

STATISTICKÉ HODNOCENÍ MARKEROVACÍ SCHOPNOSTI PCR MARKERU REZISTENCE JABLONÍ VŮČI STRUPOVITOSTI

Statistical Evaluation of the PCR Marker Ability for Resistance against Apple Scab Markering

Pavel Vejl¹, Martina Melounová¹, Petr Sedlák¹, Jana Zoufalá¹, Jan Blažek²

¹Katedra genetiky a šlechtění, ČZU v Praze

²VŠÚO Holovousy s.r.o.

Abstract

208 apple new breeds from Research and Breeding Institute of Pomology Holovousy, Ltd. were screened for resistance to the apple scab. 9-point scale was used for resistance evaluation. 87,5% of hybrids with valuation 9 – 7 were considered as the resistance ones. 12,5% of hybrids with valuation 6 - 3 were stamped as sensitive ones against the apple scab. Each of 208 hybrids were evaluated by means of PCR method. For majorgene *Vf* detection was used a pair of primers according to TARTARINI *et al.* (1999). This marker documented an excellence ability for resistance markering. Its markering ability was statistical evaluated by means of association and contingent coefficients.

Key words: *apple, apple scab, resistance, Vf gene, PCR marker, breeding*

Souhrn

Bylo provedeno vyhodnocení 208 novošlechtění jabloní ve výsadbách VŠÚO Holovousy s.r.o. Z hlediska odolnosti vůči strupovitosti. Pro klasifikaci odolnosti byla použita 9-ti bodová stupnice. 87,5% hybridů s klasifikací 9-7 bylo považováno za odolné. 12,5% hybridů vykazujících stupně odolnosti 6-3 byly označeny jako citlivé vůči strupovitosti. Všechny 208 hybridů bylo podrobeno PCR analýze. Pro detekci majorgenu *Vf* byla použita dvojice primerů navržena TARTARINI *et al.* (1999). Tento marker prokázal výbornou schopnost markerovat tento typ rezistence. Jeho markerovací schopnost byla statisticky zhodnocena s využitím asociačních a kontingenčních koeficientů.

Úvod

Jabloně patří mezi hlavní ovocné druhy a jsou nejdůležitějším ovocem mírného pásma. Mezi velice významné choroby jabloní patří strupovitost, která je způsobena houbou *Venturia inaequalis* CKE. Taxonomicky je tento patogen řazen do oddělení vlastních hub (*Eumycota*), třídy vřeckatých hub (*Ascomycetes*), řádu *Pseudosphaeriales*. Mezi základní způsoby ochrany jabloní proti strupovitosti patří dodržování agrotechnických zásad, chemická ochrana a rezistentní šlechtění.

Rezistence vůči strupovitosti může být řízena monogenně nebo polygenně. Monogenní typ rezistence je charakteristický pro některé botanické druhy rodu *Malus*. Segregace náchylných a rezistentních potomků vzniklých hybridizací probíhá podle Mendelových pravidel. Významným donorem *Vf* genu monogenní rezistence je jablonoň mnohokvětá - *Malus floribunda* Sieb. - klon 821. První rezistentní odrůda Prima byla získána na základě mezidruhového hybridizace s *Malus floribunda* Sieb. Tento gen je vnášen rovněž do řady odrůd jabloní českého původu (VEJL *et al.*, 2003, MELOUNOVÁ *et al.*, 2005). Mezi další majorgeny řídící rezistenci jabloní vůči strupovitosti patří například gen *Vm* získaný z *Malus micromalus* a *Malus atrosanguinea*, gen *Vr* z *Malus pumila*, gen *Vbj* z *Malus baccata* jackii, gen *Vb* z *Hansen's baccata*, gen *Vx* z *Malus pumila* „pitt“, gen *Va* z odrůdy Antonovka a gen *Vg* z odrůdy Golden Delicious. Tyto geny se jeví jako velice nadějně možnosti získání

rezistentních odrůd. V České republice se tyto geny nacházejí v některých materiálech v raných fázích šlechtitelského procesu.

