

Praktikum z genetiky rostlin

JS 2008

1. **Genetické mapování mutace**
lycopodioformis Arabidopsis thaliana
2. **Genetické mapování genu odolnosti k padlí**
travnímu u ječmene
3. **Využití mapovacího softwaru**
4. **Identifikace transgenních rostlin**
Arabidopsis thaliana

Genetické markery

Marker (genetický marker)

= signální gen, signální linie

- **morfologické**
- **bílkovinné (izoenzymy)**
- **DNA**
 1. **založené na hybridizaci DNA**
 2. **založené na polymerázové řetězové reakci**
 - amplifikace - specifických sekvencí**
 - náhodných sekvencí**

Vlastnosti markerů

1. vysoký polomorfismus
2. kodominantní charakter dědičnosti
3. častý výskyt v genomu
4. nezávislost na podmínkách prostředí
5. snadná dostupnost
6. snadné a rychlé testování
7. vysoká reprodukovatelnost
8. snadná výměna údajů mezi laboratořemi

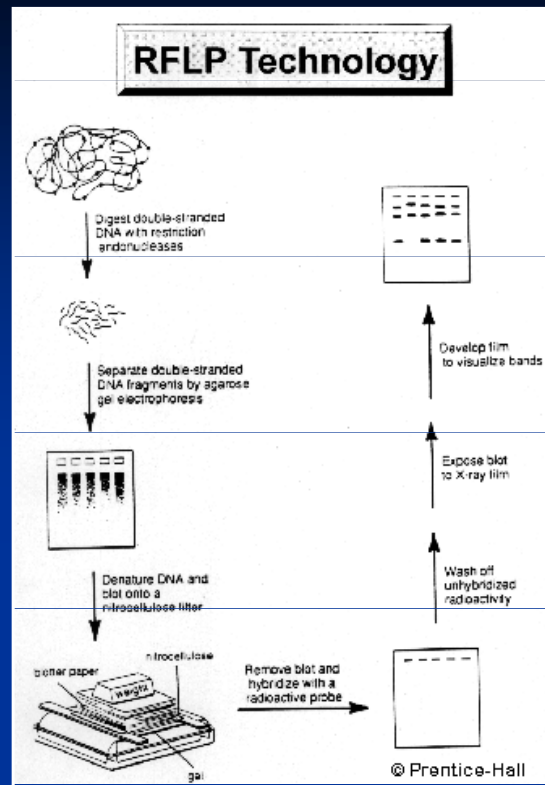
Typy DNA markerů:

- 1. založené na hybridizaci DNA**
- 2. založené na polymerázové řetězové reakci amplifikace - specifických sekvencí
- náhodných sekvencí**

Klasifikace DNA markerů podle použitých sond:

- 1. jednokopiové a vícekopiové sondy
RFLP (Restriction fragment length polymorphism)
CAPS**
- 2. mnohokopiové sondy
mikrosatelity, RAPD, AFLP**

Schéma RFLP markerů



- Izolace DNA
- Restrikční analýza
- Elektroforetická separace
- Přenos DNA na membránu
- Značení sondy
- Hybridizace
- Vizualizace

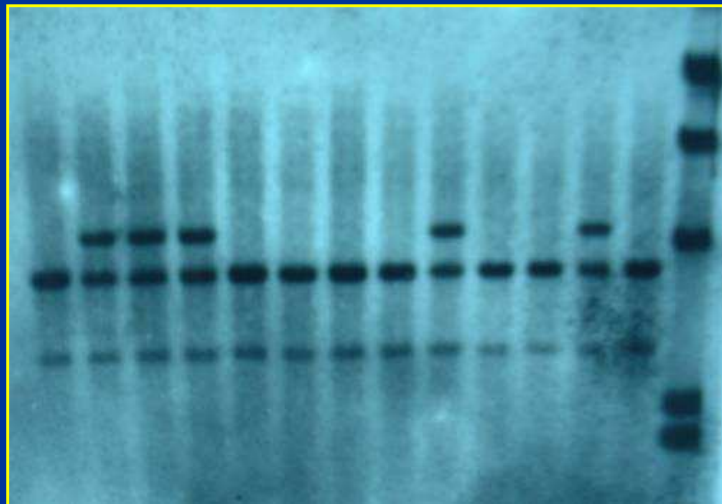
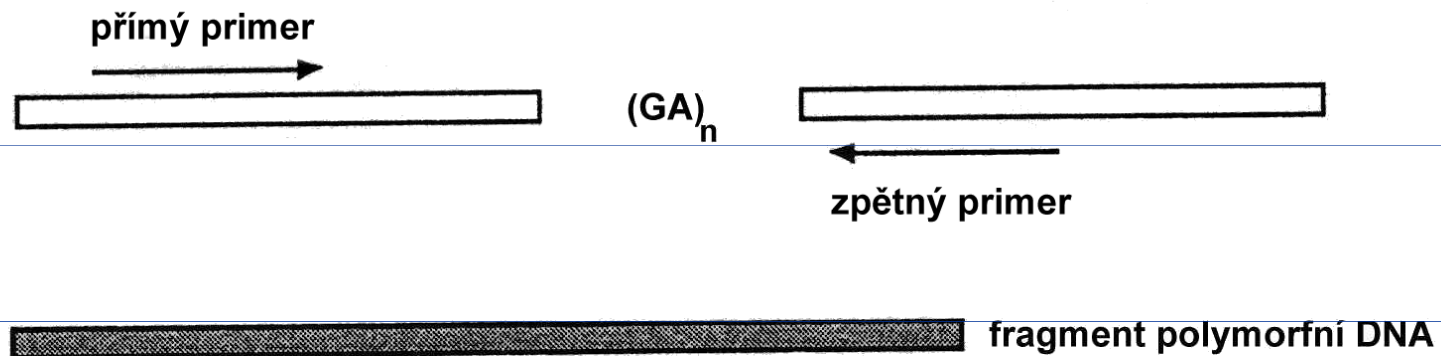
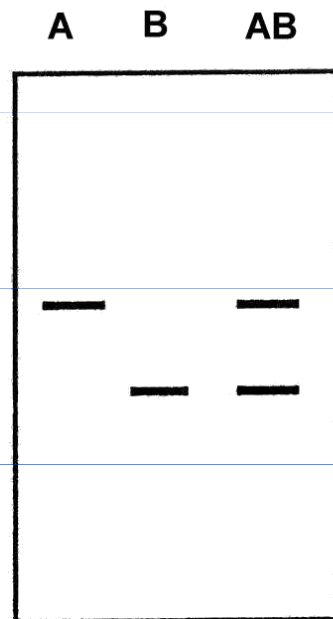


