

VARIABILITY OF GENOTYPES SPRING BARLEY WITH DIFFERENT SUSCEPTIBILITY TO RHYNCHOSPORIUM SCALD

VARIABILITA GENOTYPŮ JARNÍHO JEČMENE S ROZDÍLNOU CITLIVOSTÍ K RHYNCHOSPORIOVÉ SKVRNITOSTI

Nevimová H., Bednář J.

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

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

ABSTRACT

The objective of study was to use the microsatellite markers to detection of variability of genotypes spring barley, with different susceptibility to *Rhynchosporium* scald. The infection of plant is caused by the fungal pathogen *Rhynchosporium secalis* [Oudem.] J.J. Davis and this can lead to reduction in yields till 20%. For our analyses it was chosen thirteen genotypes of spring barley from collection of gene resources Agricultural Research Institute Kroměříž Ltd. – Abyssinian, Atlas, Atlas 46, Atlas 57, Cambrinus, Clipper, Jet, Kitchin, Kompakt, Korál, La Mesita, Nigrinudum Abyssinum a Rapid. The sixty microsatellite markers were tested in total. The products of PCR were separated on vertical electrophoresis into polyacrylamide gel and then they were coloured by silver. The obtained gels were evaluated and consequently dendrogram was configured. The dendrogram characterizes genetic affinity of the tested spring barley genotypes.

Key words: microsatellite markers, *Rhynchosporium* scald, spring barley.

ABSTRAKT

Cílem práce bylo využít mikrosatelitní markery SSR (*Simple Sequence Repeats*) k detekci variability genotypů jarního ječmene, které mají rozdílnou citlivost k *Rhynchosporiové* skvrnitosti. Infekce rostlin je způsobena houbovým patogenem *Rhynchosporium secalis* [Oudem.] J.J. Davis a může vést k redukci výnosů až o 20%. K analýzám bylo vybráno celkem 13 genotypů jarního ječmene z kolekce genetických zdrojů Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž, s.r.o. - Abyssinian, Atlas, Atlas 46, Atlas 57, Cambrinus, Clipper, Jet, Kitchin, Kompakt, Korál, La Mesita, Nigrinudum Abyssinum a Rapid. Celkem bylo otestováno 60 mikrosatelitních markerů. Produkty PCR byly separovány na vertikální elektroforéze v polyakrylamidovém gelu a vizualizovány barvením stříbrem. Získané elektroforeogramy byly vyhodnoceny a následně byl sestaven dendrogram charakterizující genetickou příbuznost testovaných genotypů jarního ječmene.

Klíčová slova: mikrosatelitní markery, *Rhynchosporiová* skvrnitost, jarní ječmen.

ÚVOD

Rhynchosporiová skvrnitost, která byla poprvé popsána koncem 19. století, patří mezi významné listové choroby. Infekci rostlin způsobuje houbový patogen *Rhynchosporium secalis* [Oudem.] J.J. Davis a to převážně v oblastech chladnějších s vlhkým průběhem počasí. Kromě ječmene napadá také žito a další druhy z čeledi *Poaceae* (Háni a kol., 1993). Charakteristickým projevem napadení jsou světle zelené vodnaté skvrny na pochvách a čepelích listů. Zřídka může dojít i k infekci klasu. Skvrny mají oválný až podélný tvar a jsou ohraničeny hnědým okrajem. Postupně mění barvu na šedou až bílou (obr. 1). Silně napadené listy předčasně zasychají (Procházka, 1994). *Rhynchosporium secalis* se šíří ve formě konidií větrem a odstříkujícími dešťovými kapkami. Napadením touto chorobou může dojít k redukcí výnosů až o 20%.