Pro posuzování rezistence vůči strupovitosti ve standardních šlechtitelských procesech je využíváno bonitování semenáček ve sklenících a další hodnocení ve výsadbách hybridů. Pro popis odolnosti respektive citlivosti vůči strupovitosti je využívána obvykle devítibodová stupnice. Genotypy hodnocené stupni 9-7 jsou považovány za odolné. Naopak genotypy hodnocené stupni 6 a níže lze označit za citlivé.

Techniky molekulární biologie představují vhodný nástroj pro přímou detekci řady významných genů. Aplikace molekulárních markerů ve šlechtění – „Marker Assisted Selection“ představuje významnou možnost pro urychlení procesu tvorby nových odrůd. TARTARINI *et al.* (1999) navrhl dvojici primerů, která umožňuje amplifikovat kodominantní PCR („Polymerase Chain Reaction“) primer schopný rozlišit alelické sestavy genu *Vf* v analyzovaných genotypech. Optimalizací metodického postupu a hodnocením českých odrůd a novošlechtění jabloní s využitím této techniky se věnovali VEJL *et al.* (2003), MELOUNOVÁ *et al.* (2004) a MELOUNOVÁ *et al.* (2005).

Pro posuzování markerovací schopnosti genetických markerů lze využít několika způsobů měření závislosti kvantitativních znaků. Koeficient asociace Q (STÁVKOVÁ, 1989) vychází ze skutečných počtů odolných a citlivých rostlin s přítomností nebo absencí markeru. Přizpůsobený korelační koeficient R (STÁVKOVÁ, 1989) je vhodný pro hodnocení oboustranně sdružených znaků. Koeficient asociace V a Pearsonův koeficient kontingence vycházejí z hodnocení relativních četností na principu χ^2 testu (ČERNÝ *et al.*, 1995).

Metodika

Biologický materiál

Pro analýzy bylo použito celkem 208 nadějných hybridů jabloní, které byly opakovaně hodnoceny ve výsadbách VŠÚO Holovousy s.r.o. z hlediska jejich odolnosti vůči strupovitosti (*Venturia inaequalis* CKE.). Jako donory majorgenu *Vf* byly v hybridních kombinacích použity odrůdy Florina, Freedom, Liberty, Priam, Prima, Priscila, Red Free, Resista a Vanda. Dalšími donory genu *Vf* byla řada nadějných hybridů jabloní českého a zahraničního původu. Podrobný popis všech hodnocených genotypů je k dispozici u autorů tohoto příspěvku. Pro klasifikaci rezistence v polních podmínkách byla použita devítibodová stupnice.

Aplikace DNA markerů

Ze všech 208 hodnocených genotypů byla izolována DNA s využitím DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, SRN). Pro posouzení alelické sestavy genu *Vf* byla použita metoda specifické PCR s dvojicí primerů, které navrhl TARTARINI *et al.* (1999). Pro vlastní detekci kodominantního PCR markeru byl použit metodický postup podle VEJL *et al.* (2003) a MELOUNOVÁ *et al.* (2005).

Statistické hodnocení výsledků

Pro statistické hodnocení byly hodnocené genotypy seříděny do kategorie odolné nebo citlivé podle třech kritérií přisnosti:

1. odolné genotypy pouze s klasifikací 9, citlivé genotypy s klasifikací 8 – 3.
2. odolné genotypy s klasifikací 9 a 8, citlivé genotypy s klasifikací 7 – 3.
3. odolné genotypy s klasifikací 9, 8 a 7, citlivé genotypy s klasifikací 6-3.

U těchto tří možností klasifikace byly aplikován koeficient asociace Q pro hodnocení kvalitativních znaků (STÁVKOVÁ, 1989) a přizpůsobený koeficient korelace R pro hodnocení kvalitativních znaků (STÁVKOVÁ, 1989).

