENETIC DIVERSITY TESTING IN SPRING BARLEY WITH DIFFERENT SENSITIVITY AGAINST FHB

TESTOVÁNÍ GENETICKÉ DIVERZITY JEČMENE JARNÍHO S RŮZNOU CITLIVOSTÍ VŮČI FHB MOLEKULÁRNÍMI MARKERY

Ježíšková I., Bednář J.

Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: xjezisko@node.mendelu.cz, bednar@mendelu.cz

ABSTRACT

Seven parental genotypes of spring barley with different sensitivity against FHB were tested to a genetic diversity using 80 RAPD and 60 SSR markers. The results of analysis by DNA markers confirm declared sensitivity of parental genotypes on molecular level. We located RAPD and also SSR markers which are specific only for resistant genotypes or only for susceptible barley genotypes against FHB. Finished analysis and obtained data documentate suitability of tested molecular markers for next analysis – analysis of offspring.

Keywords: Fusarium head blight, FHB, barley, molecular markers, SSR, RAPD, SCAR

ABSTRAKT

U 7 rodičovských genotypů ječmene jarního s různou citlivostí vůči FHB byla testována genetická diverzita pomocí 80 RAPD a 60 SSR markerů. Výsledky analýz DNA markery potvrzují deklarovanou citlivost rodičovských genotypů vůči FHB také na molekulární úrovni. V rámci analýz byly nalezeny RAPD i SSR markery umožňující v testovaném souboru rozlišit genotypy náchylné od genotypů rezistentních a také markery umožňující odlišit jednotlivé genotypy mezi sebou v rámci testovaného souboru. Provedené analýzy a získané výsledky dále prokazují vhodnost použití zvolených molekulárních markerů pro testování potomstev vzniklých z křížení rodičovských genotypů.

Klíčová slova: Fusariové vadnutí klasů, FHB, ječmen, molekulární markery, SSR, RAPD, SCAR

ÚVOD

Fusariové vadnutí klasů (Fusarium Head Blight, FHB) je celosvětově rozšířeným houbovým onemocněním obilovin, které může významně redukovat výnosy, ale také snižovat kvalitu a zdravotní nezávadnost získaného zrna. Onemocnění vyvolávají některé druhy rodu *Fusarium*. V našich podmínkách se jedná zejména o *F. culmorum*, *F. graminearum* (*Giberella zeae*) a *F. poae*. Mezi faktory ovlivňující rozsah možného napadení řadíme vlastní

rezistenci odrůdy, virulenci patogena, míru fyziologického stresu, kterému jsou rostliny v polních podmínkách vystaveny a schopnost rostliny degradovat vytvářené mykotoxiny (Sýkorová a Papoušková, 2001). Je-li FHB napadeno osivo, projeví se onemocnění v nestejném vzcházení, špatném vývoji klíčících rostlin a nevyrovnanosti porostu. Největší škody však vznikají jsou-li FHB napadeny klasy. Onemocnění se projevuje zasycháním jednotlivých klásků (jež jsou pak v plné zralosti sterilní) nebo celých částí klasu. U některých, silně napadených klasů postupuje vadnutí až do hnědavého zabarvení podklasového internodia. Tento příznak je způsoben růstem houbových vláken z místa primární infekce do celého klasu a souběžnou produkcí mykotoxinů. Toxiny nejsou, podle posledních výzkumů (Pekkarinen et al., 2000), transportovány cévními svazky rostliny do jejich různých částí, ale pouze následují prorůstání houbových vláken. Z fusariových fytotoxinů bývá v zrně v nejvyšší koncentraci obsažen mykotoxin deoxynivalenol (DON), který se tak považuje za indikátor možné kontaminace dalšími fusariovými mykotoxiny (Velíšek, 1999). Značná tepelná a chemická stabilita fusariových mykotoxinů může způsobovat problémy následným zpracovatelům zrna. Použití zrna ječmene kontaminovaného deoxynivalenolem při výrobě piva, může přispět ke vzniku gushingu piva, tj. jeho nadměrnému přepěňování (tzv. divoké pivo). Možné jsou také přímé intoxikace člověka či zvířat konzumací kontaminované potravy. Tyto se projevují postižením trávicího traktu záněty, zvracením a průjmy doprovázené bolestmi hlavy. V dalším stádiu pak zpravidla dochází k poškození imunitního systému. Mezi faktory usnadňující šíření FHB patří pěstování náchylných odrůd, změny v pěstitelské praxi a dále pak nevhodné tj. příliš vlhké počasí během metání a nalévání zrna. Ochrana před FHB může být nejlépe prováděna přes integrovaná pěstitelská opatření, přímou aplikaci fungicidních přípravků a šlechtění a zavádění nových odolných odrůd do praxe (Steffenson, 2003). Za významný zdroj rezistence vůči FHB je celosvětově považována šestiřadá odrůda nesladovnického ječmene Chevron, původem ze Švýcarska. Ze sortimentu u nás registrovaných odrůd jarního ječmene vykazují vyšší odolnost vůči FHB odrůdy Forum a Olbram (Šíp, 2001).

