

Praktikum z genetiky rostlin

JS 2017

Genetická analýza a genetické markery

- 1. Genetická analýza a zjištění počtu genů odolnosti k padlí u ječmene.**
- 2. Identifikace genů - určení DNA markerů v genetické vazbě s genem odolnosti k padlí travnímu u ječmene. Práce s balky.**
- 3. Genetické mapování genů odolnosti k padlí travnímu u ječmene. Využití mapovacího softwaru.**
- 4. Identifikace transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana*.**
- 5. Celogenomová genotypizace u jetele lučního**

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

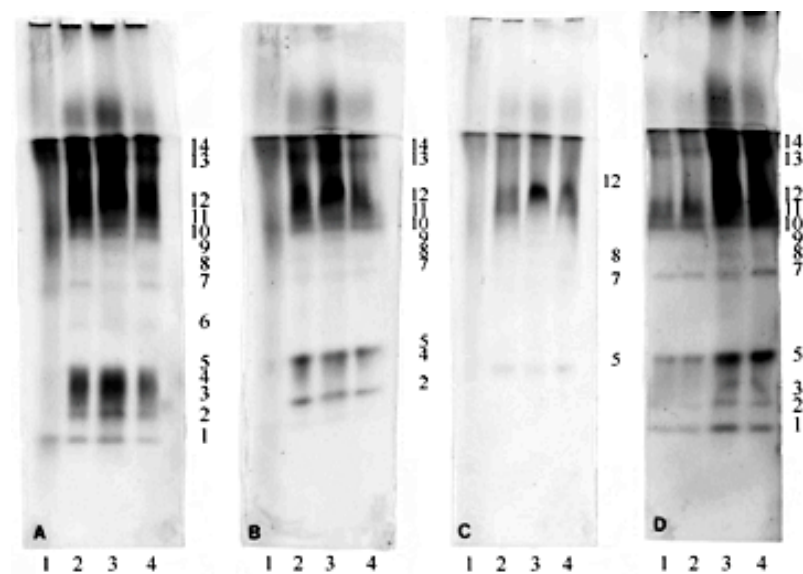
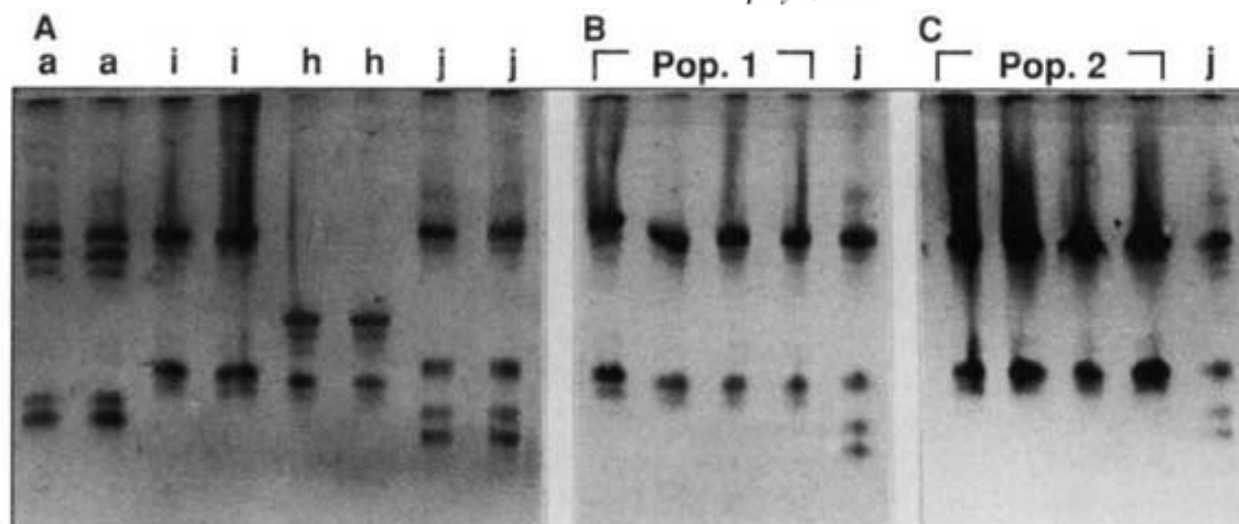


Figure 1 - Inhibition pattern for characterization of esterases from leaves of *Aspidosperma polyneuron* showing that Est-1, Est-3, Est-4, and Est-6 isozymes were inhibited in the presence of Malathion (B); Est-5, Est-7, Est-8, and Est-12 isozymes were detected as weakly stained bands by Folidol (C); 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
 Esterase I Mdh



Vlastnosti markerů

1. vysoký polymorfismus
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

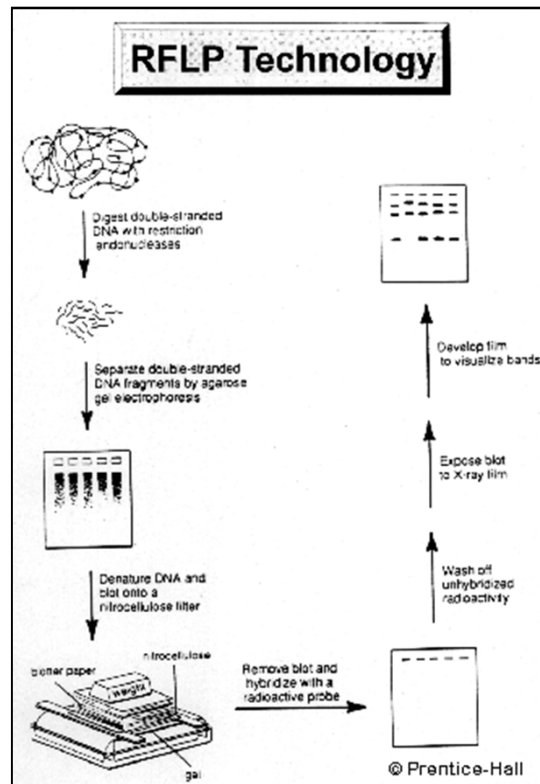
Typy DNA markerů:

- 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

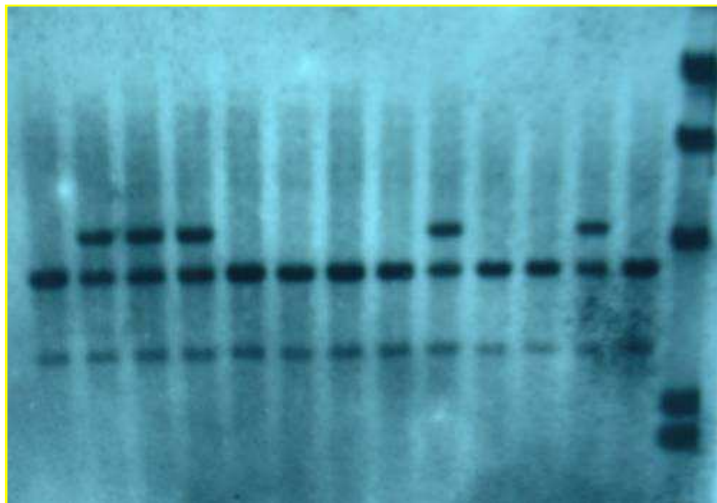


Schéma CAPS markerů

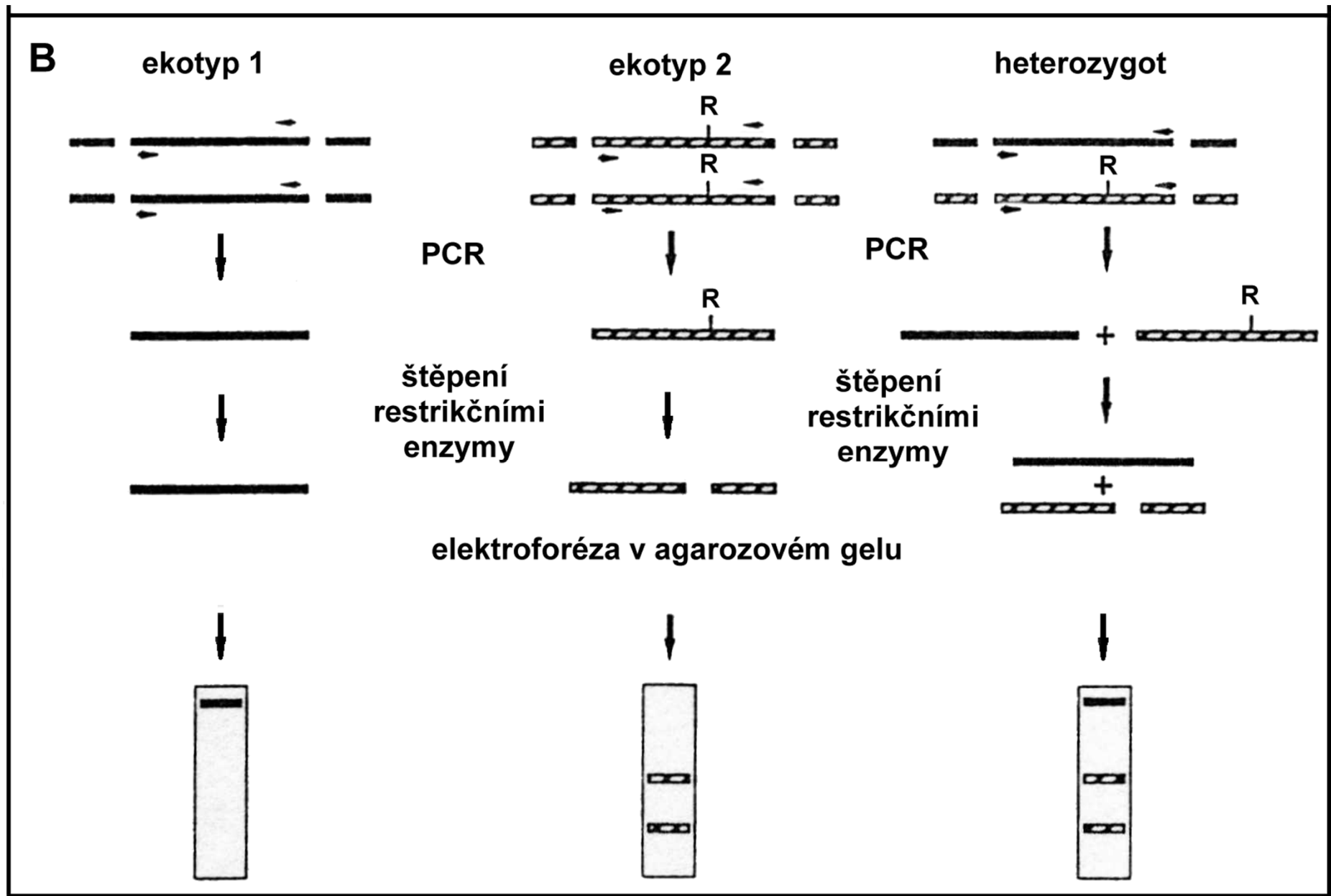
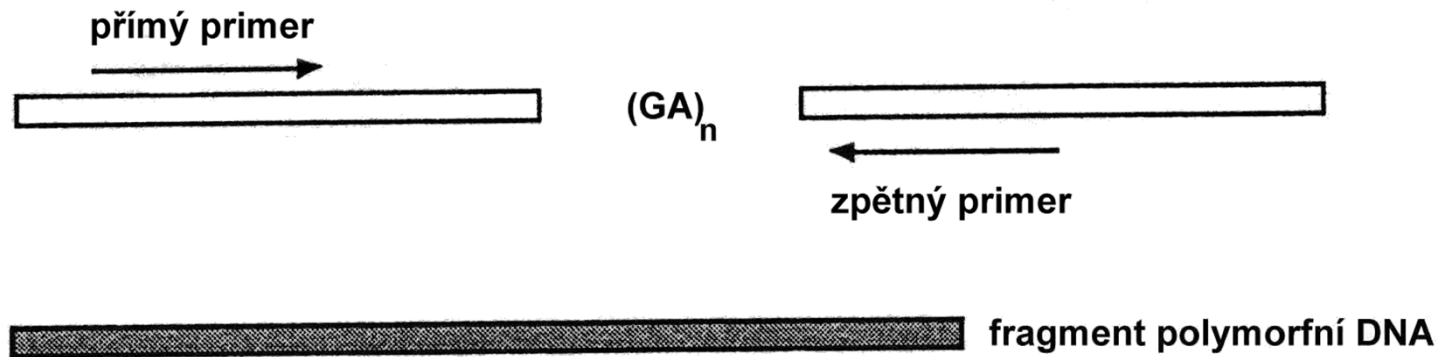
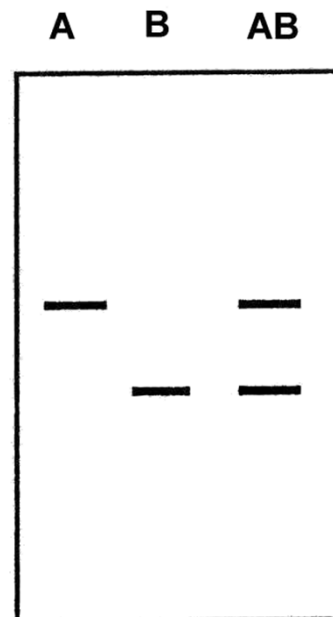


