

Rozmanitost a genetické zdroje ve šlechtění

- 1) Genetické zdroje a jejich konzervace
- 2) Metodické nástroje k rozšíření
rozmanitosti ve šlechtění

Genetické zdroje ve šlechtění

Domestikované rostliny

1) Komerční odrůdy

Současné nebo i restringované (vyřazené ze seznamu používaných) odrůdy, které jsou výsledkem šlechtění na určitý znak.

Mají vhodné kombinace genů, jsou adaptované k určitým podmínkám prostředí, mají dobrou výkonnost.

Restringované odrůdy byly vyřazeny z důvodu nějaké nevhodné vlastnosti, např. náchylnosti k určitému patogenu, nebo byly nahrazeny výkonnější odrůdou. I zde mohou šlechtitelé hledat nové vhodné kombinace genů.

2) Šlechtitelský materiál

Jde o rozpracovaný šlechtitelský materiál, může mít jedinečné vlastnosti vhodné pro perspektivní využití.

3) Ekotypy – krajové odrůdy

- Vytvořeny farmáři v určitých klimatických podmínkách.
- Dlouhodobé přizpůsobení určitým podmínkám.
- Existence komplexu adaptovaných genů.
- Vysoce heterogenní, výhodná je odolnost ke stresům prostředí.
- Nižší, ale stabilní výnosy.
- Mohou být využity jako výchozí materiál ve šlechtění pro hromadnou selekci nebo tvorbu čistých linií.

4) Introdukované rostliny

Rostliny, které byly introdukovány z jiných oblastí, zemí. Vhodné pro hybridizační projekty.

5) Nové zdroje genů

Výsledky záměrné genetické manipulace – např. mutageneze, GMO.

Nedomestikované rostliny

Divoké populace rostlin, zvýhodněné z hlediska přežití v nepříznivých podmínkách – tvrdé osemení, nepukavost, ale nevýhodné z hlediska výnosů.

Mohou být vhodnými donory jednotlivých genů.

Využívají se v programech vzdálené hybridizace nebo jako očko při roubování (citrusy, vinná réva).

Konzervace genetických zdrojů

■ *In situ*

Botanické zahrady, chráněná území, národní parky

■ *Ex situ*

Genové banky

- - 5°C aktivní kolekce
- - 10°C až -18°C základní kolekce
- kryokonzervace -150°C až -196°C

20 let a více

■ *In vitro*

Genová banka bramboru ve
Výzkumném ústavu bramborář-
ském Havlíčkův Brod



Genové banky

- Tvorba národních a mezinárodních kolekcí
- Eliminace duplikací
 - 250 tisíc vzorků ječmene - jen 50 tisíc bylo jedinečných
- 1898 první kolekce US Department of Agriculture (USDA) David Fairchild
 - PI (Plant Introduction) 1898 PI1 hlávkové zelí z Moskvy
- Začátek 20. století N. I. Vavilov
 - St. Petersburg 250 tis. vzorků rostlin

Mezinárodní organizace, smlouvy

- FAO Food and Agriculture Organization při OSN zodpovědná za genetickou konzervaci zdrojů
- 1974 Řím založení International Board of Plant Genetic Sources (IBPGR)
- 1960 EUCARPIA European Association for Research on Plant Breeding
- 1968 Mezinárodní úmluva o ochraně nových odrůd rostlin (UPOV)
- 2001 Mezinárodní smlouva o genetických zdrojích rostlin pro výživu a zemědělství (FAO) – ochrana a udržitelné využívání rostlinných genet. zdrojů pro zabezpečení výživy, udržitelný rozvoj zemědělství (64 plodin)

ČR

Národní genová banka

- Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha-Ruzyně www.genbank.vurv.cz/genetic/resource/
- 1984 Informační systém EVidence GENetických Zdrojů rostlin (EVIGEZ)
- 1992 Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a biodiverzity
 - pasportní data – základní informace o genetickém zdroji
 - popisná data – charakterizace a hodnocení (morfologické, fenologické, biologické a hospodářské znaky)
- Instituce podílející se na práci s kolekcemi GZR

Zahraniční dokumentační systémy

GZR

- European Cooperative Programme for Crop Genetic Resources Networks (ECP/GR)- ECP/GR Řím
- EURISCO - Evropský katalog genetických zdrojů rostlin
- Centre for Genetic Resources , The Netherlands (CGN) ,
Centrum pro genetické zdroje Wageningen
- Nordic Gene Bank (NGB) - Genová banka Alnarp
- BLE- GENRES (ZADI) Bonn - Zemědělské informační centrum Bonn
- GRIN-The National Plant Germplasm System (NPGS) -
USDA informační systém
- SINGER -SGRP - informační systém CGIAR

Přehled hlavních mezinárodních center pro jednotlivé plodiny

International Rice Research Institute (IRRI)	rýže	80 617
International Center for the Improvement of Maize and Wheat (CIMMYT)	pšenice	95 113
	kukuřice	20 411
International Center for Tropical Agriculture (CIAT)	pícniny	18 138
International Institute of Tropical Agriculture (IITA)	podzemnice olejná	2 029
	kasava	2 158
	sója	1 901
	yam	2 878
International Potato Center (CIP)	brambor	5 057

International Center for Agricultural Research in the Dry
Areas
(ICARDA)

ječmen	24 218
cizrna	9 116
fazol	9 074
pícniny	24 581
čočka	7 827
pšenice	30 270

International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI)

banánovník	931
------------	-----

**Metodické nástroje
k rozšíření rozmanitosti
ve šlechtění rostlin**

Začátky zemědělství

Selekce

Hybridizace

1866 J. G. Mendel

1900 znovuobjevení

1928 1. indukovaná mutace u rostlin

1944 DNA-podstata dědičnosti

1950 McClintock – transpozony *Ac/Ds*

1972 Cohen, Boyer - rDNA

1983 1. transformace – tabák



**genetické modifikace
všech významných
zemědělských plodin**

2000 osekvenovaný genom *Arabidopsis*

Klasické přístupy

Genetické principy

Nové nástroje

Molekulární metody

inzerční mutageneze



Identifikace a izolace
nových rostlinných

genů



Genomika



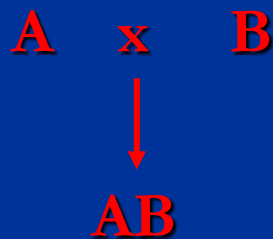
1) Hybridizace

Význam hybridizace ve šlechtění

- Introdukce genů
- Rekombinace
 - nové sestavy genů v F₂, nové genotypy
- Překonání nežádoucí genetické vazby mezi geny
- Heterózní efekt
- Zachování diverzity
- Tvorba inbredních linií
- Genetická analýza, molekulární analýza

