

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

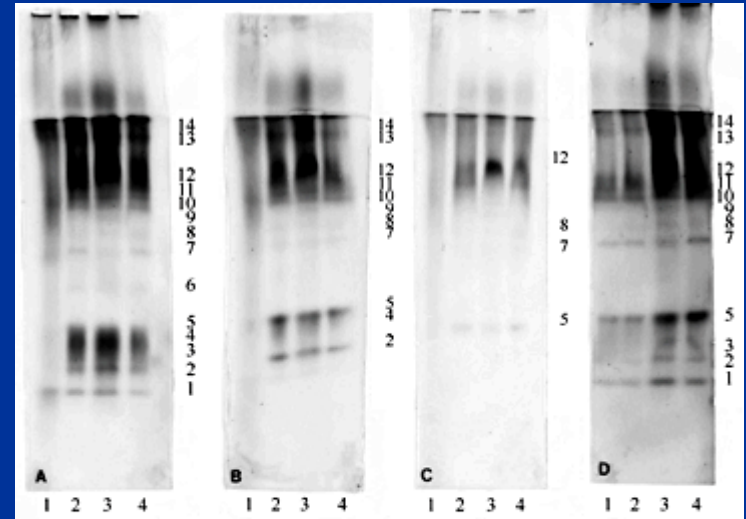
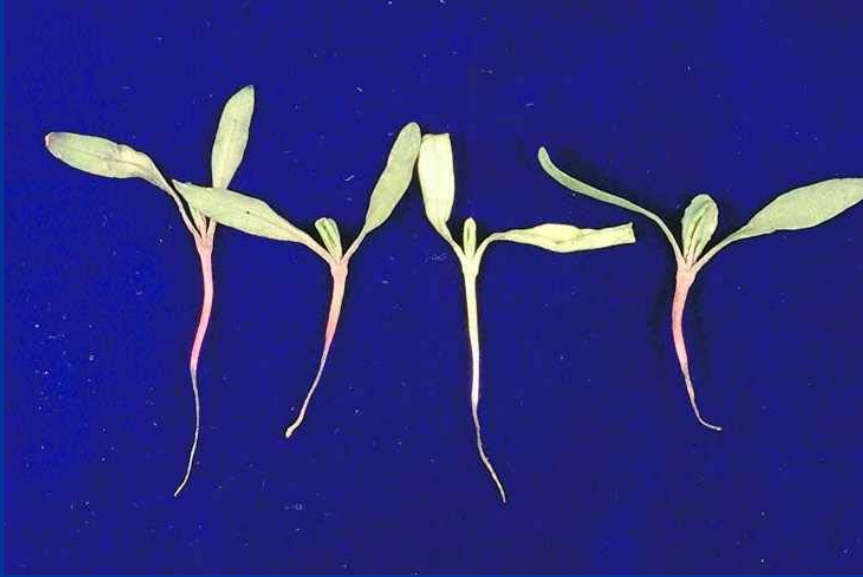
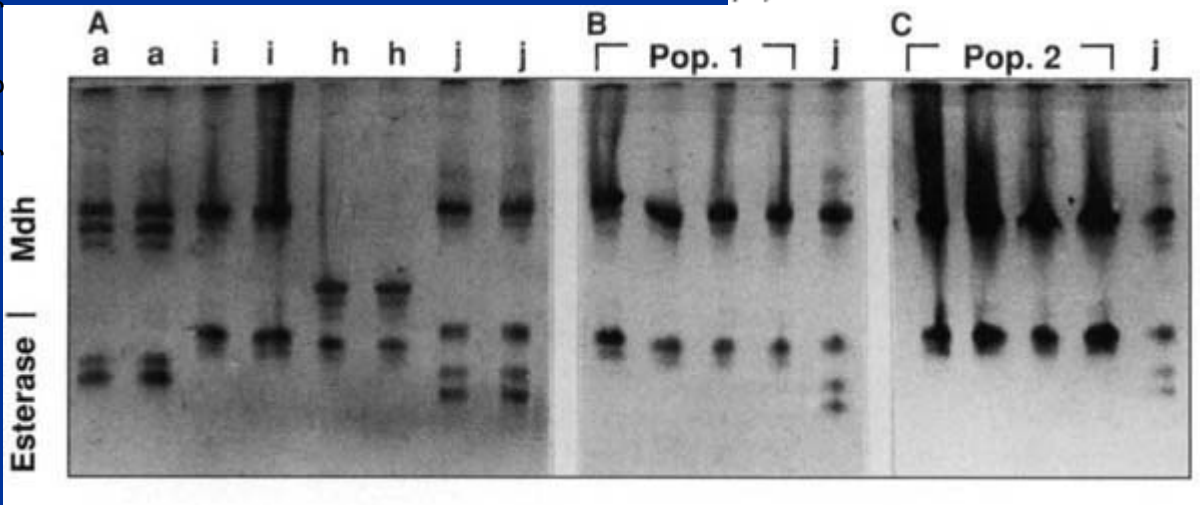


Figure 1 - Inhibition pattern for characterization of esterases from leaves of *Aspidosperma polyneuron* showing that Est-1, Est-3, Est-4, and Est-6 isozymes were inhibited in the presence of Malathion (B); Est-5, Est-7, Est-8, and Est-12 isozymes were detected as weakly stained bands by Folidol (C); Est-3, Est-4, and Est-6 isozymes were inhibited by Thiamethoxan (D). The gel in A shows α and β esterases in the absence of inhibitors. Lanes 1-4 correspond to leaf samples of different plants of *A. polyneuron*.

Malát dehidrogenázy



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

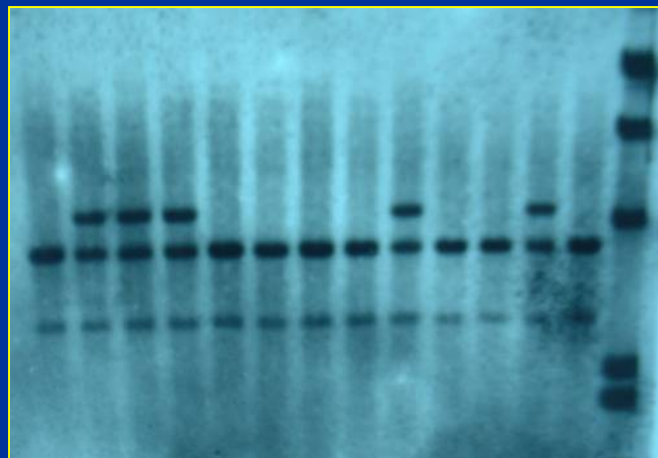
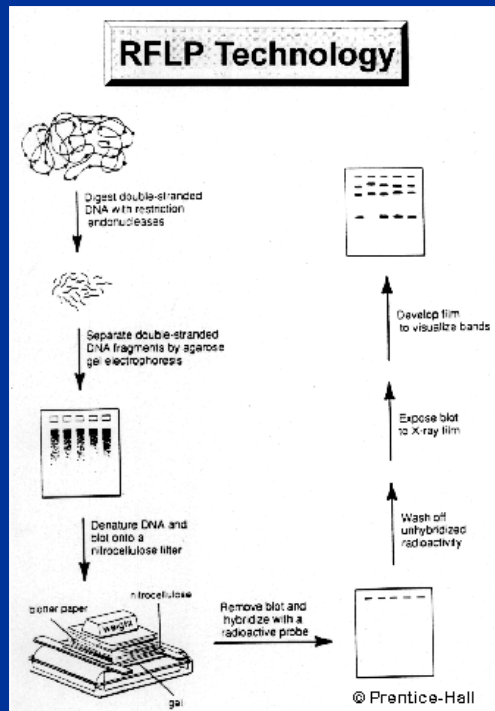
Typy DNA markerů:

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

Klasifikace DNA markerů podle použitých sond = cílových lokusů (genů):

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

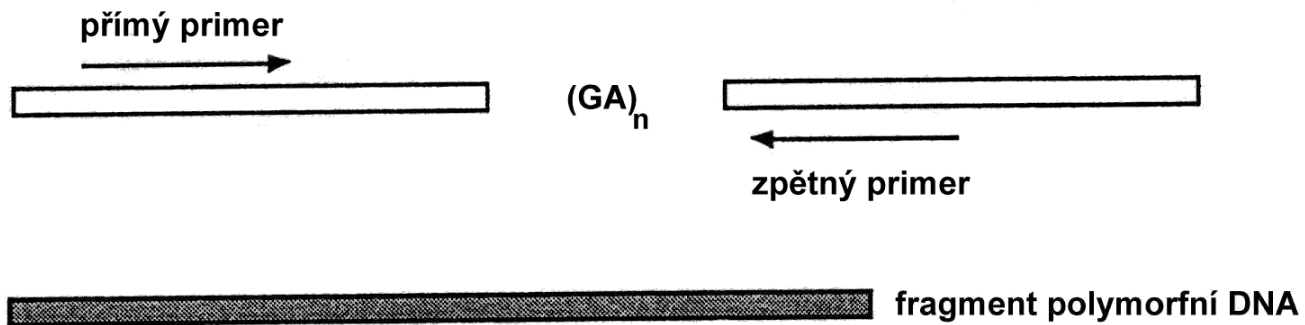
Schéma RFLP markerů



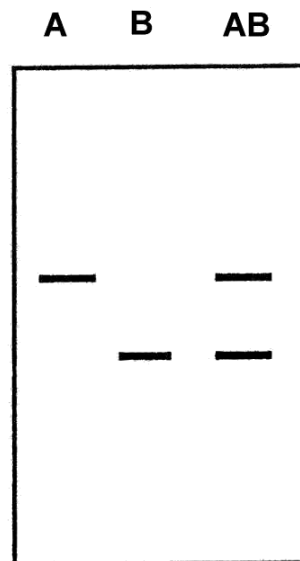
- Izolace DNA
- Restrikční analýza
- Elektroforetická separace
- Přenos DNA na membránu
- Značení sondy
- Hybridizace
- Vizualizace

