

Praktikum z genetiky rostlin

JS 2021

Identifikace genů přístupy klasické a molekulární genetiky a genomiky

- 1. Genetická analýza a využití genetických markerů u modelových a kulturních druhů**
- 2. Asociační mapování**

Cíle praktika

- 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. Celogenomová genotypizace u jetele lučního**

Genetické markery

Marker (genetický marker)

= signální gen, signální linie

- morfologické
- bílkovinné (izoenzymy)
- DNA

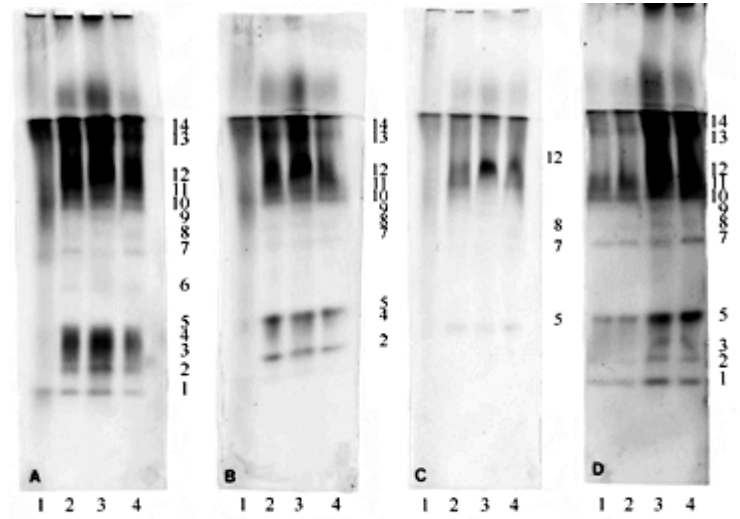
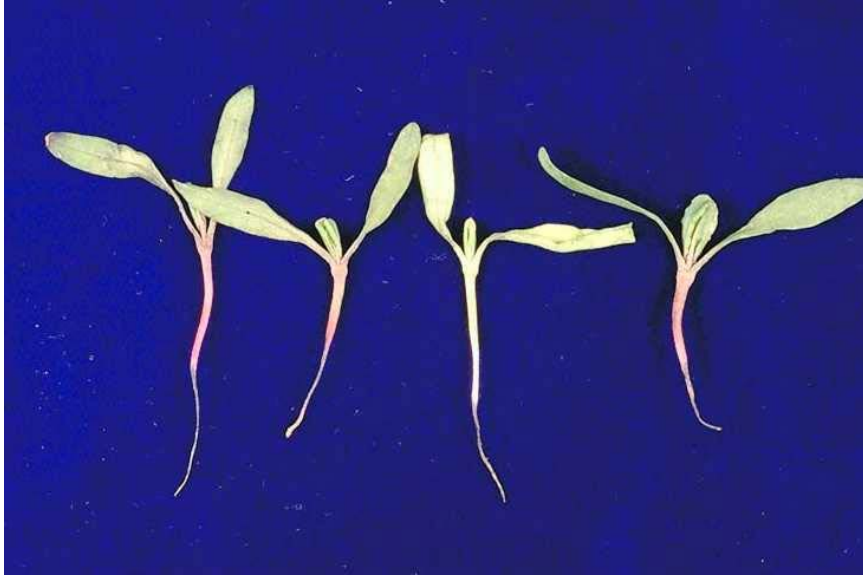
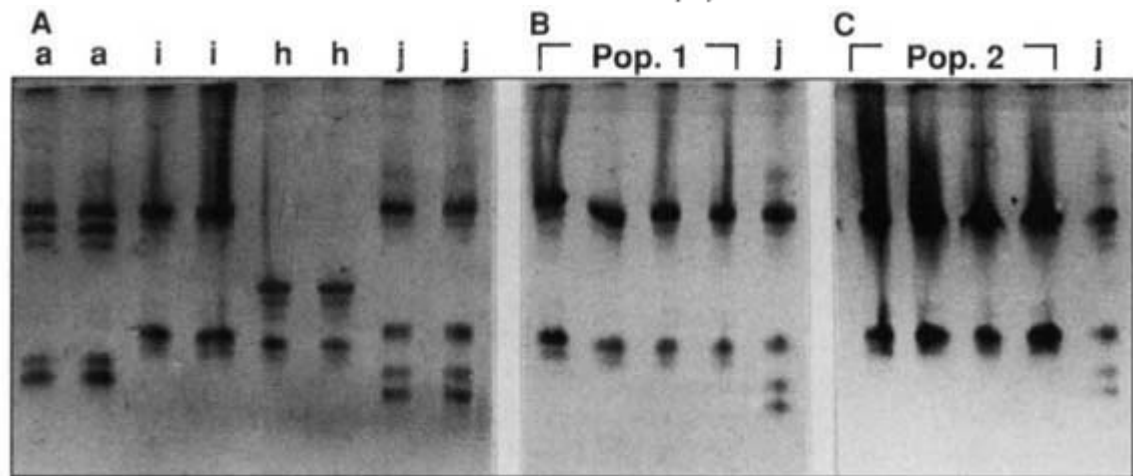


Figure 1 - Inhibition pattern for characterization of esterases from leaves of *Aspidosperma polyneuron* showing that Est-1, Est-3, Est-4, and Est-6 isozymes were inhibited in the presence of Malathion (B); Est-5, Est-7, Est-8, and Est-12 isozymes were detected as weakly stained bands by Folidol (C);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

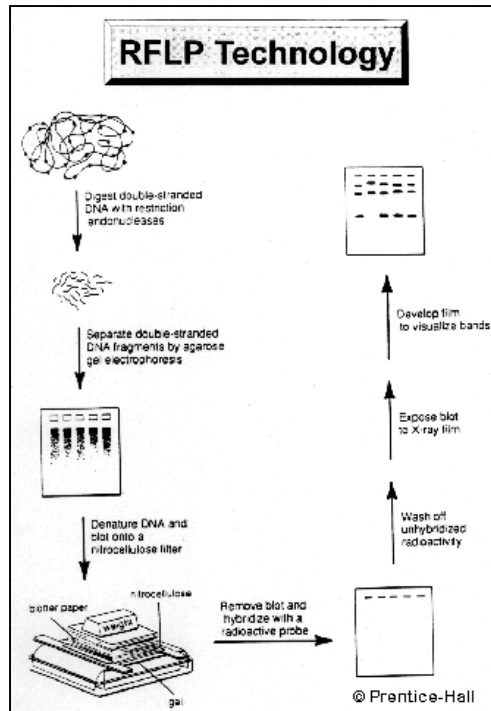
1. založené na hybridizaci DNA
2. založené na polymerázové řetězové reakci amplifikace - specifických sekvencí
- náhodných sekvencí
3. založené na sekvenování – jednonukleotidové polymorfismy

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

1. jednokopiové a vícekopiové sondy
RFLP (Restriction fragment length polymorphism)
CAPS
2. mnohokopiové sondy
mikrosatelity

Schéma RFLP markerů

(restriction fragment length polymorphism)