Cílem práce bylo zhodnotit genetickou diverzitu u 7 vybraných rodičovských genotypů ječmene jarního a 7 rodičovských genotypů ječmene ozimého, s různou citlivostí vůči FHB, pomocí molekulárních markerů. Získané výsledky pak využít při testování potomků vzniklých z křížení rodičovských genotypů.

MATERIÁL A METODIKA

Hodnocení genetické diverzity molekulárními markery bylo provedeno u 7 vybraných genotypů ječmene jarního s deklarovanou rezistencí resp. náchylností vůči FHB (tab. 1). Osivo bylo získáno z kolekce genetických zdrojů ZVÚ Kroměříž, s. r. o. Testování genetické příbuznosti bylo provedeno analýzou 80 RAPD (Random Polymorphic DNA) a 60 SSR (Simple Sequence Repeats) markerů.

Tab. 1 Charakteristika testovaných rodičovských genotypů ječmene jarního

Genotyp	Původ	Země původu	FHB reakce	*
CHEVRON	CIho 1111 (PI38061)= Landrace from Luzerne	CHE	rezistentní	6
PEC 210	Embrapa 128	BRA	rezistentní	2
CI 4196	PI 64275 (hang wang ta mai)= Landrace from Beijing	USA	stř. rezistentní	2
ZAO ZHOU 3	Cultivar in East China, Zhejiang University, Hangzhou	CHIN	stř. rezistentní	2
6NDRFG-1	PI 615583; North Dakota Agric. Experiment Station, USA	USA	stř. rezistentní	6
FOSTER	Robust/ 3/ Hanzen/Glenn/Karl	USA	velmi náchylná	6
PI 383933	Kanto Nijo2= Ko. 1018/Kyoto Nakate from Japan	USA	velmi náchylná	6

* řadovost

Izolace DNA: celková genomová DNA byla izolována z listů mladých rostlin (ve stáří 6 dní) izolačním kitem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, GE). Kvantita vyzolované DNA byla ověřována spektrofotometricky.

PCR reakce: Pro analýzy mikrosatelitů byla připravována reakční směs o celkovém objemu 25 µl. Reakční směs obsahuje: 30 ng templátové DNA, 0,5U *Taq* polymerázy (Promega, USA), 1x pufru pro *Taq* polymerázu, 0,1mM každého dNTP a 0,3 mM přímého a zpětného primeru. Reakční podmínky PCR: počáteční denaturace 1 min. při 98°C, následuje 40 cyklů - denaturace 10 sec. při 98°C, annealing 15 sec. při 60°C, elongace 30 sec. při 72°C a závěrečná elongace 5 min. při 72°C.

Pro RAPD analýzy byla připravována reakční směs o celkovém objemu 25µl. Reakční směs obsahuje 0,4 U polymerázy (Finnzymes, FIN), 1x alikvotního PCR pufru, 0,25 mM každého dNTP, 20 ng primeru a 30 ng templátové DNA. Reakční podmínky PCR: 1 min. počáteční denaturace při 94 °C, následuje 45 cyklů - 1 min. při 94 °C, 2 min. při 35 °C, 1 min. při 72 °C a závěrečná elongace 10 min. při 72 °C.