Schéma SSR markerů

A PCR



B Elektroforéza

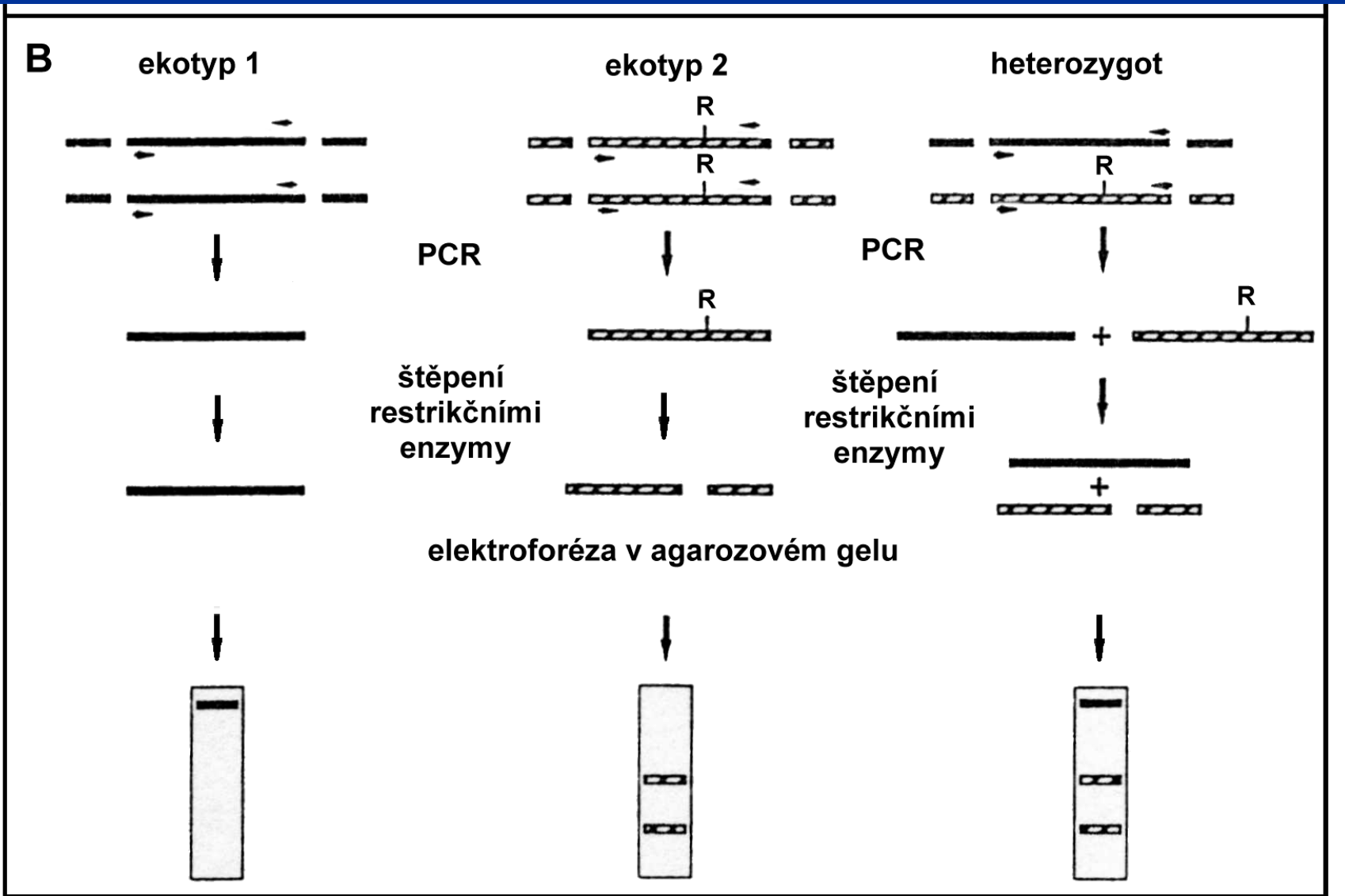


A 1. ekotyp

B 2. ekotyp

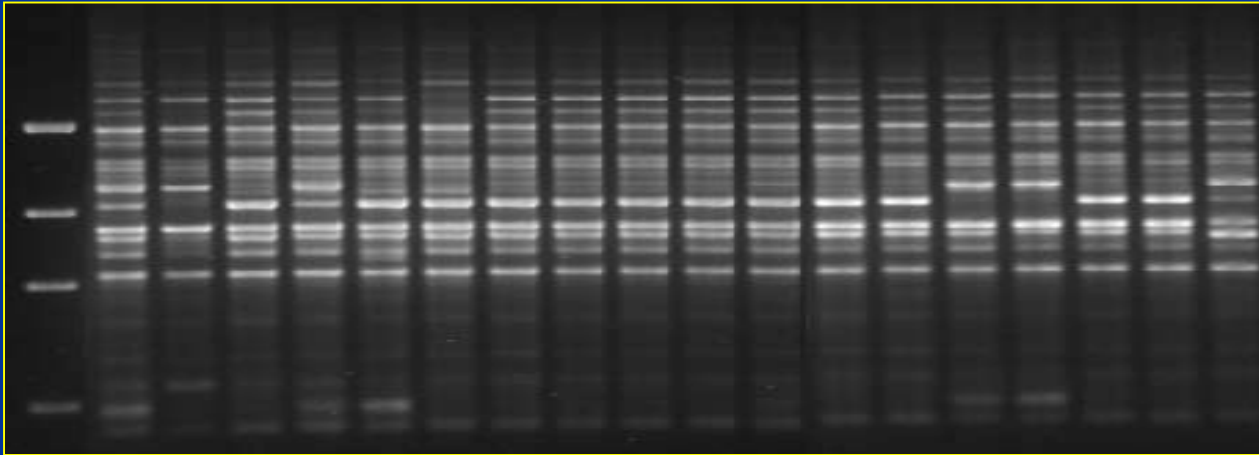
AB kříženec A x B

Schéma CAPS markerů



RAPD
DAF

- random amplified polymorphic DNA
- DNA amplification fingerprinting



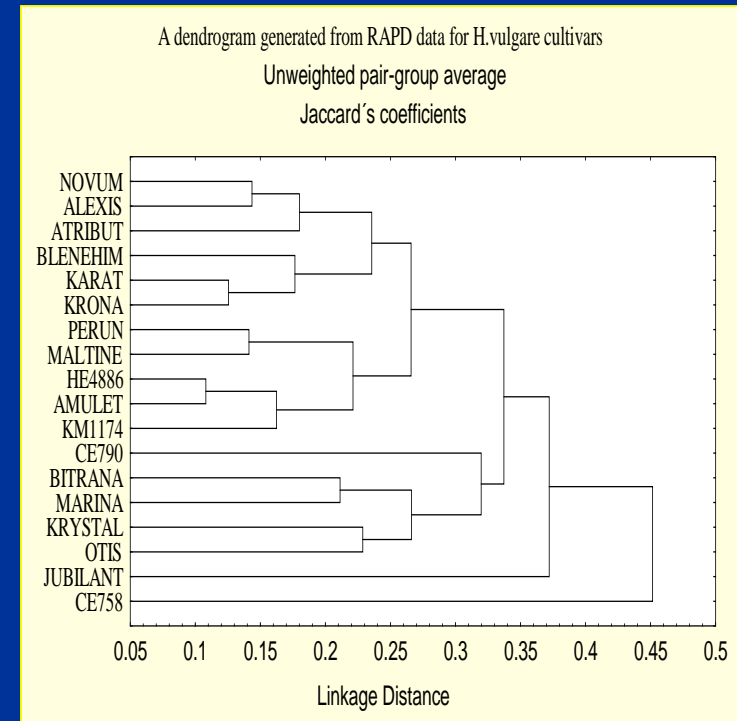
SCAR

- sequence characterised amplified regions

RAPD příklady : ječmen

Analyzována kolekce
jarních ječmenů
využívaných ve
šlechtění na
sladovnickou kvalitu

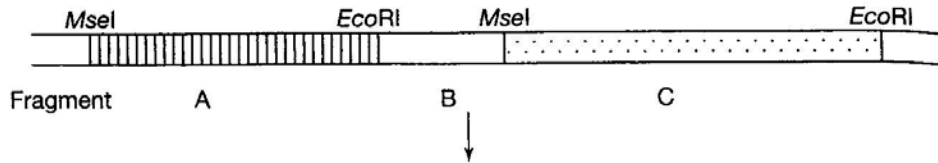
Malé rozdíly v
genetickém založení
kolekce