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

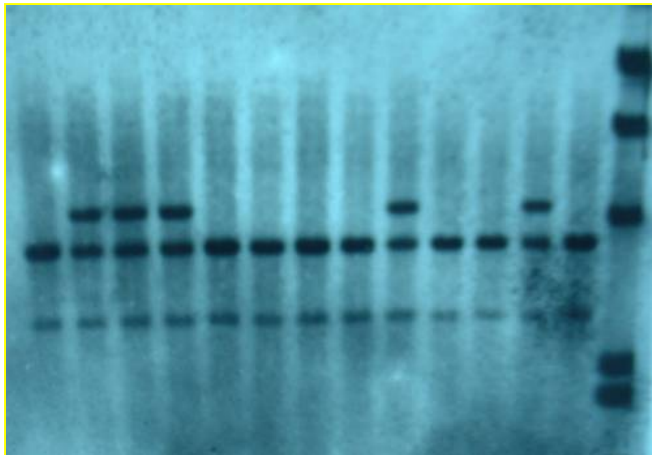
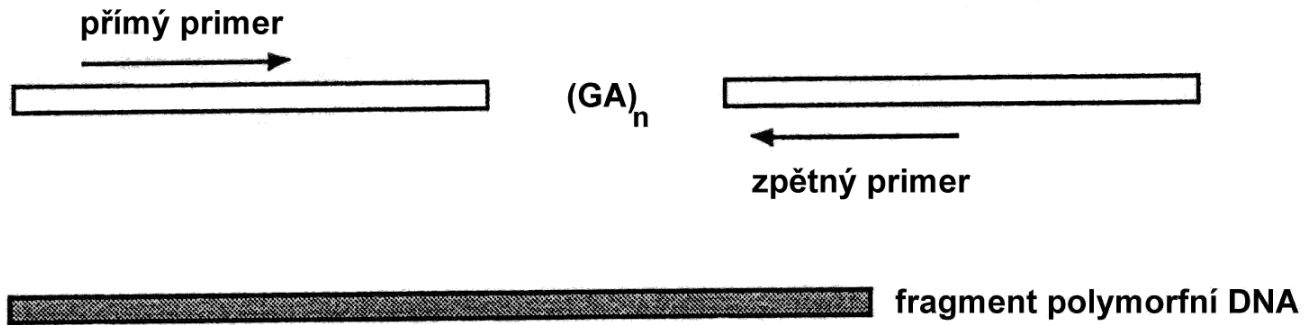
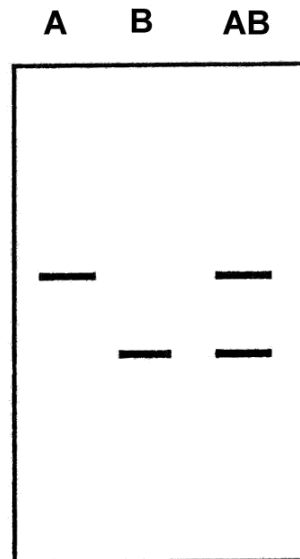


Schéma SSR markerů (simple sequence repeat)

A PCR



B Elektroforéza



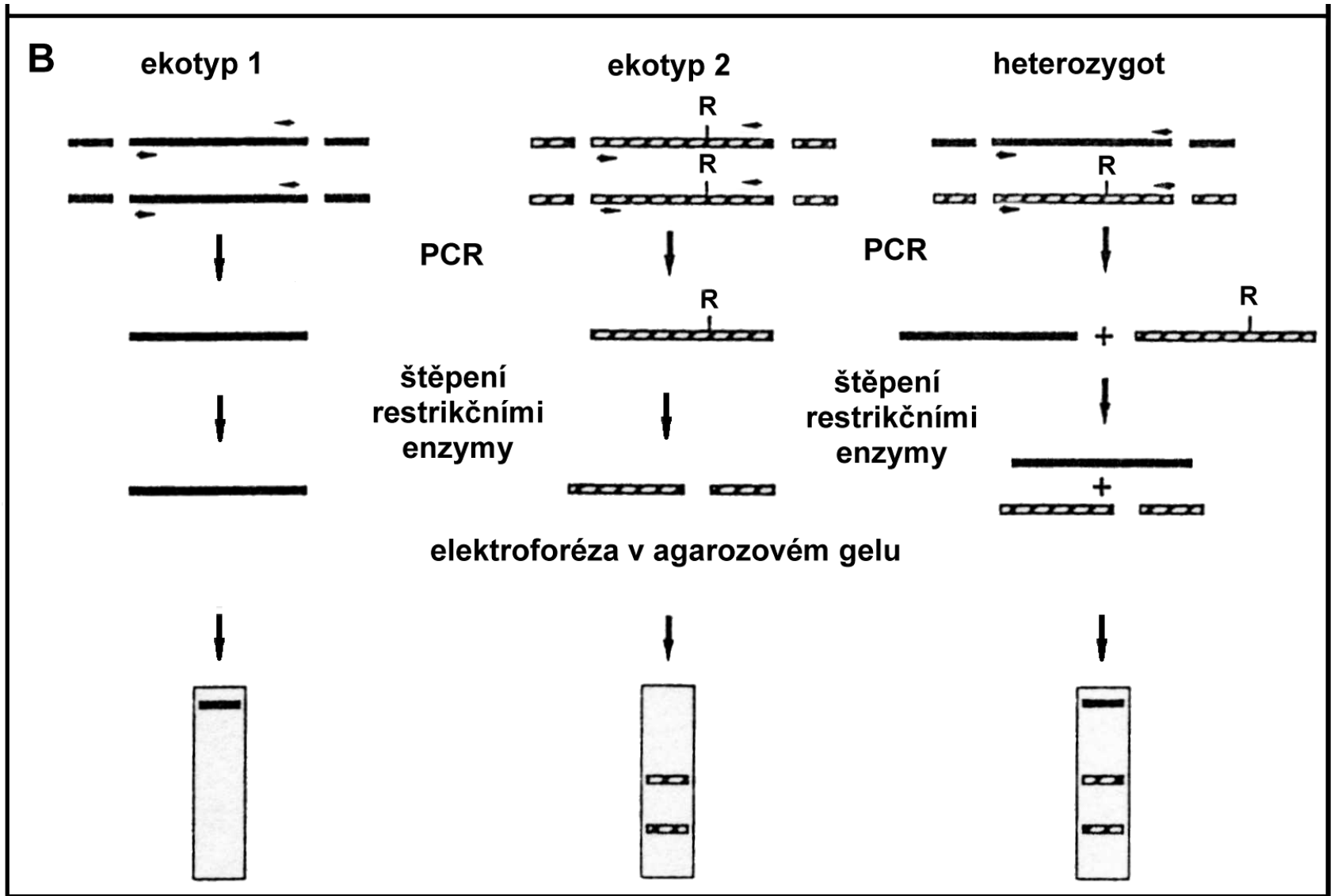
A 1. ekotyp

B 2. ekotyp

AB kříženec A x B

Schéma CAPS markerů

(cleaved amplified polymorphic sequences)



