

Časné určení pohlaví u láčkovek (*Nepenthes*) pomocí molekulárního markeru.

Autor:

Miroslav Srba

miroslav.srba@natur.cuni.cz

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Katedra experimentální biologie rostlin

Říjen 2019

Certifikovaná metodika vypracovaná jako výstup projektu MŠMT

Centrum experimentální biologie rostlin UK, LO1417

Oponenti:

Doc. Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D. (Univerzita Palackého, Olomouc) – andrej.pavlovic@upol.cz

Mgr. Dimitrij Tyč (Ústav experimentální botaniky, AVČR, Praha Lysolaje) – TycD@seznam.cz

ISBN: 978-80-7444-072-4

Summary:

This certified method enables early sex determination in *Nepenthes* plants. *Nepenthes* is a carnivorous plant genus covering 170 botanical species, many of which can be hybridized to produce attractive ornamental plants. Since the plants reach the reproductive stage after 5 or many more years, it is important to know the sexes of individual plants as early as possible for the breeders. The method for sex determination is based on the findings of Scharmann et al. (2017). It is independent of using commercial DNA extraction kits compared to the original protocol. The method reduces the required amount of plant tissue for sampling to only 10-15 mg. It is also optimized for hybrid genotypes testing. Use of the method is universal for greenhouse-grown specimens as well as in-vitro grown plantlets.

Obsah:

Úvod	3
Cíl metodiky	3
Popis metodiky	4
Extrakce DNA	4
Extrakční pufr	5
PCR	5
Primery a technická kontrola	5
Nejčastější komplikace a její řešení	5
Srovnání „novosti postupů“ oproti původní metodice	6
Popis uplatnění Certifikované metodiky	6
Ekonomické aspekty	7
Seznam použité literatury	7
Seznam literatury předcházející metodice	7

Úvod:

Láčekovky (*Nepenthes*) jsou tropické masožravé rostliny, které jsou předmětem zájmu jak specializovaných sběratelů, tak pro svůj netradiční vzhled také nezanedbatelnou komoditou v okrasném zahradnictví. Rod čítá v současné době 170 uznaných druhů (Ellison & Adamec 2018). Sběratelsky nejžádanější a též okrasně nejatraktivnější zástupci láčekovek jsou však zpravidla kultivačně náročné rostliny, které vyžadují vysokou vzdušnou vlhkost, poměrně výraznou ozářenost a buď velmi vysoké teploty nebo naopak chladné vysokohorské klima. Druhy ekologicky plastické a díky tomu také kultivačně vděčné jsou však zpravidla vzhledově fádny. Zahradnický trh si proto žádá nové kultivary, které by spojovaly atraktivní vzhled, vitální růst a co nejnižší nároky na pěstební podmínky jak v produkčních zahradnictvích, tak u koncových zákazníků. Kvalitních kultivarů, které by tyto všestranné požadavky splňovaly je zatím k dispozici velmi málo. Přesně plánované šlechtění láčekovek je komplikováno nejen specifickými požadavky výchozích druhů, ale také dvoudomou povahou rostlin, kdy je dílem vyložené náhody, zda se podaří dovést do květu dva exempláře poskytující kýžené vlastnosti a aby byly zároveň opačného pohlaví. Možnost určení pohlaví u rostlin v juvenilním stádiu by pomohlo zacílit na vybrané jedince s kýženým pohlavím, tak aby v případě dosažení reprodukční dospělosti bylo zaručené úspěšné opylování a vznik žádaného potomstva.

Možnost kontrolované selekce pohlaví může být podstatná také pro záchranné programy. Některé druhy láčekovek jsou v přírodě ohroženy vyhynutím. Často se jedná o stenoendemické druhy, vyskytují se na malém území. Nepočtené populace takových endemitů jsou pak snadno zranitelné – jsou velmi citlivé vůči zásahům do ekosystémů (vypalování deštných lesů) nebo sběru pěstiteli či místními pytláky. Jedním z takových případů je situace *Nepenthes clipeata*, která byla v přírodě téměř vysbírána až do počtu méně než 5 přeživších jedinců. Následně byl otevřen záchranný program (www.arkoflife.net) zaštitěný mimo jiné botanickou zahradou v Leidenu (NL). Shromážděná populační skupina *N. clipeata* čítala 12 klonů. Později se ale ukázalo, že všech 12 individuálně vedených linií jsou samčího pohlaví a celá skupina je tak neschopná generativní reprodukce. Podobné situaci může předkládaná metodika zabránit.