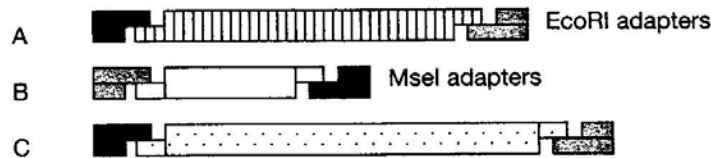
Primer	Sequence	Primer	Sequence	Contents of CG pairs
ABN-02	5'-ACC AGG GGC A-3'	ABN-04	5'-GAC CGA CCC A-3'	70%
ABN-07	5'-CAG CCC AGA G-3'	ABN-08	5'-ACC TCA GCT C-3'	
ABN-09	5'-TGC CGG CTG G-3'	ABN-13	5'-AGC GTC ACT C-3'	
ABN-14	5'-TCG TGC GGG T-3'	ABN-20	5'-GGT GCT CCG T-3'	
AB2-02	5'-GGT GCG GGA A-3'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

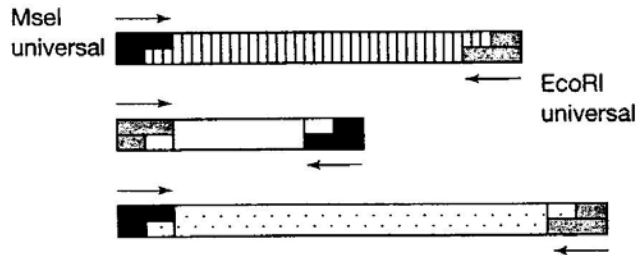
1. Štěpení genomové DNA dvěma restriktázami



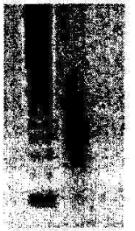
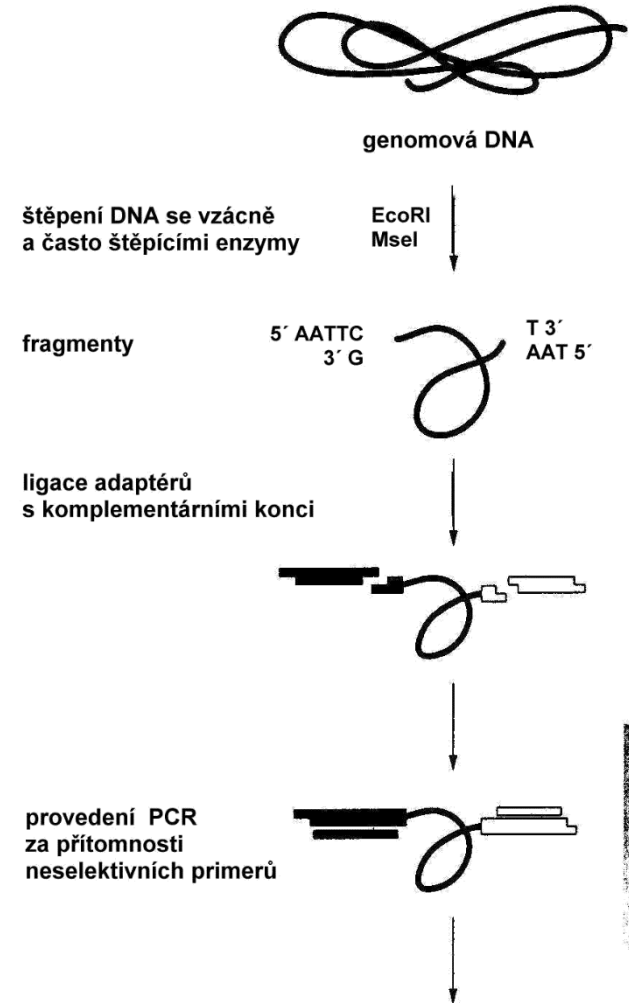
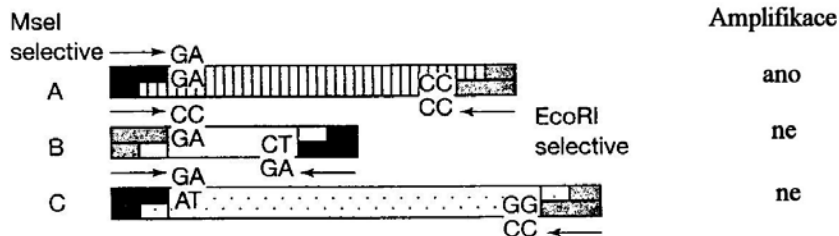
2. Ligace s adaptéry pro MseI a EcoRI



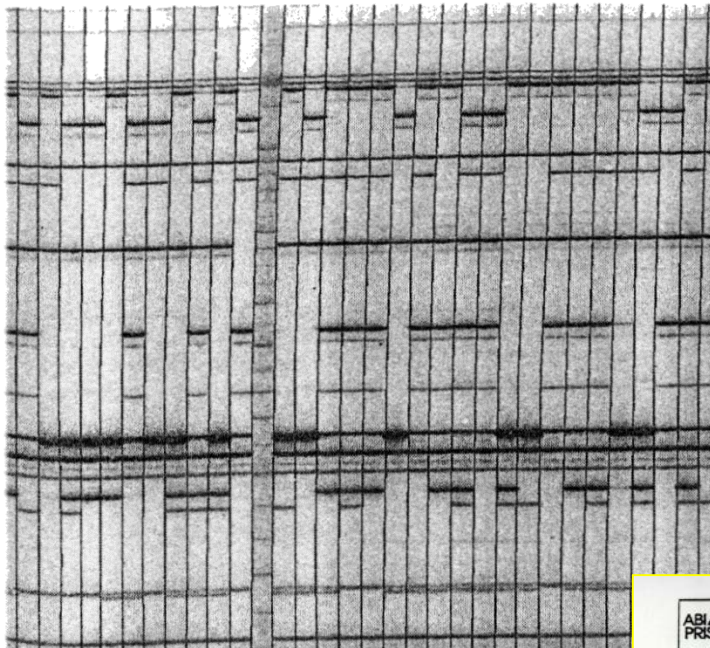
3. Amplifikace všech fragmentů pomocí univerzálních primerů pro EcoRI a MseI



