

THE MOLECULAR CHARACTERISTICS OF THE DONORS OF RESISTENCE AGAINST BYDV AT *TRITICUM AESTIVUM* L.

MOLEKULÁRNÍ CHARAKTERISTIKA DONORŮ GENŮ REZISTENCE VŮČI BYDV U *TRITICUM AESTIVUM* L.

Slámová L. , Vejl P.

Katedra genetiky a šlechtění, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Kamýcká 129, Praha 6- Suchbát, 165 21

E- mail: luc.slamova@seznam.cz, vejl@af.czu.cz

ABSTRACT

Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV) , vectored by several aphid species, is the most significant viral pathogen of wheat and other grain cereals. No resistance has been described in wheat collections except one gene in some cultivars. However, *Thinopyrum intermedium* Barkworth and Bewey, contains at least two genes for resistance to BYDV infection. We used two pairs of primers to prove the presence of the gene *Bdv 2*, which is believed to be the major gene of resistance against BYDV. The method of DNA isolation, PCR and the visualisation of electrophoreograms was optimized. The presence of the specific marker was proved in some new breeding lines of wheat.

Keywords: BYDV, common wheat, resistance, PCR

ABSTRAKT

Virus žluté zakrslosti ječmene (BYDV), přenášený několika druhy mšic, je považován za jedno z nejzávažnějších onemocnění pšenice a dalších obilnin. Snaha šlechtitelů o nalezení donora rezistence vůči BYDV u rodu *Triticum* byla neúspěšná. Jako vhodný donor rezistence se ukázal být *Thinopyrum intermedium* Barkworth et Bewey, který obsahuje nejméně 2 geny rezistence vůči BYDV. Pro analýzy byla optimalizována metoda izolace DNA, PCR a vizualizace elektroforeogramů. Přítomnost markerů rezistence byla prokázána u některých linií novošlechtění pšenice obecné.

Klíčová slova: BYDV, rezistence, pšenice obecná, PCR

ÚVOD

Pšenice obecná (*Triticum aestivum* L.) je v celosvětovém měřítku jednou z nejdůležitějších obilnin, která zajišťuje nejen výživu obyvatelstva, ale je rovněž součástí krmiv hospodářských zvířat a zároveň i vstupní surovinou pro řadu odvětví zpracovatelského průmyslu. Šlechtění na odolnost proti chorobám a škůdcům patří mezi základní šlechtitelské cíle. V České republice je selekce vedoucí ke vzniku nových odrůd založena zejména na morfologickém hodnocení rostlin, infekčních testech nebo na simulaci stresových podmínek.

Pšenici obecnou lze z hlediska molekulární genetiky považovat za modelový organismus s dobře popsáním genomem. Využití molekulárních markerů ve šlechtění pšenice představuje aktuální trend a proces označovaný jako „Marker Assisted Selection“ (MAS) umožňuje přímou selekci rostlin již v raných ontogenetických stádiích. Techniky molekulární genetiky jsou hojně aplikovány v řadě světových šlechtitelských organizací a představují rychlou, spolehlivou a relativně levnou detekci genetické výbavy konkrétní rostliny a umožňují tak výrazně zefektivnit šlechtitelský program.

Cílem této práce je prokázat přítomnost genu resistance vůči BYDV u odrůd pšenice obecné a pomocí metod molekulární genetiky charakterizovat donory rezistence.

Virus žluté zakrslosti ječmene (BYDV- Barley Yellow Dwarf Virus), přenášený několika druhy mšic, patří mezi nejzávažnější virová onemocnění obilnin (XIN *et al.*, 2001). Virus BYDV je pozitivní ssRNA virus s nesegmentovaným genomem a je řazen do skupiny luteovirů. Virová partikule je izometrická (ZÁVADA, 1999). Bylo identifikováno 5 sérotypů- PAV, MAV, RPV, RMV a SGV, z nichž sérotyp PAV je považován za nejběžnější a nejzávažnější (WATERHOUSE *et al.*, 1988).

