

***Praktikum z genetiky rostlin***  
***JS 2006***

- 1. Identifikace transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana***
- 2. Genetické mapování mutace *lycopodioformis* *Arabidopsis thaliana***
- 3. Využití mapovacího softwaru**



# **1. Identifikace transgenních rostlin**

*Arabidopsis thaliana*

**A) Selekcce na médiu s antibiotikem –  
kanamycin, hygromycin**

**Gen *NPT* (*neomycin phosphotransferase*)**

***HPT* (*hygromycin phosphotransferase*)**

**B) Polymerázová řetězová reakce**

**C) Southernova hybridizace**

# A) Postup

## **Materiál:**

**Kontrola Wassilevskaja**

**transformované linie – RJG, ER4, CoY5**

- 1. Příprava selekčního média s antibiotikem a bez antibiotika (kanamycin)**
- 2. Sterilizace semen, metodika**
- 3. Výsev na misky**
- 4. Vyhodnocení klíčících rostlin Kan<sup>R</sup>, Kan<sup>S</sup>**
- 5. Vyhodnocení počtu inzertů Kan<sup>R</sup> : Kan<sup>S</sup>**
- 6. Přesazení rostlin Kan<sup>R</sup>, důkaz PCR**

## **B) Postup PCR pro *NPT***

**Polymerázová řetězová reakce**

**Primery pro *NPT***

**5' CCCGCTCAGAAGAAGAACTCGTCA 3'**

**5' TGGCTGCTATTGGGCGAAGTG 3'**

**Program pro amplifikaci genu *NPT***

**(94°C 45s, 60°C 45s, 72°C 60s) 35x**

## Složení reakční směsi

d H <sub>2</sub> O	5,6	μl
dNTP	0,25	200 μM
5x PCR pufr	2,0	
Primer-1	0,5	
Primer-2	0,5	
Go Taq-polymeráza	0,15	0,75 U
<u>Rostlinná DNA</u>	<u>1,0</u>	
	10,0	

## **2. Genetické mapování mutace *lycopodioformis* *Arabidopsis thaliana***

**Materiál: morfologická mutace *ly***

**Populace F<sub>2</sub>**

**DNA markery – SSR (Simple sequence repeats )**

**mikrosatelity**

**– CAPS (Cleaved amplified  
polymorphic sequences)**

# Columbia

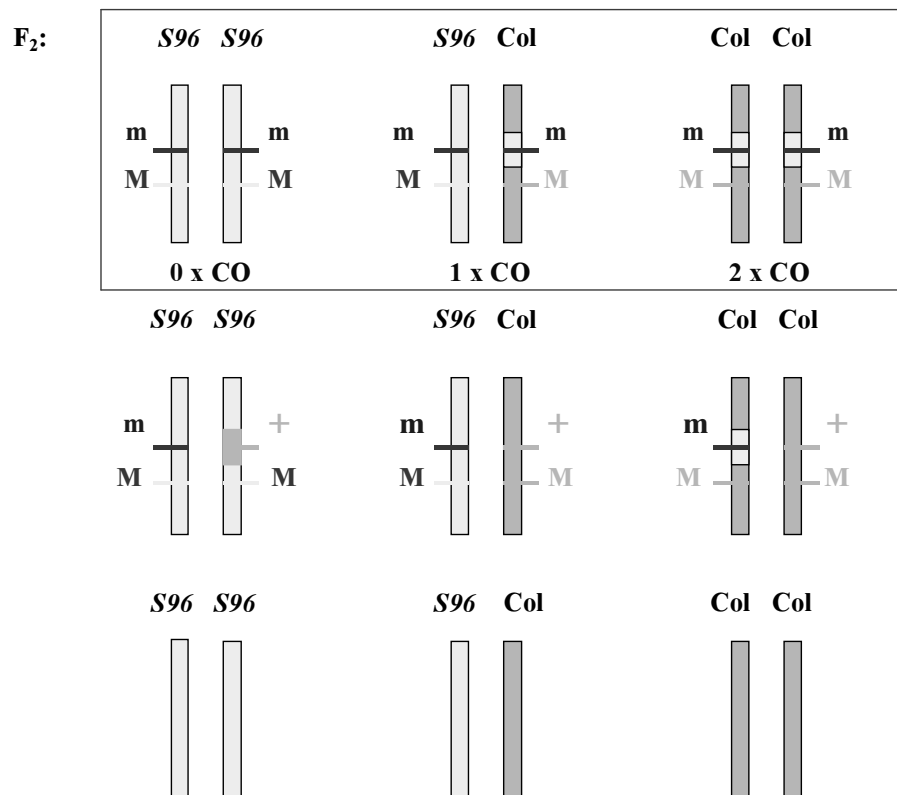
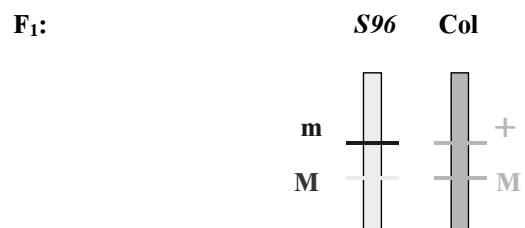
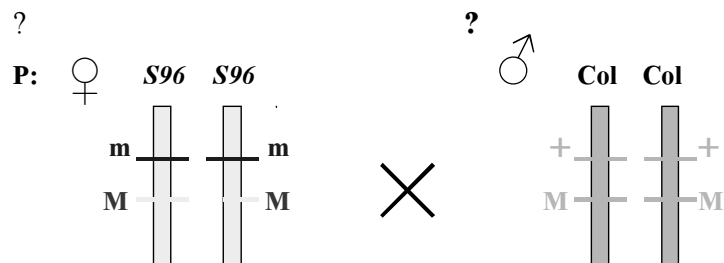


