

VYUŽITÍ METOD GENOTYPOVÁNÍ NOVÉ GENERACE PRO BRAMBORÁŘSKOU PRAXI

APPLICATION OF NEXT GENERATION GENOTYPING METHODS FOR POTATO PRACTICE

Jiří PTÁČEK¹, Jan ŠAFÁŘ², Viktor KOPAČKA³, Renata ŠVECOVÁ¹, Jaroslava DOMKÁŘOVÁ¹,
Miroslava ČEPLOVÁ¹, Alena KRPÁLKOVÁ¹

¹*Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.*

²*Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Olomouc*

³*VESA Velhartice, a.s.*

PTÁČEK, J. – ŠAFÁŘ, J. – KOPAČKA, V. – ŠVECOVÁ, R. – DOMKÁŘOVÁ, J. – ČEPLOVÁ,
M. – KRPÁLKOVÁ, A.

VYUŽITÍ METOD GENOTYPOVÁNÍ NOVÉ GENERACE PRO BRAMBORÁŘSKOU PRAXI

Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 2019, 25: 23–28

V rámci platformy NCKTN01000062 „Biotechnologické centrum pro genotypování rostlin“ koordinujeme ve VÚB Havlíčkův Brod Dílčí projekt TN01000062/04 – Brambory ve spolupráci s ÚEBAV ČR, v.v.i. a VESA Velhartice, a.s.

Řešení tohoto unikátního projektu započalo v roce 2019 a zde prezentujeme doposud dosažené výsledky.

DNA; DaRT; genotypování; brambor

ÚVOD

Brambor lilek brambor, brambor obecný (*Solanum tuberosum* L.), je jednou ze zemědělských plodin, která má vysoký potenciál přispět k řešení potravinové bezpečnosti, a to hned z několika důvodů, i) brambory mají ze všech potravin největší sytící efekt, ii) mají vyvážené složení živin a jsou bohaté na nutričně významné látky jako například antioxidanty, bílkoviny s vysokým obsahem esenciálních aminokyselin, vitamíny a minerální látky, iii) lze je používat ve všech formách diet, včetně diet pro alergiky, iv) jejich pěstování je nenáročné na přírodní podmínky a dosahuje mimořádně vysokých hektarových výnosů. Jednou z příčin, které však brání plnému využití tohoto potenciálu, je opakovaný pokles výnosu způsobený biotickými a abiotickými škodlivými faktory.

V současné době je v České republice pro tvorbu, udržování a rozmnožování odrůd bramboru využíváno výhradně tradičního šlechtění. Čeští šlechtitelé sice vycházejí ze zcela zdravých materiálů svých odrůd, které mají uloženy ve firemních kolekcích ve Výzkumném ústavu bramborářském (VÚB) Havlíčkův Brod v *in vitro* podmínkách, ale moderní způsoby šlechtění doposud nevyužívají. Dobré zkušenosti má VÚB s využitím fúze protoplastů k tvorbě nových materiálů. Některé takto vytvořené položky jsou již uloženy v genové bance VÚB. V současnosti se nedá předpokládat využívání tradičních technik genetické modifikace ve šlechtitelském procesu v stávajícím legislativním prostředí a také kvůli neochotě spotřebitelů tyto produkty používat (viz. GM odrůda bramboru fy BASF – Amflora).

ŠLECHTĚNÍ BRAMBORU

Šlechtění bramboru v České republice má více než stoletou tradici a i v dnešní době zaujímá díky některým šlechtitelským společnostem a VÚB nezanedbatelnou pozici na trhu. Plochy odrůd českého původu tvoří cca 25 % porostů brambor pěstovaných v ČR. Export jak sadbových, tak konzumních brambor se postupně daří udržovat eventuálně mírně zvyšovat, avšak je výrazně nižší než import brambor převážně z Německa a Holandska. VÚB úspěšně využívá techniky fúze protoplastů, udržování rostlin bramboru ve formě *in vitro* a dlouhodobě spolupracuje s tuzemskými výzkumnými ústavu a vysokými školami na využití moderních molekulárně-biologických technik u brambor. Perspektivním biotechnologickým postupem se nyní jeví systém CRISPR/Cas9, který je široce využívám jak v základním výzkumu modelových rostlin, tak při vývoji nových variet celého spektra hospodářských plodin a zvířat.