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

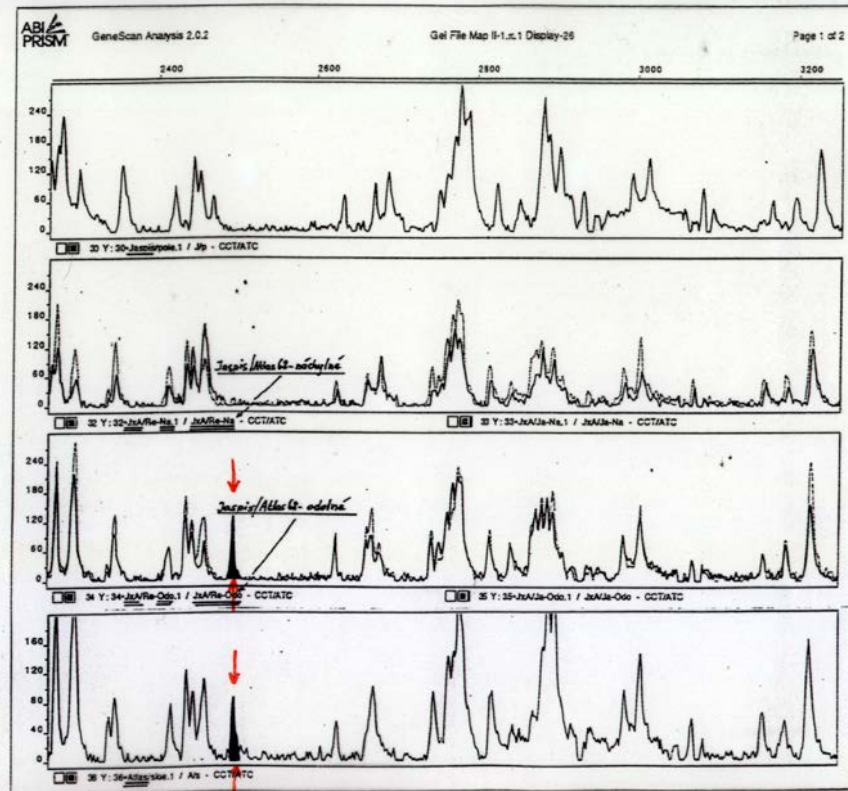


polyakrylamidový gel
a jeho analýza



Vhodný pro hodnocení

Kapilární
elektroforéza



Využití genetických markerů

Základní výzkum i šlechtění

Studium rostlinných genomů

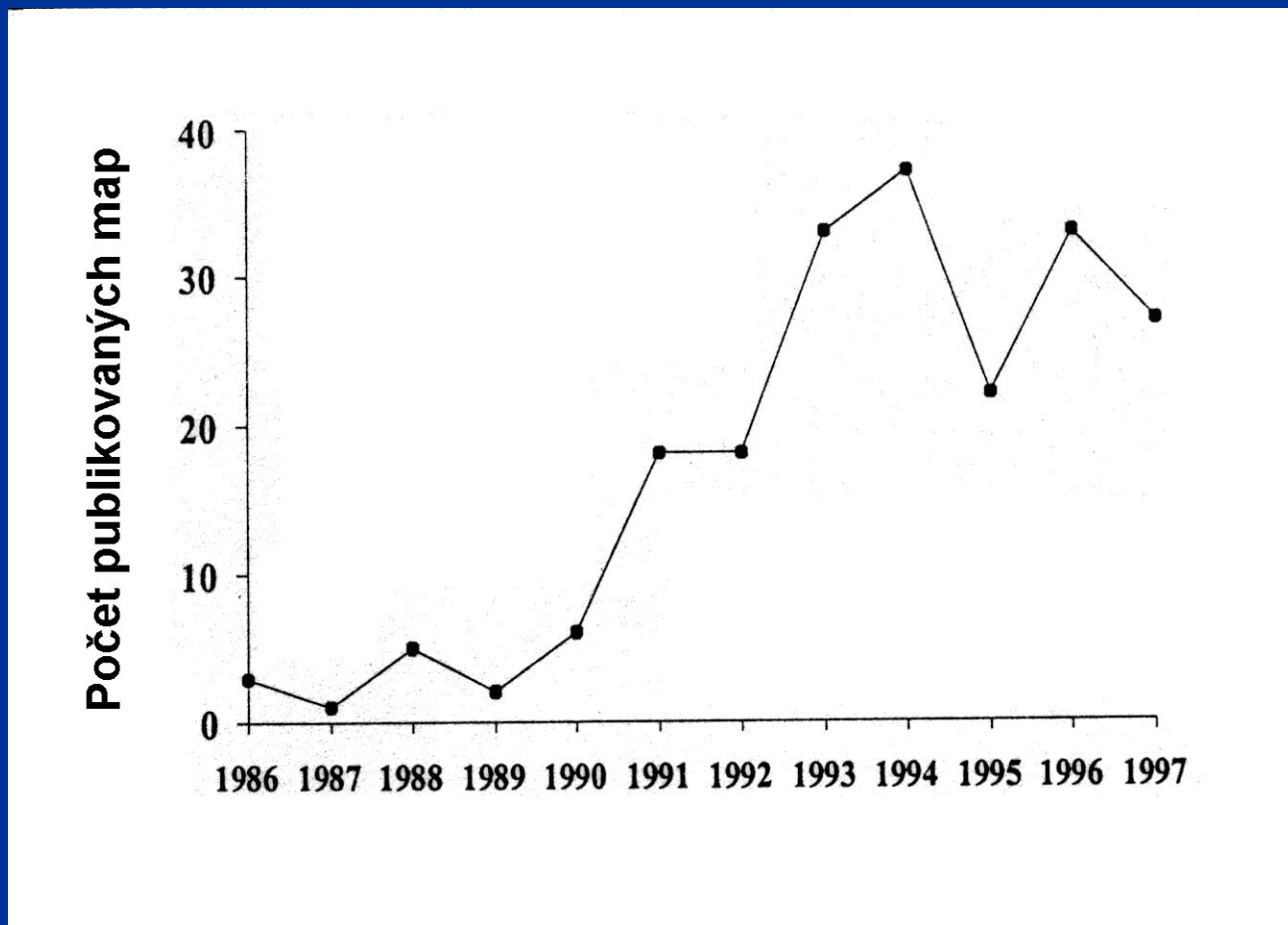
1. Otisk DNA (fingerprinting)
2. Stanovení evolučních vztahů (příbuznost genotypů), taxonomie
3. Genetické mapování

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

Aneuploidní linie – viz schéma

Dihaploidní linie – homozygotní materiál

Rekombinantní inbrední linie (RIL)

Izogenní linie (NIL)

Znaky kvalitativní x znaky kvantitativní

Velikost populace

Počet DNA markerů pro zachycení vazby

Lokalizace genů do vazbových skupin pomocí aneuploidů 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

**Příklad: Genetické mapování mutace u druhu s
malým genomem
*lycopodioformis Arabidopsis thaliana***

Materiál: morfologická mutace *ly*

Populace F_2

**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*

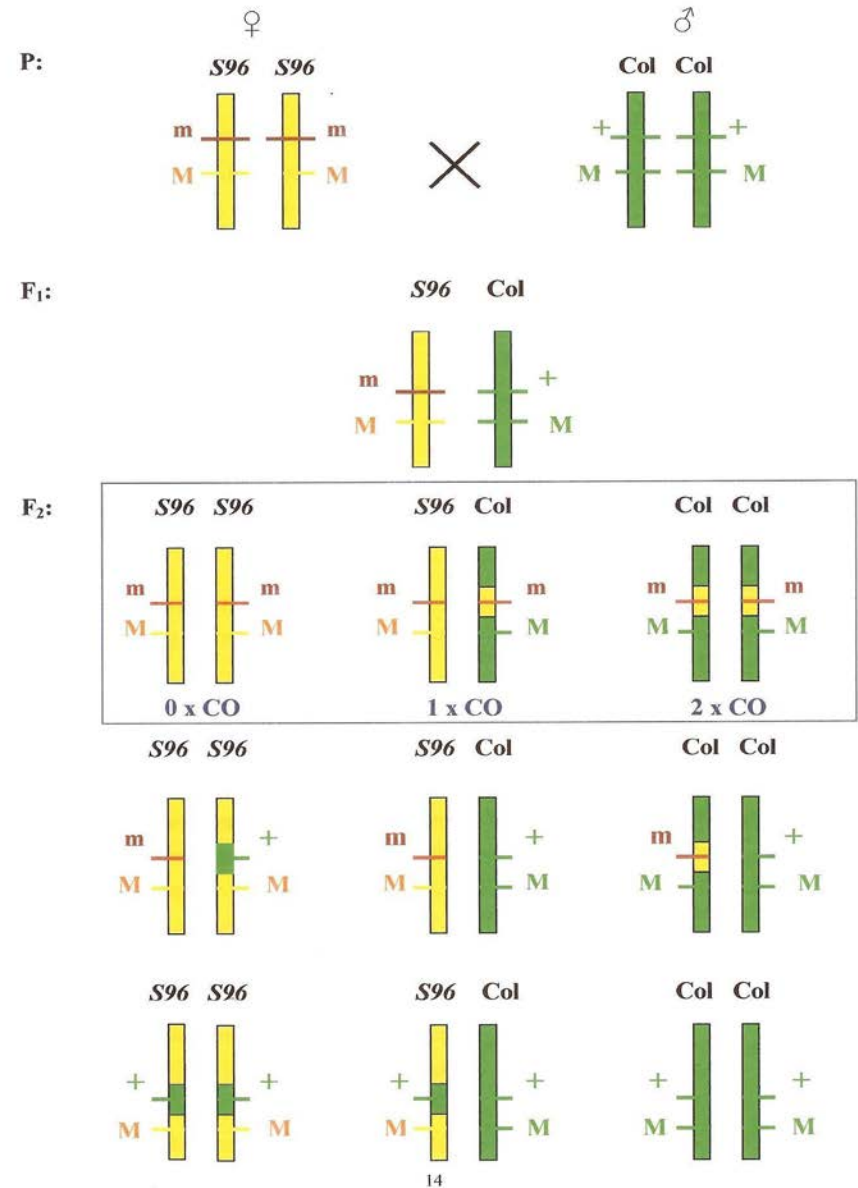
M mikrosatelit na pozadí *Col*

0 x CO.... žádný crossing-over

1 x CO.... jeden crossing-over

2 x CO ...dva crossing-over

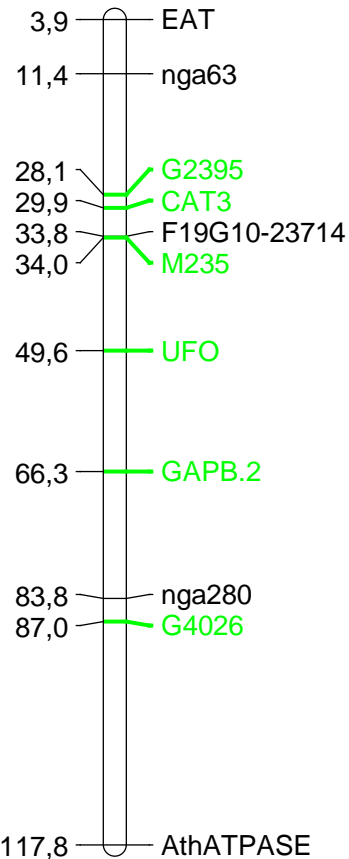
Rámečkem jsou označeny rostliny F_2 generace mutantního fenotypu



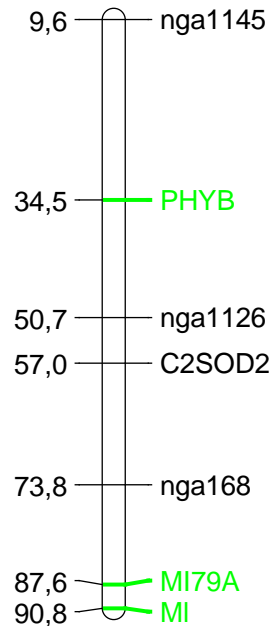
Genetická mapa DNA markerů u *Arabidopsis thaliana*

