

## THE VARIABILITY OF WHEAT GENETIC RESOURCES USABLE IN BREEDING FOR FUNCTIONAL FOODS

Milena MUSILOVÁ, Václav TROJAN, Tomáš VYHNÁNEK, Ladislav HAVEL

### ABSTRACT

The collection of 24 genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L.,  $2n = 6x = 42$ , BBAADD) and one genotype *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth & D. R. Dewey ( $2n = 10x = 70$ , JJJJJJ<sup>s</sup>J<sup>s</sup>J<sup>s</sup>) was studied using the SSR method. We analysed genetic variability of wheat genotypes with purple pericarp, blue aleurone, yellow endosperm and red pericarp. SSR markers localized on chromosomes of A and B genome were chosen from the literature for the analysis. Based on 20 SSR markers a dendrogram was calculated, which highly significantly differentiates the genotype *Thinopyrum ponticum*. The 3 genotypes with purple pericarp and 1 genotype with blue aleuron showed a higher variability than remaining 20 genotypes. The bigger cluster is split into 2 subclusters. The minor subcluster contained only genotypes with blue aleuron layer. Among these genotypes was confirmed high similarity of 2 blue aleuron genotypes that are supposed to be the same genotypes of different origin. Isogenic line of red pericarp wheat and the line of yellow endosperm genotypes are gathered in the bigger subcluster. Used SSR markers can be applied for the detection of the variability and/or purity of the analysed genotypes in breeding programs. This could be a new way how shift healthy benefits like anthocyanin pigments into the common bread and produce functional food.

**Keywords:** wheat, variability, microsatellites, colored grain, functional food

### ÚVOD

Cereálie a výrobky z nich, tedy pečivo, těstoviny aj., tvoří velkou část běžné lidské stravy. V rámci široké škály běžného pečiva je kladen důraz na výrobky z celozrnné mouky, neboť obilky této pšenice nejsou při procesu mletí zbavovány obalových vrstev, a tak jejich vysoká nutriční hodnota přechází do pečiva. Další možnost, jak obohatit tuto důležitou součást lidské výživy, se nabízí právě produkcí pšenice s různým zbarvením obilek. Pšenice s různě barevnou obilkou je bohatá nejen na přírodní pigmenty, ale i vitamíny, proteiny, aminokyseliny a prospěšné mikroelementy, a proto je doporučována pro lidskou výživu (Li et al., 2002; Chňápek et al., 2010). Přírodní pigmenty mají i prokazatelný vliv na užitek a kvalitu produkce hospodářských zvířat, např. slepic (Rückschloss et al., 2010).

Technologické využití pšenic s nestandardním zbarvením obilek je spojeno s nutností poznání genetické determinace odchylek v tomto zbarvení a následného využití ve šlechtitelském procesu. V rámci šlechtění je důležitým krokem studium genetické variability genotypů požadovaných vlastností. K tomuto účelu je možné využít morfologické markery, proteinové markery a markery DNA (Zhang et al., 2007). V rámci markerů DNA jsou mikrosatelitní markery (SSRs – Simple Sequence Repeats) zvláště vhodné, protože mají vysoký stupeň polymorfismu a kodominantní charakter dědičnosti (Chandra et al., 2010).

Cílem práce bylo studium genetické variability genotypů pšenice s nestandardním zbarvením obilky, které jsou využitelné ve šlechtitelském programu pšenice zaměřeného na funkční potraviny.

### MATERIÁL A METODY

Kolekce 24 genotypů s nestandardním zbarvením obilek pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) byla doplněna o jeden genotyp planého druhu trávy *Thinopyrum*

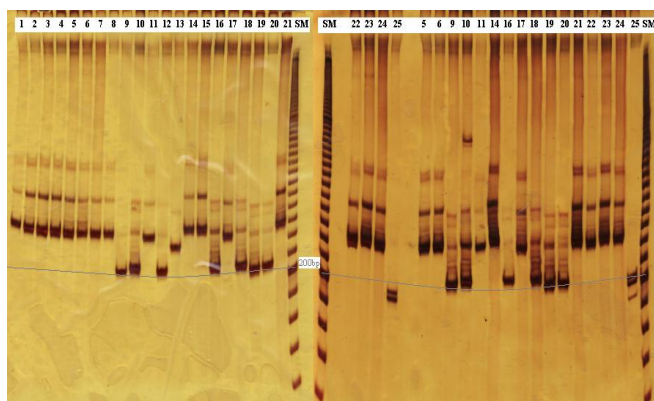
*ponticum* (předpokládaného donoru genu modrého zbarvení obilky) (Tabulka 1).

