

POSOUZENÍ PRAKTICKÉ VYUŽITELNOSTI VYBRANÝCH DNA MARKERŮ REZISTENCE BRAMBORU VŮČI *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

Assesment of Applicability of Elected Potato Resistance DNA Markers against Late Blight

Petr Sedlák¹, Pavel Křenek¹, Pavel Vejl¹, Martina Melounová¹, Jana Zoufalá¹, Lukáš Kreuz², Jaroslava Domkářová²

¹Katedra genetiky a šlechtění, FAPPZ, ČZU v Praze
²VÚB s.r.o. Havlíčkův Brod

Abstract

The aim of our work was to analyze applicability of CAPS markers GP21 and SPUD237 linked to R1 gene and SPLAT marker R1M1 in MAS of potato for resistance against *Phytophthora infestans*. Markers linked to R1 gene were detected with unexpected high frequencies in a set of 360 potato clones. The specificity of R1M1 marker was confirmed by its presence in only 16% of genotypes tested. Nevertheless R1M1 marker amplification showed low correlation with 32 clones possessing R1 phenotype. Our results indicate high informativeness of SPLAT R1M1 for potato MAS provided that conditions of breeding specified below are followed.

Key words: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, R1 gene, DNA markers

Souhrn

Byla testována využitelnost vazbových CAPS markerů GP21 a SPUD237 a specifického markeru R1M1 genu R1 ve šlechtění bramboru na rezistenci vůči *Phytophthora infestans*. Vazbové markery prokázaly vysokou frekvenci výskytu ve studovaném souboru 360 klonů. Marker R1M1 amplifikoval pouze u 16% genotypů, což naznačuje jeho poměrně vysokou specifitu, avšak překvapivě prokázal nízkou asociaci s R1 fenotypem deklarovaným u 32 odrůd. Naše výsledky naznačují vysokou vypovídací schopnost markeru R1M1 pro MAS bramboru při dodržení níže definovaných podmínek křížení.

Úvod

Rezistence bramboru vůči plísni bramborové (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary), fytopatogenním virům a hádátkům rodu *Globodera* je řízena různými způsoby. Nejčastěji jsou ve šlechtění využívány systémy rezistence vycházející z existence majorgenů řídících hypersenzitivitu, které jsou sice vysoce účinné a poměrně snadno získatelné, ale z hlediska evoluce patogena také nejméně trvanlivé. Tato rasově specifická rezistence (vertikální rezistence) je však v současném šlechtění stále velice oblíbená. Je to dáno dostatkem genových zdrojů běžně dostupných pro šlechtění.

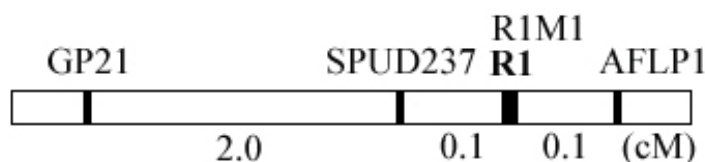
Jako zdroj specifické rezistence vůči *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary pro šlechtění *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* byl použit hexaploidní botanický druh *Solanum demissum* Lindl. (WASTIE, 1991). Vertikální rezistence pocházející ze *S. demissum* Lindl. je řízena R geny. Tyto geny poprvé popsal a charakterizoval společně s odpovídajícími geny virulence patogena BLACK *et al.* (1953), který založil jejich analýzu na hypotéze „gen proti genu“. Celkově bylo klasifikováno jedenáct R genů (R1 – R11) na základě vzájemné kompatibility a inkompatibility specifických ras patogena a diferenčních klonů (MALCOLMSON *et al.* BLACK, 1966). Přesto, že dnes převažují v evropské i americké populaci plísně bramborové komplexní rasy patogena překonávající všechny geny vertikální

rezistence bramboru, je intenzivně studována reziduální účinnost jednotlivých R genů a především jejich pyramidálních kombinací (VAN ECK, 2000).