Schéma SSR markerů

A PCR



B Elektroforéza

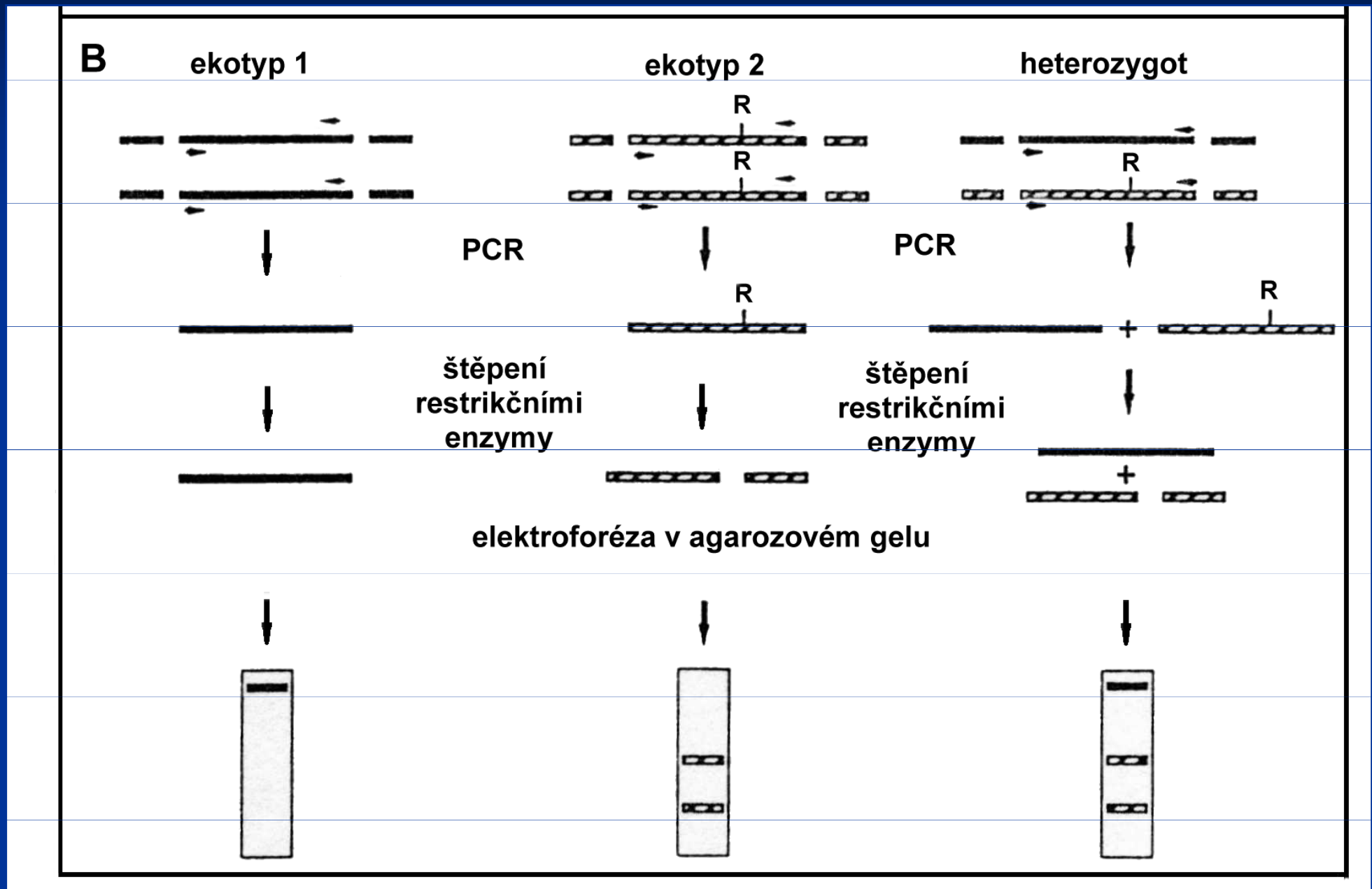


A 1. ekotyp

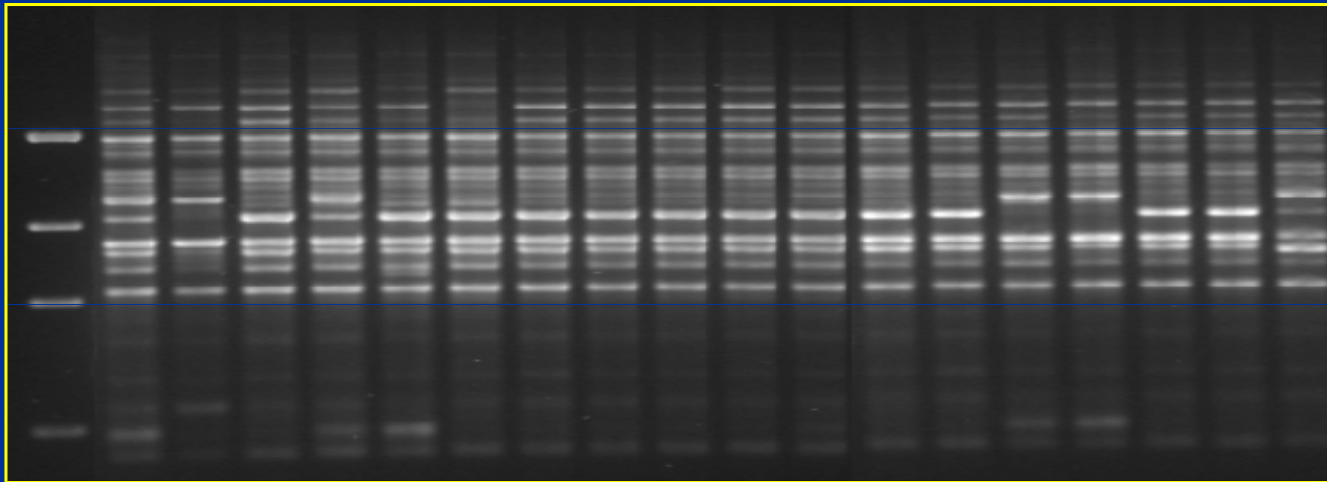
B 2. ekotyp

AB kříženec A x B

Schéma CAPS markerů



RAPD - random amplified polymorphic DNA
AP-PCR - arbitrarily primed PCR
DAF - DNA amplification fingerprinting



