

**Agritec Plant Research s.r.o.**

Zemědělská 2520/16, 787 01 Šumperk



## **METODIKA**

# **Indukce mutací u hrachu setého (*Pisum sativum* L.) ethylmetansulfonátem**

Autor:

RNDr. Hana Macková

Šumperk, 2021



# Metodika indukce mutací u hrachu setého (*Pisum sativum* L.) ethylmetansulfonátem

Metodika byla vypracována za podpory výzkumného projektu MZe QK1810072 – Vývoj biofortifikovaných linií hrachu se sníženým obsahem kyseliny fytové.

Hana Macková

[mackova@agritec.cz](mailto:mackova@agritec.cz)

Vydal: Agritec Plant Research s.r.o.

V nakladatelství AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o. Šumperk, 2021

<http://www.agritec.cz>

Recenzenty metodiky byli:

Oponent 1: Ing. Luděk Říha

Oponent 2: Ing. Tomáš Mezlík

Foto: © RNDr. Hana Macková

© Agritec Plant Research s.r.o.

Tato publikace nesmí být přetiskována vcelku ani po částech, uchováána v médiích, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez uvedení osoby, která má k publikaci práva podle autorského zákona nebo bez jejího výslovného souhlasu. S případnými náměty na jakékoliv změny nebo úpravy se obračete písemně na osobu uvedenou výše.

Vydáno bez jazykové úpravy.

ISBN: 978-80-87360-67-5

## Obsah

1	Cíl metodiky .....	4
2	Vlastní popis metodiky .....	5
2.1	Stanovení vhodné dávky mutagenu .....	5
2.1.1	Materiál .....	6
2.1.2	Pracovní postup .....	7
2.2	Vlastní indukce mutací .....	12
2.2.1	Materiál .....	13
2.2.2	Pracovní postup .....	14
3	Srovnání novosti postupů .....	17
4	Popis uplatnění metodiky .....	18
5	Ekonomické aspekty .....	19
6	Seznam použité literatury .....	20
7	Seznam publikací, které předcházely metodice .....	21

# 1 Cíl metodiky

Mutagenese – klasická mutagenese

V přírodě je mutagenese jev náhodný a poměrně vzácný. Udává se, že spontánní mutaci dochází ve frekvenci  $10^{-5}$  až  $10^{-10}$  na jednu buňku a na jednu generaci (Nečásek a kol. 1997).

Mutace je dědičná změna v primární struktuře DNA a poprvé ji indukoval Herman Muller v roce 1927 pomocí paprsků X u *D. melanogaster* a již roku 1928 Lewis Stadler u rostlinného druhu *Zea mays* L. Patří k základním nástrojům studia funkcí genů.

Mutagenesi můžeme navodit fyzikálními nebo chemickými mutageny. Použití fyzikálních mutagenů se u rostlin využívá poměrně málo, protože je potřeba využít ionizační záření, které proniká do dostatečné hloubky. Hloubka pronikání do rostlinných pletiv je vysoká u paprsků  $\gamma$ , dále následuje rentgenové záření (paprsky X), neutrony a částice  $\alpha$ , nejnižší je u částic  $\beta$ .

Vlivem působení mutačních činidel na rostliny a hodnocením jejich pozmeněného potomstva bylo celosvětově vyšlechtěno okolo 3500 odrůd mnoha různých plodin.

Mezi chemomutageny řadíme tisíce sloučenin, jejichž vlastnosti byly v minulosti testovány. Pro praktické využití u rostlin je však jejich počet omezen. Jedná se především o EMS (ethylmetansulfonát), MNG (1-methyl-3-nitro-1-nitrozoguanidin), ENU (1-ethyl-1-nitrozomočovina), MNU (1-methyl-1-nitrozomočovina), EI (ethylenimin) a dES (diethylsulfát). Tyto látky alkylují DNA, způsobují tranzice párů bází, obvykle GC za AT, vzhledem k chybnému párování  $O^6$ -alkyl-G s T.

Podobně O<sup>4</sup>-ethyl-T má za následek tranzici TA za GC. Tyto mutageny mění párovací schopnosti původních bází, aniž naruší konformaci DNA. Z hlediska indukce vysoké četnosti mutací u rostlin jsou z alkylačních činidel nejúčinnější N-nitrozosloučeniny.