BYDV napadá nejen kulturní druhy obilnin, ale má i široký okruh hostitelů v travách. Typickými symptomy napadení je zlatožluté až oranžové zbarvení listů a retardace růstu. Žloutnutí postupuje od špiček a okrajů listů a zachvacuje postupně celou listovou čepel. Listy jsou pak ztlustlé a vzpřímené. V dalším stádiu choroby se objevuje nekróza cévních svazků a redukce kořenového systému. Napadené rostliny nemetají nebo nevytvářejí semena. Symptomy jsou v některých případech těžko odlišitelné od příčin neparazitického původu (ČAČA *et al.*, 1981). Ztráty na výnosech se pohybují v závislosti na lokalitě a ročníku mezi 11 až 47% (ZAHARIEVA *et al.*, 2001).

Částečné kontroly nad napadením rostlin lze dosáhnout aplikací insekticidů, způsobem obhospodařování (změna termínu setí, alternativní způsoby pěstování, odstranění rezervoárů viru) a používáním tolerantních nebo rezistentních odrůd (HENRY *et al.*, 2001). Tolerantní odrůdy obvykle vykazují menší příznaky napadení a ztráty na výnosech jsou nižší, nebrání však množení viru. Rezistentní odrůdy pak potlačují replikaci a šíření viru na další rostliny. Stupeň tolerance odrůd potravinářské pšenice vůči BYDV popisuje např. BURNETT *et al.* (1995).

Snaha šlechtitelů o nalezení donora rezistence vůči BYDV u rodu *Triticum* byla neúspěšná, pouze u odrůd Maringa a Anza byly detekovány použitelné formy rezistence. Geny rezistence byly nalezeny u příbuzných druhů z čeledi *Triticaceae* a to u rodů *Thinopyrum*, *Agropyron*, *Elymus*, *Leymus*, *Pascopyrum* a *Elytrigia* (COMEAU & PLOURDE, 1987, LARKIN *et al.*, 1990, XU *et al.*, 1994).

Jako nejvhodnější donor rezistence se ukázal druh *Thinopyrum intermedium* (Barkworth *et Dewey*). Při analýzách bylo prokázáno, že gen rezistence se nachází na dlouhém rameni chromozomu 7 (7AilL) a tento gen byl nazván *Bdv2* (McINTOSH *et al.*, 2001). BANKS *et al.* (1995) dokázal přenést segment obsahující *Bdv2* na dlouhé rameno

chromozomu 7D u pšenice a tyto translokované TC linie vykazovaly vysoký stupeň rezistence vůči sérotypům PAV, MAV a RPV.

I přes snahy šlechtitelů se dosud nepodařilo přenést gen *Bdv2* do intenzivních odrůd pšenice. Přestože byla objevena řada markerů translokace genu *Bdv2*, žádný z nich není vhodný pro testování v širším měřítku. Proto je nutné detekovat více diagnostických markerů pro segment 7AilL obsahující gen *Bdv2*. Problematikou markerů rezistence vůči BYDV se zabýval např. XIN *et al.* (2001), HENRY *et al.* (2001), AYALA *et al.* (2000), ZHANG *et al.* (2004).

MATERIÁL A METODIKA

Biologický materiál

Pro PCR analýzy byly použity tyto odrůdy pšenice obecné: Alana , Apache , Banquet , Bill , Karolinum , Ilias , Complet , Corsair , Drifter , Ebi , Meritto , Mironovská 808 , Mladka , Nela , Rheia , Rialto , Samanta , Sandra , SG-S 5-02 , Sparta , Sulamit , Svitava , Šárka , Trend , Zdar , SG-S 1875-01, dále pak kolekce linií- teoretických donorů genu *Bdv2* poskytnutých Výzkumným ústavem rostlinné výroby v Praze (tabulka 1) , odrůdy Anza, Jara, Maringa a kolekce odrůd poskytnutá šlechtitelskou stanicí Stupice Selgen s.r.o. (tabulka 1).