Základní typy křížení prováděná ve šlechtění

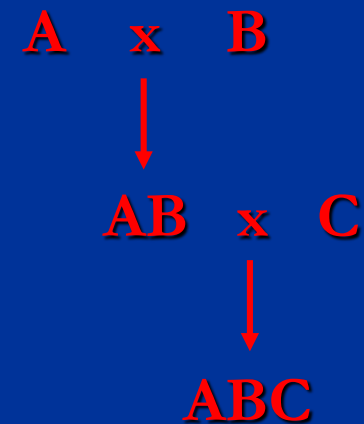
■ Jednoduché křížení



A = 50%

B = 50%

■ Trojnásobné křížení

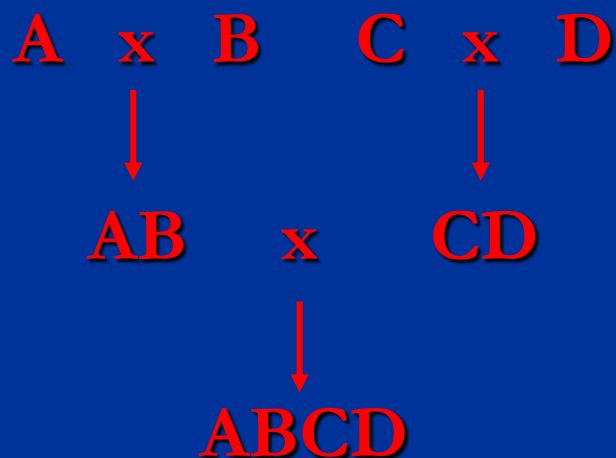


A = 25%

B = 25%

C = 50%

■ Čtyřnásobné křížené



$$A = 25\%$$

$$B = 25\%$$

$$C = 25\%$$

$$D = 25\%$$

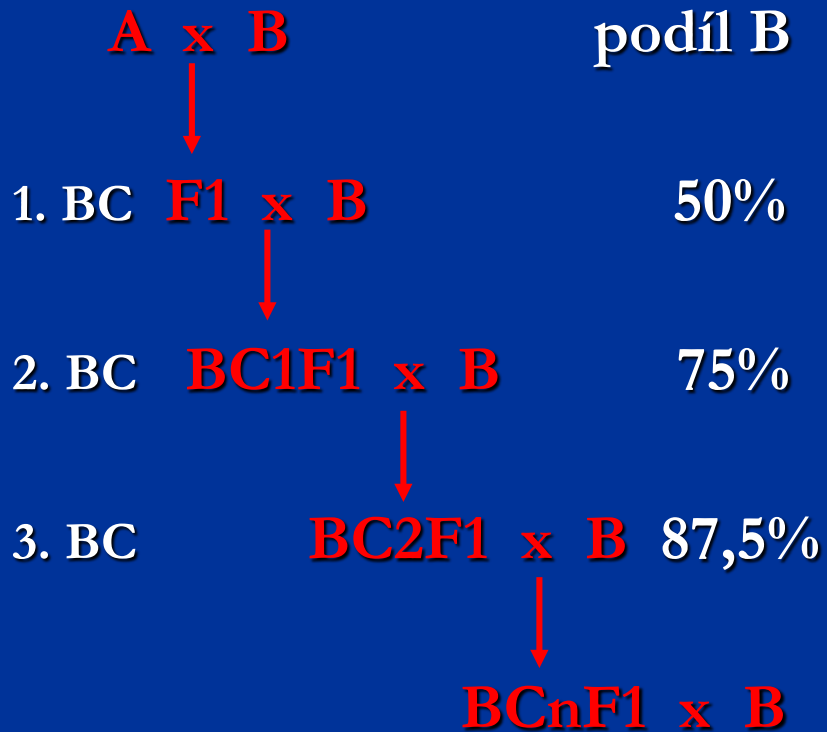
■ Dialelní křížení

	A	B	C	D	E
A	AA	BA	CA	DA	EA
B	AB	BB	CB	DB	EB
C	AC	BC	CC	DC	EC
D	AD	BD	CD	DD	ED
E	AE	BE	CE	DE	EE

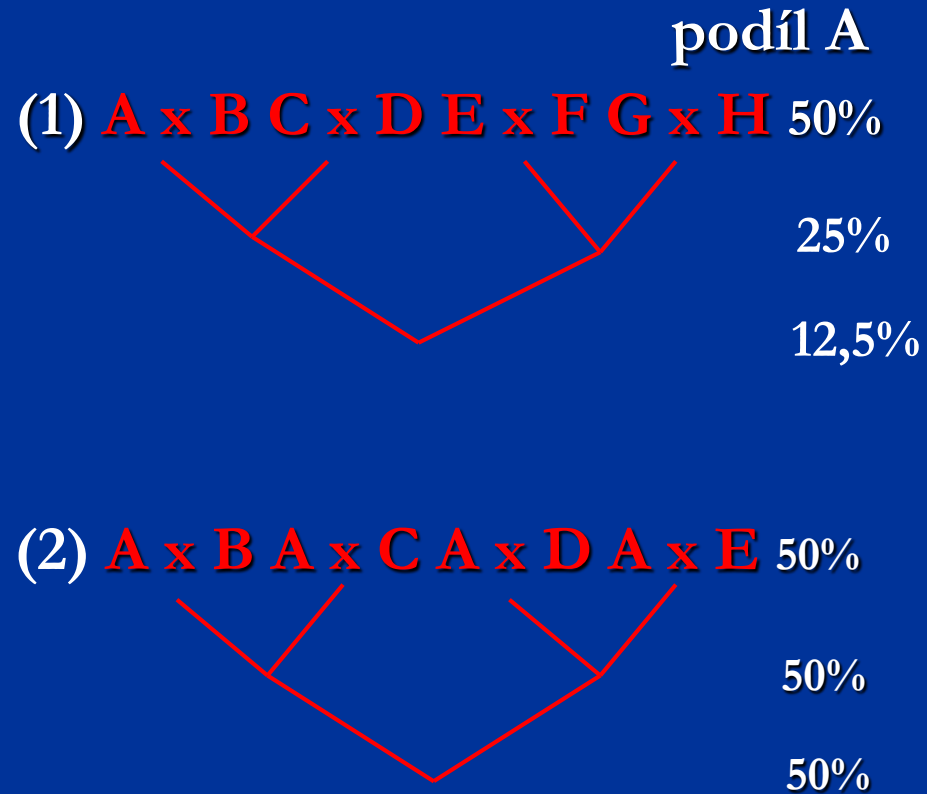
Reciproká křížení

samosprášení

■ Zpětné křížení



■ Konvergentní křížení



Hybridizace



Mezidruhová hybridizace



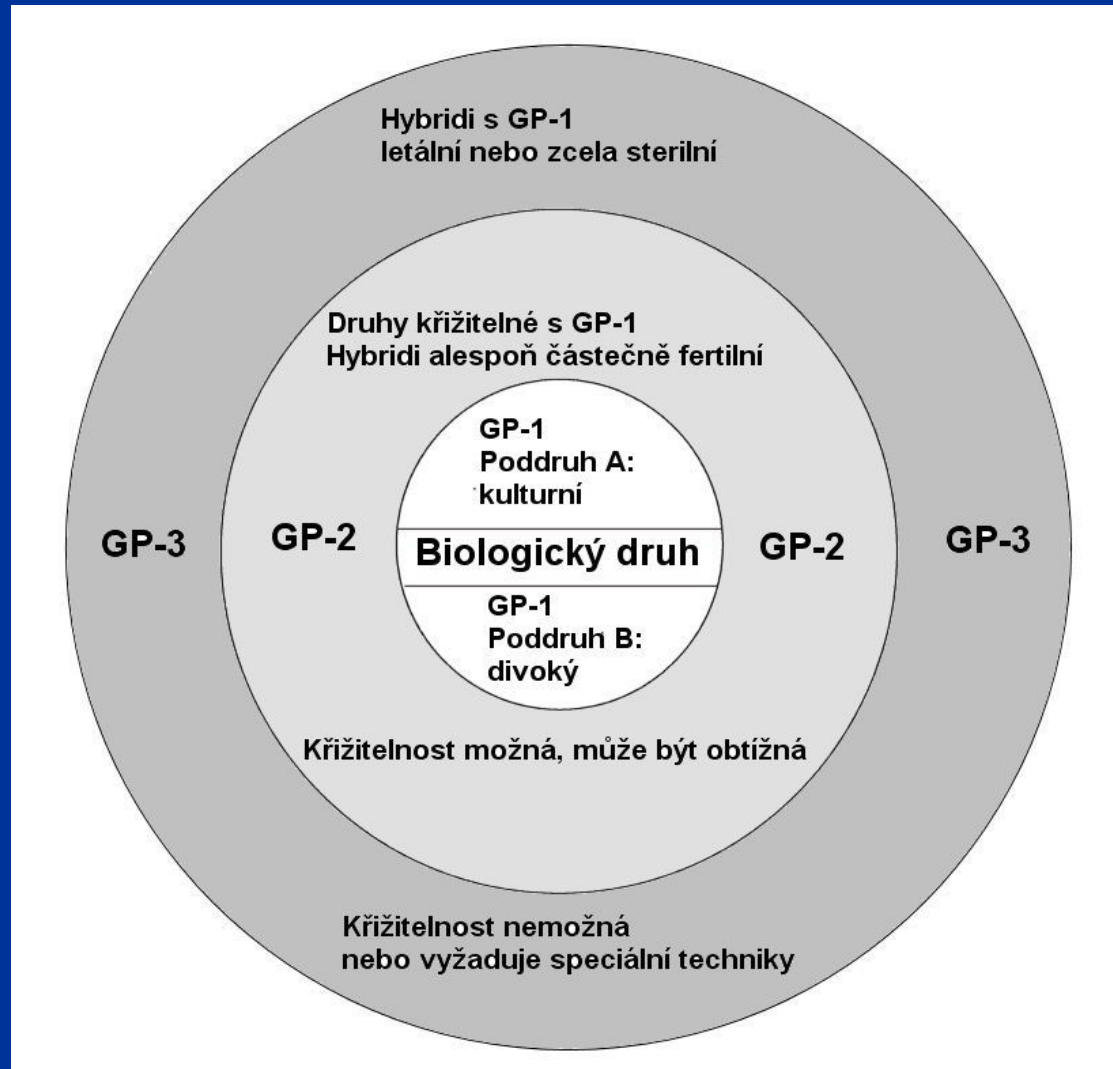
Mezirodová hybridizace



Rozšíření genetiké rozmanitosti - introdukce genů



Hybridizace



Vzdálená hybridizace

Teoretické aspekty

Bariéry křížitelnosti

morfologické a ekologické
fyziologické
cytologické
genetické

Důsledky bariér křížitelnosti:

neklíčivost pylu na blizně cizího druhu (rodu)
špatné prorůstání pylové láčky bliznou
nedochází k oplození nebo hybridní embryo hyne
sterilita hybridů F_1

Prezygotické a postzygotické bariéry křížitelnosti

Možnosti překonání nekřížitelnosti

Klasické

1. metoda prostředníka
2. opylení směsí pylu
3. stimulační látky
4. polyploidizace

Netradiční - biotechnologické

5. opylení *in vitro*
6. *in vitro* embryokultury a jejich modifikace
 - kultivace embryí v transplantovaném endospermu
 - *in ovulo* embryokultury
 - kultury endospermu
7. somatická hybridizace fúzí protoplastů
8. genetické modifikace

Příklad aplikace metody prostředníka

(Lolium multiflorum) x *(Festuca arundinacea)*

$$2n = 2x = 14$$



L. multiflorum



nekřížitelné

$$2n = 6x = 42$$



F. pratensis



$$2n = 2x \cdot 14$$

hybrid (sterilní, diploidní)

→ polyploidizace

→ prostředník – fertilní, nestabilní x *F. arundinacea*

$$2n = 4x = 28$$



$$2n = 6x = 42$$

hybrid (výběry 6x) x *F. arundinacea*

→ BC1 x *F. arundinacea*

→ BC2

→ BCn

výběr *F. arundinacea* 6x s žádoucími znaky *L. multiflorum*

Význam mezidruhové hybridizace

1. Introdukce genů, nové znaky a vlastnosti
2. Ekonomické aspekty
3. Tvorba nových aloploidů
4. Cytogenetické studie a sledování fylogenetických vztahů

Překonávání sterility hybridů

polyploidizace

zpětné křížení

Charakteristika vzdálených hybridů

1. sterilita generace F1
cytologická variabilita generace F1
2. velká variabilita v populaci F2 a v následujících generacích (morfologická, genotypová)
3. nestabilita hybridních forem
narušení vztahů mezi jaderným a cytoplazmatickým genomem → CMS

Úspěchy mezidruhové hybridizace

- Triticum durum* x *T. turgidum* AABB x AABB
T. aestivum x *T. durum* AABBDD x AABB
- Solanum tuberosum* x *S. phureja*
odřůdy se 2 sklizněmi do roka
- S. tuberosum* x *S. indigenum*
zvýšení škrobnatosti a odolnosti vůči hád'átku
- Beta vulgaris* x 15 druhů rodu *Beta*
zdroje jednosemennosti, chladuvzdornosti, odolnost
k chorobám
- Nicotiana tabacum* x plané druhy
rezistence k TMV
- Cerasus vulgaris* x *C. avium* sladkovišeň

Úspěchy mezirodové hybridizace

Triticum x *Secale* triticales

zvýšení výnosu, menší náročnost na půdní a klimatické podmínky, vyšší obsah bílkovin, esenciálních aminokyselin – hlavně lyzin

Triticum x *Agropyron*

odolnost vůči suchu, mrazu, chorobám, vytrvalost

Triticum x *Elymus*

Triticum x *Aegilops*

Hordeum x *Elymus*

Zea mays x *Euchlena mexicana*

zvýšení obsahu bílkovin v zrně

Triticum x *Hordeum* tritordeum

Adiční linie

Začlenění chromozomů žita do genomu pšenice,
introdukce genů rezistence

Substituční linie

Záměna chromozomu pšenice za chromozom pýru, žita,
Aegilops

Translokační linie

Přenesení segmentu chromozomu *Aegilops umbellulata*,
introdukce genu rezistence ke rzi

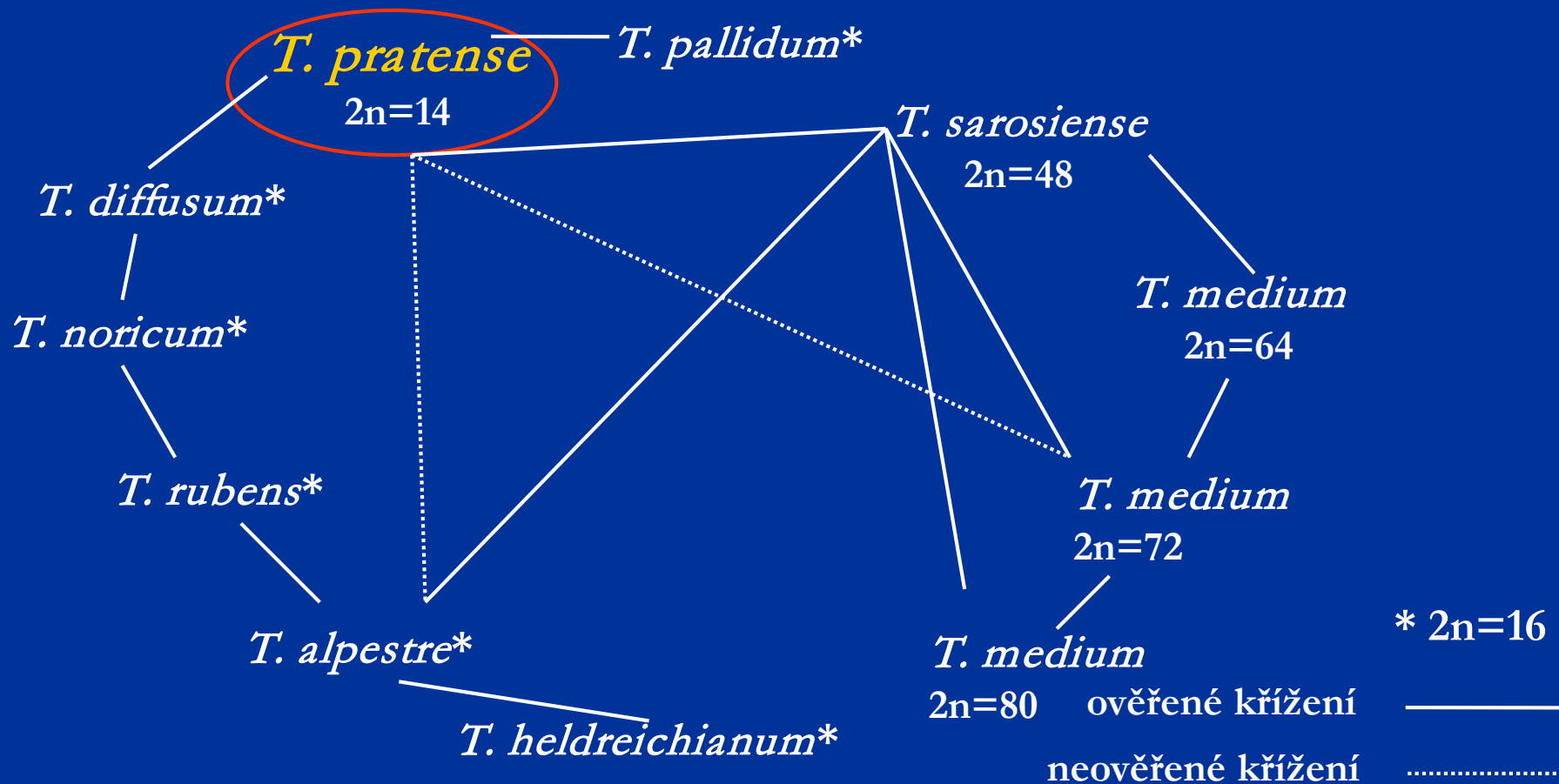
Rod *Trifolium*

Řešený problém a výchozí stav

- *T. pratense*
- *T. repens*
- Cíl: Introdukce genů
 - pro odolnost k patogenům (*Fusarium* sp., viry)
 - pro vytrvalost (tvorba stonkových výběžků)



Trifolium pratense a jeho křížitelnost s dalšími druhy r. *Trifolium*



Cíle

1. Studium prezygotických bariér křížitelnosti
2. Studium postzygotických bariér křížitelnosti
3. Získání mezidruhových hybridů
4. Identifikace a analýza mezidruhových hybridů

Strategie

- Materiál:

recipientní – *Trifolium pratense*

$$2n = 2x = 14$$

$$2n = 4x = 28$$

donorový – *Trifolium medium* $2n = 8x$ až $10x$

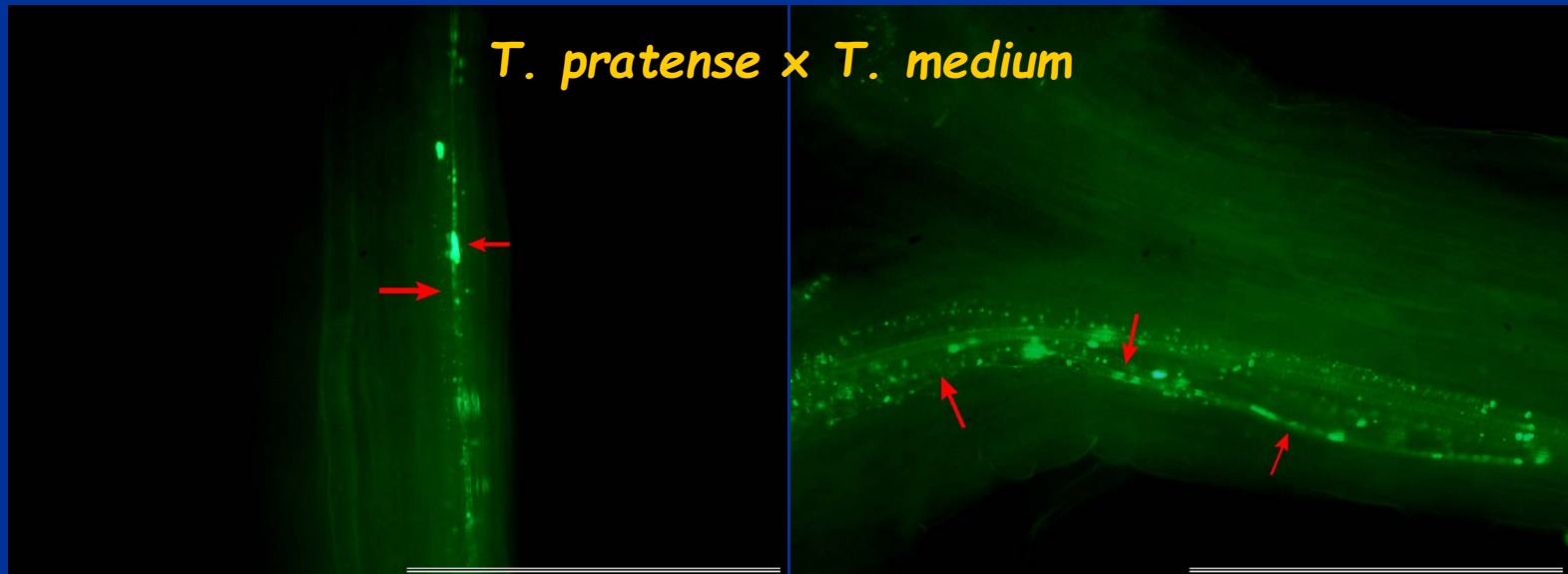
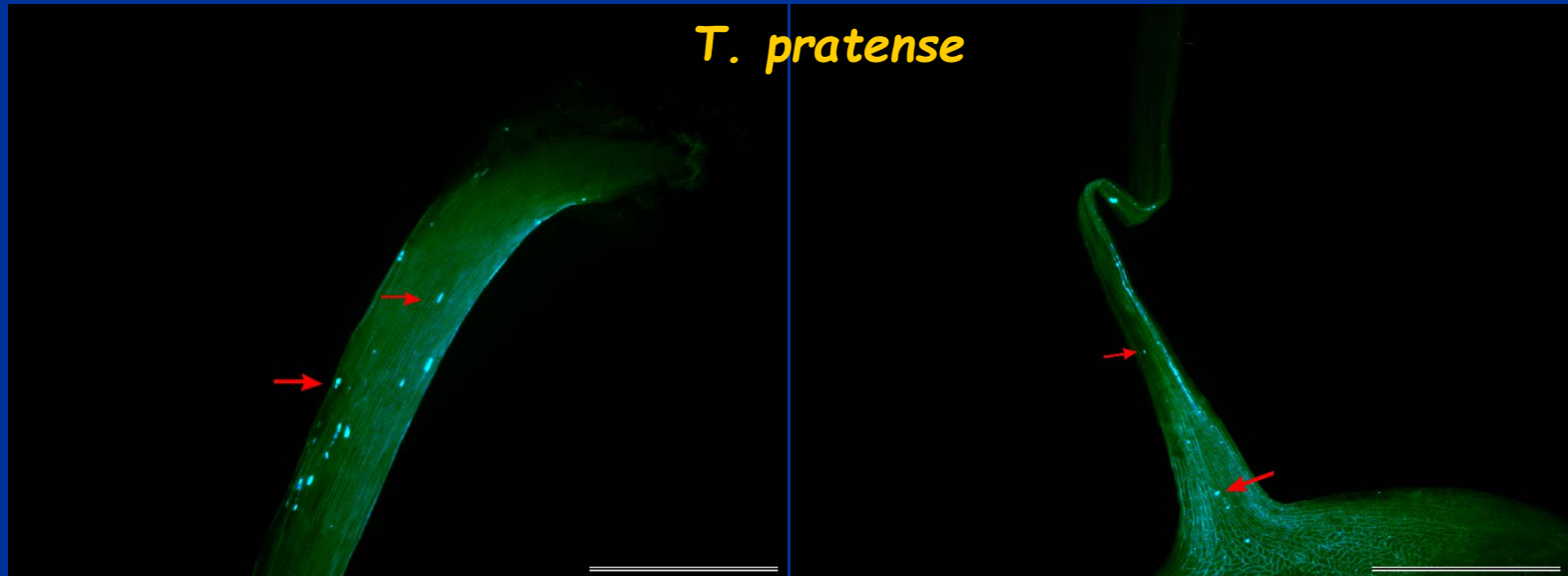
$$= 64 \text{ až } 80$$