Nejpoužívanější z nich je EMS, ethylující guanin v poloze 6 za vzniku O<sup>6</sup>-ethyl-G, který se následně při replikaci páruje s thyminem. Výsledkem je tedy tranzice GC-AT (Štěpánek, 2006).

U rostlin se mutagenese uplatňuje především u vegetativně množených nebo u samosprašných druhů (Graman a Čurn, 1998). Hrách jakožto samosprašný druh je pro indukci mutací vhodným objektem. Cizosprašnost nebyla prokázána během experimentálního pokusu v letech 2001-2003 (ročně bylo monitorováno více než 40000 rostlin) (Dostálová a kol., 2005).

Cílem metodiky je indukce mutací u hrachu setého (*Pisum sativum* L.) s použitím chemomutagenu EMS, která povede k získání rostlin s novými vlastnostmi využitelnými pro šlechtění. Metodika byla vyvinuta na odrůdách hrachu Eso a Protecta a ověřena na odrůdě Trendy.

## **2 Vlastní popis metodiky**

### **2.1 Stanovení vhodné dávky mutagenu**

Nejprve je nutné stanovit vhodnou dávku mutagenu, kterou budeme na rostlinný materiál působit. Jako optimální se udává letální dávka LD 50, tedy koncentrace mutagenu a doba jeho aplikace taková, kdy přežívá 50 % plodných jedinců z vysetých ovlivněných semen (Rod a kol 1982).

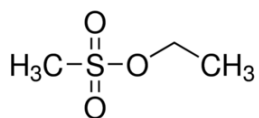
V pokusech bylo zjištěno, že pro rychlé zjištění vhodné dávky mutagenu se doporučuje stanovit takovou dávku, při které vzchází cca 70 % ovlivněných semen. Přibližně 35 % ze vzešlých rostlin je sterilních.

Během uskladnění se účinnost EMS poměrně rychle snižuje, proto je nutné stanovit LD 50 krátce před vlastním působením mutagenu na osivo. Druh a kvalita osiva ovlivňuje efektivitu působení mutagenu, zejména jeho velikost, doba bobtnání, tloušťka osemení atd. Pro stanovení LD 50 se doporučuje provést pokus, ve kterém se otestují 2 koncentrace, jako kontrola se použije destilovaná voda a 2 doby aplikace – 1 a 2 hodiny. (Tejklová 2002).

### 2.1.1 Materiál

Rostlinný materiál – semena hrachu registrovaných odrůd – Eso, Protecta – 5 × 200 semen od každé odrůdy

Ethylmethansulfonát = ethyl methanesulfonate = methanesulfonic acid ethyl ester – je mutagenní, teratogenní a případně karcinogenní organická sloučenina se vzorcem  $C_3H_8SO_3$ . Je nebezpečný při vdechování, dotyku s kůží, polknutí.



lineární vzorec  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{CH}_2\text{CH}_3$

Erlenmayerovy baňky 500 ml – 10 kusů,  
čtverce alobalu na zabalení baněk – 10 kusů,  
mikropipeta na 1 ml,  
špičky na mikropipety,  
plochá miska na odkládání použitého materiálu od EMS se čtverečkem  
buničité vaty,  
odměrný válec na 100 ml,

kádinka s 1 l destilované vody na přípravu roztoků EMS,  
kádinka se 2 l destilované vody na propláchnutí semen,  
třepačka,  
kontejner na nebezpečný odpad,

## 2.1.2 Pracovní postup

### 1. den

- Nachystat a přebrat osivo. Připravit 5 vzorků po 200 semenech odrůdy Eso a 5 vzorků po 200 semenech odrůdy Protecta pro stanovení LD 50.
- Připravit 10 misek o rozměrech 22 cm průměr misky a 5 cm hloubka misky k výsevu. Naplnit je 3 cm zeminy (výsevni substrát).
- Ve 14:00 umístit semena do Erlenmayerových baněk a zalít je vodou tak, aby hladina vody byla cca 5 cm nad vrstvou semen. Nechat semena bobtnat 18 hodin.
- *Uvedené časy jsou pouze doporučené, ale je vhodné je dodržet, aby na sebe jednotlivé kroky plynule navazovaly.*
- *Je možné bezpečně pracovat mimo digestoř.*