U výše definovaných tří kategorií členění genotypů byly stanoveny procentické četnosti výskytu jedinců s přítomností nebo absencí PCR markeru. Tyto údaje byly následně statisticky zpracovány

pomocí neparametrického koeficientu asociace V (ČERNÝ *et al.*, 1995) a Pearsonova koeficientu kontingence (ČERNÝ *et al.*, 1995).

Na souboru získaných údajů byla rovněž ověřena vhodnost vyhodnocení markerovací schopnosti PCR markeru s využitím standardního korelačního koeficientu r . Pro tento účel byla data zpracována binárním způsobem. Zařazení hybridu do skupiny odolných genotypů bylo klasifikováno číslicí 1, zařazení do skupiny citlivých genotypů bylo hodnoceno číslem 0. Výskyt PCR markeru u daného genotypu byl hodnocen číslicí 1 a absence markeru byla naopak hodnocena číslicí 0.

Výsledky a diskuse

Hodnocení odolnosti vůči strupovitosti

Přehled hodnocení odolnosti hybridů jabloní vůči strupovitosti je zpracován v tabulce 1.

Tabulka 1: Hodnocení odolnosti vůči strupovitosti vybraných hybridů jabloní ve výsadbách VŠÚO Holovousy s.r.o.

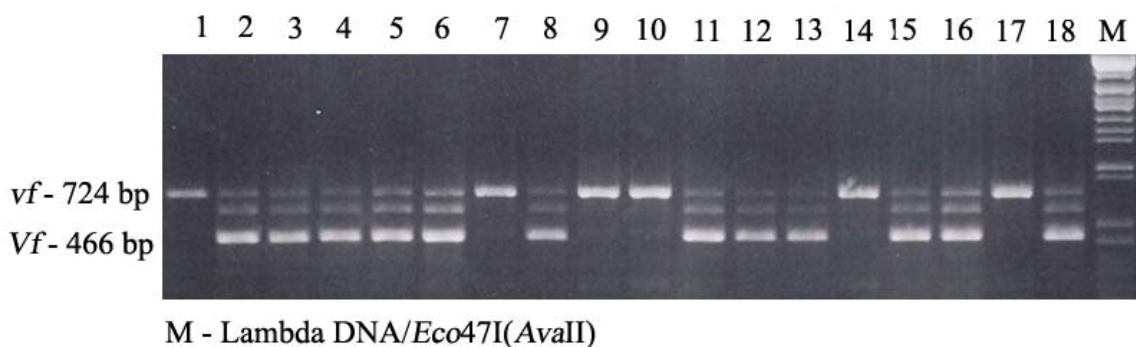
Třídy odolnosti	Počet hybridů	Relativní četnost [%]
9	131	62,98
8	14	6,73
7	37	17,79
6	8	3,85
5	13	6,25
4	4	1,92
3	1	0,48

Za odolné hybridy vůči strupovitosti jsou v šlechtitelské praxi považovány genotypy s hodnocením 9 až 7, kterých bylo v hodnoceném souboru 182 (87,5%). Naopak za citlivé hybridy jsou považovány genotypy hodnocené 6 a níže. Těchto genotypů bylo zjištěno pouze 26 (12,5%). Výrazná převaha genotypů s vysokým stupněm odolnosti vůči strupovitosti jednoznačně svědčí o velice dobré základně českého rezistentního šlechtění jabloní. Nadpoloviční většina hodnocených hybridů (62,98%) vykazovala naprostou rezistenci – imunitu vůči strupovitosti. Pro tyto hybridy je typická přítomnost majorgenu *Vf*, který je celosvětově využíván ve šlechtění jabloní rezistentních vůči strupovitosti.