Tabulka 1 Charakteristika analyzovaných genotypů

Název	Zbarvení obilky	Forma	Zdroj
Novosibirskaya 67, ANK-1A, ANK-1B, ANK-1C, ANK-1D, ANK-1E	červené	jarní	ZVÚ Kroměříž, s.r.o.*
ANK-28A, ANK-28B, Abyssinskaja arraseita, Konini, Purple, Purple feed	purpurové	jarní	ZVÚ Kroměříž, s.r.o.
UC66049, Tchermaks Blaukörniger Sommerweizen, Tchermaks Blaukörniger	modré	jarní	ZVÚ Kroměříž, s.r.o.
48M, RU 440-5, RU 440-6, Barevná 9, Barevná 25	modré	ozimá	ZVÚ Kroměříž, s.r.o.
Indigo	purpurové	ozimá	ZVÚ Kroměříž, s.r.o.
Citrus, Luteus, Bona Dea	žluté	ozimá	ZVÚ Kroměříž, s.r.o.
<i>Thinopyrum ponticum</i>	donor modrého zbarvení	ozimá	GB VÚRV, v.v.i.**

Vysvětlivky: \* Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o.; \*\* Genová banka Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. Praha-Ruzyně

Těchto 25 genotypů bylo podrobena analýzám genetické variability pomocí 20 SSR (mikrosatelitních) markerů lokalizovaných v místech genů determinující odchylky ve zbarvení obilky, které byly popsány v literatuře u pšenice a tritikale (Khlestina et al., 2004; Kuelung et al., 2006). Pro molekulární analýzy byla genomová DNA izolována pomocí izolačního kitu DNeasy Plant Mini Kit (f. Qiagen) z napěstovaných rostlin ve fázi jednoho listu (5-7 dní staré rostliny). 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). Pro vizualizaci produktů bylo použito barvení dusičnanem stříbrným (0,2 %) po proběhlé vertikální elektroforéze (při 300 V) na 8 % nedenaturovaném polyakrylamidovém (PAA) gelu v TBE pufru. 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. Pro jednotlivé SSR markery byly vypočteny statistické hodnoty DI (index diversity), PI (pravděpodobnost identity) a PIC (polymorfni informační obsah) (Russell et al., 1997).



Obrázek 1 Elektroforetická separace SSR markeru (*Xbarc176*) na PAA gelu

### VÝSLEDKY A DISKUSE

Celkem bylo SSR markery specifickými pro chromozomy A a B detekováno 94 alel, v průměru připadána přibližně 5 alel na jeden mikrosatelitní lokus. Podobný počet alel na lokus, tzn. 5,1 alel na lokus, detekovali Maccaferri et al. (2010) při použití výrazně většího počtu odrůd (189 genotypů) pšenice tvrdé a většího počtu mikrosatelitů (90 SSR markerů). Největší počet 8 alel byl detekován pomocí primeru *Xbarc163*. Nejvyšší variabilita ve velikosti získaných ampliconů byla zaznamenána u primerů *Xbarc176* (Obrázek 1) *Xbarc077*. Velikost amplifikovaných produktů se pohybovala v rozmezí od 100 do 260 bp. Khlestkina et al. (2004) a Kuelung et al. (2006) uvádějí přítomnost nulových alel, kterou jsme zjistili i my v případě pěti mikrosatelitů (*Xbarc003*, *Xbarc077*, *Xbarc163*, *Xbarc170*, *Xgwm340*). Průměrná hodnota DI byla 0,51;

průměr PI 0,29 a pro ukazatel PIC byla vypočítána průměrná hodnota 0,49 (Tabulka 2). Statistické hodnoty vyjadřují průměrný stupeň variability ve studované kolekci genotypů barevných pšenic, který byl zjištěn již při použití 4 SSR markerů (Musilová et al., 2010) a jsou srovnatelné s Holtonem et al. (2004) při použití podobného počtu genotypů a dvojnásobného počtu SSR markerů. Při použití 20 SSR markerů bylo získáno větší množství dat, která umožňují více charakterizovat analyzovaný soubor genotypů.

