

Vývoj genově specifických DNA markerů pro skrining rostlin ve šlechtění jetele lučního

Development of gene specific DNA markers for plant screening in red clover breeding

Řepková J.¹, Dluhošová J.¹, Nedělník J.², Jakešová H.³

¹Ústav experimentální biologie, Masarykova univerzita Brno

²Zemědělský výzkum, spol. s r.o., Troubsko

³Ing. Hana Jakešová, CSc., šlechtění, Hladké Životice

Abstrakt

Jetel luční (*Trifolium pratense*) je celosvětově důležitá pícnina. Cílem práce byla identifikace SSR (simple sequence repeat) markerů v kódujících sekvencích pro celý genom. Charakterizovali jsme 4005 potenciálních markerů s produkty amplifikace 100 až 350 bp. Hustota markerů byla jeden SSR na 12,39 kbp. Celkem 95 SSR v kódujících sekvencích bylo validováno pro 50 českých i zahraničních odrůd jetele lučního a byla získána kolekce 22 vysoce polymorfních markerů s PIC (polymorphism information content) > 0.9. Tyto makery jsou vhodné pro studium diverzity u *T. pratense* a pro celogenomové studie vyhledávání markerů ve specifických genech využitelných ve šlechtění jetele lučního. Informace o příbuzenských vztazích u šlechtitelského materiálu jsou využitelné pro plánování křížení, ale i ochranu práv šlechtitelů prostřednictvím identifikace odrůd.

Klíčová slova: *Trifolium pratense*, SSR, genetická diverzita

Abstract

Red clover (*Trifolium pratense*) is an important forage plant worldwide. We characterized 4,005 potential simple sequence repeat (SSR) markers generating polymerase chain reaction products preferentially within 100 to 350 bp. Marker density of 1 SSR marker per 12.39 kbp was achieved. Altogether, 95 SSRs in coding sequences were analysed for 50 red clover varieties and a collection of 22 highly polymorphic SSRs with PIC (polymorphism information content) > 0.9 was generated, thus obtaining primer pairs for application to diversity studies in *T. pratense*. Predicted large sets of SSRs throughout the genome are key to rapidly implementing genome-based breeding approaches. Detailed knowledge of genetic relationships among breeding materials can also be useful for breeders in planning crosses or for plant variety protection.

Key words: *Trifolium pratense*, SSR, genetic diversity

Úvod

Jetel luční (*Trifolium pratense* L.) je významná pícnina využitelná ke krmivářským účelům a pěstovaná jak monokulturně, tak jako důležitá součást jetelotravních směsí. Pozitivním environmentálním aspektem je také schopnost fixace vzdušného dusíku v symbióze s bakterií *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Šlechtění této plodiny komplikuje cizosprašnost a gametofytický systém inkompatibility a v důsledku toho mohou být přírodní ekotypy i odrůdy morfologicky podobné, ale geneticky heterogenní. Heterozygotní charakter rostlin komplikuje šlechtitelské a genetické postupy. Genotypování rostlin by proto bylo vhodnou strategií jak urychlit a zefektivnit šlechtění nových odrůd jetele lučního s žádoucími znaky. Pro tento cíl je nezbytné využít současné poznatky z celogenomových sekvenčních projektů jetele lučního (Ištvánek et al. 2014; De Vega et al. 2015) a další postupy na úrovni DNA, jako je cílená charakterizace genů, ale i RNA, kdy identifikujeme transkribované oblasti genů s určitou funkcí a v nich detekujeme DNA markery asociované s příslušným znakem.

Cílem této práce bylo vyvinout sadu polymorfních SSR markerů v kódujících sekvencích cílových genů vhodných k analýze genetické diverzity u odrůd jetele lučního. Toto hodnocení prostřednictvím profilů DNA markerů u cizosprašných druhů umožní kvantifikaci variability v rámci populace i mezi

populacemi, což je důležité pro identifikaci odrůd a analýzu čistoty semen nebo pro výběr geneticky odlišných rodičů pro perspektivní křížení.

Materiál a metody

Software SSR Locator (da Maia et al. 2008) byl využit k vyhledávání SSR markerů v sekvencích genů jetele lučního a pro návrh primerů. Pro všechny predikované lokusy SSR byla nastavena jednotná teplota tání ($T_m = 55\text{ °C}$). Validace markerů byla provedena pro 50 odrůd jetele lučního (40 českých, 10 zahraničních). Listy byly odebírány z rostlin pěstovaných 30 dní ve skleníku a DNA byla izolována z 1 g listů z balku 16 rostlin od každé odrůdy podle protokolu Dellaporta et al. (1983). K validaci bylo náhodně vybráno 96 SSR lokusů v kódujících sekvencích genů.

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla prováděna v objemu 10 μl s 1x reakčním pufrům, 0,2 mM každého dNTP (10 mM; Sigma-Aldrich, Germany), 10 pmol každého primeru, 0,5 U *GoTaq*[®] polymerázy (Promega, USA) a 30 ng templátu DNA. Byl použit následující PCR cyklus: 94 °C 3 min, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min; 30 cyklů 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s; závěrečný elongační krok 72 °C 5 min. Fragmenty byly separovány na 3 % agarózovém gelu nebo na 10 % polyacrylamidovém gelu a vizualizovány po barvení ethidium bromidem.