Schéma SSR (=STR) markerů

A PCR



B Elektroforéza



A 1. ekotyp

B 2. ekotyp

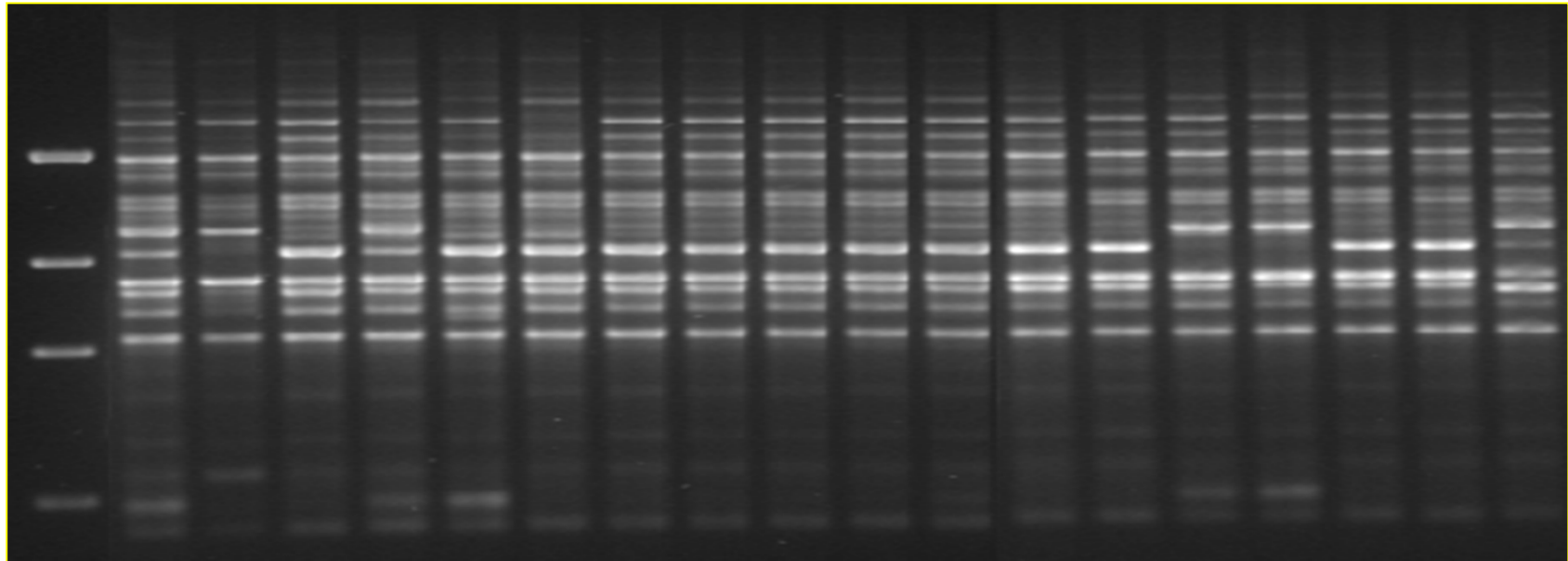
AB kříženec A x B

RAPD

- random amplified polymorphic DNA

DAF

- DNA amplification fingerprinting



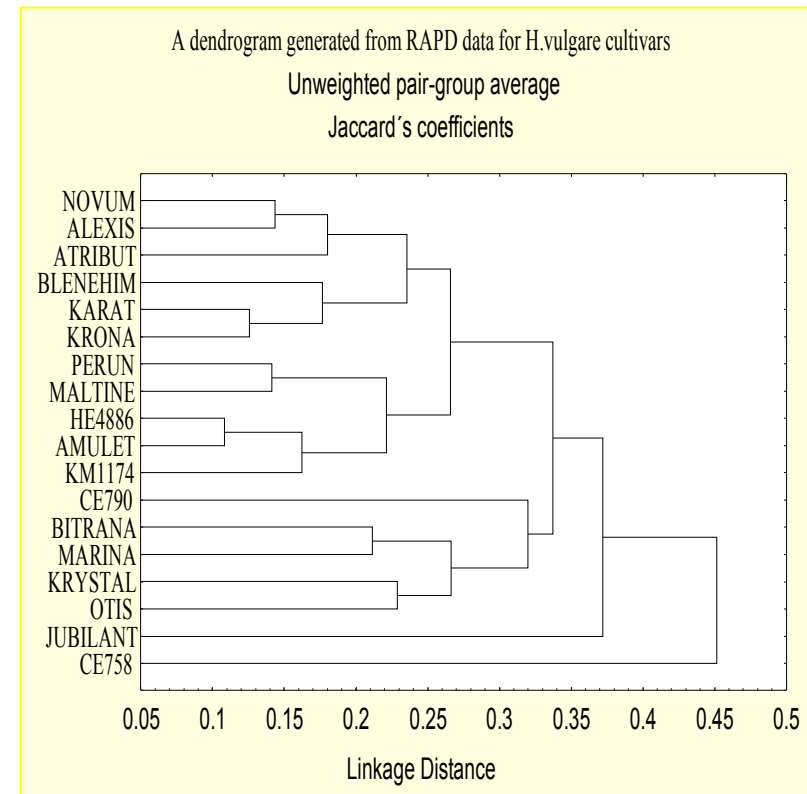
SCAR

- sequence characterised amplified regions

RAPD příklady : ječmen

Analyzována kolekce
jarních ječmenů
využívaných ve
šlechtění na
sladovnickou kvalitu

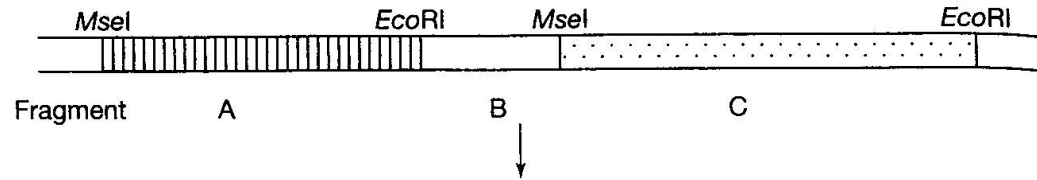
Malé rozdíly v
genetickém založení
kolekce



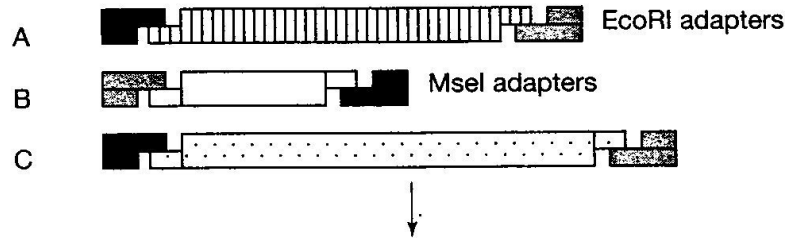
Primer	Sequence	Primer	Sequence	Contents of CG pairs
ABN-02	5'-ACC AGG GGC A-3'	ABN-04	5'-GAC CGA CCC A-3'	70%
ABN-07	5'-CAG CCC AGA G-3'	ABN-08	5'-ACC TCA GCT C-3'	
ABN-09	5'-TGC CGG CTG G-3'	ABN-13	5'-AGC GTC ACT C-3'	
ABN-14	5'-TCG TGC GGG T-3'	ABN-20	5'-GGT GCT CCG T-3'	
AB2-02	5'-GGT GCG GGA A-3'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

