



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Metodický postup chemomutagenese, vedení generací po mutaci a identifikace rostlin nesoucích mutace v genech biosyntetické dráhy alkaloidů

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV QK1810391 – Využití technik genomiky a transkriptomiky k tvorbě genových zdrojů a výchozích materiálů máku se specifickými vlastnostmi



Autoři: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., Mgr. Jiří Horáček, Ph.D.,
Ing. Eva Jozová, Ph.D., Mgr. et Ing. Ondřej Hejna, Ph.D.,
Mgr. Lenka Endlová, Ph.D., Mgr. Jiří Červeň, Ph.D.,
doc. RNDr. Petr Pečinka, CSc.

České Budějovice, 2022

**Metodický postup chemomutageneze, vedení generací po mutaci a
identifikace rostlin nesoucích mutace v genech biosyntetické dráhy
alkaloidů**

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV QK1810391 – Využití technik genomiky a transkriptomiky k tvorbě genových zdrojů a výchozích materiálů máku se specifickými vlastnostmi

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Mgr. Jiří Horáček, Ph.D.
Ing. Eva Jozová, PhD.
Mgr. et Ing. Ondřej Hejna, Ph.D.
Mgr. Lenka Endlová, Ph.D.
Mgr. Jiří Červeň, Ph.D.
doc. RNDr. Petr Pečinka, CSc.

Metodický postup chemomutagenese, vedení generací po mutaci a identifikace rostlin nesoucích mutace v genech biosyntetické dráhy alkaloidů

Vladislav Čurn et al. 2022
curn@fzt.jcu.cz

Katedra genetiky a biotechnologií, FZT JU v Českých Budějovicích, České Budějovice
www.fzt.jcu.cz, <http://biocentrum.zf.jcu.cz>

Vypracováno za podpory projektu NAZV QK1810391 – Využití technik genomiky a transkriptomiky k tvorbě genových zdrojů a výchozích materiálů máku se specifickými vlastnostmi

Recenzenty metodiky byli:

doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.

Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Ing. Petr Zehnálek

ÚKZUZ, Hradec nad Svitavou

Text: ©2022 Čurn V. a kol.
Vydáno bez jazykové úpravy
ISBN: 978-80-7394-972-3



Obsah

Uvedení problému a cíl metodiky.....	5
Vlastní popis metodiky	7
Úvod.....	7
Postup chemomutageneze, vedení generací po mutaci a molekulární analýzy	11
Chemomutageneze	11
Dopěstování ovlivněného materiálu a vedení TILLING populace	12
Hodnocení TILLING populace – obsah alkaloidů	13
Hodnocení TILLING populace – detekce mutací v genech biosyntetické dráhy alkaloidů.....	15
Hodnocení TILLING populace – hodnocení změn v genetické struktuře rostlin po mutaci.....	19
Příklady výstupů	21
Srovnání novosti postupů	27
Popis uplatnění metodiky	27
Ekonomické aspekty	28
Seznam použité literatury	29
Seznam publikací předcházející metodice	31

Uvedení problému a cíl metodiky

Poměrně významným problémem současného šlechtění je nedostatečný rozsah genetické diverzity a s tím související omezená dostupnost zajímavých genetických zdrojů, donorů požadovaných znaků a vlastností. K ochuzování a zužování genetické diverzity dochází v souvislosti s rozvojem moderního šlechtění počátkem 20. století vlivem intenzivního šlechtění zaměřeného na omezený rozsah vlastností a vlivem pěstování vysoce výkonných, ale často poměrně blízce příbuzných odrůd zemědělských plodin.

Neustálé zužování počtu pěstovaných druhů a odrůd a jejich plošné rozšiřování vedlo ke genetické erozi, částečné či úplné ztrátě krajových odrůd a zužování genetické diverzity. Následky nedostatečné genetické diverzity lze spatřovat ve ztrátě významných genů, genetické zranitelnosti a rovněž v omezení genetického zisku u kvantitativních znaků, které je jen obtížně překonatelné. Zranitelnost a negativní dopad velmi zúžené genetické diverzity lze dokumentovat na příkladu kukuřice či citrusů, kdy v souvislosti s masovým používáním T-typu cytoplasmatické pylové sterility v produkci hybridů kukuřice došlo počátkem 70. let v USA k výraznému snížení výnosů v důsledku rozšíření agresivního kmene *Helminthosporium maydis*. Pěstování jen několika odrůd citrusů na Floridě vedlo k rozšíření mutantního silně virulentního kmene *Xanthomonas campestris* a k následné epidemii a zničení 20 milionů citrusů (Chloupek 2008).

U intenzivně šlechtěných plodin klesá rozsah genetické variability a morfologické znaky již nestačí k identifikaci nově vznikajících odrůd a k definování jejich fenotypové variability kvůli vlivům mnoha faktorů prostředí. To se odráží i v často problematickém používání testů DUS pro popis a právní ochranu odrůd (Fu et al. 2006; Yu a Chung 2021).

Snahou šlechtitelů pak je rozšíření stávající genetické diverzity, např. využitím krajových odrůd, vzdálenou hybridizací s taxonomicky více vzdálenými donory, ale i aplikací *in vitro* technik a cílené mutagenese.

Cílem metodiky je uvést přesný metodický návod pro provedení chemomutagenese, vedení mutantních generací (M1-M2) a detekci změn ve struktuře genomu pomocí molekulární analýzy.

Vlastní popis metodiky

Úvod

Mutační šlechtění je šlechtitelská metoda, která využívá rostliny s mutovanými znaky a vlastnostmi vzniklými spontánně nebo i uměle a tyto slouží jako výchozí materiál k šlechtitelskému zpracování. Mutacemi (z latinského *mutare* - měnit) označujeme náhlé, neusměrněné, ale dědičné změny znaků a vlastností. Jde o změny vzniklé na různých úrovních genetické informace, dědičně předávané do dalších generací. Mutagenese, kterou rozumíme umělé vyvolávání mutačních změn, pomáhá rozšiřovat genetickou proměnlivost rostlin. Může přispět k rozšíření genetických zdrojů pro plnění úkolů šlechtitelského programu. Mutagenese ve šlechtění plodin se většinou využívá v těch případech, kdy křížením a jinými metodami nelze dosáhnout žádaného cíle.

Mutační šlechtění jako šlechtitelská metoda má svoji historii. Základem jsou práce H. J. Mullera (1927) a J. L. Stadlera (1928) na ječmeni a kukuřici. Rozsáhlé využívání umělých (indukovaných) mutací ve šlechtění je spojeno s pracemi H. Gaula (1963) a A. Gustafssona (1968). Období 50. a 60. let 20. století je začátkem mutačního šlechtění ve světě. V ČR se v 60. - 70. letech rozvíjelo využívání účinku ionizačního záření na rostliny, a to byl i začátek využívání mutací ve šlechtění. Ke konci tohoto období došlo ke stagnaci v rozvoji metody. V 80. letech se pak začala využívat mutagenese na úrovni explantátových a buněčných kultur (Graman a Čurn 1998).