Brambor má velkou genetickou diverzitu v rámci člověkem domestikovaných rostlin. Genom bramboru má 12 chromozómů a velikost genomu je přibližně 840 milionu bází, což ho činí středně velkým rostlinným genomem. Obecné informace o genomu jsou přístupné na adrese Potato Genome Sequencing Consortium (PGSC), www.potatogenome.net

a vlastní data genomu jsou prezentována na stránkách <http://potatogenomics.plantbiology.msu.edu>. Sekvenovaný kultivar RH89-039-16 je diploidní heterozygotní varianta bramboru. PGSC projekt využívá informaci ze 78 000 BAC klonů, které byly „fingerprintovány“ a poskládány do přibližně 7000 fyzických contigů. Data jsou strukturovaná (kompletní nukleotidové sekvence všech chromozomů, kompletní CDS sekvence, sekvence transkriptů, genové anotace v GFF3formátu, aminokyselinové sekvence všech kódujících sekvencí) a jsou volně přístupná ke stažení, nebo pro přímou analýzu prostřednictvím online BLAST a Genome Browser aplikace.

Dlouhodobá selekce a místně specifické šlechtění bramboru vedlo k tvorbě odrůd s různými užitnými vlastnostmi. Samotný proces křížení a výběru způsobil diversifikaci na úrovni genomu. Pro zlepšení užitných vlastností i získání různých odolností byly často využívány plané či příbuzné druhy, což vedlo k dalšímu „obohacení“ původního genomu.

Řešený projekt NCK se zaměřuje na několik okruhů genomových analýz s cílem najít a vyvinout specifické DNA markery, které mají vazbu k vybraným biotickým a abiotickým faktorům. Projekt se z tohoto hlediska zaměří na několik významných okruhů genomových analýz pro hledání specifických markerů spojených s genetickým pozadím následujících znaků jako je (a) škrobnatost, (b) schopnost akumulace flavonoidů, látek s antioxidačními účinky, (c) ranost a (d) odolnost vůči některým abiotickým a biotickým stresovým faktorům.

V posledních dvaceti letech vznikla celá řada metod sekvenování označovaných jako „next generation sequencing“ (NGS) neboli sekvenování nové generace, tj. metod, které v porovnání s klasickými metodami sekvenování umožňují rychlou, masivní a cenově příznivou produkci velkého množství sekvenčních dat najednou. NGS využívá principu paralelizace procesu sekvenování, kdy dochází k sekvenování tisíců až milionů sekvencí současně. Výsledkem je obrovská produkce výstupních dat s následnou potřebou data utřídit a analyzovat.

Pro sekvenování nové generace v současné době existuje řada různých technologií a protokolů, přičemž každá z technologií má své přednosti nebo naopak nevýhody a může být vhodná jen k určitým aplikacím. Nicméně pro všechny tyto metody existuje určité obecné schéma:

- V prvním kroku je při těchto technikách templátová DNA fragmentovaná na úseky několika set bází dlouhé. (Neplatí pro technologii SMRT od firmy Pacific Biosciences a Oxford Nanopore – techniky sekvenování třetí generace).
- Konce získaných fragmentů jsou enzymatickou reakcí zatupeny a napojeny k oligonukleotidům určité sekvence (tzv. adaptéry).
- Jednotlivé fragmenty jsou odděleně amplifikovány PCR reakcí (u některých technologií tento krok chybí) a pak v jednom kroku paralelně sekvenovány. Při tomto paralelním sekvenování se sekvenují milióny sekvencí najednou.
- Délka získaných sekvencí je cca 20–700 bp (u PB, Nanopore i desítky kilobází). Sekvenační výtěžek jednoho běhu sekvenátoru může být až několik tisíc Gb, přičemž cena sekvenování za 1 b je až o dva řády nižší, než by byla u kapilárního sekvenování Sangerovou metodou.

Možnosti přečíst a analyzovat celé genomy nás přenesly do éry genomiky. Genomický přístup v bádání znamená, že se nezabýváme jen jedním nebo několika málo geny, ale analyzujeme daný problém na celogenomové úrovni.