# *lycopodioformis*





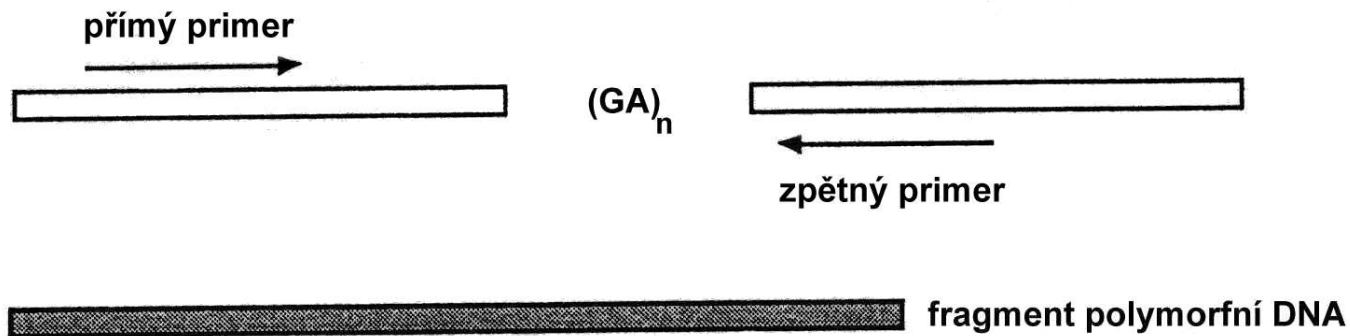
# Křížení polymorfních linií pro genetické mapování



