

Možnosti šlechtění ječmene na rezistenci k viru žluté zakrslosti ječmene s využitím molekulárních márků

J. Chrpová, V. Šíp, J. Ovesná, J. Vacke

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha 6 – Ruzyně

Virus žluté zakrslosti ječmene (barley yellow dwarf virus – BYDV) patří k závažným patogenům obilnin. Jedná se o luteovirus s několika kmeny, z nichž na našem území převládá PAV kmen, který se vyznačuje silnou patogenitou. BYDV je přenášen některými druhy mšic, z nichž jsou u nás nejvýznamnější *Rhopalosiphum padi*, *Sitobion avenae* a *Metopolophium dirhodum*. Jinými způsoby se virus nepřenáší. Virus infikuje všechny u nás pěstované obilniny a řadu travních druhů.

BYDV působí největší škody u ječmene a ovsa, menší u pšenice a tritikale, nejmenší u žita a kukuřice. Výše škod u jednotlivých obilnin je závislá na citlivosti odrůd, kmenu, případně izolátu viru a povětrnostních podmínkách během vegetace, především však na růstové fázi v době infekce. U ječmene byly zaznamenány výnosové ztráty od 0,6 do 93,2%. Podle údajů prof. D. Spaara (BOA, GmbH, Berlin) časné infekce vedou k 55% redukci výnosu, při pozdní nákaze mohou ztráty dosáhnout 19%.

Ochrana proti BYDV spočívá v prevenci infekce. Z agrotechnických opatření je to hubení zdrojů nákazy (vzešlý infikovaný výdrol obilnin) a přenašečů viru včasnou podmínkou a hlubokou orbou. Velmi účinný je pozdní výsev ozimů, uspokojivé výsledky přináší velmi časný výsev jařin. K ochranným zákrokům patří rovněž hubení přenašečů aphicidy. Efektivní a spolehlivý způsob, jak zabránit škodám způsobovaným BYDV nebo je minimalizovat, představuje genetická ochrana.

Genetické základy tolerance ječmene k BYDV

Odolnost k BYDV je definována jako tolerance. Dosavadní výsledky výzkumu ukazují, že tolerance může být založena na více genech malého i genech velkého účinku.

Největší význam má gen Yd2. Tolerance podmíněná tímto genem je stabilní, především proti kmenům PAV a MAV. Podle některých autorů může být efekt tohoto genu u ozimých genotypů redukován. Gen byl poprvé popsán v roce 1959 v etiopských jarních ječmenech. Jednou z prvních odrůd s tímto genem je americká odrůda Atlas 68. Mezi další nositele genu Yd2 patří Sutter, Abate, CI 2376, Coracle, CM 67, CM 72, Franklin, Nomin, Prato, Shannon, Shyri, Sutter, UC 337, UC 476, UC 566, UC 603, Venus, Vixen a Wysor.

Dále existují tolerantní odrůdy (Post, Perry, Penco), jejichž odolnost nepochází z etiopských ječmenů. U těchto odrůd lze předpokládat přítomnost jiných od Yd2 odlišných genů.

Je známo, že kombinování více genů vede ke zvýšení odolnosti. Nové možnosti přináší využití molekulárně-genetických metod, které mohou výrazně urychlit šlechtitelský proces. Byly odvozeny dva PCR molekulární markéry YLM a Ylp, které je možno použít k detekci genu tolerance Yd2. Metodické přístupy k řešení problematiky BYDV ve VÚRV.

Výzkum problematiky tolerance ječmene k BYDV probíhal v letech 1992–1999 v rámci několika projektů GAČR a NAZV. V současné době je zařazen do projektu GAČR č. 521/00/0332 s názvem "Charakteristika zdrojů odolnosti k BYDV a BaYMV u ječmene pomocí genetických analýz a molekulárních technik". Jedná se o spolupráci tří pracovišť VÚRV (odd. virologie, odd. molekulární genetiky a odd. šlechtitelských metod).

Řešená problematika se týká následujících oblastí:

1. Testování povolených odrůd a novošlechtění ječmene na toleranci k BYDV, vyhledávání a hodnocení genetických zdrojů
2. Genetické analýzy
3. Stanovení přítomnosti genů rezistence pomocí molekulárních markerů (molekulárně genetické analýzy)
4. Strategie ve šlechtění na rezistenci k BYDV