### 2. den

- *Práce v digestoři v ochranných gumových rukavicích. EMS je mutagenní, teratogenní a případně karcinogenní organická sloučenina.*
- *Práce při pokojové teplotě (21 °C).*

- V 7:30 nachystat roztoky EMS: 8 baněk se 100 ml destilované vody. Ze 4 odebrat 0,5 ml vody a přidat 0,5 ml EMS, označit 0,5. Ze 4 odebrat 1,0 ml vody a přidat 1,0 ml EMS, označit 1,0.
- V 8:00 slít přes sítko všechnu vodu z Erlenmayerových baněk ve kterých bylo namočené osivo. Přilít do dvou baněk s odrůdou Eso 0,5% roztok EMS a do dvou baněk 1,0% roztok EMS. Stejný postup opakovat s odrůdou Protecta. Použitou špičku odložit na čtvereček buničité vaty a poté zlikvidovat jako nebezpečný odpad. Označit variantami Eso 0,5/1, Eso 0,5/2, Eso 1,0/1, Eso 1,0/2 a Protecta 0,5/1, Protecta 0,5/2, Protecta 1,0/1 a Protecta 1,0/2. Do zbylých 2 baněk nalít destilovanou vodu a označit variantami Eso K a Protecta K. Baňky zabalit do alobalu a umístit na třepačku při pokojové teplotě, aby se semena pomalým pohybem v roztoku EMS promýčávala.
- V 9:00 vyndat z třepačky a přemístit do digestoře Erlenmayerovy baňky označené Eso K, Eso 0,5/1, Eso 1,0/1 a Protecta K, Protecta 0,5/1 a Protecta 1,0/1. U všech variant postupně odstranit alobal a přes sítko slít kapalinu do kontejneru s nebezpečným odpadem, 2x semena důkladně propláchnout 300 ml destilované vody, kapalinu slévat do kontejneru pro nebezpečný odpad. Nádoby s osivem umístit pod proud tekoucí vody po dobu 30 minut tak, aby došlo k důkladnému vymytí mutagenu (obr. 1). Je nutné zabezpečit osivo před vypláchnutím z nádoby (dostatečně vysoká nádoba, použití vhodné sítky). Takto ošetřené osivo je připravené k výsevu do půdy.
- V 10:00 vyndat z třepačky a přemístit do digestoře Erlenmayerovy baňky označené Eso 0,5/2, Eso 1,0/2 a Protecta 0,5/2 a Protecta 1,0/2. U všech variant postupně odstranit alobal a přes sítko slít kapalinu do kontejneru s nebezpečným odpadem, 2x semena

důkladně propláchnout 300 ml destilované vody, kapalinu slévat do kontejneru pro nebezpečný odpad.

- Nádoby s osivem umístit pod proud tekoucí vody po dobu 30 minut tak, aby došlo k důkladnému vymytí mutagenu. Je nutné zabezpečit osivo před vypláchnutím z nádoby (dostatečně vysoká nádoba, použití vhodné sítky). Takto ošetřené osivo je připravené k výsevu do půdy. Schéma pokusu je uvedeno v tabulce 1.



Obrázek 1 Promývání ošetřeného osiva pod proudem tekoucí vody.

Tab. 1: Stanovení LD 50 pro jednotlivé odrůdy – Eso, Protecta.

koncentrace EMS %	odrůda		doba působení mutagenu/ h	
	Eso	Protecta	1	2
0	Eso	Protecta	1	2
0,5	Eso	Protecta	1	2
1	Eso	Protecta	1	2

- Ošetřené osivo ručně vyset do připravených misek (obr. 2 a obr. 3).



*Obrázek 2 Ošetřené osivo připravené k vysetí.*



*Obrázek 3 Vyseté ošetřené osivo.*

11. den

- Po 8 dnech od výsevu vyhodnotit vzházení klíčících rostlin ER (emergence rate):

$$ER = \frac{\text{počet vzešlých rostlin ve variantě s EMS} \times 100}{\text{počet vzešlých rostlin v příslušné kontrolní variantě}} \%$$



*Obrázek 4 Vzházení ošetřeného osiva. Odrůda Eso.*

Dále je vhodné provést pokus s jemnější škálou rozdílů v koncentracích. Jako ideální se z předchozího pokusu jevílo působení EMS po dobu 1 hodiny. Koncentrace mutagenu byly zvoleny 0,3 % EMS, 0,6 % EMS, 0,9 % EMS a 1,2 % EMS (tabulka 2).