$$T. sarosiense \quad 2n = 6x = 48$$

$$T. alpestre \quad 2n = 2x = 16$$

1. Křížení s kastrací
2. Studium prezygotických bariér – prorůstání pylových láček a barvení anilinovou modří pozorování ve fluorescenčním mikroskopu
3. Studium postzygotických bariér
 - zhotovování trvalých preparátů a barvení
 - projasňování rostlinných pletiv a pozorování Nomarského optikou
4. Flowcytometrické stanovení počtu chromozomů
5. Fenotypová analýza

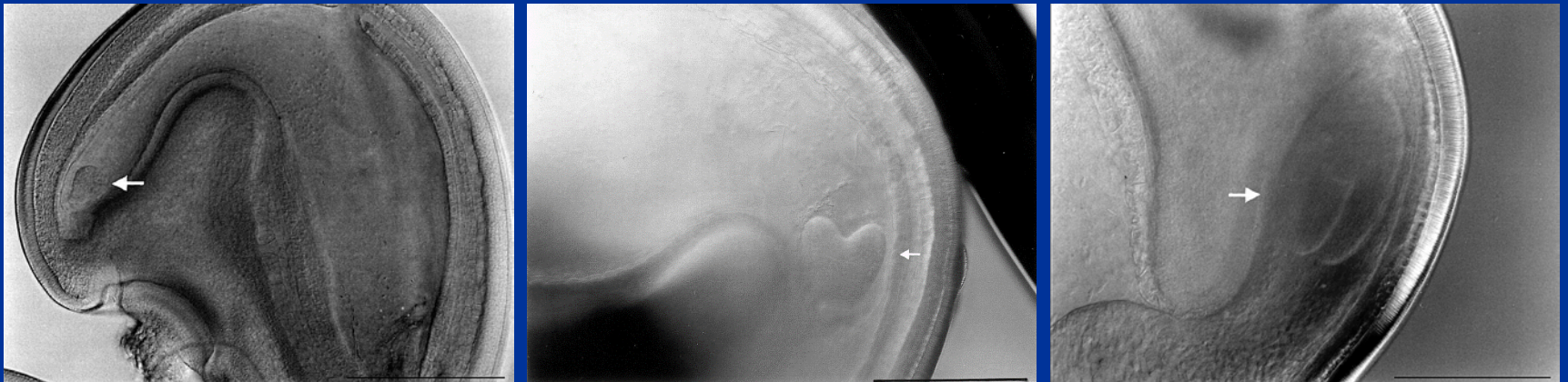
Výsledky studia prezygotických bariér



Postzygotické bariéry křížitelnosti

- Optimalizace metodiky projasňování
 1. chloralhydrát
 2. benzyl benzoát + dibutyl ftalát
- Studium embryogeneze

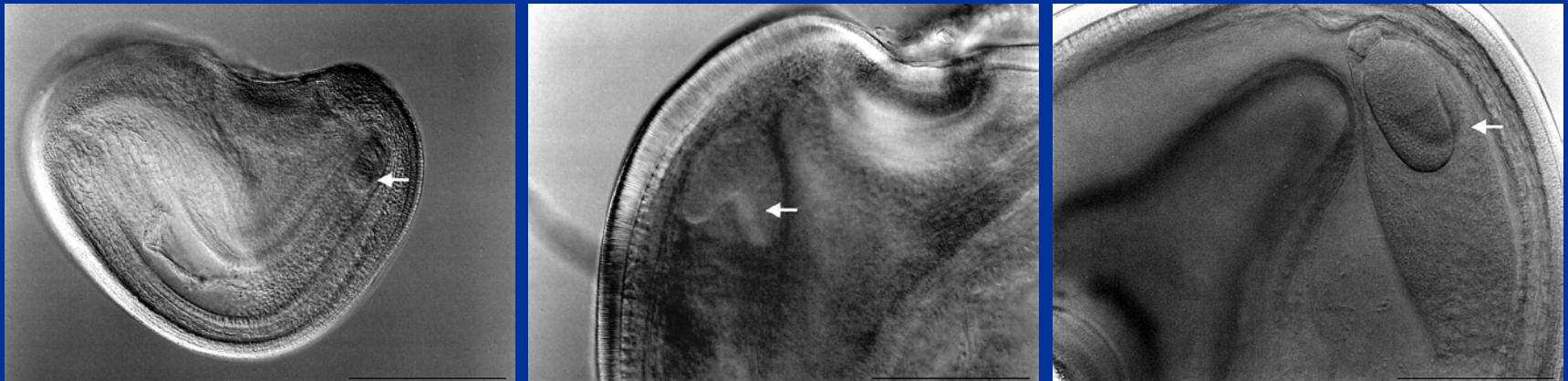
T. pratense (4x)



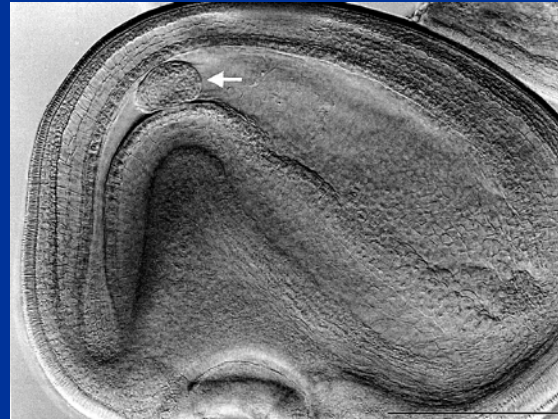
Studium embryogeneze u mezidruhových hybridů Trifolium

- **Optimalizace metodiky projasňování pletiv**
- **Výběr genotypů pro mezidruhovou hybridizaci**

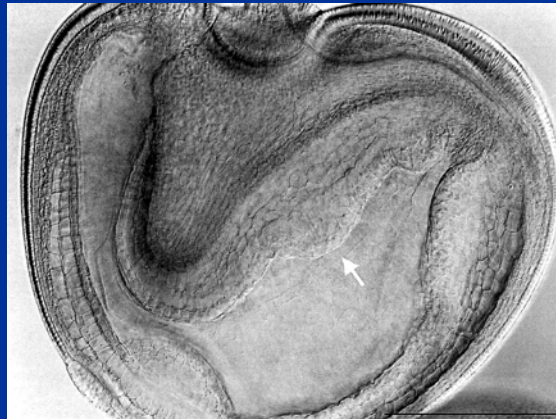
T. pratense (4x) x T. medium



T. sarosienne x *T. pratense* (4x)



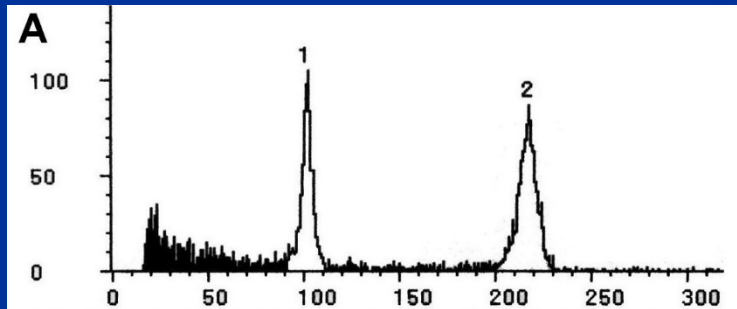
T. apestre x *T. pratense* (4x)