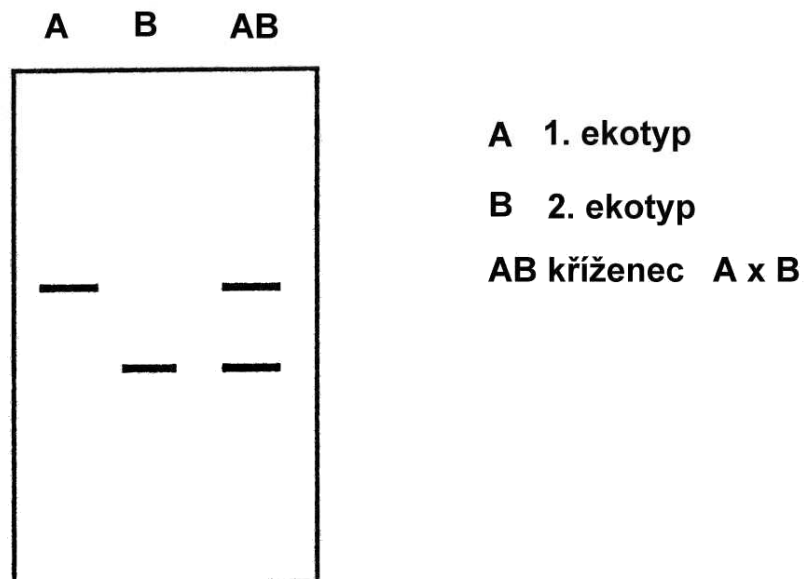
# Typy DNA markerů

## Schéma SSR markerů

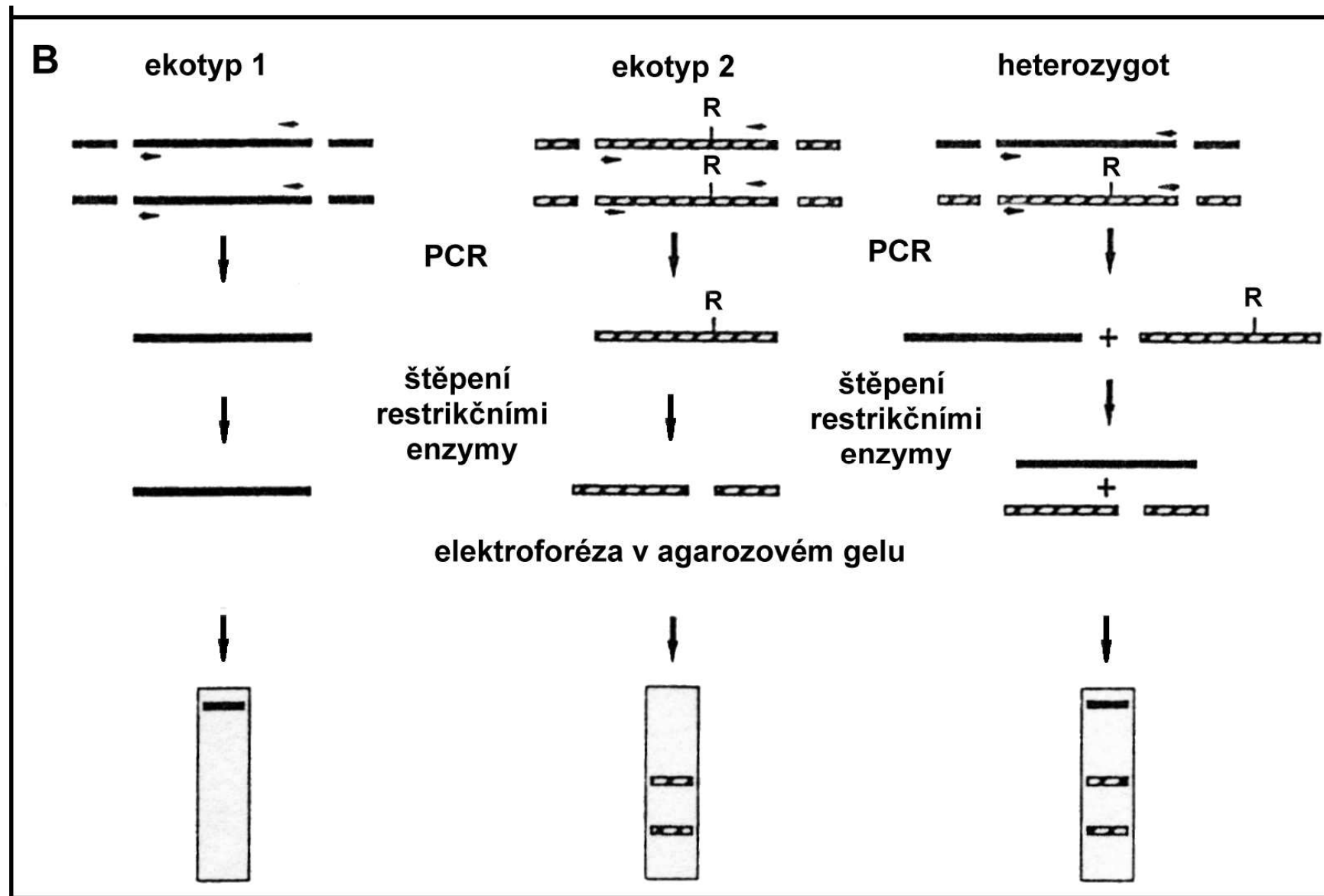
### A PCR



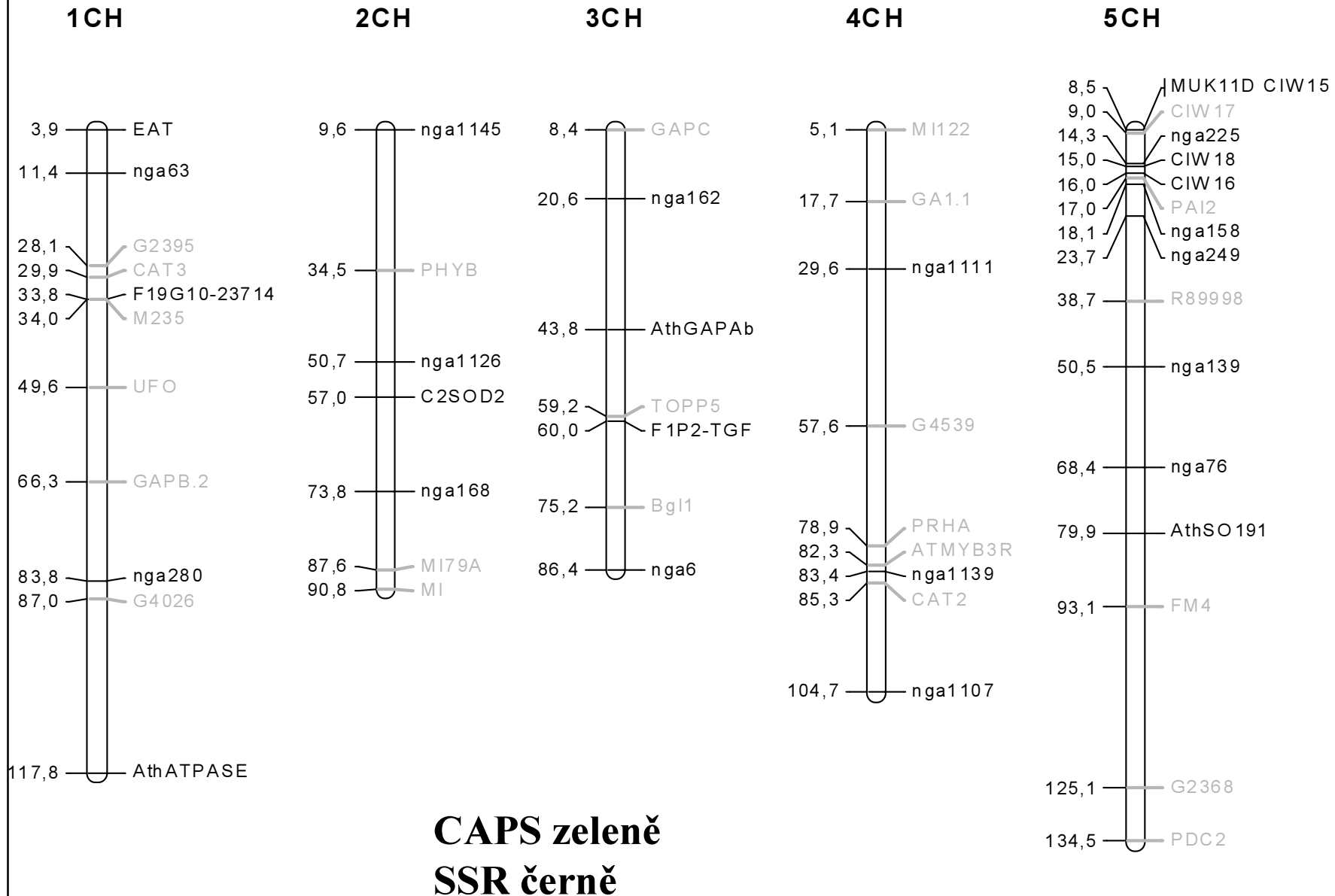
### B Elektroforéza



# Schéma CAPS markerů



# Lokalizace používaných DNA markerů v genetické mapě *Arabidopsis thaliana*



# SSR a CAPS markery použité pro mapování *ly*

## 5. chromozom

Název	Pozice	Typ	Polymorfismus (bp)		PCR cyklus
			Col	S96	
• CIW15	8,5 cM	SSR	177	72	2
• CIW17	9,0 cM	CAPS	2203	1228/805	14
• nga 225	13,3 cM	SSR	119	189	2
• nga 76	68,4 cM	SSR			4
• FM4	93,1 cM	CAPS	630/450	1100	12