Využití genetických markerů

Základní výzkum i šlechtění

Studium rostlinných genomů

1. **Otisk DNA (fingerprinting)**
2. **Stanovení evolučních vztahů (příbuznost genotypů), taxonomie**
3. **Genetické mapování**
4. **Celogenomové studie – asociační studie (GWAS, GBS)**
5. **Korelace mezi fyzickými a genetickými mapami**

Genetické mapování

1. Konstrukce genetických map určitého rostlinného druhu

Vysycenost markery

2. Vytváření nástrojů pro MAS (marker-assisted selection)

3. Poziční klonování genů

Populace využívané k mapování

F_2 znak dominantní 3:1

znak kodominantní 1:2:1

B_1 1:1

Aneuploidní linie

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

Genetické mapování u modelových druhů mutace u *Arabidopsis thaliana*

Výhoda: malý genom

morfologická mutace *ly lycopodioformis*

Populace F₂

DNA markery – SSR (simple sequence repeats)
mikrosatelity
– CAPS (cleaved amplified
polymorphic sequences)

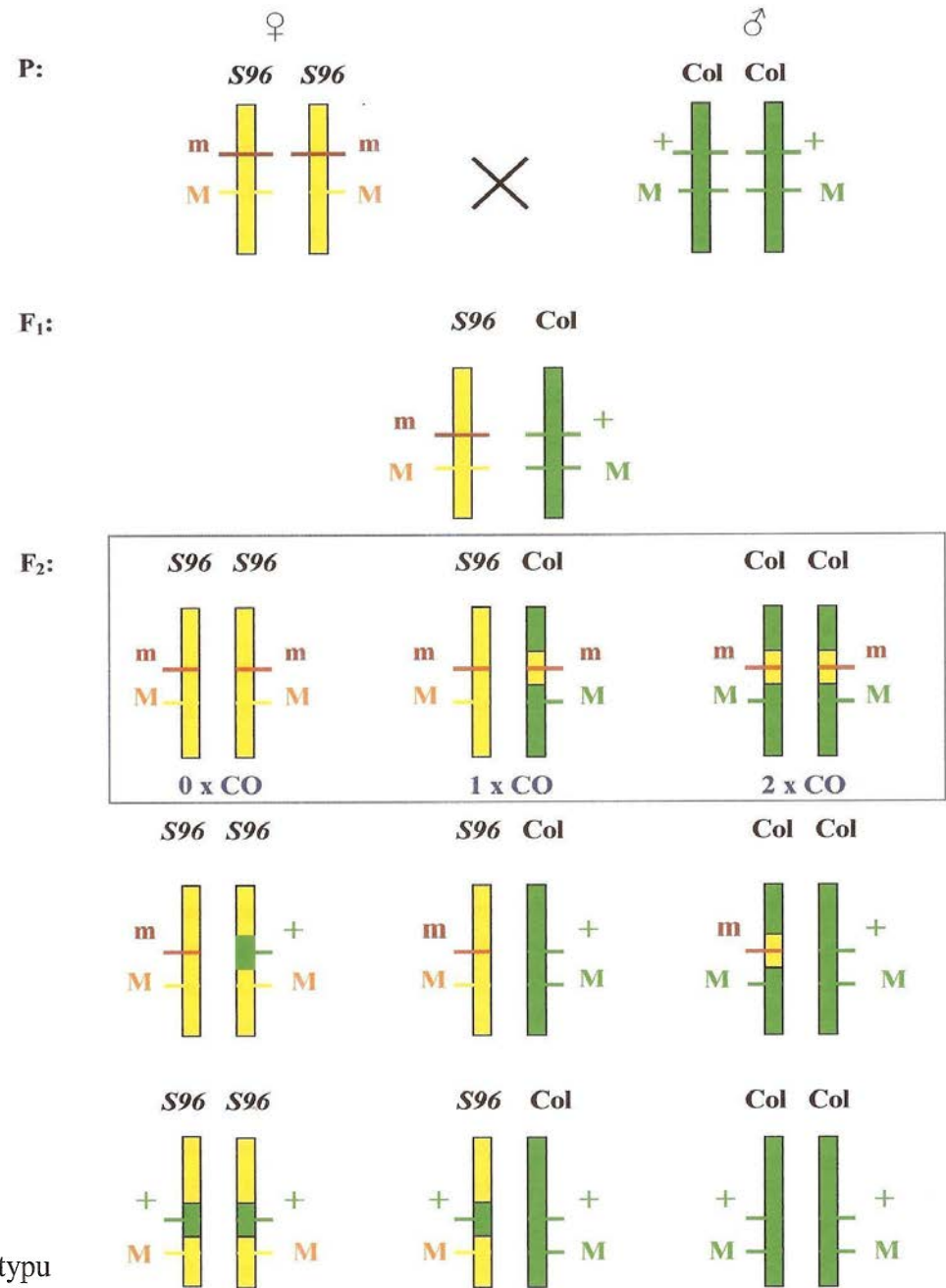
Columbia



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*

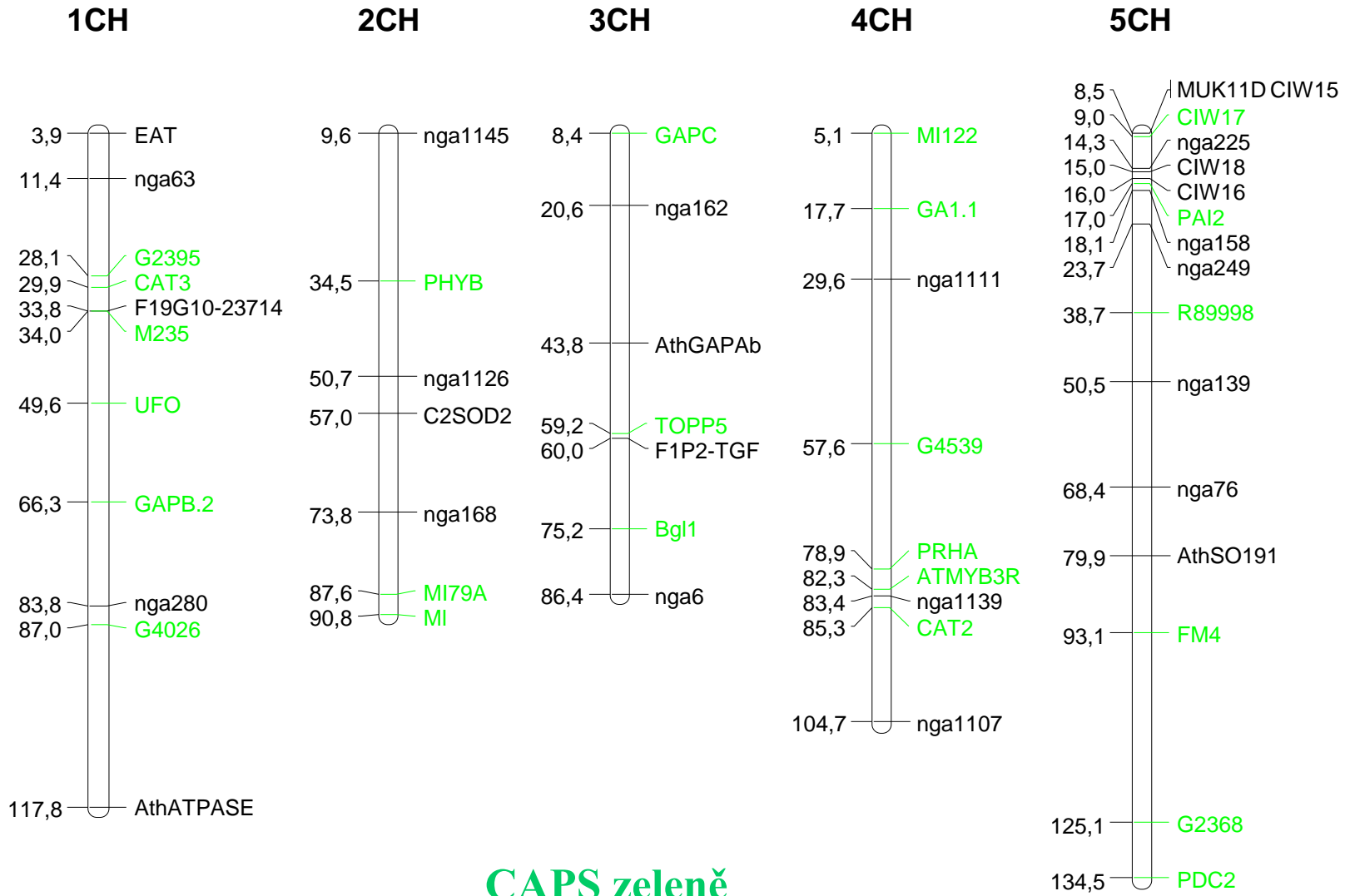
0 x CO.... žádný crossing-over

1 x CO.... jeden crossing-over

2 x CO ...dva crossing-over

Rámečkem jsou označeny rostliny F₂ generace mutantního fenotypu

Lokalizace základní sady DNA markerů v genetické mapě *Arabidopsis thaliana*



CAPS zeleně
SSR černě

Postup

1. Lokalizace lokusu v genomu

20 až 30 vzorků DNA z mutantů *ly* z F_2

Kontroly: rodiče, F_1

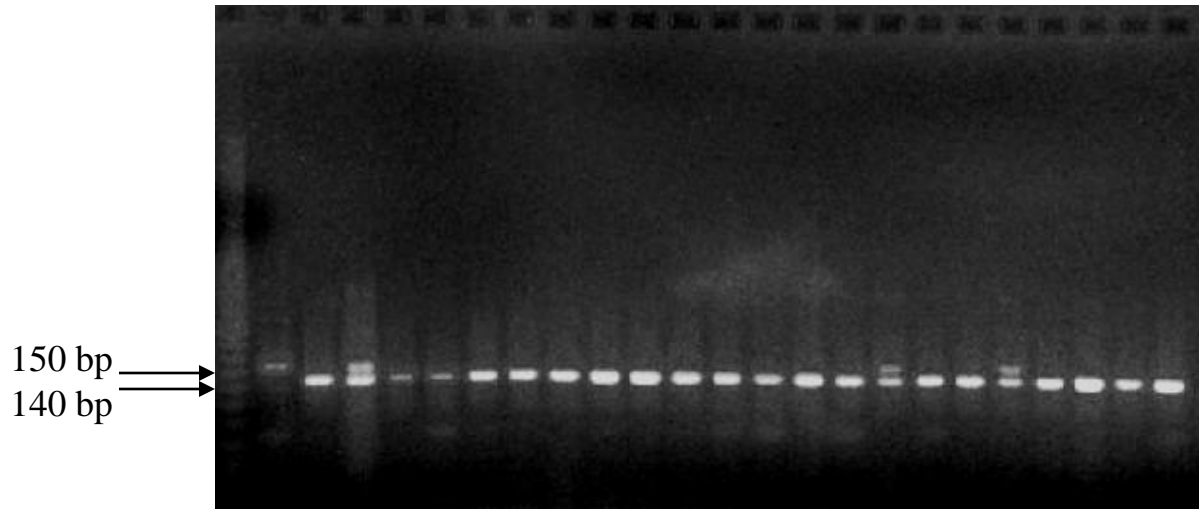
20 markerů

- PCR pro SSR markery
- ELFO

- PCR pro CAPS markery
- Štěpení enzymem
- ELFO

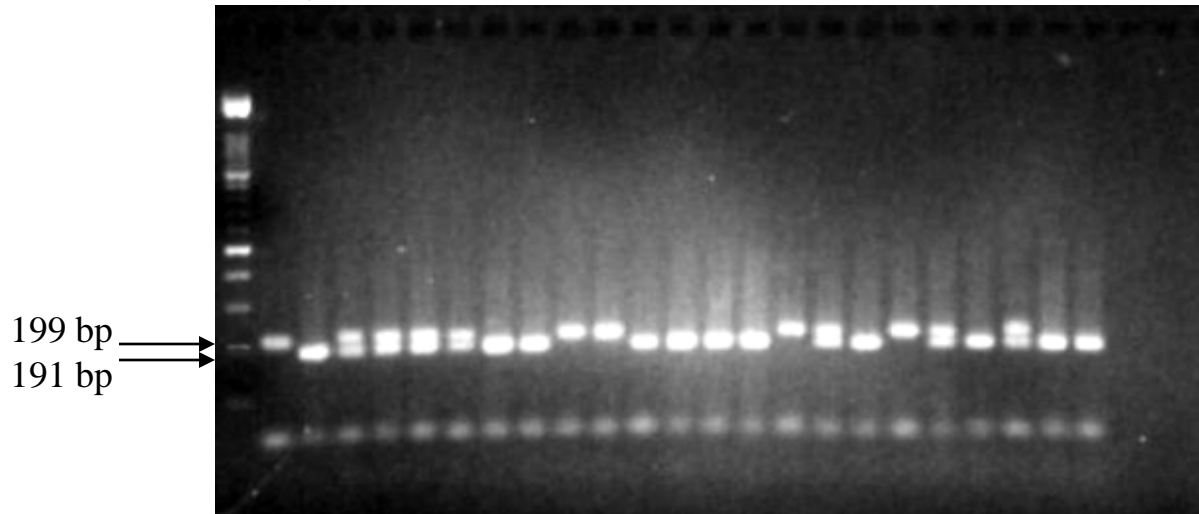
Segregující populace F₂ a molekulární analýza - příklady