Vizualizace SSR markerů:

- horizontální elektroforéza při 300V na 30% nedenaturačním polyakrylamidovém gelu v TE pufru s následným barvením stříbrem (0,2% AgNO₃) a SYBRGoldem (Molecular Probes, USA),
- vertikální elektroforéza při 78 V na 3,5% MetaPhor agarosovém gelu s obsahem ethidiumbromidu v TAE pufru (poměr MetaPhor agarosa (Cambrex, USA): agarosa SERVA (Serva, USA) - 2:1),
- kapalinová elektroforéza - stanovení na genetickém analyzátoru ABI PRISM AVANT (Applied Biosystem, USA) metodou fragmentační analýzy na polymeru POP 4. Primery "forward" byly značeny fluorescenčními značkami VIC, NED, 6 - FAM, PET. Fluorescenční značka LIZ byla použita pro hmotnostní standard.

Vizualizace RAPD markerů: vertikální elektroforéza při 67 V na 1,5% agarosovém gelu (Serva, USA) s obsahem ethidiumbromidu v TAE pufru.

Statistické vyhodnocení získaných výsledků - získané elektroforeogramy byly převedeny do podoby binárních matic reprezentované přítomností (1) nebo absencí (0)

výsledných alel. Matice byly vyhodnoceny pomocí software FreeTree ver. 9.1 s využitím konstrukční metody UPGMA a podobnostního koeficientu dle Jaccarda. Ke grafickému vyjádření matice byl využit software TreeView ver. 1.6.

VÝSLEDKY A DISKUSE

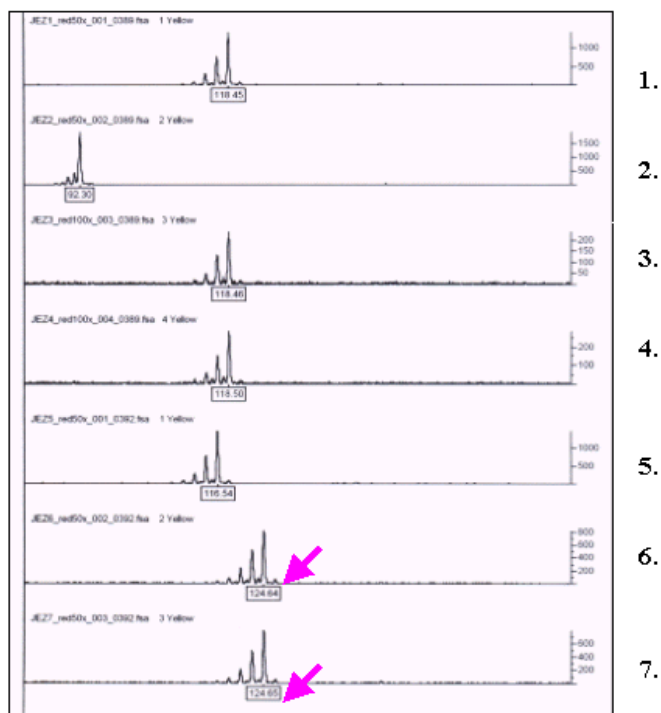
U 7 výchozích rodičovských genotypů ječmene jarního byla provedena analýza mikrosatelitními a RAPD markery. Z celkového počtu 60 testovaných SSR markerů bylo u analyzovaných genotypů 8 SSR markerů monomorfních, zbylých 52 SSR markerů mělo polymorfní charakter. V rámci analýz byly nalezeny 2 SSR markery (EBmac806 a Bmag382), díky nimž je možné od sebe odlišit skupinu genotypů deklarovaných jako rezistentní od ostatních testovaných genotypů a 1 SSR marker (Bmag353), který umožňuje odlišení genotypů deklarovaných jako náchylné od ostatních testovaných genotypů (obr. 1). Výsledky analýz SSR markerů byly zpracovány do podoby dendrogramu, který charakterizuje genetickou příbuznost testovaných genotypů (obr.2). Dendrogram ukazuje rozdělení testovaných genotypů do dvou hlavních shluků. První shluk je možné rozdělit do dvou podskupin. Do první podskupiny byly zařazeny genotypy Chevron a PEC 210, které literatura uvádí jako rezistentní. Druhou podskupinu tvoří genotypy Zao Zhou 3 a 6NDRFG-1 literaturou definované jako středně rezistentní a rezistentní genotyp Foster. Do stejné podskupiny byl zařazen také genotyp Foster, který literatura uvádí jako genotyp náchylný. Druhý – samostatný shluk, tvoří genotyp PI 383933, který je v literatuře uváděn jako genotyp náchylný. Výsledný dendrogram nepotvrdil vzájemné shlukování genotypů se stejným původem, ani genotypů se stejnou řadovostí klasů. Dále byl soubor rodičovských genotypů ječmene jarního testován 80 RAPD markery. 72 testovaných RAPD markerů poskytlo u testovaných genotypů polymorfní charakter, zbylých 8 RAPD markerů bylo monomorfních, a to nejméně při dvou opakovaných analýzách. Byl nalezen RAPD marker (H30), který umožňuje odlišení velmi náchylných rodičovských genotypů od ostatních rezistentních, resp. středně rezistentních genotypů (obr. 3) na základě fragmentu o velikosti cca 1300bp. U tohoto fragmentu se předpokládá jeho převedení na SCAR marker (Sequence Characterise Amplified Regions). Testovaná genetická diverzita vybraných genotypů byla vyjádřena formou dendrogramu, který opět umožňuje rozlišení dvou velkých shluků (obr.4). První – zcela samostatný, tvoří náchylný genotyp PI 383933. Druhý se rozpadá do dvou podskupin. První podskupinu tvoří genotyp 6NDRFG-1, deklarovaný jako středně rezistentní a rezistentní genotypy CI 4196 a PEC 210. Druhou podskupinu tvoří středně rezistentní genotyp Zao Zhou 3 a rezistentní genotyp Chevron. Do stejné podskupiny připadl ještě genotyp Foster, literaturou uváděný jako genotyp vůči FHB velmi náchylný.

