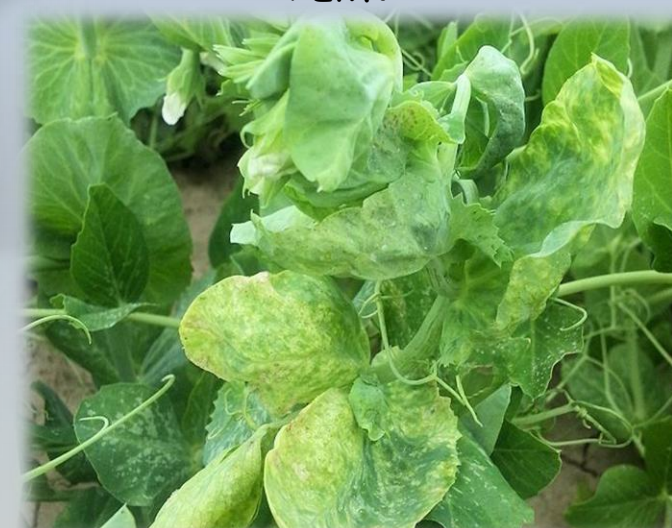


Screening genotypů hrachu na odolnost k virům PEMV a PSbMV

Macková H., Horáček J., Ludvíková M., Dostálová R.
Agritec Plant Research, s.r.o.



PEMV



PSbMV

Úvod

Jednou z velmi významných chorob hrachu je v současné době virus mozaiky hrachu přenosný semenem Pea seed-borne mosaic virus - PSbMV (Hampton a Mink 1975, Piáková et al. 2006). Jedná se o typického zástupce rodu Potyvirus (čeleď Potyviridae). Typickými příznaky infekce hrachu tímto virem je svinutka listů, zkrácení internodií, různý stupeň zakrslosti infikovaných rostlin, dále deformace květů a vývoj malých deformovaných lusků. Příčinou snadného šíření je přenos semen, který byl popsán u tak celosvětově významných plodin jako je hrách, čočka nebo bob. U vnímavých kultivarů hrachu se uvádí přenos semen až do 30 %, ale byly zaznamenány případy, kdy 90 % komerčního osiva bylo infikováno. Virus je přirozeně přenosný vektory, a to mšicemi nepersistentním způsobem. V současnosti se rozlišují čtyři patotypy PSbMV označované P1, P2, P3 a P4, ze kterých se v Evropě běžně vyskytuje patotyp P1 a v minulém roce byl potvrzen výskyt patotypu P4. Rezistence ke standardním výše uvedeným patotypům PSbMV je založena recesivně geny sbm-1, sbm-2, sbm-3 a sbm-4, které odpovídají zmíněným patotypům PSbMV. Spolu s PSbMV se velmi často vyskytuje výrůstková mozaika hrachu PEMV - Pea enation mosaic virus, obě virózy mohou způsobovat významné výnosové ztráty převyšující i 50 - 60 %. Výrůstková mozaika hrachu se projevuje napadením listů, deformací úponků, tvorbou průsvitných chlorotických skvrn, na nichž se později vytváří na spodní straně listové čepele výrůstky (enace). Virulentnější izoláty mohou způsobovat deformaci lusků, zkrácení internodií a zakrslost vegetačního vrcholu. Virus výrůskové mozaiky hrachu je v přírodě rozšiřován perzistentně mšicemi. Virus je snadno přenosný mechanicky a pravděpodobně i osivem.

Materiál a metody

V polních podmínkách byl v letech 2019-2021 založen pokus s odrůdami a liniemi hrachu. Celkem bylo hodnoceno 282 položek, které zahrnovaly registrované odrůdy ze seznamu SDO, šlechtitelské linie, zdroje rezistence k virovým a houbovým patogenům s deklarovanými vlastnostmi. Hodnocení fenotypu bylo provedeno u celého souboru, stejně tak analýzy ELISA testů. U jednotlivých položek byla molekulárními metodami prokazována rezistence či senzitivita ke spektru chorob. Použity byly molekulární markery pro detekci rezistence/senzitivity k oběma virózám: PSbMV patotypu 1 (Smýkal et al., 2011) a PEMV, kde je pomocí metody PCR 98,7% spolehlivost predikce (Jain et al., 2013).