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

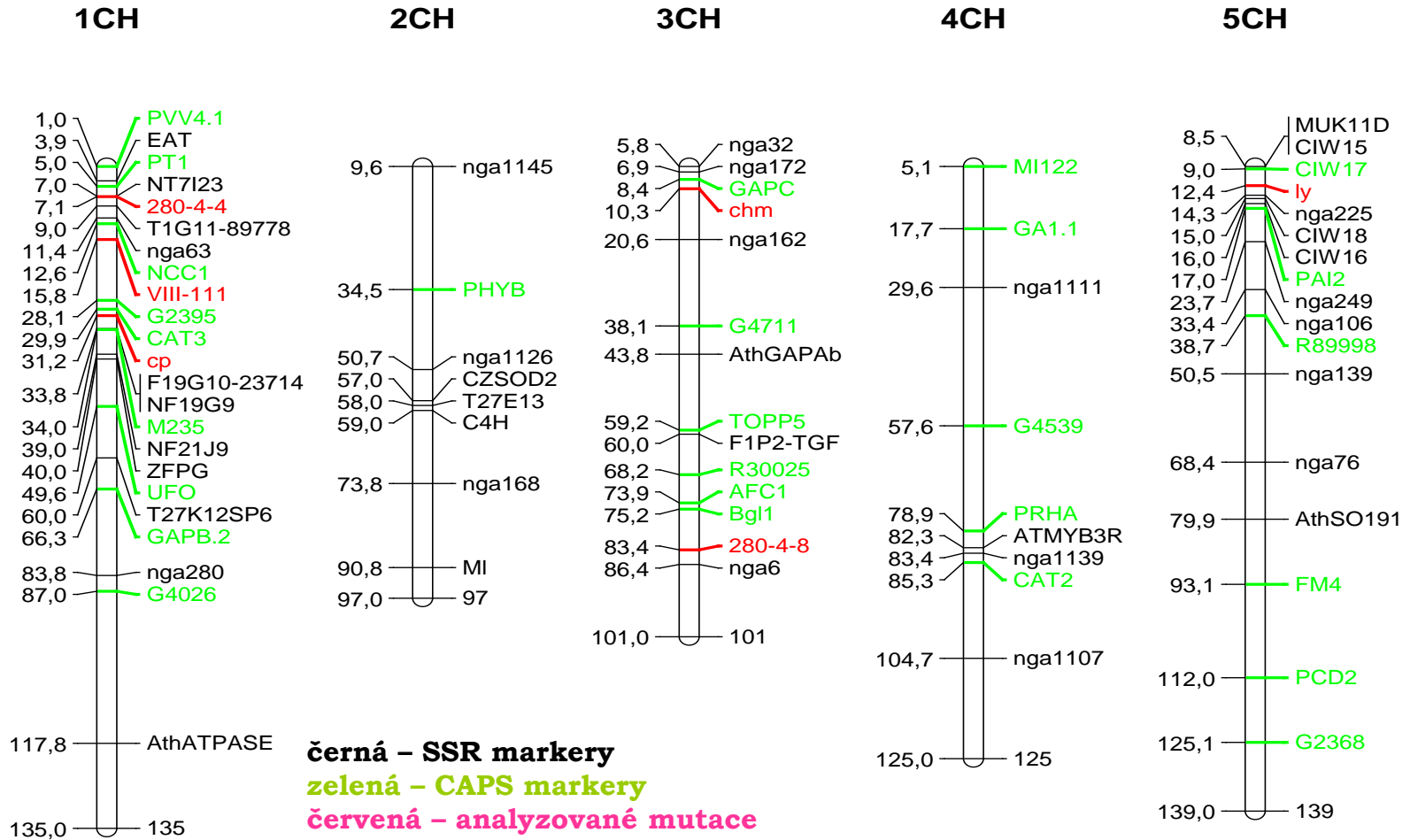
Odhad mapové vzdálenosti D dle Kosambiho mapovací funkce (Kosambi, 1944):

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

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**GAGAATATGGGAAGTACTAGAGTGATAGAGCCATTGATAATGGGGAGAGTGGTAGGAGATGTT
CTTGATTTCTTCACTCCAACAATAAGATGAATGTTAGTTATAACAAGAAGCAAGTCTCCAATGGCCATGAGCTCTTTC
CTTCTTCTGTTTCTCCAAGCCTAGGGTTGAGATCCATGGTGGTGATCTCAGATCCTTCTTCACTTTGgtaatacatatatt
aaattatttataataatggttggttttatttatattgtgcaaaaaaaaaaccatataaaacgtctcacttcctttctcttacaagtttccatttctaactcaa
taatcttataaattgtagcttttagttttatcattccttttccagtcttttttttaatggtaaaactcaaccgaaatgcaaaacagGTGATGATAGAC
CCAGATGTTCCAGGTCCTAGTGACCTCTTCTAAAAGAACACCTGCACTGgtacgtttaatttatttattctttcttttcattttggggc
catattccatatacattgcatttaaactcatttcgttataaccctaataaagtttttttgggtgtaagttatatacatttgagttggtcaaagatctccatcgc
catgagttctcagaacttttctgtaaagtaataatattagttggtgaatggttcaatagGATCGTTACAAACATTCCCGGCACAACAGAT
GCTACGTTTGtaaggcctctcatgaatcttgaatttaaacttatacatatatcatgttatatagaataaaaaatattgcattgtaatatagGC
AAAGAGGTGGTGAGCTATGAATTGCCAAGGCCAAGCATAGGGATACATAGGTTTGTGTTTGTCTGTTTCAGGCAGAA
GCAAAGACGTGTTATCTTCTAATATCCCTTCGAGAGATCACTTCAACACTCGTT
AAATTTGCGGTCGAGTATGATCTTGGTCTCCCTGTGCGGCCGTCTTCTTAAACGCACAAAGAGAAACCGCTGCACGC
AAACG**TAG**tttcatgattgtcataaactgcaaaaatgaaagaagaaaatttgcagtaatctcatgtttatttgtgttctgaatttcgtactctgaa
taaaaactgccaaagatgagttgaatccgaaatatcaattgagtttacagaagtattgataacgatctgtcgattatcagaataaaaactagattaattg
catatcatgttttagcattgtaatactacaaaaatagtaaactcttgattaattaataaaaatctaagttgctgtagtatataaatcattaaatctcacaat
ggcttgataggtcacatcacatgtagtgaaccttatttatgataaacgtggagatacggaaaaggatagttaaacgatgaaaacttttttagttctggt
caaagtgacaagacctgatgacctctaaaatgatcctctcc



Genetické mapování u kulturních druhů s velkým genomem

Identifikace DNA markerů v těsné vazbě s genem

Speciální populace pro mapování

RIL Rekombinantní linie

NIL Izogenní linie

BSA (Bulk Segregant Analysis)

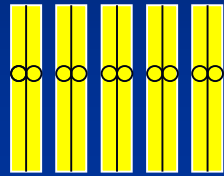
RIL (recombinant isogenic lines)

Rekombinantní inbrední linie

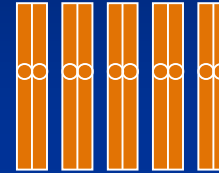
⊗ časová náročnost

⊕ vysoká homozygotnost

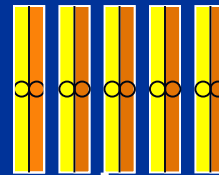
Křížení polymorfních
(fenotypově kontrast-
ních) linií