Markerování majorgenu *Vf* technikou PCR

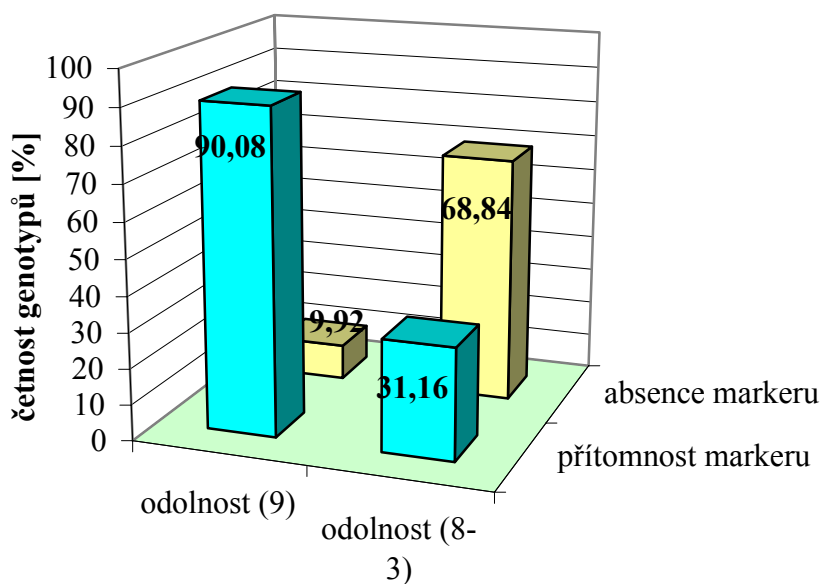
Pomocí DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, SRN) byla ze všech 208 analyzovaných hybridů izolována vysokomolekulární DNA. Její kvalita i kvantita byla vhodná pro následné analýzy založené na principu PCR. Výsledek amplifikace kodominantního markeru *Vf* genu se plně shodoval s údaji TARTARINI *et al.* (1999), VEJL *et al.* (2003) a MELOUNOVÁ *et al.* (2005). Amplifikovaný fragment markerující dominantní alelu *Vf* měl velikost 466 bp. Fragment markerující recesivní alelu *vf* dosahoval velikosti 724 bp – obrázek 1. Ani u jedno z hybridů nebyla zjištěna dominantně homozygotní sestava *VfVf*. Heterozygotní sestava *Vfvf* byla zjištěna u 143 (68,75%) hybridů. Recesivně homozygotní sestavu genu *vfvf* mělo 65 (31,25%) hybridů. Nulová frekvence homozygotní sestavy *VfVf* odpovídá výsledkům, které u zahraničních i českých odrůd zjistili VEJL *et al.* (2003) a MELOUNOVÁ *et al.* (2005). Poměrně nízkou frekvenci dominantních homozygotů v segregujících potomstvech popisuje rovněž MELOUNOVÁ *et al.* (2004).

Obrázek 1: Elektroforeogram kodominantního PCR markeru Vf genu při použití primerového páru podle TARTARINI et al. (1999). Recessivní homozygoté jsou označeny čísly 1, 7, 9, 10, 14 a 17. Zbývající genotypy jsou v genu Vf heterozygotní.



V následujících grafech je znázorněno rozčlenění genotypů podle přítomnosti respektive absence PCR markeru a podle zařazení do skupiny odolných nebo citlivých hybridů vůči strupovitosti.