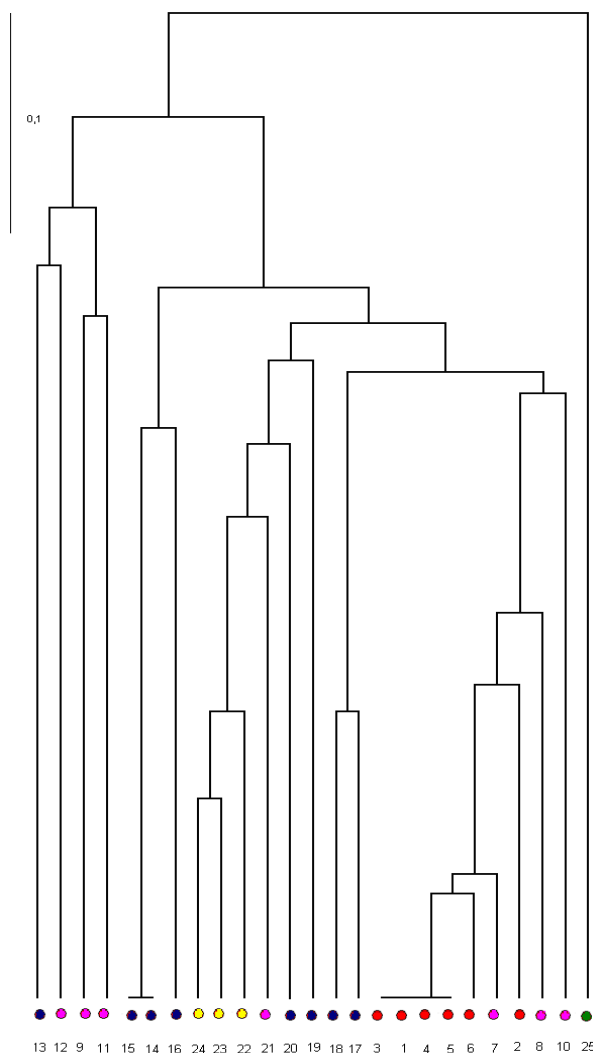
Tabulka 2 Statistické zhodnocení analyzovaných SSR markerů

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>Xgwm328</i>	2A	1	0,07	0,86	0,07
<i>Xgwm356</i>	2A	1	0,07	0,86	0,07
<i>Xwmc428</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
<b>Průměr</b>		<b>5</b>	<b>0,51</b>	<b>0,29</b>	<b>0,49</b>

Vysvětlivky: DI (index diversity), PI (pravděpodobnost identity) a PIC (polymorfni informační obsah)

Na základě statistického vyhodnocení byl sestaven dendrogram podobnosti analyzovaných genotypů barevných pšenic (UPGMA, Jaccardův koeficient). Z dendrogramu (Obrázek 2) je patrné rozdělení do dvou klasterů. Genotyp *Thinopyrum ponticum* se zařadil mimo tyto klastery, což potvrzuje skutečnost, že tento planý druh nesdílí s pšenicí setou homologii ve sledovaných chromozomech. Menší ze dvou klasterů zahrnuje 3 genotypy s purpurovou barvou obilky ('Abyssinskaya Arraseita', 'Purple' a 'Purple feed') a 1 genotyp modrého zbarvení, tedy je průkazná jejich větší variabilita vzhledem ke zbývajícím 20 genotypům většího klasteru. Tento se dále rozdělil na 2 subklastery. Menší subklaster je složen pouze z genotypů s modrým zbarvením, z nichž byla u dvou genotypů zaznamenána vysoká příbuznost. Tímto byla potvrzena domněnka, že se jedná o stejný genotyp, ovšem rozdílného původu odkud byl vzorek do kolekce ZVÚ Kroměříž, s.r.o. zařazen. Ve větším subklasteru se nachází izogenní linie červeně zbarvených pšenic a vysoce příbuzná linie genotypů se zbarvením.

V prípade 'Citrus' a 'Luteus' je to dáno spoločnými predky 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).



Obrázek 2 Dendrogram genetiké variability 20 SSR markerů

Vysvětlivky:

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

## ZÁVĚR

Pomocí SSR markerů se podařilo statisticky významně rozlíšiť analyzovaný soubor genotypů pšenice seté s nestandardním zbarvením obilky. Genotyp *Thinopyrum ponticum* (pravděpodobný donor modrého zbarvení) se zařadil mimo tyto klastery, což potvrzuje skutečnost, že tento planý druh nesdílí s pšenicí setou homologii ve sledovaných chromozomech. Získané výsledky jsou použitelné ve šlechtitelských programech pšenice pro charakteristiku donorů nestandardního zbarvení obilky. Pro další studium je nezbytné mj. charakterizovat geny, které jsou součástí biochemických drah zodpovědných za syntézu daných barviv, sledovat jejich expresi, a tak zefektivnit šlechtění těchto typů pšeníc. Neméně důležité je sledovat kvalitativní i kvantitativní změny anthokyanů v průběhu pekárenského zpracování, které pozitivně působí na zdraví člověka svými antioxidačními účinky.