Vůbec nejrozšířenějším a z hlediska molekulární genetiky nejlépe charakterizovaným R genem bramboru je R1 gen lokalizovaný na horním ramenu chromozómu V. Během posledních let byl tento gen úspěšně mapován pomocí RFLP (LEONARDS-SCHIPPERS *et al.* 1992, marker GP21) a AFLP (MEKSEM *et al.* 1995, marker AFLP1 a DE JONG *et al.*, 1997, marker SPUD237) technik. BALLVORA *et al.* (2002) R1 gen izoloval, identifikoval a přenesl do náchylné odrůdy Desireé. K identifikaci transgenu použil specifický PCR marker (námi označený jako R1M1 marker), který je součástí oblasti genu odpovídající za rozpoznání patogena na počátku infekce – LRR (Leucine Rich Repeats) domény.

Pro vlastní molekulárně genetickou analýzu R1 genu byly v této práci aplikovány CAPS markery GP21 a SPUD237 a SPLAT marker R1M1 (BALLVORA *et al.* 2002). Konverzi RFLP markeru GP21 a AFLP markeru SPUD237 na technicky méně náročné a snadno detekovatelné CAPS markery popsal MEKSEM *et al.* (1995), respektive DE JONG *et al.* (1997). Marker GP21 se nachází 2,1cM a marker SPUD237 0,1cM proximálně od genu R1, R1M1 marker je na gen R1 vázán úplně a námi neanalyzovaný marker AFLP1 leží 0,1cM distálně od genu R1 (Obrázek 1).

Obrázek 1: Mapa části chromozómu V u *Solanum tuberosum ssp. tuberosum L.* s lokalizací alely R1 a markerů AFLP1, R1M1, SPUD237 a GP21 (upraveno podle DE JONG *et al.*, 1997 a BALLVORA *et al.* 2002)



Vzhledem ke složitosti genomu bramboru lze obecně říci, že jakákoliv metoda, která při šlechtění vstoupí do selekčního procesu, může přinést pozitivní efekt, zejména z hlediska urychlení a správného posouzení sledované vlastnosti. Cílem předkládaného příspěvku je zhodnocení výše zmíněných DNA markerů, které byly uvedenými autory charakterizovány a pro svou vysokou vypovídací schopnost námi testovány s cílem jejich brzkého a úspěšného zavedení do podmínek českého šlechtění, které má o genetické markery zájem.

Metodika

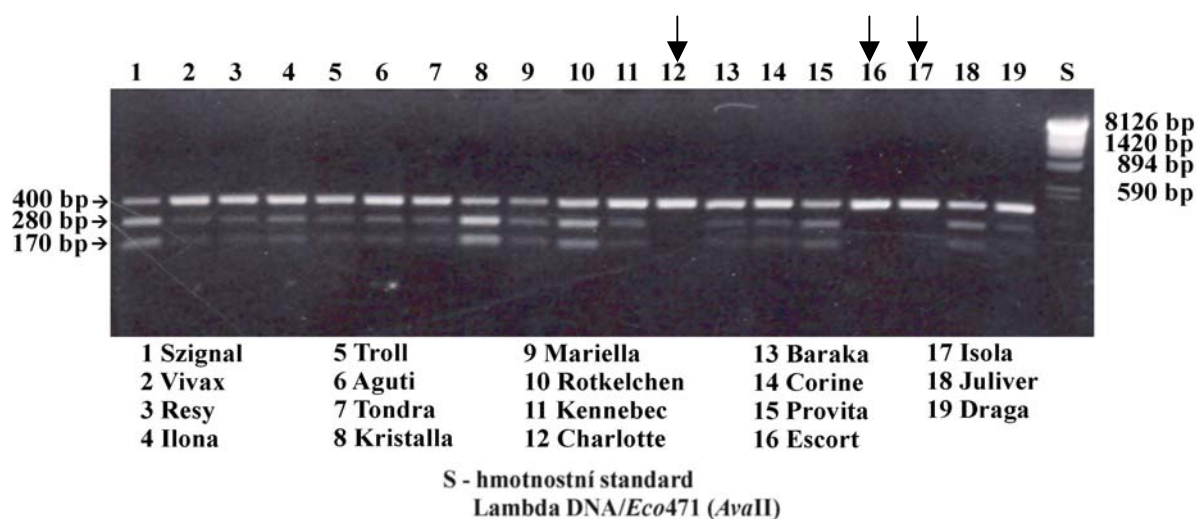
Základním materiálem pro celou analýzu bylo široké spektrum genotypů bramboru a příbuzných druhů rodu *Solanum*. Celkově se jednalo o 360 klonů. Genotypy byly získány jako etiolizované 10 cm rostlinky z *in vitro* z genové banky při Výzkumném ústavu bramborářském v Havlíčkově Brodě. Tento soubor byl rozdělen do několika kolekcí, podle charakteru rezistence, kterou jednotlivé klony vykazují. Fenotypové údaje byly laskavě poskytnuty VÚB Havlíčkův Brod, případně doplněny z veřejně přístupných databází (europotato.org a genres.de/eva). Izolace DNA byla provedena pomocí kitu „DNeasy plant Mini Kit“ (Qiagen, SRN) podle instrukcí výrobce. Kvalita izolované DNA byla potvrzena elektroforeticky. Všechny genotypy byly testovány pomocí třech PCR markerů, které byly studovány v souvislosti s genem R1. CAPS markery GP21 a SPUD237 byly amplifikovány u všech genotypů za reakčních podmínek a teplotního a časového profilu amplifikace a digesce PCR produktů probíhala podle MEKSEM *et al.* (1995), DE JONG *et al.* (1997) a ROUPPE *et al.* (1998) v termocykleru T-gradient (Biometra WhatmanGmbH, SRN). Pro amplifikaci R1M1 markeru (BALLVORA *et al.*, 2002) bylo použito námi optimalizované složení reakční směsi a upraven teplotní a časový průběh amplifikace. CAPS markery byly separovány elektroforeticky ve 2,5% agarózovém gelu, R1M1 marker pak v 1,5 % agarózovém gelu. Separovaná DNA byla barvena ethidium bromidem.

