

Praktikum z genetiky rostlin

JS 2014

Genetická analýza a genetické markery

1. Genetická analýza a identifikace počtu genů odolnosti k padlí u ječmene.
2. 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. Expresní analýza genu *PPO* pomocí RT-PCR

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

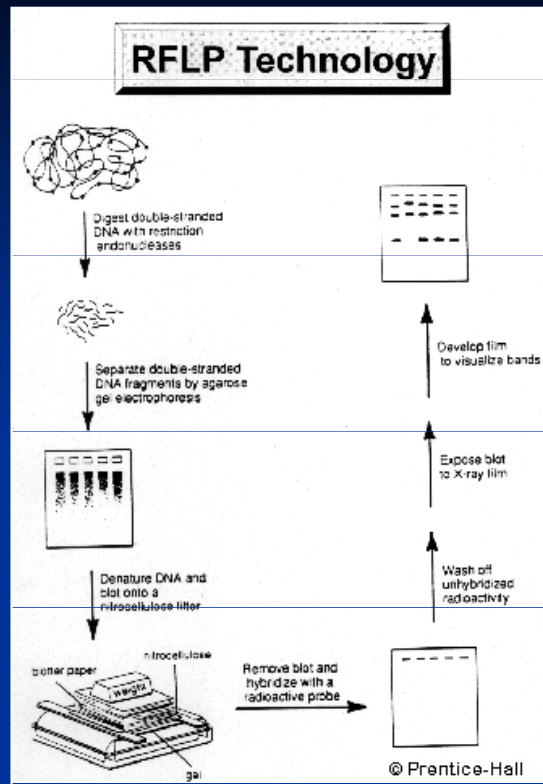
Typy DNA markerů:

- 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

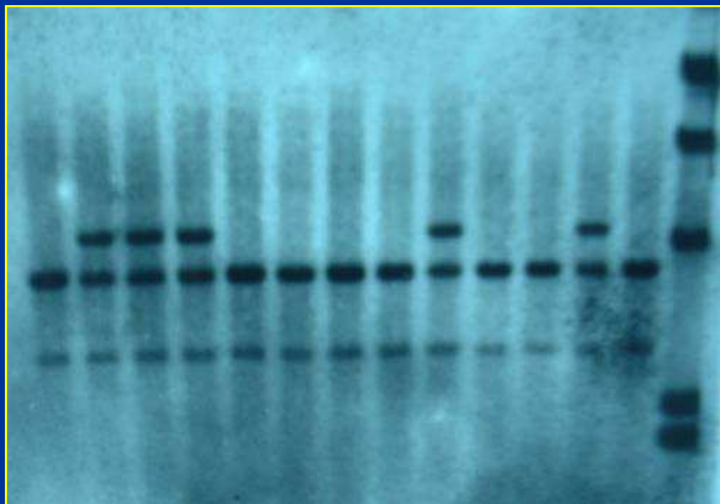
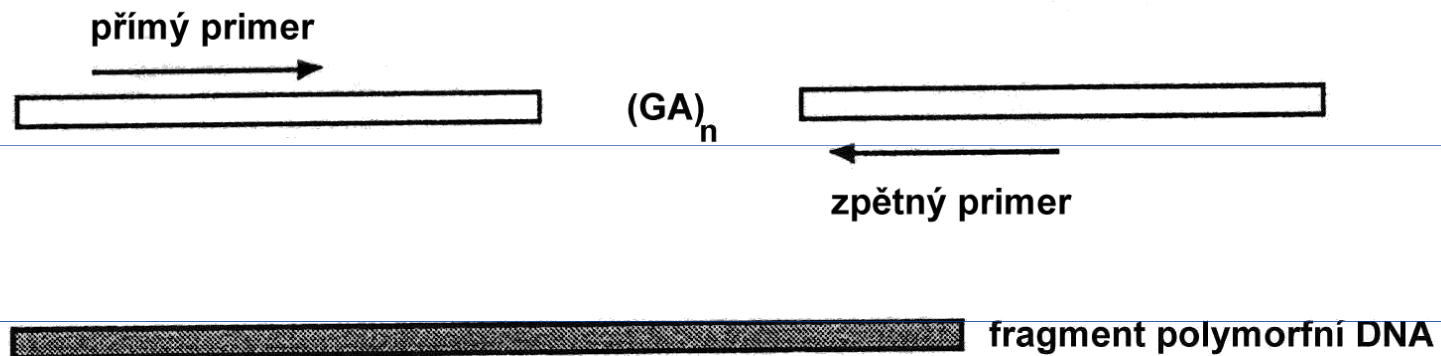
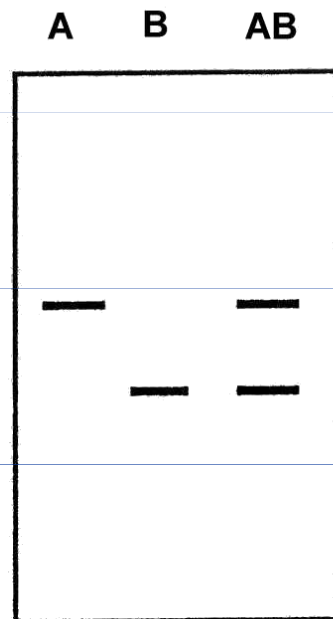