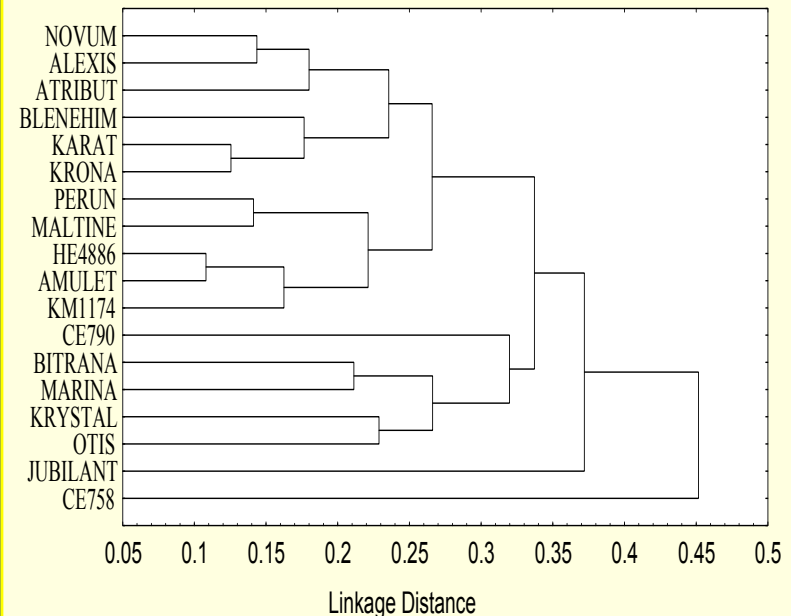
SCAR - sequence characterised amplified regions

RAPD příklady : ječmen

Analyzována kolekce
jarních ječmenů
využívaných ve
šlechtění na
sladovnickou kvalitu

Malé rozdíly v
genetickém založení
kolekce

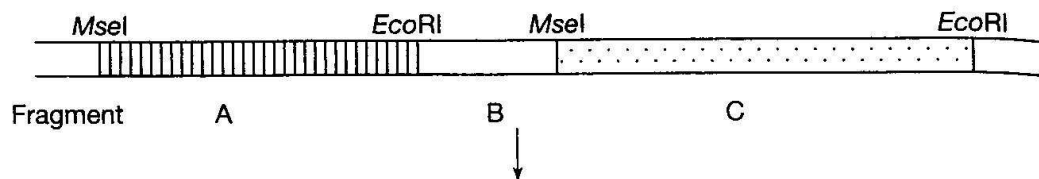
A dendrogram generated from RAPD data for *H. vulgare* cultivars
Unweighted pair-group average
Jaccard's coefficients



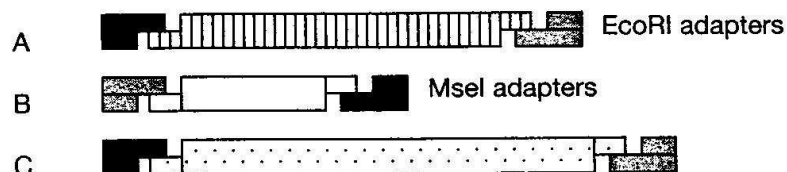
Primer	Sequence	Primer	Sequence	Contents of CG pairs
ABN-02	5'-ACC AGG GGC A-3'	ABN-04	5'-GAC CGA CCC A-3'	70%
ABN-07	5'-CAG CCC AGA G-3'	ABN-08	5'-ACC TCA GCT C-3'	
ABN-09	5'-TGC CGG CTG G-3'	ABN-13	5'-AGC GTC ACT C-3'	
ABN-14	5'-TCG TGC GGG T-3'	ABN-20	5'-GGT GCT CCG T-3'	
AB2-02	5'-GGT GCG GGA A-3'	AB2-09	5'-CTT CAC CCG A-3'	60%
AB2-10	5'-CAC CAG GTG A-3'	AB2-19	5'-ACG GCG TAT G-3'	
ABN 13 x AB2 19				
ABN 13 x AB2 10				

AFLP - amplified fragment length polymorphism

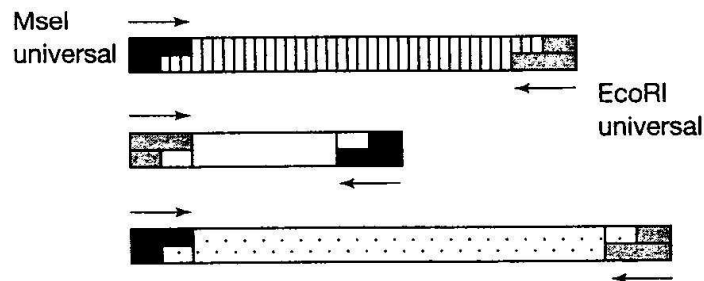
1. Štěpení genomové DNA dvěma restrikázami