Cíl metodiky:

Cílem metodiky je vytvořit protokol umožňující determinaci pohlaví u láčekovek nezávisle na komerčním kitu, jehož dlouhodobá dostupnost není garantována, tj. sestavit protokol využívající běžně dostupné laboratorní chemikálie. Dalším cílem je optimalizace postupu tak, aby bylo potřeba co nejmenší množství rostlinného materiálu, což umožní selekci pohlaví již u poměrně malých semenáčků. Tím se uživateli sníží náklady na jejich předchozí kultivaci a zároveň zefektivní management cílové kultivace (dlouhodobě jsou pěstovány pouze klony kýženého pohlaví; zvýšení efektivity šlechtění atd.). Metodika musí být univerzálně použitelná jak pro botanické druhy, tak pro hybridní genotypy. Vedlejším cílem je nastavení protokolu tak, aby byl použitelný jak pro *in-vitro* materiál, tak pro stanovení pohlaví u vzrostlých exemplářů ze skleníkových kultur, které v některých případech kvetou až po mnoha letech.

Popis metodiky:

Test pohlaví u láčkovek je založen na amplifikaci úseku ortologu AtDYT1. Vzorky jedinců samčího pohlaví poskytují PCR produkt o velikosti přibližně 280-290 bp. Vzorky ze samičích jedinců tento produkt neposkytují. Vzhledem k tomu, že dosud nebyl popsán specifický samičí marker, je zařazena technická kontrola v podobě amplifikace úseku mitochondriální cytochrom oxidázy 1 (COX1, Cho *et al.* 1998). Tato reakce poskytuje produkt o velikosti 600-700 bp vždy. Pokud je amplifikace COX1 pozitivní a pohlavního markeru negativní, lze usuzovat, že výchozí vzorek je samice. V případě, že se nezdaří ani amplifikace COX1, je třeba hledat technickou chybu, viz níže.

Extrakce DNA:

1. Pro extrakci DNA vycházíme z listových pletiv. Vzorky by měly být odebírány z mladých listů, které nesmí vykazovat známky poškození nebo jiných fyziologických poruch (taková pletiva obsahují zvýšené množství sekundárních metabolitů). Velikost vzorku je standardizována na 10 - 15 mg. V případě dostatečného množství materiálu lze vycházet z dvojnásobného množství materiálu (20 – 30 mg), extrakci provádět ve dvojnásobných objemech, což přináší snadnější manipulaci se vzorky.
2. Vzorky jsou umístěny do 2ml mikrozkušavek zn. Eppendorf opatřených zámkem víčka společně se dvěma nerezovými kuličkami, hluboko zmrazeny tekutým dusíkem a následně homogenizovány pomocí kuličkového homogenizátoru.
3. Ke zmrzlému homogenizovanému vzorku je přidáno 150 µl extrakčního pufru (popis viz níže) a vzorky jsou i s pufrem ručně protřepány.
4. Ke vzorku je přidáno 150 µl chloroformu a celá směs je 1 minutu intenzivně vortexována.
5. Tekutá směs je přenesena do nové mikrozkušavky – standardní 1,5ml kónická. Pozn. Tento krok je zařazen pro snadnější manipulaci se supernatantem v kroku 7. V případě, že je k dispozici dostatek materiálu (krok 1), lze extrakci provádět s dvojnásobným množstvím ve dvojnásobných objemech a tento krok (5) je pak možné vynechat.
6. Centrifugace 3 minuty při 12 000 g. Mezitím připraveny popsané mikrozkušavky na další krok.
7. 100 µl horní fáze je opatrně a bez kontaminací mezivrstvou či spodní fází přeneseno do nové mikrozkušavky
8. Přidáno 100 µl vymraženého isopropanolu
9. Centrifugace 5 minut při 12 000 g. Supernatant odstraněn
10. Usazená peleta obsahující DNA 2x promyta 500 µl 70% ethanolu.
11. Po druhém promytí je ethanol bezzbytku odstraněn a vzorky vysušeny prostou ventilací za laboratorních podmínek. Je třeba dbát, aby nedošlo k výraznému dlouhodobému přesušení vzorků, které komplikuje následné rozpouštění DNA.
12. DNA rozpuštěna v 50 µl dH₂O. Pro lepší rozpouštění genomové DNA lze doporučit inkubaci vzorků 10 min při 65°C.
13. Koncentrace DNA ve vzorcích je změřena pomocí spektrometru / nanodropu a normalizována na koncentraci 10 ng/µl. Ukazatel čistoty – poměr absorbance 260/280nm by neměl být nižší než 1,6. Pod touto hodnotou již zpravidla kontaminanty blokují vlastní testovací PCR reakci. Při výše popsaném postupu je zpravidla dosahováno hodnot 1,8 - 2,0

