

# UTILIZATION OF WHEAT AND RYE SSR MARKERS IN TRITICALE

## VYUŽITÍ SSR MARKERŮ PŠENICE A ŽITA U TRITIKALE

**Slezáková K., Nevrtalová E., Vyhnánek T.**

Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: xslezak9@node.mendelu.cz, xnevrtal@node.mendelu.cz, vyhnanek@mendelu.cz

---

### ABSTRACT

Genetic variability of 16 genotypes of triticale (*XTriticosecale* Wittmack.,  $2n = 6x = 42$ , BBAARR) was studied using the SSR method. Triticale is a man made cereal combining the genomes of wheat and rye, it is autogamous with a low share of cross-pollination. For detection of the genetic variability on the level of DNA polymorphism RAPD and AFLP markers were used. Microsatellites occur in a large number of alleles. Simple sequence repeats are codominant and highly variable. Eight varieties of triticale registered in the Czech Republic, one variety from Russia and seven translocation forms derived from cv. Presto were analyzed. An appropriate step is a control electrophoresis on agarose gel with a fraction of the sample after amplification, which makes it possible to select usable samples for separation on polyacrylamide gels. SSR markers localized on chromosomes of A, B, D and R genome were chosen from the literature for the analysis. Based on 30 SSR markers a dendrogram was calculated, which highly significantly differentiates the Valentine-90 genotype from all other 15 genotypes splitted into two sub-clusters. The first one includes cv. Lupus, Ticino, Presto and translocation forms of cv. Presto. The second sub-cluster consists of the cv. Lamberto, Kitaro, Triamant, Gutek and Tornado. Supported by the Grant Agency of MUAFF in Brno, project No. 23/2007.

**Key words:** triticale, genetic variability, polymorphism of DNA, SSR, marker

## ÚVOD

Pro detekci genetické variability je v současné době k dispozici mnoho metod, např. morfologická charakteristika, analýza rodokmenů, biochemické markery především bílkoviny a jejich různé izoenzymové varianty, molekulární (DNA) markery atd. Pro genetické mapování, studium genetické variability a diverzity jsou významným nástrojem v poslední době DNA markery, které se vyznačují častým výskytem v genomu, nezávislostí na prostředí a vysokou reprodukovatelností. Garg et al. (2001) uvádějí v případě DNA markerů jako nejvýhodnější metodu detekci variability mikrosatelitů (SSR – *Simple Sequence Repeats*).

Cílem práce byla detekce genetické variability u vybraných genotypů tritikale pomocí SSR markerů popsanych v literatuře u pšenice a žita.