V praktickém šlechtění je využití klasické mutagenese omezené a na základě mutagenese využitím přímých mutací bylo vyšlechtěno jen několik nových odrůd. V našich podmínkách je velmi známá odrůda Diamant, radiomutant odrůdy Valtický, která se vyznačovala zkráceným stéblem, odolností k poléhání, zvýšeným výnosem zrna a dobrou sladovnickou jakostí. Dala základ vyšlechtění odrůd jarního ječmene tzv. "diamantové řady".

Mutagenese se uplatňuje hlavně u samosprašných druhů, neboť se u nich snáze uchovávají recesivní mutace, které se vyskytují ve většině případů. Ve šlechtění rostlin měly a mají největší význam genové (bodové) mutace a mutace genomové, tj. kvantitativní změny v počtu chromozomů. U rostlin pak převažuje využívání chemomutagenese a z hlediska indukce vysoké četnosti bodových mutací u rostlin jsou významnými chemomutageny alkylační činidla - N-nitrososloučeniny. Často využívaný etylmetansulfonát u rostlin způsobuje primárně bodové mutace na

různých místech genu, úplnou ztrátu genové funkce, změny v načasování exprese mRNA nebo změny v aktivitě proteinů (Řepková a Relichová 2001).

Účinek mutagenu závisí na řadě činitelů vnitřních a vnějších. Citlivost rostlin ve šlechtitelské praxi se vyjadřuje tzv. radiocitlivostí, což je schopnost odolávat na letální působení mutagenu. Jako kritická dávka se udává LD50, což je dávka umožňující přežití 50 % ovlivněných rostlin. Na účinek mutagenů má vliv řada faktorů, např. koncentrace O₂ v prostředí, vlhkost, teplota, ontogenetická fáze rostlin, vlhkost semen. Ovlivněný organizmus reaguje fyziologickou reakcí a změnou genetické informace. Objevují se také efekty stimulace, modifikace a morfózy a také úhyn rostlin, a to v závislosti na dávce záření či koncentraci mutagenu.

Vzhledem k obtížné detekci mutací a ne zcela úspěšnému využití metod indukované mutagenese ve šlechtění rostlin se od roku 2000 začal využívat přístup molekulární neboli reverzní genetiky prostřednictvím metody TILLING (*Targeting Induced Local Lesions In Genome*, McCallum et al. 2000a). TILLING je metoda, která umožňuje řízenou identifikaci mutací specifického genu a kombinuje standardní a účinnou techniku mutagenese za použití chemomutagenu s citlivou technikou screeningu DNA, která identifikuje jednotlivé bodové mutace v cílovém genu. Metoda je založena na specifické amplifikaci pomocí polymerázové řetězové reakce a tvorbě heteroduplexů v místě polymorfizmu. Cílová místa heteroduplexu s chybným párováním bazí v důsledku jednonukleotidových polymorfizmů jsou štěpena endonuklázou *CelI* a jednotlivé fragmenty odpovídají místům polymorfizmu mezi sledovanými jedinci (McCallum et al. 2000b; Colbert et al. 2001). Modernější postup spočívá v amplifikaci genů zájmu, sekvenování ampikonů a identifikaci bodových mutací (Tsai et al. 2011). Rostliny nesoucí bodové mutace v genech zájmu jsou dopěstovány a v potomstvu je sledován fenotypový projev mutace (reverzní genetik – od genu k fenotypu). Následně jsou selektovány rostliny s odlišným fenotypovým projevem. Tento přístup umožňuje účinnou selekci nových genotypů a jejich využití ve šlechtění (Slade et al. 2005).

Změny v genetické struktuře výchozí a mutantní populace lze sledovat i na základě analýzy mikrosatelitů. Mikrosatelity (SSR markery) představují nejkomplexnější markerový systém používaný pro hodnocení genetické diverzity a genetické struktury, protože mají mnoho žádoucích vlastností, jako je hojná distribuce v genomu (Kalia et al. 2011), schopnost tvořit multiplexy a kodominance, tj. schopnost rozlišovat mezi homozygoty a heterozygoty (Guichoux et al. 2011). Kombinace morfologických a molekulárních markerů je navíc vynikající technikou pro výběr optimálních genotypů pro šlechtění při zachování adekvátní genetické diverzity (Heffner et al. 2009; Varshney 2021).

Genomics-led predictive mutation breeding (TILLING)

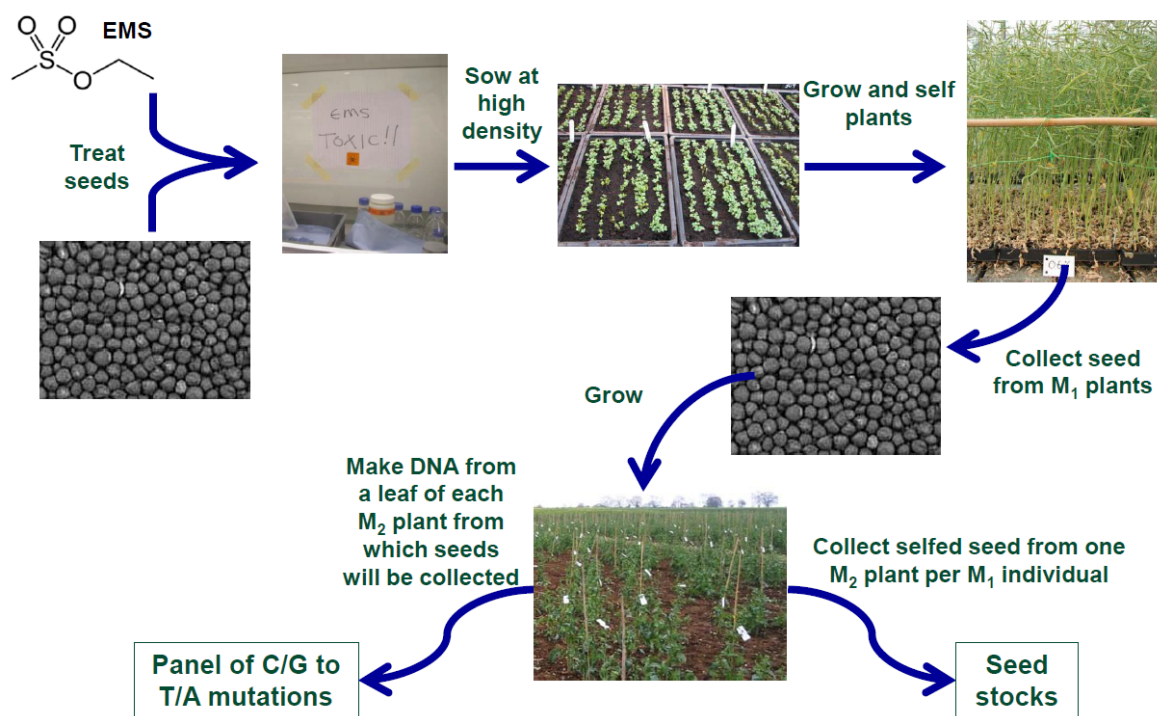


Schéma využití metody TILLING ve šlechtění rostlin (poskytnuto prof. Ianem Bancroftem).

