

VZTAH RODIČOVSKÝCH GENOMŮ U MEZIDRUHOVÝCH HYBRIDŮ *TRIFOLIUM PRATENSE* X *TRIFOLIUM MEDIUM*

Intergenomic relationships in interspecific hybrids of *Trifolium pratense* x *Trifolium medium*

Řepková J.¹, Simandlová J.¹, Jakešová H.², Nedělník J.³, Soldánová M.¹,
Hajšlová J.⁴, Schulzová V.⁴

¹Ústav experimentální biologie, Masarykova univerzita Brno

²Ing. Hana Jakešová, CSc, šlechtění, Hladké Životice

³Zemědělský výzkum, spol. s r.o., Troubsko

⁴Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Abstrakt

Šlechtitelský materiál založený na hybridech *Trifolium pratense* x *T. medium* je vhodným zdrojem genetické variability pro kulturní jetel luční (*T. pratense*). Tito hybridy byli hodnoceni na úrovni cytologické prostřednictvím průtokové cytometrie a genomické *in situ* hybridizace. Rostliny ve dvou školkách s 99 původů hybridů měly srovnatelné zastoupení, co se týče počtu chromozomů v pěti hodnocených skupinách, to je $2n = 28$ (76 a 66% rostlin), s méně než 28 chromozomy (8,5 a 6,4% rostlin), $2n = 29$ a 30 (15 a 26% rostlin), $2n = 31$ až 40 (0,4 a 1,2% rostlin) a $2n = 41$ až 46 (méně než 1% rostlin). Nepodařilo se prozatím identifikovat introdukované chromozomy nebo translokované části. Hybridy obsahovali nižší množství fytoestrogenů než *T. pratense*, ale byl zaznamenán nárůst formononetinu ve srovnání s *T. medium*. Pro identifikaci mezidruhové variability budou využity genomické techniky založené na *de novo* sekvenování obou rodičovských genomů.

Klíčová slova: Genomická *in situ* hybridizace, Průtoková cytometrie, *Trifolium medium*, *Trifolium pratense*

Abstract

Breeding material derived from hybrids *Trifolium pratense* x *T. medium* is a promising source of new genetic variability for cultivated red clover (*T. pratense*). These hybrids were evaluated on the cytological level via flow cytometry and genomic *in situ* hybridization. Plants of 99 sources in two breeding nurseries had comparable chromosome numbers in five groups: $2n = 28$ (76 and 66% of plants), below of 28 chromosomes (8.5 and 6.4% of plants), $2n = 29$, 30 (15 and 26% of plants), $2n = 31$, 40 (0.4 and 1.2% of plants) and $2n = 41$ to 46 (0.1 and 0.3% of plants). The identification of introduced chromosomes or translocated parts was unsuccessful. Hybrids contained lower level of phytoestrogens than *T. pratense* but increased amount of formononetin with comparison of *T. medium* was evaluated. Interspecific variability will be identified by genomic procedures based on *de novo* sequencing of the both parental genomes.

Key words: Flow cytometry, Genomic *in situ* hybridisation, *Trifolium medium*, *Trifolium pratense*

Úvod

Genetická rozmanitost kulturních druhů se zužuje vlivem šlechtění. Vhodným zdrojem pro rozšíření jejich genetické variability jsou plané druhy, které prostřednictvím mezidruhové hybridizace umožňují využití genofondu nad rámec druhu a mohou být zdrojem řady nových znaků jako samčí sterilita, rezistence k chorobám, biotickým faktorům a podobně. *Trifolium pratense* L. je vysoce kvalitní pícnina dávající vysoké výnosy, ale má nízkou vytrvalost, což je možné překonat mezidruhovou hybridizací s druhem, který tvoří podzemní výběžky, např. s *T. medium* L. Ve VÚP Troubsko byl získán originální rostlinný materiál mezidruhovou hybridizací *T. pratense* ($2n = 4x = 28$) a *T. medium* ($2n = 8x = 64$) (Řepková et al. 1991; Nedbálková et al. 1995). Volným sprášením hybridů F_2 s *T. pratense* cv. Amos po pět generací byla získána populace rostlin, která byla využita ke šlechtění, jehož součástí byly i výběry rostlin s odlišným obsahem DNA ve srovnání s tetraploidním *T. pratense*. Bylo

získáno novošlechtění, které bylo přihlášené v r. 2010 do státních odrůdových zkoušek ÚKZÚZ pod názvem Pramedi. Materiál se odlišuje od rodičovských druhů variabilitou v morfologických a agronomických znacích (Řepková et al. 2011) a v současné době je pozornost zaměřena na hodnocení znaků souvisejících s pozitivními agronomickými vlastnostmi, jakými jsou hmotnost rostlin, počet lodyh a hlávek na rostlinu, a s vytrvalostí rostlin.