Schéma SSR markerů

A PCR



B Elektroforéza

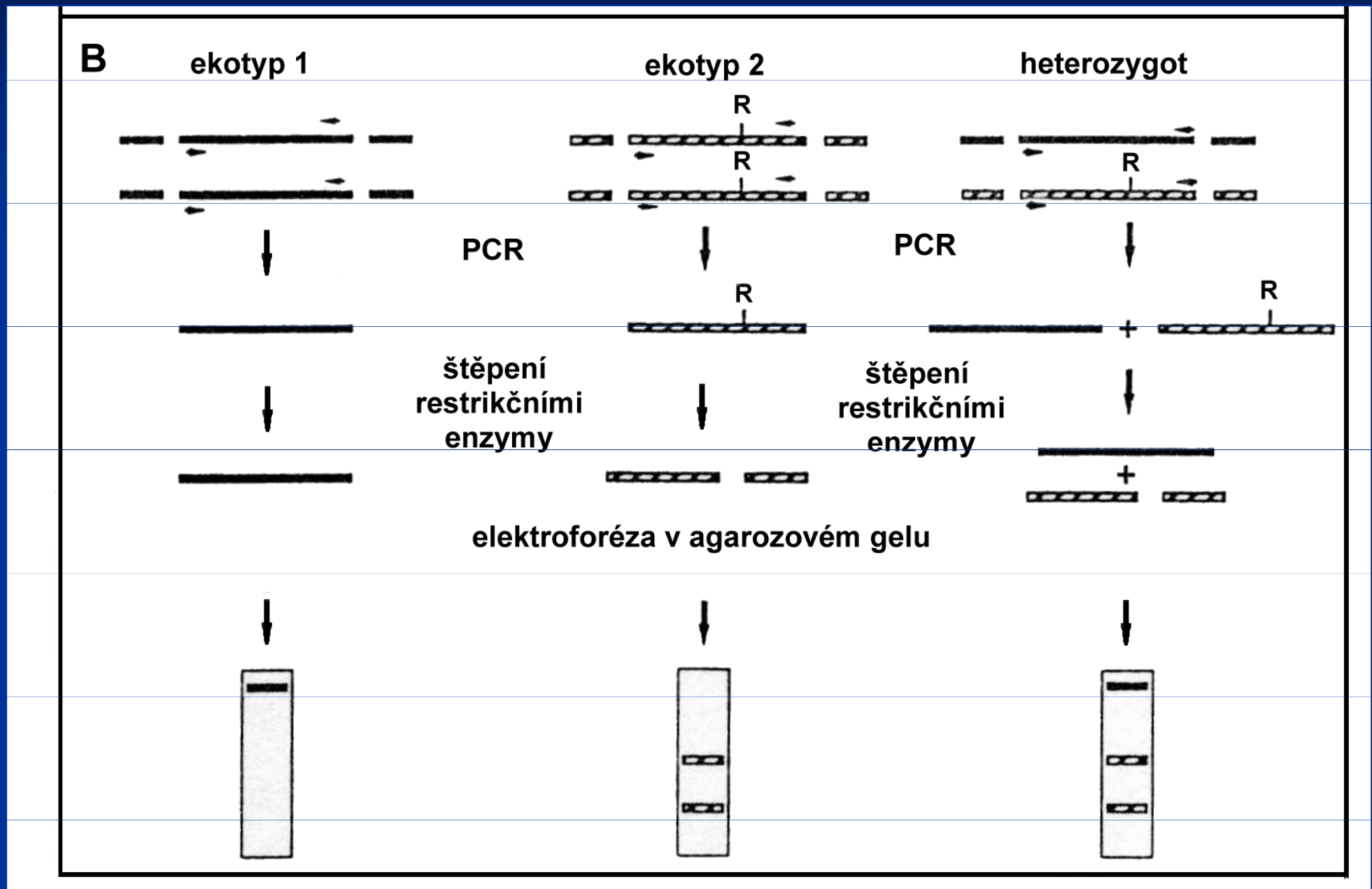


A 1. ekotyp

B 2. ekotyp

AB kříženec A x B

Schéma CAPS markerů

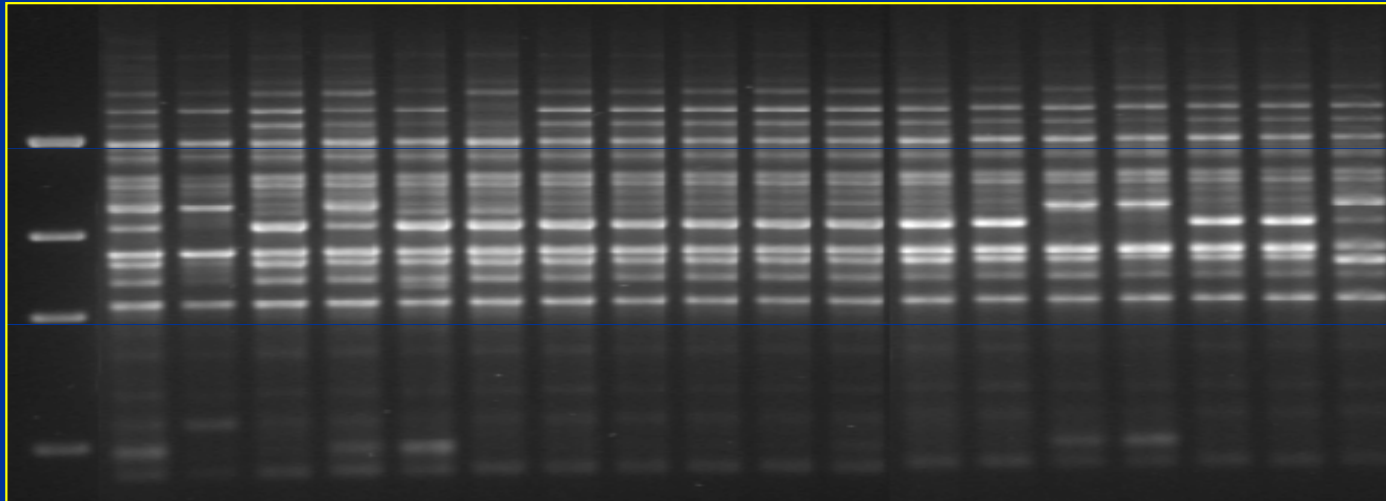


RAPD

- random amplified polymorphic DNA

DAF

- DNA amplification fingerprinting



SCAR

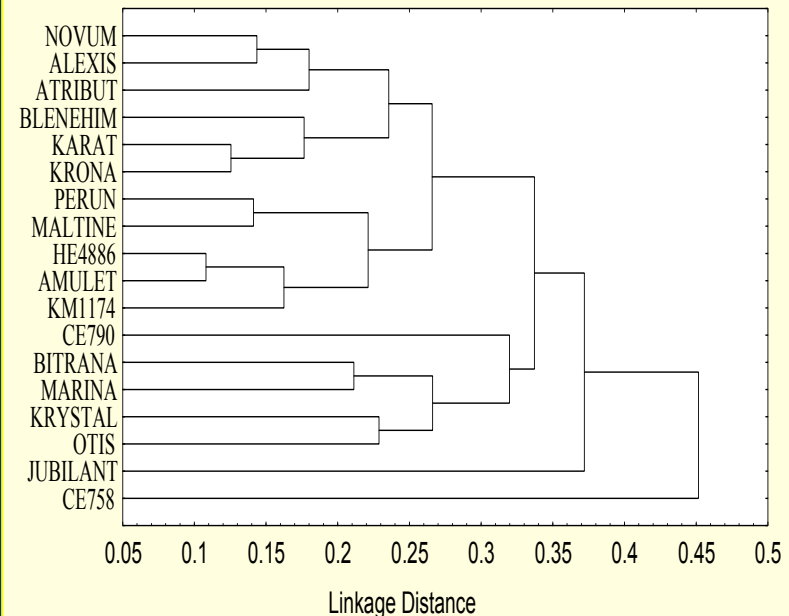
- sequence characterised amplified regions

RAPD příklady : ječmen

Analyzována kolekce
jarních ječmenů
využívaných ve
šlechtění na
sladovnickou kvalitu

Malé rozdíly v
genetickém založení
kolekce

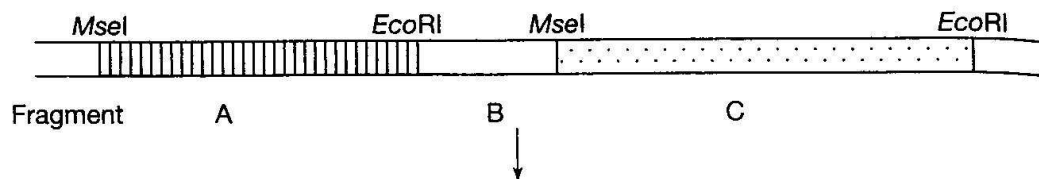
A dendrogram generated from RAPD data for *H. vulgare* cultivars
Unweighted pair-group average
Jaccard's coefficients



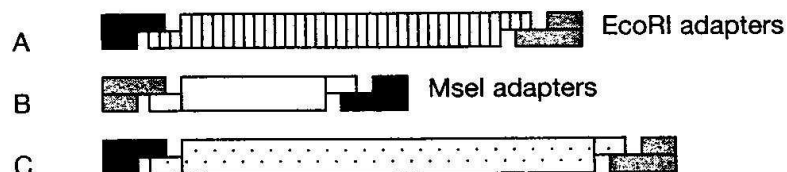
Primer	Sequence	Primer	Sequence	Contents of CG pairs
ABN-02	5'-ACC AGG GGC A-3'	ABN-04	5'-GAC CGA CCC A-3'	70%
ABN-07	5'-CAG CCC AGA G-3'	ABN-08	5'-ACC TCA GCT C-3'	
ABN-09	5'-TGC CGG CTG G-3'	ABN-13	5'-AGC GTC ACT C-3'	
ABN-14	5'-TCG TGC GGG T-3'	ABN-20	5'-GGT GCT CCG T-3'	
AB2-02	5'-GGT GCG GGA A-3'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

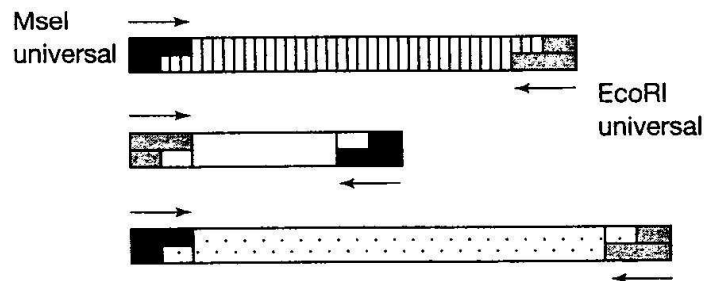
1. Štěpení genomové DNA dvěma restrikázami