Postup chemomutagenese, vedení generací po mutaci a molekulární analýzy

Chemomutagenese

Semena máku jsou vystavena účinkům mutagenní látky EMS (etylmethansulfonát). Jedná se o mutagenní sloučeninu produkující náhodné mutace v genetickém materiálu substitucí nukleotidů (Sega 1984).

Osivo máku pochází z izolovaných, tj. samosprášených rostlin, tak aby byla zajištěna homozygotnost a homogenita ošetřovaného vzorku semen. Vlastní ošetření osiva se provádělo ve dvou variantách koncentrace EMS.

Semena máku se před vlastní mutagenézí nechají nabobtnat 18 hodin ve vodě. Po této době se přebytečná voda slije přes sítko a k osivu se přidá roztok EMS o různých koncentracích (např. 0,5 %, 1 % a 1,5 % EMS). Baňky se zabalí do alobalu (zamezení přístupu světla – EMS se na světle rozkládá) a umístí se na třepačku.

EMS se nechá působit po dobu 1 respektive 2 hodin při laboratorní teplotě. Po této době se roztok EMS slije a nádoba s osivem se umístí pod proud tekoucí vody po dobu 30 minut, aby došlo k důkladnému vymytím mutagenu. U máku (či jiného rostlinného materiálu s malými semeny) je nutné zabezpečit osivo před vypláchnutím z nádoby – například přetažením silonové sítky zabezpečené gumičkou. Vše stačí provádět nesterilně. Takto ošetřené osivo je připravené k výsevu do půdy.

U chemomutagenem ošetřovaného osiva se před výsevem hodnotí klíčivost. Ošetřené osivo je přeneseno na navlhčený filtrační papír a je proveden standardní test klíčivosti. Jako ideální hodnota je považováno vyklíčení 75 % semen.

Použité přístroje a pomůcky:

- digestoř
- třepačka
- 90mm Petriho misky
- pinzeta
- kultivační box/fytotron

Chemikálie:

- EMS (etylmethansulfonát) - 0,5%, 1% a 1,5% roztok
- destilovaná voda

Dopěstování ovlivněného materiálu a vedení TILLING populace

Ovlivněné osivo je po vymytí mutagenu uchováno ve zkumavkách s vodou. Osivo je vyseto (vylito) do zahradnického substrátu v truhlících a po vzejití jsou rostlinky přepikýrované do záhonů.

Všechny dopěstované rostliny je nutné izolovat technickými izolátory proti cizosprášení a po dozrání jsou individuálně sklizené tobolky z jednotlivých rostlin.

Použité přístroje a pomůcky:

- skleník
- pokusný pozemek
- výsevní substrát
- technické izolátory

Chemikálie:

- agrochemikálie a hnojiva pro ošetřování pokusu

Hodnocení TILLING populace – obsah alkaloidů

U získaných rostlin M2 generace je provedena NIRS analýza obsahu a složení alkaloidů. Pro tvorbu FT-NIR kalibračních modelů byly použity vzorky makoviny materiálů ze šlechtitelského programu a kolekce genových zdrojů (GZ) olejnin kolekce Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity analyzovaných laboratorní referenční metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Kalibrační modely pro kvantitativní analýzu příslušných analytů byly vyvinuty pomocí chemometrického programu Thermo Scientific TQ Analyst (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Na základě získané závislosti mezi spektrální informací a složením vzorku byly vytvořeny pro každou kvantitativní analýzu zvlášť kalibrační modely pomocí algoritmu Partial Least Squares (PLS) bez derivace. K vývoji kalibračních modelů pro jednotlivé analyty byly využity rozdílné spektrální intervaly. Pokud vzorky vykazovaly velkou odchylku mezi naměřenými a predikovanými hodnotami nebo objevila-li se spektrální odchylka ve změřeném spektru, byly ze souboru vyloučeny pomocí diagnostik Spectrum Outlier, Leverage a Principal Component Scores. Byla vyjádřena standardní chyba kalibrace (RMSEC) a korelační koeficient kalibrace (R). Pro ověření spolehlivosti, robustnosti a přesnosti kalibračních modelů byla použita úplná křížová a externí validace. Při křížové validaci se vycházelo ze stejné sady vzorků jako při kalibraci, byla vyjádřena chyba křížové validace (RMSECV) a hodnota korelačního koeficientu křížové validace (RCV). Externí validace byly provedeny softwarově, automatickým výběrem validačních standardů z kalibračního souboru. Při výpočtu chyby predikce byly validační standardy z kalibračního souboru vyloučeny. Jejich počet byl vždy roven přibližně 10 procentům z celkového počtu standardů zadaných a rovnoměrně pokrývaly kalibrační intervaly. Byla vyjádřena chyba predikce (RMSEP) a hodnota korelačního koeficientu predikce (RP).

Vzorky a jejich příprava:

Vzorky makoviny byly pomlety na mlýnku (typ IKA TUBE-MILL control). Doba mletí činila 40 s při otáčkách 22 000 rpm. Po mletí se vzorek přesil přes síto s velikostí otvoru 0,5 nebo 1 mm, tak, aby ve vzorku nezůstávaly větší úlomky makoviny. Následně byly vzorky homogenizovány důkladným promícháním. Je nutno dosáhnout maximální homogenity vzorků, protože nedostatečná homogenita může významně ovlivnit přesnost a správnost NIR analýzy. Upravený a dokonale promíchaný vzorek se rovnoměrně nadávkuje do měřicí kyvety v takovém množství, aby bylo možné kyvetu uzavřít. Nadávkované vzorky se umístí do měřicí části přístroje a nasnímá se jejich NIR spektrum. Každý vzorek se měří dvakrát (ve dvou kyvetách).

FT-NIR spektroskopie:

Měření vzorků probíhá na spektrometru např. FT-NIR Antaris II (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) na integrační sféře v režimu reflektance ve spektrálním rozsahu 10 000 – 4 000 cm^{-1} pomocí softwaru Omnic for Antaris. Vzorky jsou proměřovány v rotačních kruhových kyvetách o průměru 30 mm a výšce 15 mm, které jsou opatřeny křemenným dnem propustným pro NIR záření. Výsledné spektrum každého vzorku je získáno zprůměrováním ze 128 scanů s rozlišením 2 cm^{-1} .

Použité přístroje a pomůcky:

- laboratorní mlýnek
- FT-NIR spektrometr a software
- kruhové kyvety s křemenným dnem

Hodnocení TILLING populace – detekce mutací v genech biosyntetické dráhy alkaloidů

U získaných rostlin M2 generace je provedena molekulární analýza a detekce mutací v genech biosyntetické dráhy alkaloidů.