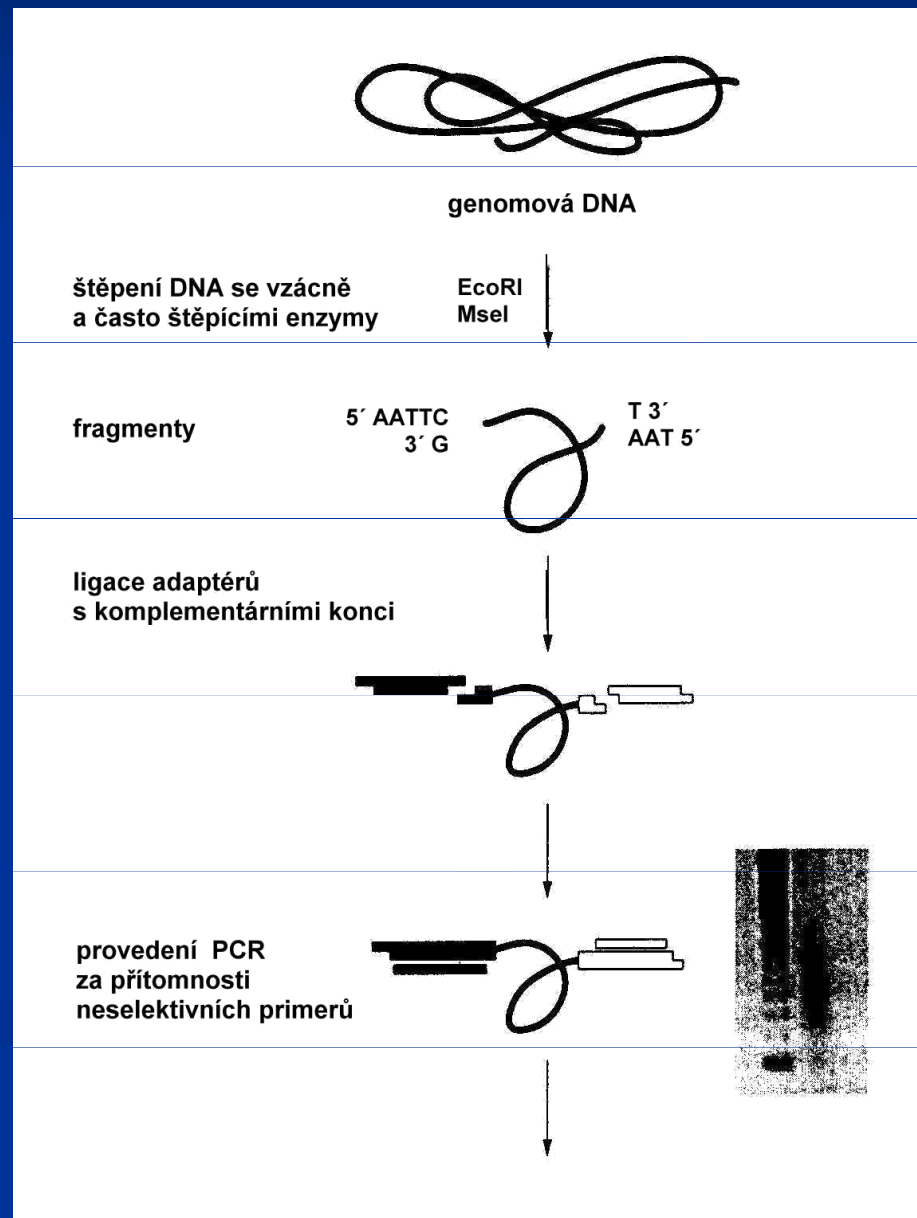
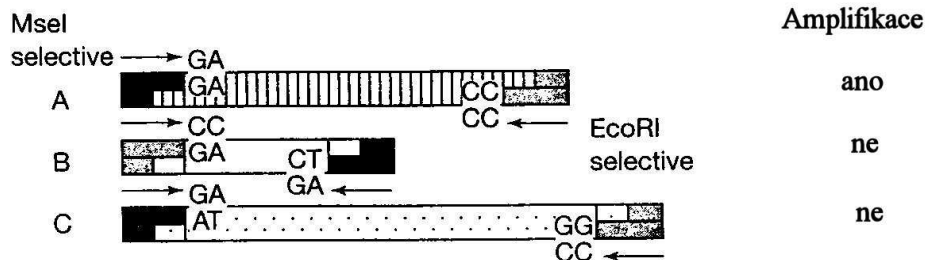
2. Ligace s adaptéry pro MseI a EcoRI



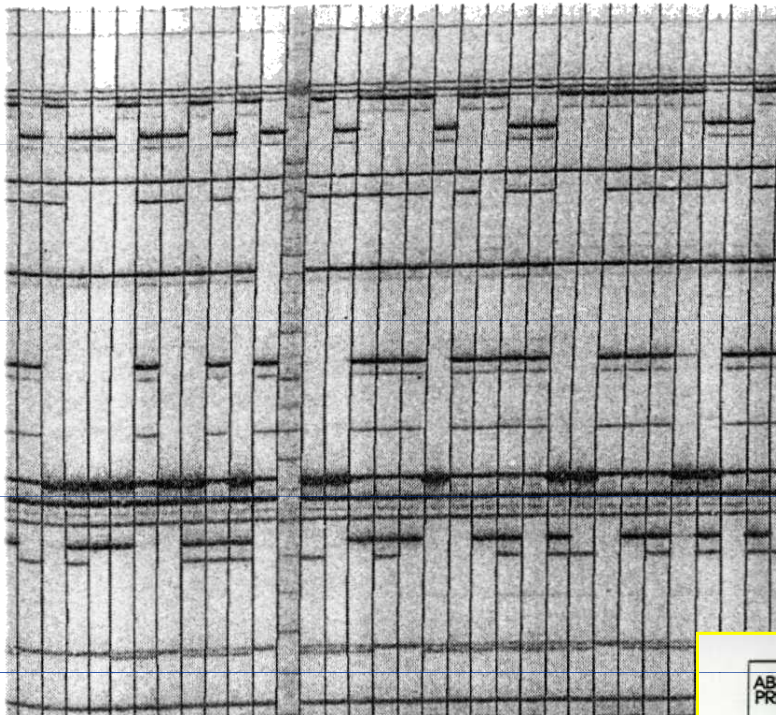
3. Amplifikace všech fragmentů pomocí univerzálních primerů pro EcoRI a MseI