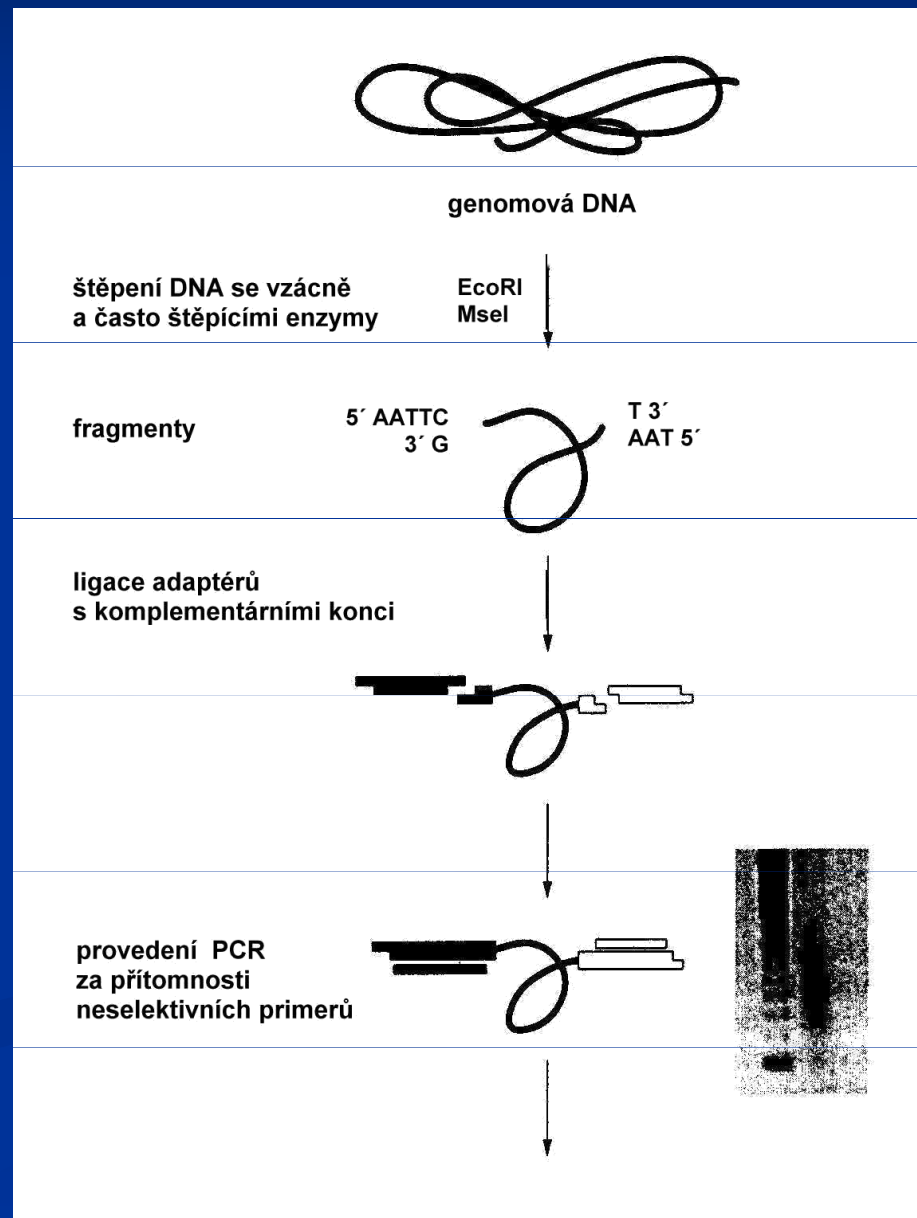
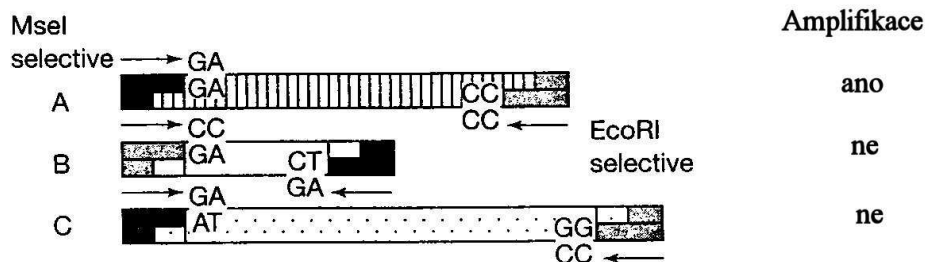
2. Ligace s adaptéry pro MseI a EcoRI



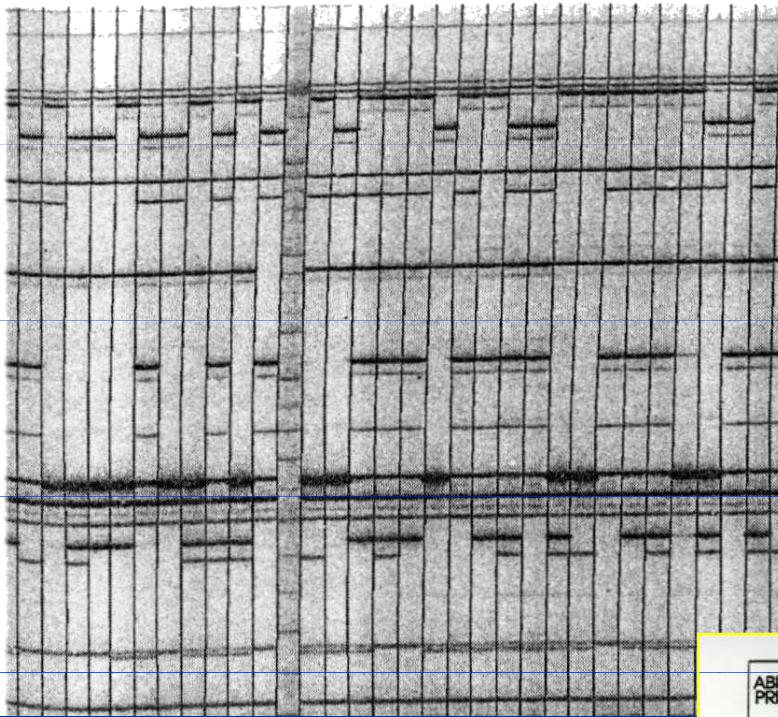
3. Amplifikace všech fragmentů pomocí univerzálních primerů pro EcoRI a MseI



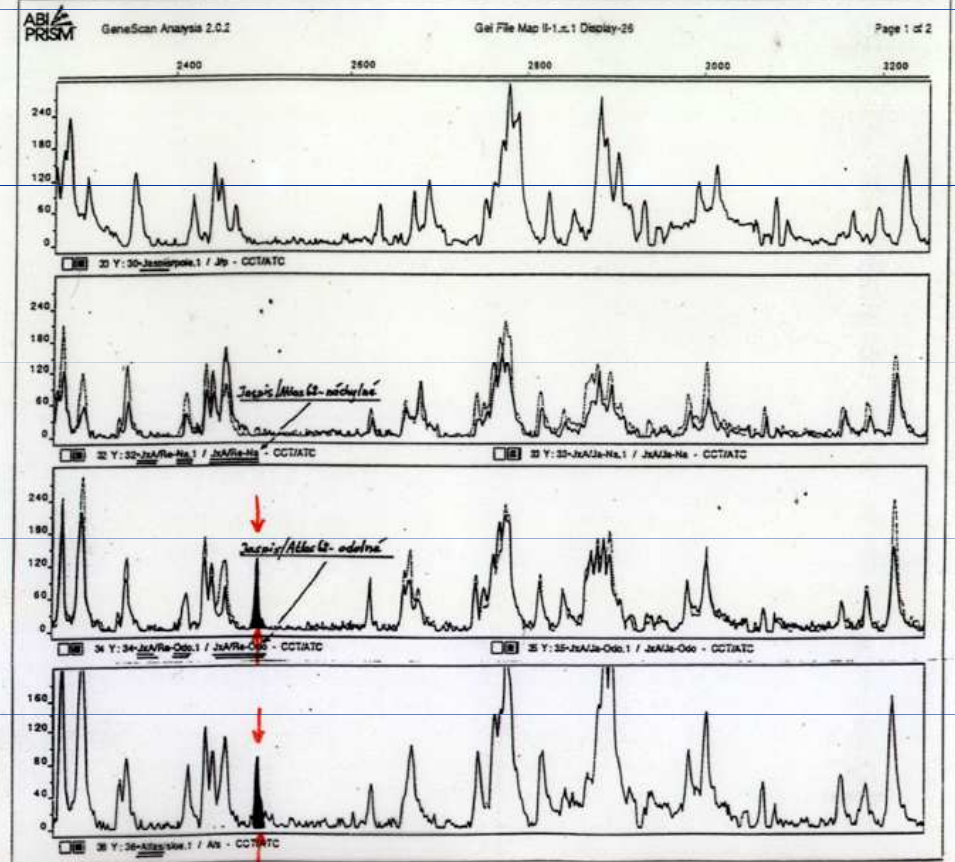
4. Amplifikace pomocí selektivních primerů prodloužených o 1 až 3 náhodně vybrané báze