Tab. 2: Stanovení LD 50 pro jednotlivé odrůdy – Eso, Protecta při použití jemnější škály rozdílu v koncentracích.

koncentrace EMS %	odrůda		doba působení mutagenu h
	Eso	Protecta	
0	Eso	Protecta	1
0,3	Eso	Protecta	1
0,6	Eso	Protecta	1
0,9	Eso	Protecta	1
1,2	Eso	Protecta	1

Pracovní postup je totožný.



Obrázek 5 Vzházení ošetřeného osiva při pokusu s jemnější škálou koncentrací.

## 2.2 Vlastní indukce mutací

Z předchozího pokusu byla vybrána ideální kombinace koncentrace a doby působení mutagenu pro jednotlivé odrůdy hrachu. Vzhledem k tomu, že žádná varianta přesně neodpovídala přesně 70 % klíčivosti vzhledem ke kontrole, byla dávka mutagenu odvozena aproximací od varianty, která se nejvíce blížila požadovaným 70 %. V prvním roce

experimentu byla pro odrůdu Eso zvolena kombinace působení 1,1 % EMS po dobu jedné hodiny a pro odrůdu Protecta kombinace působení 0,9 % EMS po dobu jedné hodiny. V následujícím roce byl proveden shodný experiment i s odrůdou Trendy. U té byla zvolena vhodná kombinace působení 1,1 % EMS po dobu jedné hodiny. Takto ošetřené osivo bylo vyseto na pole (obrázek 6).



*Obrázek 6 Vzcházení ošetřeného osiva v polních podmínkách.*

### **2.2.1 Materiál**

Rostlinný materiál – certifikované osivo registrovaných odrůd hrachu  
– Eso, Protecta, Trendy

množství – 4 × 500 semen od každé odrůdy

Ethyl methan sulfonát

Erlenmayerovy baňky 500 ml – 8 kusů, čtverce alobalu na zabalení baněk – 8 kusů, mikropipeta na 1 ml, špičky na mikropipety, plochá miska na odkládání použitého materiálu od EMS se čtverečkem buničité vaty, odměrný válec na 100 ml, kádinka s 1 l destilované vody na přípravu roztoků EMS, kádinka se 2 l destilované vody na propláchnutí semen, třepačka, kontejner na nebezpečný odpad.

### **2.2.2 Pracovní postup**

Jako mutagen použít Ethylmethansulfonát (EMS). Semena hrachu se před vlastní mutagenezí nechat nabobtnat. V 14:00 semena namočit do vody – v Erlenmayerových baňkách o objemu 500 ml. Po 18 hodinách bobtnání slít přebytečnou vodu přes sítko a k osivu se přilít roztok EMS o požadovaných koncentracích: 1,1 % pro odrůdu Eso, 0,9 % pro odrůdu Protecta. Erlenmayerovy baňky zabalit do alobalu (zamezení přístupu světla – EMS se na světle rozkládá) a umístit na třepačku při pokojové teplotě. EMS nechat působit po dobu 1 hodiny. Roztok EMS se slít přes sítko a ošetřené osivo 2× důkladně propláchnout destilovanou vodou. Vodu slít do kontejneru s nebezpečným odpadem. Nádoba s osivem se umístit pod proud tekoucí vody po dobu 30 minut tak, aby došlo k důkladnému vymytí mutagenu. Je nutné zabezpečit osivo před vypláchnutím z nádoby (dostatečně vysoká nádoba, použití vhodné sítky). Vše stačí provádět nesterilně. Takto ošetřené osivo vyset na pole.

