

THE GENETIC VARIABILITY OF COLOURED GRAIN WHEAT COLLECTION

Trojan V., Musilová M., Vyhnánek T., Havel L.

Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: vaclav.trojan@mendelu.cz

ABSTRACT

Genetic variability of 24 genotypes of common wheat (*Triticum aestivum* L., $2n = 6x = 42$, BBAADD) and one genotype tall (rush) wheatgrass (*Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth & D. R. Dewey, $2n = 10x = 70$, JJJJJJ^sJ^sJ^s) was studied using the SSR markers. Genotypes with purple, blue, yellow, and red caryopses were analysed. SSR markers localized on chromosomes of A and B genome were chosen from the literature for the analysis. Based on 18 SSR markers a dendrogram was calculated, which highly significantly differentiates *Thinopyrum ponticum*. The high differences show 3 genotypes from the group of genotypes with purple pericarp, especially the 'Abyssinskaya Arraseita', 'Purple', 'Purple feed' and 1 genotype with blue aleuron layer named UC66049. Remaining genotypes are split into two clusters and then into two sub-clusters. The minor sub-cluster contains only genotypes with blue aleuron layer. There was identified a high genetic similarity of isogenic lines of wheat 'Novosibirskaya 67' and ANK genotypes with red grain in the major sub-cluster. The genotypes with yellow endosperm gathered into the major sub-cluster show the high genetic similarity. The results suggest that SSR markers can be used for the detection of variability and purity of the analysed samples in breeding programs.

Key words: genetic variability, SSR marker, *Thinopyrum ponticum*, *Triticum eastivum* wheat, wheatgrass

Acknowledgments: This study was supported by project IGA FA MENDELU No. IP 1/2010.

ÚVOD

U pšenice seté (*Triticum aestivum* L., $2n = 6x = 42$, BBAADD), jejíž obilky jsou běžně zabarveny červeně, byly popsány i genotypy s jiným zabarvením obilky (purpurovým, modrým, žlutým a bílým). Toto zabarvení je způsobeno tvorbou pigmentů ze skupiny anthokyanů (purpurové a modré) nebo karotenoidů (žluté) v různých částech obilky – perikarpu, testě, aleuronové vrstvě a endospermu. V bílých obilkách se pigmenty netvoří. Obilka se zvýšeným obsahem přírodních barviv by mohla být vhodná pro výrobu funkčních potravin, které by měly mít kromě prosté výživné hodnoty i příznivý účinek na zdraví konzumenta. V případě uvedených barviv se jedná zejména o antioxidační aktivitu (Trojan et al., 2010). Při šlechtění je důležitým krokem charakteristika genetické variability genotypů požadovaných vlastností. K tomuto účelu je možné využít morfologické markery, proteinové markery a DNA markery. V rámci DNA markerů jsou zvláště vhodné mikrosatelitní markery (SSRs – Simple Sequence Repeats), které mají vysoký stupeň polymorfismu a kodominantní charakter dědičnosti. Tyto mikrosatelitní markery jsou v současnosti široce používány při genetickém mapování různých druhů obilovin, tudíž i pšenice (Röder et al., 1998). Jsou navrženy tak, aby poskytovaly více informací právě při zkoumání hexaploidních pšenic (Song et al., 2005). Cílem naší práce bylo zhodnotit genetickou variabilitu v kolekci genotypů pšenic se standardním i nestandardním zabarvením obilky pomocí mikrosatelitních markerů a zjistit jejich příbuznost s planým druhem *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth & D. R. Dewey ($2n = 10x = 70$, JJJJJJ⁵J⁵J⁵). Tento druh je předpokládaným donorem modrého zabarvení obilky pšenice (Suneson and Pope, 1946).