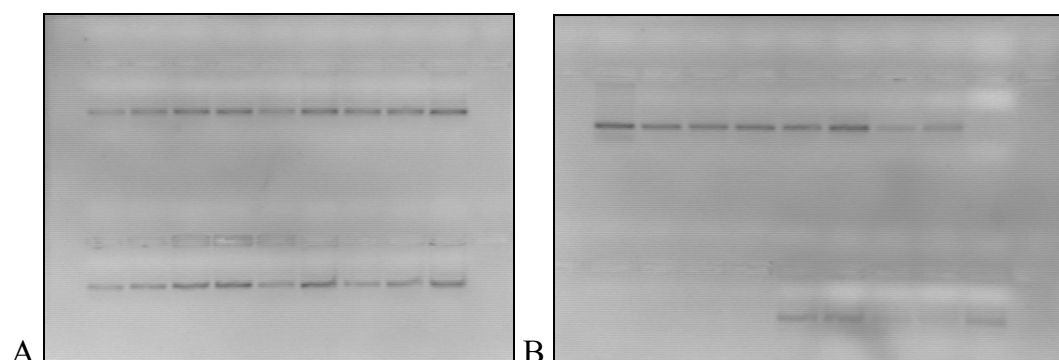
## MATERIÁL A METODIKA

Genetická variabilita byla detekována u 16 genotypů tritikale (*XTriticosecale* Wittmack.). Jednalo se o 8 registrovaných odrůd: ozimá forma – Gutek, Kitaro, Lamberto, Lupus, Presto, Ticino, Tornado a Triamant. Směsné vzorky certifikovaného osiva byly získány z Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského, zkušební stanice Hradec nad Svitavou. V případě analýzy 8 donorů lepší technologické kvality tritikale se jednalo o 7 translokovaných variant odrůdy Presto (Presto 1R.1D; Presto I.R. /linie 3/; Presto I.R. /linie 5/; Presto MA1 /linie 1/; Presto MA1 /linie 2/, Presto Valdy /linie 10/, Presto Valdy LH67) a v Rusku registrovanou odrůdu Valentin-90. Směsné vzorky osiva byly získány od Ing. Petra Martinka, CSc. ze Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž, s. r. o. Jako genetických markerů bylo využito polymorfizmu DNA, který byl detekován metodou SSR. Pro molekulární analýzy byla genomová DNA izolována pomocí izolačního kitu DNAesy Plant Mini Kit (f. Qiagen) z napěstovaných rostlin ve fázi jednoho listu (5-7 dní staré rostliny). Koncentrace DNA ve vzorku byla po izolaci zjištěna spektrofotometricky. Pro SSR analýzy bylo použito 30 SSR markerů popsanych v literatuře u pšenice a žita (Devos et al., 1995; Röder et al., 1998; Khlestina et al., 2004; Somer et al., 2004; Kuelung et al. 2006). Reakční směs o celkovém objemu 25  $\mu$ l obsahuje: 30 ng templátové DNA, 0,5 U *Taq* polymerázy (Promega, USA), 1x odpovídající pufr, 7,5  $\mu$ M každého primeru a 0,1 mM 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). Pro vizualizaci produktů bylo použito barvení stříbrem (0,2 %  $\text{AgNO}_3$ ) po proběhlé vertikální elektroforéze (při 300 V) na 10 % nedenaturovaném polyakrylamidovém (PAA) gelu v TBE pufru. Před vlastní elektroforetickou separací na PAA gelu byla provedena kontrolní elektroforéza na 1,5% agarozovém gelu (barvení ethidiumbromidem) z části objemu reakce pro kontrolu úspěšnosti/neúspěšnosti reakce. Výsledky molekulárních analýz byly vyhodnoceny pomocí binární matice, kde 1 znamená přítomnost produktu a 0 absenci produktu. Následně byly tyto hodnoty statisticky zpracovány pomocí programu FreeTree a graficky zpracovány do podoby dendrogramu pomocí programu TreeView.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

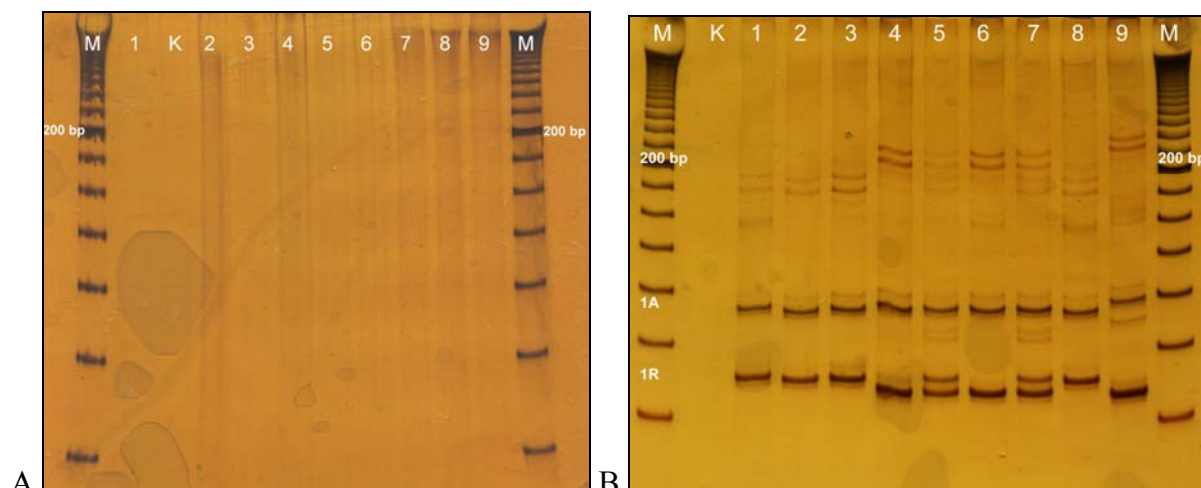
Jako velmi vhodný metodický krok se jeví využití části objemu reakční směsi po reakci na kontrolní elektroforézu pro zjištění úspěšnosti amplifikace (obr. 1), která umožňuje výběr vhodných vzorků pro separaci na polyakrylamidovém gelu.

