

# USING OF MICROSATELLITE MARKERS FOR IDENTIFICATION OF DUPLICATIONS IN COLECTION OF GENETIC RESOURCES OF PEPPER (*CAPSICUM L.*)

## VYUŽITÍ MIKROSATELITNÍCH MARKERŮ PRO IDENTIFIKACI DUPLICIT V KOLEKCI GENOVÝCH ZDROJŮ PAPRIKY (*CAPSICUM L.*)

<sup>1</sup>Rohrer M., <sup>1</sup>Cieslarová J., <sup>1</sup>Hanáček P., <sup>1</sup>Vyhnánek T., <sup>2</sup>Stavělková H.

<sup>1</sup>Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemědělská 1, 613 00, Czech Republic,

<sup>2</sup> Department of Vegetables and Special Crops, Crop Research Institute, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc – Holic, Czech Republic

E-mail: m.rohrer.@seznam.cz, hanacek@mendelu.cz

---

### ABSTRACT

Within a collection of 41 genetic resources of red pepper genotypes (*Capsicum annuum L.*) genetic variability using 8 microsatellite markers was tested. Three of the microsatellite markers (*Hpms 1-1*, *Hpms 1-168*, and *Hpms 1-274*) provided uniform spectra in all analyzed genotypes. From 2 to 7 alleles were detected for the rest of microsatellite loci. Totally 27 alleles were detected, which means an average of 4.0 allele per one microsatellite locus. The size of amplified products was determined within the limits of 172 – 340 base pairs. The highest number of different alleles was detected using *Hpms 1-5* and *Hpms 2-21* primers (7 alleles). The calculated average DI value was 0.33 (0.00-0.74), average PI value was 0.55 (0.04-1.00) and average PIC value was 0.32 (0.00-0.73). The low value of PIC indicates higher level of genetic similarity between analyzed genotypes. Based on statistical evaluation a dendrogram of similarity was constructed. Distribution of the analyzed genotypes in the dendrogram implies a high level of similarity within some genotypes and on the contrary there is a presumption of genetically different material within other genotypes of the same or similar name. Molecular data were complement with morphological measurement by descriptor lists for genus *Capsicum*. These results show the possibility of duplicities in the current collection of genetic resources of red pepper.

**Key words:** genetic resources, pepper, *Capsicum L.*, microsatellites, SSRs

**Acknowledgments:** The research was funded by the Grant Agency of Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, project No. DP1/AF/2008 and The Czech National Programme on Conservation and Utilization of Plant Genetic Resources and Agrobiodiversity (File Number 20139/2006-13020).

## ÚVOD

Velký počet vzorků v kolekcích genových zdrojů vede k problémům jak s charakterizací jednotlivých položek, podmiňujících jejich následné využití, tak i procesem regenerace, nutným pro další uchování životaschopnosti semen. Z těchto důvodů byl v 80. letech minulého století zaveden koncept „core“ kolekcí, tj. menšího souboru, zachovávajícího na základě podrobného genetického, morfologického a agronomického popisu, co největší genetické spektrum výchozí kolekce (Brown, 1989). Pro zachování integrity a funkčnosti uložených vzorků semen, je potřebné zajistit dlouhodobou konzervovanost celého spektra genetické diverzity a zároveň udržování dostatečného množství osiva pro uživatele. Na druhé straně je v genových bankách udržována řada pravděpodobně totožných vzorků, které jsou však uchovávány pod různými čísly EVIGEZ (*Český informační systém genových zdrojů*). Tyto vzorky často pocházejí z různých zahraničních zdrojů a přispívají ke zvýšené náročnosti na udržování kolekce a rovněž ke zvyšování nežádoucí genetické eroze – kolekce obsahují vysoké počty vzorků genových zdrojů, jejich genetická variabilita je však nízká. Genetická eroze ve svém důsledku vede ke snižování šlechtitelského pokroku a výrazně omezuje možnost reakce na požadavky pěstitelů a spotřebitelů.