Výsev je nutné provést ručně, protože nabobtnaná a ovlivněná semena nelze umístit do secího stroje. Mutované osivo je citlivé na dostatek/ nedostatek vláhy v několika prvních dnech po vysetí. Při delším suchu je nutné pokusnou plochu zalévat, jinak hrozí zaschnutí semen a jejich nevyklíčení. Působením mutagenu dojde k oslabení semen a ovlivněná semena vzcházejí pomaleji. Hrách se na pole seje

obvykle koncem března či začátkem dubna – záleží na lokalitě. Hrách setý má poměrně nízké nároky na teplotu, klíčí už při 1 °C, roste od 4 °C a nespálí ho ani jarní přízemní mrazíky. Optimální teplota pro růst je 14 až 18 °C (obrázek 7, 8).



*Obrázek 7 Pohled na pokusné parcely v době květu a nasazování lusků. Osivo ošetřené EMS.*



*Obrázek 8 Pohled na pokusné parcely v době květu a nasazování lusků.*

Vodítkem pro odhad působení mutagenu je přechodná skvrnitost listů vyvolaná lokální inhibicí tvorby chlorofylu, které je možné pozorovat na vzházejících rostlinách M1 generace (Rod et al., 1982), případně výskyt různých morfóz (nedědičné odchylky ve tvaru listů, květních orgánů) (obrázek 9).



*Obrázek 9 Morfózy u rostlin vzešlých z osiva ošetřeného EMS.*

U M1 generace vzrostlé ze semen přímo ovlivněných mutagenem není možné detekovat všechny mutace, protože většina mutací má recesivní charakter. Jedná se zejména o ztrátu funkce bílkovin. Dominantní mutace v M1 generaci detekovat lze.

Rostliny v plné zralosti se hromadně sklídí a odsemení (ručně, nebo sklízecí technikou). Získaná semena se vysejí na pole v následujícím roce. Pro výsev lze již využít běžné secí stroje. Vhodné je založit maloparcelkový pokus, aby bylo možné jednotlivé rostliny sledovat v M2 generaci. Stejný postup lze posléze využít i v dalších generacích. V M2 generaci se již vyštěpují mutace v homozygotním stavu. Proto je možné detekovat i mutace recesivní. V M2 generaci je vhodné soustředit se již na jednotlivé rostliny, sklídit je jednotlivě a v další generaci přesévat odděleně potomstvo dané rostliny zajímavé ve sledovaném znaku či charakteristice k získání dostatečného množství osiva pro analýzy.

Během pěstování je potřebné vytvořit požadovaný selekční tlak nebo specifický způsob zacházení s osivem/plodinou během vegetační doby (předseťová příprava pole; množství, způsob aplikace a druh hnojiva; preemergentní ošetření pokusné plochy; postřiky proti plevelům či škůdcům). Důležité je zohlednit pokusnou lokalitu – složení půdy (chemické, mechanické). Umístění lokality v krajině – zastíněná/osluněná plocha, nadmořská výška, potencionálně zaplavovaná oblast. Zatížení pokusné plochy patogeny. Např. v Šumperku byla část pokusu pěstována na provokačním poli, které je zatížené nadměrným výskytem půdních patogenů, které způsobují komplex kořenových chorob u hrachu.

### **3 Srovnání novosti postupů**

Použití EMS jako mutagenu pro získání nových forem hrachu se sníženým obsahem kyseliny fytové popisuje ve své práci Warkentin et al. (2012). V experimentu byly použity dva typy mutagenů – 1,5 % EMS a 1mM roztok azidu sodného. Obě tyto sloučeniny působily

odděleně na semena hrachu odrůdy CDC Bronco po dobu 4 hodin. Po působení mutagenu EMS byly získány 2 nízko fytátové linie hrachu. Podrobná metodika mutagenese však v práci uvedena nebyla.

Engvild (1987) použil ve své práci suchá a nabobtnalá semena hrachu odrůdy Finale v experimentu s různými dávkami různých mutagenů – ethyl methanesulfonate (EMS), diethyl sulfat(DES), ethyl nitrosourea (ENU) a okyselený azid sodný ( $\text{NaN}_3$ ). Nabobtnalá semena byla namočena do vody po dobu 18 hodin. Doba působení EMS byla 1 h a 2 h pro koncentrace 0,5 % EMS a 1,0 % EMS. Ani zde však podrobná metodika nebyla popsána. Doba bobtnání semen, výchozí časy působení mutagenu a jeho koncentrace byly použity jako výchozí v prvním experimentu.