Obr. 1 Listy se skvrnami způsobenými patogenem *Rhynchosporium secalis*

Mikrosatelitní markery (SSR – *Simple Sequence Repeats*, STR – *Short Tandem Repeats*), které byly v této práci použity k detekci variability genotypů jarního ječmene s rozdílnou citlivostí k Rhynchosporiové skvrnitosti, jsou sekvence DNA složené z mnohokrát se opakujících motivů 1 – 6 nukleotidů např. $(GA)_n$ (Řepková, Relichová, 2001). Mikrosatelity se řadí k metodám lokusovým, kdy se sleduje jen určité, předem definované místo v genomu a k metodám amplifikačním, kdy je fragment DNA namnožen pomocí polymerázové řetězové reakce – PCR. SSR markery jsou součástí nekódujících oblastí genomu a celková délka nepřesahuje 100 bp. Podle složení se SSR markery člení na dokonalé, nedokonalé a složené. Dokonalé mikrosatelity jsou tvořeny souvislým motivem, např. $(AG)_{24}$. Nedokonalé mikrosatelity se vyznačují tím, že základní mikrosatelitový motiv je přerušen sledem náhodných bází. Několika různými motivy jsou pak tvořeny mikrosatelity složené, např. $(AG)_{14}(AT)_{35}$. Mikrosatelitní markery mají vysokou informační hodnotu (Ovesná a kol., 2002). To znamená, že umožňují rozlišení homozygotů (1 fragment) a heterozygotů (2 fragmenty). Jsou ideální ke genetickému mapování pro svoji hojnost v genomu, vysoký stupeň polymorfizmu, široké rozptýlení v genomu, nezávislost na vnějších podmínkách, vysokou reprodukovatelnost, snadné rozšíření mezi laboratoři a jednoduchost provedení PCR reakce (Liu a kol., 1996).

MATERIÁL A METODIKA

Pro detekci variability bylo vybráno celkem 13 genotypů jarního ječmene z kolekce genetických zdrojů Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž, s.r.o. Jednalo se o tyto následující genotypy: Abyssinian, Atlas, Atlas 46, Atlas 57, Cambrinus, Clipper, Jet, Kitchin, Kompakt, Korál, La Mesita, Nigrinudum Abyssinum a Rapid.

Variabilita genotypů jarního ječmene byla detekována pomocí mikrosatelitních markerů. Celkem bylo otestováno 60 mikrosatelitů, z nichž většina je lokalizována na chromozomech 1H, 3H, 4H a 7H ječmene, kde se nacházejí geny rezistence *Rh* k Rhynchosporiové skvrnitosti v největší míře.

DNA byla izolována z mladých rostlin ve fázi prvního listu pomocí izolačního kitu DNeasy Plant Mini Kit od firmy Qiagen. Výtěžek vyizolované DNA byl zjištěn na spektrofotometru.

Reakční směs pro polymerázovou řetězovou reakci o celkovém objemu 25 μ l má následující složení: 0,5 U *Taq* polymerázy (Promega, USA), 1x alikvotní pufr, 0,1 mM každého dNTP, 7,5 μ M každého primeru, 30 ng templátové DNA. Teplotní a časový profil PCR reakce: počáteční denaturace 2 minuty při 93°C, 30 cyklů – denaturace 1 minuta při 93°C, annealing 2 minuty při 54°C, elongace 2 minuty při 72°C.

Separace PCR produktů byla provedena na vertikální elektroforéze při 300 V na 15 % nedenaturačním polyakrylamidovém gelu v TBE pufru. K vizualizaci těchto separovaných produktů bylo použito barvení stříbrem (0,2% AgNO₃).

Získané elektroforeogramy byly vyhodnoceny pomocí binární matice, kde 1 znamená přítomnost produktu a 0 absenci produktu. Dále byly tyto výsledky statisticky zpracovány programem FreeTree a následně byl sestaven dendrogram s použitím programu TreeView.