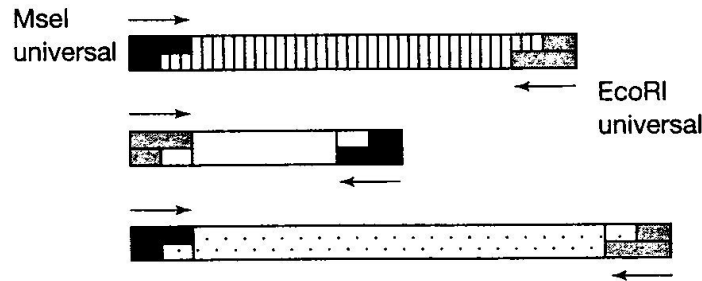
1. Štěpení genomové DNA dvěma restrikťazami



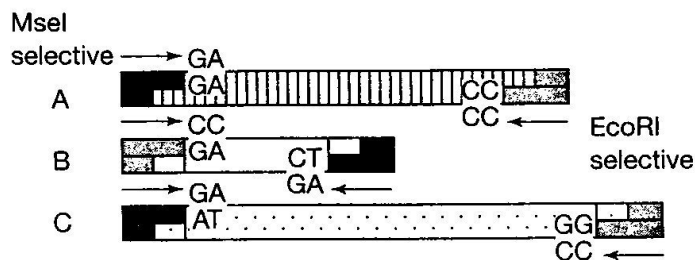
2. Ligace s adaptéry pro MseI a EcoRI



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



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



Amplifikace

ano

ne

ne

štěpení DNA se vzácně a často štěpicími enzymy

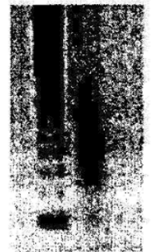
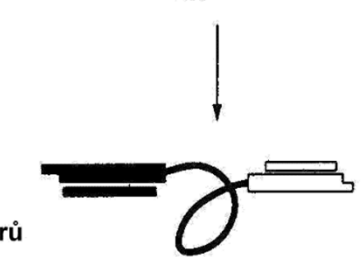
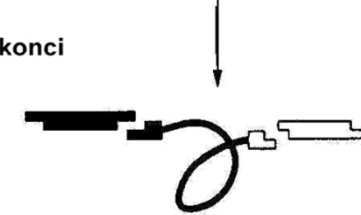
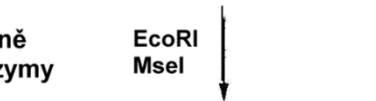
fragmenty

ligace adaptéru s komplementárními konci

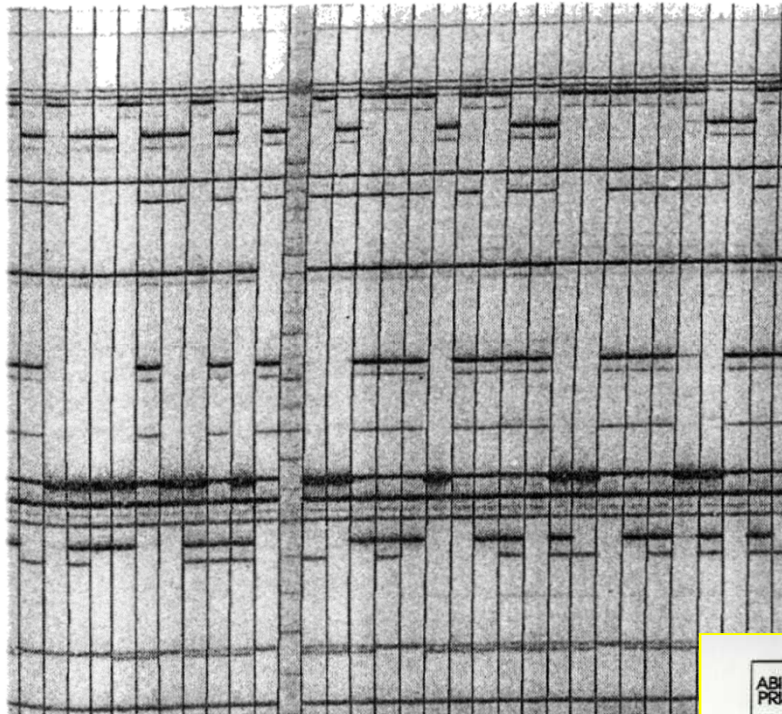
provedení PCR za přítomnosti neselektivních primerů



genomová DNA

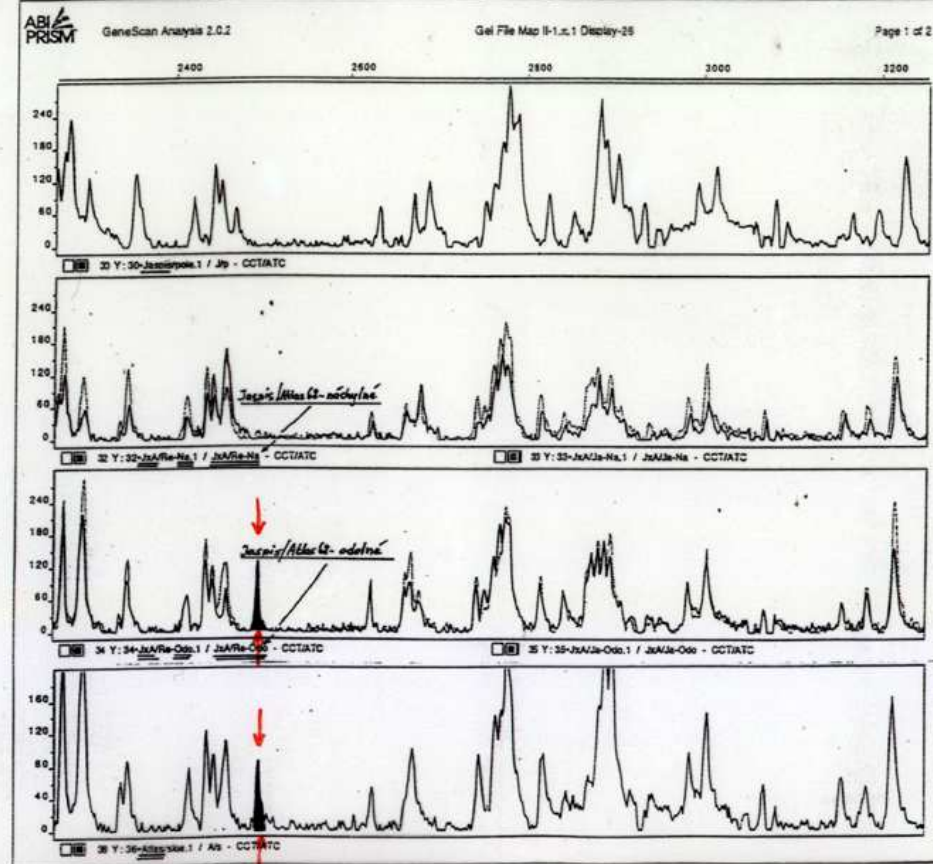


polyakrylamidový gel
a jeho analýza



Vhodný pro hodnocení

Kapilární
elektroforéza



Využití genetických markerů

Základní výzkum i šlechtění

Studium rostlinných genomů

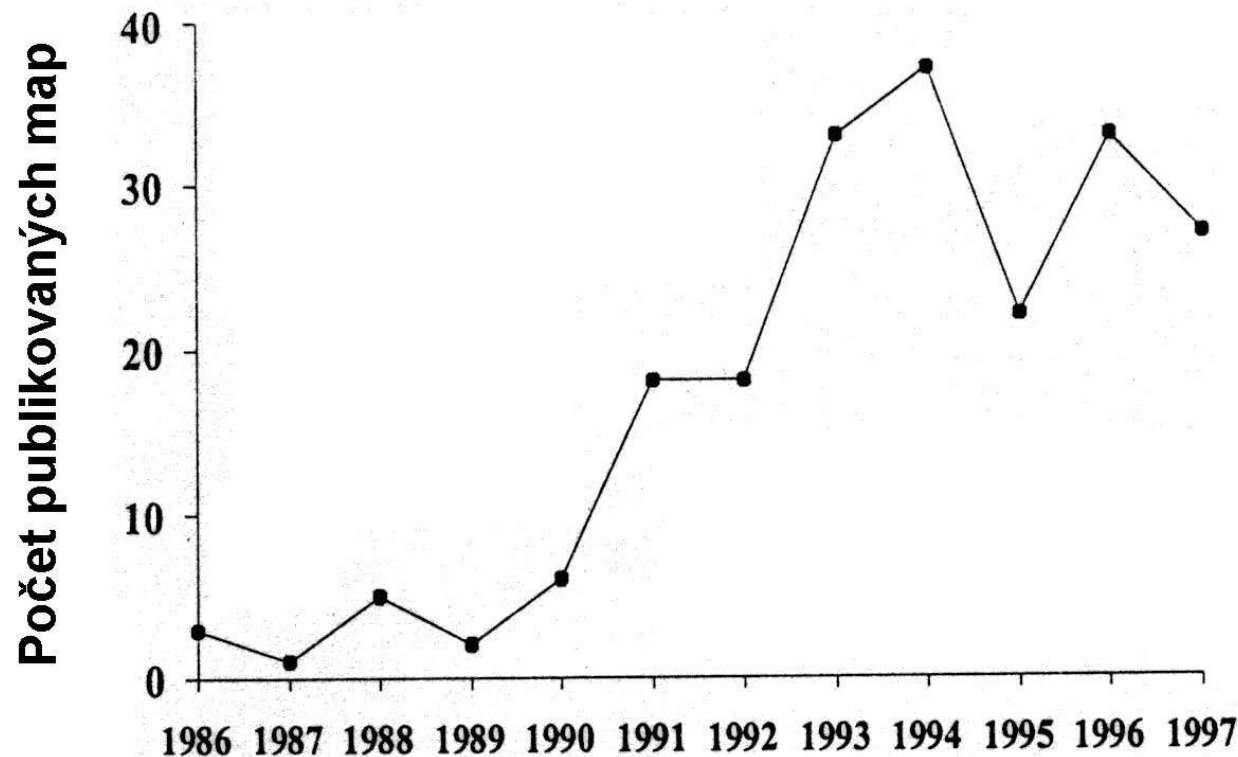
- 1. Otisk DNA (fingerprinting)**
- 2. Stanovení evolučních vztahů (příbuznost genotypů), taxonomie**
- 3. Genetické mapování**

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)

Blízké izogenní linie (NIL)