Reakce genotypů ječmene na infekci BYDV je ve VÚRV zkoumána v maloparcelkových polních pokusech. Rostliny jsou vysévány na dvouřádkové parcely 1m dlouhé, ve sponu 20x8 cm. Pokusy mají infekční a kontrolní variantu (bez infekce BYDV). Testované genotypy jsou ve stadiu třetího listu až počátku odnožování infikovány kmenem PAV. Jako vektorů viru slouží mšice *Rhopalosiphum padi* ze skleníkových chovů. Na každou rostlinu připadá 10–20 mšic různých vývojových stadií. Mšice jsou po 5 dnech inokulačního sání usmrceny insekticidním přípravkem. Kontrolní varianta je po dobu sání mšic chráněna krycí tkáninou. Během vegetační doby jsou pokusné parcely i okolní dělicí a ochranné pásy udržovány pod insekticidní clonou. V průběhu vegetace jsou prováděna fenologická pozorování a hodnotí se symptomatická reakce na infekci podle desetistupňové škály (0 – bez příznaků).

V polních podmínkách byly prováděny i genetické analýzy. Odrůdy s deklarovanou přítomností genu Yd2 byly kříženy s náchylnými odrůdami a s odrůdami s mírnou rezistencí. U kříženců F3 generace byla zjišťována reakce na infekci BYDV a dle štěpného poměru byla určena přítomnost genu Yd2, popř. počet dalších genů rezistence. K dispozici byla ELISA, pomocí které bylo možno určit, zda rostlina byla skutečně infikována.

V Praze-Ruzyni probíhalo též hodnocení dihaploidních linií odvozených v generaci F2 po křížení donora genu Yd2 (Atlas 68) a německé krnné odrůdy ozimého ječmene Igri. U těchto linií je hodnocen vliv genu Yd2 na hlavní hospodářské znaky.

Velice přínosné pro řešení problematiky odolnosti k BYDV bylo využití molekulárně genetických metod. Pro stanovení přítomnosti genu rezistence Yd2 byly využity 2 molekulární markery: PCR marker YLM a marker Ylp. Genetická diverzita sledovaných odrůd a linií byla hodnocena pomocí analýz AFLP a SSR (mikrosatelitů). DNA pro molekulární analýzy byla izolována z listů čtrnáctidenních rostlin.



Linie ozimého ječmene s odolností k BYDV odvozené od křížence Perry/Luxor. Porovnání s náchylnou rodičovskou odrůdou Luxor (2 řádky vlevo).

OptimAgro

Růstový regulátor do obilovin

Cerone[®] 480 SL

Cerone = vyšší výnosy = vyšší zisky

- snižuje nebezpečí poléhání (zkracuje rostlinu, stimuluje syntézu buničiny a ligninu, mění tvar buněk)
- stimuluje rozvoj kořenového systému
- zlepšuje přívod živin do zrna (zvyšuje výnosy a kvalitu sklizně)
- dávkování: ječmen zimý a triticales (0,75-1 l/ha), ječmen jarní (0,75 l/ha), žito ozimé (1 l/ha), pšenice ozimá (0,5-1 l/ha)

Není třeba aplikovat preventivně!

Kontaktujte svého distributora!

OptimAgro CR/SR s.r.o. • Třebotov 304 • 252 26 Třebotov
Telefon 02/578 301 37, 578 301 38 • Fax 02/578 301 39 • GSM brána 0602 69 04 49

OptimAgro
Společnost Aventis Group

Tabulka: 1 Vliv genu Yd2 na hlavní hospodářské znaky u dihaploidních linií ozimého ječmene odvozených od křížence Igri/Atlas 68. Přítomnost genu Yd2 byla zjištěna pomocí markeru Ylp.

Skupina n	Stupeň * napadení	Délka rostliny (cm)		Metání **	HTZ (g)		Hmotnost zrna na klas		Výnos zrna (dt/ha)		Obsah extraktu %	
		K	I		K	I	K	I	K	I		
(-/-) 41	Průměr	4,78	88,05	65,24	7,46	48,25	40,45	1,59	0,93	6,34	3,7	74,72
	Variabilita s ²	1,31	27,90	57,26	1,57	115,52	79,99	0,11	0,05	1,83	0,75	2,84
(Yd2/Yd2) 53	Průměr	1,17	92,26	84,81	7,26	47,66	47,36	1,62	1,50	6,46	6	75,32
	Variabilita s ³	1,14	27,89	38,64	1,67	117,74	107,31	0,08	0,08	1,27	1,24	2,95
t - test		15,57	3,796	13,61	0,744	0,261	3,367	0,468	10,788	0,468	10,788	1,6777
Pravděpodobnost	0	0,0003	0	0,459	0,795	0,0011	0,641	0	0,641	0	0,0968	

* 0 - vysoká rezistence, 9 - silně náchylné
podle stupnice, kterou vyvinuli Schaller und Qualset (1980)

** od 1. května

K - kontrolní varianta
I - infekční varianta

Tabulka: 2 Vliv genu Yd2 na hlavní hospodářské znaky u dihaploidních linií jarního ječmene odvozených od křížence Igri/Atlas 68. Přítomnost genu Yd2 byla zjištěna pomocí markeru Ylp.