Na základě sekvenovaného genomu máku byly vybrány geny, vhodné pro sledování mutace po chemické mutagenезi. Byly vybrány tři geny, které nejsou v genomu duplikovány (a případná mutace by tak nemusela mít inhibiční účinek), zároveň geny, které jsou přibližně stejně dlouhé, aby nedocházelo k disproporcii při sekvenačním ověřování. Byla optimalizována metoda izolace DNA tak, aby mohla probíhat z 96 vzorků rostlin najednou.

Semena máku setého byla vyseta do pěstebního květináče s 25 g živného substrátu a pěstovány v kultivačních boxech při režimu dlouhého dne (16 hodin světlo/8 hodin tma) při 23 °C a světelné intenzitě 150 $\mu\text{mol}\times\text{m}^{-2}\times\text{s}^{-1}$. Rostliny byly zalívány každý druhý den 5ml odstáté vodovodní vody.

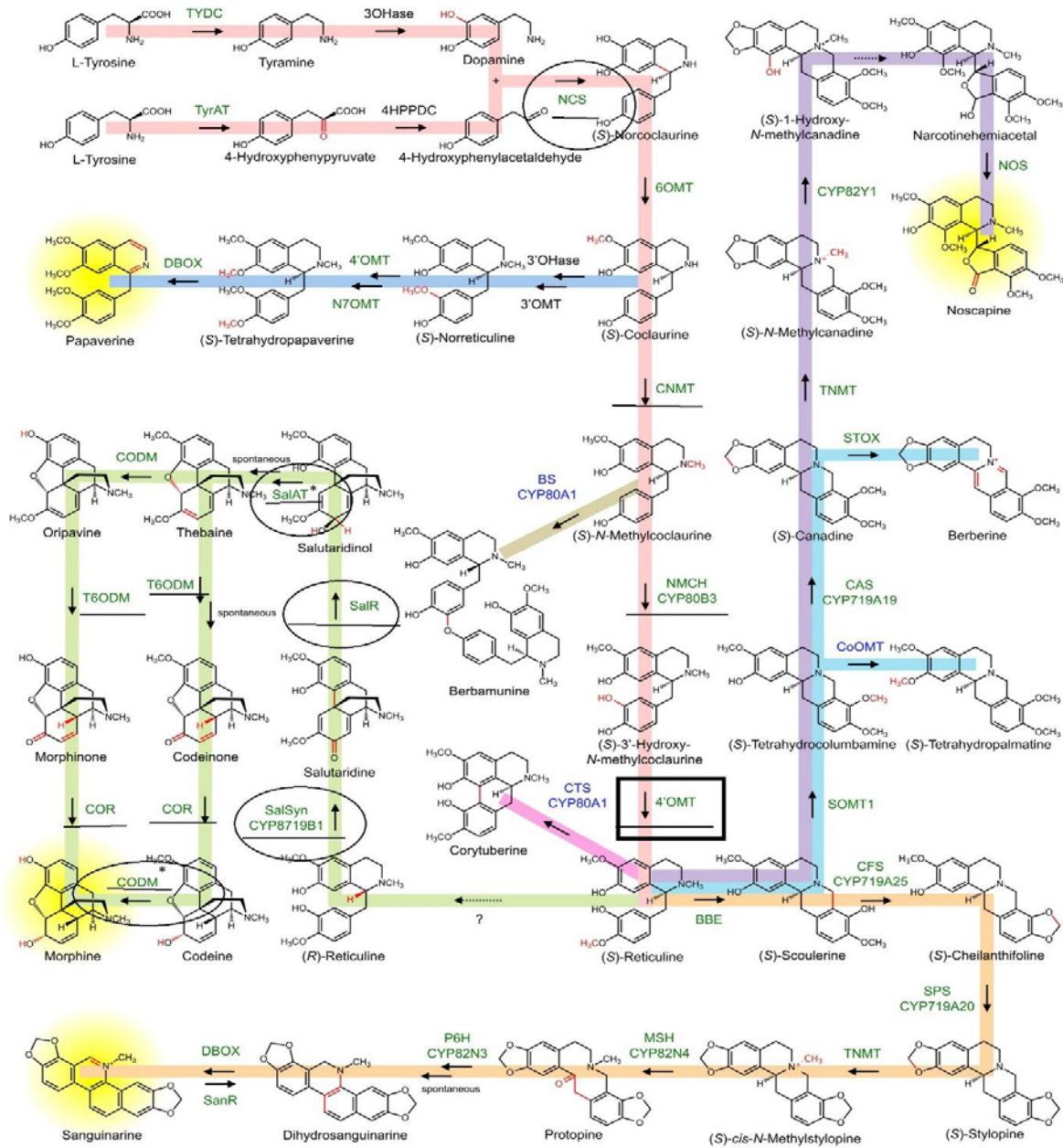
DNA byla izolována s využitím kitu NucleospinPlant 96 (Macherey Nagel, Německo), případně EligenePlant (Elisabeth Pharmacon, Česká republika).

Vzorky rostlin jsou izolovány přímo v mikrotitrační destičce po 96 vzorcích tak, aby mohla být vyizolovaná DNA přímo pipetována do PCR reakce, která poslouží pro přípravu sekvenačních reakcí. Celý proces izolace DNA a následné PCR je tak významně časově zkrácen. V případě nižšího počtu vzorků, byla využita individuální izolace v 2ml zkumavkách, které jsou součástí EliGene Plant kitu.

Izolovaná DNA slouží jako templát pro PCR reakci. Pro cílové geny metabolické dráhy alkaloidů jsou použity primery obohacené o sekvence umožňující připojení barcodů, což mnohonásobně zvýší množství screenovaných rostlin pro detekci mutací a během PCR reakce je DNA jedinečně označena (barkódována). Vzhledem k cíli analýz – detekce mutací je nutno použít specifické DNA polymerázy pro high-fidelity PCR (Hi-Fi PCR). Získané amplikony jsou sekvenovány a po vyhodnocení sekvenačních dat jsou identifikované rostliny nesoucí mutace.

Izolovaná DNA slouží jako templát pro PCR reakci. Pro cílové geny metabolické dráhy alkaloidů jsou použity primery, které byly navrženy, aby pokryly geny v celé jejich délce. Primery těchto genů jsou na konci obohaceny o sekvence, které slouží pro navázání barcodů (SMRTbell barcoded adapter plate 2.0 (v současnosti je k dispozici verze 3.0), PacificBiosciences, USA). Tyto primery musí být upravené o

blokující skupinu (modifikace C6-amino, Elisabeth Pharmacon, Česká republika). Využití barcodů mnohonásobně zvýší množství screenovaných rostlin pro detekci mutací a během PCR reakce je DNA jedinečně označena (barkódována). Specificita PCR reakcí a čistota pro sekvenování byla ověřena pomocí 1% agarózové elektroforézy při 7,2 V/cm. Vzhledem k cíli analýz – detekce mutací je nutno použít specifické DNA polymerázy pro high-fidelity PCR (Hi-Fi PCR). Získané amplikony jsou sekvenovány a po vyhodnocení sekvenačních dat jsou identifikovaná rostliny nesoucí mutace. Pro analýzu celých genů je vhodné použít sekvenování s dlouhou délkou čtení (např. v našem případě PacBio Sequel SMaRT). Tyto služby poskytují různé komerční laboratoře (v našem případě DNALink, Jižní Korea).