Identifikace a analýza mezidruhových hybridů

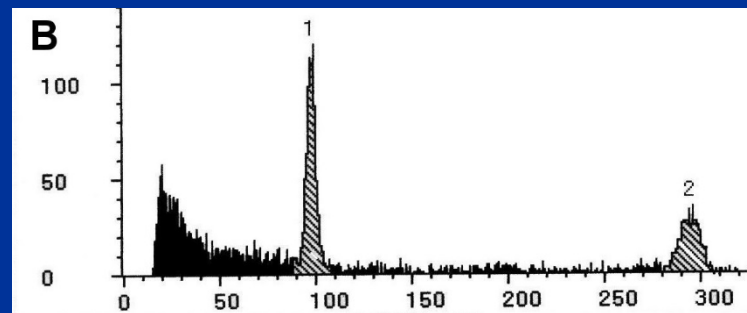
Průtoková cytometrie

$2n = 30$

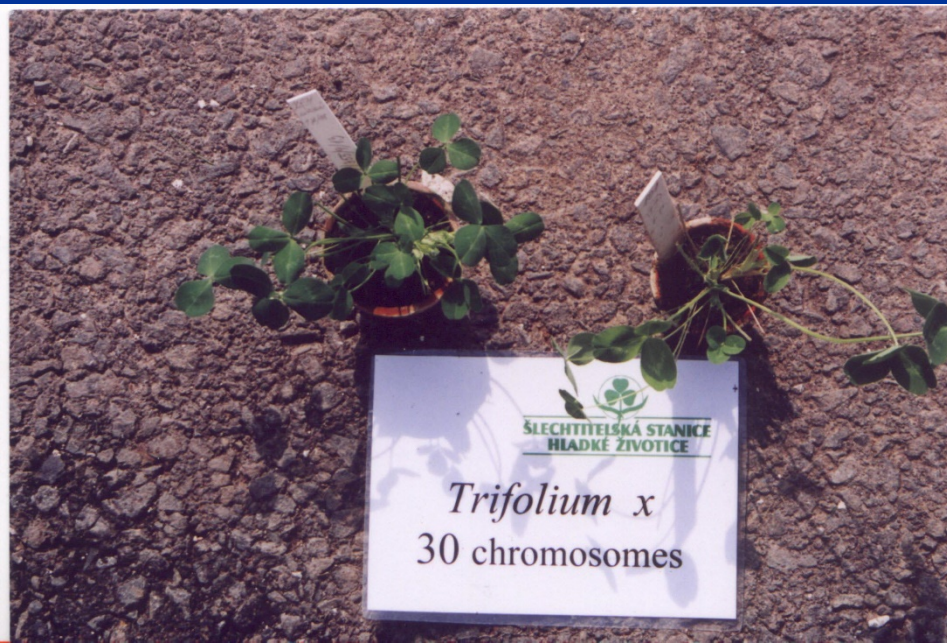


1 - *T. pratense* $2n = 2x = 14$

$2n = 42$

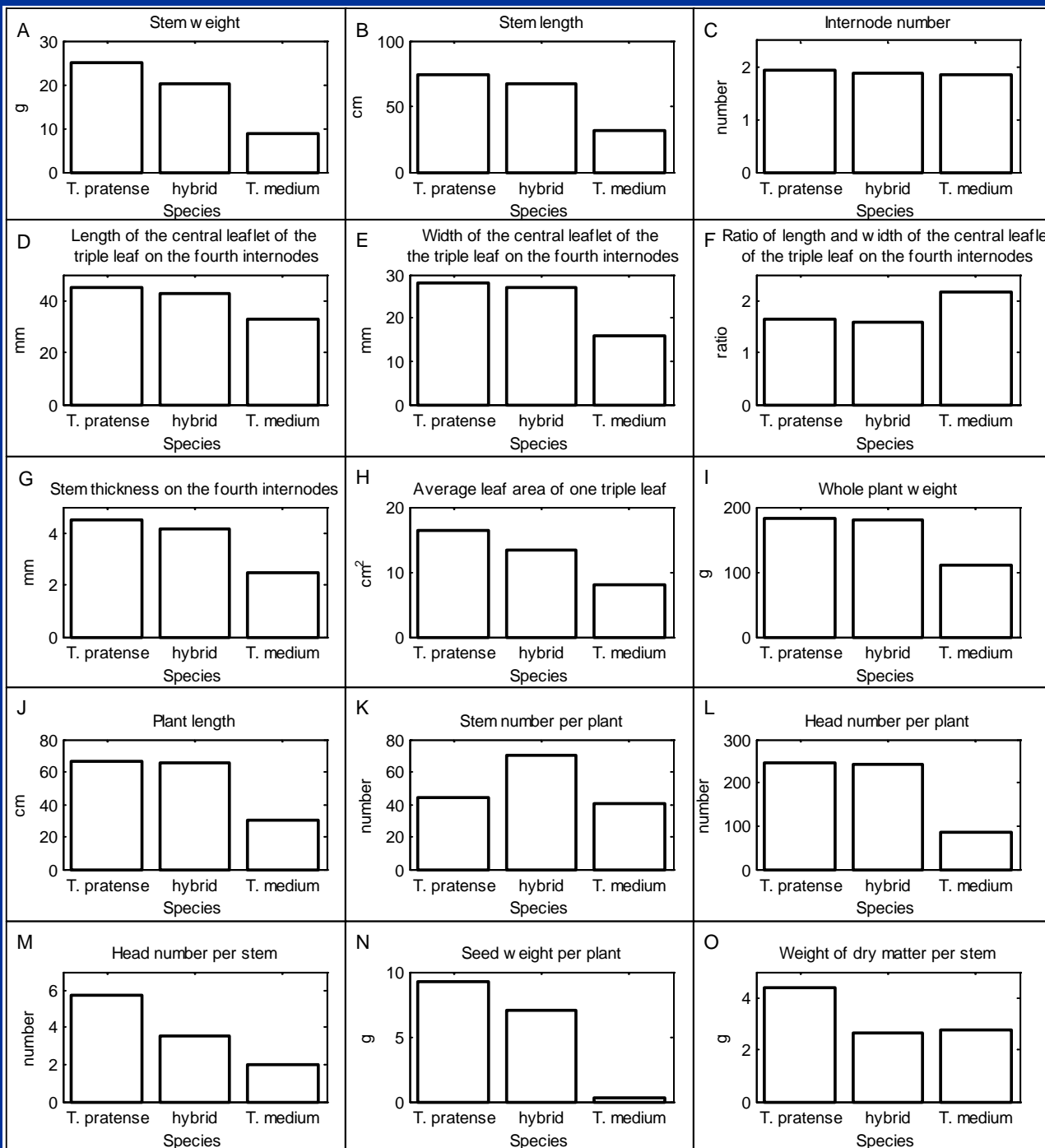


Fenotypové hodnocení

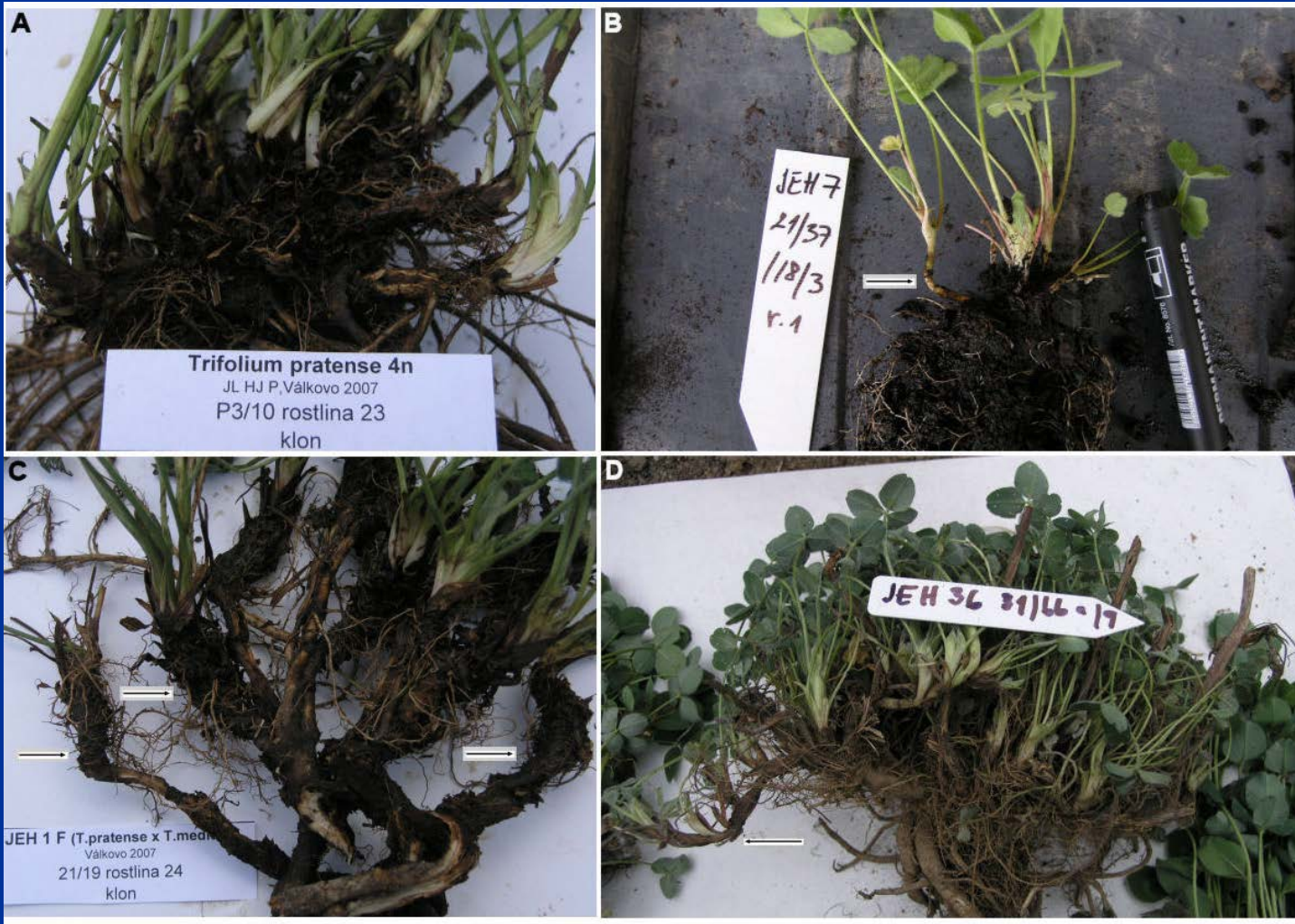




Hodnocení 15 morfologických a agronomických znaků (3 roky)



Kořenový systém hybridů ve srovnání s rodiči



Charakter trsu hybrida



T. medium



Rod *Lotus*

Řešený problém a výchozí stav

Cíl: *Lotus corniculatus*

introdukce genů pro
nepukavost lusků



Strategie

Materiál

Recipientní *Lotus corniculatus*

$$2n = 4x = 24$$

Donorový *L. ornithopodioides*

$$2n = 2x = 14$$

L. conimbricensis

$$2n = 2x = 12$$

L. uliginosus $2n = 2x = 12$

$$2n = 4x = 24$$

Úspěchy

L. uliginosus (2x, 4x) x *L. corniculatus* **sterilita**

L. conimbricensis x *L. corniculatus* **sterilita**

(*L. alpinus* x *L. conimbricensis*) x *L. corniculatus*

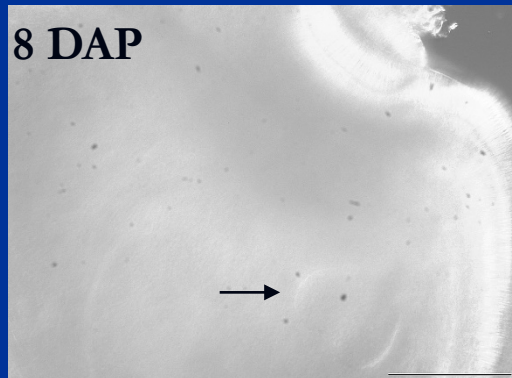
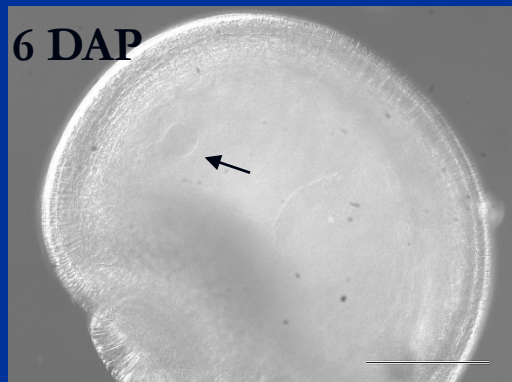


1. Křížení s kastrací
2. Studium prezygotických bariér
barvení láček anilinovou modří
3. Studium postzygotických bariér
Projasňování pletiv chloralhydrátem

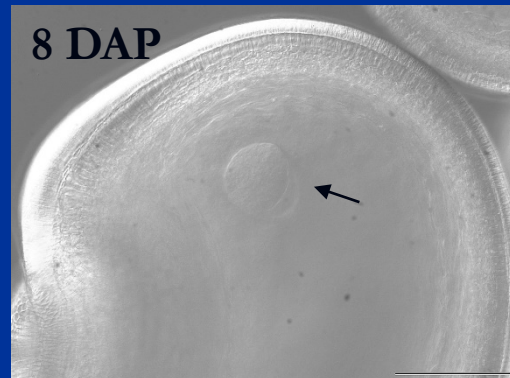
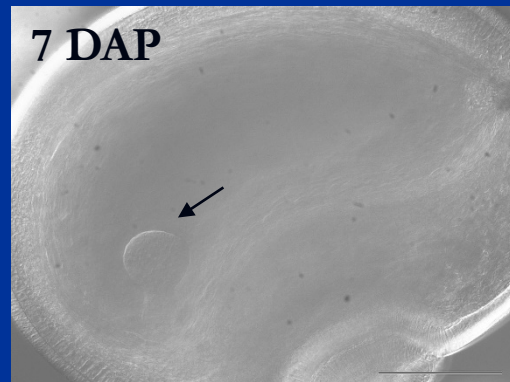
Studium embryogeneze

Chloralhydrát - 24 h fixace, 48 h chloralhydrát

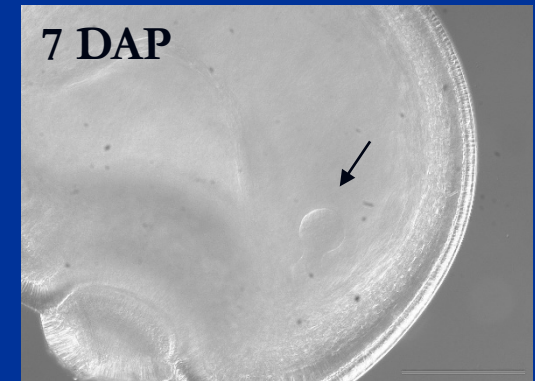
L. corniculatus



L. uliginosus (2x)

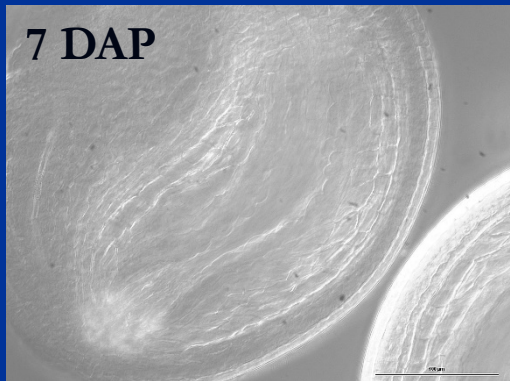


L. uliginosus (4x)



Studium postzygotických bariér po mezidruhové hybridizaci

L. corniculatus × *L. uliginosus* (2x)



L. corniculatus × *L. uliginosus* (4x)

Rod *Hordeum*

Řešený problém a výchozí stav

1. Cíl: Introdukce genů ze zdrojů odolnosti k padlí ječmene (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*)
Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o.
H. vulgare x *H. vulgare* ssp. *spontaneum*
2. Identifikace genů odolnosti prostřednictvím DNA markerů

Strategie řešení

1. Vytvoření vhodných populací pro analýzy
odrůda 'Tiffany' x zdroj odolnosti → F₂
2. Fytopatologické testy – P, F₁, F₂
3. Genetická analýza
Určení počtu genů determinujících odolnost
4. Získání DNA markerů pro ječmen *H. vulgare*
Určení polymorfismu rodičů
5. Určení DNA markerů ve vazbě s jednotlivými geny odolnosti
Analýza bulků – náchylného a odolného
Lokalizace genů na chromozomech ječmene

2) Genomové změny

Polyploidie, haploidie

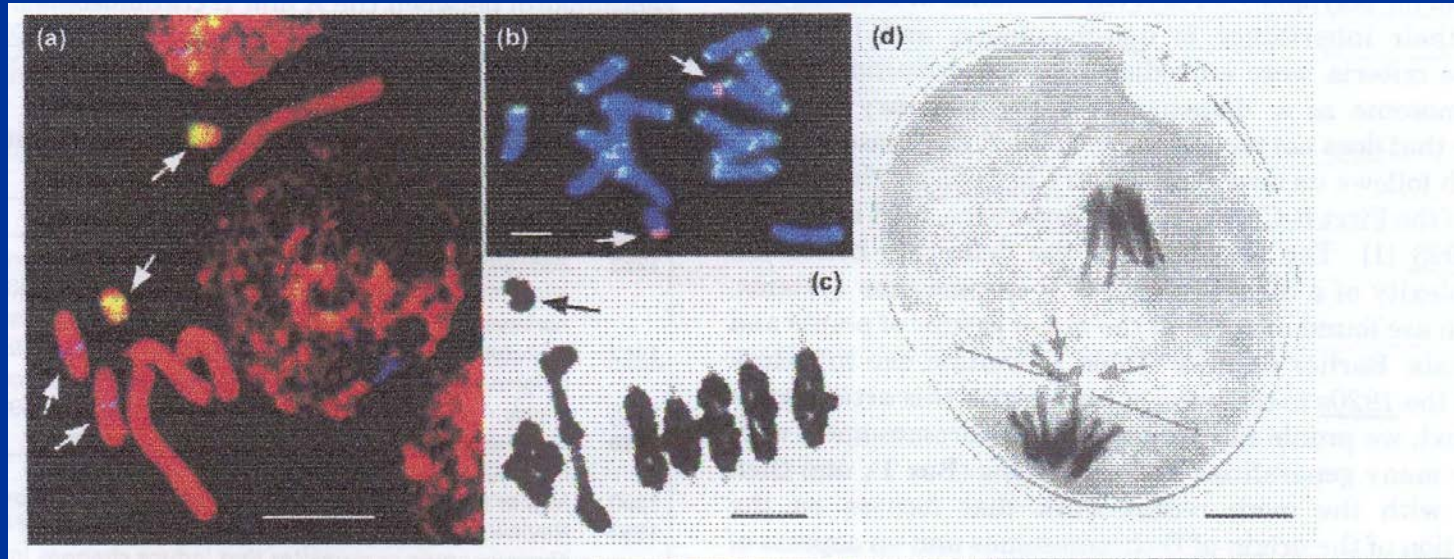
Klasifikace polyploidů – euploidie – ortoploidie
- anortoploidie
- aneuploidie
- endoploidie
- B chromozomy