MATERIÁL A METODIKA

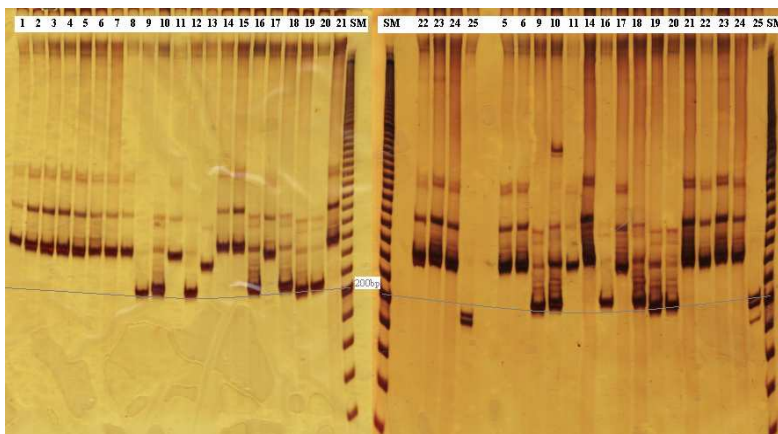
Kolekce 24 genotypů pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) se standardním i nestandardním zabarvením obilek byla doplněna o jeden genotyp *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth & D. R. Dewey (tab. 1). Těchto 25 genotypů bylo podrobeno analýzám pomocí 20 SSR (mikrosatelitních) markerů (*Xbarc163*, *Xbarc195*, *Xbarc003*, *Xbarc077*, *Xgwm861*, *Xbarc176*, *Xbarc170*, *Xgwm122*, *Xgwm294*, *Xgwm445*, *Xgwm328*, *Xgwm356*, *Xwmc428*, *Xgwm666b*, *Xcfa2134*, *Xgwm636*, *Xgwm674*, *Xgwm276*, *Xgwm181*, *Xgwm340*) lokalizovaných v místech genů determinující odchylky v zabarvení obilek, které byly popsány v literatuře u pšenice a tritikale (Khlestina et al., 2004; Kuelung et al. 2006).

Tab. 1 Charakteristika analyzovaného souboru genotypů

Název odrůdy, genotypu nebo druhu	Zabarvení obilky	Forma	Zdroj
Novosibirskaya 67, ANK-1A, ANK-1B, ANK-1C, ANK-1D, ANK-1E	červené	jamí	ZVU Kroměříž, s.r.o.
ANK-28A, ANK-28B, Abyssinskaya arraseita, Konini, Purple, Purple feed	purpurové	jamí	ZVU Kroměříž, s.r.o.
UC66049, Tchemmaks Blaukörniger Sommerweizen, Tchemmaks Blaukörniger	modré	jamí	ZVU Kroměříž, s.r.o.
48M, RU 440-5, RU 440-6, Barevná 9, Barevná 25	modré	ozimá	ZVU Kroměříž, s.r.o.
Indigo	purpurové	ozimá	ZVU Kroměříž, s.r.o.
Citrus, Luteus, Bona Dea	žluté	ozimá	ZVU Kroměříž, s.r.o.
<i>Thinopyrum ponticum</i>	donor modré	ozimá	GB VURV, v.v.i.

MENDELNET 2010

Z rostlin ve fázi prvního listu (5-7 dní staré rostliny) byla izolována genomová DNA pomocí izolačního kitu DNeasy Plant Mini Kit (f. Qiagen) Reakční směs o celkovém objemu 25 µl obsahuje: 30 ng templátové DNA, 0,5 U *Taq* polymerázy (Promega, USA), 1x odpovídající pufr, 7,5 µM každého primeru a 100 µM každého dNTP. Teplotní a časový profil reakce byl: 1 cyklus 93°C – 120 s; 30x (93°C – 60 s, 54°C – 120 s, 72°C – 120 s). Po proběhlé vertikální elektroforéze (při 300 V) v 8 % nedenaturovaném polyakrylamidovém (PAA) gelu v TBE pufru bylo použito pro vizualizaci produktů barvení 0,2 % dusičnanem stříbrným (obr. 1). Výsledky molekulárních analýz byly vyhodnoceny pomocí binární matice, kde 1 znamená přítomnost produktu a 0 absenci produktu. Tyto hodnoty byly dále statisticky zpracovány pomocí programu FreeTree a graficky zpracovány do podoby dendrogramu pomocí programu TreeView. Pro jednotlivé SSR markery byly vypočteny statistické hodnoty DI (index diversity), PI (pravděpodobnost identity) a PIC (polymorfní informační obsah) (Russell et al. 1997).