Obrázek 1: Biosyntetická dráha alkaloidů u máku (Beaudoin and Facchini 2014; Červeň et al. 2021).

Tabulka 1: Sekvence primerů pro vybrané geny biosyntetické dráhy alkaloidů.

OLIGONUKLEOTID	KAT.ČÍSLO	OZNAČENÍ	SEKVENCE
C6-Amino 2 OD (40 nmol)	ol.1.19	SALAT-F-C6	gcagtcgaacatgtagctgactcaggtcacaaagaggggtattctattcgggtga
C6-Amino 2 OD (40 nmol)	ol.1.19	SALAT-R-C6	tggatcacttgtgcaagcatcacatcgtagGGATCATCTACCCGAAAACAACC
C6-Amino 2 OD (40 nmol)	ol.1.19	NCS2-F-C6	gcagtcgaacatgtagctgactcaggtcacAAACACTCGGAACCGCAAGT
C6-Amino 2 OD (40 nmol)	ol.1.19	NCS2-R-C6	tggatcacttgtgcaagcatcacatcgtagGAAAATCCTGAACCTTAGAGTGGA
C6-Amino 2 OD (40 nmol)	ol.1.19	CNMT-F-C6	gcagtcgaacatgtagctgactcaggtcacGCTTGGGTTGATACCGGACC
C6-Amino 2 OD (40 nmol)	ol.1.19	CNMT-R-C6	tggatcacttgtgcaagcatcacatcgtagCGATGGTAAACAACACAAAACG

Rostliny, u nichž jsou detekované mutace, jsou vybrány jako kmenové matky. Potomstva těchto rostlin jsou vyseta, rostliny jsou zaizolovány a jsou získána semena generace M3. Rostliny z těchto semen jsou vysety a kultivovány pro účely izolace DNA, sekvenování a potvrzení udržení mutací v další generaci.

Použité přístroje a pomůcky:

- sada automatických pipet
- vortex
- analytické váhy
- magnetická míchačka
- pH metr
- mrazák -20 °C
- centrifuga
- homogenizátor na 96 jamkové destičky
- inkubátor zkumavek/96 jamkových destiček na 60°C
- PCR cykler

Chemikálie:

- DNA extrakční pufr
- high-fidelity PCR master mix
- primery

Hodnocení TILLING populace – hodnocení změn v genetické struktuře rostlin po mutaci

U získaných rostlin M2 generace jsou provedeny molekulární analýza a hodnocení změn v genetické struktuře po mutačním zásahu.

Analýzy probíhají ze semen rostlin M2 generace. Semena jsou vyseta do výsevního substrátu. Rostliny se nechají vyrůst v laboratorních podmínkách do velikosti děložních lístků, přičemž tento proces trvá přibližně 14 dní. Po této době jsou odebrány lístky individuálně z každé rostliny do papírových sáčků a vzorky jsou uloženy cca 7 dní v silicagelu. Díky tomu dojde k šetrnému vysušení materiálu. Po jednom týdnu jsou vysušené rostlinky umístěny do 2 ml mikrozkušavky s přidáním skleněné kuličky a materiál je homogenizován v automatickém homogenizátoru, např. Beat Ruptor 96 (Omni International Inc., USA) po dobu 30 sec při maximální frekvenci.

Z takto připraveného homogenizovaného materiálu je izolována DNA pomocí modifikované metodiky pro izolaci DNA z rostlinného materiálu (Doyle, 1991). Tento typ izolace je pro tento typ analýz ověřený a vhodný, díky vysoké koncentraci a čistotě DNA (Jozová et al. 2020).

Jako marker pro identifikaci mutantního osiva jsou použity specifické mikrosatelitové markery: Psom4, Psom17_B, OPEST026_B, OPEST081c, OPEST053, OPEST106, SSR001, SSR57_A, SSR57_B, psSSR69 (Ondreičková 2017, Vašek 2020). Při analýze pro mák je postupováno podle metodiky Jozová a kol. (2020). Výsledky PCR amplifikace jsou vizualizovány pomocí fragmentační analýzy díky fluorescenčně značeným forward primerům. Vyhodnocení probíhá v programu GeneMapper TM (ThermoFisher Scientific, USA).

Použité přístroje a pomůcky:

- laboratorní homogenizátor
- vodní lázeň
- sada automatických pipet
- vortex
- analytické váhy
- magnetická míchačka
- pH metr

- mrazák -20 °C
- centrifuga
- PCR cykler
- termoblok
- chladicí blok
- genetický analyzátor pro fragmentační analýzu

Chemikálie:

- DNA extrakční pufr (CTAB)
- PCR master mix
- PCR voda
- primery
- fluorescenčně značený primer
- DMF
- polymery a pufr pro fragmentační analýzu
- led

Příklady výstupů



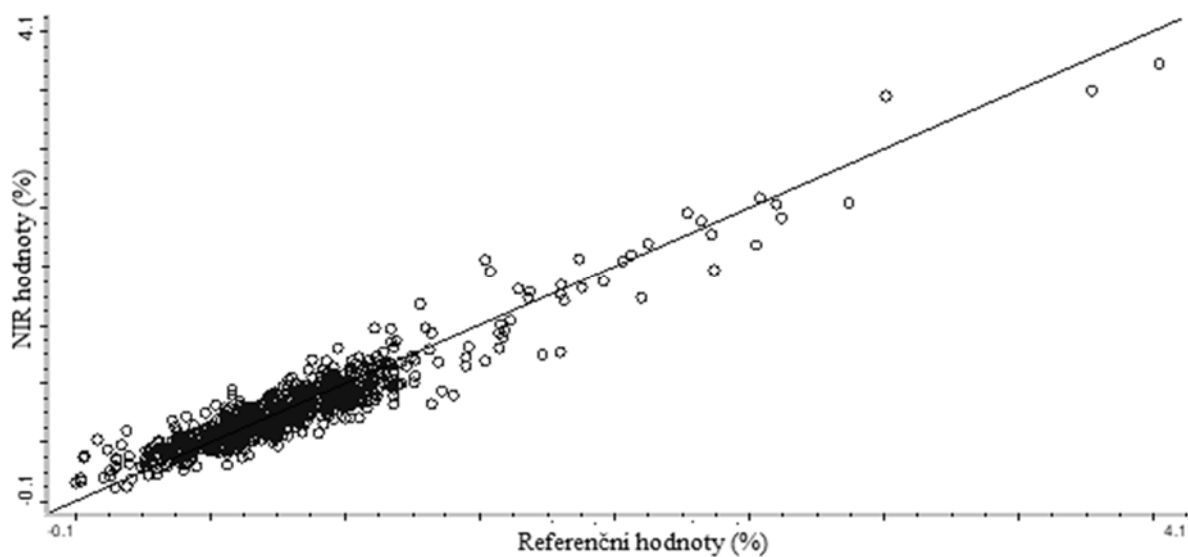
Obrázek 2: Rostliny máku z osiva ovlivněného mutagenem před výsadbou do záhonů.