Znaky kvalitativní x znaky kvantitativní

Velikost populace

Počet DNA markerů pro zachycení vazby

Aneuploidie

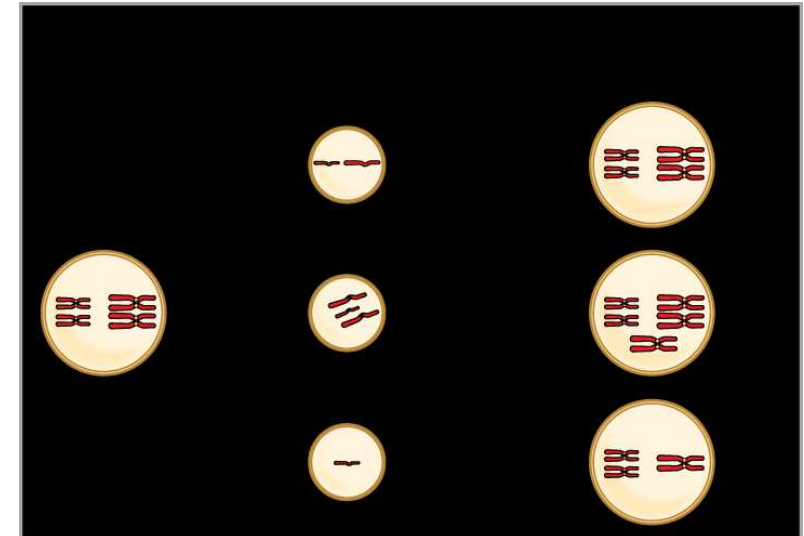
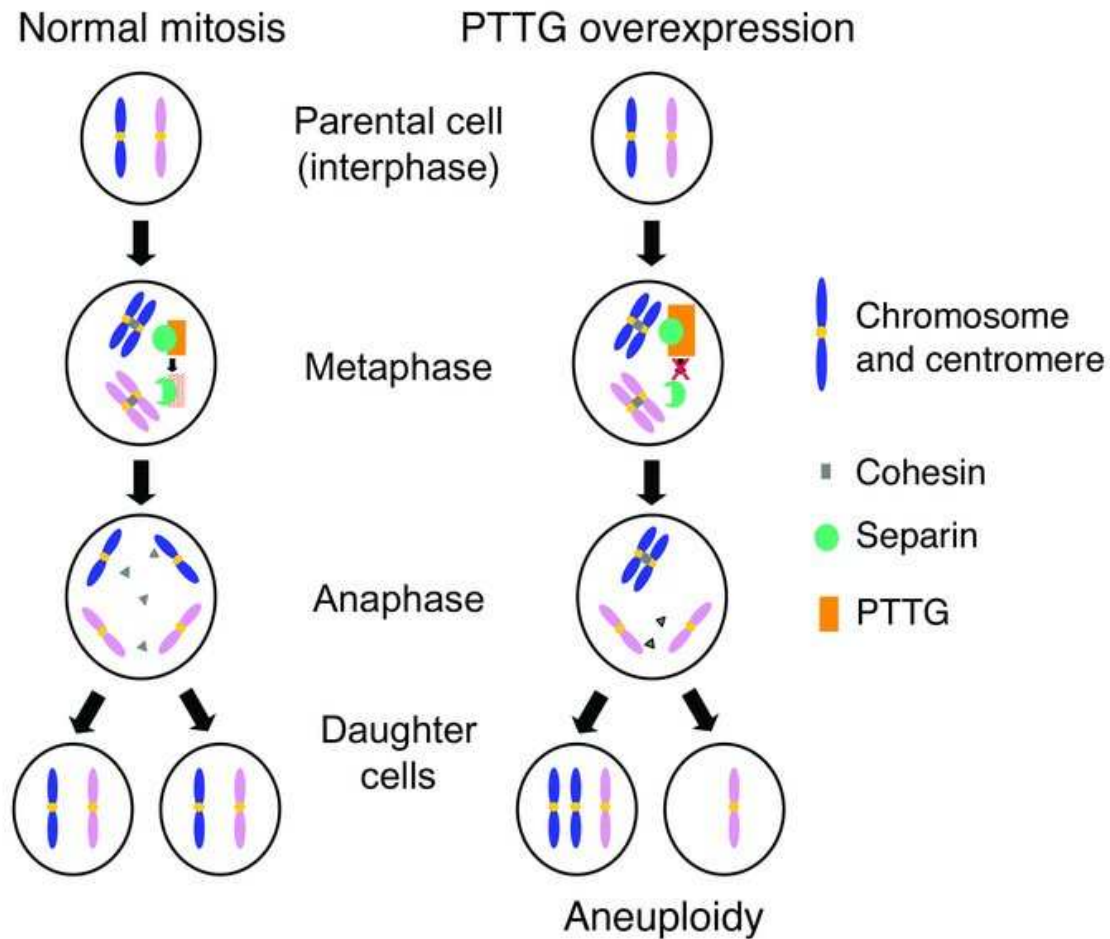


Table 5.2 Classification of aneuploids

Term	Chromosome number
Monosomy	$2n-1$
Nullisomy	$2n-2$
Trisomy	$2n+1$
Tetrasomy	$2n+2$
Pentasomy	$2n+3$

Lokalizace genů do vazbových skupin pomocí aneuploidů trizomiků

1. Mutace *a* je lokalizována na trizomickém chromozomu

P: *AAA* x *aa*

F1: *AAa* *Aa*

F2:

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

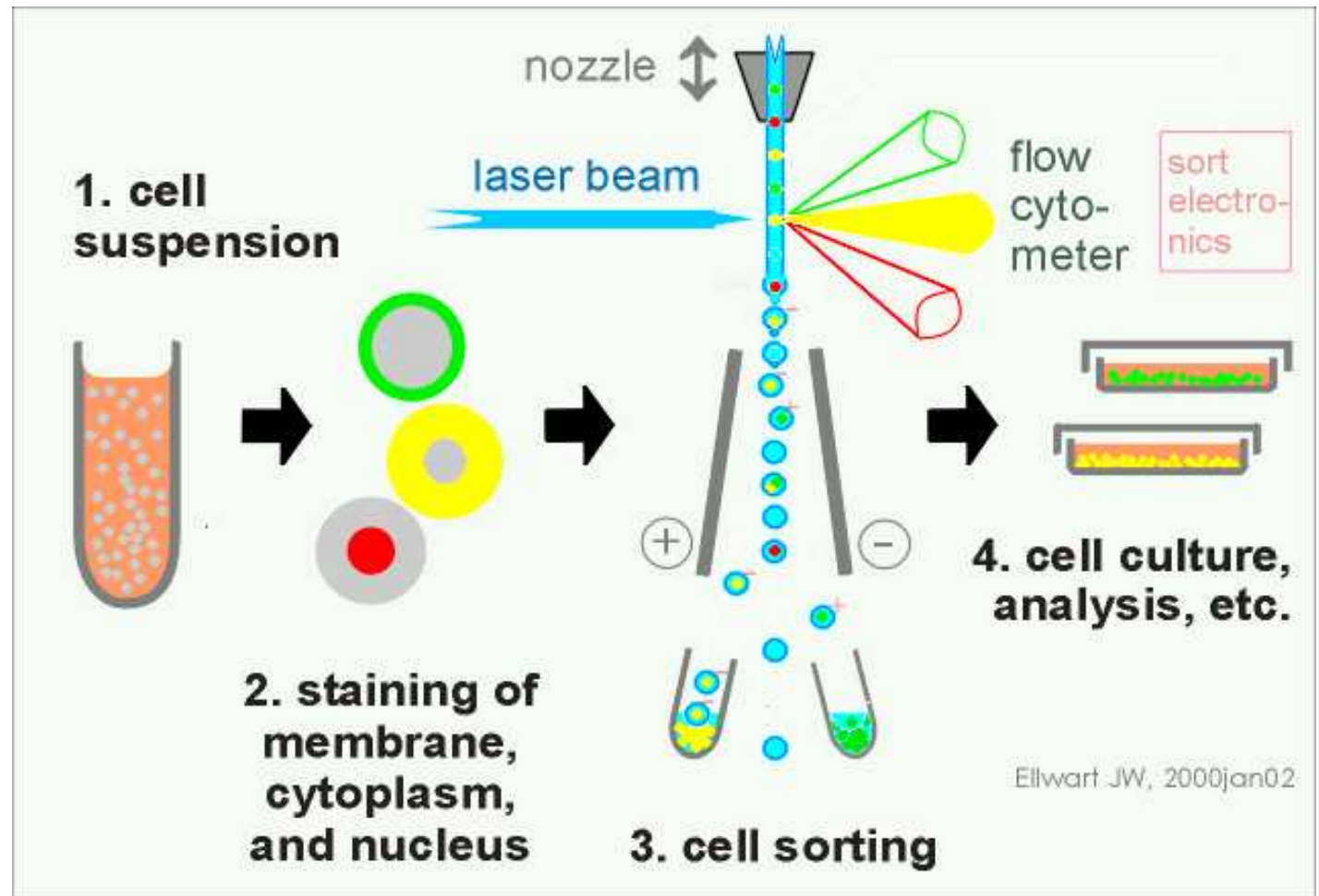
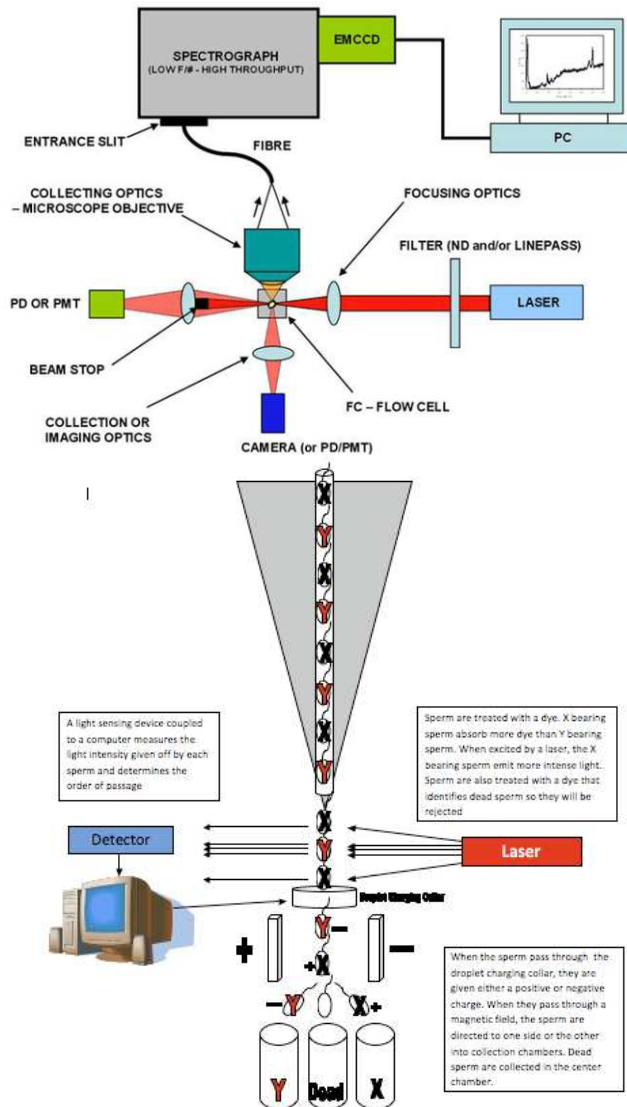
Fenotypové štěpné poměry:

AAA B- : *AAA bb* 3 : 1

AA B- : *AA bb* 3 : 1

Význam aneuploidie v současnosti

Identifikace 1 chromozomu při celogenomových studiích velkých genomů
Pšenice – polyploidie, příprava aneuplodů pro jednotlivé chromosomy,
jejich třídění průtokovou cytometrií



Příklad: Genetické mapování mutace
lycopodioformis Arabidopsis thaliana

Materiál: morfologická mutace *ly*

Populace F₂

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

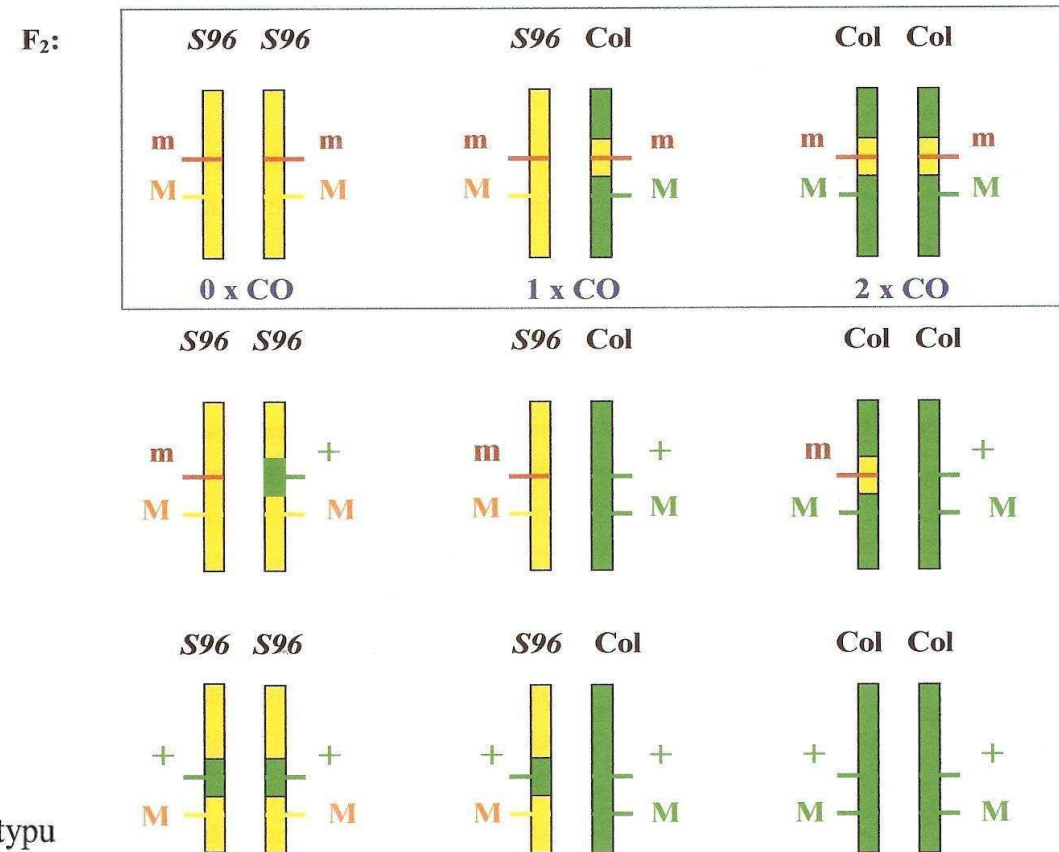
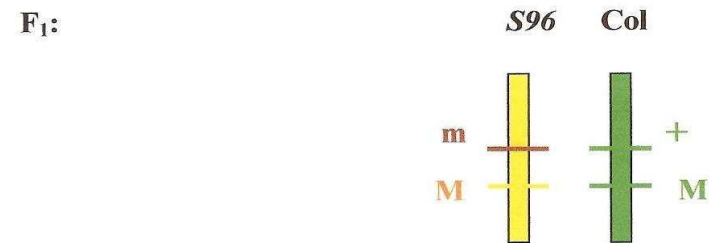
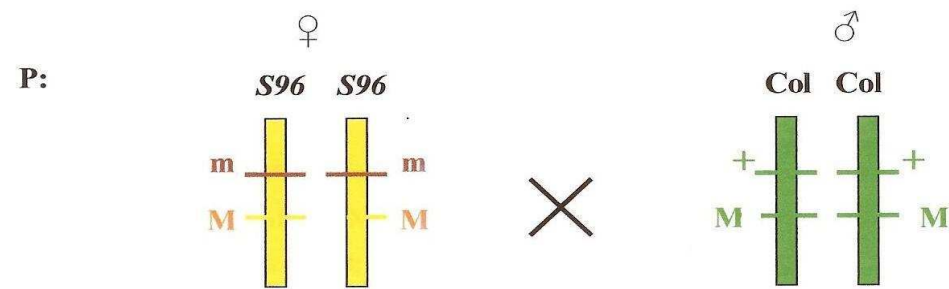
Columbia