Doba trvání elektroforetické separace na polyakrylamidovém gelu se pohybuje od 7 do 10 hodin v závislosti na velikosti detekovaného mikrosatelitu. Vybrání vhodných vzorků, na základě kontrolní elektroforézy, je předpoklad úspěšné elektroforetické separace na polyakrylamidovém gelu včetně jejich vizualizace pomocí stříbra (obr. 2). Zařazením kroku s kontrolní elektroforézou do metodiky detekce genetické variability tritikale pomocí SSR markerů přináší nejenom finanční, ale i výraznou časovou úsporu v rámci analýz.



Obr. 1 Kontrolní elektroforéza po proběhlé amplifikaci SSR markerem *Xpsp2999*

Vysvětlivky: A – úspěšná amplifikace u všech vzorků (2 opakování); B – neúspěšná amplifikace u všech vzorků (2 opakování)



Obr. 2 Srovnání výsledného elektroforeogramu na polyakrylamidovém gelu po neúspěšné (A) a úspěšné (B) amplifikaci mikrosatelitu *Xgwm752*

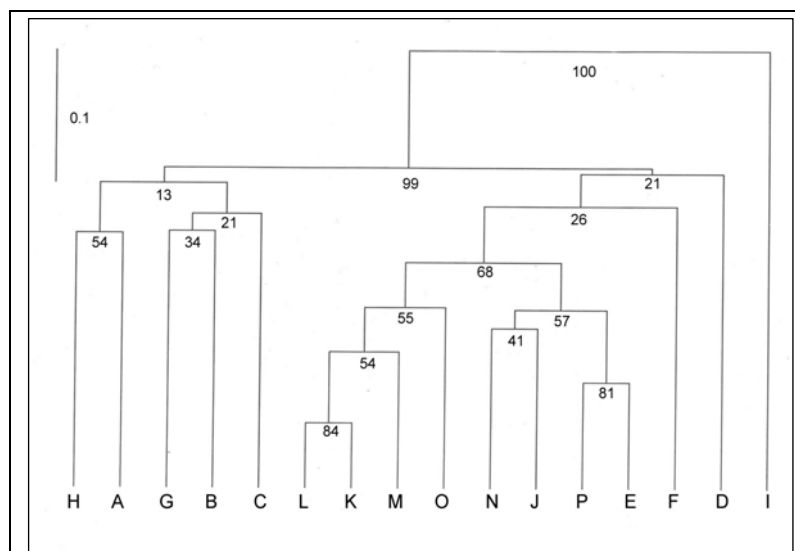
Vysvětlivky: M – velikostní marker (20 bp extended DNA ladder), K – negativní kontrola, 1 až 9 – analyzované genotypy

Z 30 analyzovaných SSR markerů poskytovaly 4 SSR markery uniformní spektrum (*Xrems1174*, *Xrems1234*, *Xwmc429* a *Xgwm1166*) u všech analyzovaných genotypů tritikale.

Ostatní mikrosatelity poskytovaly 2 až 9 alel, včetně výskytu nulových alel u některých mikrosatelitů (*Xrems1303*, *Xrems1253*, *Xrems1167*, *Xwmc216* a *Xgwm861*). Nejvyšší počet alel byl detekován u mikrosatelitů *Xpsp3000* (9 alel) a *Xbarc004* (7 alel). Manifesto et al. (2001) zjistili u pšenice v případě SSR markeru *Xpsp3000* 13 alelických variant (213-285 bp) včetně nulové. U 7 analyzovaných mikrosatelitů byla zjištěna jejich přítomnost na více než jednom chromozomu v genomu tritikale. Na dvou chromozomech bylo lokalizováno 5 SSR markerů (*Xgwm752*, *Xgwm1233*, *Xgwm1166*, *Xgwm1300* a *Xwmc216*) a třech chromozomech 2 SSR markery (*Xrems1135* a *Xgwm861*). Ve výsledném elektroforeogramu byly následně detekovány dvě nebo tři zóny s různě velkými mikrosatelity (obr. 2B). Kuelung et al. (2004) uvádějí, že je to způsobeno homologním vztahem podobnosti mezi genomy blízkce příbuzných druhů.