polyakrylamidový gel
a jeho analýza



Vhodný pro hodnocení



Využití genetických markerů

Základní výzkum i šlechtění

Studium rostlinných genomů

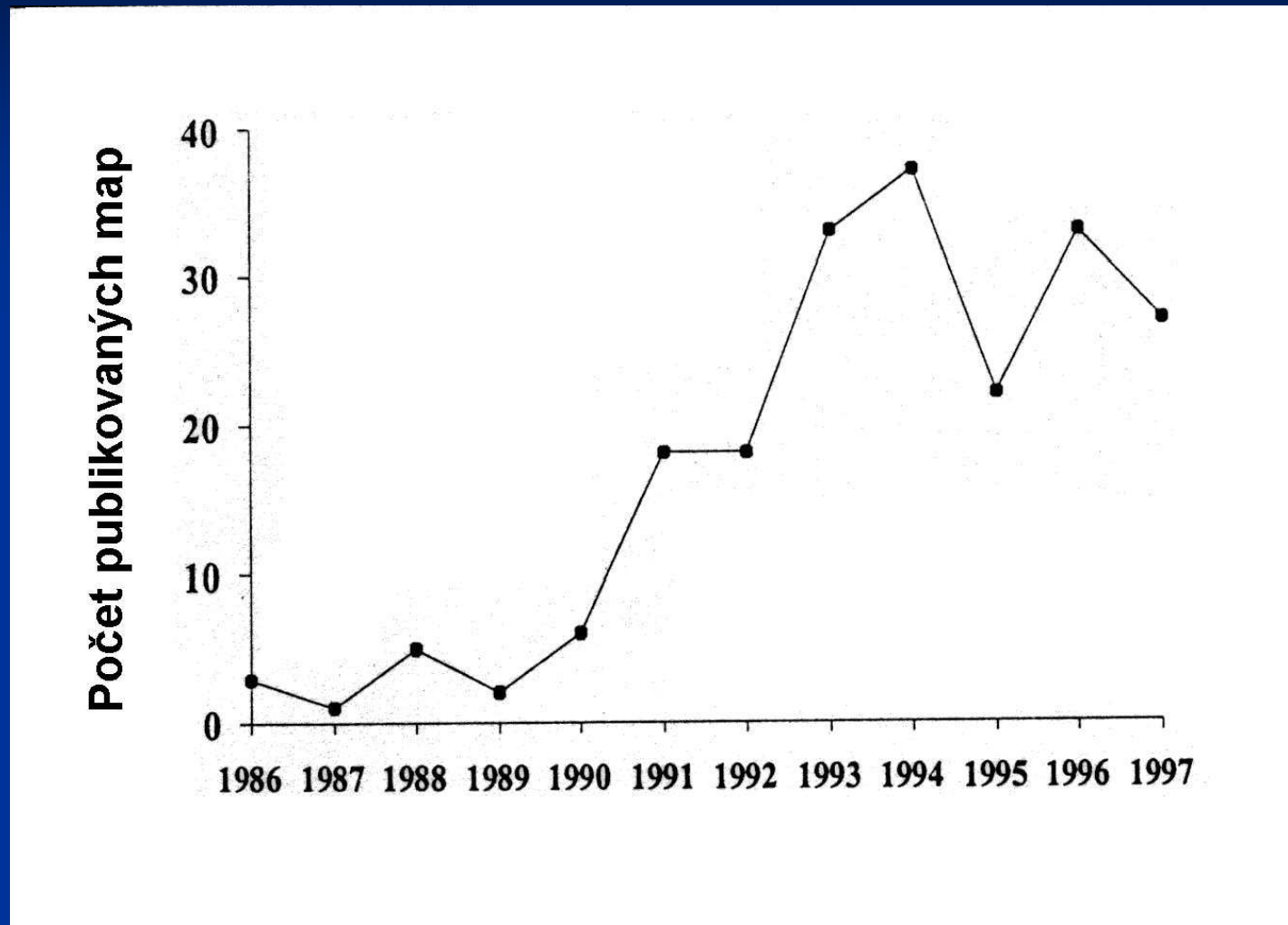
1. Otisk DNA (fingerprinting)
2. Stanovení evolučních vztahů (příbuznost genotypů), taxonomie
3. Genetické mapování

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

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

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
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*