Autopolyploid, alopolyloid, amfidiploid

Vznik polyploidie

- mitotická – somatická
- zygotická
- gametická

B chromozomy



- a) *Brachycoma dichromosomatica* (mitóza, 2 B a 2 mikro-B chromozomy)
- b) *Secale cereale* (metafáze, 2 B chromozomy)
- c) *Secale cereale* (metafáze I meiózy, 1 B chromozom, 7 bivalentů)
- d) *Secale cereale* (1. mitóza v pylovém zrně, nondisjunkce B chromozomu)

Výskyt polyploidie

Fixace polyploidie během evoluce → selekční výhoda heterozygotů

- plané druhy
- kulturní druhy

- vznik spontánní
- indukovaný – chlorhydrát, chloroform, fenylmetan, atropin, papaverin, acenaften, kolchicin

Kolchicin – aplikace na vegetační vrcholy (0,5-2%)
– klíčící semena (0,01-0,2%)

kde je maximální počet dělicích se buněk
doba působení – hodiny až dny

Klasifikace aneuploidů - zobrazení chromozomových sad

hypoploidi

2n
diploid



2n - 1
monozomik



2n - 2
nulizomik



2n - 1 - 1
dvojitý monozomik

hyperploidi



2n + 1
trizomik



2n + 2
tetrazomik

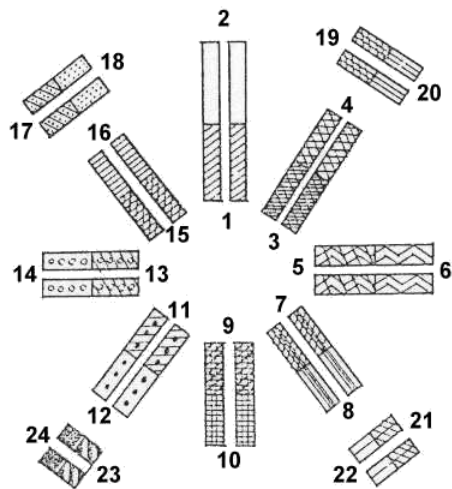


2n + 1 + 1
dvojitý trizomik

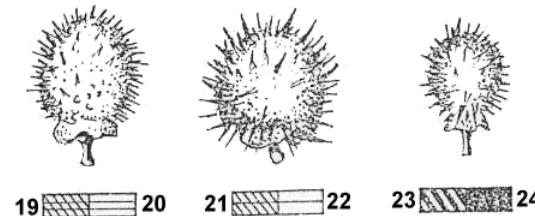
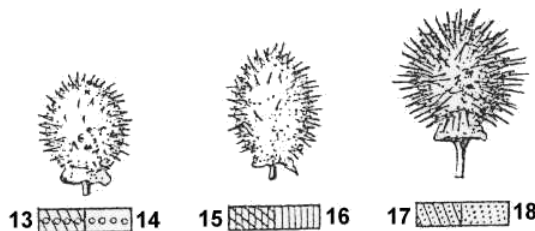
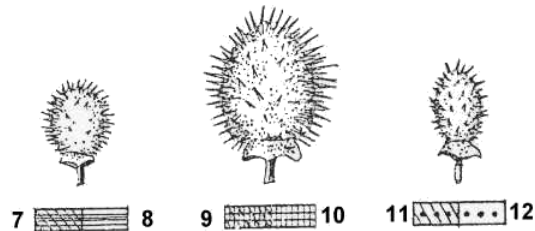
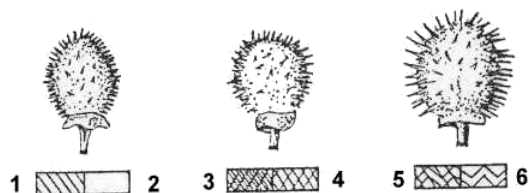
Tvary tobolek u různých typů trizomiků

Datura stramonium

Datura stramonium
normální typ tobolky

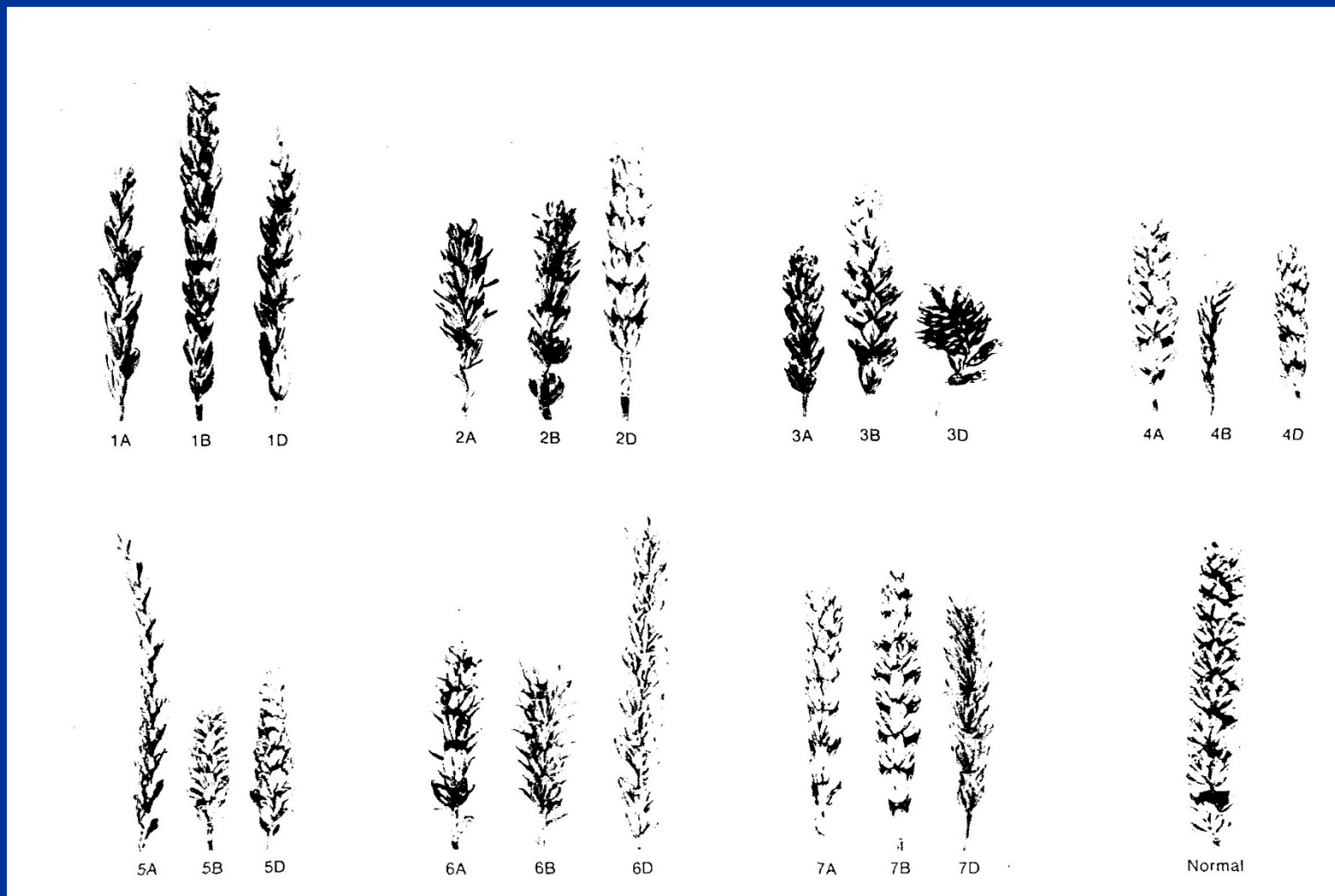


diploid ($2n = 24$)



trizomici ($2n + 1$) a tvary jejich tobolek

Tvary klasů u různých typů nulizomiků *Triticum aestivum*



Lokalizace genů do vazbových skupin pomocí trizomiků

1. Mutace *a* je lokalizována na trizomickém chromozomu

P: *AAA* x *aa*

F1: *AAa* *Aa*

F2:

	<i>2 A</i>	<i>a</i>
<i>AA</i>	<i>2 AAA</i>	<i>AAa</i>
<i>2 Aa</i>	<i>4 AAa</i>	<i>2 Aaa</i>
<i>2 A</i>	<i>4 AA</i>	<i>2 Aa</i>
<i>a</i>	<i>2 Aa</i>	<i>aa</i>

Fenotypové štěpné poměry:

A-- : *aaa* *1* : *0*

A- : *aa* *8* : *1*

2. Mutace *b* není lokalizována na trizomickém chromozomu

P: *AAA BB* x *AA bb*

F1: *AAA Bb* *AA Bb*

F2:

	<i>AB</i>	<i>Ab</i>
<i>AAB</i>	<i>AAA BB</i>	<i>AAA Bb</i>
<i>AAb</i>	<i>AAA Bb</i>	<i>AAA bb</i>
<i>AB</i>	<i>AA BB</i>	<i>AA Bb</i>
<i>Ab</i>	<i>AA Bb</i>	<i>AA bb</i>

Fenotypové štěpné poměry:

AAA B- : *AAA bb* 3 : 1

AA B- : *AA bb* 3 : 1

Využití polyploidů ve šlechtění

Změna celkového habitu rostlin, zvětšení buněk, orgánů – vegetativních i generativních, kvantitativní změny

Vyšší ekologická přizpůsobivost

Lepší křížitelnost

Změny v požadavcích na fotoperiodu

Zvýšení obsahu glycidů, alkaloidů, barviv

Vyšší obsah bílkovin a nižší obsah nestravitelné vlákniny – výhoda u krmných plodin

Optimum 4x, 6x i 3x

Vyšší ploidie – pokles a zpomalení dělicích pochodů v buňkách

- Jetel luční – více zelené hmoty, vyšší zimovzdornost, nižší produkce semen
- Žito – vyšší hmotnost a kvalita zrna, zrna o 50% větší, mouka s lepšími pekařskými vlastnostmi, chleba až o 10% větší objem, vyšší obsah bílkovin
- Len, vinná réva
- Mák setý, proso, pohanka
- Fazol, sója
- Slunečnice
- Cukrová řepa, krmná řepa, melouny – triploidie

Haploidie

monohaploidie $n = x$

polyhaploidie $n = k.x$

Metody získání haploidů

1. Spontánní

2. Dvojčatová metoda (*Poaceae*, *Solanaceae*, *Liliaceae*)

3. Opylení ozářeným pylem

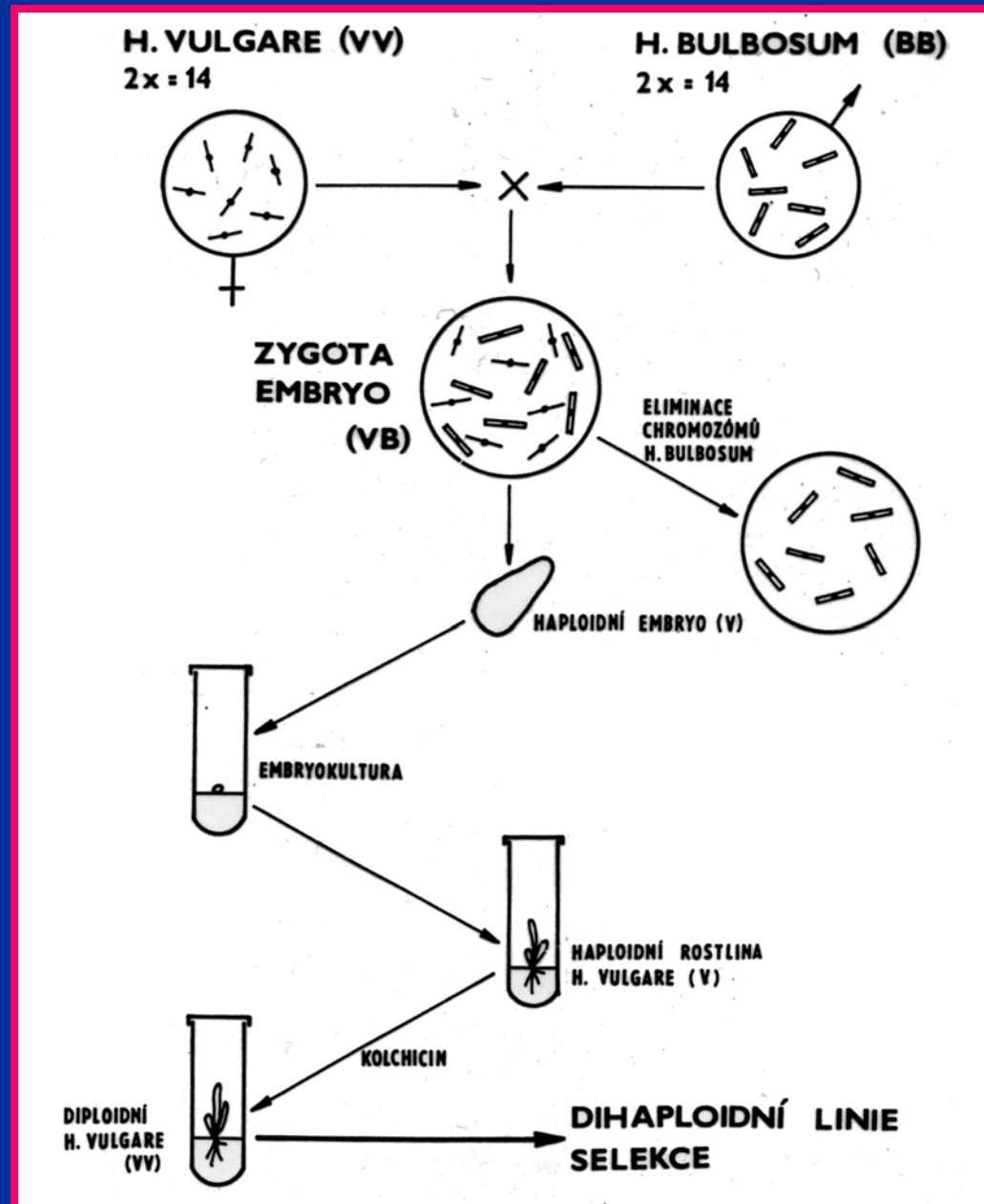
4. Indukce chemickými látkami - aminokyseliny a jejich analogy (alanin, metionin)

5. Mezidruhové křížení a eliminace chromozomů
(rod *Hordeum*, pšenice x kukuřice)

6. Kalusové a suspenzní kultury *in vitro*

7. Pylové a prašnickové kultury *in vitro*
(tabák, ječmen, rýže)

Schéma selektivní eliminace chromozomů a produkce haploidního ječmene po křížení *Hordeum vulgare* x *H. bulbosum*



3) Mutace

Spontánní mutace a domestikace

Table 1. Spontaneous mutations and domestication of crops.