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*

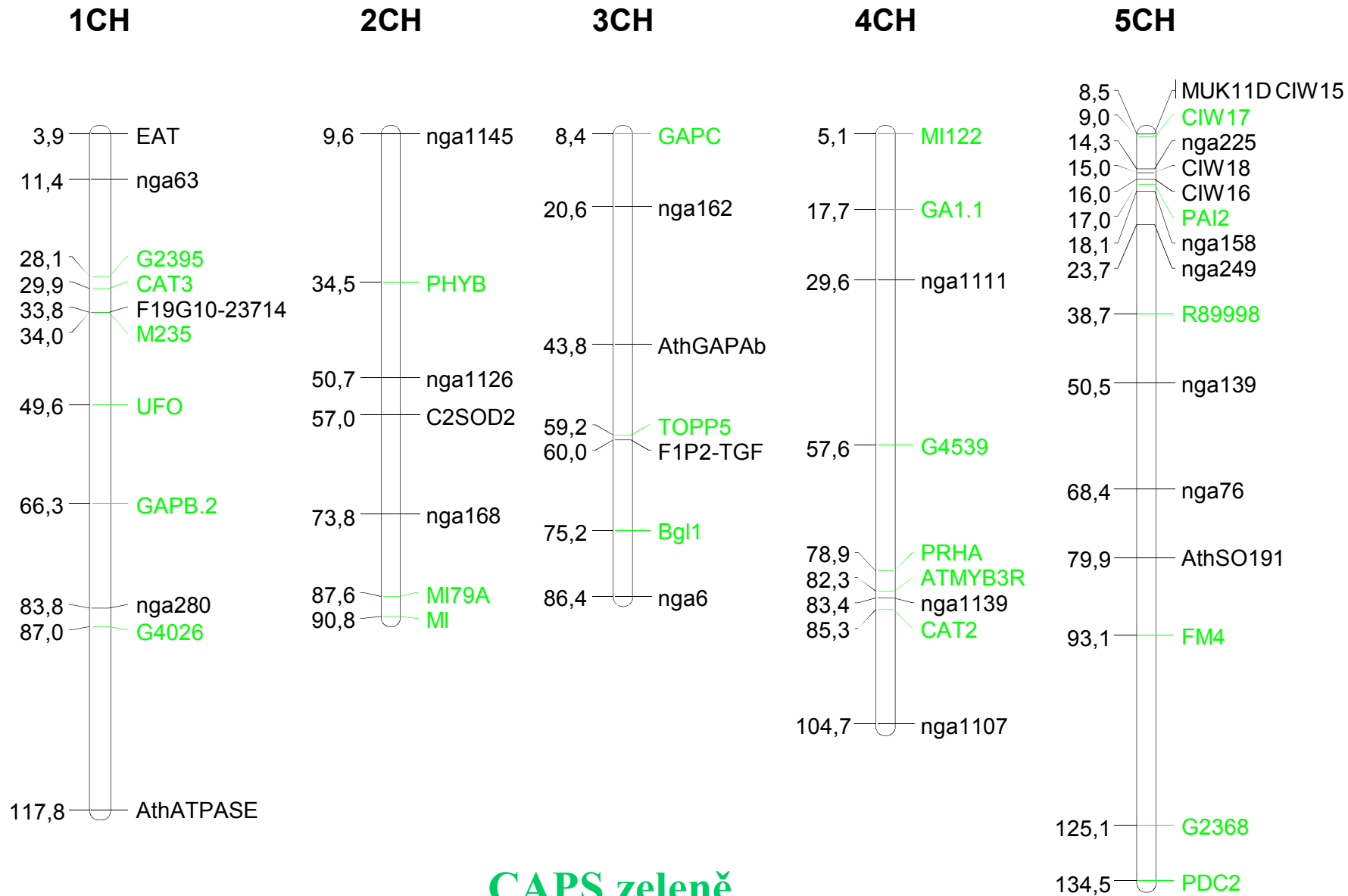
0 x CO.... žádný crossing-over

1 x CO.... jeden crossing-over

2 x CO ...dva crossing-over

Rámečkem jsou označeny rostliny F₂ generace mutantního fenotypu

Lokalizace používaných DNA markerů v genetické mapě *Arabidopsis thaliana*



CAPS zeleně
SSR černě

Postup

20 až 30 vzorků DNA /y z F₂

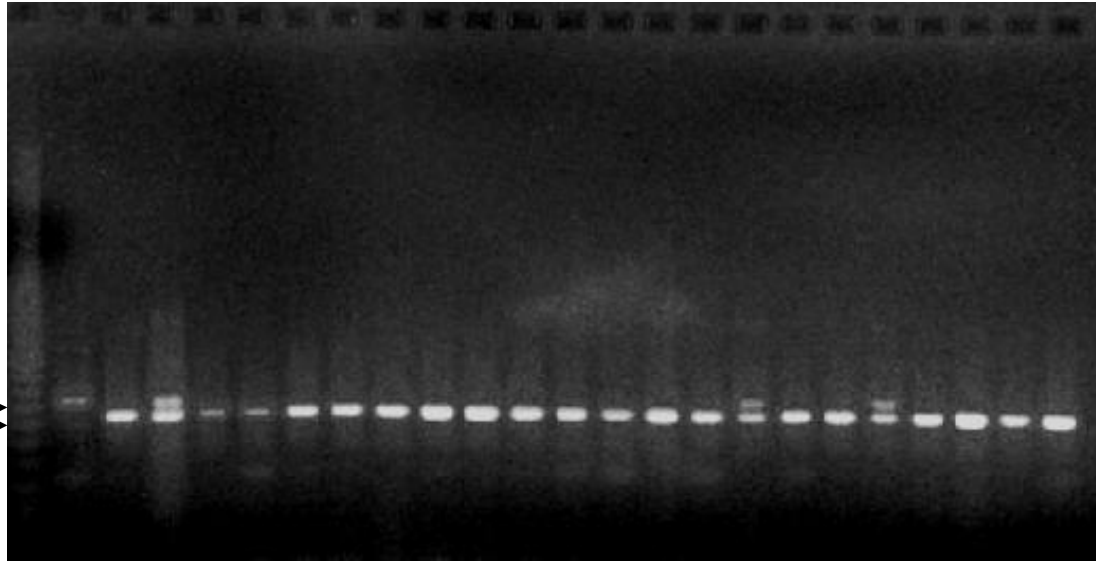
Kontroly: rodiče, F₁

- **PCR pro SSR markery**
- **ELFO**

- **PCR pro CAPS markery**
- **Štěpení enzymem**
- **ELFO**

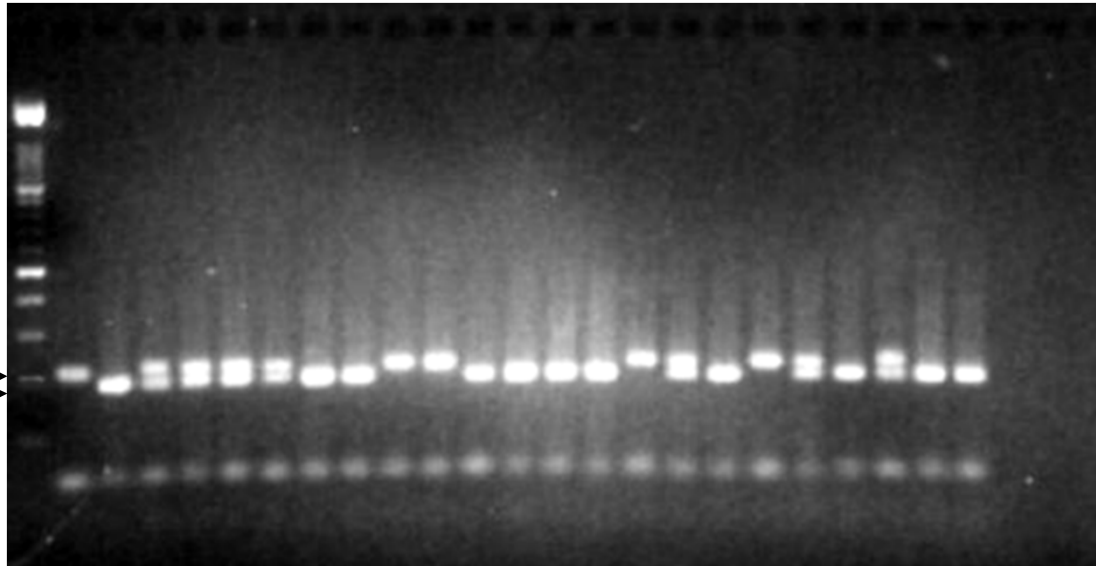
Segregující populace F2 a molekulární analýza - příklady

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

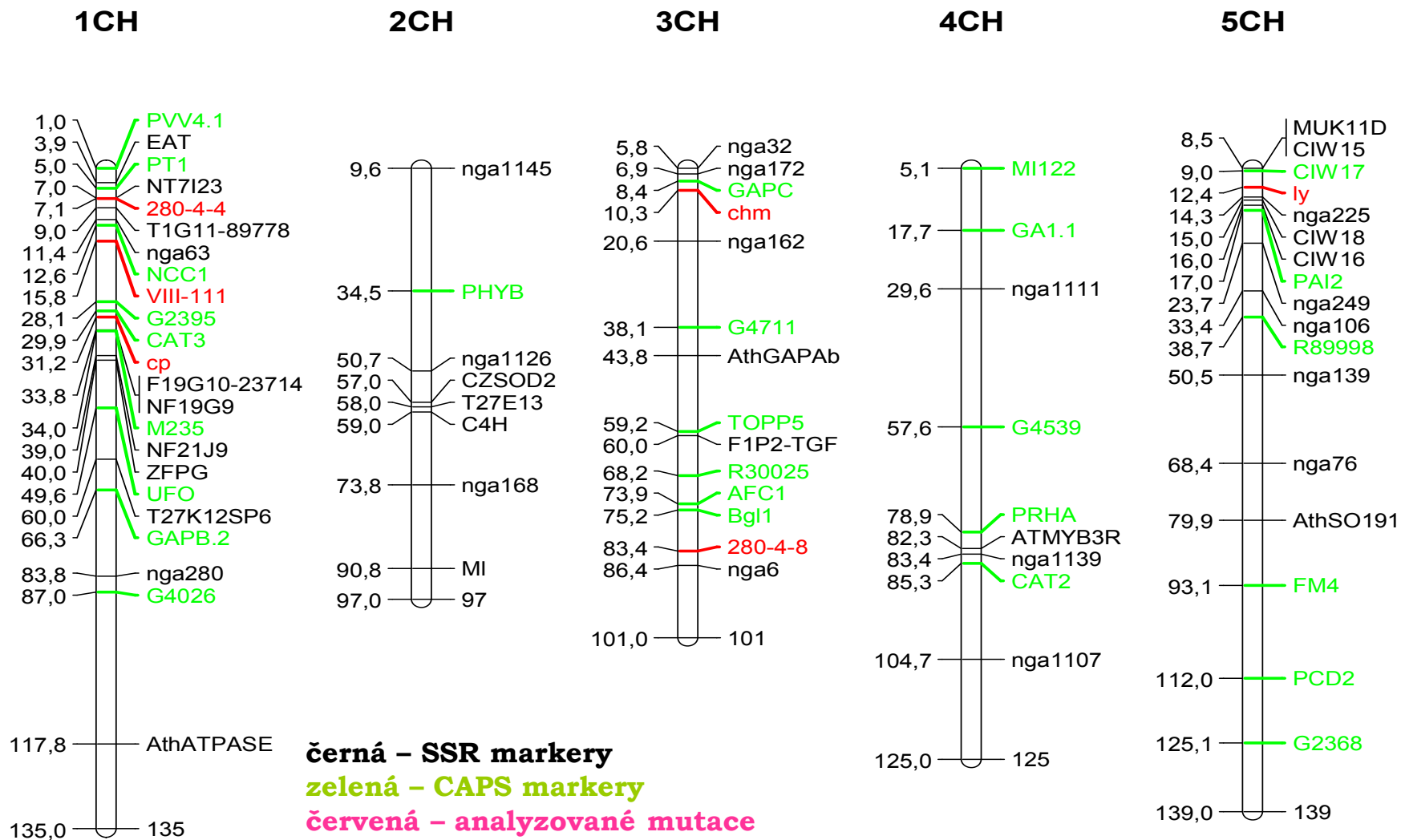
*Odhad mapové vzdálenosti D dle Kosambiho mapovací funkce
(Kosambi, 1944):*

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

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**

Charakterizace mutace na úrovni DNA

aagttacaaaagaaa**ATG**GAGAATATGGGAAGCTAGAGTGATAGAGCCATTGATAATGGGGAGAGTGGTAGGAGATGTT
CTTGATTTCTTCACTCCAACAAGATGAATGTTAGTTATAACAAGAAGCAAGTCTCCAATGGCCATGAGCTCTTTC
CTTCTTCTGTTTCTCCAAGCCTAGGGTTGAGATCCATGGTGGTGATCTCAGATCCTTCTTCACTTTGgtaaatacatatatt
aaattatattataataatggttggtttatattatattgtgccaaaaaaacatatataaacgtctcacttcctttcctttacaagtttccatttctaactcaa
taatcttataaattgtagcttttagttttatcattccttttccagtcttttttttaatggtaaaactcaaccgaaatgcaaaacagGTGATGATAGAC
CCAGATGTTCCAGGTCCTAGTGACCTCTTCTAAAAGAACACCTGCACTGgtacgtttaatttatttctttcctttcattttgggcc
catattccatatacattgcatttaaatcatttcgttataaccctaataaagtttttttgggtgtaagttatatacatttgagttggtcaaagatctccatcgc
catgagttctcagaacttttctgtaaagtaataatattagattggtgaatggttcaatagGATCGTTACAAACATTCCCGGCACAACAGAT
GCTACGTTTGgtaaggcctcttcatgaatcttgaatttaataacttatacatatcatggttatatagaataaaaaatattgcatgtaatatagGC
AAAGAGGTGGTGAGCTATGAATTGCCAAGGCCAAGCATAGGGATACATAGGTTTGTGTTTGTCTGTTTCAGGCAGAA
GCAAAGACGTGTTATCTTTCCTAATATCCCTTCGAGAGATCACTTCAACACTCGTT
AAATTTGCGGTGAGTATGATCTTGGTCTCCCTGTCGCGGCCGTCTTCTTTAACGCACAAAGAGAAACCGCTGCACGC
AAACGC**TAG**tttcatgattgtcataaactgcaaaaatgaaagaagaaaatttgcattgtaattctcatggtttatttgtgttctgaatttccgtaactctgaa
taaaaactgccaaagatgagttgaaatccgaaatatcaattgagtttacagaagtattgataacgatctgtcgattatcagaataaaaactagattaattg
catatcatgtttagcattgtaataactacaaaaatagtaaactcttgattaattaataaaaatctaagttgctgtagtatataaatcattaatcctcatat
ggcttgataggtcacatcacatgtagtgaaccttattatgataaacgtggagatacggaaaaggatagttaaacgatgaaaacttttttagttctggt
caaagtgacaagacctgatgacctataaataatgatcctctcc



lycopodioformis (ly)

lycopodioformis S96 - standard



terminal flower

Klasická mutageneze (EMS)

Raně kvetoucí rostlina s terminálním květenstvím a celkově malým habitem

1 gen, recesivní alela

Chromozom 5; $12,4 \pm 1,3$ cM

Kandidátní gen:

TFL 1 (Terminal Flower 1)