Výsledky

Markery GP21, SPUD237 a R1M1 pro detekci R1 genu byly testovány na souboru 320 odrůd *Solanum tuberosum ssp. tuberosum* a souboru 40 botanických druhů rodu *Solanum*.

Vzorový elektroforeogram (obrázek 2) znázorňuje detekci CAPS markeru SPUD237 po restriktivním štěpení *AluI* u sady 19 odrůd bramboru. Podle DE JONG *et al.* (1997) je přítomnost tří zón (400bp, 280bp, 170bp) v cis fázi vazby s alelou R1 a přítomnost jednoho fragmentu (400bp) detekuje recesivního homozygota v genu R1. Z obrázku je patrné, že pouze u tří odrůd nebyl detekován polymorfismus markeru (tři zóny). Celkově byl polymorfismus markeru SPUD237 popsán DE JONGEM *et al.* (1997) při restriktivním štěpení SPUD237 PCR produktu restriktivní endonukleázou *AluI* detekován u 190 z 320 testovaných odrůd brambor, tj. téměř u 60% testovaných odrůd. Obdobně CAPS marker GP21 (4 fragmenty po restriktivním štěpení *AluI* podle MEKSEM *et al.* (1995), DE JONG *et al.* (1997) a ROUPPE *et al.* (1998) v cis fázi vazby s R1 genem) byl detekován u 56% z 320 testovaných odrůd brambor. Digescí PCR produktu markeru GP21 pomocí restriktázy *AluI* byl zjištěn dodatečný polymorfismus, který nebyl výše zmíněnými autory publikován (výsledky nejsou prezentovány).