Tab.1 Seznam genotypů použitých pro analýzy

Označení vzorku	Původ	Zdroj materiálu
126	CIMMYT, Mexiko	Výzkumný ústav rostlinné výroby
287	CIMMYT, Mexiko	Výzkumný ústav rostlinné výroby
289	CIMMYT, Mexiko	Výzkumný ústav rostlinné výroby
290	CIMMYT, Mexiko	Výzkumný ústav rostlinné výroby
291	CIMMYT, Mexiko	Výzkumný ústav rostlinné výroby
292	CIMMYT, Mexiko	Výzkumný ústav rostlinné výroby
293	CIMMYT, Mexiko	Výzkumný ústav rostlinné výroby
294	CIMMYT, Mexiko	Výzkumný ústav rostlinné výroby
295	CIMMYT, Mexiko	Výzkumný ústav rostlinné výroby
296	CIMMYT, Mexiko	Výzkumný ústav rostlinné výroby
297	CIMMYT, Mexiko	Výzkumný ústav rostlinné výroby
299	CIMMYT, Mexiko	Výzkumný ústav rostlinné výroby
344	CIMMYT, Mexiko	Výzkumný ústav rostlinné výroby
345	CIMMYT, Mexiko	Výzkumný ústav

		roslinné výroby
349	CIMMYT, Mexiko	Výzkumný ústav roslinné výroby
350	CIMMYT, Mexiko	Výzkumný ústav roslinné výroby
351	CIMMYT, Mexiko	Výzkumný ústav roslinné výroby
352	CIMMYT, Mexiko	Výzkumný ústav roslinné výroby
V1	linie 1 (SG-S1267-92 x TC14 290E)	Šlechtitelská stanice Selgen - Stupice
V2	linie 2 (SG-S1267-92 x TC14 290E)	Šlechtitelská stanice Selgen - Stupice
V3	CIMMYT, Mexiko	Šlechtitelská stanice Selgen - Stupice
V4	CIMMYT, Mexiko	Šlechtitelská stanice Selgen - Stupice
V5	CIMMYT, Mexiko	Šlechtitelská stanice Selgen - Stupice
V6	CIMMYT, Mexiko	Šlechtitelská stanice Selgen - Stupice
V7	CIMMYT, Mexiko	Šlechtitelská stanice Selgen - Stupice
V8	CIMMYT, Mexiko	Šlechtitelská stanice Selgen - Stupice
V9	CIMMYT, Mexiko	Šlechtitelská stanice Selgen - Stupice
V10	CIMMYT, Mexiko	Šlechtitelská stanice Selgen - Stupice
V11	CIMMYT, Mexiko	Šlechtitelská stanice Selgen - Stupice
V12	CIMMYT, Mexiko	Šlechtitelská stanice Selgen - Stupice
V13	CIMMYT, Mexiko	Šlechtitelská stanice Selgen - Stupice
P29	Fred Kolb, Universita Illinois, USA	Šlechtitelská stanice Selgen - Stupice

P961341	Fred Kolb, Universita Illinois, USA	Šlechtitelská stanice Selgen - Stupice
TC14290E	CIMMYT, Mexiko	Šlechtitelská stanice Selgen - Stupice
TC14290J	CIMMYT, Mexiko	Šlechtitelská stanice Selgen - Stupice

Izolace DNA

Rostlinná DNA byla izolována pomocí komerčně dodávaného kitu GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit od firmy Sigma. K izolaci byly použity listy klíčnicích rostlin. Kvalita izolované DNA byla ověřena elektroforetickou separací v 1% agarózovém gelu. Koncentrace izolované DNA byla stanovena pomocí UV spektrofotometru.

Amplifikace DNA

Polymerázová řetězová reakce (PCR) probíhala v termocykleru Techne Cyclogene. Byly vybrány 2 dvojice primerů: BYAGI-F 5' -CATGGATAATTCAGGGAGCATTCTG- 3', BYAGI-R 5'-CTGAACACGAATTTGCTGAGGTTG -3' (MASwheat, 2005) a SCGP1 U 5'-CAGGACAAGTGAAAGCACCTAAGC-3', SCGP1 L 5'-GTCCACAAGTCATATGGGGACAC- 3' (ZHANG *et al.*, 2004), které detekují přítomnost genu *bdv2* v genomu pšenice.

Chemické složení PCR reakce je uvedeno v tabulce 2 a 3. Reakční směs byla převrstvena 17μl minerálního oleje. Teplotní a časový profil PCR je uveden v tabulce 4 a 5.