Důkaz: test na alelismus

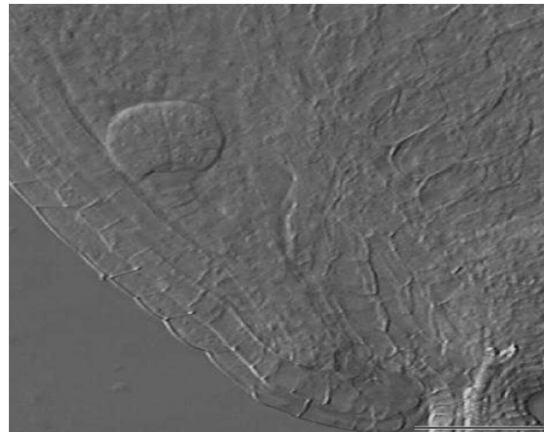


Znaky se sníženou vitalitou nebo letalitou

- Důsledek - štěpné poměry?
- Letální alela – recesivní
- Test mutagenity – **Müllerův embryonální test** na letální gametické mutace

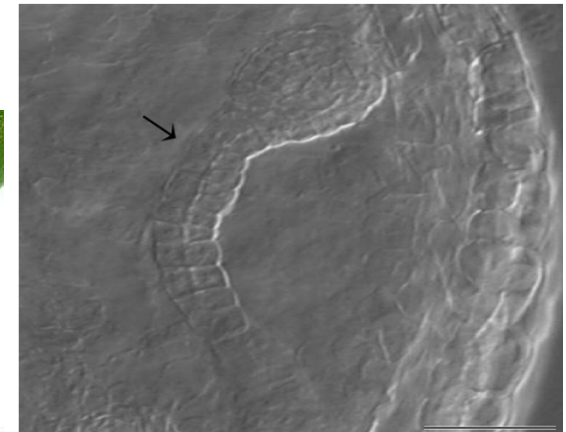
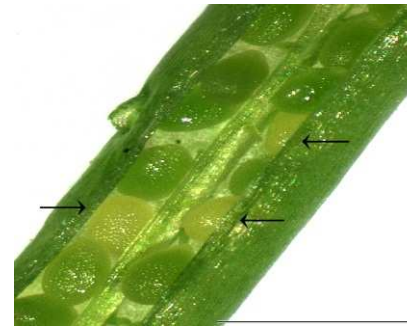
Kontrolní linie

Col

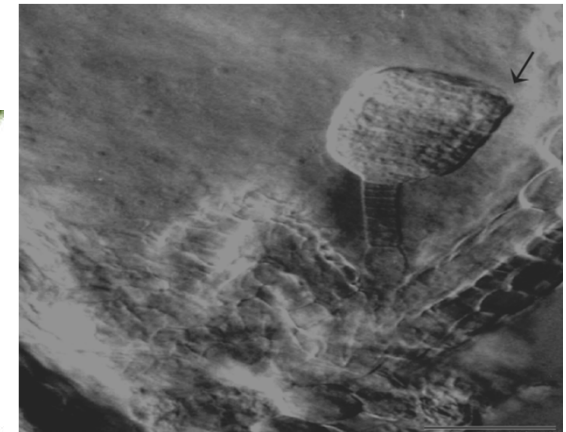
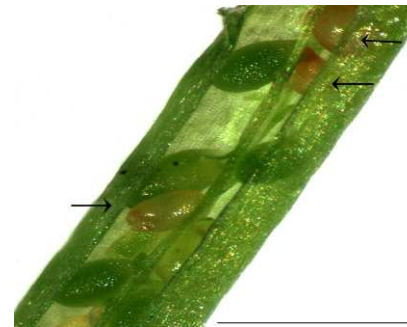


Mutantní linie

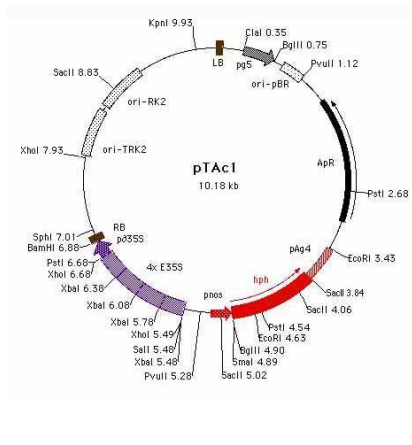
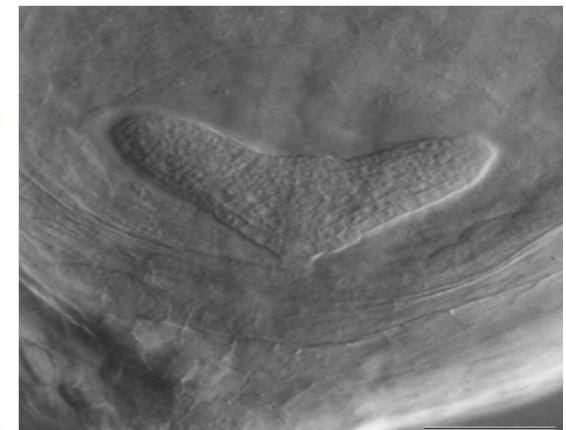
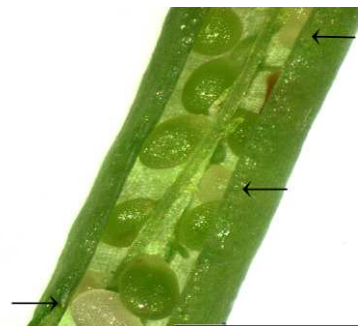
280-4-4



VIII-41



VIII-111



Speciální problémy řešitelné mapováním u druhů s velkým genomem

Podrobné mapování určité oblasti genomu

Identifikace DNA markerů v těsné vazbě s genem
Speciální populace pro mapování – RIL, NIL,
BSA (Bulk Segregant Analysis) s cílem MAS

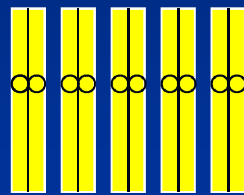
RIL (recombinant isogenic lines)

Rekombinantní inbrední linie

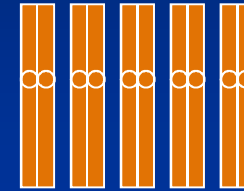
⊗ časová náročnost

⊕ vysoká homozygotnost

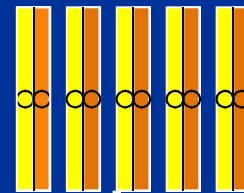
Křížení polymorfních
(fenotypově kontrast-
ních) linií