Cílem současných analýz hybridní populace bylo studium jejich genomů za využití průtokové cytometrie a stanovení koncentrace DNA ve vztahu k počtu chromozomů hybridů a k oběma rodičovským druhům. Cytologické analýzy se zaměřily na metodu GISH (genomickou *in situ* hybridizaci), která umožňuje identifikaci a vizualizaci chromozomů nebo jejich částí a detekci introgrese genetické informace. Analýza znaků hybridních rostlin byla doplněna studiem znaků kvalitativních – stanovení obsahu fytoestrogenů v zelené hmotě.

Materiál a metody

Do analýz byly zahrnuty rodičovské rostliny *T. pratense* ($2n = 4x = 28$) a *T. medium* ($2n = 8x = 64$, klon 10/8) a rostliny hybridní populace *T. pratense* x *T. medium*, 18 původů v kmenové školce JEH1V a 81 původů v kmenové školce JEH1F.

Průtoková cytometrie

Do misek s perlitem bylo z každého původu vyseto cca 30 semen. Ve stadiu prvních až třetích pravých lístků bylo provedeno měření obsahu DNA u jednotlivých rostlin na průtokovém cytometru Partec PA. DNA každé rostliny byla měřena ve směsném vzorku s diploidním jetelem lučním (Start, $2n = 14$). Celkem bylo hodnoceno 800 rostlin JEH1V a 753 rostlin JEH1F.

Genomická in situ hybridizace (GISH)

Z 67 hybridních rostlin JEH1V a rostlin JEH1F *T. pratense* x *T. medium* byly odebrány kořenové špičky, po odstrihnutí byly ponechány 24 hod. na ledu za účelem synchronizace mitózy a pak byly fixovány v Carnoyově fixáži. Byla použita směs lytických enzymů celulázy, pektolázy a cytohelikázy pro narušení buněčné stěny. Dále byly připraveny hybridizační sondy z DNA izolované metodou CTAB z rostlin *T. pratense* odrůdy Tatra a *T. medium* klonu 10/8. Bylo použito nepřímé značení sond - sondy pro odrůdy *T. pratense* byly značeny digoxigeninem-11-dUTP (Roche) a DNA *T. medium* byla značena biotinem (Roche). Kvalita sond po nick translaci byla kontrolována na 1% agarózovém gelu. Hybridizační směs (Schubert et al. 1998) byla přidána k cytologickému preparátu (10 μ l/sklíčko). Pro denaturaci chromozomů a sondy byla sklíčka umístěna na 2 min na varnou desku (80°C), a pak na 6 h ve vlhkém boxu nebo přes noc při 37°C. Vizualizace preparátů byla provedena pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX-51.

Kvalitativní znaky

Z 10 kmenů mezidruhových hybridů JEH a obou rodičovských druhů byly odebírány vzorky zelené píce pro stanovení obsahu volných a celkových fytoestrogenních látek – isoflavonů daidzeinu, genisteinu, glyciteinu, formononetinu, biochaninu A a equolu, pterokarpanů – kumestrolu a jejich glykosidů. Pro stanovení celkového obsahu fytoestrogenů ve vzorcích byly glykosidy hydrolyzovány pomocí HCl za tepla, stanovení bylo provedeno pomocí kapalinové chromatografie a tandemovou hmotnostní spektrometrií. Stanovení volných fytoestrogenů bylo provedeno extrakcí metanolem.

Výsledky a diskuze

Koncentrace DNA měřených hybridních rostlin se pohybovala v rozmezí odpovídajícímu 22 až 47 chromozomům. Na základě těchto počtů byly rostliny rozděleny do pěti skupin (Tab. 1). Zastoupení rostlin v jednotlivých kategoriích bylo u obou školek srovnatelné. Na obr. 1 jsou zastoupeny hybridní rostliny s různým počtem chromozomů. Obsah DNA u *T. medium*

odpovídal oktoploidu s 64 chromozomy. Rostliny neobsahovaly stejný podíl chromozomů od obou rodičovských druhů. Podobné závěry byly zjištěny při studiu genomů odrůd založených na mezidruhové hybridizaci *Lolium multiflorum* a *Festuca pratensis* nebo *F. arundinacea* (Kopecky et al. 2005). Úspěšná hybridizace mezi *T. pratense* a *T. medium* včetně hodnocení intermediální morfologie listů byla popsána v práci Isobe et al. (2001). Introgrese znaků mezidruhovou hybridizací je u rodu *Trifolium* vzácná a byla popsána spíše mezi druhy *T. ambiguum* a *T. hybridum* pro tvorbu oddenků (Paplauskienė et al. 2004) nebo *T. repens* a *T. nigrescens* pro odolnost k hád'átkům (Hussain et al. 1997).