Obrázek 2: PCR marker SPUD237 po digesci restriktivním enzymem *AluI*



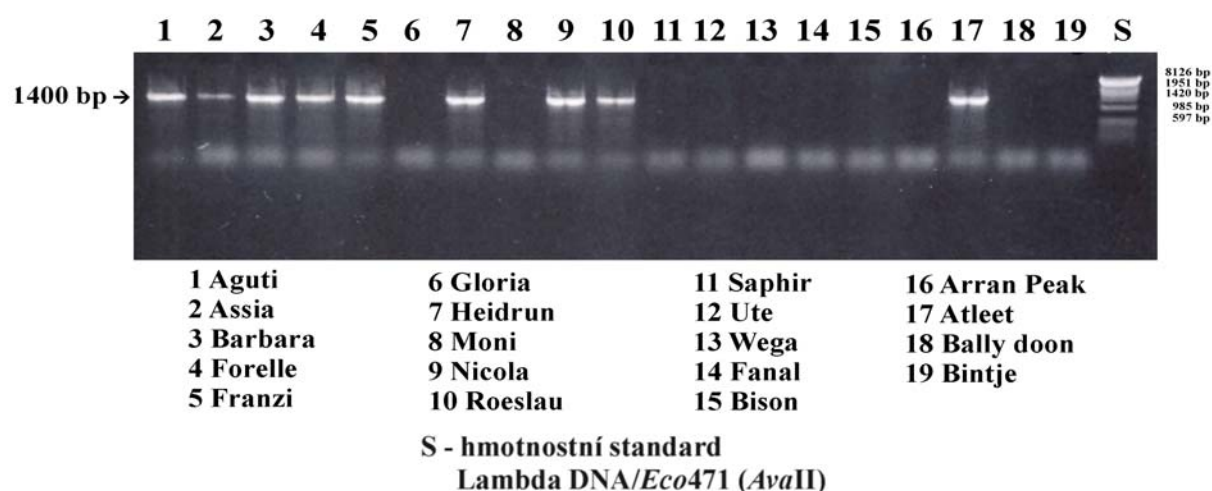
Pozn.: U genotypů označených šipkou nedošlo k detekci polymorfizmu markeru SPUD237

Detekce markeru SPUD237 u botanických druhů rodu *Solanum* byla druhově specifická. Jeden fragment (400bp) byl stanoven u *Solanum phureja*, *S. bulbocastanum*, *S. pinnatisectum* (výsledky nejsou prezentovány). Polymorfismus markeru SPUD 237 (tři fragmenty v souladu s DE JONG *et al.* (1997) byl specifický pro *S. demissum*, *S. microdontum*, *S. verrucosum*, *S. vernei*, *S. stoloniferum* a *S. ohyadenium* (výsledky nejsou prezentovány). Polymorfismus markeru GP21 nebyl u testovaného souboru botanických druhů rodu *Solanum* narozdíl od markeru SPUD237 druhově specifický.

Výsledek amplifikace SPLAT PCR markeru R1M1 (sekvenční marker genu R1 podle BALLVORA *et al.* (2002)) u sady 19 odrůd bramboru je znázorněn na obrázku 3. Z elektroforeogramu je patrné, že u některých odrůd došlo k výrazné amplifikaci markeru R1M1. Délka amplifikovaného produktu byla v souladu s BALLVORA *et al.* (2002) 1,4 kb. V souboru testovaných odrůd bramboru (320 odrůd) byla frekvence výskytu markeru R1M1 15,8%. Frekvence markerů SPUD237 (3 zóny) a GP21 (4 zóny) v rámci stejného souboru testovaných odrůd brambor byla 60%, respektive 56%, tedy mnohem větší než frekvence markeru R1M1.

V rámci hodnocení botanických druhů rodu *Solanum* byl detekován marker R1M1 pouze u *S. demissum* (PI 160220), tj. druhu, ze kterého byl R1 gen přenesen do *S. tuberosum ssp. tuberosum*. U dalších dvou testovaných klonů *S. demissum* (PI 275209, 8LO) nedošlo k amplifikaci markeru R1M1 (výsledky nejsou prezentovány).