Pro usnadnění práce při chemomutagenesi s EMS byla vytvořena tato metodika, protože žádná podrobná a ucelená metodika dosud nebyla publikována.

#### **4 Popis uplatnění metodiky**

Metodika indukce mutací u hrachu setého (*Pisum sativum* L.) ethylmetansulfonátem obsahuje v první části teoretický úvod do problematiky. V praktické části jsou uvedeny přesné protokoly včetně časového harmonogramu od přípravy rostlinného materiálu až po návrhy selekčních markerů pro selekci vhodného osiva.

Metodika je vhodná k praktickému využití ve šlechtění rostlin. Evropská legislativa není nakloněna novým metodám ve šlechtění, New Breeding Techniques (NBT), které často zahrnují „úpravu genomu“, jejímž záměrem je modifikovat DNA na konkrétních místech v genech rostlin tak, aby se v plodinách získaly nové vlastnosti, bez

nežádoucích vedlejších mutací a při použití zlomku prostředků a času. Jedná se o Zinc finger nuclease; TALENs, and CRISPR/Cas Tools). Tyto technologie nebyly v rámci Evropské unie schváleny pro běžné použití při produkci potravin nebo krmiv. Proto je mutagenese vhodný způsob, jak získat rostliny s požadovanými vlastnosti, které mohou být využity pro další šlechtění.

Na pracovišti Agritec Šumperk byly z materiálu ovlivněného EMS získány linie Inu se zkadeřeným stonkem, s nízkým obsahem kyseliny linoleové a současně s vysokým obsahem kyseliny linolové v semenném oleji nebo s vyšší odolností k padlí a dalším houbovým chorobám.

## **5 Ekonomické aspekty**

Z ekonomického hlediska je efektivní, že pomocí mutagenese získáme zajímavé odrůdy ve výrazně kratším čase než při využití konvenčních šlechtitelských metod. Výrazně se tedy sníží doba na šlechtění jedné odrůdy a tím se podstatně sníží náklady se šlechtěním spojené. Získaný rostlinný materiál bude využíván zejména šlechtitelskými stanicemi pro tvorbu nových odrůd. Přesný ekonomický přínos proto nelze přesně vyčíslit, ale lze odhadovat, že bude významný.

Metoda indukce mutací u hrachu setého (*Pisum sativum* L.) ethylmetansulfonátem nevyžaduje výraznější náklady na její provedení. Pro uplatnění je potřeba pouze běžné laboratorní vybavení a chemikálie Ethylmetansulfonát jehož cena se pohybuje okolo 3000 Kč za 10gramové balení.

## 6 Seznam použité literatury

- Engvild., K. C. 1987: Nodulation and nitrogen fixation mutant of pea, *Pisum sativum*. Theoretical and Applied Genetics., 74:711-713.
- Graman, J., Čurn, V. 1998: Šlechtění rostlin (obecná část). Učební text. JU v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice.
- Dostálová, R., Seidenglanz, M., Griga, M. 2005: Simulation and Assessment of Possible Environmental Risks Associated with Release of Genetically Modified Peas (*Pisum sativum* L.) into Environment in Central Europe. Czech J. Genet. Plant Breed., 41: 51-63.
- Nečásek, J., Cetl, I. a kol. 1979: Obecná genetika. SPN Praha.
- Rod J., a kol. 1982: Šlechtění rostlin.
- Tejklová, E. 2002: Curly stem – an induced station in flax (*Linum usitatissimum* L.). Czech J. Genet. Plant Breed. 38: 125–128.
- Štěpánek, O. 2006: Využití metod pozičního klonování při charakterizaci mutací *evoluta*, *cupuliformis* a *lucida* *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Diplomová práce. Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Oddělení genetiky a molekulární biologie Brno.
- Warkentin, T. D., Delgerjav, O., Agranosa, G., Rehman., A. U., Bett., K. E., Anbessa., Y., Rosnagel., B., Raboy., V. 2012: Development and Characterization of Low-Phytate Pea. Crop Science, 52:74-78.

## **7 Seznam publikací, které předcházely metodice**

Vydání této metodiky nepředcházela žádná publikace

**Poznámky :**

ISBN: 978-80-87360-67-5