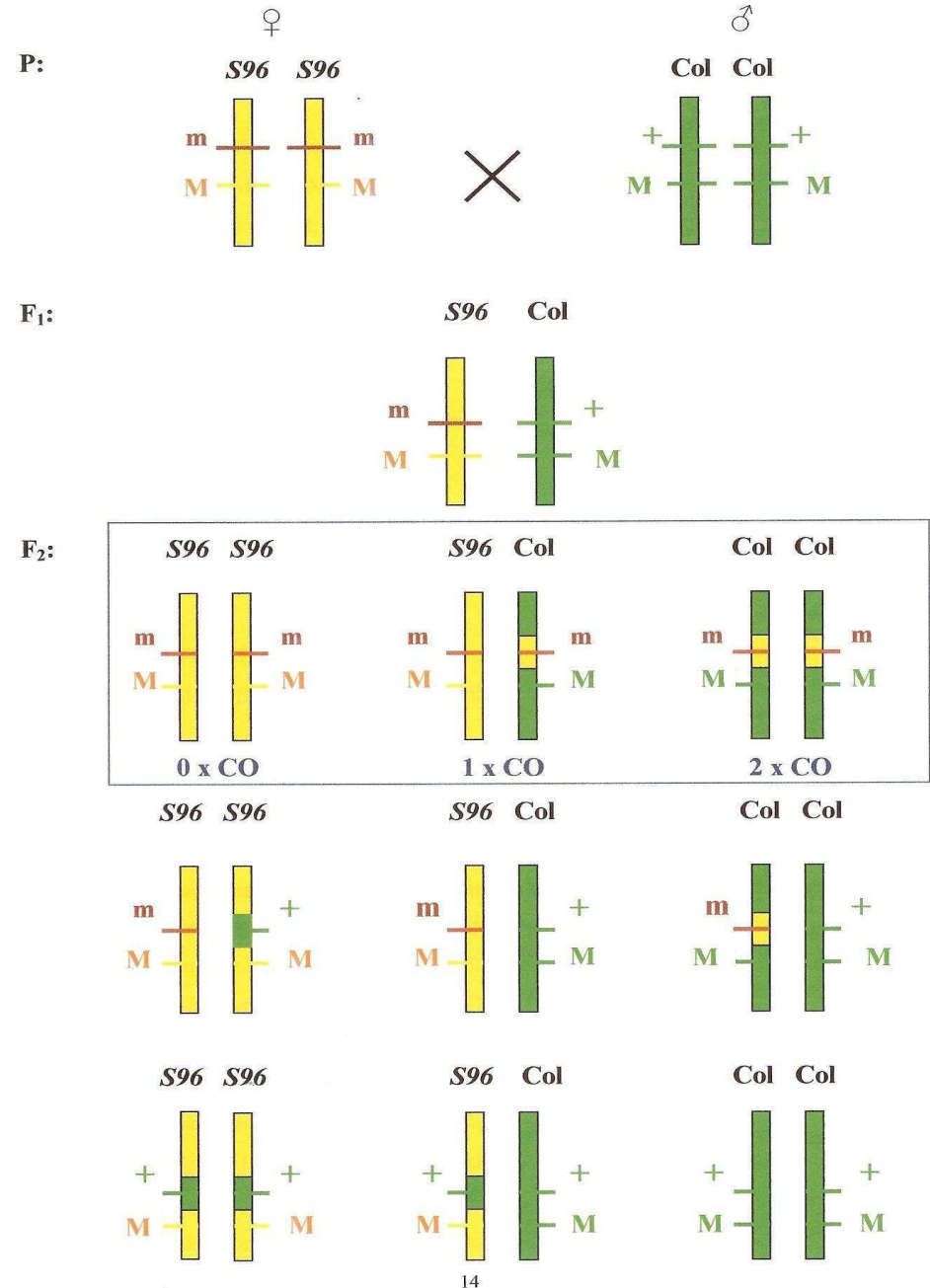
M mikrosatelit na pozadí *Col*

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*

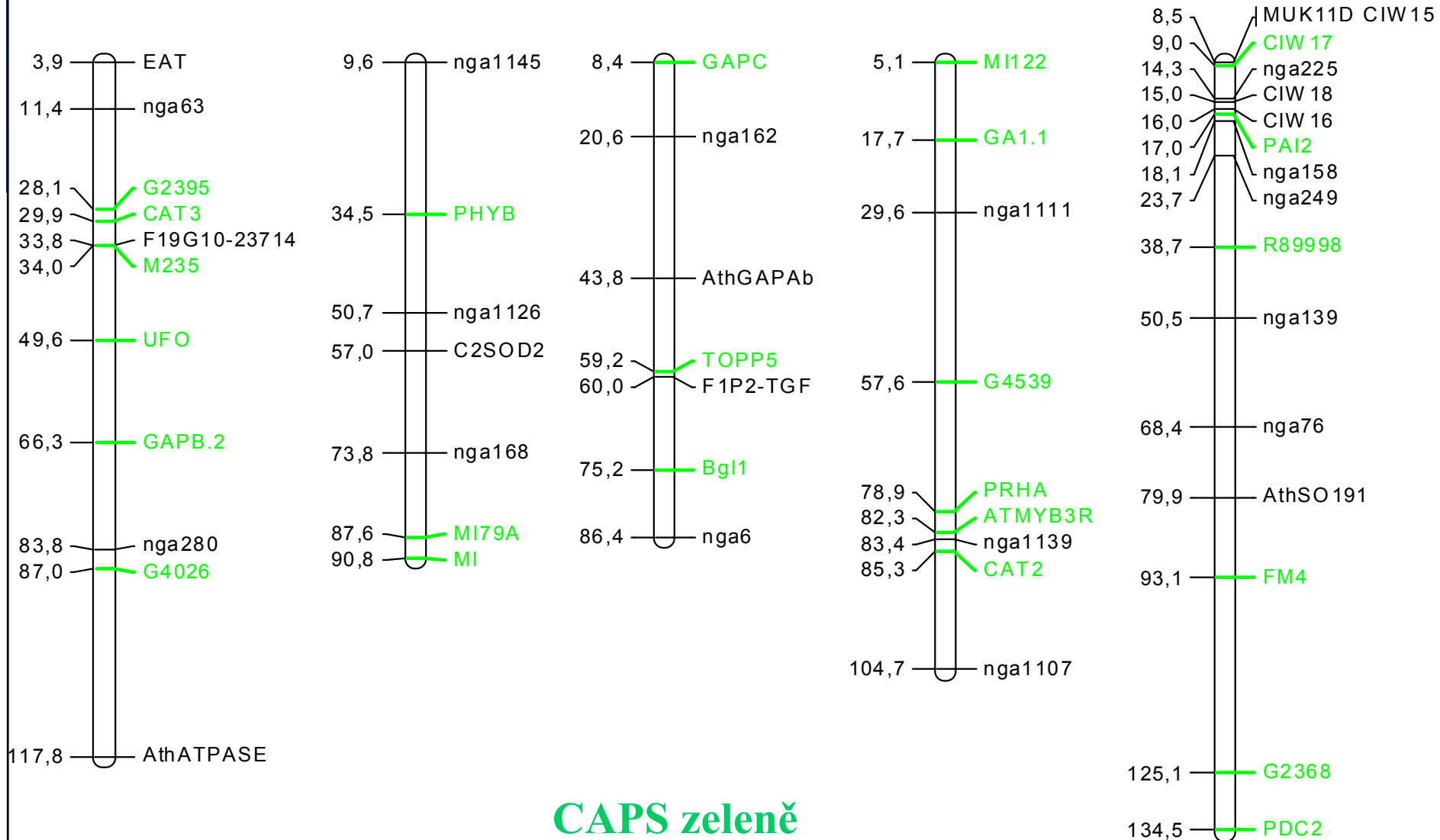
1CH

2CH

3CH

4CH

5CH



CAPS zeleně
SSR černě

Postup

20 až 30 vzorků DNA *lyz* F₂

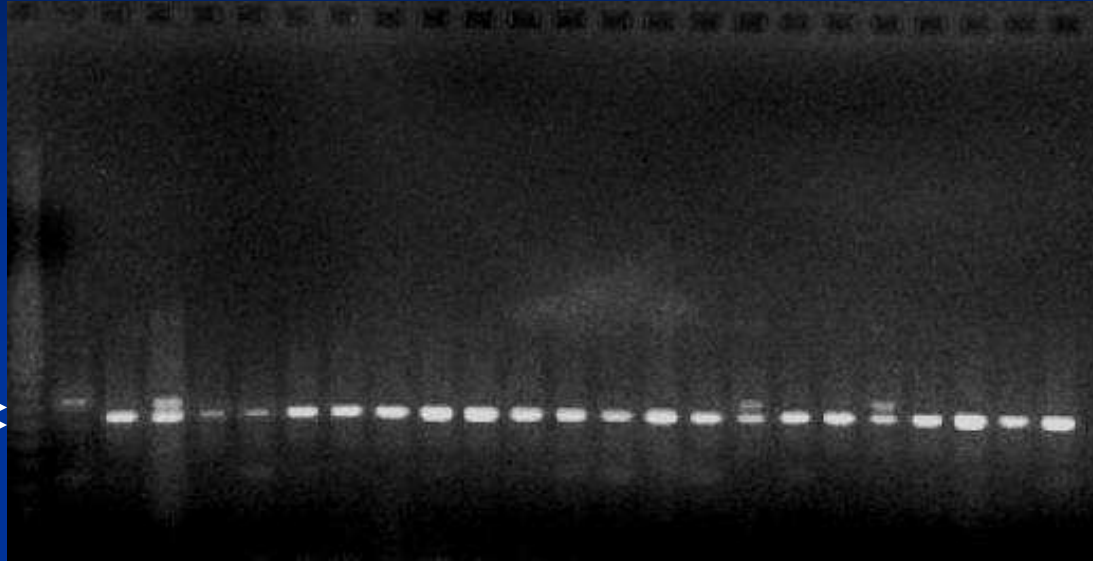
Kontroly: rodiče, F₁

- PCR pro SSR markery
- ELFO

- PCR pro CAPS markery
- Štěpení enzymem
- ELFO

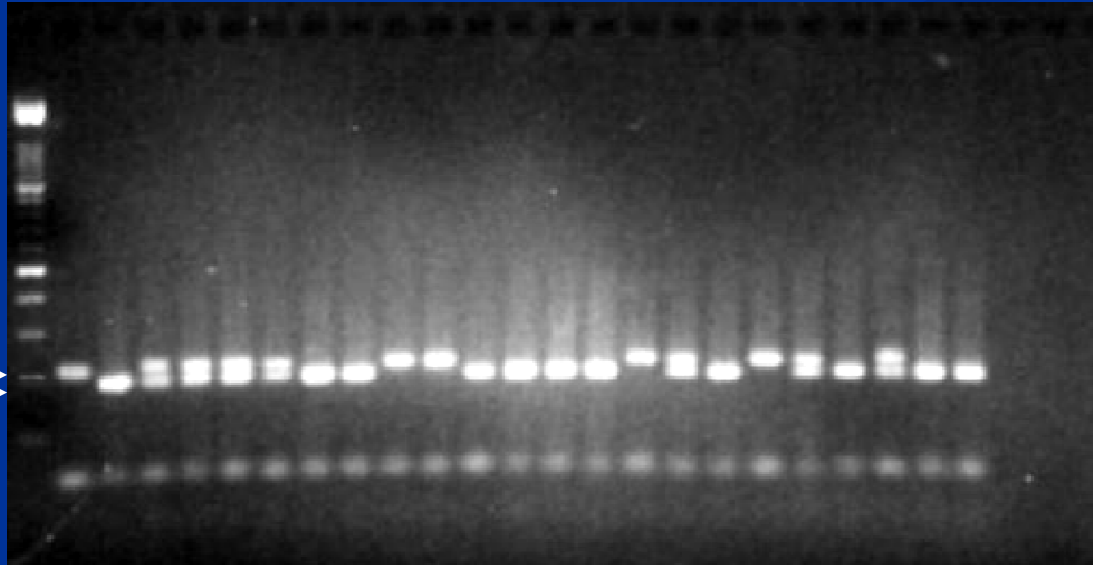
Segregující populace F2 a molekulární analýza - příklady

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