Jednotlivé druhy jetele se lišily jednak v obsahu, jednak v profilu fytoestrogenů. U *T. medium* bylo po kyselé hydrolýze stanoveno celkově 6190 mg/kg fytoestrogenů, z čehož tvoří 66% biochanin A (4061 mg/kg), 28% formononetin (1746 mg/kg), 5% genistein (323 mg/kg) a <1% daidzein (56 mg/kg). *T. pratense* obsahuje 2471 mg/kg celkových isoflavonů (stanovených rovněž po kyselé hydrolýze), s opačným zastoupením majoritních isoflavonů než u *T. medium*. Fytoestrogeny jsou tvořeny z 56% formononetinem (1394 mg/kg), 39% biochaninem A (968 mg/kg), 3,3% genisteinem (83 mg/kg) a z 1% daidzeinem (26 mg/kg). Rostliny hybridu uvedených dvou rodičů obsahovaly nižší množství fytoestrogenů než *T. pratense*, ale byl zaznamenán nárůst formononetinu ve srovnání s *T. medium*. Obsah celkových fytoestrogenů je u hybridů 2149 mg/kg se 68% zastoupením formononetinu (1468 mg/kg), 27% biochaninu A (573 mg/kg), 3,9% genisteinu (84 mg/kg) a 1,1% daizeinu (23 mg/kg).

Tab. 1: Obsah DNA hybridních rostlin *T. pratense* x *T. medium* v populaci novošlechtění měřený průtokovou cytometrií přepočítaný na počet chromozomů vzhledem ke standardu $2n = 14$.

	Počet rostlin s chromozomy				
	$2n = \text{méně než } 28$	$2n = 28^*$	$2n = 29 \text{ až } 30$	$2n = 31 \text{ až } 40$	$2n = 41 \text{ až } 47$
JEH1V	68 (8,5%)	608 (76,0%)	120 (15,0%)	3 (0,4%)	1 (0,1%)
JEH1F	48 (6,4%)	495 (65,7%)	199 (26,4%)	9 (1,2%)	2 (0,3%)