Obr. 1: Ukázka elektroforetické separace SSR markeru (*Xbarc176*) na PAA gelu

VÝSLEDKY A DISKUSE

Velikost amplifikovaných produktů se pohybovala v rozmezí od 100 do 260 bp. Při využití uvedených 20 SSR markerů, které jsou specifické pro chromozómy A a B, bylo detekováno 94 alel. V průměru tedy připadá 5 alel na jeden mikrosatelitní lokus. Největší počet alel byl detekován pomocí primeru *Xbarc163*. Nejvyšší variabilita byla zaznamenána u primerů *Xbarc176* a *Xbarc077* (tab. 2). Khlestkina et al., 2004 a Kuelung et al., 2006 uvádějí přítomnost nulových alel, kterou jsme zjistili i my. Nejvíce nulových alel bylo zaznamenáno u druhu *Thinopyrum ponticum*. Tento genotyp totiž nemá homologii s chromozomy pšenice, přičemž použité SSR markery jsou specifické pro chromozómy sad A a B u tohoto druhu. V našich analýzách se jednalo o mikrosatelitní lokusy *Xbarc003*, *Xbarc077*, *Xgwm340*, které se u pšenice nacházející na chromozómech 3B, 4A a 6A. Průměrná hodnota DI byla 0,51; průměrná hodnota PI byla 0,29 a pro ukazatel PIC byla vypočítána průměrná hodnota 0,49 (tab. 2). Statistické hodnoty vyjadřují vysoký stupeň variability ve studované kolekci genotypů barevných pšeníc, který byl zjištěn již při použití 10 SSR markerů (Musilová et al., 2010) a který je srovnatelný s Holtonem et al. (2004). Při použití

MENDELNET 2010

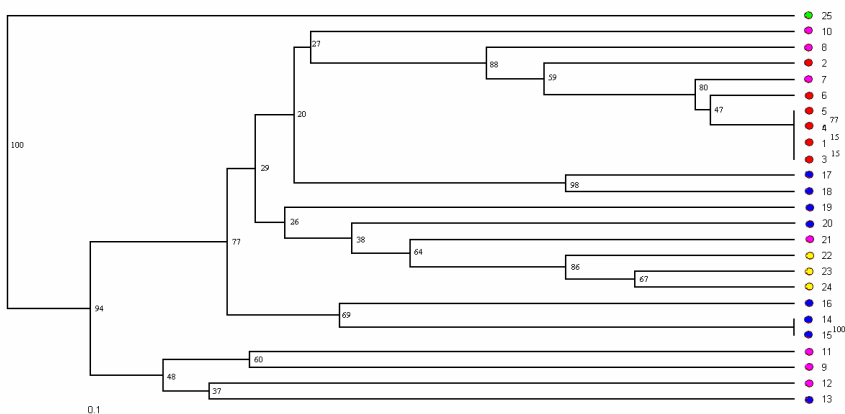
20 SSR markerů byla získána data k podrobnější charakterizaci analyzované kolekce. Větší množství SSR markerů se projevilo v rozlišení některých izogenních materiálů.