Bylo vyvinuto mnoho metod pro snížení komplexity velikých rostlinných genomů. Významnou roli na tomto poli hraje metoda známá jako Diversity Array Technology (DArT). Redukce komplexity u metody DArT poskytují významnou výhodu prostřednictvím inteligentní selekce genomové frakce odpovídající převážně aktivním genům. Tato volba je dosažena použitím kombinace restričních enzymů, z nichž je jeden methylačně senzitivní (neštěpí methylované, převážně vysoce repetitivní části genomu).

Zatímco počáteční implementace DArT na platformě microarray zahrnovala fluorescenční značení a hybridizaci na vyhrazená pole DArT, metoda DArTseq nasazuje sekvenování na platformách NGS. Přechod na sekvenční platformu umožnil zvýšení počtu analyzovaných fragmentů genomu (1–2 řády) a následně i odpovídající zvýšení počtu markerů. I proto používáme tuto metodu v našem dílčím projektu.

DArTseq pro nový organismus nebo aplikace začíná optimalizací metody snižování složitosti. Společnost DArTPty Ltd. investovala značné úsilí do testování různých kombinací enzymů na značný počet organismů a vyvinula sady metod snižování složitosti (reprezentace), které jsou v porovnání s jinými metodami velmi účinné. Optimalizační proces obvykle vybírá jednu dominantní metodu snižování složitosti pro plodinu, ale v mnoha případech bylo zjištěno několik metod, které nabízejí výhody specifické pro aplikaci. Rozdíl mezi metodami může být jak kvantitativní (rozdílný počet jedinečných fragmentů v reprezentaci), tak kompozitní (různé skupiny fragmentů zachycených v reprezentacích). Nezanedbatelnou výhodou je, že společnost je schopna genotypovat širokou paletu hospodářsky významných plodin.

Projekt se z tohoto hlediska zaměří na několik významných okruhů genomových analýz pro hledání specifických markerů spojených s genetickým pozadím následujících znaků, jako je (a) škrob, (b) schopnost akumulace flavonoidů, látek s antioxidačními účinky, (c) ranost a (d) odolnost vůči některým abiotickým a biotickým stresovým faktorům.

Bude vyvinut efektivní systém markerů a dosáhne kvalitativně vyšší úrovně hodnotícího systému pro zemědělské vlastnosti s využitím výsledků genomového sekvenování. Zkrátí se doba šlechtitelského procesu a omezí se rozsah vedeného materiálu o materiály neobsahující požadované znaky.

Následným budoucím možným perspektivním biotechnologickým postupem se jeví systém CRISPR/Cas9, který je v současnosti využíván převážně u modelových rostlin a v základním výzkumu, kde je hojně využíván a výsledky publikovány.

Dosud dosažené dílčí výsledky řešení:

- výběr 376 genotypů,
- příprava rostlinného materiálu,
- izolace DNA,
- DArT analýza,
- výběr fenotypových znaků pro hodnocení,
- tvorba podkladů pro proasociaci DArT analýzy s vybranými fenotypovými daty,
- příprava na statistické vyhodnocování.

Plánované výstupy projektu:

- užité vzory,
- funkční vzorky.

PODĚKOVÁNÍ

Práce vznikla díky podpoře TA ČR na projekt NCK TN01000062 a Národnímu programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiversity 51834/2017-17253/62.3.

PTÁČEK, J. – ŠAFÁŘ, J. – KOPAČKA, V. – ŠVECOVÁ, R. – DOMKÁŘOVÁ, J. – ČEPOVÁ,
M. – KRPÁLKOVÁ, A.

APPLICATION OF NEXT GENERATION GENOTYPING METHODS FOR POTATO PRACTICE

Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 2019, 25: 23–28

Within NCCTN01000062 “Biotechnology Center for Plant Genotyping” we coordinate in PRI Havlíčkův Brod Partial project TN01000062 / 04 – Potatoes in cooperation with IEB AS CR, v.v.i. and VESA Velhartice. The project execution started in 2019 and we present here the results achieved so far.

DNA; DArT; genotyping; potato

Kontaktní adresa:

RNDr. Jiří PTÁČEK, CSc.

Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.

Dobrovského 2366, 58001 Havlíčkův Brod, Česká republika

tel.: +420 569 466 244, e-mail: ptacek@vubhb.cz