## REFERENCES

- 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. In *Mol. Breed.*, roč. 9, 2010, č. 1, s. 63-71. ISSN 1572-9788.
- CHANDRA, R., GUPTA, S., AHMAD, A., IQBAL, M., PRASAD, M. 2010. Variability in Indian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties differing in nitrogen efficiency as assessed by microsatellite markers. In *Protoplasma*, roč. 242, 2010, č. 1-4, s. 55-67. ISSN 1615-6102
- CHŇAPEK, M., GÁLOVÁ, Z., TOMKA, M., RŮCKSCHLOSS, L. 2010. Nutriční a technologická kvalita darebných genotypů pšenice letně formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.). In *Potravinárstvo*, roč. 4, 2010, č. 1, s. 20-25. ISSN 1337-0960.
- 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. In *Theor. Appl. Genet.*, roč. 109, 2004, č. 4, s. 725-732. ISSN 0040-5752.
- KUELUNG, C., BAEZINGER, P.S., KACHMAN, S.D., DWEIKAT, I. 2006. Evaluating the genetic diversity of triticale with wheat and rye SSR markers. In *Crop Sci.*, roč. 46, 2006, č. 3, s. 1692-1700. ISSN 0011-183X.
- 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. In *Plant Soil Environ.*, roč. 49, 2003, č. 1, s. 1-7. ISSN 1214-1178.
- LI, X.P., HOU, H.J., LIU, Y.P., LAN, S.Q., ZHU, Y.Y. 2002. Studies of grain nutritional quality on wheat with blue or purple kernels. In *Acta Agri. Boreali-Sin.*, roč. 17, 2002, č. 1, s. 21-24. ISSN 0496-3490.
- LILA, A.M. 2004. Anthocyanins and human health: An *in vitro* investigative approach. In *J. Biomed. Biotech.*, roč. 2004, 2004, č. 5, s. 306-313. ISSN 1110-7251.
- MACCAFERRI, M., SANGUINETI, M.C., DEMONTIS, A., EL-AHMEND, A., DEL MORAL, L.C., MAALOUF, F., NACHIT, M., NSERALLAH, N., OUABBOU, H., RHOUMA, S., ROYO, C., VILLEGAS, D., TUBEROSA, R. 2010. Association mapping in durum wheat grown across

a broad range of water regimes. In *J. Exp. Bot.*, 2010, doi: 10.1093/jxb/erq287, s. 1-30. ISSN 1460-2431.

MUSILOVÁ, M., TROJAN, V., VYHNÁNEK, T., HAVEL, L. 2010. Detekce genetické variability pšenice s nestandardním zabarvením obiliek pomocí SSR markerů. In *Hodnotenie genetických zdrojov rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo*. 1. vyd. Piešťany, Slovensko: Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, 26. - 27. 5. 2010: 160-161. ISBN 978-80-89417-13-1.

RUSSELL, J., FULLER, J., YOUNG, G., THOMAS, B., TARMINO, G., MACAULAY, M., WAUGH, R., POWELL, W. 1997. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. In *Genome*, roč. 40, 1997, č. 4: s. 442-450. ISSN 0831-2796.

RŮCKSCHLOSS, E., MATUŠKOVÁ, K., HANKOVÁ, A., JANČÍK, D. 2010 Vplyv pšenice s purpurovou farbou zrna na parametre užitočnosti nosníc a kvalitu vajec. In *Potravinárstvo*, roč. 4, 2010, č. mimoriadne, s. 231-235. ISSN 1337-0960.

ZHANG, L., LI, H., WANGH, H., LI, L. 2007. Genetic diversification of the Chinese wheat landrace Mazhamai as revealed by morphological characteristics, seed storage proteins, and microsatellite markers. In *Canad. J. Plant Sci.*, roč. 87, 2007, č. 2: s. 763-771. ISSN 1918-1833.

### Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory Interní grantové agentury Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně, projekt č. IP1/2010.

### Contact address:

Milena Musilová, Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic, Tel.: +420 545 133 027, Email: milena.musilova@mendelu.cz

Václav Trojan, Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic, Tel.: +420 545 133 389 Email: vaclav.trojan@mendelu.cz

Tomáš Vyhnánek, Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic, Tel.: +420 545 133 185 Email: vyhnanek@mendelu.cz

Ladislav Havel, Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic, Tel.: +420 545 133 016, Email: lhavel@mendelu.cz