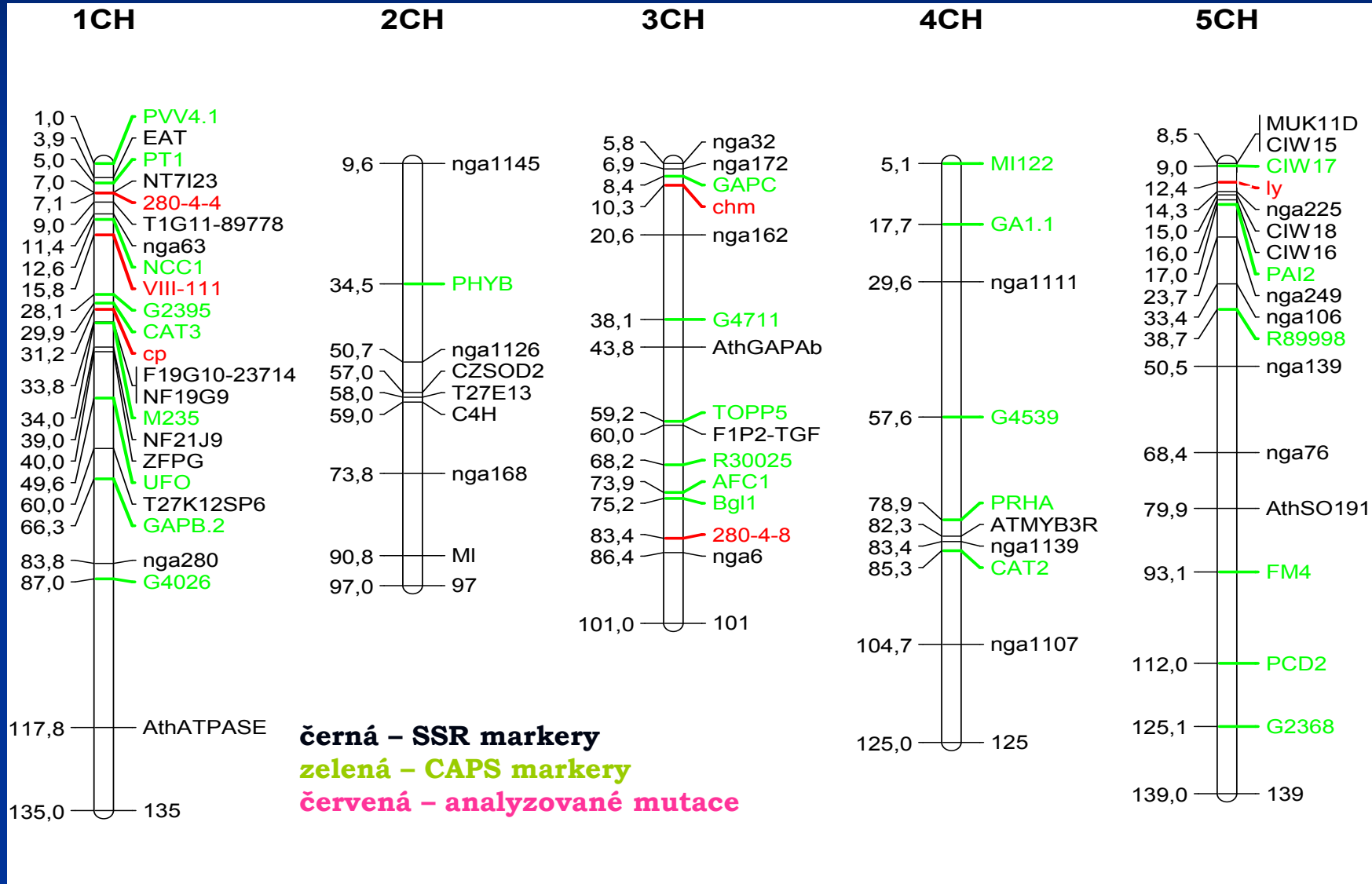
Odhad mapové vzdálenosti D dle Kosambiho mapovací funkce (Kosambi, 1944):

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

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**

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**

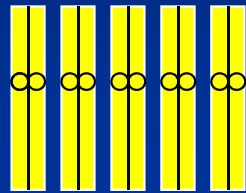
RIL (recombinant isogenic lines)

Rekombinantní inbrední linie

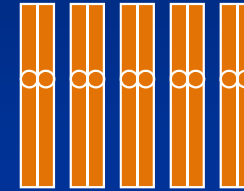
⊗ časová náročnost

⊕ vysoká homozygotnost

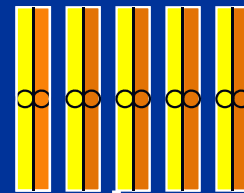
Křížení polymorfních
(fenotypově kontrast-
ních) linií