Počet DNA markerů potřebných pro základní skríníng genomu

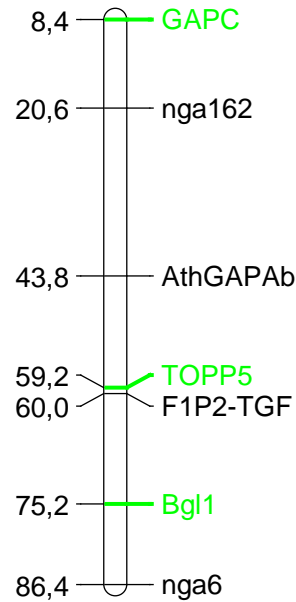
1CH



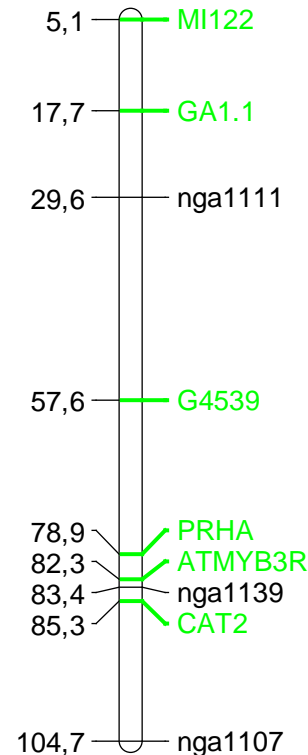
2CH



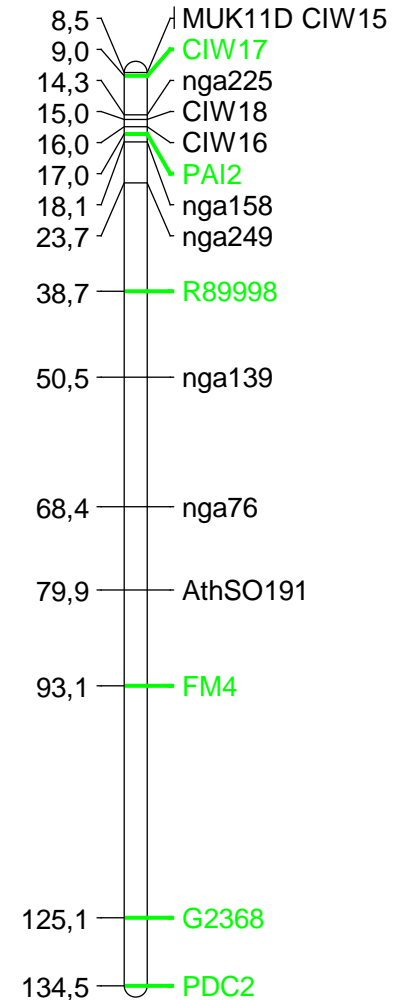
3CH



4CH



5CH



CAPS zeleně
SSR černě

Postup

20 až 30 vzorků DNA *lyz* z F_2

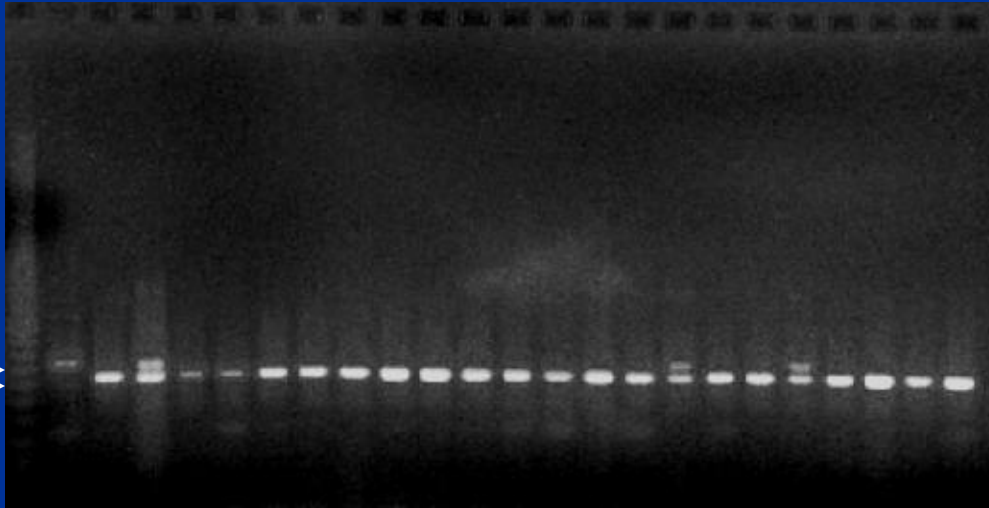
Kontroly: rodiče, F_1

- PCR pro SSR markery
- ELFO

- PCR pro CAPS markery
- Štěpení enzymem
- ELFO

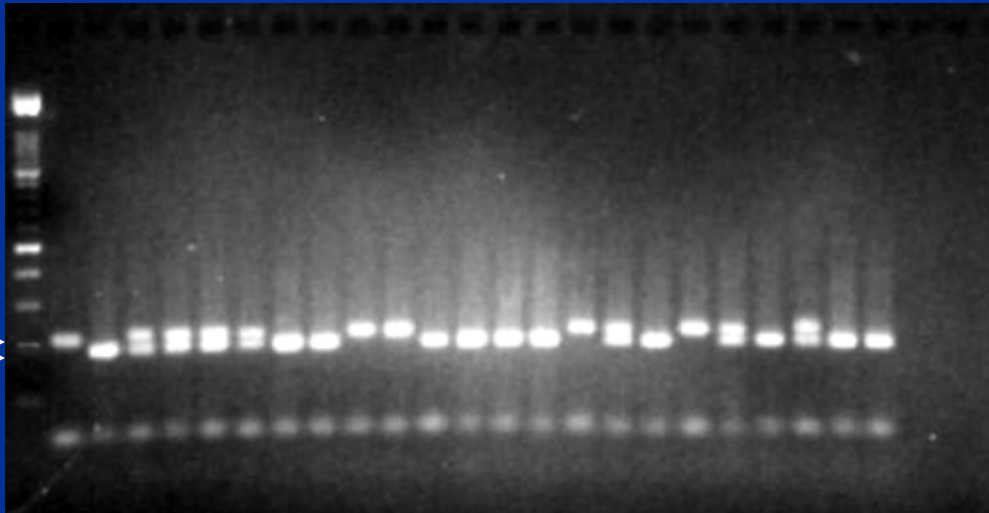
Segregující populace F2 a molekulární analýza - příklady

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



nga249

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



nga1126

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

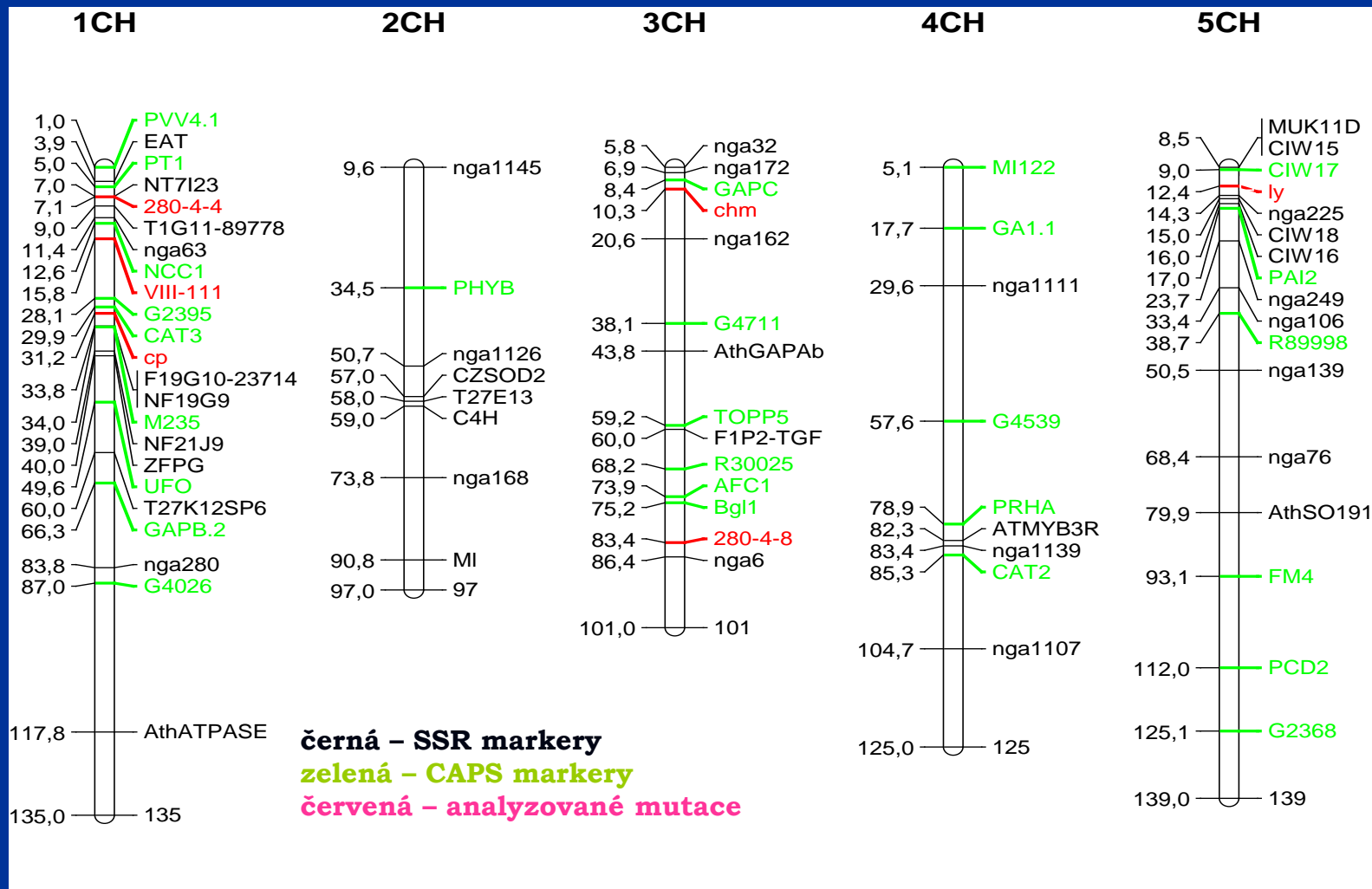
Odhad mapové vzdálenosti D dle Kosambiho mapovací funkce (Kosambi, 1944):