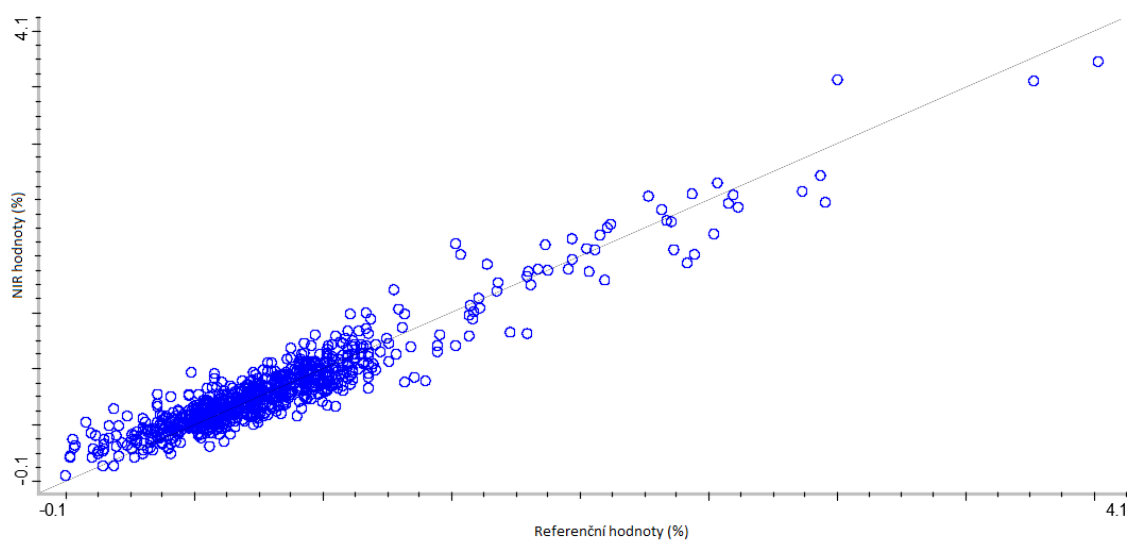
Obrázek 3: Rostliny máku z osiva ovlivněného mutagenem po výsadbě do záhonů.



Obrázek 4: Rostliny máku z osiva ovlivněného mutagenem zaizolované proti cizosprášení.



Obrázek 5: PLS kalibrační model pro stanovení obsahu morfinu. RMSEC = 0,113, R = 0,931.



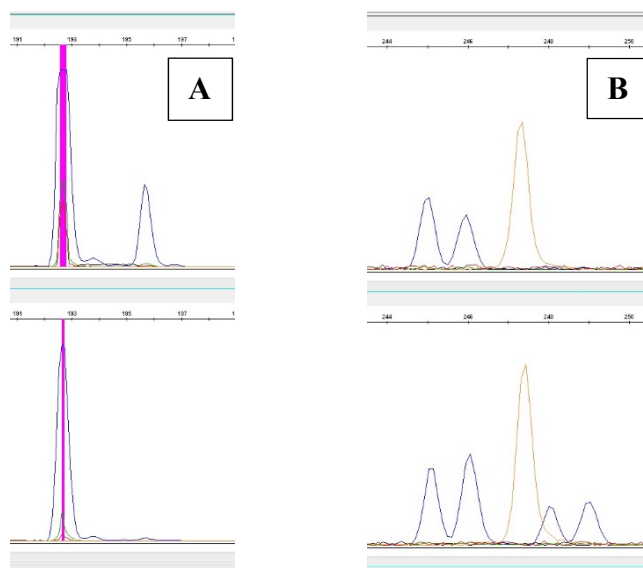
Obrázek 6: Křížová validace modelu pro stanovení obsahu morfinu. RMSECV = 0,193, RCV = 0,904.

Gene ID	Gene name	Shortcut	CDS length	Chromosome	Location	whole gene length
113321914	salutaridine synthase	SalS	1518	11	NC_039368.1 (128249007..128250966)	1959
113339274	salutaridine synthase-like	SalS	1521	Unplaced	NW_020631041.1 (8601134..8603100)	1966
113322262	salutaridine reductase	SalR	939	11	NC_039368.1 (128330274..128331968)	1694
113340174	salutaridine reductase	SalR	942	Unplaced	NW_020631041.1 (8574428..8576190)	1762
113321357	salutaridinol 7-O-acetyltransferase	SalAT	1425	11	NC_039368.1 (128319439..128321744)	2305
113347789	thebaine 6-O-demethylase	T6ODM	1095	2	NC_039359.1 (59955747..59958211)	2464
113347787	thebaine 6-O-demethylase-like	T6ODM	1095	2	NC_039359.1 (59933446..59935978)	2532
113347785	thebaine 6-O-demethylase-like	T6ODM	1095	2	NC_039359.1 (59911109..59913641)	2532
113311621	codeine O-demethylase	CODM	1083	1	NC_039358.1 (198606455..198608421)	1966
113311630	codeine O-demethylase	CODM	1083	1	NC_039358.1 (198677764..198679676)	1912
113328201	NADPH-dependent codeinone reductase 1-5	COR	966	Unplaced	NW_020619603.1 (7219550..7221550)	2000
113294469	NADPH-dependent codeinone reductase 1-4	COR	966	7	NC_039364.1 (2467198..2469038)	1840
113340282	S-norococlaurine synthase 2	NCS2	2103	Unplaced	NW_020631041.1 (12957304..12960215)	2912
113283898	(RS)-norococlaurine 6-O-methyltransferase	6OMT	1041	5	NC_039362.1 (183999440..184000794)	1355
113294670	(S)-coclaurine N-methyltransferase	CNMT	1056	7	NC_039364.1 (4136348..4138555)	2208
113314340	(S)-N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase	NMCH	1464	1	NC_039358.1 (208684986..208686784)	1799
113328451	(S)-N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase	NMCH	1467	Unplaced	NW_020619603.1 (9494942..9496974)	2033
113283892	(S)-N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase	NMCH	1464	5	NC_039362.1 (183738532..183740333)	1802
113339850	3'-hydroxy-N-methyl-(S)-coclaurine 4'-O-methyltransferase 2	4OMT	1074	Unplaced	NW_020631041.1 (11170945..11172437)	1493
113327792	3'-hydroxy-N-methyl-(S)-coclaurine 4'-O-methyltransferase 1	4OMT	1065	Unplaced	NW_020619603.1 (9452525..9454113)	1589

Tabulka 2: Geny biosyntetické dráhy alkaloidů u máku.