Z gelů byly hodnoceny polymorfni fragmenty a pro každý marker byla vypočítána hodnota PIC (polymorphism information content) vyjadřující pravděpodobnost detekce polymorfismu mezi genotypy dvou náhodně vybraných odrůd. PIC byl vždy vypočítán pro všech 50 odrůd. Podobnost mezi jednotlivými páry odrůd z celkového počtu byla odhadnuta na základě přítomnosti nebo absence jednotlivých amplifikovaných fragmentů všech SSR markerů pomocí Jaccardova ($n_{xy} / (n_x + n_y - n_{xy})$) a Sorensen-Dice ($2n_{xy} / (n_x + n_y)$) koeficientu (kde n_{xy} je počet fragmentů přítomných u obou porovnávaných odrůd, n_x je počet všech fragmentů první porovnávané odrůdy a n_y je počet všech fragmentů druhé porovnávané odrůdy). Byly zkonstruovány dva fylogenetické stromy na základě průměrné vzdálenosti matric pomocí MATLAB (verze R2015a, <http://www.mathworks.com>), UPGMA a FigTree (verze 1.4.2, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Výsledky a diskuze

V kódujících sekvencích jetele lučního bylo pomocí softwaru SSR Locator identifikováno 6749 potenciálních SSR lokusů. To je dvakrát více než počet lokusů SSR identifikovaných v osekvenovaném transkriptomu jetele lučního (Yates et al. 2014). Pro vhodné lokusy byly navrženy jedinečné primery pro amplifikaci fragmentů dlouhých 100 až 350 bp. Bylo tak navrženo 4005 (59,3 %) potenciálních SSR markerů. 3409 (5,3 %) kódujících sekvencí mělo alespoň jeden SSR marker. Pro celkovou délku kódujících sekvencí 49,6 Mbp tak byl 1 SSR marker na každých 12,39 kbp. Nejčastějším motivem mikrosatelitů byly trimery (78,68 %), komplexní motivy (10,74 %) a hexamery (8,16 %) byly méně časté (Tab. 1). Další motivy jako dimery a pentamery se vyskytovaly vzácně. Tento jev je způsoben nutností zachování otevřených čtecích rámců v kódujících sekvencích a negativním selekčním tlakem vůči sekvencím SSR, které je narušují. Podle literárních zdrojů u většiny SSR s motivy jinými než trimerickými je celková délka motivu kombinací základních motivů dělitelných třemi, např. (A)₁₂, (GA)₆, (ATTGG)₃, a tak nedochází k narušení otevřených čtecích rámců posunovými mutacemi (Metzgar et al. 2000).

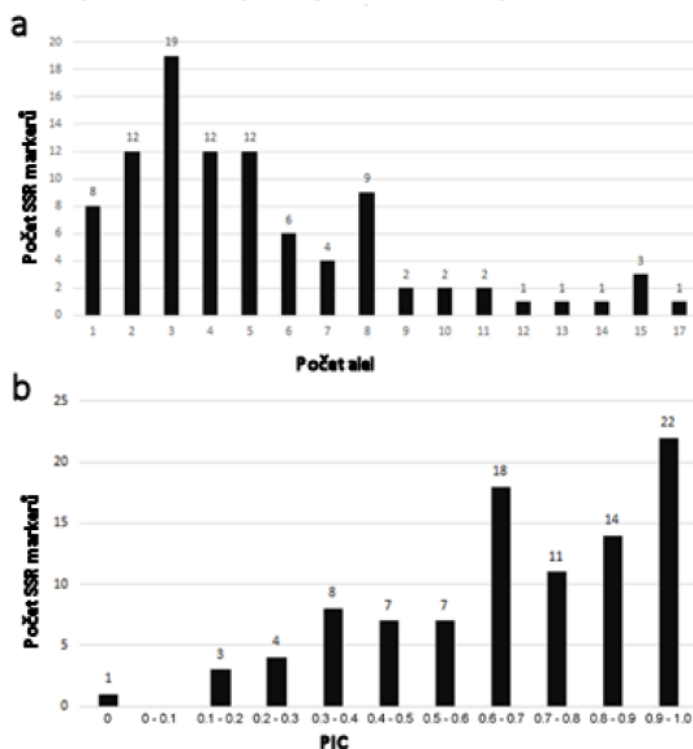
Z 96 vybraných SSR lokusů nebyly pouze u jednoho (SSR-TP_g53834.t1.cds1) získány žádné PCR produkty. Celkem 95 markerů SSR bylo analyzováno u 50 odrůd jetele lučního. Monomorfní SSR marker SSR-TP_g20700.t1.cds3 byl amplifikován u všech 50 odrůd. 15 odrůd mělo produkty amplifikace ve všech 95 lokusech SSR, nejnižší počet (4 lokusy) byl amplifikován u odrůdy Radegast. Počet alel v lokusech se pohyboval od 1 do 17 (Obr. 1a). Hodnoty PIC pro SSR markery byly v rozmezí 0 až 0,986 a průměrnou hodnotou 0,679 a mediánem 0,693. Nejvyšší diverzita byla zjištěna pro SSR s trinukleotidovými motivy s PIC v rozmezí 0,180 až 0,986 (Tab. 1). 22 SSR bylo vysoce polymorfních s PIC > 0,9 a 72 SSR mělo PIC > 0,5 (Obr. 1b). PIC je obvykle využíván v genetice rostlin k odhadu úrovně polymorfismu markerů. U leguminóz byl využit např.