Tab. 2 Statistické zhodnocení analyzovaných SSR markerů

SSR marker	Lokalizace	Počet alel	DI	PI	PIC
<i>Xbarc163</i>	4B	8	0,52	0,23	0,52
<i>Xbarc195</i>	6A	4	0,51	0,3	0,44
<i>Xbarc003</i>	6A	6	0,64	0,09	0,64
<i>Xbarc077</i>	3B	6	0,72	0,05	0,72
<i>Xgwm861</i>	7A,7B	6	0,67	0,11	0,65
<i>Xbarc176</i>	7B	7	0,59	0,16	0,58
<i>Xbarc170</i>	4A	7	0,56	0,22	0,52
<i>Xgwm122</i>	2A	7	0,52	0,23	0,51
<i>Xgwm294</i>	2A	4	0,65	0,16	0,60
<i>Xgwm445</i>	2A	6	0,60	0,17	0,58
<i>Xgwm528</i>	2A	1	0,07	0,86	0,07
<i>Xgwm556</i>	2A	1	0,07	0,86	0,07
<i>Xvmo428</i>	2A	5	0,69	0,09	0,68
<i>Xgwm666b</i>	3A	3	0,41	0,37	0,39
<i>Xcfa2134</i>	2A	2	0,20	0,65	0,19
<i>Xgwm636</i>	2A	6	0,77	0,03	0,76
<i>Xgwm674</i>	3A	3	0,41	0,36	0,38
<i>Xgwm276</i>	7B	3	0,36	0,42	0,34
<i>Xgwm181</i>	3B	5	0,76	0,04	0,75
<i>Xgwm340</i>	3B	4	0,69	0,07	0,68
Průměr		5	0,51	0,29	0,49

Statistické vyhodnocení umožnilo sestavení dendrogramu podobnosti analyzovaných genotypů pšenice seté s různým zabarvením obilky (UPGMA, Jaccardův koeficient) (obr. 2). Z dendrogramu je patrná silná odlišnost genotypu *Thinopyrum ponticum*. Dále se dendrogram dělí na dva klustery, přičemž menší kluster obsahuje jen část genotypů s purpurovým perikarpem ('Abyssinskaya

Arraseita', 'Purple' a 'Purple feed') a jeden genotyp s modrým zabarvením ('UC66049'). Druhý klaster se dále dělí na menší a větší subklaster. Do menšího subklasteru se zařadily další genotypy modrého zabarvení. Je zde patrné, že genotypy 'Tschemacks Blaukörniger' a 'Tschemaks Blaukörniger Sommerweizen' se vyznačují vysokým stupněm podobnosti. S největší pravděpodobností se jedná o stejný vzorek pocházející ze dvou různých zdrojů, což se domnívá i kurátor kolekce Ing. Martinek (ZVÚ Kroměříž, s.r.o.). Z jeho informací víme jen, že 'Tschemaks Blaukörniger Sommerweizen' pochází z IPK Gatersleben. Zbývající genotypy znázorňují svou příbuznost ve větším subklasteru. Nachází se zde izogenní linie genotypů s červeným zabarvením obilke přičemž jeden genotyp ('ANK-1A') se podařilo odlišit od zbývajících izogenních linií ANK. Skupina genotypů se žlutým endospermem nacházející se také ve větším subklasteru vykazuje vyšší stupeň podobnosti. V případě 'Citrus' a 'Luteus' je to dáno společnými předky v rodokmenu. Obě odrůdy pochází od prof. dr. Wilhelma Jahn-Deesbacha z Německa a mají následující rodokmen: Citrus /(Sunnan x Monopol) x Stamm GI 912/ a Luteus /(Sunnan x Monopol) x Giessener Stamm/ (ÚKZÚZ, ústní sdělení). Důležitou otázkou zůstává, jaký zdravotní, případně nutriční význam by mělo pěstování těchto netradičních pšenic ve větším rozsahu. Vzhledem k tomu, že úloha antokyanů je ze zdravotního pohledu obecně prospěšná (Lila, 2004) mohou být uváděné netradiční pšenice zdrojem nových vhodných látek. Přírodní barviva se obvykle vyznačují antioxidační aktivitou. Strava bohatá na antioxidanty typu antokyanů, flavonoidů a karotenoidů působí preventivně mimo jiné na výskyt aterosklerózy, ischemické choroby srdeční, zánětlivých procesů, zlepšuje funkci zraku a pozitivně ovlivňuje ochranné procesy v organismu (srov. Lachman et al., 2003).