# Postup

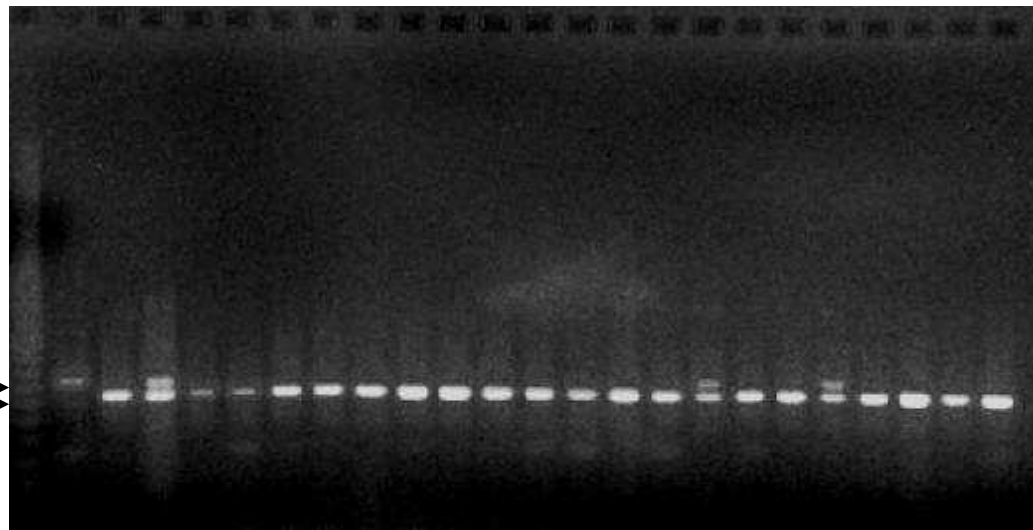
**45 vzorků DNA *ly* z F<sub>2</sub>**

**Kontroly: rodiče, F<sub>1</sub>**

- **Reakční směs pro SSR markery**
- **ELFO**
  
- **Reakční směs pro CAPS markery**
- **Štěpení enzymem AccI 37 °C 3h – CIW17**  
**AflII – FM4**
- **ELFO**

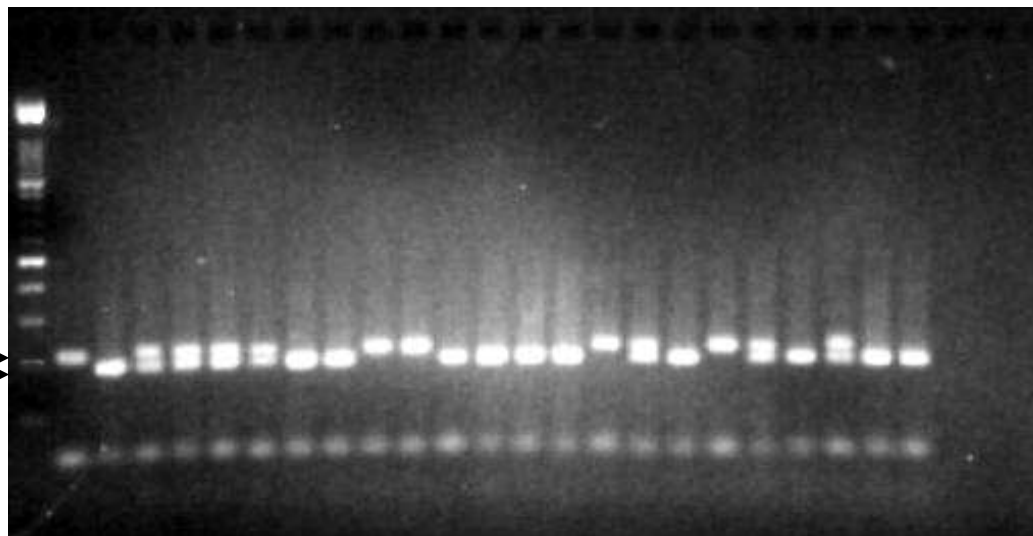
# Segregující populace F2 a molekulární analýza - příklady