Skupina n	Stupeň * napadení	Délka rostliny (cm)		Metání **	HTZ (g)		Hmotnost zrna na klas		Výnos zrna (dt/ha)		Obsah extraktu %	
		K	I		K	I	K	I	K	I		
(-/-) 44	Průměr	6,53	59,61	38,91	8,7	40,80	31,90	1,05	0,55	41,9	22,1	72,065
	Variabilita s ²	0,27	34,74	47,31	14,53	70,80	43,30	0,07	0,05	11,2	8,2	3,519
(Yd2/Yd2) 41	Průměr	3,38	61,12	51,22	8,85	41,4	36,7	1,12	0,76	44,6	30,2	73,003
	Variabilita s ³	2,22	41,03	61,15	19,73	47,5	54,3	0,20	0,06	32,6	9,9	5,202
t - test		12,77	1,1172	7,627	0,1645	0,324	3,1432	0,8425	3,889	0,8425	3,889	1,9356
Pravděpodobnost	0	0,2671	0	0,8698	0,747	0,0023	0,4026	0,0002	0,4026	0,4026	0,002	0,0567

* 0 - vysoká rezistence, 9 - silně náchylné
podle stupnice, kterou vyvinuli Schaller und Qualset (1980)

** ve dnech od 27. května

K - kontrolní varianta
I - infekční varianta

Výsledky genetických a molekulárních analýz

Většina zkoušených současných odrůd jarního a ozimého ječmene byla náchylná až silně náchylná. Ojedinele vykazují některé odrůdy mírnou toleranci. Jedná se o odrůdy Atribut, Malvaz a Madras u jarního ječmene a o odrůdy Perry a Siga u ozimého ječmene. Vysoká úroveň tolerance byla vesměs zjištěna u materiálů získaných z CIMMYT (Mexiko) a ICARDA (Sýrie), kde šlechtění na odolnost k BYDV probíhá již dlouhou dobu.

U některých odrůd a linií, které vykazovaly střední až vyšší toleranci, byly provedeny hybridologické analýzy. U odrůdy Brea'S'Ben a u linie CIM 164 (Giza 121/Pue) byla zjištěna přítomnost genu Yd2. U odrůd ozimého ječmene Perry a Siga byla detekována přítomnost genů tolerance, odlišných od genu Yd2. Jedná se pravděpodobně o jeden gen u odrůdy Perry a o dva geny u odrůdy Siga. U odrůd jarního ječmene Atribut, Malvaz a Madras bylo prokázáno polygenní založení rezistence geny menšího účinku.

Současně probíhaly i molekulární genetické analýzy, jejichž cílem bylo zjistit přítomnost genu Yd2 u kolekce odrůd, pocházejících z CIMMYT a ICARDA. Spolu s genetickými zdroji byly hodnoceny i další odrůdy. Využití molekulárního markéru YLM se ukázalo jako nevhodné u ozimého ječmene, kde byla pomocí tohoto markéru detekována přítomnost genu Yd2 i u náchylné odrůdy Luxor a u odrůd Perry a Siga, kde se jedná o toleranci podmíněnou jinými geny. V současné době je využíván k detekci genu Yd2 pouze marker Ylp, který je v těsnější vazbě s hledaným genem než markér YLM.

U souboru 24 odrůd jarního a ozimého ječmene s vyšší a střední tolerancí a u 3 náchylných odrůd byla pomocí metod AFLP a SSR zjišťována genetická diverzita. Analýzou hlavních komponent bylo zjištěno, že neexistuje ostrá hranice mezi genotypy s genem Yd2 a ostatními genotypy. Genotypy jsou rozděleny do dvou velkých skupin. Jedna obsahuje 7 genotypů s genem Yd2 a druhá široká genotypy s genem Yd2 i bez tohoto genu. Jednoznačně jsou odděleny české odrůdy se sladovnickou kvalitou – Atribut, Jaspis a Malvaz.