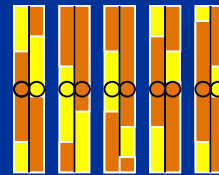
×



F₁



F₂ 50,0%



F₃ 75,0%

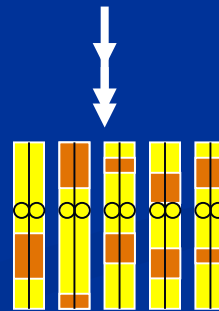
F₄ 87,5%

F₅ 93,8%

F₆ 96,9%

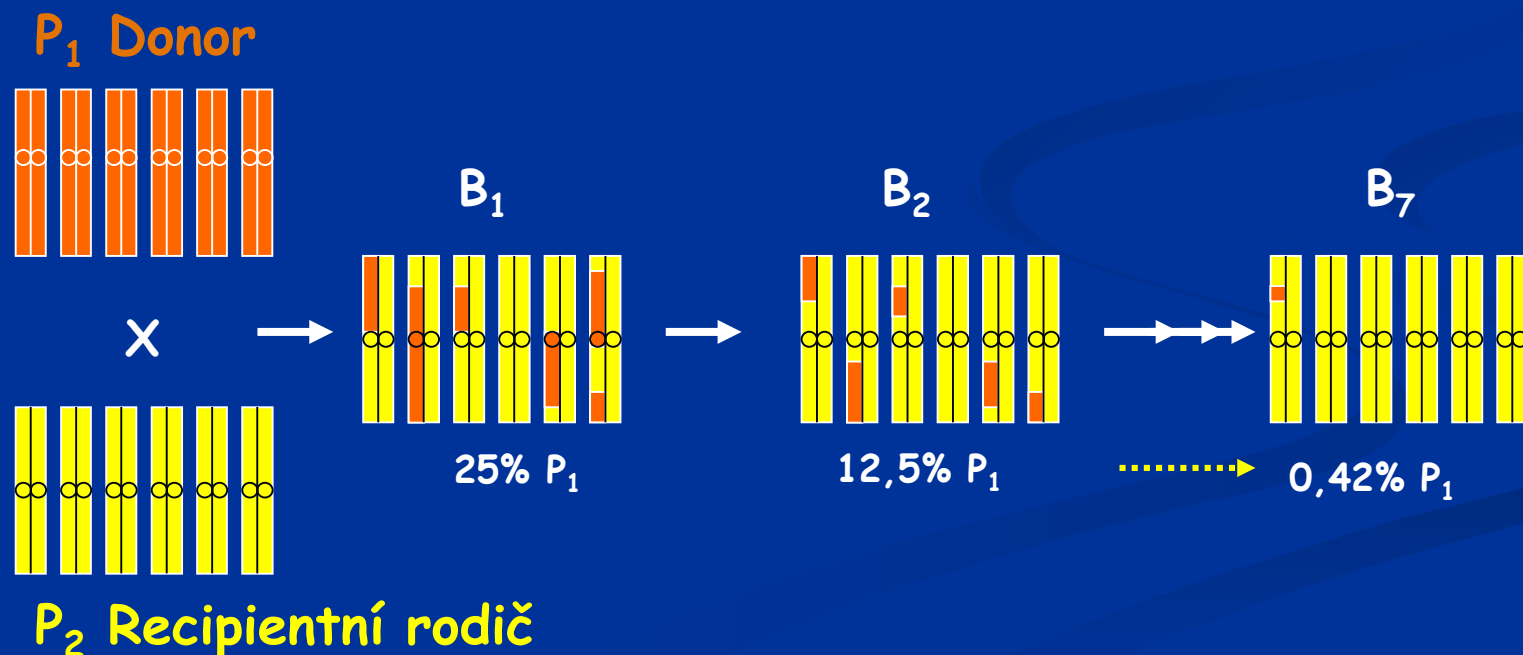
F₇ 98,7%

F₈ 99,5%



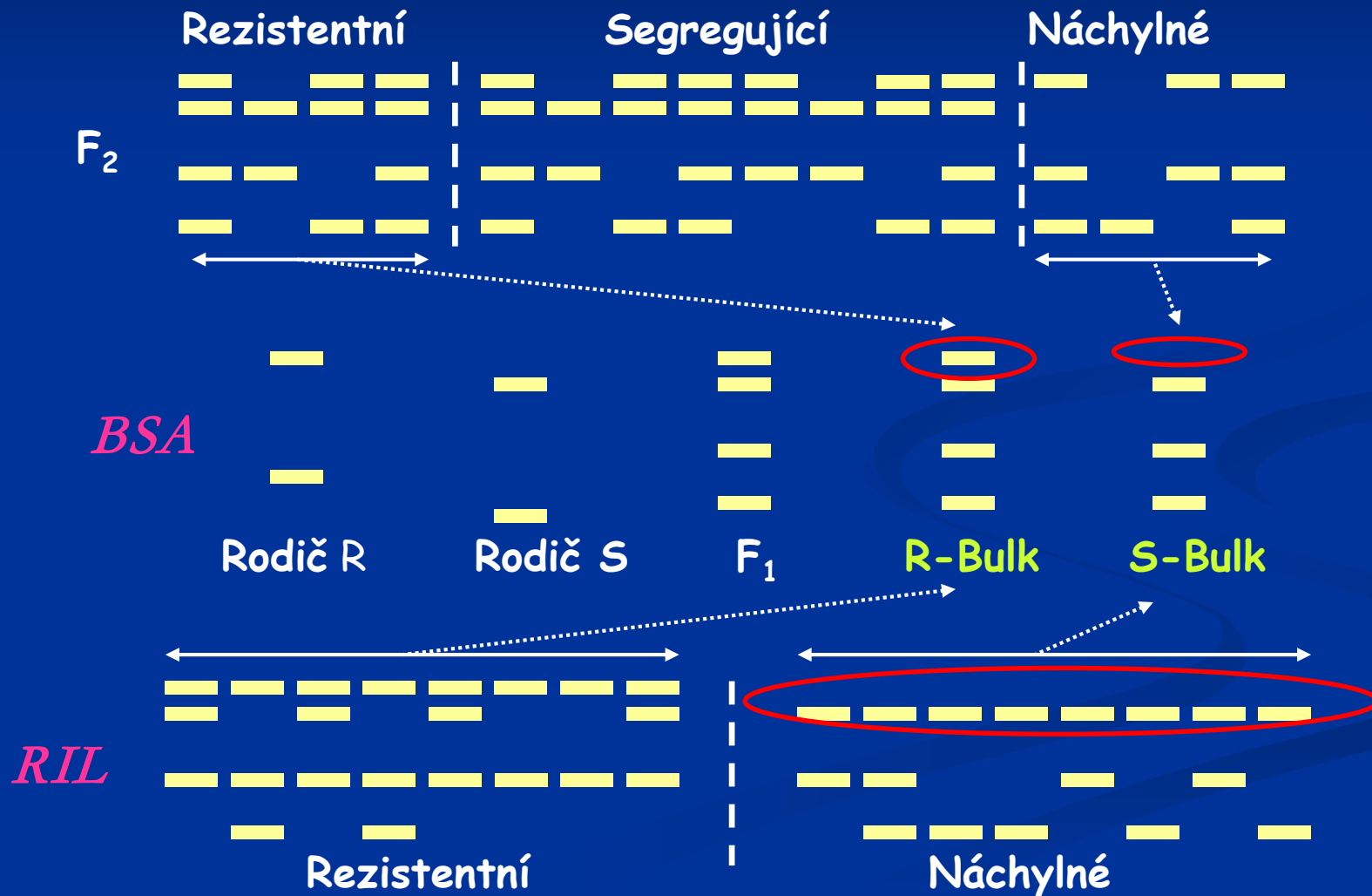
NIL (near isogenic lines) Izogenní linie