Gen	Pozice	Typ mutace
CNMT	1205	SNP A->G
CNMT	1211	SNP T->A
CNMT	1256	SNP A->T
CNMT	1456	SNP A->T
CNMT	1695	SNP G->A
SalAT	2011	INS 30nt

Tabulka 3: Souhrn detekovaných mutací v různých rostlinách odrůdy OPP19.



Obrázek 7: Ukázka amplifikace mikrosatelitových markerů. Obrázek 7A zobrazuje velikost alel pro mikrosatelitový primer OPEST106. Na spodní části obrázku je zobrazena alela u kontrolního vzorku odrůdy OP-P-19 o velikosti 192 bp. V horní části je vzorek č. 1/137, u kterého jsou jasně patrné dvě alely o velikosti 192 a 195 bp. Obrázek 1B zobrazuje velikost alel pro mikrosatelitový primer OPEST026_B. Na horní části obrázku je kontrolní vzorek odrůdy Ametizst s velikostí alel 245, v dolní části je ošetřený vzorek, u kterého se amplifikovaly alely o velikostech 245 a 249 bp.

druh	genotyp	% EMS	počet analyzovaných potomstev	geneticky odlišných	% odlišnosti	variabilních markerů
<i>Papaver</i>	OP-P-19	1	79	8	10,1	7 z 11 *
<i>somniferum</i>	Ametizst	1	60	4	6,7	5 z 12 *
celkem			139	12	8,4	

Tabulka 4: Charakteristika genetické odlišnosti.

* U máku nedochází vždy k amplifikaci všech markerů u jednotlivých odrůdy, proto je celkový počet markerů odlišný.

Srovnání novosti postupů

Předkládanou metodiku s názvem “Metodický postup chemomutageneze, vedení generací po mutaci a identifikace rostlin nesoucích mutace v genech biosyntetické dráhy alkaloidů“ lze hodnotit jako novou metodiku, neboť v současné době není v šlechtitelské praxi k dispozici ucelená metodika pro aplikaci metody TILLING u máku setého. Dosud dostupné informace jsou jen dílčí a rozptýlené ve vědeckých publikacích a monografiích. Navíc se tyto informace týkají jiných plodin, než je mák, *Papaver somniferum*. Komplexní metodický postup tedy k dispozici není.

TILLING je metoda umožňující řízenou identifikaci mutací zájmového genu a kombinuje standardní a účinnou techniku mutageneze za použití chemomutagenu s citlivou technikou screeningu DNA pomocí sekvenování amplikonů, která identifikuje jednotlivé bodové mutace v cílovém genu. Rostliny nesoucí bodové mutace v genech zájmu jsou dopěstovány a v potomstvu je sledován fenotypový projev mutace. Tato metoda představuje aplikaci principu reverzní genetiky – od genu k fenotypu – ve šlechtění rostlin. Potenciál využití tohoto metodického postupu lze spatřovat v rychlé detekci rostlin nesoucí mutace v zájmových genech. Limity pak představuje požadavek na specifické přístrojové vybavení a vlastní práci s chemomutageny. Je třeba také zmínit, že bodové mutace v genech se nutně nemusí projevit na úrovni fenotypu a vybrané mutantní rostliny je nutno prověřovat i z hlediska jejich fenotypového projevu. Předkládaná metodika pak popisuje všechny kroky chemomutageneze, vedení generací po mutaci a metody molekulární analýzy a detekce mutací.

Popis uplatnění metodiky

Využití metodiky pro aplikace metodického postupu TILLING je na šlechtitelských pracovištích, pro které využití tohoto postupu může vést k získání nových donorů požadovaných znaků a vlastností, k obohacení a rozšíření genetické diverzity používaných genetických zdrojů a jejich začlenění do šlechtitelského programu. Metodika v první části zahrnuje teoretický úvod do problematiky. V praktické části jsou uvedeny přesné protokoly chemomutageneze, kultivaci rostlin po mutačním zásahu a protokoly molekulárních analýz pro detekci rostlin nesoucích mutace v zájmových genech.

Tato metodika byla vyvinuta a optimalizována pro přesnou a spolehlivou detekci mutací, resp. rostlin nesoucích mutace v genech řídících fenotypové znaky, na které je zaměřeno šlechtění. To je zásadní posun oproti standardně prováděnému

mutačnímu zásahu a aplikace principu reverzní genetiky je velmi účinným nástrojem ve šlechtění rostlin. Právě možnost cíleného výběru šlechtitelských materiálů s genetickou predispozicí pro danou vlastnost je naprosto klíčová pro úspěšné šlechtění rostlin. Tato metodika pak může umožnit přenos znalostí a postupů z akademických pracovišť do běžného provozu např. šlechtitelských laboratoří a pracovišť. Uživatelé metodiky jsou výzkumná pracoviště, laboratoře šlechtitelských firem, které mohou dle svých laboratorních možností využít tuto metodiku pro rozšíření portfolia svých postupů a služeb. Metodika bude uplatněna prostřednictvím biotechnologické firmy OSEVA PRO s.r.o. S tímto subjektem byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

Ekonomické aspekty

Analýzy popisované v této metodice mají značný ekonomický význam z pohledu šlechtitelských pracovišť. V důsledku nedostatečné šíře genetické variability genetických zdrojů je velmi obtížné či nemožné dosáhnout vytyčených šlechtitelských cílů. Metoda TILLING umožňuje velmi přesně cílenou identifikaci mutací v zájmovém genu a kombinuje standardní a účinnou techniku mutagenese za použití chemomutagenu s citlivou technikou molekulární analýzy.

Pomocí navrženého metodického postupu lze objektivně vyhodnotit přítomnost mutací v cílových genech (v metodice uvedené příklady se týkají genů metabolické dráhy alkaloidů) a selektovat genotypy máku s odlišným spektrem či kvantitou alkaloidů. Právě možnost cíleného výběru šlechtitelských materiálů je naprosto klíčová pro úspěšné šlechtění rostlin.

Pro provedení analýz je potřebné disponovat vybavenou molekulárně-biologickou laboratoří a laboratoří pro provedení mutačního zásahu. Potřebným přístrojovým vybavením je přístroj pro provedení PCR analýzy, případně genetický analyzátor (fragmentační analýzu a sekvenování je ale možné provádět formou služby na specializovaném pracovišti). Náklady na celý metodický postup pak zahrnují vlastní mutagenese, kultivaci rostlin a molekulární analýzy. Nejnákladnějším laboratorním postupem je molekulární analýza, kde typová cena PCR analýzy a sekvenování je pak na úrovni 1000 Kč. K této ceně je nutné započítat náklady na pořízení přístrojového vybavení, odpisy a energie. Pro molekulárně biologickou laboratoř uvedený metodický postup může znamenat zajímavé rozšíření portfolia nabízených služeb a ekonomický přínos v podobě zisku z prováděných analýz. V širším kontextu pak zcela zásadním přínosem pro šlechtitelské pracoviště je novošlechtění/odrůda s požadovanými vlastnostmi.