Tab. 2 Chemické složení PCR – primery BYAGI

Chemické složení PCR reakce	
Templátová DNA	60 ng
Primer BYAGI-F	0,4 μM
Primer BYAGI-R	0,4 μM
dNTP	280 μM
1x PCR pufr	1x
MgCl₂	2,5 mM
Taq polymeráza	1 U
H₂O	15,1 μl

Tab. 3 Chemické složení PCR – primery SCG

Chemické složení PCR reakce	
Templátová DNA	60 ng
Primer SCGP1 U	0,4 µM
Primer SCGP1 L	0,4 µM
dNTP	280 µM
1x PCR pufr	1x
MgCl ₂	2,5 mM
Taq polymeráza	1 U
H ₂ O	15,1 µl

Tab. 4 Teplotní a časový profil PCR – primery BYAGI

Kroky PCR	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	30	1
Denaturace	94	30	35
"Annealing"	60	30	
Prodlužování	72	45	
Závěrečné prodlužování	72	45	1
Uchování produktů	4	max.	1

Tab. 5 Teplotní a časový profil PCR - primery SCG

Kroky PCR	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace I.	72	60	1
Počáteční denaturace II.	96	60	1
Denaturace	94	60	35
"Annealing"	65	60	
Prodlužování	72	120	
Závěrečné prodlužování	72	600	1
Uchování produktů	4	max.	1

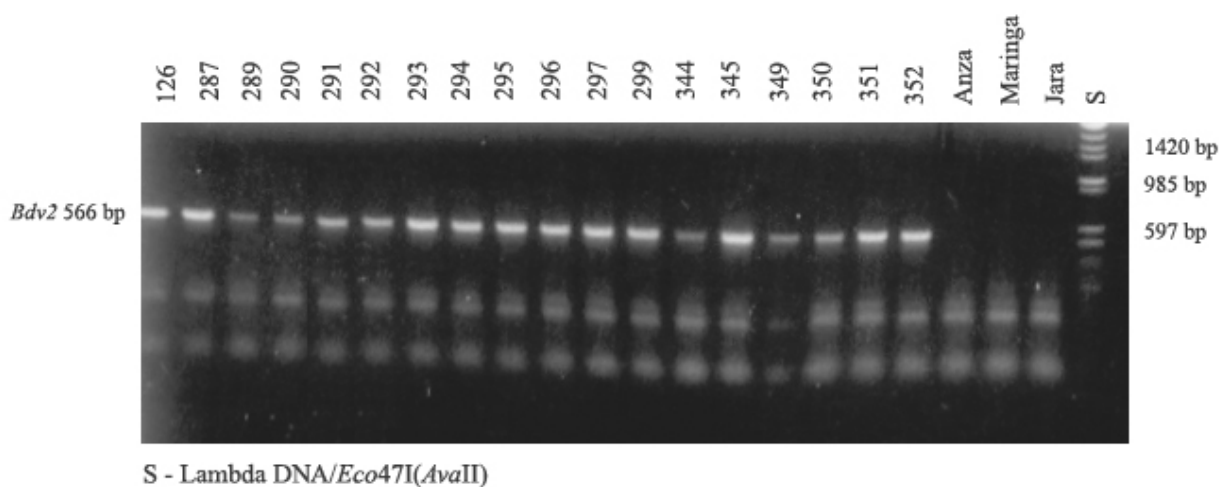
Elektroforetická separace PCR produktů a počítačová analýza elektroforeogramů

Pro separaci PCR produktů byla použita horizontální 1,5% agarózová elektroforéza (Bio Rad, USA). Vizualizace bylo dosaženo pomocí ethidium bromidu, který v ultrafialovém světle o vlnové délce 260nm emituje červenooranžové fluorescenční světlo s vlnovou délkou 560nm. Dokumentace agarózového gelu byla provedena Polaroid kamerou. Přítomnost markerů byla posouzena na základě porovnání délky fragmentů s hmotnostním standardem λDNA/Eco47I (AvaII).