U dihaploidních linií křížence Igri/Atlas 68 (jarní i ozimé formy) byl sledován vliv přítomnosti genu Yd2 na základní agronomické znaky (tabulka 1 a 2). Linie byly rozděleny pomocí markéru Ylp na dvě skupiny: u první skupiny byl gen Yd2 přítomen a u druhé nikoliv. Výsledky vyšetření pomocí molekulárního markéru se s vysokou pravděpodobností shodují s výsledky polních testů. Bylo zjištěno, že přítomnost genu Yd2 má velký význam pro toleranci k BYDV u jarních i ozimých linií. Současně bylo zjištěno, že samotná přítomnost genu Yd2 neovlivňuje negativně základní agronomické znaky (metání, výnos zrna, hmotnost tisíce semen, obsah extraktu). Pouze ozimé linie s genem Yd2 vykazovaly o cca 5 cm vyšší délku stébla než linie ze druhé skupiny.

Možnosti šlechtění na toleranci k BYDV

Tolerance k BYDV je založena monogenně, oligogenně i polygenně. Kombinace více genů vede k dosažení vyšší a trvalejší tolerance.

Gen Yd2 je pro svou efektivitu a stabilitu často využíván. Podle našich zjištění kombinace genu Yd2 s více geny malého účinku ze středně odolných odrůd (Malvaz, Atribut a Madras) vede k dosažení vyšší tolerance. Kombinace dvou zdrojů genu Yd2 se nejvíce jeví jako příliš vhodná, protože se jedná o exotické materiály přinášející s sebou nežádoucí vlastnosti. Více úspěchů tedy nabízí introdukce genu Yd2

do domácích adaptovaných genotypů. Ke zvýšení efektivity šlechtitelského procesu může přispět využití již ověřeného molekulárního markéru Ylp.

Kombinace více genů malého účinku v našich pokusech k žádoucímu zvýšení tolerance nevedla. Více možností nabízí využití genů rezistence nepocházejících z etiopských ječmenů (odlišných od genu Yd2).

Ve VÚRV byla v rámci spolupráce s firmou SELGEN, a.s., ŠS Lužany testována potomstva odrůd Perry a Siga, křížených se současnými odrůdami ozimého ječmene. Některé linie vykazují vysokou úroveň tolerance i dobré agronomické parametry. Pro širší využití genů odlišných od Yd2 je důležité odvození a ověření molekulárních markérů, které umožní jejich rychlou detekci. Ve VÚRV se pracuje na odvození molekulárního markéru genu tolerance odrůdy ozimého ječmene Perry.

Shrnutí

1. Ve zkouškách tolerance, které ve VÚRV probíhaly od roku 1992, převažovala u většiny materiálů mírná až silná náchylnost.
2. Mezi odrůdami jarního a ozimého ječmene byly zjištěny i genotypy s mírnou tolerancí, která byla podmíněna geny odlišnými od Yd2.
3. Přítomnost genu Yd2 může být efektivně prokázána pomocí markéru Ylp.
4. Negativní vlivy genu Yd2 na agronomické i kvalitativní parametry nebyly prokázány.
5. Vzhledem k tomu, že účinek genu Yd2 je ovlivněn genetickým pozadím, jeví se jako výhodné křížit zdroje genu Yd2 s mírně tolerantními odrůdami.
6. U odrůd ozimého ječmene Perry a Siga byly detekovány geny tolerance odlišné od genu Yd2.

Kombinování rezistence k BYDV a mozaikovým virům

Potencionální nebezpečí pro ozimý ječmen představuje u nás též další virové onemocnění – žlutá mozaika ječmene. Jedná se o komplex 3 virů (virus žluté mozaiky ječmene – BaYMV-1 a BaYMV-2 a virus mírné mozaiky ječmene – BaMMV).

Přítomnost těchto virů nebyla dosud na našem území prokázána, v západní Evropě však představují značný problém. Odolnost k mozaikovým virům je podmínkou uplatnění našich odrůd v západní Evropě, navíc lze předpokládat, že v budoucnu dojde k rozšíření mozaikových virů i na naše území. K přenosu virů dochází půdou prostřednictvím houby *Polymyxa graminis*. Ztráty na výnosech mohou dosáhnout více než 50 %. Chemická ochrana je v pěstitelské praxi neproveditelná, takže vytvoření rezistentních odrůd je velmi přínosné.

Jedním z cílů projektu, řešeného ve VÚRV, je kombinování rezistence k BYDV a mozaikovým virům. Pro řešení této problematiky je nutná spolupráce se zahraničními pracovišti (Německo, Itálie). Jedná se o země, kde je možno provádět testy na rezistenci k BaYMV v polních podmínkách.

Ve VÚRV jsou testovány na odolnost k BYDV zahraniční materiály s rezistencí ke žluté mozaice ječmene. Rezistence k mozaikovým virům je ověřována na zahraničních pracovištích i u perspektivního materiálu vytvořeného ve VÚRV. Ve VÚRV je též možno ověřit přítomnost genů rezistence k BaYMV ym4 a ym5 pomocí markéru BMac29.