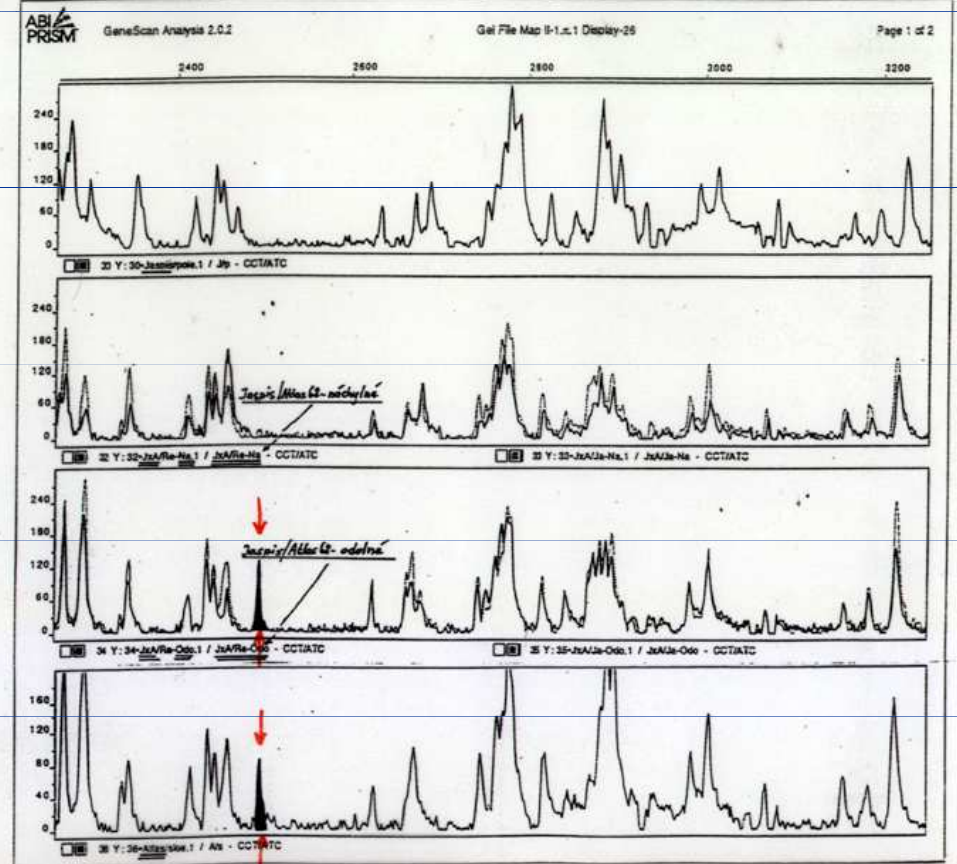
4. Amplifikace pomocí selektivních primerů prodloužených o 1 až 3 náhodně vybrané báze



polyakrylamidový gel
a jeho analýza



Vhodný pro hodnocení



Využití genetických markerů

Základní výzkum i šlechtění

Studium rostlinných genomů

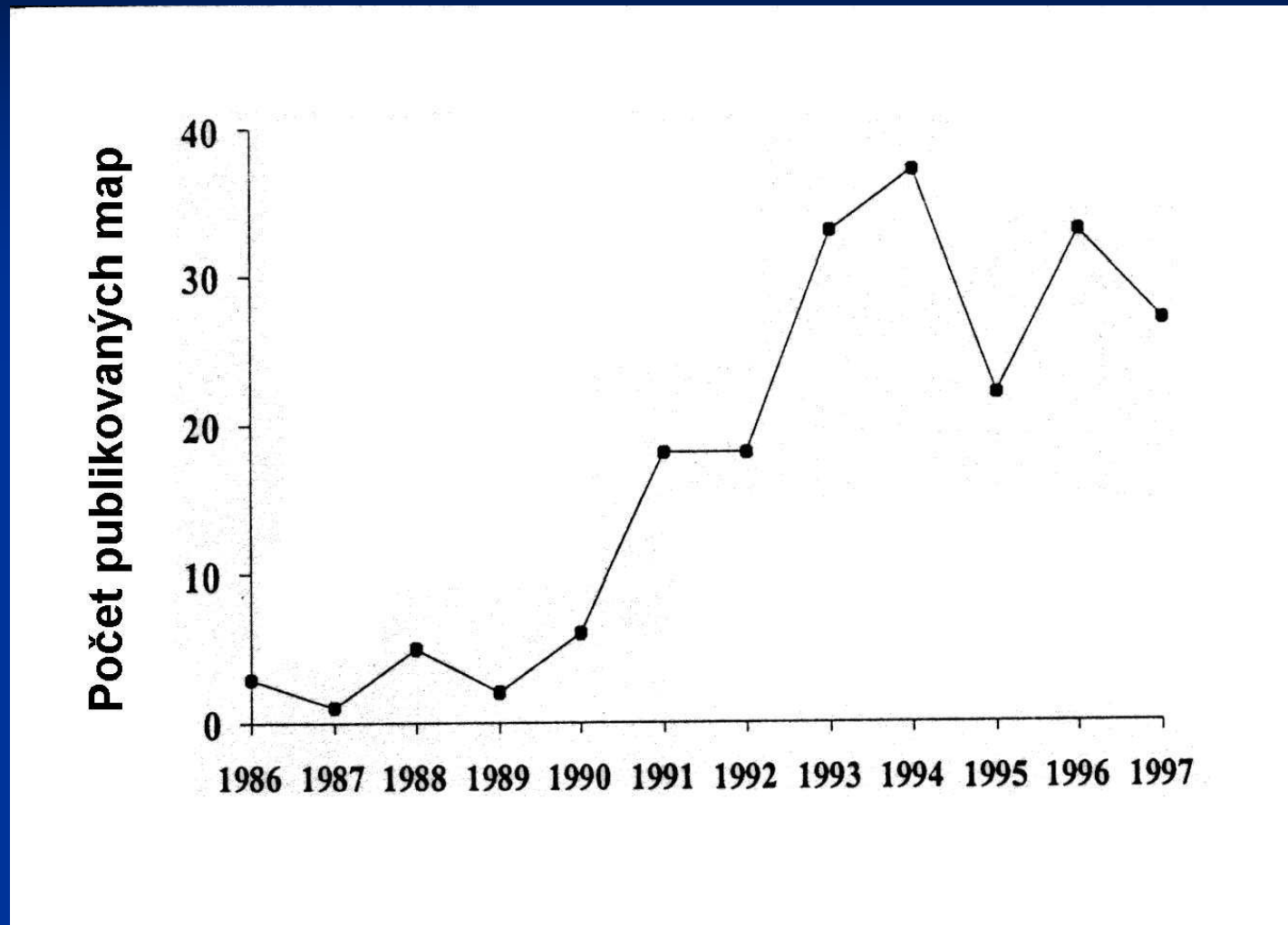
1. Otisk DNA (fingerprinting)
2. Stanovení evolučních vztahů (příbuznost genotypů), taxonomie
3. Genetické mapování