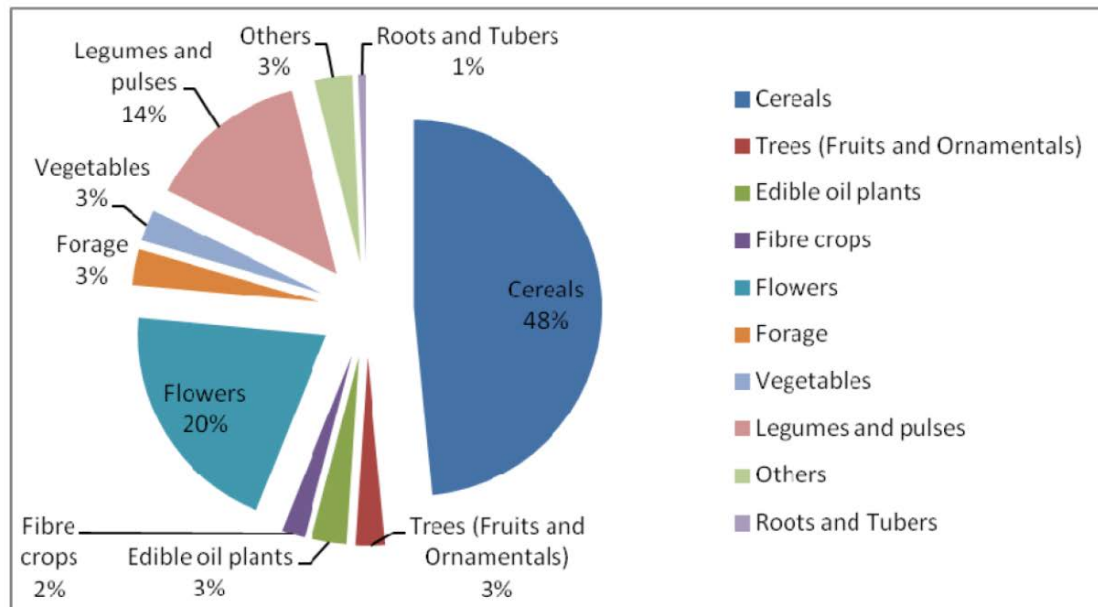
Mutation that facilitated domestication	Examples of plant
Abolishment of bitterness and toxicity	almonds, lima beans, watermelons, potatoes, egg-plants, cabbages nuts
Abolishment of the need for sexual reproduction (seedlessness or parthenocarpy)	bananas, grapes, oranges, and pineapples
Loss of natural seed dispersal mechanism—shattering of pods and heads	peas, wheat, barley
Loss of the hard seed coat and other germination inhibitors (dormancy)	wheat, barley, peas
Facility for self-compatible hermaphroditism	grapes, papaya, <i>etc.</i>

Indukované mutace a šlechtění

Klasická mutagenese

Cíle: Zlepšení výnosu, kvalitativních vlastností – kvalita škrobu, rezistence k chorobám a škůdcům, suchu, bezsemenné plody
Přes 3000 odrůd různých druhů rostlin

Figure 3. Distribution of officially released mutant crop varieties reported on the Joint FAO/IAEA Mutant Varieties Database [42] by crop type and usage.



Food and Agriculture
Organisation of the United
Nations
International Atomic Ener-
gy Agency

IAEA International Atomic Energy Agency

Vídeň

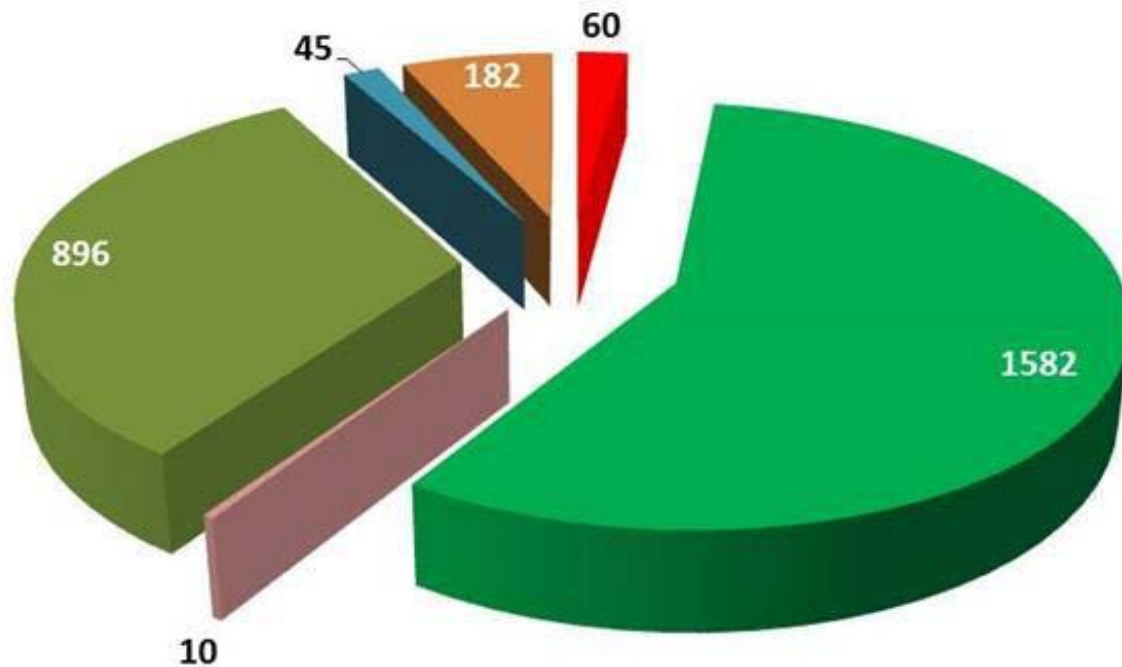
FAO/IAEA program

- <http://mvgs.iaea.org/>
- Databáze mutantních odrůd plodin
<http://mvgs.iaea.org/AboutMutantVarities.aspx>



The Role of Induced Mutations in World Food Security

The Number of Mutant Varieties in Different Continents



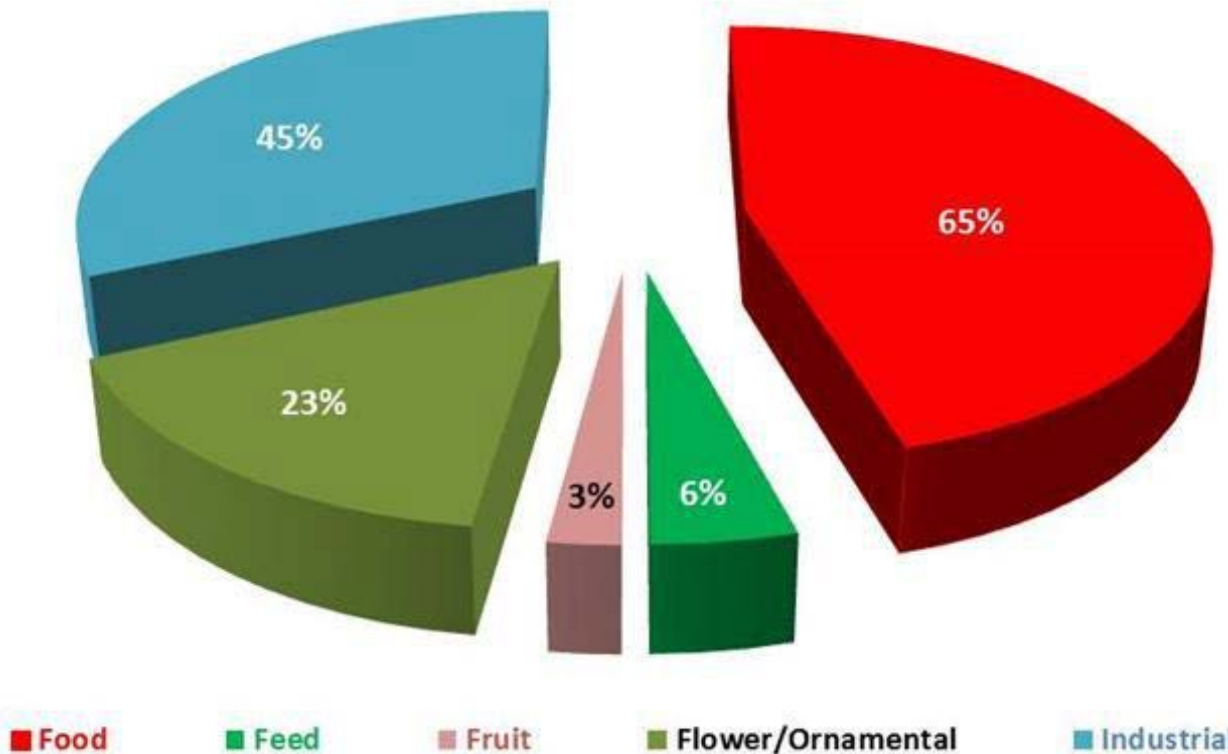
■ Africa ■ Asia ■ Australia & the Pacific ■ Europe ■ Latin America & the Caribbean ■ North America

Source: mvgs.iaea.org

Figure: 04

The Role of Induced Mutations in World Food Security

Proportion of Various Plan Types



Source: mvgs.iaea.org

Figure: 05

Mutageny u rostlin

- **Paprsky X, gama, neutrony, UV světlo**

- **EMS** dodání etylové skupiny ke G, T

záměny na adenin, cytosin

nedochází k posunu čtecího rámce

záměna v tripletu bazí – zastavení transkripce, změněný protein, nový protein

kyselina dusičná – deaminace A, C, efekt jako alkylační činidla

- **Transpozony** – inaktivace genu, změna proteinu, větší přeuspořádání genomu

- **Speciální endonukleázy** – meganukleázy, zinkové prsty

Praktické výsledky mutačního šlechtění

Především diploidní druhy

■ Ječmen jarní

odrůda Pallas – odolná vůči poléhání, r. 1956, Švédsko

odrůda Mari – krátké stéblo, ranost, r. 1961, Švédsko

odrůda Wiensa – odolnost k chorobám, r. 1959, Rakousko

odrůda Allasch – odolnost k chorobám, r. 1964, Německo

odrůda Diamant – z odrůdy Valtický ozářením paprsky X,
odolnost proti poléhání, ČR

■ Ječmen ozimý

odrůda Utta – pevné stéblo, odolnost k vyzimování, r. 1960,
NSR

odrůda Penurad – odolnost k vyzimování, r. 1963, USA

■ Oves setý

odrůda Florad – odolnost ke rzi, r. 1960, USA

■ Hrách setý

odrůda Weibull Stral – odolnost k chorobám, r. 1957,
Švédsko

■ Pšenice setá

P 836 – odolnost k chorobám, r. 1964, Indie

■ Len setý

odrůda Allan - 2010, EMS, nízký obsah kyseliny
 α -linolenové

■ Mák setý

odrůda Norman – 1997, změna alkaloidového spektra -
thebain

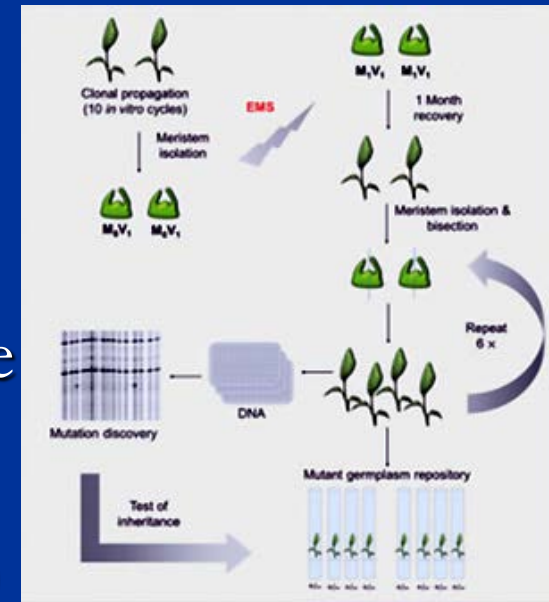
- **Řepka** EMS zvýšení olejové kys. v oleji
- **Rýže** gama zakrslost, zvýšení výnosu, samčí sterilita
- **Slunečnice** X zvýšení kys. olejové a palmitové
- **Jabloň** gama zbarvení plodů
- **Hrušeň** gama rezistence k chorobám
- **Grapefruit** X bezsemennost

Table 4. Some characterized mutant stocks of crops and the host institutions.