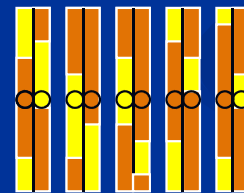
×



F₁



F₂ 50,0%



F₃ 75,0%

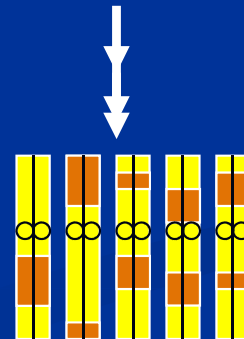
F₄ 87,5%

F₅ 93,8%

F₆ 96,9%

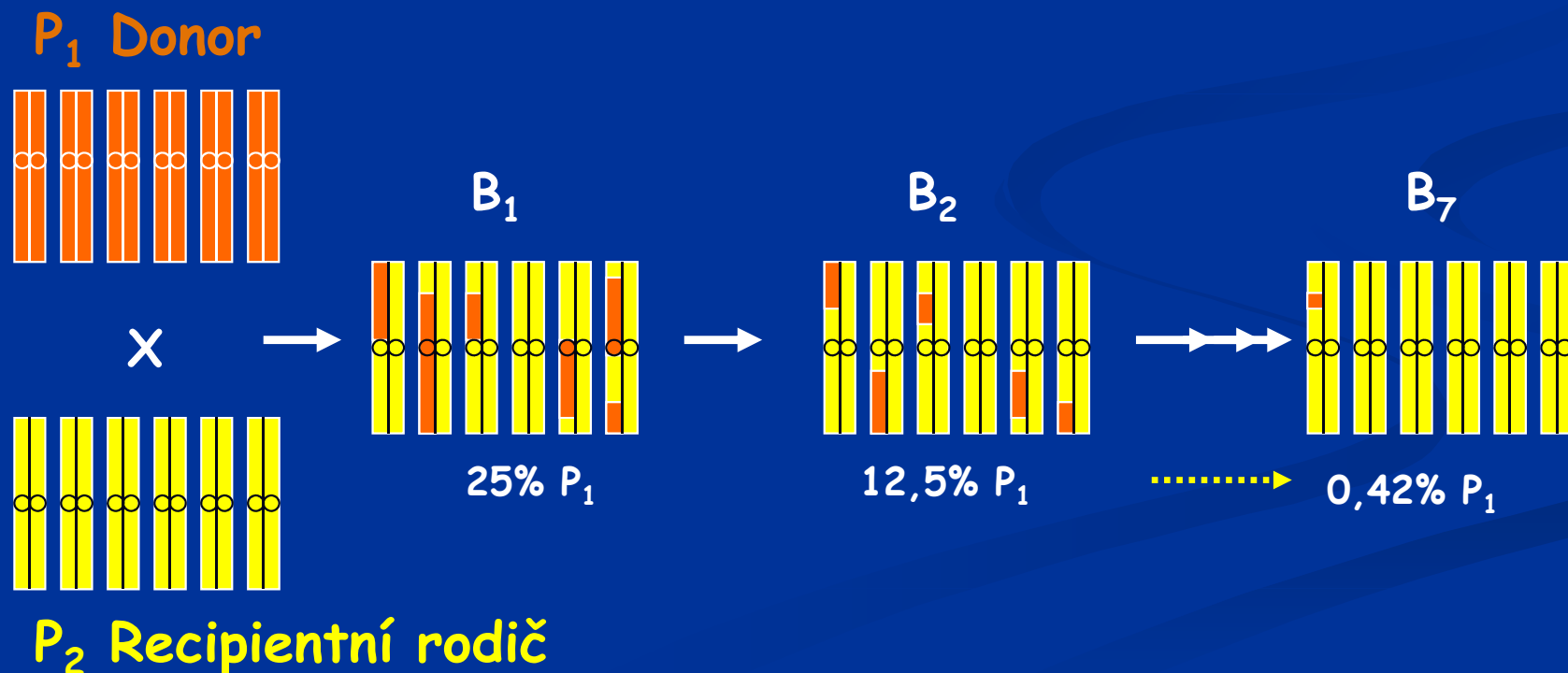
F₇ 98,7%

F₈ 99,5%



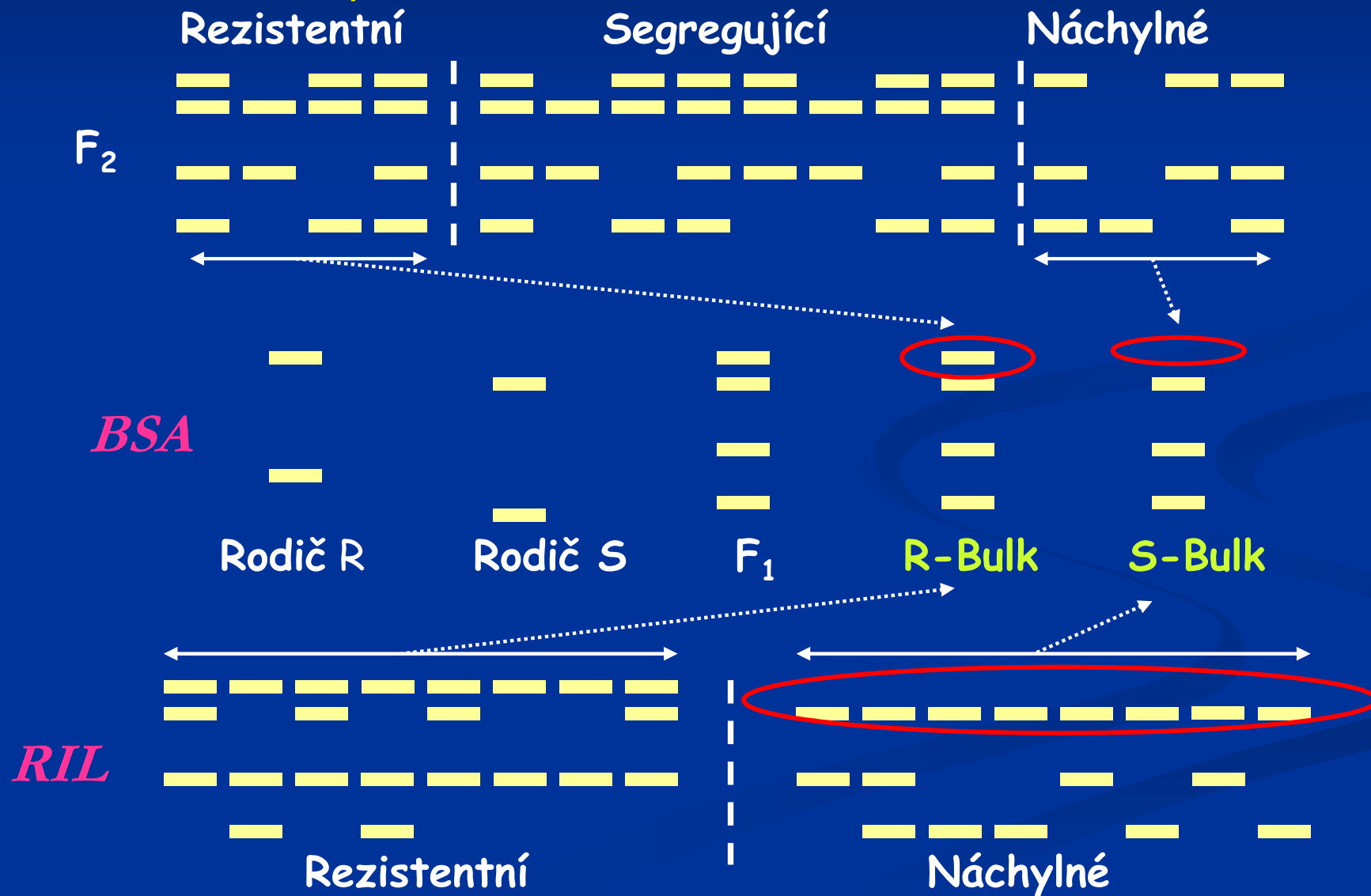
NIL (near isogenic lines) Izogenní linie

- ⊗ 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)

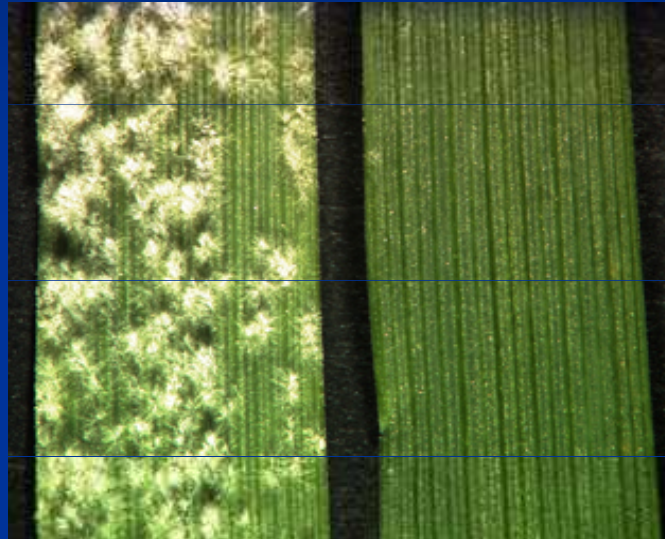
⊕ rychlá příprava kontrastních skupin genotypů
z F_2 generace
dominance, recesivita