Metoda ELISA - Detekce PEMV a PSbMV

Detekce obou rostlinných virů byla provedena metodou DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Pro tento účel byly využity komerční soupravy PSbMV Complete Kit (Loewe, Německo) a PEMV Complete Kit (Loewe, Německo). Soupravy obsahovaly mikrotitrační destičky, roztoky specifických protilátek i veškeré chemikálie pro přípravu pufrů. Detekce probíhala ve formátu 96 jamkových mikrotitračních destiček. V prvním kroku byla na povrch jamek imobilizována specifická protilátka, inkubace s roztokem protilátky probíhala po dobu 4 hod při 37 °C. Odebrané vzorky listů byly ručně homogenizovány ve vzorkovém pufru v 1,5 ml mikrozkušavkách pomocí jednorázových plastových homogenizátorů. Druhým krokem po promytí mikrotitrační desky promývacím pufrům byla inkubace se vzorky, která probíhala přes noc při 4 °C. Dále byly jamky inkubovány roztokem konjugátu specifické protilátky a alkalické fosfatázy po dobu 5 hod při 37 °C. V případě přítomnosti antigenu (částice viru) došlo k navázání konjugátu na antigen a k vytvoření sendviče. Ve čtvrtém kroku byl do jamek přidán chromogenní substrát (4-nitrofenyl fosfát), který byl alkalickou fosfatázou přeměněn na žlutý 4-nitrofenol. Žluté zbarvení bylo změřeno spektrofotometricky při 405 nm pomocí ELISA readeru VersaMax (Molecular Devices, USA). Všechny promývací kroky byly provedeny na promývače Dynawash (Dyrex, CZ). Pozitivní a negativní kontrolní vzorek byly součástí soupravy.

Výsledky

Pomocí metody ELISA byly provedeny detekce virů PEMV a PSbMV. Byly odebrány listy, na kterých byly typické chlorózy a deformace. Při hodnocení fenotypu byly příznaky PSbMV méně rozpoznatelné, neboť většina hodnocených odrůd a šlechtitelských linií je semi-leafless a typické příznaky svinování listů nejsou znatelné, jsou viditelné až na semenech sklizeného hrachu. Potvrdila se přítomnost virů PEMV i PSbMV. Výsledky testů ELISA a PCR jsou uvedeny v tabulkách. Hodnota 1 znamená, že daný vzorek vykazoval při hodnocení ELISA pozitivní reakci. Vzorek byl napaden virem PEMV respektive PSbMV. Hodnota 0 znamená, že daný vzorek nevykazoval při hodnocení ELISA pozitivní reakci. Testy ELISA proběhly ve dvou letech ve dvou opakováních, první opakování je značeno IA, druhé opakování je značeno IB. Vzorky na analýzu byly odebrány vždy z totožné rostliny v časovém rozmezí 14 dnů. Označení S při hodnocení metodou PCR znamená, že vzorek je k chorobám PEMV a PSbMV senzitivní, R je k chorobám PEMV a PSbMV rezistentní. Z dizajnu pokusu vyplývá, že pokud se na dané lokalitě vyskytlo virové onemocnění, což bylo patrné nejen z polního hodnocení, ale i z výsledků ELISA testů, je zřejmé, že choroba se šířila v rámci celém porostu.



Metoda PCR

IZOLACE DNA

Listy rostlin byly homogenizovány v kapalném dusíku a pomocí Isolate II Genomic DNA Kit (Bioline Meridian Bioscience) z nich byla izolována genomová DNA dle protokolu výrobce. DNA získaná z přibližně 100 mg materiálu byla rozpuštěna ve 200 µl elučního pufru a zamražena.

PCR

PCR probíhala v termálním cyklu Mastercycler Gradient (Eppendorf, Německo) v objemu 15 µl v 0,2ml zkumavkách (TreffLab, Švýcarsko).