Crop	Host institution	Reference
Maize	The Maize Genetics Cooperation Stock Centre, University of Illinois, Urbana/Champaign, IL, USA	[51]
Arabidopsis	European Arabidopsis Stock Centre (or Nottingham Arabidopsis Stock Centre, NASC), University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, UK	[52]
	Arabidopsis Biological Resource Centre, (ABRC) Ohio State University, OH, USA	[53]
Tomato	CM Rick Tomato Genetics Resource Centre, University of California at Davis, CA, USA	[54]
Cucurbits (cucumber, melon, <i>Cucurbita</i> , and watermelon)	Cucurbit Genetics Cooperative (CGC) North Carolina State University Raleigh, NC, USA	[55]
Rice	The Oryzabase of the National BioResource Project— Rice National Institute of Genetics, Japan	[56]
	IR64 Rice Mutant Database of the International Rice Functional Genomics, International Rice Research Institute, Manila, Philippines	[57]
	Plant Functional Genomics Lab., POSTECH BIOTECH CENTER, San 31 Hyoja-dong, Nam-gu Pohang, Kyoungbuk, Korea	[58]
Barley and wheat	Barley mutants, Scottish Crop Research Institute, Dundee, Scotland	[59]
	Barley and Wheat Genetic Stock of the USDA-ARS	[60]
	USDA-ARS Cereal Crops Research Unit, Fargo, ND, USA	[61]
	Wheat Genetics Resource Center, Kansas State University, Manhattan, KS, USA	[62]
	Wheat Genetic Resources Database of the Japanese National BioResource Project	[63]
Pea	Pea mutants, John Innes Centre, Norwich, UK	[64]

Explantátové kultury a mutageneze

- Velké populace jedinců pro mutagenesi
- Zkrácení šlechtění (banánovník, brambor: z 5 let i na 9 měsíců)
- Naklonovaní jedinci, úžlabní pupeny, apikální meristémy, kalusy, prašníky, mikrospory, somatická embrya, suspenze
- Druhy vegetativně i pohlavně množené
- Odstranění chimér (hodně sektoriálních)
- Banánovník, jabloň, ananas, datlovník, brambor, sladké brambory, kasava, karafiát, chryzantéma, růže, tulipán



Reverzní genetika a šlechtění

■ TILLING

Nové fenotypy

pšenice *waxy* složení škrobu

sója mutace *FAD1*, 2, 3 vyšší obsah olejové kys.

sorghum mutace *COMT* méně ligninu

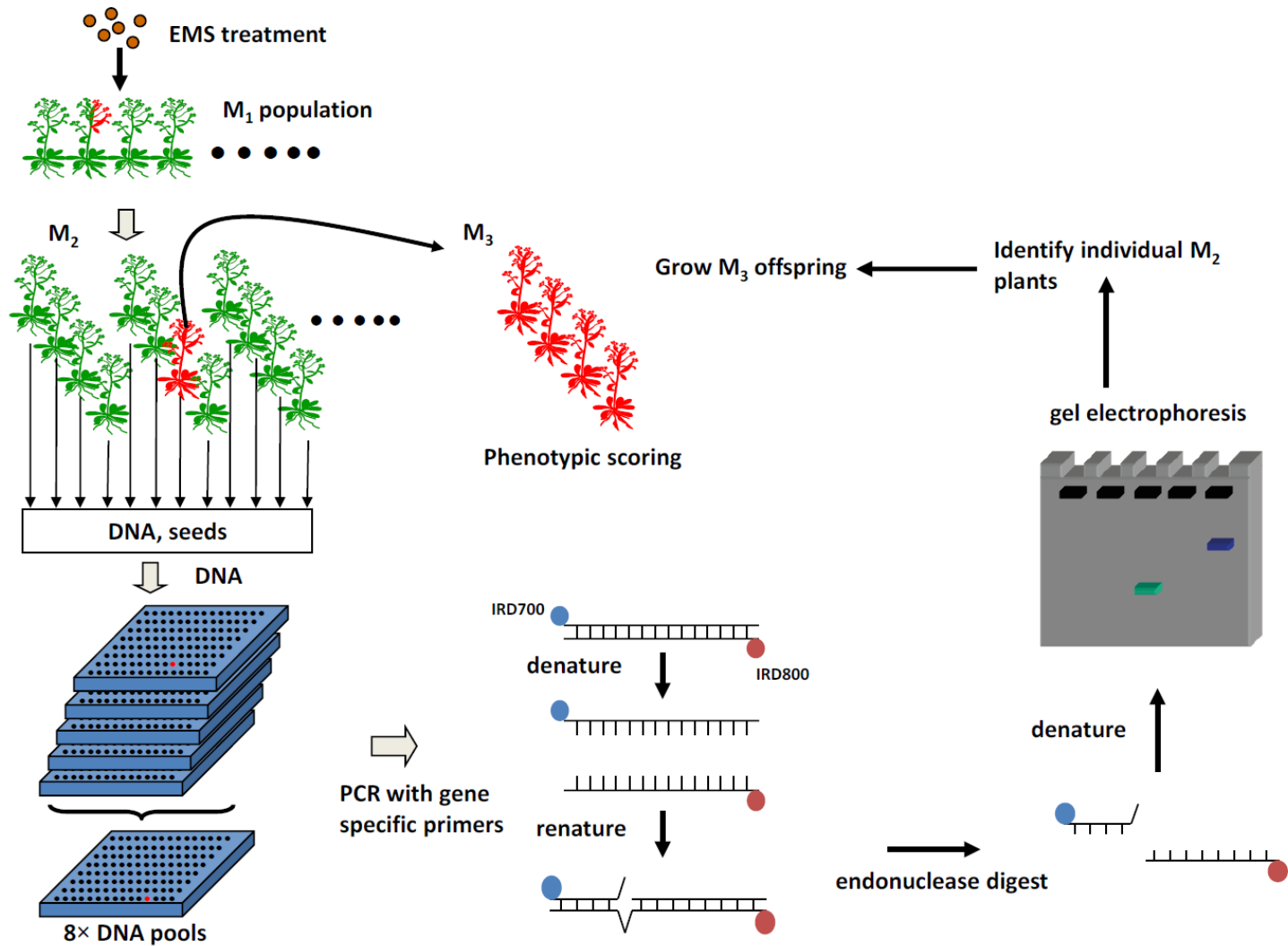
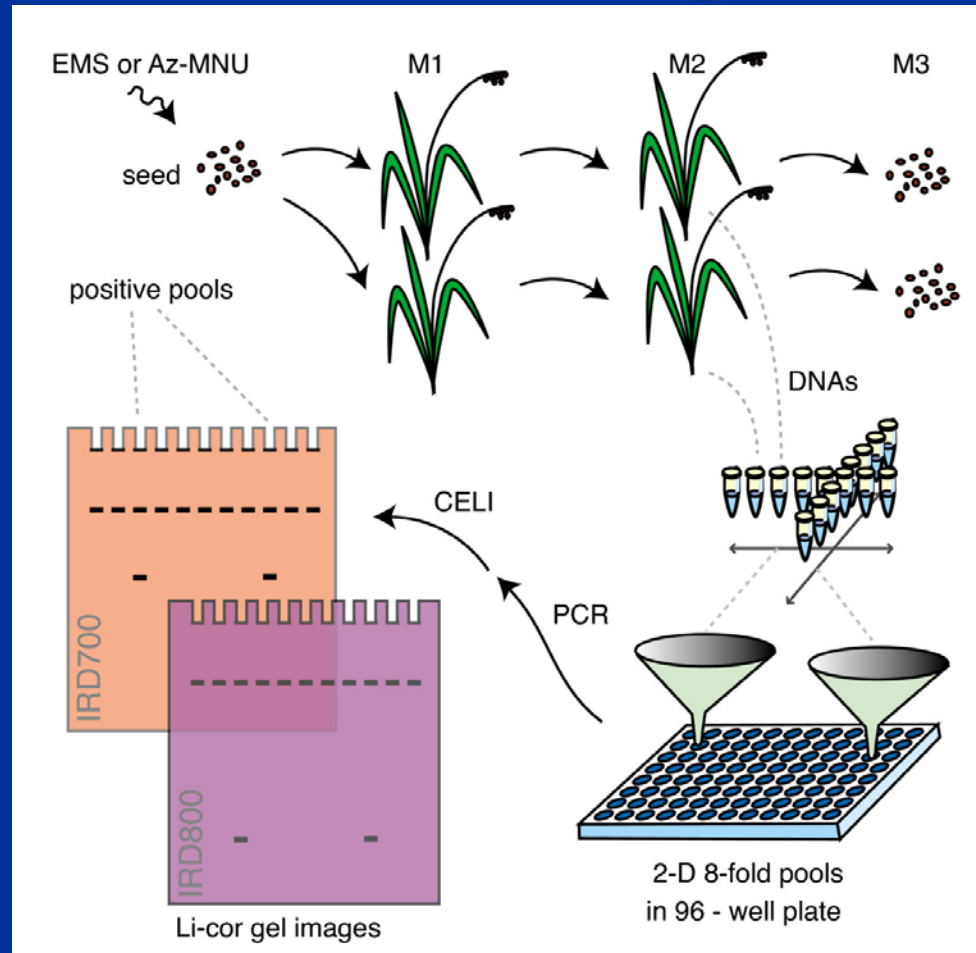


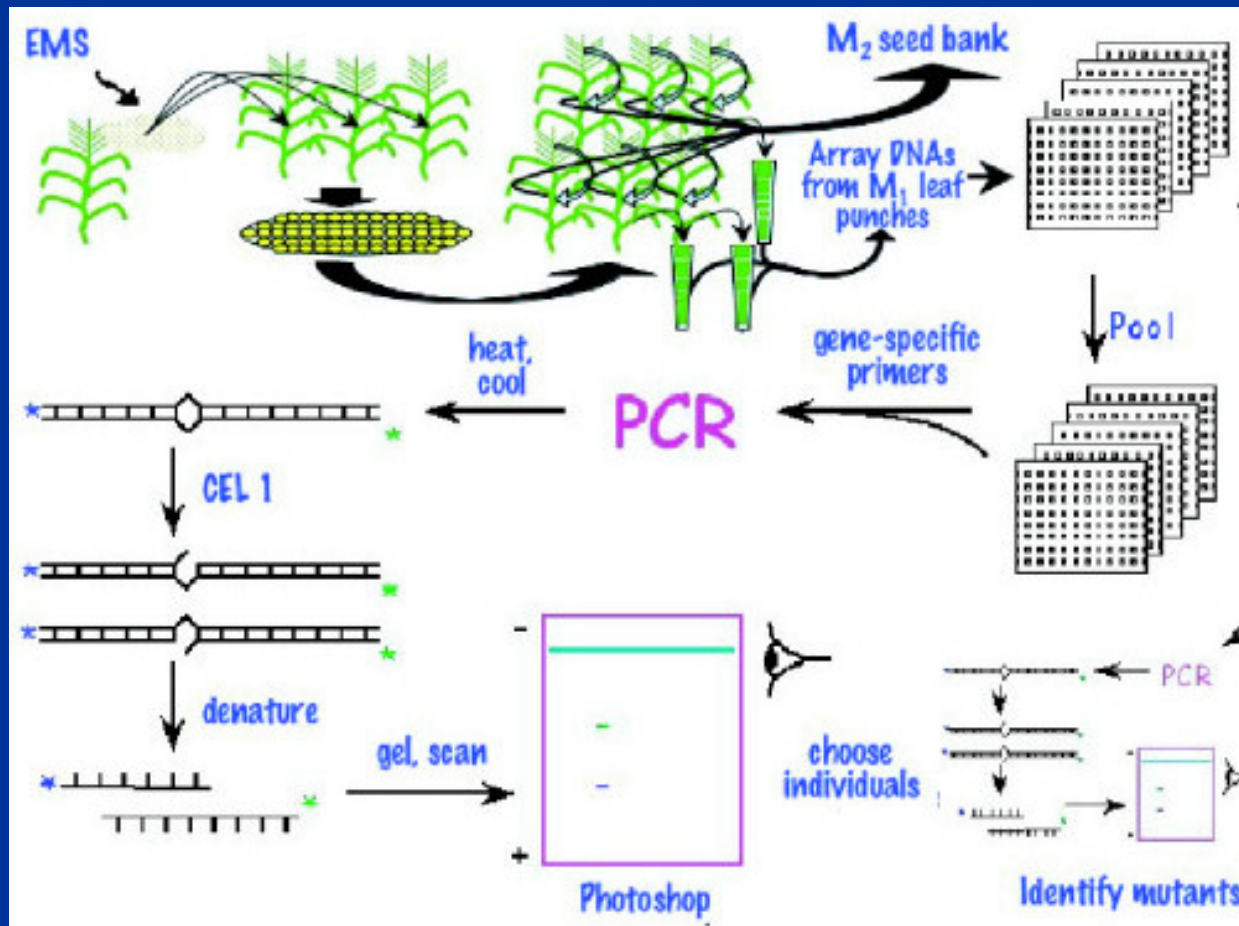
Figure 1: Mutation screening by genotype: High throughput TILLING

TILLING rýže



After seed mutagenesis, chimeric M1 plants are allowed to self-pollinate and a single M2 plant is grown to provide DNA for mutation discovery and seed for banking. DNAs are pooled eightfold and arrayed in a two-dimensional format on 96-well plates. After PCR amplification of target genes, heteroduplexes are formed upon heating and annealing, and then digested using crude celery juice extract containing the CEL I nuclease. Cut strands are separated by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, and visualized by fluorescence detection using a Li-Cor DNA analyzer. The presence of cut products in two pools identifies the individual harboring the polymorphism.