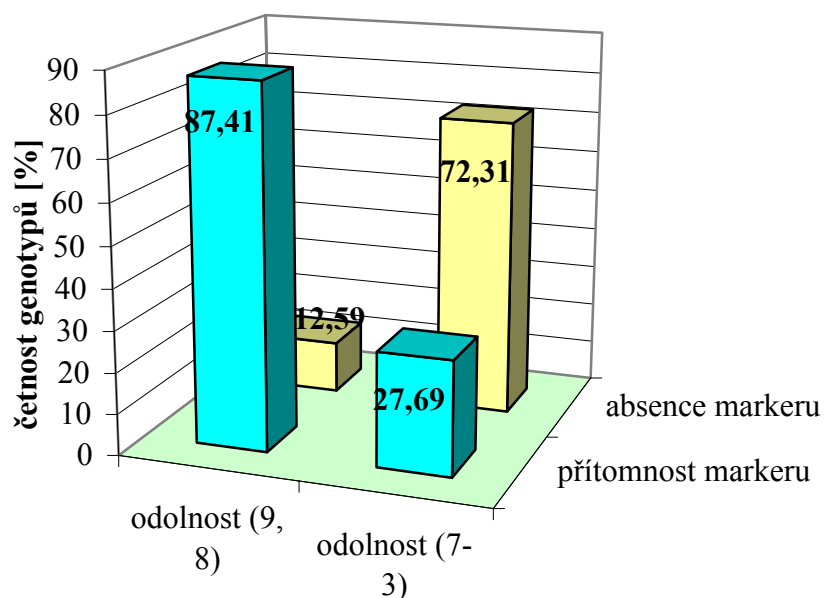
Graf 1: Relativní četnosti hybridů s přítomností a absencí PCR markeru. V grafu je vyčleněna kategorie hybridů zcela imunních vůči strupovitosti – odolnost 9



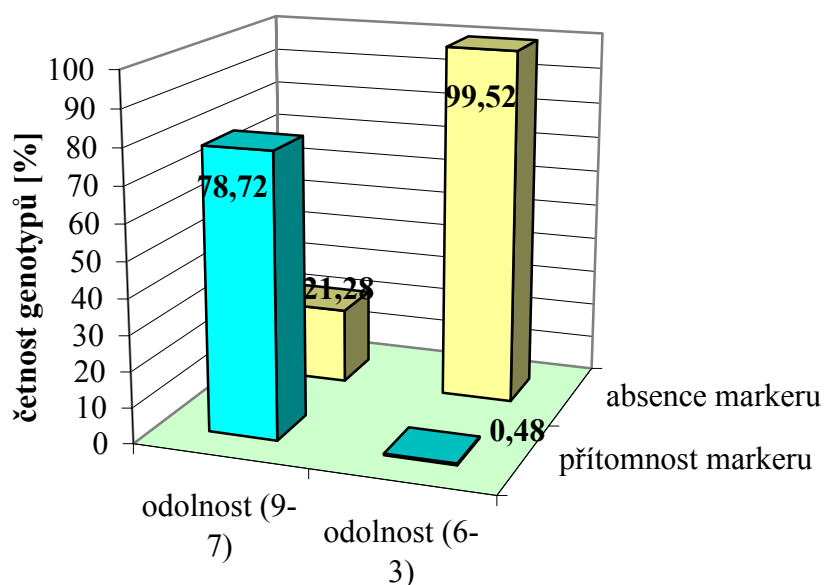
Graf 1 byl zkonstruován na základě vyčlenění skupiny genotypů s imunitou vůči strupovitosti – odolnost hodnocená stupněm 9. Majorgen Vf neslo 90,08% imunních hybridů. Je zajímavé, že vysokou odolnost vůči strupovitosti měly i genotypy, v jejichž genomu se majorgen Vf nevyskytoval (9,92%). Jedná se skutečně o genotypy, v jejichž rodokmenu nebyl použit donor Vf genu – *Malus floribunda*. Vysoký stupeň odolnosti u této skupiny genotypů byl způsoben jinými genetickými mechanismy – polygenně podmíněnými. Ve skupině hybridů s odolností 8-3 se nacházelo 31,16% genotypů s přítomností markeru. Tento fakt svědčí o tom, že přítomnost Vf genu nemusí zajišťovat úplnou imunitu vůči strupovitosti, nýbrž rovněž i vysoký stupeň odolnosti, který je hodnocen stupněm 8 nebo

7, jak vyplývá rovněž z grafu 2. V hodnoceném souboru hybridů bylo zjištěno 7 (3,37%) hybridů, které vykazovaly heterozygotní sestavu *Vf/vf* a byly klasifikovány stupněm odolnosti 8. Dále bylo zjištěno, že 17 (8,17%) hybridů s heterozygotní sestavou *Vf/vf* bylo hodnoceno stupněm odolnosti 7.