Pro studium genetické diverzity a variability je v současné době k dispozici mnoho metod, např. morfologická charakteristika, analýza rodokmenů, biochemické markery především proteiny a jejich různé izoenzymové varianty a dynamicky se vyvíjecí molekulární (DNA) markery atd (Koch, 1998). Vzhledem k vysokému stupni polymorfizmu a kodominantnímu charakteru dědičnosti se v rámci DNA markerů velmi dobře uplatňují mikrosatelitní markery (SSRs – *Simple Sequence Repeats*). Využití detekce polymorfizmu mikrosatelitů pro studium genetické diverzity a variability bylo popsáno u řady rostlinných druhů mnoho autory, např. u hrachu (Haghnazari et al., 2005), řepky (Li et al., 2007) atd. Z uvedeného krátkého nástínu je zřejmá vhodnost metody SSR i pro studium genetické variability u papriky.

Cílem práce byla detekce variability SSR markerů u vybraných genových zdrojů papriky Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. Genové banky Olomouc za účelem identifikace případných duplicit v kolekci.

## MATERIÁL A METODIKA

Genetická variabilita byla detekována u 41 genotypů paprik (*Capsicum L.*) (Tab. 1). Materiál byl pěstován v izolačních klecích na pozemcích VÚRV, v.v.i. GB Olomouc, kde byly v průběhu celého vegetačního období genotypy popisovány podle dvou klasifikátorů: IPGRI /27 znaků/ (IPGRI, 1995) a UPOV /44 znaků/. Použité klasifikátory se vzájemně doplňují, protože každý je určen pro jiný typ popisu. Klasifikátor IPGRI je určen pro morfologický popis genetických zdrojů a klasifikátor UPOV pro morfologický popis uznaných odrůd. Popisuje se habitus (výška, odění nodů...), listy (délka čepele, tvar, zvlnění okrajů...), květy (postavení květů, barva květní koruny...), plody (tvar, délka, barva v konzumní zralost...) a semenáčky. Jako genetických markerů bylo využito polymorfizmu DNA, který byl detekován metodou SSR. Pro molekulární analýzy byla genomová DNA

izolována pomocí izolačního kitu Invisorb Spin Plant Mini Kit (f. Ivitek) z listů napěstovaných rostlin na počátku kvetení. Z každé rostliny byly pro izolaci odebrány 4 listové disky (80 mg). Koncentrace DNA ve vzorku byla po izolaci zjištěna fluorimetricky. Pro SSR analýzy bylo použito 8 SSR markerů popsanych v literatuře u papriky (Lee et al., 2004; Minamiyama et al., 2006).

Reakční směs pro PCR o celkovém objemu 25  $\mu$ l obsahovala:

- 30 ng templátové DNA,
- 1 U *Taq* polymerázy (Promega, USA),
- 1x koncentrovaný odpovídající pufr,
- 5 pmol fluorescenčně značeného forward primeru,
- 5 pmol reverse primeru,
- 0,1 mM směsi dNTPs.

Teplotní a časový profil PCR reakce byl následný: 1 cyklus 94 °C 180 s; 35 cyklů 94 °C 60 s, 50-55 °C (v závislosti na použitém páru primerů) 60 s, 72 °C 120 s; 1 cyklus 72 °C 600 s. Produkty PCR byly předběžně testovány pomocí agarosové elektroforézy. Pro analýzu vzorků byla použita kapilární elektroforéza ABI Prism 3100. Pomocí software Gene Marker 1.3 byl vyhodnocen počet a velikost produktů. Následně byla sestavena binární matice, kde 1 znamená přítomnost produktu a 0 absenci produktu. Tyto hodnoty byly statisticky zpracovány pomocí programu FreeTree a graficky zpracovány do podoby dendrogramu pomocí programu TreeView. Pro každý SSR marker byly vypočteny hodnoty: indexu diversity (DI), pravděpodobnosti identity (PI) a polymorfního informačního obsahu (PIC) (Russell et al., 1997).

## VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci kolekce genových zdrojů papriky byla testována variabilita mikrosatelitních markerů. Z 8 analyzovaných SSR markerů poskytovaly 3 SSR markery uniformní spektrum (*Hpms 1-1*, *Hpms 1-168*, a *Hpms 1-274*) u všech analyzovaných genotypů papriky. U ostatních mikrosatelitů bylo detekováno od 2 do 7 alel. Celkem bylo detekováno 27 alel, což je v průměru 4,0 alely na lokus (Tab. 2). Velikost amplifikovaných produktů se pohybovala v rozmezí 172-340 bp (Tab. 3). Největší rozdíl od průměrné velikosti (Lee et al., 2004; Minamiyama et al., 2006) byl detekován u SSR markeru *Hpms 1-168* (+36 bp) a *Cams 163* (+46 bp). Nejvyšší počet alel byl detekován u mikrosatelitů *Hpms 1-5* a *Hpms 2/21* (7 alel). Minamiyama et al. (2006) zjistili u SSR markerů *Cams 163* (9 alel) a *Cams 647* (10 alel). V našem případě se tyto SSR markery vyznačovaly nižším počtem alel, tj. *Cams 647* (6 alel) a *Cams 163* (2 alely). Průměrný počet alel na lokus je srovnatelný s jinými autory, kteří uvádějí hodnoty 2,9 (Minamiyama et al., 2006) a 3,0 (Kwon et al., 2007).

Průměrná hodnota DI byla 0,33 (0,00-0,74), průměr PI 0,55 (0,04-1,00) a v případě PIC byla vypočítána průměrná hodnota 0,32 (0,00-0,73) (Tab. 4). Průměrná hodnota PIC byla nižší v porovnání s hodnotou 0,76, kterou uvádějí Lee et al. (2004) při studiu různých zástupců rodu *Capsicum*. Pododnou hodnotu 0,46 uvádějí v rámci studia dihaploidních linií

papriky (*Capsicum annuum*) Minamiyama et al. (2006). Nízká hodnota PIC ukazuje na vyšší stupeň genetické podobnosti mezi analyzovanými genotypy papriky.

Na základě statistického zpracování byl sestaven dendrogram podobnosti (Nei a Li koeficient) analyzovaných genotypů papriky (Tab. 5). U analyzovaného souboru genotypů se podařilo statisticky významně odlišit tři genotypy (Hatvani /č. 13/, Japan a Madarszen /č. 29 a č. 30/) od ostatních 38 analyzovaných genotypů. Rozložení analyzovaných genotypů v dendrogramu naznačuje vysoký stupeň podobnosti v rámci některých položek se stejným resp. podobným názvem, např. Astrachanskij /č. 10 a 11/; Bogyiszloi /č. 26/ a Bogyiszloi Vastaghusu /č. 27/; Konservnyj Belyj 289 /č. 18 a 40/; Tetenyi /č. 1 a 33/ apod. Naopak u dalších položek v rámci studovaného souboru je předpoklad, že se jedná o geneticky odlišné materiály.

Při srovnání morfologického hodnocení 10 skupin zástupců (dle názvu genotypu) paprik s dendrogramem lze odvodit následující skutečnosti:

- zástupci skupiny Tetenyi č. 1 a 3 se nepodařilo na základě morfologického klasifikátoru rozlišit a i molekulární data vykazují vysoký stupeň podobnosti,
- zástupce skupiny Kalocsai Fuszer (Eder) č. 2 se výrazně odlišuje od zbývajících dvou zástupců /č. 3 a 4/, kteří jsou si dle morfologických znaků a polymorfizmu SSR markerů geneticky velmi blízcí (Obr. 1 a 2),
- u zástupců skupiny Bogyiszloi č. 26 a 27 byly po stránce polymorfizmu DNA i morfologické velmi podobní,
- naopak v rámci morfologického hodnocení tři zástupci skupiny Konservnyj Belyj nebyla pozorována variabilita, ale v při analýze SSR markerů došlo k rozlišení zástupce č. 41 od zbývajících dvou genotypů,
- zástupci skupiny Vinedale se vyznačovali jak vysokou variabilitou morfologických znaků, tak i variabilitou SSR markerů.