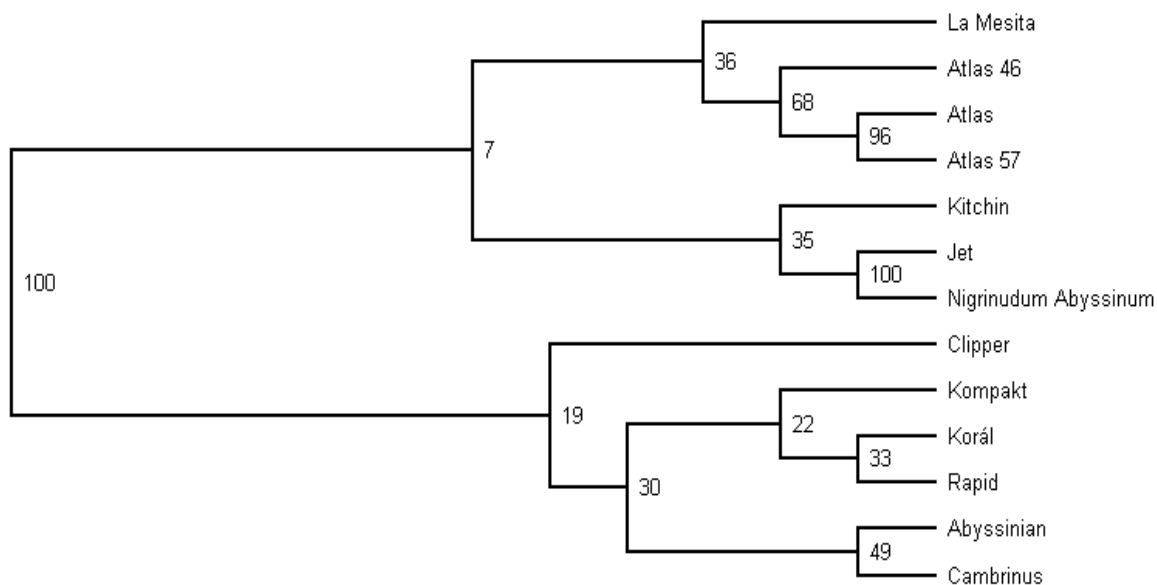
VÝSLEDKY A DISKUZE

Bylo otestováno celkem 60 mikrosatelitů, z nichž většina se nachází na 1H, 3H, 4H a 7H chromozomech ječmene, kde se také vyskytují nejčastěji geny rezistence k Rhynchosporiové skvrnitosti (*Rh*, *Rh2*, *Rh3*, *Rh12*, *Rh13*, *Rh14*) jak uvádí Gronnerod a kol. (2002), Genger a kol. (2003) a Patil a kol. (2003).

Velikost produktů byla v rozmezí od 106 bp po 240 bp. Polymorfní charakter vykazovalo 56 testovaných mikrosatelitních markerů. Monomorfní charakter byl zjištěn u 4 mikrosatelitních markerů.

Z vyhodnocených elektroforeogramů byly výsledky statisticky zpracovány prostřednictvím programu FreeTree s použitím Jaccardova podobnostního koeficientu a ze získaných údajů byl sestaven dendrogram pomocí počítačového programu TreeView. Dendrogram (obr. 2), který vyjadřuje genetickou příbuznost analyzovaných genotypů jarního ječmene, rozděluje tyto genotypy do dvou základních skupin. První skupinu, která se ještě dále člení na dvě menší podskupiny, tvoří genotypy rezistentní k Rhynchosporiové skvrnitosti – Atlas, Atlas 46, Atlas 57, La Mesita, Jet, Kitchin a Nigrinudum Abyssinum.

Druhá skupina je složena z genotypů jarního ječmene které jsou k této listové skvrnitosti náchylné – Abyssinian a Cambrinus a z genotypů Clipper, Kompakt, Korál a Rapid, jež jsou středně náchylné.



Obr. 2 Dendrogram analyzovaných genotypů jarního ječmene

ZÁVĚR

Pomocí mikrosatelitních markerů byla detekována variabilita 13 genotypů jarního ječmene s rozdílnou citlivostí k *Rhynchosporiové* skvrnitosti. Celkem bylo otestováno 60 mikrosatelitů. Analyzované genotypy jarního ječmene byly rozlišeny sestavením dendrogramu na dvě základní skupiny a to skupinu genotypů rezistentních a genotypů středně náchylných a náchylných k *Rhynchosporium secalis*.

LITERATURA

- Genger R. K., Brown A. H. D., Knogge W., Nesbitt K., Burdon J. J. (2003): Development of SCAR markers linked to scald resistance gene derived from wild barley. *Euphytica*, 134: 149-159.
- Gronnerod S., Maroy A. G., Mackey J., Tekauz A., Penner G. A., Bjornstad A. (2002): Genetic analysis resistance to barley scald (*Rhynchosporium secalis*) in the Ethiopian line Abyssinian (CI668). *Euphytica*, 126: 235-250.

Häni F., Popov G., Reinhard H., Schwarz A., Tanner K., Vorlet M. (1993): *Obrazový atlas chorob a škůdců polních plodin*. Scientia, 336 s.

Liu Z., Biyashev R. M., Saghai Maroof M. A. (1996): Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 869–876.

Ovesná J., Rulcová J., Poláková K., Kučera I., Leišová L. (2002): DNA markéry – současnost a perspektivy. Sborník přednášek česko-slovenského workshopu “Využití molekulárních markerů v biologii, šlechtění a uchovávání genových zdrojů rostlin”. 85-93.

Patil V., Bjornstad A., Mackey J. (2003): Molecular mapping of a new gene Rrs4CI11549 for resistance to barley scald (*Rhynchosporium secalis*). *Molecular breeding*, 12(2): 169-183.

Procházka I. (1994): *Kapesní atlas hlavních chorob polních plodin*. FEZ Třebíč, 128 s.

Řepková J., Relichová J. (2001): *Genetika rostlin*. Masarykova univerzita v Brně, 296 s.