M C D H 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



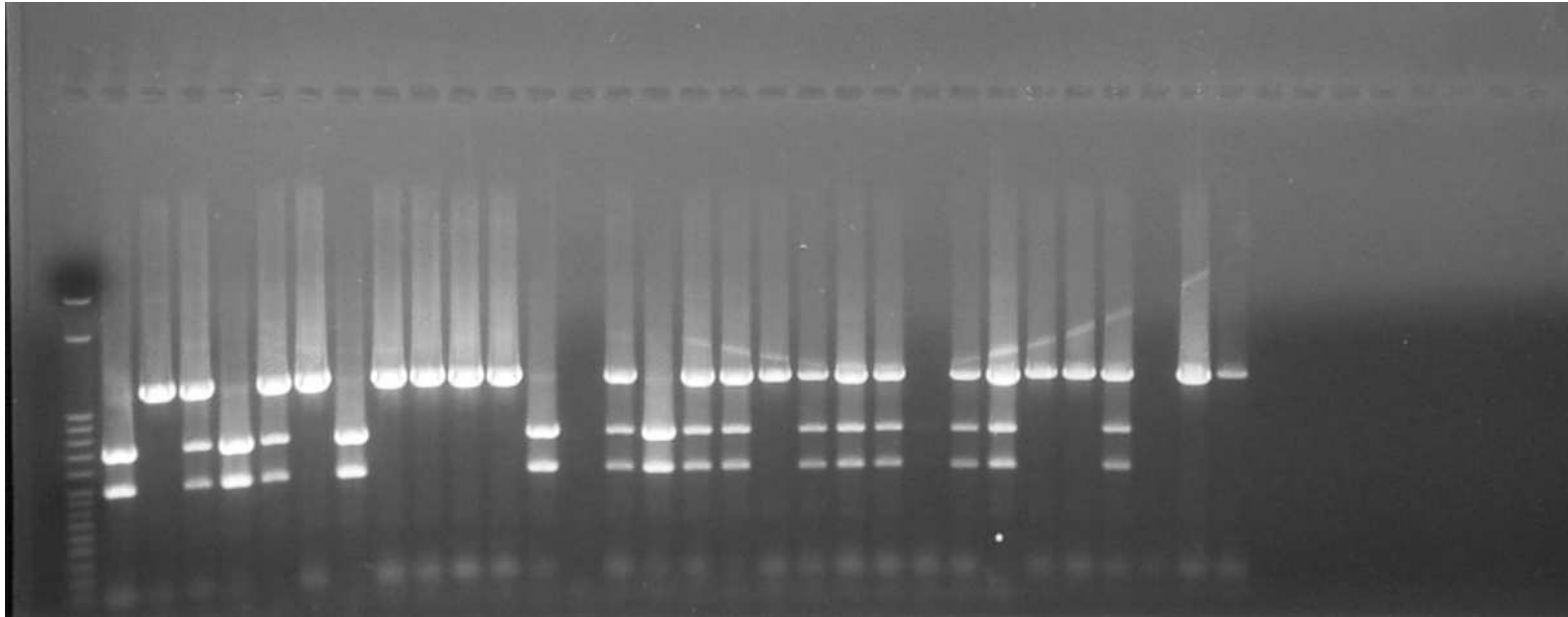
*lc*  
**nga1107**

M L C H 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

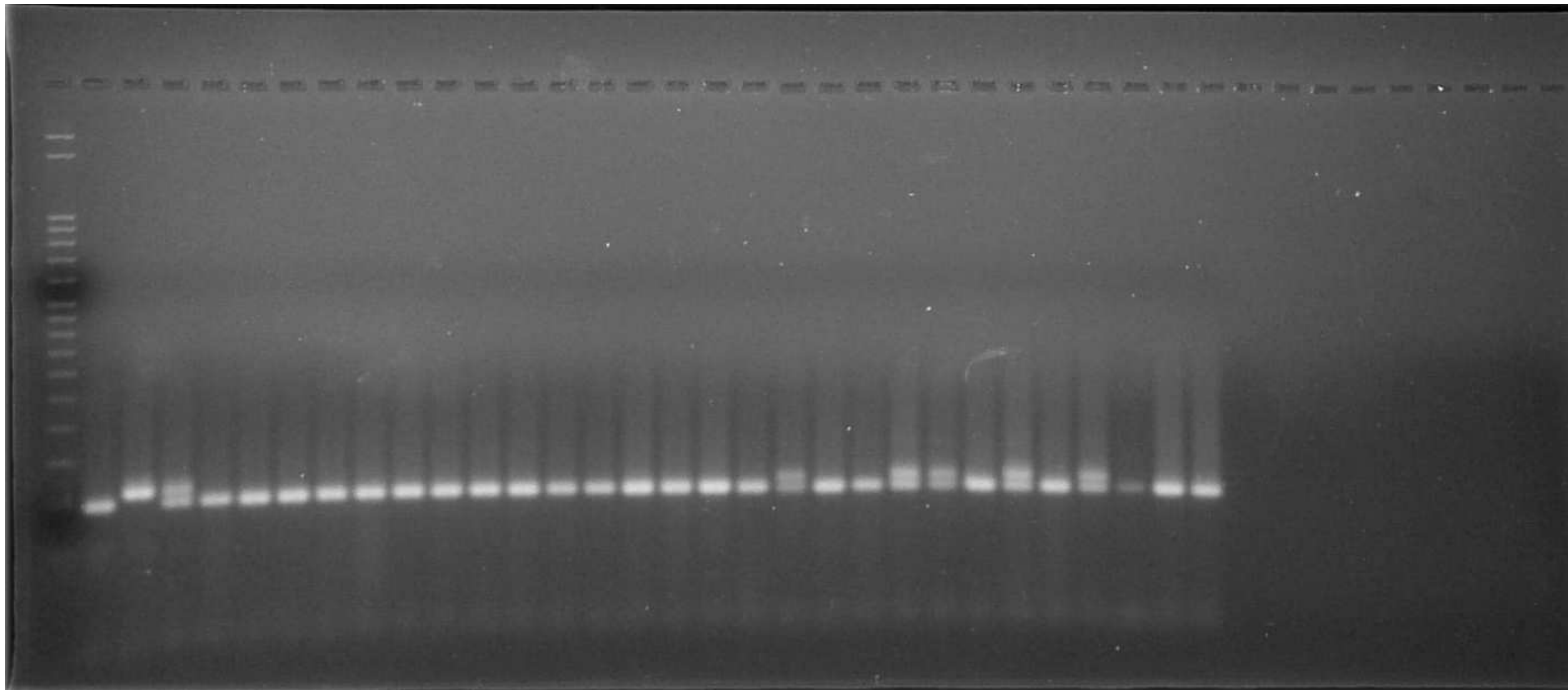


**280-4-8**  
**nga1126**

**GA1.1**



**nga162**





## ***Výpočet podílu rekombinace $r$ :***

$$(1) \quad r = \frac{\sum_i C \text{ chromozomů}}{\sum_j \text{všech chromozomů}}$$

*C...rekombinovaný chromozom*

## ***Výpočet střední chyby podílu rekombinace $s_r$ :***

$$(2) \quad s_r = \sqrt{\frac{r(1-r)}{n}}$$

*n...celkový počet chromozomů*

***Odhad mapové vzdálenosti  $D$  dle Kosambiho mapovací funkce  
(Kosambi, 1944):***

$$(3) \quad D = 25 \ln \left( \frac{100 + 2r}{100 - 2r} \right)$$

***Výpočet střední chyby odhadu mapové vzdálenosti  $s_D$ :***

$$(4) \quad s_D = \frac{2500}{2500 - r^2} s_r$$

# **Využití mapovacího softwaru MapManager**

## **Umožňuje**

- **konstrukci genetických map**
- **lokalizaci genů determinujících sledovaný znak**

## **Co potřebujeme**

- **Segregující populaci získanou křížením 2 rostlin odchylných fenotypů**
- **Genetické markery (DNA)**
- **Hodnocení znaku u rodičovských rostlin, F1 a v segregující populaci**