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

Výpočet střední chyby odhadu mapové vzdálenosti s_D :

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

Lokalizace mutantní alely *ly* v genetické mapě *Arabidopsis*



**2. Zpřesnění mapové pozice (200 mutantních rostlin)
vzdálenost 1 až 3 cM (200 až 600 kb, 45 až 135 genů)**

**3. Identifikace kandidátních genů
až 2000 F₂ rostlin, identifikace dvou DNA markerů v co
nejbližší pozici, identifikace rekombinantů
Nezbytná vysoká vysycenost genomu DNA markery
SNP, In/Del**

Speciální problémy řešitelné mapováním u druhů s velkým genomem

Podrobné mapování určité oblasti genomu – fine mapping

Mapování u druhů s velkým genomem

- **Identifikace DNA markerů v těsné vazbě s genem**
- **Speciální populace pro mapování – RIL, NIL,**
- **BSA (Bulk Segregant Analysis) s cílem MAS (marker assisted selection) selekce přistřednictvím DNA markerů**
- **Pyramidování genů ve šlechtitelských programech**

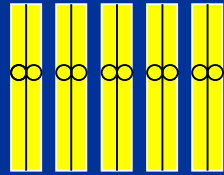
RIL (recombinant isogenic lines)

Rekombinantní inbrední linie

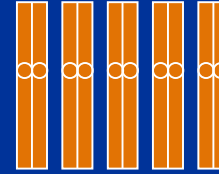
⊗ časová náročnost

⊕ vysoká homozygotnost

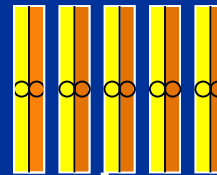
Křížení polymorfních
(fenotypově kontrast-
ních) linií



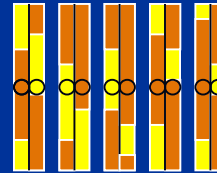
×



F₁



F₂ 50,0%



F₃ 75,0%

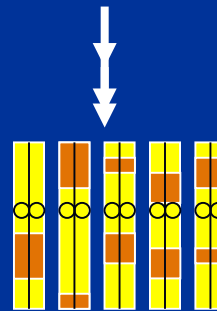
F₄ 87,5%

F₅ 93,8%

F₆ 96,9%

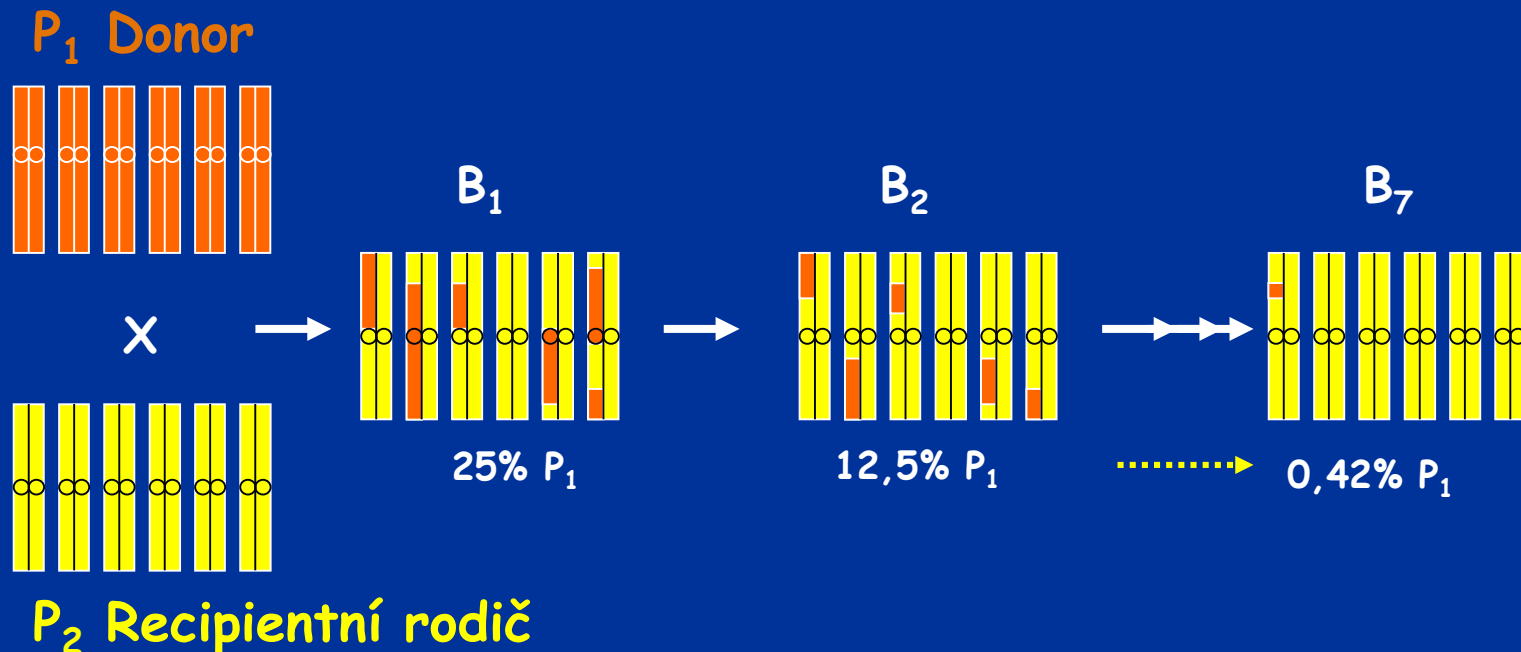
F₇ 98,7%

F₈ 99,5%



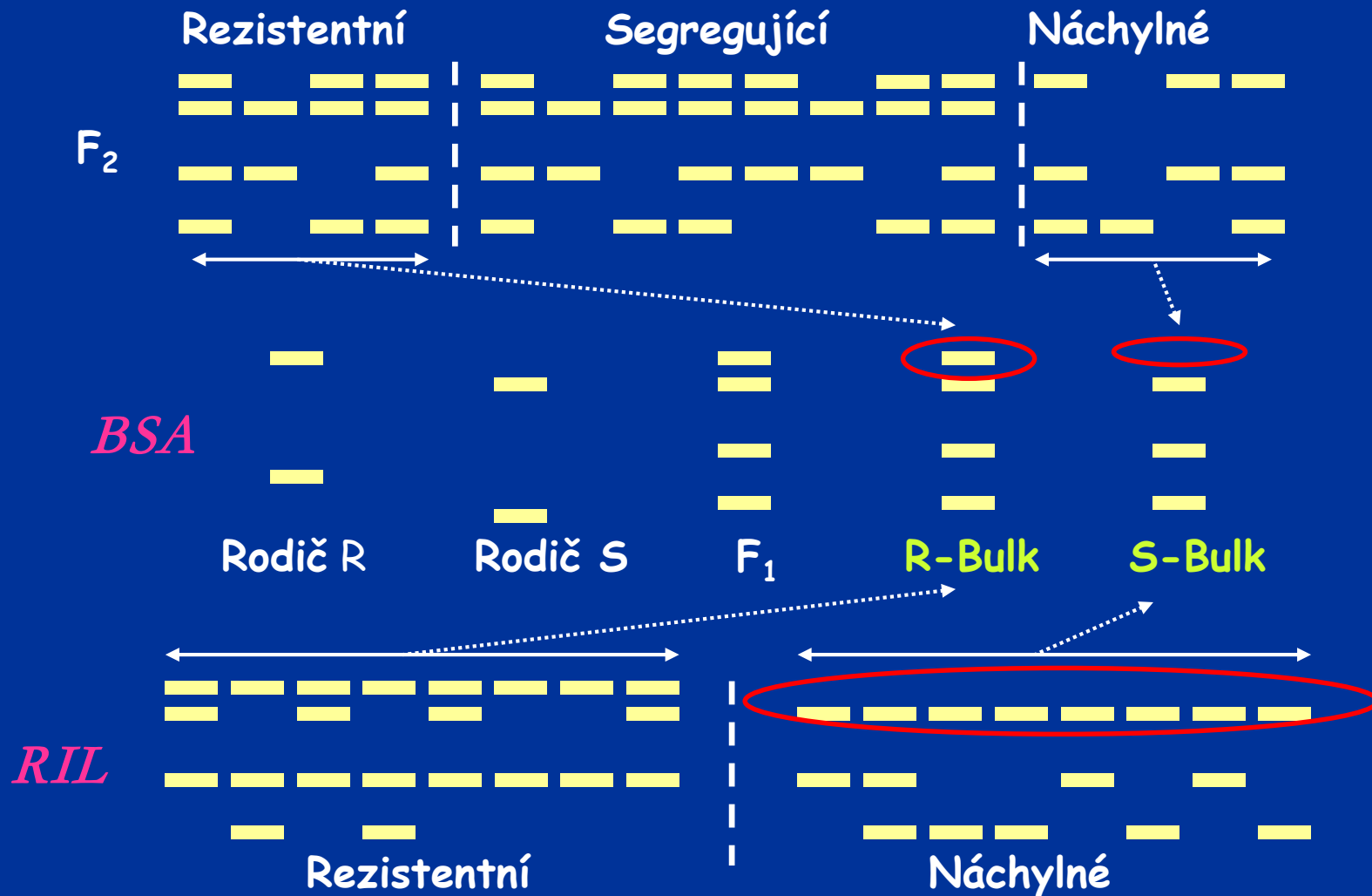
NIL (near isogenic lines) Izogenní linie