Obrázek 3: Amplifikace markeru R1M1 u vybraných odrůd brambor



Podle fenotypových charakteristik získaných z VÚB Havlíčkův Brod a databází (europotato.org a genres.de/eva) byly odrůdy rozděleny do několika skupin: deklarovaná přítomnost genu R1, deklarovaná přítomnost jiných genů rezistence vůči plísni (R3, R4 a R10) a tedy absence genu R1 a deklarovaná absence genů rezistence vůči plísni - r odrůdy. Podle předpokladu mělo dojít k amplifikaci markeru R1M1 pouze u první skupiny odrůd. Nicméně marker amplifikoval s vysokou frekvencí u druhé skupiny (18 amplifikací na 27 genotypů) i třetí skupiny (3 amplifikace na 7 genotypů). Došlo však i k opačnému fenoménu, absenci amplifikace markeru R1M1 u první skupiny odrůd. Frekvence absence amplifikace byla v první skupině tedy o něco nižší (10 absencí markeru na 32 genotypů), než výskyt amplifikace markeru v druhé a třetí skupině. Výsledky detekce GP21, SPUD237 a R1M1 u vybraných odrůd s deklarovanou přítomností R1 genu a jiných genů R jsou shrnuty v tabulce 1. V tabulce je psáno tučným písmem všech 10 odrůd s absencí amplifikace R1M1 markeru. Amplifikace R1M1 markeru, který byl navržen BALLVORA *et al.* (2002) na základě sekvence R1 genu, tak navzdory očekávání prokázala nízký konsenzus s R1 fenotypem. Vzhledem k nespecifickému výskytu markerů GP21 a SPUD237 v rámci testovaného souboru klonů nebyla hodnocena jejich asociace s fenotypovými charakteristikami rezistence jednotlivých odrůd.

Diskuse

Cílem této práce bylo zhodnotit využitelnost dvou vazbových (GP21 a SPUD237) CAPS markerů a SPLAT PCR markeru R1M1 genu R1, který udílí bramboru hypersenzitivní rezistenci vůči všem rasám *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, kromě ras s virulencí 1, v procesu MAS (markery asistovaná selekce) brambor. Výhody MAS proti klasickým šlechtitelským metodám shrnuje např. VEJL *et al.* (2001).

Detekce výše uvedených markerů u rozsáhlého souboru 320 odrůd brambor a 40 příbuzných druhů rodu *Solanum* překvapivě prokázala velice nízký konsenzus mezi výskytem polymorfismu vazbových markerů GP21 (4 fragmenty) a SPUD237 (3 fragmenty) asociovaného s rezistencí R1 podle LEONARDS-SCHIPPERS *et al.* (1992), MEKSEM *et al.* (1995), respektive DE JONG *et al.* (1997) a amplifikací R1 specifického markeru R1M1 (BALLVORA *et al.* 2002). Polymorfismus markerů GP21 a SPUD237 asociovaný s R1 byl u všech testovaných klonů stanoven několikanásobně častěji než R1 specifický marker R1M1, což naznačuje vysokou sekvenční homologii v obou vazbových markerech v rámci celého rodu *Solanum*. To potvrzuje i skutečnost, že k amplifikaci GP21 a SPUD237 PCR markerů došlo prakticky u všech testovaných odrůd a botanických druhů rodu *Solanum*. Vliv rekombinací markerů a R1 genu v průběhu tvorby odrůd přispěl k častému výskytu polymorfismu markerů SPUD237 a GP21 pravděpodobně jen velmi málo vzhledem k malým genetickým vzdálenostem markerů od genu R1. O specifitě R1M1 markeru svědčí, že k jeho amplifikaci došlo

pouze u jednoho klonu *S. demisum* Lindl. (PI 160220) ze všech testovaných botanických druhů rodu *Solanum*. Detekce R1M1 markeru u *S. demisum* koresponduje s použitím tohoto botanického druhu ve šlechtění na vertikální rezistenci bramboru vůči plísni bramborové (WASTIE, 1991).

Tabulka 1: Detekce markerů GP21, SPUD237, R1M1 v závislosti na fenotypových charakteristikách odrůd *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*

Deklarovaná přítomnost R genů	Odrůdy	Detekován marker GP21	Detekován marker SPUD237	Detekován marker R1M1
R1	Maris Peer	*	*	*
	Clivia	-	*	*
	Kennebec	*	*	*
	Troll	*	*	*
	Prior	*	*	-
	Mariella	*	*	*
	Karmona	-	-	-
	Milva	*	-	-
	Morene	-	-	-
	Apta	*	*	*
	Atleet	*	*	*
	Breza	-	*	*
R1, R3	Marijke	*	*	-
	Resy	*	*	*
	Rotkehlchen	*	*	-
	Adretta	*	*	-
	Schwalbe	*	*	-
R1, R4	Olev	-	*	*
	Virginia			*
R1, R2, R3	Magyar Rozsa	*	*	*
	Szignal	*	*	*
	Fresco	-	*	-
	Pentland Crown	-	-	-
R1, R2, R3, R4	Tondra	-	*	*
R1, R2, R3, R10	Escort	*	-	*
R10	Jaerla	-	-	*
	Premiere	-	*	-
	Draga	*	*	*
	Kristalla	*	*	*
	Provita	*	*	*
	Corine	-	*	*
	Anosta	*	*	*
	Vivaks	*	*	-