3. Genetické mapování

1. Konstrukce genetických map určitého druhu
2. Identifikace nových DNA markerů
 - Vytváření nástrojů pro MAS (marker-assisted selection)
 - Poziční klonování genů

Konstrukce genetických map hlavních plodin

1986 – 1. mapa RFLP markerů u kukuřice a rajčete



Databáze projektů zabývajících se mapováním rostlinných genomů (celkem pro 66 různých druhů rostlin)

http://www.nal.usda.gov/pgdic/Map_proj/

Teoretické otázky genetického mapování rostlinných genomů

Podstata genetického mapování

Pravděpodobnost vzniku crossing-overu mezi 2 lokusy

Polymorfismus a jeho detekce

Výchozí křížení

Populace využívané k mapování

F₂ znak dominantní 3:1

znak kodominantní 1:2:1

B₁ 1:1

Dihaploidní linie – homozygotní materiál

Rekombinantní inbrední linie (RIL)

Blízké izogenní linie (NIL)

Znaky kvalitativní x znaky kvantitativní

Velikost populace

Počet DNA markerů pro zachycení vazby

Úkol č. 1

Genetické mapování mutace *lycopodioformis* *Arabidopsis thaliana*

Materiál: morfologická mutace *ly*

Populace F₂

**DNA markery – SSR (Simple sequence repeats)
mikrosatelity
– CAPS (Cleaved amplified
polymorphic sequences)**

Columbia



lycopodioformis



Schéma křížení

m mutantní alela na pozadí *S96* resp. *DiG*

M mikrosatelit na pozadí *S96* resp. *DiG*

+ standardní alela na pozadí *Col*

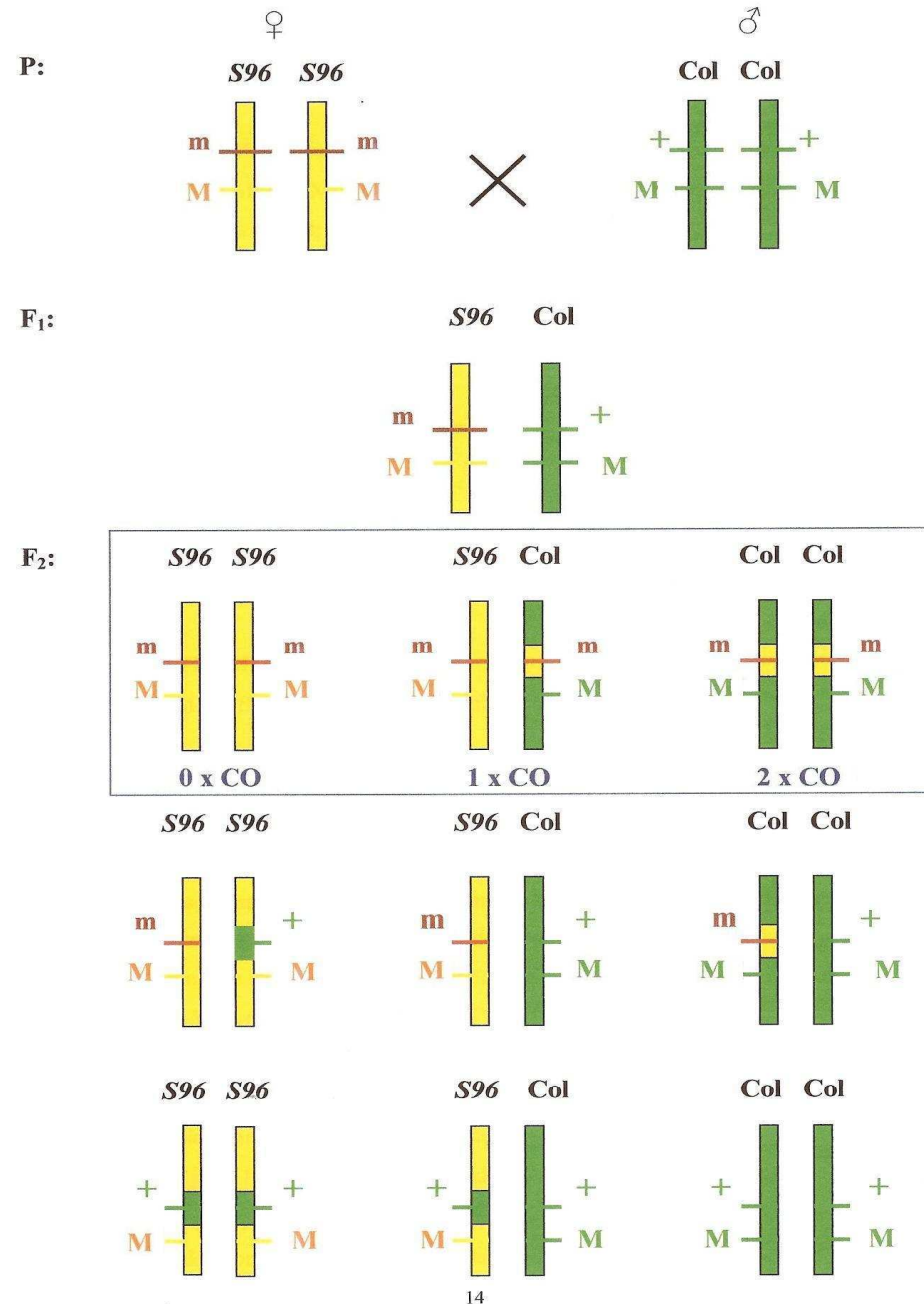
M mikrosatelit na pozadí *Col*

0 x CO.... žádný crossing-over

1 x CO.... jeden crossing-over

2 x CO ...dva crossing-over

Rámečkem jsou označeny rostliny F_2 generace mutantního fenotypu



Lokalizace používaných DNA markerů v genetické mapě *Arabidopsis thaliana*

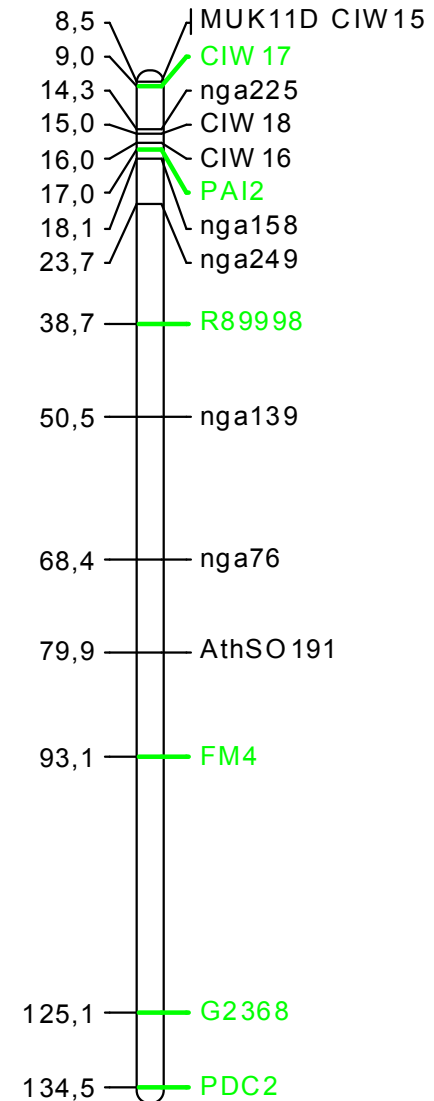
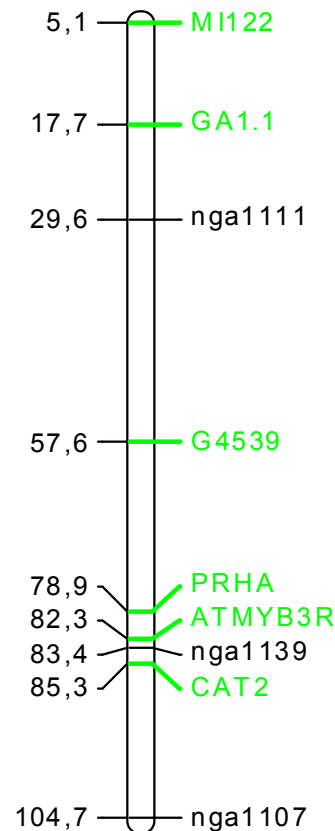
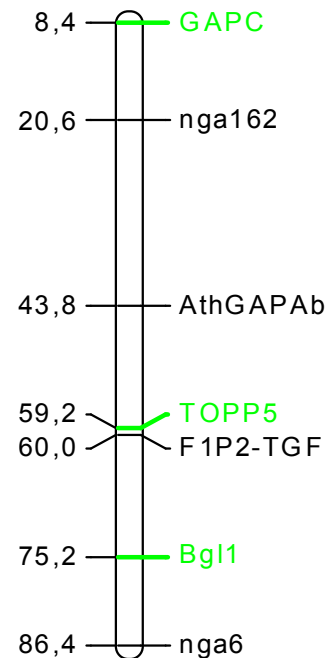
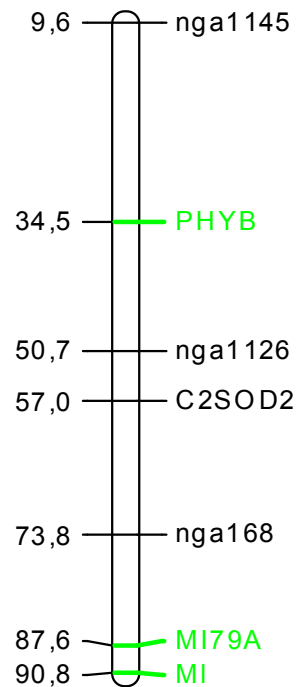
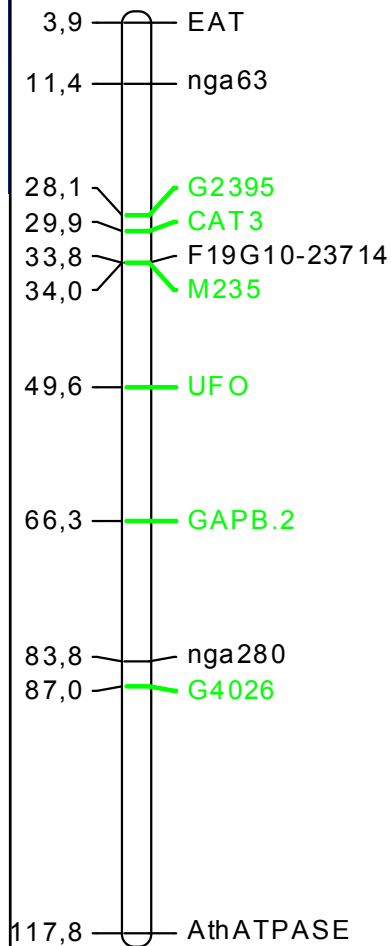
1CH