ZÁVĚR

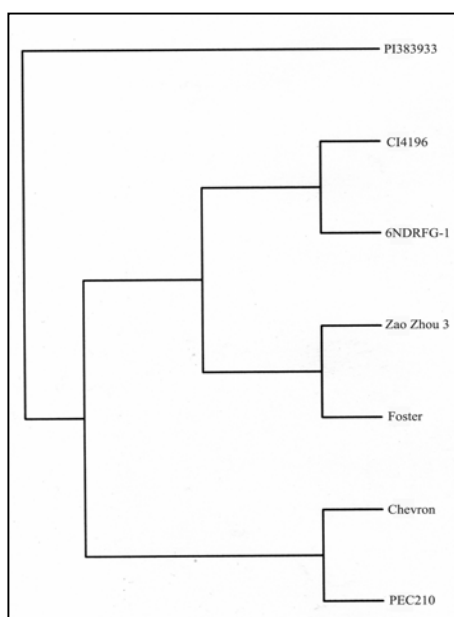
V práci byly pro testování genetické diverzity 7 rodičovských genotypů ječmene jarního použity mikrosatelitní a RAPD markery. Výsledky analýz u rodičovských genotypů ukazují na vhodnost použití těchto typů markerů také pro následné testování potomků vzniklých křížením rodičovských genotypů. Úspěšné převedení RAPD fragmentu,

charakteristického pro skupinu náchylných testovaných genotypů ječmene jarního, o velikosti 1300 bp z profilu markeru H30, na specifický SCAR marker, by umožnilo urychlit a zpřesnit další navazující analýzy potomstva.