Pozn.:

* detekován marker v cis fázi s R1 podle dříve publikovaných prací (viz text, část výsledky)

- detekován fragment (SPUD237), respektive 3 fragmenty (GP21) nebo absence amplifikace (R1M1) markerující senzitivitu podle dříve publikovaných prací (viz text, část výsledky)

Překvapivá nespecifičnost amplifikace markeru R1M1 vzhledem k fenotypovým charakteristikám odrůd (část výsledky) nás vedla k navržení a testování několika hypotéz vysvětlujících oba fenomény, tedy výskyt amplifikace R1M1 u odrůd s deklarovanou absencí R1 genu a absenci amplifikace R1M1 v rámci souboru R1 odrůd.

Fenomén 1 (amplifikace markeru R1M1 u odrůd s danou absencí genu R1)

První testovanou hypotézou byla nespecifičnost amplifikace. Ta byla málo pravděpodobná vzhledem k amplifikaci markeru pouze u jednoho klonu *S. demissum* Lindl., ze čtyřiceti testovaných botanických druhů rodu *Solanum* a nízké frekvenci markeru mezi všemi analyzovanými klony. Hypotéza nebyla přijata na základě testování variací úprav chemického složení PCR reakce a teplotního profilu amplifikace, které vždy vedly ke stejným výsledkům.

Druhou hypotézou byla nespecifičnost amplifikace R1M1 markeru vzhledem k přítomnosti R genů (v našem případě geny R1, R3 a R10). Hypotéza byla formulována na základě známé sekvenční homologie genů rezistence v rámci vyšších rostlin (LEISTER *et al.*, 1996). Tuto hypotézu s velkou pravděpodobností vyvrátil restričním štěpením R1M1 PCR produktu SEDLÁK *et al.* (2005)

Nejvíce pravděpodobnou hypotézou je inhibice exprese R1 genu (v našem případě u R3 a R10 a r odrůd) prostřednictvím inhibitoru, pro kterou existují experimentální důkazy (EL KHARBOTLY *et al.* 1995). ORDONEZ *et al.* (1997) na základě výsledku segregčních analýz tetraploidních odrůd brambor předpokládá, že R geny jsou inhibovány dominantním supresorem, jehož aktivace je rasově specifická.

Fenomén 2 (absence amplifikace R1M1 markeru v rámci souboru R1 odrůd)

Přesto, že k absenci amplifikace R1M1 došlo v menší míře než byl výskyt fenoménu 1, jedná se o dostatečnou frekvenci a nelze tedy přijmout hypotézu o chybě laboratorního stanovení případně o dílčích nespolehlivostech fenotypových údajů.

Jako pravděpodobná se jeví existence dosud neidentifikované alely, nebo paralog R1 genu, která/který řídí stejnou rasově specifickou rezistencí jako sekvence popsaná BALLVORA *et al.* (2002). To, že se skutečně může jednat o neznámou alelu R1 genu naznačují aktuální trendy studia botanických druhů rodu *Solanum* jako potenciálních donorů širokospektrální rezistence vůči *P. infestans*. Nedávno byly nezávisle na sobě klonovány dva geny širokospektrální rezistence *S. bulbocastanum* vůči *P. infestans*, gen RB (SONG *et al.*, 2003) a gen Rpi-blb1 (VAN DER VOSSSEN *et al.*, 2003) jejichž funkce byla úspěšně potvrzena transformací náchylných odrůd. Oba geny jsou lokalizovány na stejném lokusu chromozómu 8 a jsou naprosto identické v kódující sekvenci, liší se pouze bodovými mutacemi a insercemi v lemujících oblastech a jediném společném intronu. Vzhledem k výskytu jednonukleotidového polymorfizmu byly geny RB a Rpi-blb1 označeny jako alely (VAN DER VOSSSEN *et al.*, 2003). Zpětný primer R1M1 markeru nasedá na templát v 3' lemujícím regionu a je proto možné, že u odrůd s fenoménem 2 bodové mutace nevedly k "annealingu" zpětného primeru. Obdobně hypervariabilní LRR doména R1 genu, oblast annealingu vedoucího primeru, může být nositelem synonymních mutací (VAN DER VOSSSEN *et al.*, 2003) a tedy polymorfizmu templátu pro vedoucí primer. Z těchto důvodů navrhneme v budoucnu primery pro 5', 3' lemující sekvence R1 genu a jeho konzervativní oblasti. Tyto markery pak budou amplifikovány u odrůd s výskytem fenoménu 2 pro detekci neznámé alely s fenotypem R1.