Graf 2: Relativní četnosti hybridů s přítomností a absencí PCR markeru. V grafu je vyčleněna kategorie hybridů vysoce odolných vůči strupovitosti – odolnosti 9 a 8



Graf 3: Relativní četnosti hybridů s přítomností a absencí PCR markeru. V grafu je vyčleněna kategorie hybridů vysoce odolných vůči strupovitosti – odolnosti 9 a 8



Graf 3 odpovídá přibližnému způsobu selekce genotypů během šlechtitelského procesu. Jako odolné vůči strupovitosti se považují hybridy s hodnocení odolnosti 9-7. Hybridy s nižší odolností (6 a méně) respektive s vyšší citlivostí vůči strupovitosti jsou v rámci klonové selekce rezistentního šlechtění vyřazeny. Z grafu 3 rovněž vyplývá, že 78,72% odolných hybridů vykazovalo přítomnost majorgenu *Vf*. U zbývajících 21,28% hybridů s odolností vůči strupovitosti se předpokládá zřejmě polygenně podmíněný genetický mechanismus.

Ve skupině genotypů vysloveně citlivých vůči strupovitosti byl získán 1 hybrid (0,48%) opakovaně hodnocený stupněm 6, který byl technikou PCR identifikován jako heterozygot *Vf**vf*. Jedná se o křížence HL1126, který vznikl výběrem z křížení HLII/39/3 x Florina. Cílem tohoto křížení byl přenos majorgenu *Vf* z odrůdy Florina. Pro vysvětlení této situace, kdy hybrid s PCR detekovaným majorgemem *Vf* vykazuje citlivost vůči strupovitosti, lze použít několik hypotéz. Existuje možnost genetické rekombinace mezi přítomností sekvence přímo markerované PCR a absencí skutečného genu rezistence. Tuto hypotézu podporuje skutečnost, že pro analýzy je využíván vazebný PCR marker a že rodičovská odrůda Florina tuto markerovanou sekvenci obsahuje. Další z možných vysvětlení může vycházet z vlivu genového pozadí, které ovlivnilo expresi majorgenu *Vf*. Vliv genového pozadí jako inhibitoru *Vf* genu však nebyl potvrzen u dalších hybridů. Rovněž nelze vyloučit spontánní mutaci *Vf* genu u tohoto genotypu.

Pro posouzení markerovací schopnosti byly dále použity testy založené na výpočtu koeficientů asociace, kontingence a korelace. Cílem těchto testů bylo určit těsnost asociace, kontingence respektive korelace mezi přítomností PCR markeru a zařazením genotypu mezi odolné hybridy vůči strupovitosti – tabulka 2.

Tabulka 2: Asociační, korelační a kontingenční koeficienty použité pro posouzení markerovací schopnosti

Statistické parametry	Třídy hodnocení zařazené do skupiny odolných genotypů		
	9	9 a 8	9, 8 a 7
Koeficient asociace Q pro hodnocení kvalitativních znaků (STÁVKOVÁ, 1989)	0,899	0,895	0,977
Přizpůsobený koeficient korelace R pro hodnocení kvalitativních znaků (STÁVKOVÁ, 1989)	0,600	0,597	0,529
Neparametrický koeficient asociace V (ČERNÝ <i>et al.</i> , 1995)	0,591	0,604	0,760
Pearsonův koeficient kontingence (ČERNÝ <i>et al.</i> , 1995)	0,509	0,517	0,800
Korelační koeficient binárně zadaných dat	0,600	0,571	0,525