TILLING kukuřice

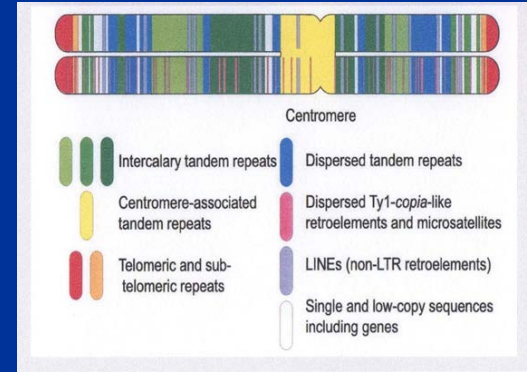


TILLING ve šlechtění

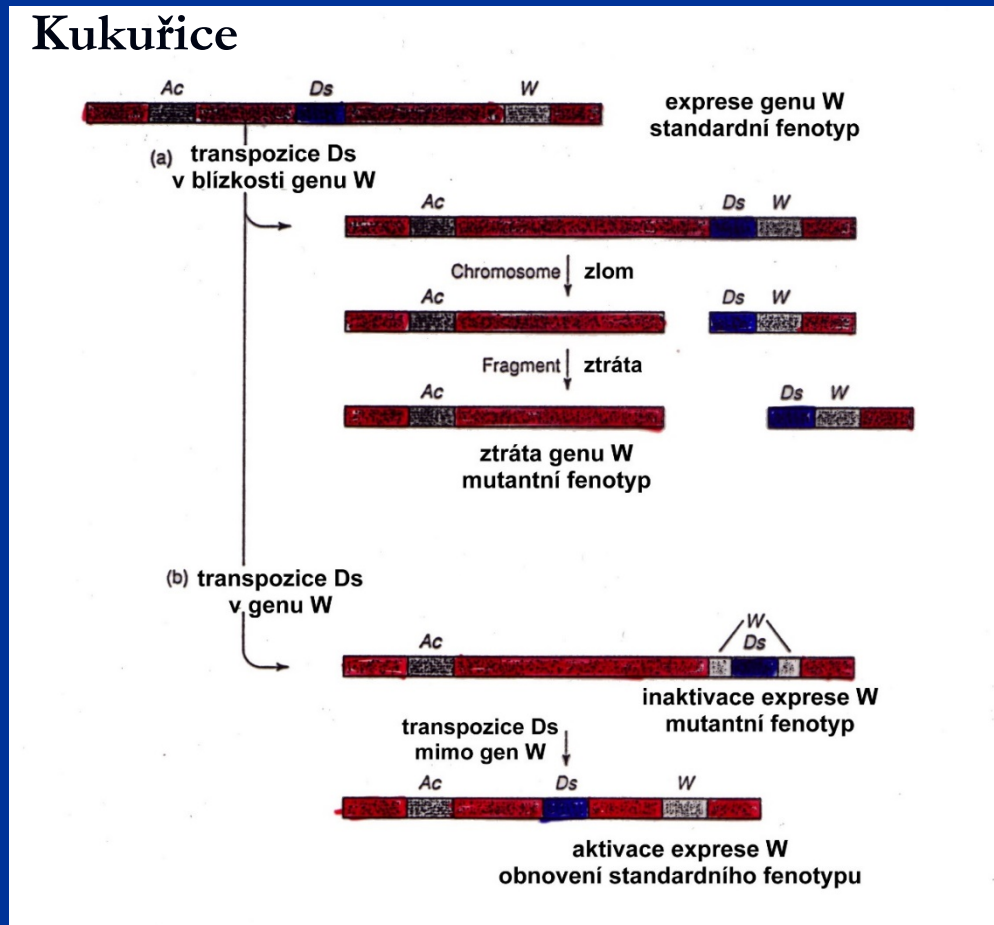
Table 5. Some research and development facilities offering TILLING services.

Plant	TILLING Facility	Reference
Rice, tomato, <i>Arabidopsis</i>	The UC Davis TILLING Core, University of California, Davis, CA, USA	[90]
Tomato	Metapontum Agrobios Centre, Metaponto di Bernalda, MT, Italy	[91]
Maize	The Maize TILLING Project, Purdue University, West Lafayette, IN, USA	[92]
Brassica napus	CAN-TILL, University of British Columbia, RevGenUK, John Innes Centre, Norwich	[93]
Lotus, Medicago, Brassica rapa	Research Park, Colney, Norwich, NR4 7UH, UK	[94]
Arabidopsis	Seattle TILLING Project, Fred Hutchinson Cancer Research Center, North Seattle, WA, USA	[95]
Tomato, Rapeseed, Pea, Medicago and Melon	Plant Genomic Research, INRA/CNRS—URGV, Evry cedex, France	[96]

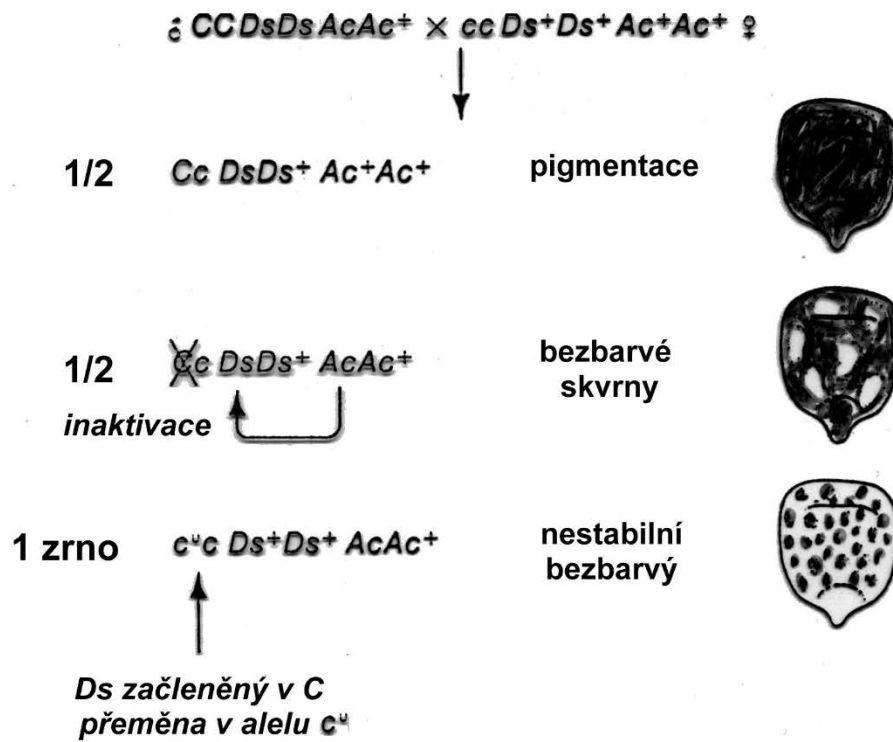
Transpozony a retrotranspozony



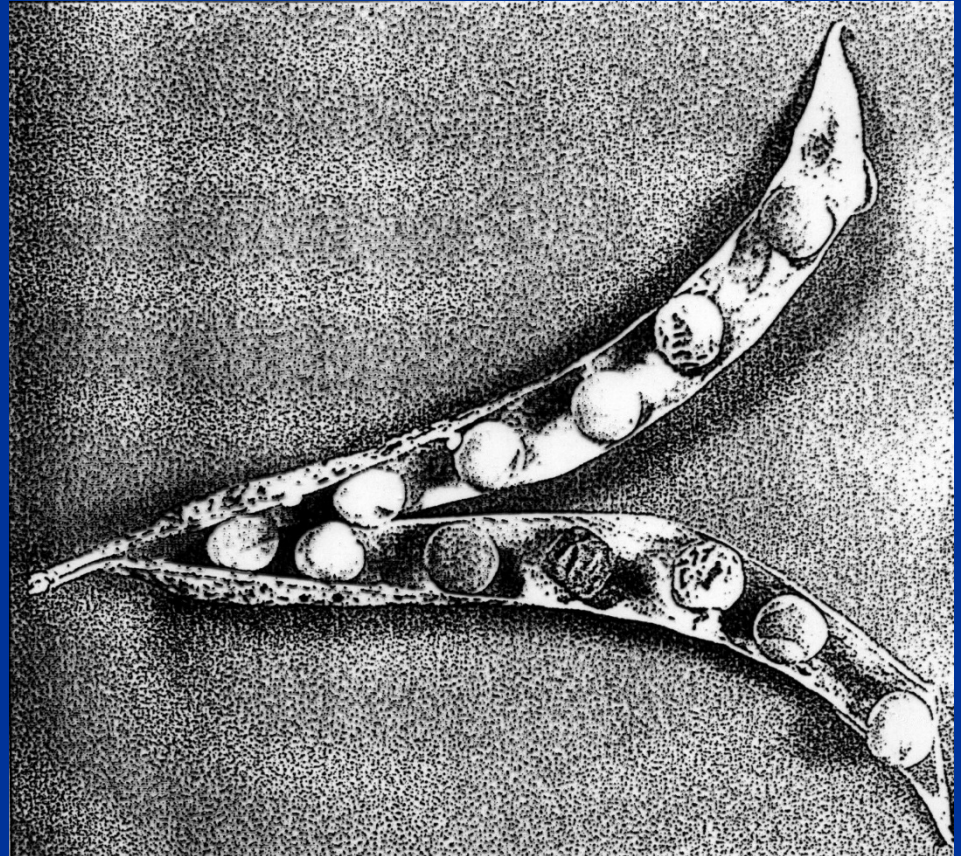
Příčiny nestability fenotypového projevu



Nestabilní fenotypový projev



Hrách *Pisum sativum*
gen *RUGOSUS*
produkt genu enzym
SBEI (starch
branching enzyme)



Hledík *Antirrhinum majus*

Transpozony v genech *pallida*, *nivea*

Tam1 bílé pozadí, červené skvrny

Tam2 bílé

Tam3 světlé pozadí, červené skvrny

slonovinové pozadí, červené skvrny

Heterologní transpozice

Arabidopsis, rýže, tabák, rajče, petúnie, len,
mrkev, brambor, sója

Retrotranspozony u rostlin

Tabák	<i>Tnt1</i>	počet kopií	100
Kukuřice	<i>Ty1 copia</i>		100tis. až 85%genomu
Rýže	<i>Tos17</i>		
Bob setý	<i>Ty1 copia</i>		1mil.
Hrách setý	<i>Ty3 gypsy</i>		5tis.

Rýže

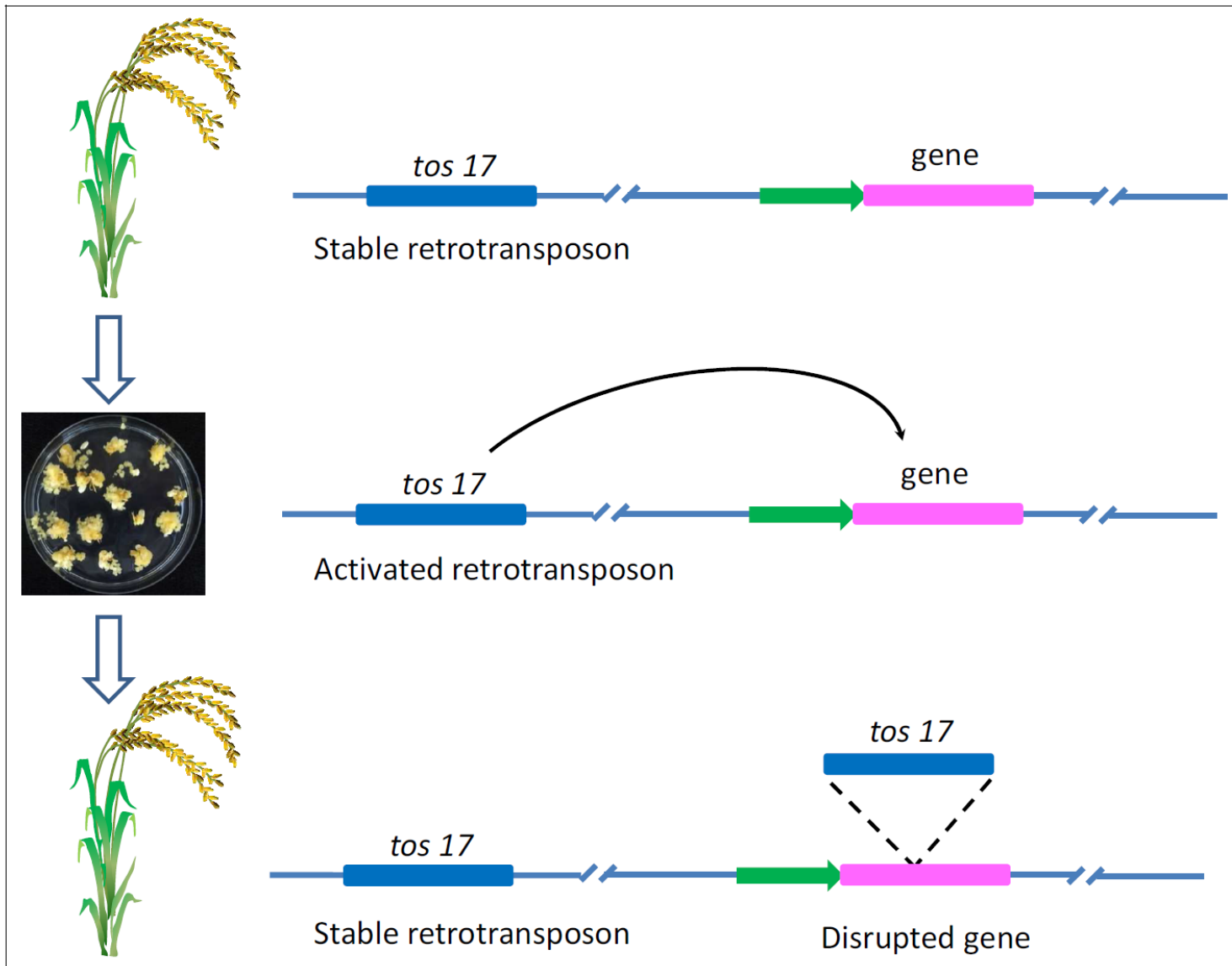


Fig. 4. Scheme for the generation of *tos17* insertion mutant lines by tissue culture.



Changes make a difference!

Mutations are permanent changes in the DNA sequence. Mutations to the order of the A, T, G, C bases can result in different versions of a particular gene. The different versions of a gene are called **alleles**. One reason individuals of the same

species do not have exactly the same traits is because they have different alleles.

The color of fruits and vegetables is usually controlled by more than one gene, and there may be several alleles for each gene. The first cultivated carrots came from the area of Afghanistan and were purple or yellow.

Traders carried them to Europe and the Mediterranean, where mutations occurred or they were crossed with wild varieties. This resulted in the orange carrots we are familiar with. Carrots may be white, yellow, orange, red, or purple, depending on the combination of alleles that they inherit.



Budoucnost

- TILLING
- Uplatnění DNA markerů při identifikaci a analýze mutantů (fingerprint - otisk)
- Sekvenování další generace a charakterizace mutantů