- ⊗ časová náročnost – vytvoření F_1 + 6 x BC, selekce na daný gen (znak) v každé generaci
- ⊕ vysoká homozygotnost, rozdíl jen v lokusu konkrétního genu a jeho okolí
- ⊕ polymorfismus (DNA) mezi NIL s vysokou pravděpodobností souvisí s vazbou marker-gen



BSA (bulk segregant analysis)

- ⊕ rychlá příprava kontrastních skupin genotypů z F_2 generace
- dominance, recesivita

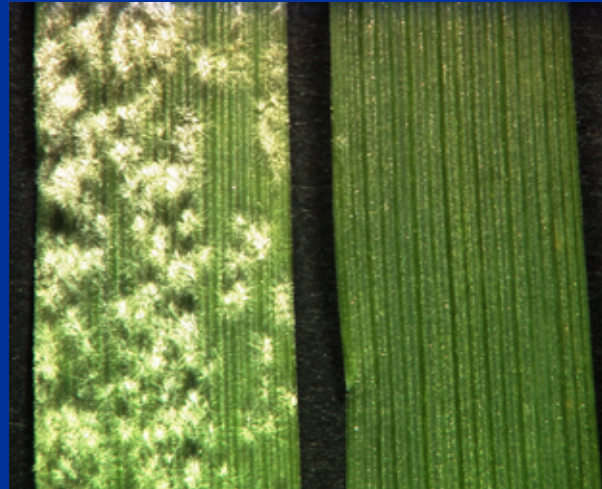


Genetické mapování genu odolnosti u ječmene

Druh s velkým genomem

- *Hordeum vulgare*

- Padlí ječmene



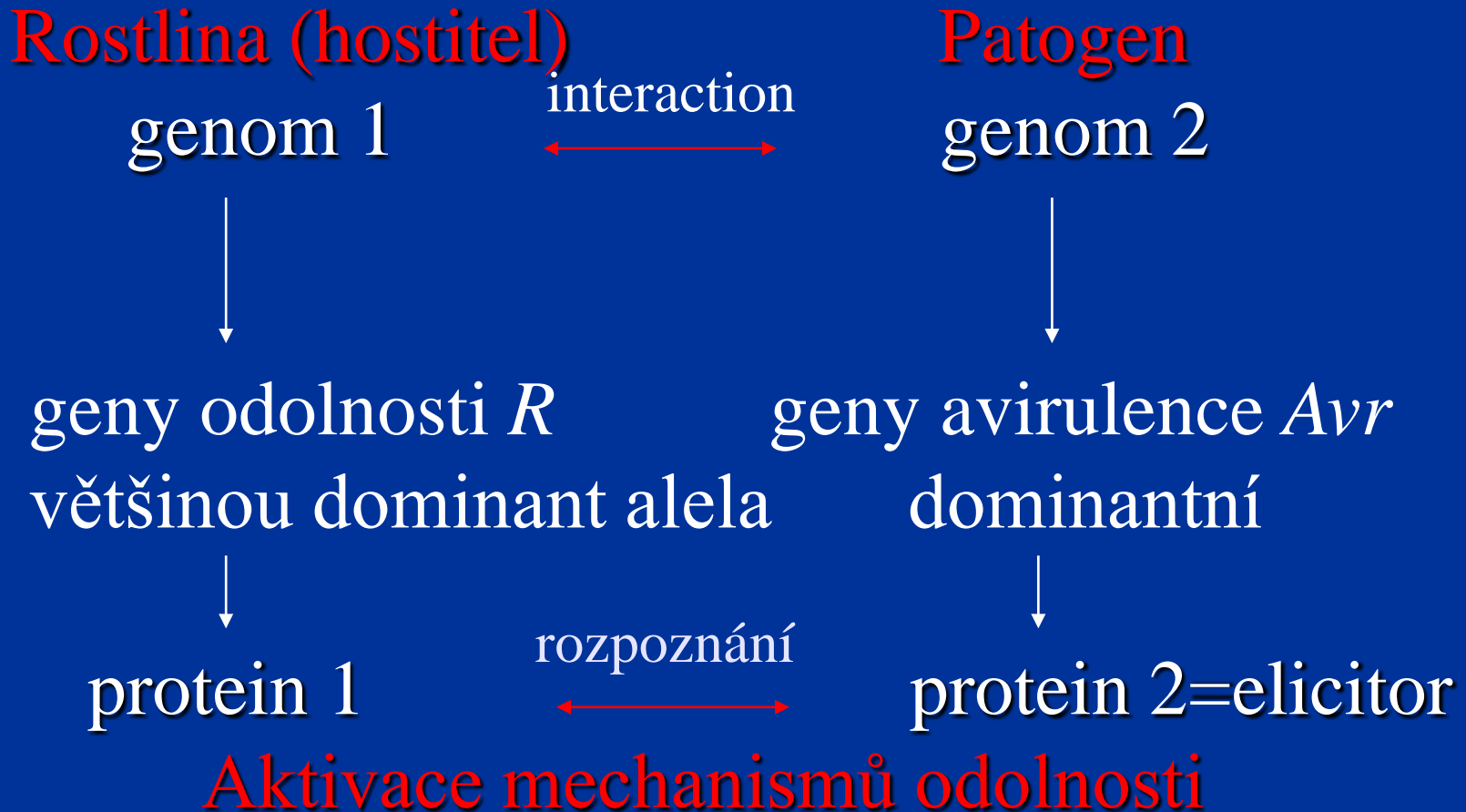
původce *Blumeria graminis*
f. sp. *hordei*
v ČR i celosvětově jedna
ze
závažných chorob
ječmene

- Šlechtění odolných odrůd

- Významné zdroje genů odolnosti jsou plané ječmeny –
H. vulgare ssp. *spontaneum*, *H. bulbosum*

- 23 zdrojů (donorů) odolnosti ječmene (*H. vulgare* ssp. *spontaneum*) k padlí ječmene (PI.....)

Genetické aspekty choroby



koncept gen – proti – genu

geny *R*

1. Mají schopnost detekovat (rozpoznat) patogena
2. Mají schopnost aktivovat obranné mechanismy

Cíle studia donorů rezistence

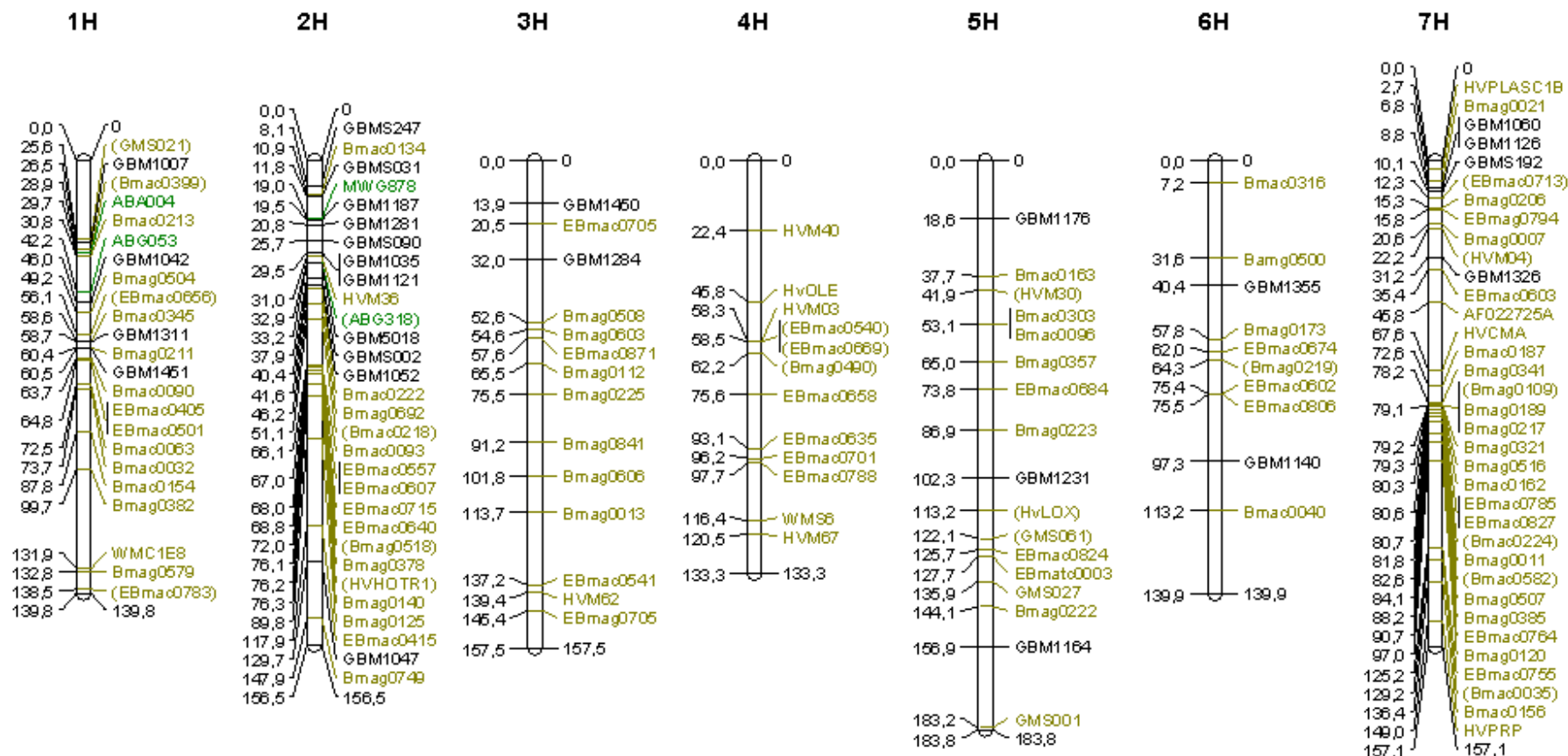
- 1. Zjistit charakter dědičnosti genů v nových zdrojů odolnosti ječmene k padlí ječmene**
- 2. Lokalizovat zjištěné geny odolnosti v genomu ječmene pomocí DNA markerů**
- 3. Vyvinout molekulární markery pro některé ze zjištěných genů odolnosti**
- 4. Pyramidování genů**