Z tabulky vyplývá, že koeficienty asociace Q a V, koeficient kontingence a přizpůsobený koeficient korelace R vykazují shodný trend. Minimálních hodnot dosahují při vyčlenění skupiny zcela imunních hybridů (9). Naopak maximálních hodnot dosahují při roztrídění hybridů podle šlechtitelské praxe – do skupiny odolných jsou zařazeny genotypy hodnocené 9, 8 a 7. Při takovémto rozčlenění je nejvyšší asociace mezi přítomností PCR markeru a zařazením materiálu do skupiny odolných hybridů. Cílem statistického hodnocení bylo rovněž ověřit vhodnost použití standardního korelačního testu pro posouzení markerovací schopnosti. Zadáání dat binárním způsobem není matematickou překážkou pro výpočet korelačního koeficientu. Z tabulky 2 však jednoznačně vyplývá že hodnoty takto stanoveného korelačního koeficientu nekorespondují se vzrůstajícími hodnotami asociačních a kontingenčních koeficientů.

Závěr

Z tohoto souhrnného příspěvku vyplývá, že šlechtění jabloní na rezistenci vůči strupovitosti zaujímá důležitou pozici rovněž v rámci České republiky. Na pracovišti VŠÚO Holovousy s.r.o. se nachází bohatá kolekce materiálů v různém šlechtitelském stupni, která vykazuje rezistenci řízenou majorgenem *Vf*. U řady materiálů je tento typ rezistence podpořen dalšími genetickými mechanismy. Optimalizované PCR markery představují vhodný nástroj pro jednoznačnou a rychlou selekci rezistentních genotypů. Tomuto nasvědčuje zejména fakt, že pouze 1 hybrid z celkového počtu 208 genotypů vykazoval přítomnost PCR markeru *Vf* genu a současně citlivost vůči strupovitosti hodnocenou stupněm 6. Ze statistického šetření vyplývá, že pro posuzování markerovací schopnosti PCR markerů je správné využívat neparametrické koeficienty, které vycházejí ze studia asociačních respektive kontingenčních vztahů.

Literatura

- Černý, J. - Šásek, A. - Vejl, P. - Hanišová, A.: Common wheat (*T. aestivum* L.) marking by determination of approximate dependence of frequency of allelic gliadin genes on quality grade of agronomic character. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 26(4), 1995, 245-258.
- Melounová, M. – Vejl, P. – Sedlák, P. – Blažek, J. – Zoufalá, J. – Milec, Z. – Blažková, H.: Alleles controlling apple skin colour and incompatibility in new Czech apple varieties with different degrees of resistance against *Venturia inaequalis* CKE. *Plant Soil Environ.*, 51, 2005(2), 65-73.
- Melounová, M. - Vejl, P., Sedlák, P. - Reznerová, A. - Tesařová, M. - Blažek, J. - Zoufalá, J.: The Variability of *Venturia inaequalis* CKE. Races in the Czech Republic and the Accumulation of Resistance Genes in Apple Germplasm. *Plant, Soil and Environment*, 50(9), 2004, 416 – 423.
- Stávková, J.: Biometrika a polní pokusnictví. VŠZ v Brně, Brno, 1989.
- Tartarini, S.- Gianfranceschi, L. – Sansavini, S. – Gessler, C.: Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple. *Plant Breeding*, 118, 1999, 183-166.
- Vejl, P. - Skupinová, S. - Blažek, J. - Sedlák, P. - Bardová, M. - Blažková, H. - Milec, Z.: PCR Markers of Apple Resistance to Scab (*Venturia inaequalis* CKE.) Controlled by *Vf* Gene in Czech Apple Breeding. *Plant, Soil and Environment*, 49(9):, 2003, 427–432.

Příspěvek vznikl za podpory grantových projektů agentury NAZV MZe ČR QD1267 a QD1049.

Kontaktní adresa autora: Doc. Dr. Ing. Pavel Vejl, Katedra genetiky a šlechtění, ČZU v Praze, Kamýcká 957, 165 21 Praha 6 – Suchbátka, E-mail: vejl@af.czu.cz