k hodnocení polymorfismu 48 SSR markerů *Vigna radiata* (Shrivastava et al. 2014), 45 SSR markerů *Trifolium alexandrinum* (Verma et al. 2015) a 36 SSR markerů *Vicia* spp. (Raveendar et al. 2015). Vysoké hodnoty PIC jsou obvykle spojené s možností dalšího využití při identifikaci odrůd nebo výběrech vhodného materiálu pro další šlechtění. Pro výpočet hodnot PIC se vyžaduje určení alelových četností ve studované populaci.

Tabulka 1: Hodnoty PIC pro validovaných 95 SSR marker s různými motivy.

Motiv repeticce	Počet SSR	Rozmezí	PIC	
			Průměr	SD
monomer	2	0.567–0.693	0.6297	0.0632
dimer	2	0.875–0.895	0.8853	0.0102
trimer	67	0.180–0.986	0.6929	0.2227
hexamer	2	0.333–0.365	0.3488	0.0160
komplexní	22	0–0.975	0.6514	0.2734

Obrázek 1: Validace 95 SSR markerů u 50 odrůd jetele lučního. Počet alel pro jednotlivé SSR markery (a) a hodnoty PIC pro SSR markery (b).



Pomocí Jaccardova a Sørensen-Dice koeficientů bylo dosaženo téměř shodného klastrování odrůd. Odrůdy tvořily klastry podle svého původu. Odrůdy Walter (CA), Concorde (US) a Makimidori (JPN) vyšlechtěné mimo Evropu vytvořily jednu skupinu, další oddělenou skupinu tvořily odrůdy Lossam (FR), Triton (SE), Essex Broad Red (GB), Gibridnij Pozdnespelyj (former SU) a Parka (PL) vyšlechtěné mimo Českou republiku. České odrůdy tvořily samostatný klastrování odrůd.

Závěr

Práce rozšířila naše znalosti o kódujících sekvencích jetele lučního na základě již získané celogenomové sekvence. Byla vytvořena kolekce 22 vysoce polymorfních SSR markerů s PIC > 0,9

a byly získány další markery s PIC > 0,5. Tyto sady budou dále rozšířeny pro aplikaci ve šlechtění jetele lučního na cílené zlepšení znaků kvality, vytrvalosti a rezistence. Společně s dalšími molekulárními postupy a dalšími jednonukleotidovými polymorfismy přispějí k implementaci genotypování do šlechtění jetele.

Literatura

- da Maia L.C., Palmieri D.A., de Souza V.Q. et al. 2008. SSR Locator: Tool for simple sequence repeat discovery integrated with primer design and PCR simulation. *Int. J. Plant Genomics* 2008: 412696.
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Report* 1: 19–21.
- De Vega J.J., Ayling S., Hegarty M. et al. 2015. Red clover (*Trifolium pratense* L.) draft genome provides a platform for trait improvement. *Sci. Rep.* 5: 17394.
- Ištvánek J., Jaroš M., Křenek A., Řepková J. 2014. Genome assembly and annotation for red clover (*Trifolium pratense*; *Fabaceae*). *Am. J. Bot.* 101(2): 327–337.
- Metzgar D., Bytof J., Wills C. 2000. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Res.* 10: 72–80.
- Raveendar S., Lee G.-A., Jeon Y.-A. et al. 2015. Cross-amplification of *Vicia sativa* subsp. *sativa* microsatellites across 22 other *Vicia* species. *Molecules* 20: 1543–1550.
- Shrivastava D., Verma P., Bhatia S. 2014. Expanding the repertoire of microsatellite markers for polymorphism studies in Indian accessions of mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Mol. Biol. Rep.* 41: 5669–5680.
- Verma P., Chandra A., Roy A.K. et al. 2015. Development, characterization and cross-species transferability of genomic SSR markers in berseem (*Trifolium alexandrinum* L.), an important multi-cut annual forage legume. *Mol. Breed.* 35: 1–14.
- Yates S.A., Swain M.T., Hegarty M.J. et al. 2014. *De novo* assembly of red clover transcriptome based on RNA-Seq data provides insight into drought response, gene discovery and marker identification. *BMC Genomics* 15: 453.

Poděkování

Tato práce byla řešena s finanční podporou projektu NAZV - QI111A019.

Kontaktní adresa:

Doc. RNDr. Jana Řepková, CSc.
Masarykova univerzita
Přírodovědecká fakulta
Ústav experimentální biologie
Kamenice 5, 625 00 Brno
Tel.: 549496895, e-mail: repkova@sci.muni.cz