Strategie řešení

1. Vytvoření vhodných populací pro analýzy
odrůda 'Tiffany' x zdroj odolnosti \longrightarrow F_2
2. Fytopatologické testy – P, F_1 , F_2
3. Genetická analýza
Určení počtu genů determinujících odolnost
4. Získání DNA markerů pro ječmen *H. vulgare*
Určení polymorfismu u rodičů
5. Určení DNA markerů ve vazbě s jednotlivými
geny odolnosti:
Analýza balků – náchylného a odolného
Lokalizace genů na chromozomech ječmene

Mapa SSR markerů ječmene

Počet DNA markerů potřebných pro základní skríníng genomu



Druh – ječmen *Hordeum vulgare*

Hodnocený znak - odolnost k padlí travnímu

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

Populace F2 po křížení

náchylná (S) x odolná (R)

***H. vulgare* cv. Tiffany x *H. vulgare* ssp. *spontaneum*
PI466200**

(zdroj odolnosti – planý ječmen)

F₁ → F₂ (100 rostlin)

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/CAPS markery ve vazbě (analýzou balků)
4. Se kterými markery jsou vázány geny odolnosti (použitím SW MapQTL5)

- Rostliny rodičovské, F_1 i jednotlivé rostliny F_2 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 RT4

Zdroj odolnosti RT0

F_1 RT0

- F_2 balky (DNA) každý 18 rostlin

- F_2 100 rostlin (DNA)

- F_2 240 rostlin (fytopatologická analýza)

Určení markerů ve vazbě s genem odolnosti k padlí travnímu u ječmene. Práce s balky.

Materiál: Zdroj odolnosti (PI460200)

Populace F₂ (Tiffany x PI460200)

Krajní třídy RT0 a RT4

DNA markery – SSR (Simple sequence repeats)

CAPS (cleaved amplified polymorphis sequence)

chromozom 1H

chromozom 6H

chromozom 2H

chromozom 7H

chromozom 3H

chromozom 4H

chromozom 5H

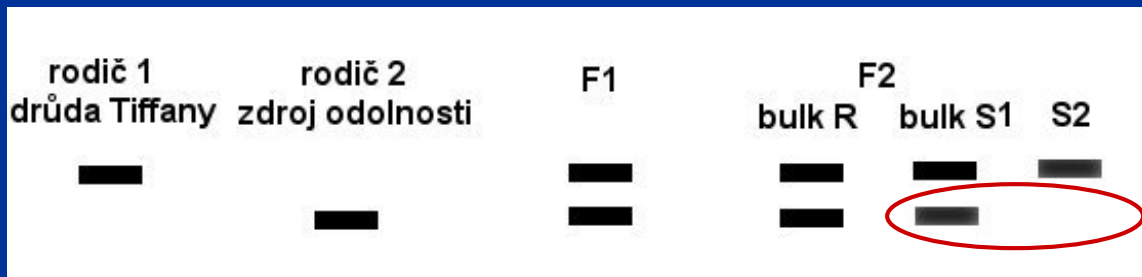
Analýza bulků při dominanci odolnosti

S – z náchylných rostlin F2

R – z odolných rostlin F2

S1 – testovaný SSR marker není ve vazbě s genem odolnosti

S2 – testovaný SSR marker je ve vazbě s genem odolnosti



DNA markery – aplikace ve šlechtění ČR

Rezistentní šlechtění

markery kosegregující se znakem odolnosti

Pšenice

geny rezistence ke rzi, lokusy *Lr9*, *Lr24* a *Lr35*

Ječmen

- gen *waxy*, charakter endospermu
- gen pro β -amylázu
- gen pro α -amylázu
- gen pro odolnost k viru BYDV
- geny pro odolnost k padlí ječmene

Pracoviště: VÚRV Praha-Ruzyně, Zemědělský VÚ Kroměříž

Brambor – geny rezistence k háďátku bramborovému a plísni bramborové (*Phytophthora infestans*), lokusy *H1*, *R1*

Pracoviště: VÚ bramborářský Havlíčkův Brod, AF ČZU

Meruňka – mapování a identifikace AFLP markeru vázaného s genem pro odolnost k viru šarky švestky

Pracoviště: VÚRV Praha-Ruzyně ve spolupráci s pracovištěm v USA.

Další oblasti aplikace genetických markerů

Metody identifikace transgenních rostlin

**A) Selektce na médiu s antibiotikem –
kanamycin**

Gen *NPT* (*neomycin phosphotransferase*)

B) Polymerázová řetězová reakce

C) Southernova hybridizace

Identifikace transgenních rostlin

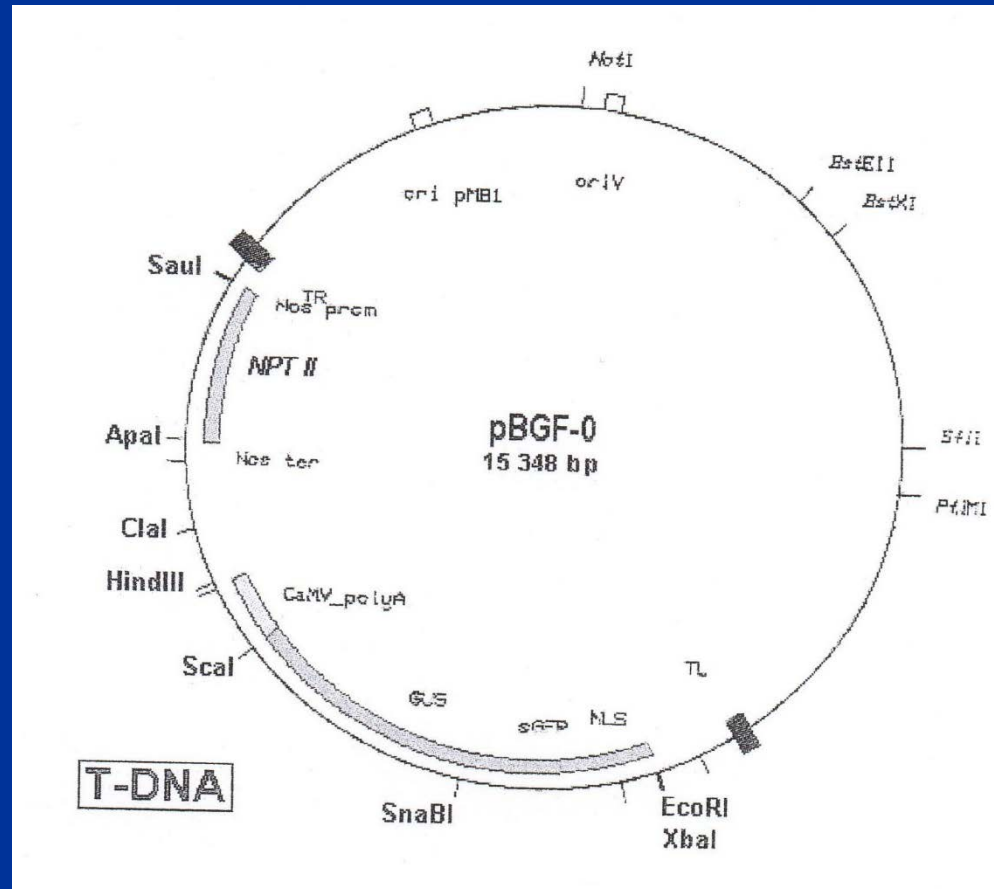
Arabidopsis thaliana

Agrobacterium tumefaciens

T-DNA

Gen selekční
NPT

Gen signální
GUS



A) Postup

Materiál:

Kontrola Wassilevskaja

transformované linie – RJG, ER4

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

Vyhodnocení počtu inzertů

Rezistence ke kanamycinu je dominantní znak

- 1 inzert 3 : 1 Kan^R : Kan^S
 - 2 inzerty 15 : 1
 - 3 inzerty 63 : 1
1. Jak se změní štěpné poměry, jestliže 2 a více inzertů je ve vazbě?
 2. Určení počtu inzertů u testovaných inzerčních linií.
 3. Přesazení rostlin a identifikace inzertu PCR.

B) Postup PCR pro *NPT*

Polymerázová řetězová reakce

Primery pro *NPT*

5' CCCGCTCAGAAAGAAGAACTCGTCA 3'

5' TGGCTGCTATTGGGCGAAGTG 3'

Program pro amplifikaci genu *NPT*

(94°C 45s, 60°C 45s, 72°C 60s) 35x

Složení reakční směsi

d H ₂ 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	