## ZÁVĚR

Výsledky prezentované práce ukazují praktickou aplikaci metod detekce molekulární genetiky v rámci kolekce genových zdrojů paprik. Je zřejmé, že je velmi vhodné kombinovat tyto metody s metodami morfologického hodnocení. Pro lepší a přesnější závěry je nutné aplikovat vyšší počet polymorfních SSR markerů a analyzovat větší počet rostlin v rámci jednotlivých zástupců. Toto je předmětem další práce.

## LITERATURA

Brown A.H.D. (1989): Core collections: A practical approach to genetic resources management. *Genome*, 31: 818-824.

Haghnazari A., Samimifard R., Najafi J., Mardi M. (2005): Genetic diversity in pea (*Pisum sativum* L.) accessions detected by sequence repeat markers. *J Genet Bred*, 59: 145-152.

IPGRI (1995): Descriptors for *Capsicum* (*Capsicum* spp.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy; Asian Vegetable Research and Development Center, Taipei, Taiwan; Centro Agronomico Tropical de Investigacion y Esenanza, Turrialba, Costa Rica.

Koch G. (1998): Comparison of the efficiency of biochemical and molecular marker methods for the description of genetic diversity. Proc symposium on the utilisation of genetic resources, Gatersleben: 49-54.

Lee J.M., Nahm S.H., Kim Y.M., Kim D.D. (2004) Characterisation and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theor Appl Genet*, 108: 619-627.

Li M., Zhang C., Qian W., Meng J. (2007): Genetic diversity of Brassica species revealed by amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeat markers. *Hortic Environ Biotech*, 48: 9-15.

Minamiyama Y., Tsuru M., Hirai M. (2006) An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Mol Breeding*, 18: 157-169.

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.

Wang R., Li Y., Yang L., Li L., Fang F., Li W. (2006): Analysis of genetic diversity based on SSR and morphological markers among tomato cultivars. *J Trop Subtrop Bot*, 14: 120-125.

Tab. 1 – Přehled testovaných genotypů

<b>Př.</b>	<b>číslo EVIGEZ</b>	<b>jméno</b>
1	09H3100071	Tetenyi
2	09H3100243	Kalocsai Fuszer (Edes)
3	09H3100244	Kalocsai Fuszer (Edes)
4	09H3100245	Kalocsai Fuszer (Edes)
5	09H3100290	Vinedale
6	09H3100291	Vinedale
7	09H3100055	Astrachanskij
8	09H3100056	Astrachanskij
9	09H3100057	Astrachanskij
10	09H3100058	Astrachanskij
11	09H3100541	Astrachanskij
12	09H3100059	Astrachanskij 147
13	09H3100416	Hatvani
14	09H3100350	Japan Madarszem
15	09H3100419	Hatvani Csemege
16	09H3100418	Hatvani
17	09H3100417	Hatvani
18	09H3100354	Konservnyj Belyj 289
19	09H3100292	Vinedale
20	09H3100137	Aufrechte Cayenne
21	09H3100138	Aufrechte Cayenne
22	09H3100139	Aufrechte Cayenne
23	09H3100140	Aufrechte Cayenne
24	09H3100111	Bogyisloi
25	09H3100112	Bogyiszloi
26	09H3100113	Bogyiszloi
27	09H3100114	Bogyiszloi Vastaghusu
28	09H3100351	Japan Madarszem
29	09H3100503	Japan Madarszen
30	09H3100504	Japan madarszen
31	09H3100505	Japan madarszen
32	09H3100067	Tetenyi
33	09H3100068	Tetenyi
34	09H3100069	Tetenyi
35	09H3100070	Tetenyi
36	09H3100288	Vinedale
37	09H3100349	Japan Hontakka
38	09H3400501	Japan hontakka
39	09H3100502	Japan hontakka
40	09H3100352	Konservnyj Belyj 289
41	09H3100353	Konservnyj Belyj 289