Obr. 2: Dendrogram genetické variability 20 mikrosatelitních markerů

1 Novosibirskaya 67	6 ANK-1E	11 Purple	16 48M	21 Indigo
2 ANK-1A	7 ANK-28A	12 Purple feed	17 RU 440-6	22 Citrus
3 ANK-1B	8 ANK-28B	13 UC66049	18 RU 440-5	23 Luteus
4 ANK-1C	9 A. Arreseita	14 T. B. Sommerweizen	19 Barevná9	24 Bona Dea
5 ANK-1D	10 Konini	15 T. Blaukörniger	20 Barevná25	25 T. ponticum

ZÁVĚR

Pomocí SSR markerů se podařilo statisticky významně rozlišit tři genotypy pšenice s purpurovými obilkami společně s jedním genotypem modrého zabarvení obilky od ostatních genotypů. Byla také potvrzena příbuznost pšenice se žlutým endospermem. Rozložení dalších analyzovaných genotypů v dendrogramu potvrzuje genetickou podobnost pšenice s modrými obilkami, nevykazují však takovou podobnost s genotypem *Thinopyrum ponticum*, jak se předpokládalo. Samostatná skupina pšenice s červenou obilkou i přes mírnou variabilitu jednoho genotypu potvrzuje jejich izogenní charakter. Výsledky této práce budou doplněny o další mikrosatelitní markery lokalizované v blízkosti genů zodpovědných za příslušné zabarvení obilky. Získané výsledky budou využity ve šlechtitelském programu pšenice s využitím genotypů jednotlivých zabarvení obilky. Společně se studiem genetické variability je realizováno i studium komparativní genomiky genů zodpovědných za syntézu barevných pigmentů u pšenice.

LITERATURA

- Holton T.A., Christopher J.T., McClure L., Harker N., Henry R. J. (2004): Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat. *Molecular Breeding*, 9: 63-71.
- Khlestkina E.K., Than M.H.M., Pestsova E.G., Röder M.S., Malyshev S.V., Korzun V., Börner A. (2004): Mapping of 99 new microsatellite-derived loci in rye (*Secale cereale* L.) including 39 expressed sequences tags. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 725-732.
- Kuelung C., Baezinger P.S., Kachman S.D., Dweikat I. (2006): Evaluating the genetic diversity of triticale with wheat and rye SSR markers. *Crop Science*, 46: 1692-1700.
- Lachman J., Dudjak J., Orsák M., Pivec V. (2003): Effect of accelerated ageing on the content and composition of polyphenolic complex of wheat (*Triticum aestivum* L.) grains. *Plant, Soil and Environment*, 49: 1-7.
- Lila A.M. (2004): Anthocyanins and human health: An *in vitro* investigative approach. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004: 306-313.

- Musilová M., Trojan V., Vyhnánek T., Havel L. (2010): Polymorfismus DNA u donorů nestandardního zabarvení obilíků využitelných ve šlechtění potravinářské pšenice. Hygiena a technologie potravin, XL. Lenfeldovy a Höcklovy dny. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 14.10.-15.10.
- Röder M.S., Korsun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. (1998): A microsatellite map of the wheat genome. *Genetics* 149:2007–2023.
- Russell J., Fuller J., Young G., Thomas B., Taramino G., Macaulay M., Waugh R., Powell W. (1997): Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. *Genome*, 40: 442-450.
- Song Q. J., Shi Č J. R., Singh Č S., Fickus Č E. W., Costa J. M., Lewis Č J., Gill Č B. S., Ward Č R., Cregan P. B. (2005): Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 110: 550–560.
- Suneson, C.A., and Pope, W.K. (1946). Progress with Triticum × Agropyron crosses in California. *J. Am. Soc. Agron.* 38: 956-963.
- Trojan V., Bartl P., Musilová M., Vyhnánek T., Martinek, P., Tremlová B. (2010): Barevné pšenice - genetika, šlechtění a potravinářské využití. In *HYGIENA ALIMENTORUM XXXI*. 1. vyd. Košice, Slovensko: Univerzita veterinárského lékařstva a farmácie v Košiciach, 5. – 7. 5. 2010: 335-337.