2CH

3CH

4CH

5CH

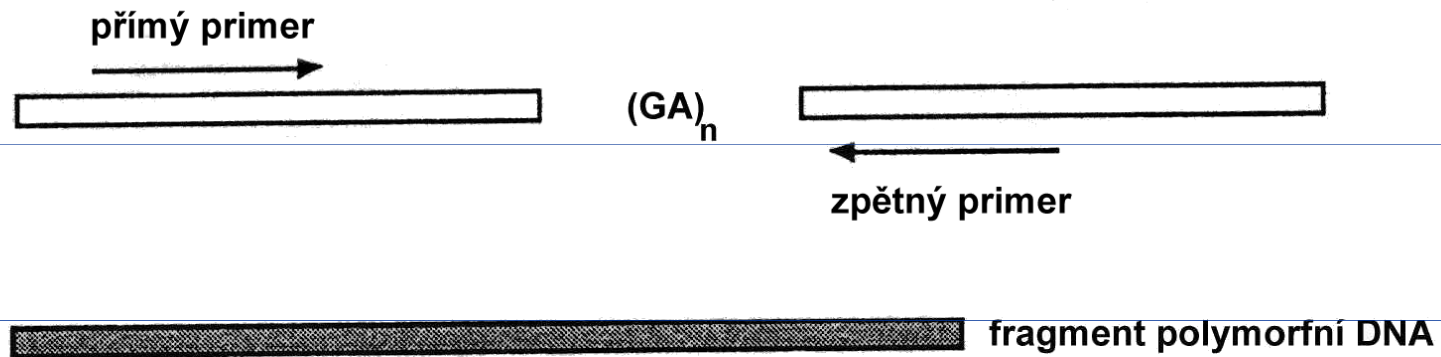


CAPS zeleně
SSR černě

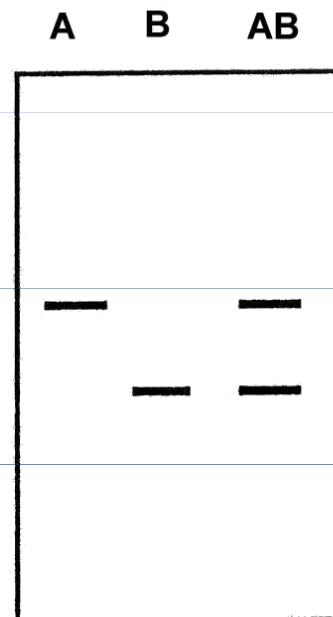
Typy DNA markerů

Schéma SSR markerů

A PCR



B Elektroforéza

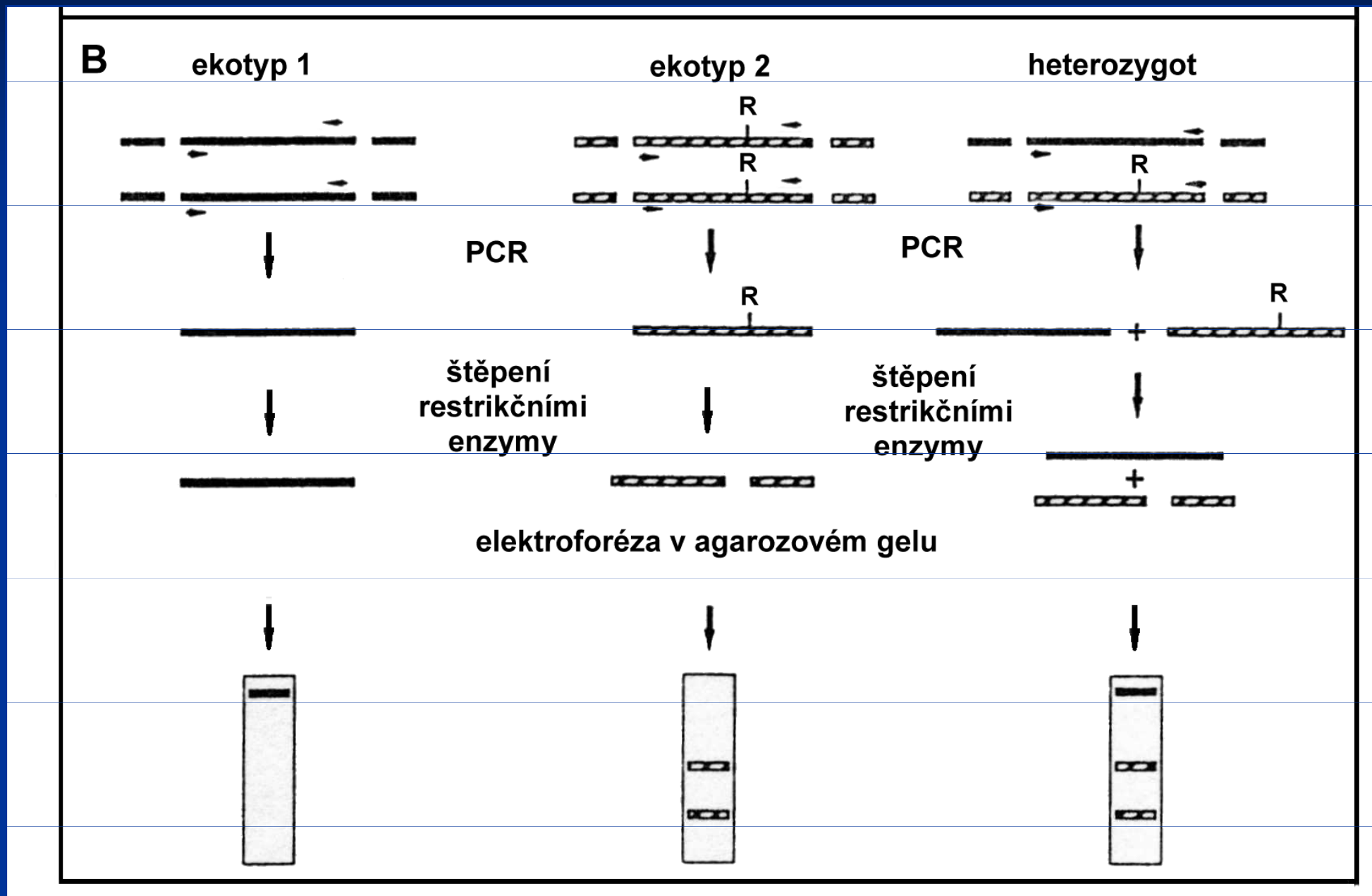


A 1. ekotyp

B 2. ekotyp

AB kříženec A x B

Schéma CAPS markerů



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

Postup

36 vzorků DNA *lyz* F₂

Kontroly: rodiče, F₁

- Reakční směs pro SSR markery
- ELFO

- Reakční směs pro CAPS markery
- Štěpení enzymem AccI 37 °C 3h – CIW17

- ELFO