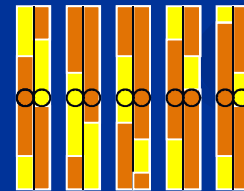
×



F₁



F₂ 50,0%



F₃ 75,0%

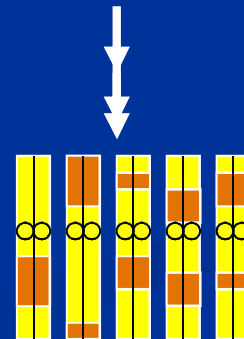
F₄ 87,5%

F₅ 93,8%

F₆ 96,9%

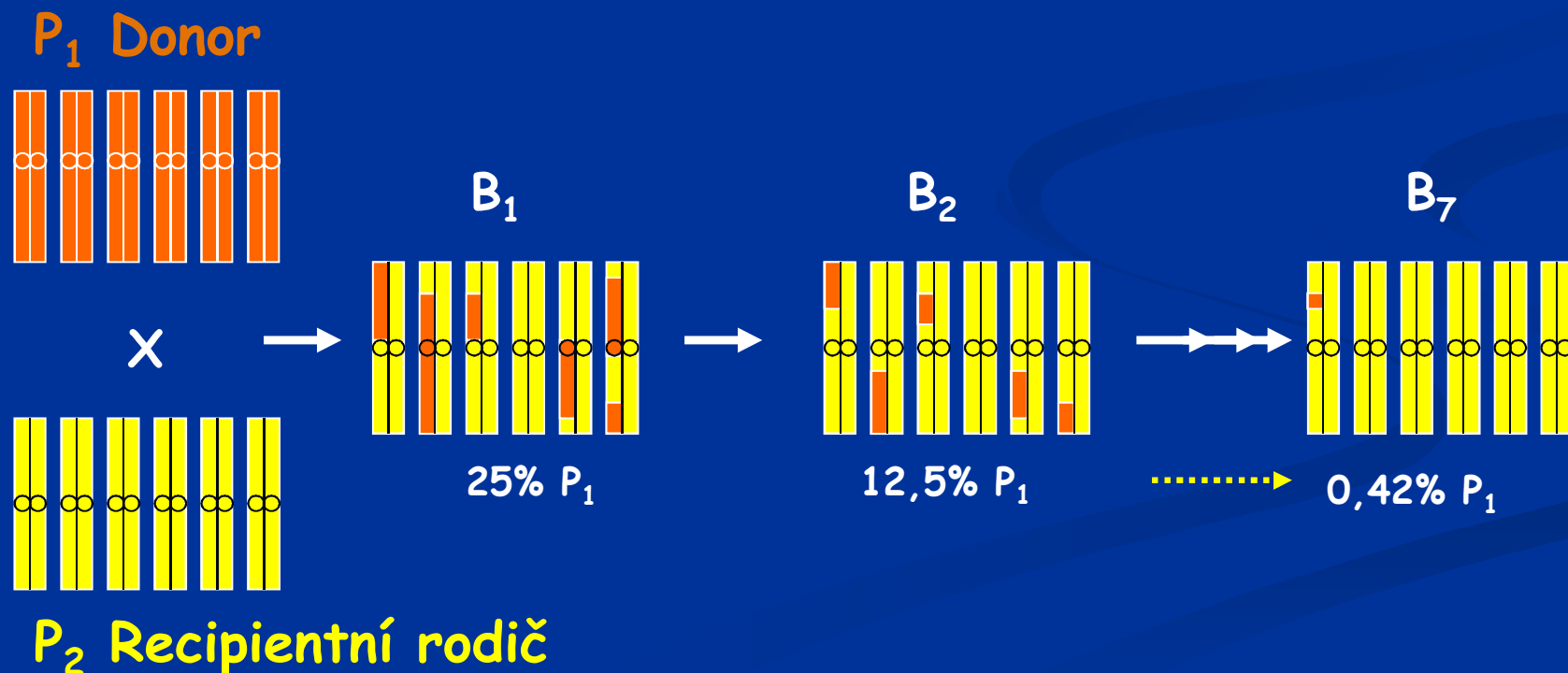
F₇ 98,7%

F₈ 99,5%



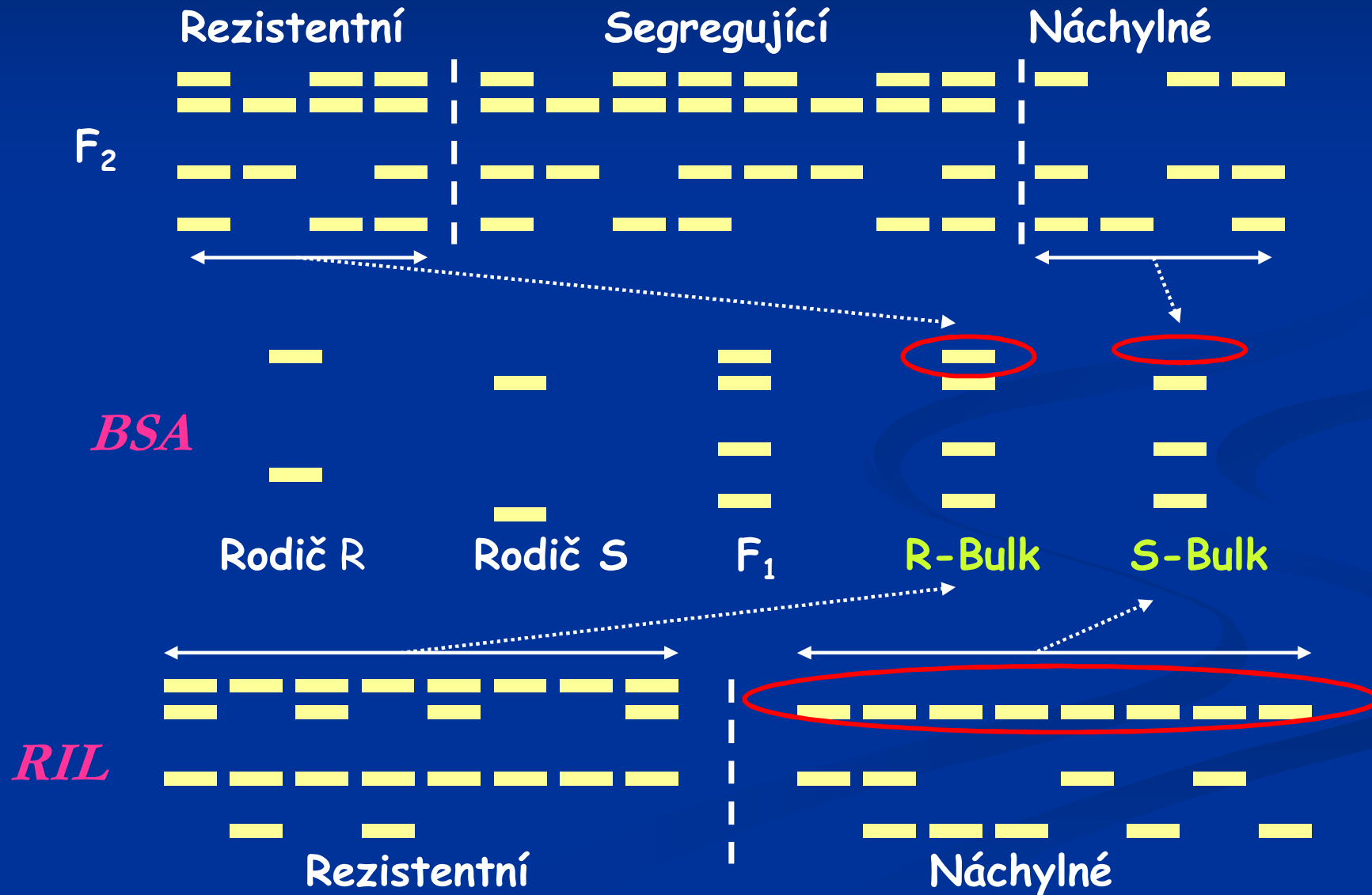
NIL (near isogenic lines) Izogenní linie

- ⊗ 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



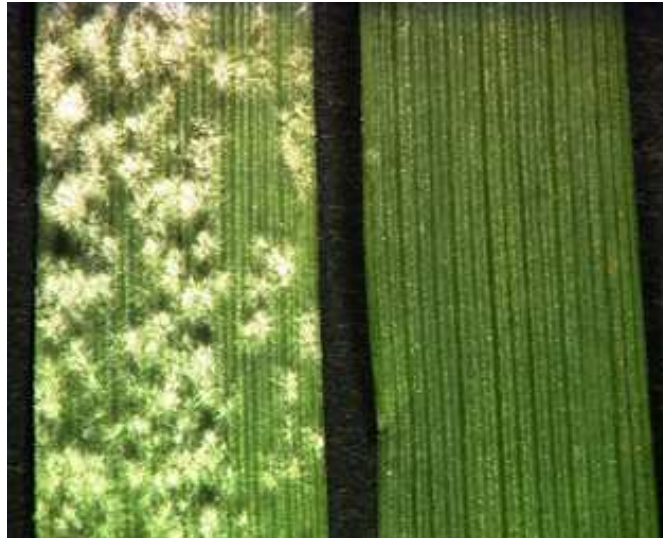
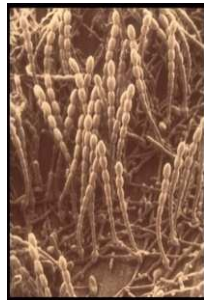
BSA (bulk segregant analysis)

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



Genetické mapování genu odolnosti u ječmene

- *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 (Pl.....)

Genetické aspekty choroby

Rostlina (hostitel)

genom 1



geny odolnosti *R*
většinou dominant alela



protein 1

Patogen

genom 2



geny avirulence *Avr*
dominantní



protein 2=elicitor

interaction



rozpoznání



Aktivace mechanismů odolnosti

koncept gen – proti – genu

geny *R*

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

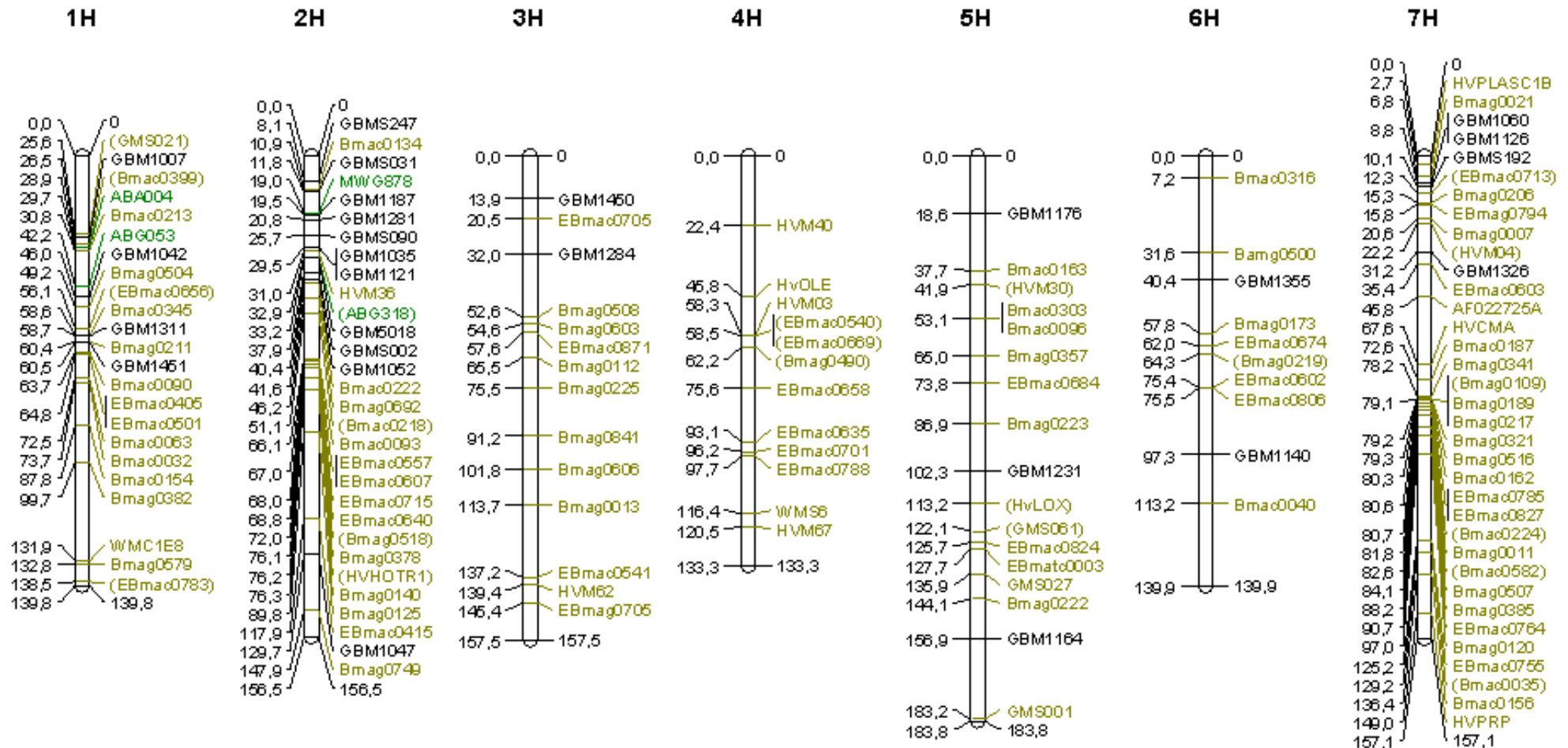
Cíle studia donorů rezistence

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

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 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 využívaných v laboratoři



Druh – ječmen *Hordeum vulgare*

Hodnocený znak - odolnost k padlí travnímu

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

Populace F2

Křížení 7:

náchylná (S) x odolná (R)

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

(zdroj odolnosti – planý ječmen)



F₁ → F₂ (100 rostlin)

Úkol č. I

Analýza rezistence ječmene

- 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)**

- 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 7

RT0

F_1

RT0

- F_2 balky (DNA) každý 17 rostlin

- F_2 100 rostlin (DNA)

- F_2 240 rostlin (fytopatologická analýza)

Úkol č. 3

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

Materiál: Zdroj odolnosti 7 (PI460200)

Populace F₂ (Tiffany x PI460200)

Krajní třídy RT0 a RT4

DNA markery – SSR (Simple sequence repeats)

CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence)

chromozom 1H RGH1aE2d, Bmac0213, K06257

chromozom 2H Bmac0134

chromozom 3H K00088

chromozom 5H EBmac0684

chromozom 7H Bmag0011, Bmag0507

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