Složení reakční směsi bylo: 20-50 ng DNA, 1x Dream Taq PCR buffer, 100 µM každého nukleotidu, 0,4 µM každého primeru a 1 U Dream Taq polymerázy (Fermentas, Litva).

Produkty PCR reakce byly rozděleny na 1,5% agarózovém gelu (Serva, Německo) barveném ethidium bromidem, nasvíceny UV světlem a nasnímány.

		ELISA	2021	ELISA	2020	2021	2021
vzorek	odrůda/linie	IA	IB	IA	IB	PCR PEMV	PCR PSBMV
1	AUDIT	0	1	0	0	S	S
2	SALAMANCA	1	1	0	0	S	S
3	GAMBIT	1	0	0	0	S	S
4	ESO	0	1	0	1	S	S
5	IMPULS	1	0	0	1	S	S
6	AVATAR	0	0	1	1	S	S
7	PROPHET	1	0	0	0	S	S
8	ATLAS	1	1	0	1	S	S
9	LISSO *	0	0	0	1	S	S
10	TURNIA	1	1	0	1	S	S
11	ZEKON	1	1	0	0	S	S
12	NATURA	0	1	0	0	S	S
13	GREGOR	1	0	0	1	S	S
14	CRACKER JACK	0	0	0	1	S	S
15	Mutant 1-150-81	1	1	0	0	S	S
16	7395	1	0	0	0	S	S
17	7446	0	1	0	0	S	S
18	7446	0	1	0	0	S	S
19	7541	0	1	0	1	S	S
20	7606	0	1	0	1	S	S
21	7647	0	0	0	0	S	S
22	7647	1	1	0	1	S	S
23	7717	1	1	0	0	S	S
24	M 410	1	1	0	0	S	S

		ELISA	2021	ELISA	2020	2021	2021
vzorek	odrůda/linie	IA	IB	IA	IB	PCR PEMV	PCR PSBMV
1	AGT 2018.26	0	0	0	0	R	R
2	B 99/100	0	0	0	0	R	R
3	B 99/103	0	0	0	0	R	R
4	B 99/104	0	0	0	0	R	R
5	B 99/108	0	0	0	0	R	R
6	B 99/112	0	0	0	0	R	R
7	B 99/116	0	0	0	0	R	R
8	B 99/118	0	0	0	0	R	R
9	AGT 206.5	0	0	0	0	R	R
10	AGT 212.11	0	0	0	0	R	R

U 10 linií byla PCR testováním prokázána rezistence k virovým onemocněním PEMV a PSbMV. Tyto linie současně nevykazovaly žádné symptomy nakažení ověřené ELISA testy.

U 24 linií byla PCR testováním prokázána senzitivita k virovým onemocněním PEMV a PSbMV. Tyto linie současně vykazovaly symptomy nakažení ověřené ELISA testy.

Závěr

V průběhu let 2020 a 2021 byly provedeny vstupní screeningové PCR a ELISA testy na zjištění senzitivity/rezistence odrůd/linií hrachu k virovým chorobám PEMV a PSbMV u 65 genotypů. ELISA testy byly provedeny u 282 položek. Z našich výsledků je zřejmé, že u 10 linií byla PCR testováním prokázána rezistence k virovým onemocněním PEMV a PSbMV a zkoumané linie současně nevykazovaly žádné symptomy nakažení ověřené ELISA testy. Tyto informace budou využity ve šlechtění nových odrůd na rezistenci proti virovým onemocněním PEMV a PSbMV.

V následujících letech bude probíhat navazující screening odrůd a linií hrachu, jak těch, které jsou běžně komerčně dostupné tj. odrůd ze Seznamu doporučených odrůd (SDO) polního hrachu, zdrojů rezistence s deklarovanými vlastnostmi, tak odrůd nekomerčních např. uchovávaných v depozitu genové banky, až po nové šlechtitelské linie, které mohou mít značný potenciál v následném komerčním využití, zejména pro své prvotřídní vlastnosti týkající se odolnosti proti virovým chorobám.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora projektu č. MZE-RO1018 a č. MZE-RO0418 a projektu TAČR č. TN01000062/05.