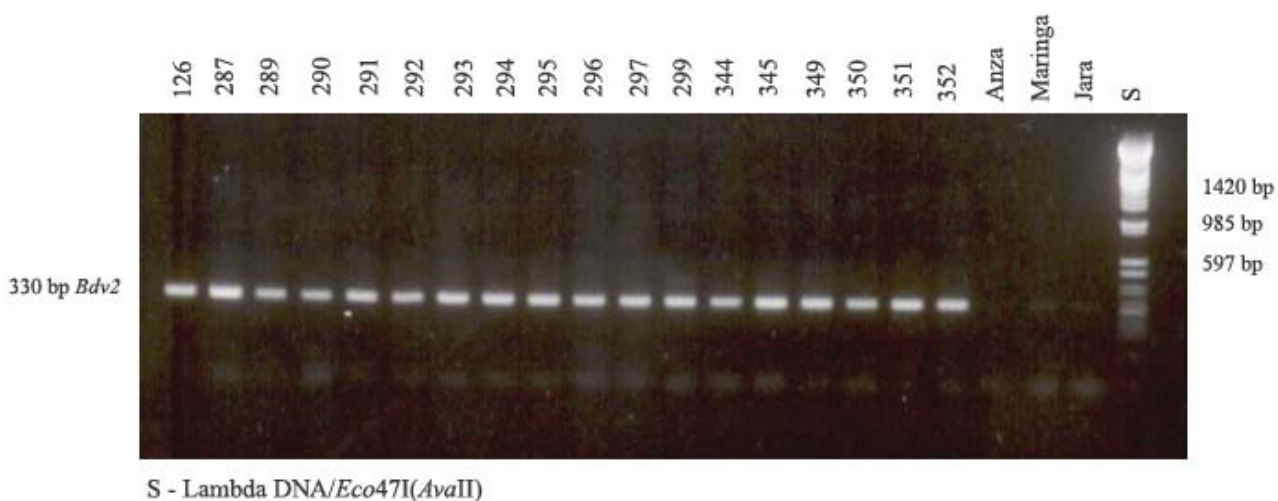
VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledkem izolace DNA byla vysokomolekulární DNA. Testovaná DNA byla použita pro PCR reakci. Použity byly 2 dvojice primerů, označených jako BYRGI-L, BYRGI-R, SCGP1 U, SCGP1 L, které detekují přítomnost genu *Bdv 2* v genomu pšenice. Byl optimalizován teplotní a časový profil PCR včetně chemického složení reakční směsi. Z elektroforeogramů byla vyhodnocena přítomnost markerů genu *Bdv 2* (obrázek 1). Primery BYAGI umožňují amplifikaci fragmentů o délce 566bp, primery SCG umožňují amplifikaci fragmentů o délce 330bp. Velikost amplifikovaných fragmentů se shoduje s výsledky uvedenými v práci ZHANG *et al* (2004) a MASwheat (2005).

Obr. 1 Elektroforeogram PCR markeru při použití primerů BYAGI podle ZHANG *et al* (2004)



Obr. 2 Elektroforeogram PCR markeru při použití markerů SCG podle MASwheat (2005)



Poznámka: Čísla vzorků jsou uvedena v tabulce 1.

ZÁVĚR

Přítomnost majorgenu rezistence *Bdv 2* byla prokázána u genotypů kolekce odrůd-teoretických donorů rezistence poskytnutých Výzkumným ústavem rostlinné výroby v Praze. U odrůd Anza a Maringa, které vykazují vyšší odolnost vůči BYDV, je rezistence vůči BYDV pravděpodobně řízena polygenně a proto nemůže být detekována pomocí specifického markeru. Genotypy P29 a P961341 jsou zatím jedinými genovými zdroji ozimé pšenice, u kterých se podařilo prokázat přítomnost markeru rezistence. U linií TC14290E a TC14290J byla PCR testem prokázána přítomnost *Bdv 2* genu. Linie TC14290E je otcovskou komponentou linií V1 a V2 (tabulka 1). Přesto u těchto linií nebyla přítomnost *Bdv 2* genu prokázána. Příčinou zřejmě byla selekční kritéria, která vedla ke vzniku těchto linií. Při jejich vzniku nebyla záměrně selekce na rezistenci vůči BYDV prováděna. V závěru lze konstatovat, že *Bdv 2* gen nebyl detekován u žádné z registrovaných odrůd. Tato skutečnost nasvědčuje tomu, že rezistentní šlechtění zaměřené na získání české odrůdy vůči BYDV je vysoce aktuální a že DNA markery představují nadějný nástroj při šlechtění nových odrůd.