* počet chromozomů u mateřského genotypu *T. pratense*

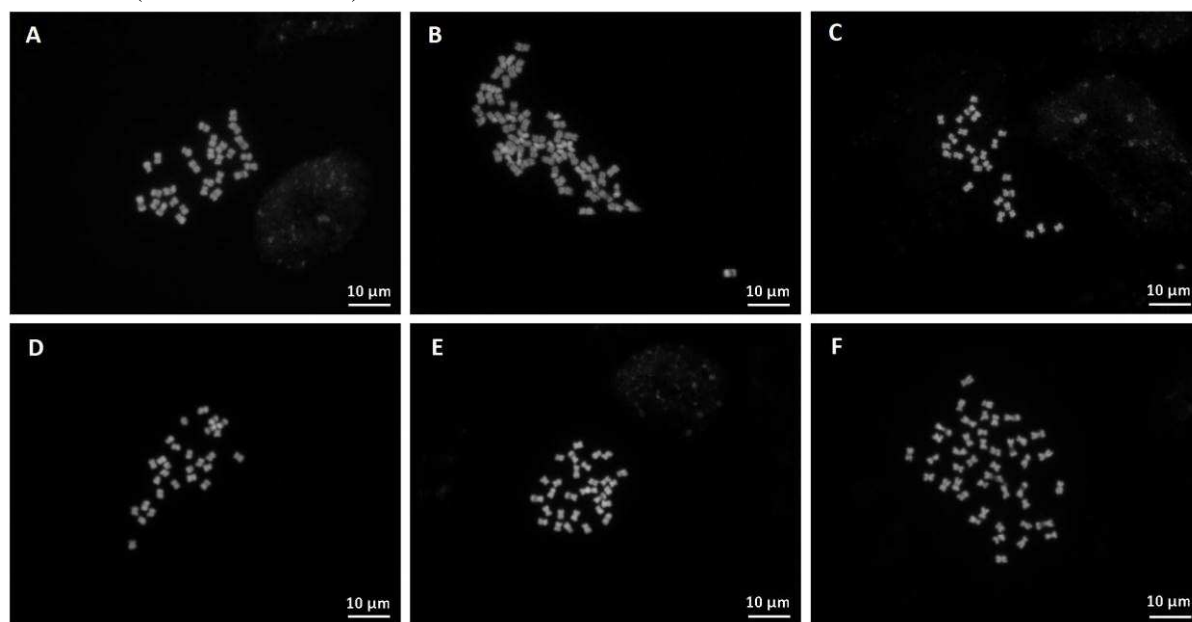
Závěr

Charakterizace hybridů *T. pratense* x *T. medium* byla doplněna o kvalitativní parametry, jako je obsah fytoestrogenů. Výsledky potvrdily mezidruhovou variabilitu, která bude dále studována. Cytologická analýza hybridů ukázala variabilní obsah počtu chromozomů od 20 do 43 v korelaci s metodou průtokové cytometrie, což dokládá introgresi celých chromozomů nebo jejich ztrátu. Introgrese metodou GISH nebyla zatím potvrzena. Probíhá hodnocení introgrese znaku tvorby podzemních výběžků, charakter trsu, a jejich souvislost s vytrvalostí. Pokračují práce s analýzou získaných celogenomových sekvencí obou rodičovských druhů *T. pratense* a *T. medium* metodou Illumina. Práce je zaměřena na vypracování postupu využití druhově specifických DNA markerů a DNA čipů jako prostředků selekce hybridních rostlin na znaky kvalitativní i kvantitativní.

Dedikace

Výzkum je součástí projektu QI111A019 a QI111C016 Ministerstva zemědělství ČR.

Obr. 1: Počty chromozomů u hybridních rostlin *T. pratense* x *T. medium* - C JEH 35/6 (27 chromozomů), D JEH 12/29 (28 chromozomů), E JEH 34/4 (30 chromozomů), F JEH 26/7 (43 chromozomů) ve srovnání s rodiči A *T. pratense* (28 chromozomů) a B *T. medium* klon 10/8 (64 chromozomů).



Použitá literatura

- Hussain S.W., Williams W.M., Mercer C.F., White D.W.R. (1997): Transfer of clover cysts nematode resistance from *Trifolium nigrescens* Viv. to *T. repens* L. by interspecific hybridisation. Tudor. Appl. Genet. 95: 1274–1281.
- Isobe S., Sawai A., Yamaguchi H., Gau M., Uchiyama K. (2001): Breeding potential of the backcross progenies of a hybrid between *Trifolium medium* x *T. pratense* to *T. pratense*. Canad. J. of Plant Sci. 82: 395–399.
- Kopecký D., Lukaszewski A.J., Doležel J. (2005): Genomic constitution of Festulolium cultivars released in the Czech republic. Plant Breed. 124: 454–458.
- Nedbalková B., Repková J., Bartosová L. (1995): Germplasm TBZP1, TBZP2, TBZP3, TBZP4 of interspecific *Trifolium* hybrids. Scientific Studies Res. Inst. Fodder Plants 13: 129–131.
- Paplauskienė V., Dabkevičienė G., Pasckinskiene I. (2004): Identification of interspecific hybrids of *T. ambiguum* x *T. hybridum* by inter-SSR fingerprinting. Grassland Sci. Eur. 9: 398–400.
- Řepková J., Nedbálková B., Holub J. (1991): Regeneration of plants from zygotic embryos after interspecific hybridization within the genus *Trifolium* and electrophoretic evaluation of hybrids. Scientific Studies Res. Inst. Fodder Plants 12: 7–14.
- Řepková J., Nedělník J., Jakešová H., Hampel D., Hofbauer J. (2011): Mezidruhová hybridi *Trifolium pratense* x *Trifolium medium* jako zdroj nové diverzity. Úroda 12, vědecká příloha časopisu, 21–24.
- Schubert I., Shi F., Fuchs J., Endo T.R. (1998): An efficient screening for terminal deletions and translocations of barley chromosomes added to common wheat. Plant J. 14: 489–495.

Kontaktní adresa:

Doc. RNDr. Jana Řepková, CSc.
Kampus Bohunice, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika
e-mail: repkova@sci.muni.cz