Prokázali jsme, že markery GP21, SPUD237 a dokonce ani specifický marker R1M1, které byly navrženy pro mapování vazbové skupiny R1 genu (LEONARDS-SCHIPPERS *et al.* 1992, MEKSEM *et al.* 1995, DE JONG *et al.* 1997, BALLVORA *et al.* 2002) nelze přímo použít ke stanovení přítomnosti genu u odrůd s neznámým genotypem. Nicméně markery jsou vysoce informativní pro MAS potomstva křížení rodiče s fenotypem R1 a přítomností polymorfizmu markeru asociovaného s rezistencí (GP21, SPUD237), nebo R1M1 zóny s náchylným rodičem, nebo rodičem s jinými geny R než R1 pokud u nich nedošlo k amplifikaci R1M1 markeru. Pro selekci náchylného rodiče je určující absence amplifikace R1M1 markeru a fenotypové charakteristiky. Vazbové markery (GP21, SPUD237) nemohou být k této selekci použity vzhledem k jejich vysoké frekvenci výskytu v rámci rodu *Solanum*. Přítomnost

polymorfizmu vazbového markeru asociovaného s rezistencí R1 u odrůdy s fenotypem r, nebo R, kromě R1 (náchylné v R1) vede k vyloučení vybraného genotypu z křížení vzhledem k předpokladu, že se jedná o inhibici R1 genu dominantním supresorem (ORDONEZ *et al.*, 1997). Genotyp je tak vyloučen kvůli předpokladu přítomnosti dominantního supresoru, který není cílem vnášet do genotypů potomstva křížení. Pokud však u stejného genotypu nebude detekována zóna R1M1 jedná se o náchylný klon bez přítomnosti R1 genu a tento lze ke křížení použít (absence dominantního supresoru). Genotyp senzitivní v R1 s přítomností polymorfizmu vazbového markeru a s absencí zóny R1 je možno označit jako falešné pozitivum vzhledem k předpokládané přítomnosti dominantního supresoru (mylně stanoven přítomností polymorfizmu vazbového markeru). Tato falešná pozitiva jsou zdůvodněním, proč s ohledem na vysokou frekvenci výskytu polymorfizmu markerů GP21 a SPUD237 asociovaného s rezistencí R1 v rámci rodu *Solanum* nelze tyto markery použít k selekci náchylných genotypů. R1M1 marker tak umožňuje MAS mezi náchylnými genotypy s mnohem rozsáhlejšího spektra odrůd s požadovanými agrotechnickými vlastnostmi než vazbové markery GP21 a SPUD237. Především z tohoto důvodu, ale i z důvodu možné rekombinace mezi vazbovými markery a r alelou u potomstva křížení má pro MAS brambor na vertikální rezistenci vůči plísni bramboru největší vypovídací hodnotu R1M1 marker. R1M1 marker je tedy vysoce informativní a přínosný pro křížení za výše definovaných podmínek.

Přítomnost dominantního supresoru u odrůd, kde došlo k amplifikaci R1M1 s náchylným fenotypem nebo prezencí jiných genů R než R1 by mělo být dále testováno křížením s náchylnými odrůdami, u kterých nedošlo k amplifikaci markeru R1M1.

Literatura

Přehled citované literatury je k dispozici u autora.

Příspěvek vznikl za podpory grantového projektu agentury NAZV MZe QF4107.

Kontaktní adresa autorů: Ing. Petr Sedlák, Katedra rostlinné výroby, ČZU v Praze, Kamýcká 957, 165 21 Praha 6 – Suchbátka, E-mail: sedlak@af.czu.cz