Tab. 2 – charakteristika SSR markerů

SSR marker	lokalizace na chromozomu	počet alel	rozpětí (bp)	poznámka
<i>Hpms 1-1</i>	1	1	270	monomorfní
<i>Hpms 1-5</i>	6	7	296-320	
<i>Hpms 1-168</i>	16	1	172	monomorfní
<i>Hpms 1-172</i>	11	2	338-340	
<i>Hpms 1-274</i>	7	1	175	monomorfní
<i>Hpms 2-21</i>	10	7	266-296	
<i>Cams 163</i>	5	2	248-250	
<i>Cams 647</i>	3	6	188-224	
průměrný počet alel na lokus je 4,00				

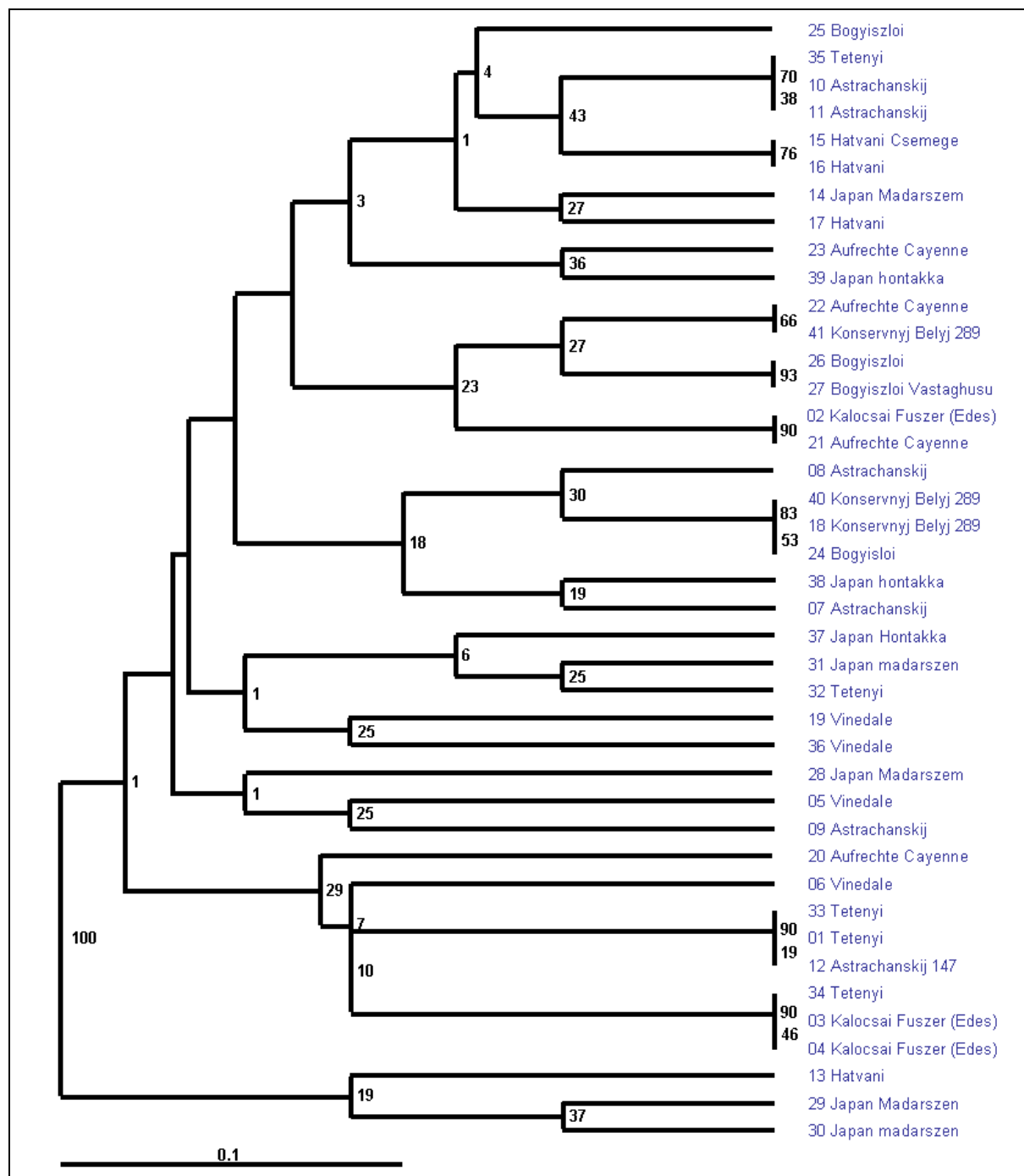
Tab. 3 – Velikost amplifikovaných produktů v bp