Seznam použité literatury

- Beaudoin, G. A. W., Facchini. P. J. (2014): Benzylisoquinoline Alkaloid Biosynthesis in Opium Poppy. *Planta* 240: 19–32.
- Cerven J., Matznerova A., Kundratova K., Bartas M., Pecinka P., Curn V. (2021): Mechanisms of different levels of opium composition in selected lineages of opium poppy. *Journal of International Scientific Publications: Agriculture & Food* 9: 116-122.
- Colbert, T; Till, BJ; Tompa, R; Reynolds, S; Steine, MN; Yeung, AT; McCallum, CM; Comai, L; Henikoff, S (Jun 2001). High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol.* 126: 480–484.
- Fu Y.B., Gugel R.K., Katepa-Mupondwa F. (2006): Genetic diversity of *Sinapis alba* germplasm as revealed by AFLP markers. *Plant Genet. Resour.* 4: 87–95.
- Graman J., Čurn V. (1998): Šlechtění rostlin. JU ZF, České Budějovice.
- Guichoux E., L. Lagashe, S. Wagner, P. Chaumeil, P. Léger, O. Lepais, C. Lepoitteiven, T. Malausa, E. Revardel, F. Salin, R. Patit (2011): Current trends in microsatellite genotyping. *Mol. Ecol. Resour.* 11: 591–611.
- Heffner E.L., M.E. Sorrells, J.L. Jannink (2009): Genomic selection for crop improvement. *Crop Sci.* 49: 1–12.
- Chloupek O. (2008): Genetická diverzita, šlechtění a semenářství. Academia, Praha.
- Jozová E., Stará M., Horáček J., Ludvíková M., Čurn V. (2020): Metodika pro genotypizaci genetických zdrojů máku setého (*Papaver somniferum* L.) pomocí SSR a IRAP markerů. Uplatněná certifikovaná metodika (UKZUZ 199189/2020).
- Kalia R., M. Rai, S. Kalia, R. Singh, A. Dhawan, (2011): Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177: 309–334.
- McCallum, CM; Comai, L; Greene, EA; Henikoff, S (2000): Targeted screening for induced mutations. *Nat Biotechnol.* 18: 455–457.
- McCallum, CM; Comai, L; Greene, EA; Henikoff, S (2000): Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.* 123: 439–442.
- Ondreičková, K., Mičianová, V., Muchová, D., Klčová, L., Hudcovicová, M., Havrlentová, M., Mihálik, D., Kraic, J. (2017): Forensic application of EST-derived STR markers in opium poppy. *Biologia.* 72: 587-594.
- Řepková J., Relichová J. (2001): Genetika rostlin. MU, Brno.
- Sega G.A. (1984): A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutat. Res-Gen. Tox. En.* 134: 113- 142.
- Slade, AJ; Fuerstenberg, SI; Loeffler, D; Steine, MN; Facciotti, D. (2005): A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nat Biotechnol.* 23: 75–81.

- Tsai, Helen; Howell, Tyson; Nitcher, Rebecca; Missirian, Victor; Watson, Brian; Ngo, Kathie J.; Lieberman, Meric; Fass, Joseph; Uauy, Cristobal; Tran, Robert K.; Khan, Asif Ali; Filkov, Vladimir; Tai, Thomas H.; Dubcovsky, Jorge; Comai, Luca (2011): Discovery of Rare Mutations in Populations: TILLING by Sequencing. *Plant Physiology*. 156: 1257–1268.
- Varshney R.K. (2021): Designing Future Crops: Genomics-Assisted Breeding Comes of Age. *Trends Plant. Sci.* 26: 631–649.
- Vašek, J., Číhalová, D., Melounová, M., Svoboda, P., Vejl, P., Štikarová, R., Vostrý, L., Kuchtová, P., Ovesná, J. (2020): New EST-SSR markers for individual genotyping of opium poppy cultivars (*Papaver somniferum* L.). *Plants* 9:10.
- Yu J.K, Y.S. Chung (2021): Plant Variety Protection: Current Practices and Insights. *Genes* 12, 1127.

Seznam publikací předcházející metodice

Cerven J., Matznerova A., Kundratova K., Bartas M., Pecinka P., Curn V. (2021): Mechanisms of different levels of opium composition in selected lineages of opium poppy. *Journal of International Scientific Publications: Agriculture & Food* 9: 116-122.

Hejna O. , Čurn V. (2018): Sestavení de novo transkriptomu máku setého za využití veřejně dostupných RNA-seq dat. *Úroda* 12, roč. LXVI, 2018, vědecká příloha, ISSN 0139-6013, s. 135 – 138.

Jozová E., Stará M., Horáček J., Ludvíková M., Čurn V. (2020): Metodika pro genotypizaci genetických zdrojů máku setého (*Papaver somniferum* L.) pomocí SSR a IRAP markerů. Uplatněná certifikovaná metodika (UKZUZ 199189/2020), ISBN: 978-80-7394-826-9.

Endlová L., Vrbovský V., Rychlá A.: Stanovení kvality semen a makoviny máku setého metodou spektroskopie v blízké infračervené oblasti. OSEVA vývoj a výzkum s.r.o., 2019, ISBN 978-80-905808-8-6

Rychlá A., Endlová L., Vrbovský V. (2019): Kvalitativní parametry genových zdrojů kolekcí máku setého (*Papaver somniferum* L.). 18. Makový občasník, s. 15-17. ISBN 978-80-213-2930-0

Název: Čurn V. a kol. (2022): Metodický postup chemomutagenese, vedení generací po mutaci a identifikace rostlin nesoucích mutace v genech biosyntetické dráhy alkaloidů

Autorský kolektiv: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Mgr. Jiří Horáček, Ph.D.
Ing. Eva Jozová, Ph.D.
Mgr. et Ing. Ondřej Hejna, Ph.D.
Mgr. Lenka Endlová, Ph.D.
Mgr. Jiří Červeň, Ph.D.
doc. RNDr. Petr Pečinka, CSc.

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta zemědělská a technologická
Studentská 1668
370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika je dostupná na:
http://biocentrum.zf.jcu.cz/docs/lab/Metodiky-mak_mut-7fa2b83686.pdf

Osvědčení o certifikaci UKZUZ 006949/2023.

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne 31.1.2023 (č.j. MZE-4478/2023-13132), jako uplatněná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: curn@fzt.jcu.cz

ISBN: 978-80-7394-972-3

ISBN 978-80-7394-972-3



9 788073 949723