**Druh – ječmen *Hordeum vulgare***

**Hodnocený znak - odolnost k padlí travnímu**

**Původce padlí travního – *Blumeria graminis*  
f.sp. *hordei* (houba)**

**Populace F2**

**Křížení:**

**náchylná (S)                      x                      odolná (R)**

***H. vulgare* cv. Tiffany x *H. vulgare* ssp. *spontaneum*  
(zdroj odolnosti – divoký ječmen)**



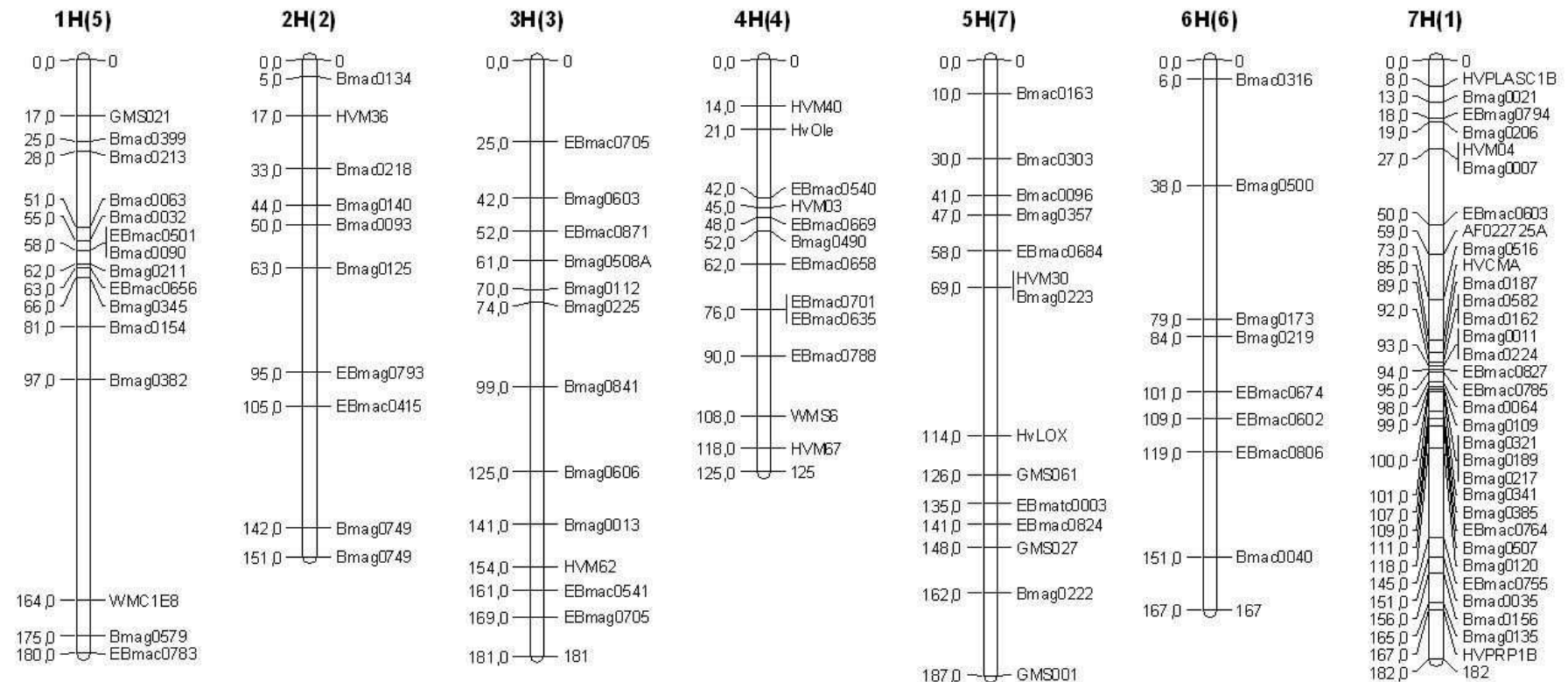
**F1 → F2 (114 rostlin)**

- **Rostliny rodičovské, F1 i jednotlivé rostliny F2 jsou otestovány virulentním izolátem *Bgh***
- **Stupnice hodnocení:**
  - 0, 0-1, 1, 1-2, 2, 2-3, 3, 3-4, 4**
  - 0 až 3 – rostliny odolné,**
  - 3-4 a 4 - rostliny náchylné**
- Tiffany 4**
- Zdroj odolnosti 0**
- F1 0 až 1**
- F2 viz tabulka (114 rostlin)**
- **F2 9 SSR markerů (kodominantní, polymorfní)**

# Úkoly

- 1. Určit počet genů determinujících odolnost k padlí travnímu v uvedeném zdroji odolnosti ječmene, statisticky ověřit**
- 2. Určit typ dědičnosti genu/genů odolnosti**
- 3. Určit SSR markery ve vazbě (použití SW)**
- 4. Se kterými markery jsou vázány geny odolnosti (použití SW)**

# Genetická mapa *Hordeum vulgare* s lokalizovanými SSR markery



Marker RGH1a je kolizován na chromozomu 1H mezi markery GMS021 a Bmac0399