SSR marker	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
<i>Hpms 1-1</i>	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270
<i>Hpms 1-5</i>	318	320	308	308	312	318	320	318	312	308	308	318	296	308	318	318	318	318	308	308	320
<i>Hpms 1-168</i>	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172
<i>Hpms 1-172</i>	340	340	340	340	340	340	340	340	340	340	340	340	338	340	340	340	340	340	340	340	340
<i>Hpms 1-274</i>	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175
<i>Hpms 2-21</i>	294	292	294	294	288	292	290	290	296	294	294	294	294	294	294	294	294	290	292	288	292
<i>Cams 163</i>	248	250	248	248	250	248	250	250	250	250	250	248	250	250	250	250	250	250	250	248	250
<i>Cams 647</i>	224	224	218	218	188	218	218	218	218	212	212	224	224	188	212	212	188	224	220	224	224
SSR marker	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	
<i>Hpms 1-1</i>	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270	
<i>Hpms 1-5</i>	320	310	318	308	320	320	310	308	308	308	308	318	308	308	318	308	308	306	318	320	
<i>Hpms 1-168</i>	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172	
<i>Hpms 1-172</i>	340	340	340	340	340	340	340	338	338	338	340	340	340	340	340	340	340	340	340	340	
<i>Hpms 1-274</i>	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	
<i>Hpms 2-21</i>	294	294	290	294	294	294	270	292	288	288	288	294	294	294	288	266	290	294	290	294	
<i>Cams 163</i>	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	248	248	250	250	250	250	250	250	250	
<i>Cams 647</i>	224	218	224	224	190	190	188	224	224	218	218	224	218	212	220	218	218	218	224	224	

Tab. 4 – DI, PI a PIC SSR markerů

SSR marker	DI index diverzity	PI pravděpodobnost identity	PIC polymorfní informační obsah
<i>Hpms 1-1</i>	0,00	1,00	0,00
<i>Hpms 1-5</i>	0,73	0,10	0,70
<i>Hpms 1-168</i>	0,00	1,00	0,00
<i>Hpms 1-172</i>	0,18	0,69	0,16
<i>Hpms 1-274</i>	0,00	1,00	0,00
<i>Hpms 2-21</i>	0,68	0,09	0,67
<i>Cams 163</i>	0,31	0,52	0,26
<i>Cams 647</i>	0,74	0,04	0,73
<b>Průměr</b>	<b>0,33</b>	<b>0,55</b>	<b>0,32</b>

Tab. 5 – dendrogram podobnosti





Obr. 1 - Postavení plodů genotypu 09H3100243



Obr. 2 – Postavení plodů genotypu 09H3100244