- ⊗ 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



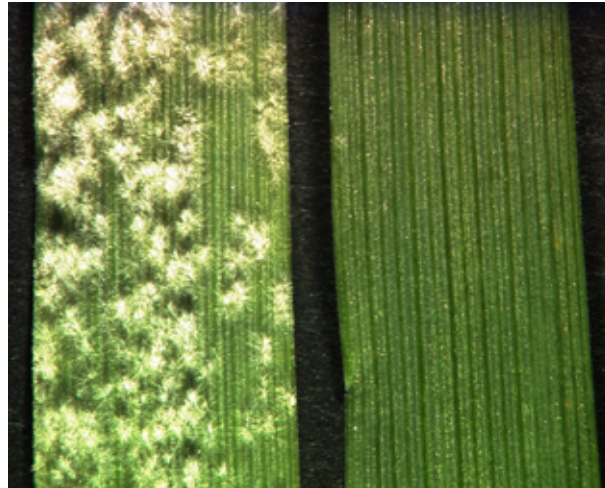
BSA (bulk segregant analysis)

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



Genetické mapování genu odolnosti u ječmene

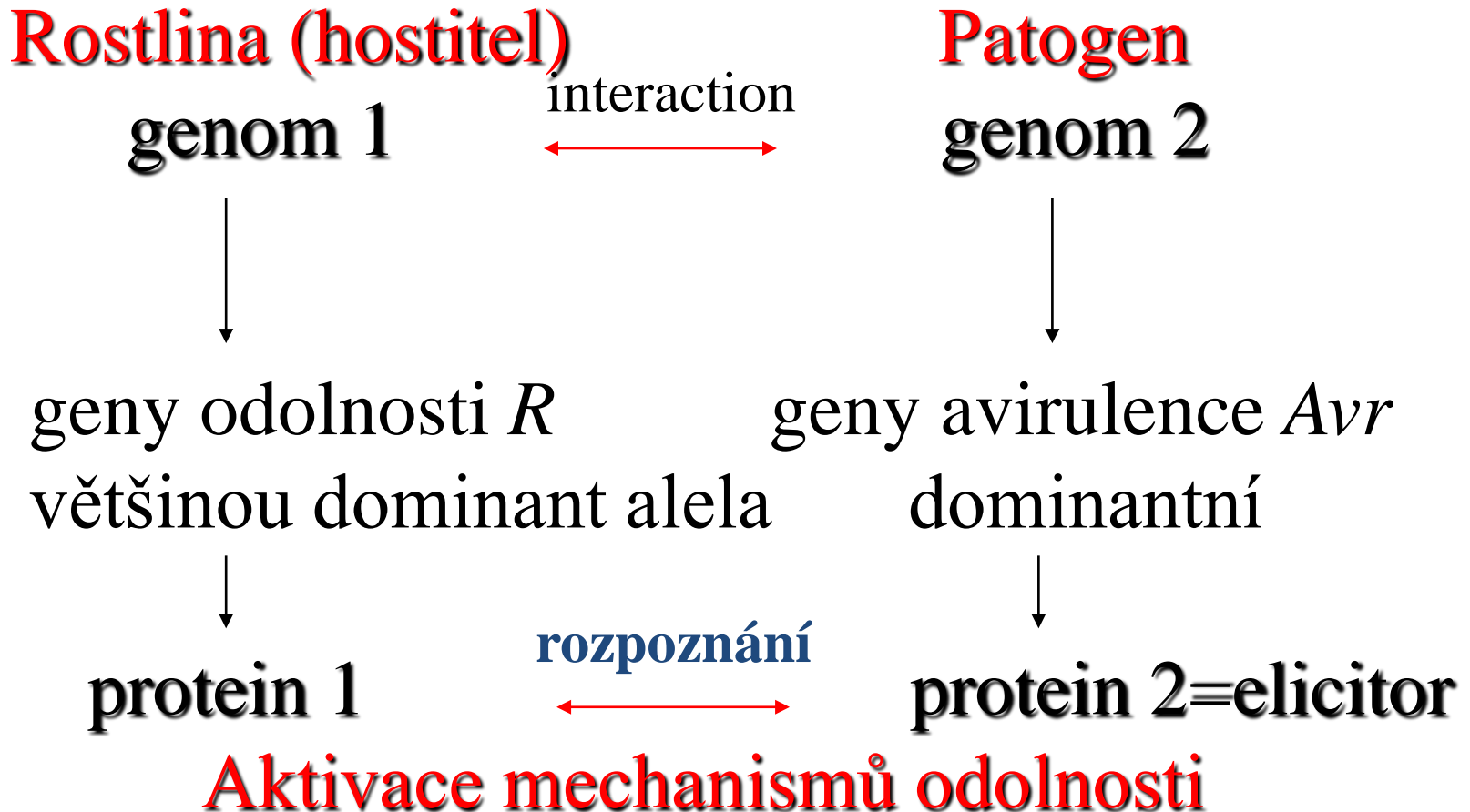
- *Hordeum vulgare*
- Padlí ječmene



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

- Šlechtění odolných odrůd
- Zdrojem genů odolnosti jsou plané ječmeny – *H. vulgare* ssp. *spontaneum*, *H. bulbosum*

Genetické aspekty choroby



koncept gen – proti – genu

geny *R*

rasově specifické

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

Analýza rezistence ječmene

Využití 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)

Postup řešení

1. Vytvoření **vhodných populací** pro analýzy odrůda 'Tiffany' x zdroj odolnosti → F₂
2. Fytopatologické testy – P, F₁, F₂ **fenotypování**
3. **Genetická analýza**
Určení počtu genů determinujících odolnost
Statistické ověření. Určení typu dědičnosti.
4. Získání DNA markerů pro ječmen *H. vulgare*
Určení polymorfismu u rodičů
5. **Molekulární analýza**
Určení DNA markerů (SSR, CAPS) ve vazbě s jednotlivými geny odolnosti:
Analýza balků – náchylného a odolného
Lokalizace genů na chromozomech ječmene

Druh – ječmen *Hordeum vulgare*

Hodnocený znak - odolnost k padlí travnímu

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

Populace F_2

Křížení 2

náchylná (S) x odolná (R)

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

PI391004

(zdroj odolnosti – planý ječmen)



$F_1 \rightarrow F_2$ (100 rostlin)

1 Fenotypování – identifikace počtu genů

- Rostliny rodičovské, F_1 i jednotlivé rostliny F_2 jsou otestovány virulentním izolátem *Bgh*

- Stupnice hodnocení fenotypu - odolnosti:

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 2 RT0

F_1 RT1 typ dědičnosti

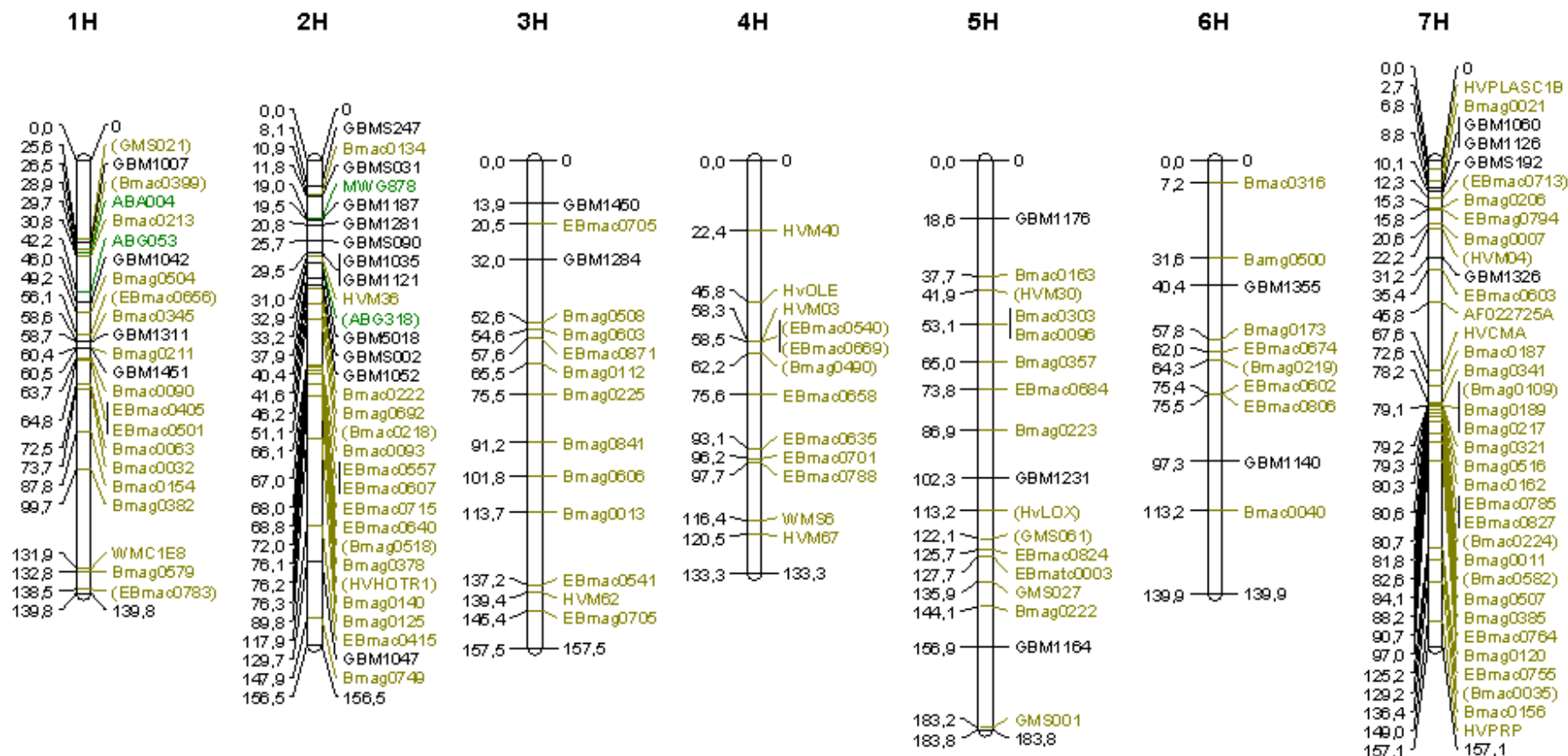
- F_2 210 rostlin (fytopatologická analýza)

2 Molekulární analýza – lokalizace genů v genomu

- F_2 balky (DNA, rostliny RT 0 a RT4) každý asi 15 rostlin

- F_2 asi 100 rostlin (DNA)

Mapa SSR markerů ječmene využívaných v laboratoři



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

Práce s balky

Krajní třídy RT0 a RT4

DNA markery

SSR (simple sequence repeats)

CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence)

chromozom 1H RGH1aE2I2 (*AluI*), Bmac0213, Bmac0032

chromozom 2H Bmac0134, GBM1281

chromozom 6H Bmac0316

chromozom 7H Bmac0156

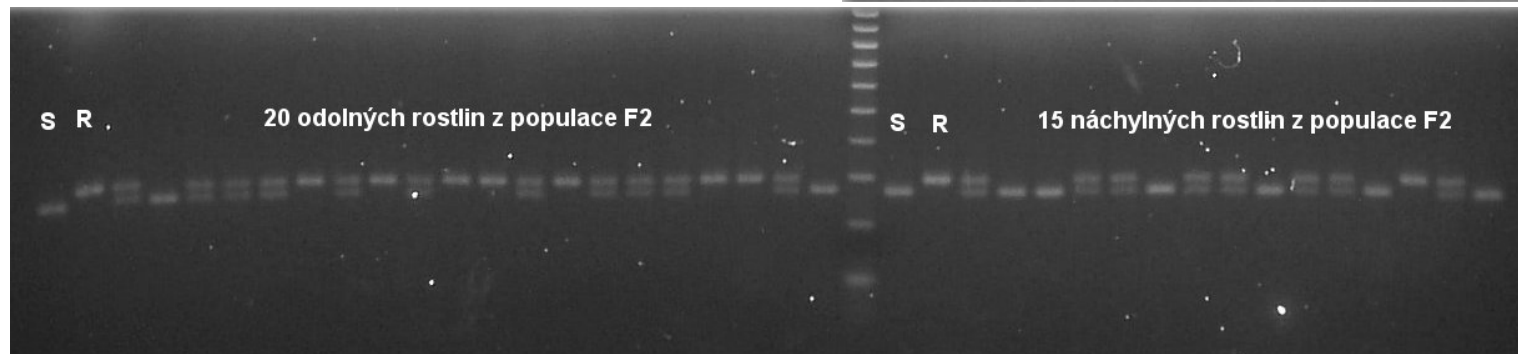
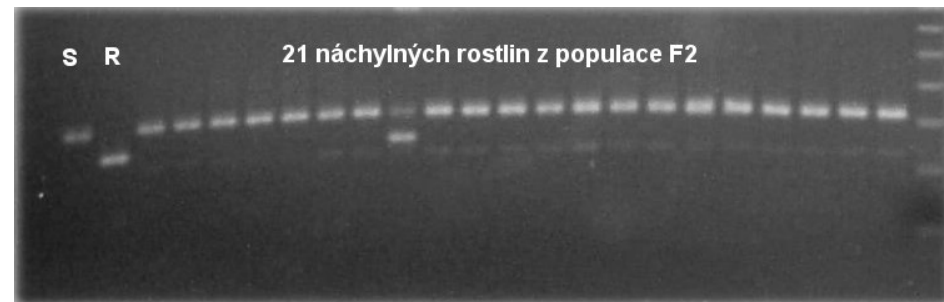
Analýza bulků při dominanci odolnosti

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 na chromozomu 1H

SSR

CAPS

štěpení enzymem *AluI* 3 h/37°C