Extrakční pufr:

Složka	koncentrace	navážka na 100 ml roztoku
Tris-HCL (pH 7,5)	200 mM	3,15 g
NaCl	250 mM	1,45 g
EDTA	25 mM	0,073 g
SDS	17,3 mM	0,5 g
PVP	5 %	5 g
sorbitol	175 mM	3,19 g

PCR:

Složení reakce (30 μ l)

0,9 μ l DNA templát (10 ng/ μ l)
1+1 μ l primery (forward + reverse; 10 mM)
1 μ l dNTPs (10 mM)
3 μ l MgCl (25 mM)
3 μ l pufr pro dreamTaq polymerázu (10x)
20 μ l dH₂O
0,1 μ l dreamTaq polymeráza

Program PCR:

Iniciační zahřátí: 95 °C 2 min.
1. denaturace 95 °C 30 s.
2. annealing 50 °C 30 s.
3. polymerace 72 °C 1 min.
4. opakování kroků 1.-3. 35x
terminace 72 °C 5 min -> vzorky zchlazeny na 4 °C

Primery a technická kontrola:

Pohlavní marker (ortolog AtDYT1):

Forward: AATTCAGTATTCGGATCACG

Reverse: CGATCGCGTCGCAAAGTATG

Technická kontrola (mitochondriální cytochrom oxidáza 1):

Forward: GGAGGAGTTGATTTAGC

Reverse: AAGGCTGGAGGGCTTTGTAC

Nejčastější komplikace a její řešení:

Nejpravděpodobnější komplikací testu je přetrvávající kontaminace DNA vzorku sekundárními metabolity z výchozích pletiv. Tato situace může vzniknout zejména v případě, že výchozí rostliny byly nějakým způsobem významně stresovány. Během optimalizace metody bylo zjištěno, že vlastní PCR reakce poskytuje spolehlivé výsledky při výchozím množství templátu 5 – 20 ng DNA získané výše popsaným protokolem. Optimální množství se zdá být 8 - 10 ng při 35 cyklech PCR. V případě, že kontrolní reakce neposkytne produkt COX, lze doporučit snížit množství templátu na 5 ng a zvýšit počet cyklů PCR reakce na 40.

Srovnání „novosti postupů“ oproti původní metodice:

První publikace naznačující objev genetického pohlavního markeru u láčkovek publikovali Sudmoon a kol. (2007). Tato studie však byla zjevně založena na příliš malém vzorku, a proto navržená metodika nebyla univerzálně použitelná (zkoušeno v naší laboratoři).

Předkládaná metoda je založena na výsledcích práce Scharmanna a kol. (2017). Pohlavní marker popsán v této publikaci vychází z velmi široké studie transkriptomu láčkovek a byl původními autory otestován na širokém souboru jedinců náležejících k 22 různým druhům. Autoři jak v citované publikaci, tak v osobní komunikaci uvádějí, že se jim nedařilo získat DNA extrakty vhodné pro další PCR jinak než jedním konkrétním komerčním kitem. Jeho dlouhodobá dostupnost pochopitelně není garantována. První inovací předkládané metody je proto extrakce DNA z listů láčkovek založená na běžně dostupných chemikáliích. Zatímco původní publikovaný protokol vycházel z 50 mg rostlinného pletiva, námi vyvinutý postup extrakce umožnil nastavit podmínky pro snížení požadovaného vzorku až na 10 - 15 mg. Tato druhá inovace umožňuje selekci pohlaví již u semenáčků o průměru listové růžice kolem 10 - 15 mm. Taková velikost semenáčků je dosažena o řadu měsíců dříve než velikost rostlin umožňující odběr 50mg vzorků. Tím se zásadně snižují náklady na předchozí kultivaci, zejména při kultivaci *in-vitro*, která je nejpoužívanější technikou množení láčkovek. Třetí úpravou původního protokolu je optimalizace pro hybridní genotypy. Původně publikovaný protokol popisuje simultánní amplifikaci pohlavního markeru a kontrolní COX1 v jedné PCR reakci za současného použití 2x2 primerů. Sekvenční podobnost amplifikovaných úseků není u láčkovek pravděpodobně úplně dokonalá a proto kombinace 4 primerů a 4 různých templátů v jedné PCR reakci heterozygotních vzorků poskytovala velmi variabilní a těžko interpretovatelné výsledky. Z tohoto důvodu doporučujeme provádět amplifikaci pohlavního markeru (DYT1) a kontrolní COX1 v oddělených reakcích, tedy pouze s příslušným párem primerů. V tomto uspořádání jsou výsledky naprosto reprodukovatelné a jednoznačně interpretovatelné u všech testovaných hybridních (i botanických) genotypů. Předložený inovovaný protokol byl úspěšně otestován na 45 různých genotypech (druhy / hybridy) s fenotypově známým pohlavím. Byly testovány vzorky z rostlin napěstovaných *in-vitro* ve třech různých kultivačních místnostech dvou laboratoří a též na rostlinách napěstovaných ve třech různých sklenících. Lze se proto domnívat, že protokol je dobře univerzálně použitelný.