Genetické mapování genu odolnosti u ječmene

- *Hordeum vulgare*

- Padlí ječmene



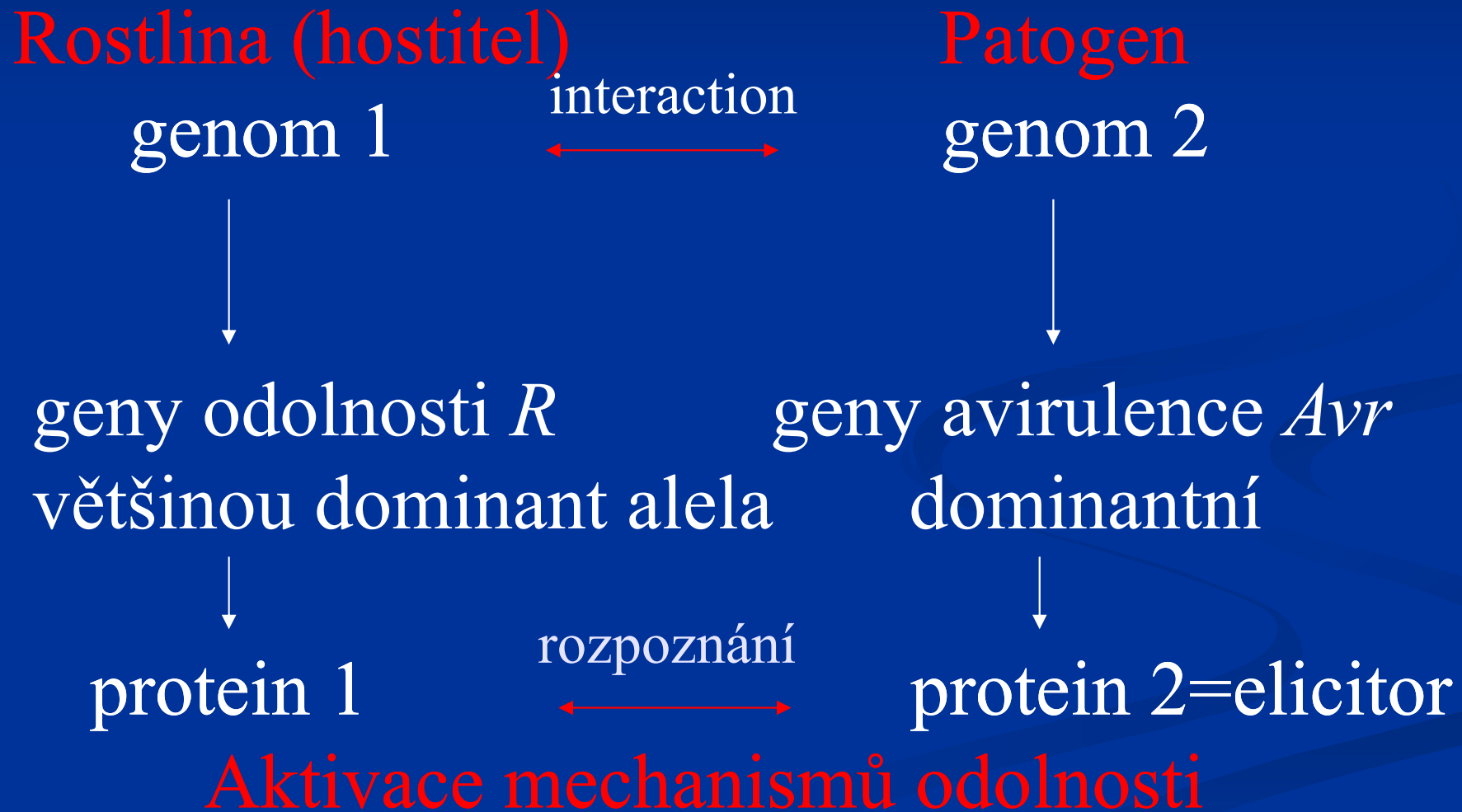
původce *Blumeria graminis*
f. sp. *hordei*
v ČR i celosvětově jedna ze
závažných chorob
ječmene

- 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 (PI.....)

Genetické aspekty choroby



koncept gen – proti – genu

geny *R*

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

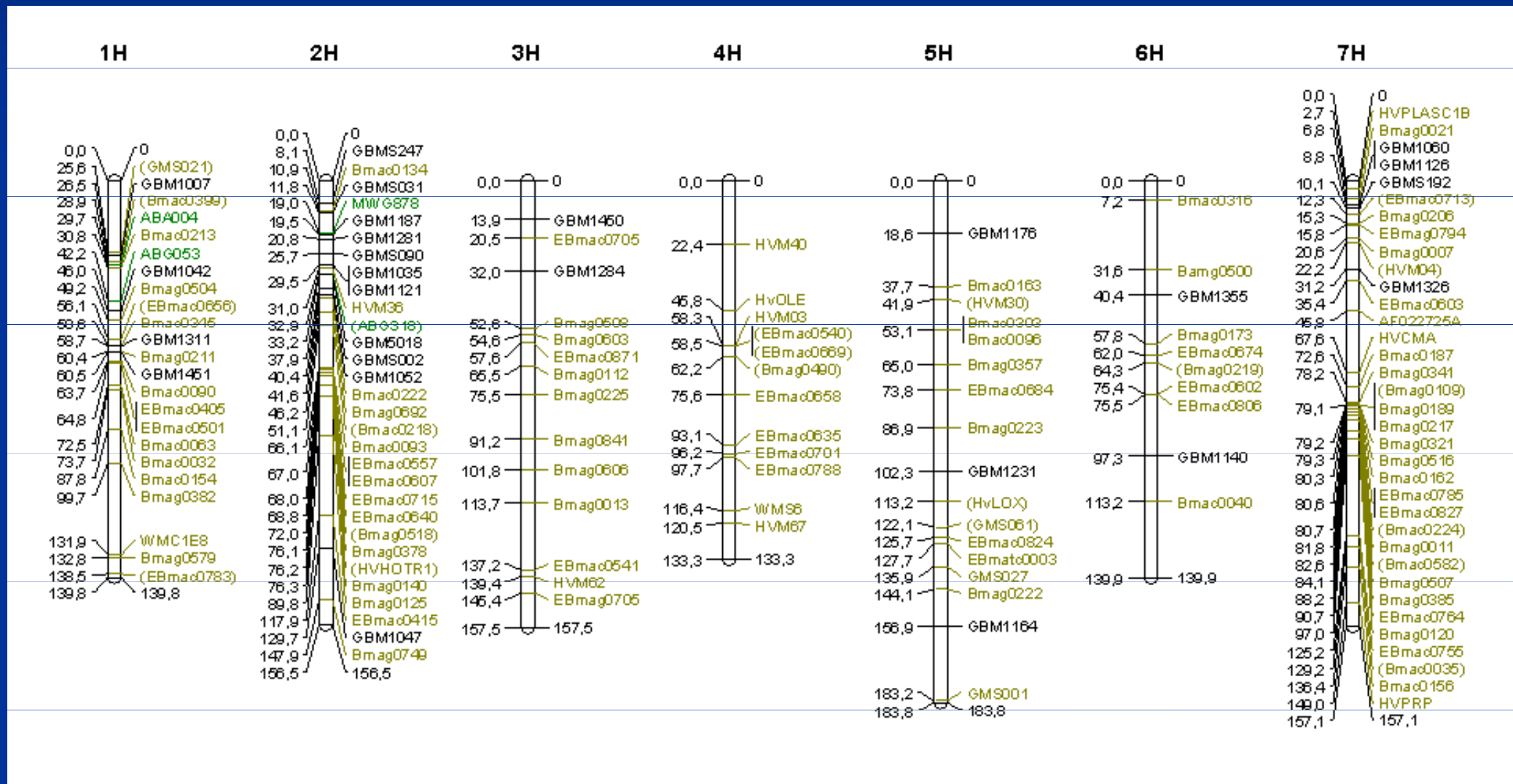
Cíle studia donorů rezistence

- 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 alespoň pro některé ze zjištěných genů odolnosti**

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)

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, 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

RT4

Zdroj odolnosti 7

RT0

F₁

RT0

- **F₂ balky (DNA) každý 18 rostlin**

- **F₂ 100 rostlin (DNA)**

- **F₂ 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 polymorphis sequence)

chromozom 1H

chromozom 2H

chromozom 3H

chromozom 6H

chromozom 7H

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