Poděkování

Práce byla finančně podporována grantovým projektem QF 50073 „Studium odolnosti pšenice obecné (*Triticum aestivum* L.) k BYDV“ a GA ČR č. 521/05/H013 „Pšenice - od genomu ke kvalitě produkce“.

LITERATURA

- AYALA, L., KHAIRALLAH, M., GONZALES-DE-LEON, D., VAN GINKEL, M., MUJEEB-KAZI, A., KELLER, B., HENRY, M.: Identification and use of molecular markers to detect barley yellow dwarf resistance derived from *Th. Intermedium* in bread wheat, 2000
- BANKS, P.M., LARKIN, P.J., BARIANA, H.S., LAGUDAH, E.S., CHEN, R.I.S., XU, H.J., XIN, Z.Y., QIAN, Y.T., ZHOU, X.M., CHENG, Z.M.: The use of cell culture for subchromosomal introgressions of barley yellow dwarf virus resistance from *Thinopyrum intermedium* to wheat, *Genome* 38: 395-405, 1995
- BURNETT, P.A., COMEAU, A., QUALSET, C.O., : Host plant tolerance or resistance for control of barley yellow dwarf, In: *Barley yellow dwarf: 40 years of progress*, 1995
- COMEAU, A., PLOURDE, A.: Cell tissue culture and intergeneric hybridization for barley yellow dwarf resistance in wheat, *Can J Plant Pathol* 9: 188-192, 1987
- ČAČA A KOL.: *Zemědělská fytopatologie*, SZN, Praha, 1981, 344 s.
- GRAMAN, J., ČURNÝ, V.: *Šlechtění zemědělských plodin*, JU ZF, České Budějovice, 1998, 194 s.

HENRY, M., VAN GINKEL, M., KHAIRALLAH, M. : Marker- Assisted Selection for BYDV Resistance in Wheat, Barley Yellow Dwarf Newsletter, D.F. : CIMMYT, Mexico, 2001

LARKIN, P.J., BRETTEL, R.I.S., BANKS, P.M., APPELS, R., WATERHOUSE, P.M., CHENG, Z.M., ZHOU, G.H., XIN, Z.Y., CHEN, X. : Identification, characterization and utilisation of sources of resistance to barley yellow dwarf virus. In: P.A. Burnett: World Perspectives on Barley Yellow Dwarf, pp. 415-420. International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Mexico, 1990

MAS-Wheat- Bringing Genomics to the wheat fields- Virus resistance. Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV)- Bdv2. <http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/BYDV/BYDV-methods.htm>, 2005

MCINTOSH, R.A., DEVOS, K.M., DUBCOVSKY, J., ROGERS, W.J., : Catalog of gene symbols for wheat: Supplement pp 14. http://wheat.p-w.usda.gov/ggpages/wgc/2001_upd.html, 2001

WATERHOUSE, P.M., GILDOW, F.E., JOHNSTONE, G.R.: Luteovirus group, AAB Description of Plant Viruses, no. 339, 1988

XIN, Z.Y., ZHANG, Z.Y., CHEN, X., LIN, Z.S., MA, Y.Z., BANKS, P.M., LARKIN, P.J.: Development and characterization of common wheat- Thinopyrum intermedium translocation lines with resistance to barley yellow dwarf virus, Euphytica 119: 161-165, 2001

XU, S.J., BANKS, P.M., DONG, Y.S., ZHOU, R.H., LARKIN, P.J. : Evaluation of Chinese Triticaceae for resistance to barley yellow dwarf virus (BYDV), Genet. Res. Crop Evol. 41: 35-41, 1994

ZAHARIEVA, M., MONNEVEUX, P., HENRA, M., RIVOAL, R., VALKOUN, J., NACHNIT, M.M. : Evaluation of a collection of wild wheat relative *Aegilops geniculata* Roth and identification of potential sources for useful traits, Euphytica 119: 33-38, 2001

ZÁVADA, V.: Molekulární virologie I., Nakladatelství Peres, Praha, 1999, 180 s.

ZHANG, Z., XU, J., XU, Q., LARKIN, P., XIN, Z.: Development of novel PCR markers linked to the BYDV resistance gene Bdv2 useful in wheat for marker-assisted selection, Theor. Appl. Genet 109: 433-439, 2004