Popis uplatnění Certifikované metodiky:

Předkládaná metodika nachází uplatnění především u komerčních pěstíren zabývajících se množением láčkovek. Velmi efektivní je výběr pohlaví u malých semenáčků, které bývají základem dlouhodobě *in-vitro* množných linií. Pěstitel tak může cíleně množit, případně inzerovat rostliny známého pohlaví, a to ještě dříve, než zástupci dané linie fyziologicky vykvetou. Dalším přesahem je selekce pohlaví pro pěstírny aktivně se zabývající šlechtěním láčkovek. Dosud bylo designování komplexnějšího křížení láčkovek limitováno náhodou, zda se v dalších generacích podaří sestavit pohlavní pár kýžených genotypů. Díky předkládané metodice je možné velmi brzy u výchozích genotypů vyselektovat obě pohlaví a vybrané rostliny dopěstovat do reprodukční zralosti zcela cíleně.

Druhým využitím metodiky jsou záchranné programy ohrožených druhů láčkovek. Díky předkládané metodice je možné kontrolovat zastoupení obou pohlaví v kultivovaných skupinách a zajistit tak možnost generativní reprodukce vymřením ohrožených druhů.

Ekonomické aspekty:

Popsanou metodu lze provádět v jakékoliv základně vybavené molekulárně-biologické laboratoři (PCR cykler, centrifuga, spektrofotometr, sada pipet, elektroforéza a zařízení pro její interpretaci). Příslušné vybavení lze pořídit v závislosti na cenové nabídce v řádu 150 - 200 tis. Kč.

Cena zpracování jednoho vzorku (extrakce DNA + PCR reakce) se díky optimalizovanému postupu extrakce DNA snižuje ze 135 Kč (v případě použití komerčního kitu) na 75 Kč. Uvedené cenové kalkulace jsou orientační ($\pm 20\%$) a závisí na aktuální cenové nabídce dodávaných chemikálií a laboratorního plastu.

Předkládaná metodika umožňuje pohlavně třídit semenáče láčkovek v mnohem menší velikosti než původně publikovaný protokol (Scharmann et al. 2017). Nejčastěji používaný postup výsevů láčkovek je metoda *in-vitro*. Díky nové metodice je možné určit pohlaví u takto pěstovaných rostlin o 5 – 10 měsíců dříve v závislosti na rychlosti růstu testovaných genotypů. Nový postup určení pohlaví proto uživateli ušetří náklady na *in-vitro* kultivaci nezbytnou před výběrem jedinců pro další množení. Tyto náklady je těžké vyčíslit, záleží na rychlosti růstu příslušného genotypu, a především na konkrétním kultivačním zařízení.

Seznam použité literatury:

Ellison, A. M., & Adamec, L. (Eds.). (2018). Carnivorous Plants: physiology, ecology, and evolution. Oxford University Press.

Cho Y, Qiu Y-L, Kuhlman P, Palmer JD. (1998). Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:14244–14249.

Porebski, S., Bailey, L. G., & Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant molecular biology reporter*, 15(1), 8-15.

Štorchová, H., Hrdličková, R., Chrtek Jr, J., Tetera, M., Fitze, D., & Fehrer, J. (2000). An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution. *Taxon*, 49(1), 79-84.

Seznam literatury předcházející metodice:

Sudmoon, R., Tanee, T., Mokkaul, P., & Chaveerach, A. (2007). Species identification and sex determination of the genus *Nepenthes* (Nepenthaceae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10, 561-567.

Scharmann, M., Grafe, T. U., Metali, F., & Widmer, A. (2017). Sex-determination and sex chromosomes are shared across the radiation of dioecious *Nepenthes* pitcher plants. *bioRxiv*, 240259.