Dvě alely v rámci jednoho SSR markeru byly detekovány u odrůdy Tornado (6 mikrosatelitů), Lupus (4 mikrosatelity) a genotypů Gutek, MA1 (linie 1) a Presto Valdy HL-67 u jednoho SSR markeru. U odrůdy Tornado byly pomocí polymorfizmu prolaminových bílkovin detekovány dvě sesterské linie (Vyhnánek a Bednář, 2003). Izolace DNA byla realizována ze směsného vzorku, a tak není možné rozlišit, jestli se jedná o detekci dvou sesterských linií ve vzorku osiva nebo o heterozygotní konstituci genotypu. Pro upřesnění bylo nutné realizovat analýzy z jednotlivých rostlin. V případě odrůdy Tornado se přikláníme k názoru, že se jedná o detekci obou sesterských linií ve směsném vzorku osiva.

Na základě statistického zpracování byl sestaven dendrogram podobnosti (Jaccardův koeficient) analyzovaných genotypů (obr. 3). Z analyzovaného souboru genotypů se podařilo statisticky významně odlišit ruskou odrůdu Valentin-90 od ostatních 15 analyzovaných genotypů, které tvoří dva subklastery. V jednom subklasteru se nachází registrované odrůdy v ČR s výjimkou odrůd Lupus, Ticino a Presto, které tvoří subklaster s translokovanými genotypy tritikale. V rámci translokovaných genotypů tritikale odvozených ze stejného výchozího genotypu (Presto I.R., Presto MA1 a Presto Valdy – linie vyselektované v ZVÚ Kroměříž, s. r. o.) byla zjištěna určitá variabilita, což je pravděpodobně způsobeno nehomogeností výchozího materiálu (Martinek, ústní sdělení). Jednotlivé translokované genotypy nebylo možno rozlišit podle translokovaného 1R chromozomu, ale SSR markery na jiných chromozomech.



*Obr. 3 Dendrogram podobnosti analyzovaných genotypů tritikale*

*Vysvětlivky:* A – Gutek, B – Kitaro, C – Lamberto, D – Lupus, E – Presto, F – Ticino, G – Triamant, H – Tornado, I – Valentin-90, J - Presto 1R.1D<sub>5+10</sub>-1 (BC6), K - Presto I.R. (linie 3), L - Presto I.R. (linie 5), M - Presto MA1 (BC3) (linie 1) , N - Presto MA1 (BC3) (linie 2), O - Presto Valdy (linie 10) , P - Presto Valdy LH-67.

## **ZÁVĚR**

V práci jsou prezentovány výsledky detekce polymorfizmu DNA 30 SSR markery u 16 genotypů tritikale, které je možné využít pro detekci genetické variability a rozlišení jednotlivých analyzovaných genotypů tritikale. Po metodické stránce je vhodné zařazení kontrolní elektroforézy jako mezikrok mezi amplifikací a elektroforetickou separací na polyakrylamidovém gelu.

## LITERATURA

Devos K.M., Bryan G.J., Collins A.J., Stephenson P., Gale M.D. (1995) Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, *90*: 247-252.

Garg M., Singh S., Singh B., Singh K., Dhaliwal H. S. (2001): Estimates of genetic similarities and DNA fingerprinting of wheats (*Triticum* species) and triticale cultivars using molecular markers. *Indian Journal of Agriculture Science*, *71*: 438-433.

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., Dweikat I. (2004): Transferability of SSR markers among wheat, rye and triticale. *Theoretical and Applied Genetics*, *108*: 1147-1150.

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.

Manifesto M.M., Schlatter A.R., Hopp H.E., Suarez E.Y., Dubcovsky J. (2001): Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. *Crop Science*, *41*: 682-690.

Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. (1998): A microsatellite map of wheat. *Genetics*, *149*: 2007-2023.

Somers D.J., Isaac P. Edwards, K. (2004) A high-density wheat microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, *109*: 1105-1114.

Vyhnánek T., Bednář J. (2003): Detection of the varietal purity in sample of harvested wheat and triticale grains by prolamin marker. *Plant, Soil and Environment*, *49*: 95-98.