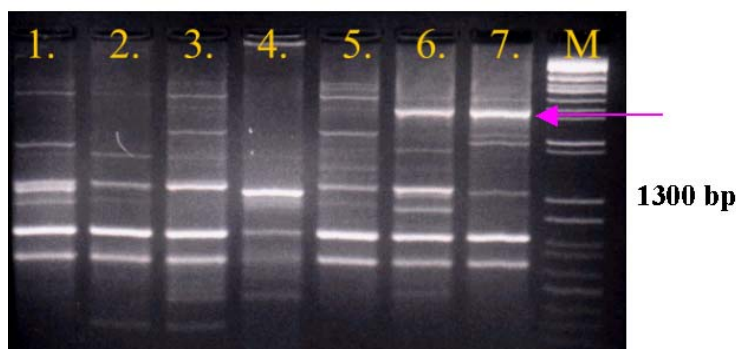
Obr. 1 Výsledky analýzy SSR markeru Bmag353 na kapalinové elektroforéze. Šipka naznačuje produkt o velikosti 124 bp, který je charakteristický pro skupinu 2 genotypů ječmene jarního náchylných vůči FHB. (1) – Chevron, (2) – PEC 210, (3) CI 4196, (4) – Zao Zhou 3, (5) – 6 NDRFG-1, (6) Foster, (7) PI 383933.



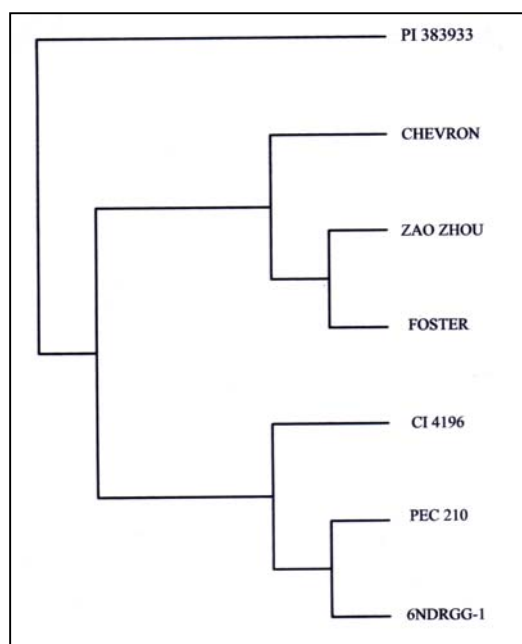
Obr. 2 Dendrogram charakterizující genetickou příbuznost testovaných rodičovských genotypů ječmene jarního na základě analýz 60 SSR markerů.



Obr.3 Elektroforeogramy 7 rodičovských genotypů po analýze RAPD markerem H30, (1) – Chevron, (2) – PEC 210, (3) CI 4196, (4) – Zao Zhou 3, (5) – 6 NDRFG-1, (6) Foster, (7) PI 383933. Šipka naznačuje produkt o velikosti 1 300 bp charakteristický pro skupinu genotypů náchylných.



Obr. 4 Dendrogram charakterizující genetickou příbuznost testovaných rodičovských genotypů ječmene jarního na základě analýz 80 RAPD markery.



LITERATURA

Pekkarinen, A., Mannonen, L., Jones, B. L., Niku-Paavola, M.L.: Production of protease by *Fusarium* species grown on barley grains and in media containing cereal proteins. J. Cereal Sci. 31, 2000: 253-261.

Steffenson, B. J.: Fusarium head blight of barley: epidemic, impact and breeding for resistance. MBAA Technical Quartely 35, 1998: 177-183.

Sýkorová, S., Papoušková, L.: Detekce obsahu mykotoxinů v znu. Sborník ze šlechtitelského semináře Problematika odolnosti k fusariozám obilovin, Praha, 2001: 11-13.

Šíp, V.: Metody šlechtění na odolnost k fusariozám. Sborník ze šlechtitelského semináře Problematika odolnosti k fusariozám obilovin, Praha, 2001: 8-10.

Velíšek, J.: Chemie potravin – 3 díl. Osis Tábor, 1999, 368 s.

Práce vznikla za finanční podpory FRVŠ ČR č. 583/2005/G4, GA ČR č. 521/03/0938 a GA MZLU č. 211/2102/IG250081.