



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Posílení spolupráce mezi MZLU v Brně a dalšími institucemi v terciárním vzdělávání a  
výzkumu  
CZ 1.07./2.4.01/12.0045

# Šlechtění minoritních plodin

**Tereza Cholastová**

**Zemědělský výzkum, spol. s r.o. Troubsko**



# Genetické mapování

## Mapovací populace

### Úvod ke genetickému mapování

- **genetická mapa** – pořadí lokusů (genetických značek – markerů) na chromozomu
- **rekombinace** – jev vyskytující se v průběhu meiotického dělení, kt. vede ke vzniku gamet. V profázi meiózy dochází k párování homologních chromozómů a k fyzické výměně GI v důsledku procesu nazývaného **crossing – over**
- pravděpodobnost každého crossing – overu, udává **frekvenci rekombinace (r)**, kt. je pak základem pro určení genetických vzdáleností mezi lokusy. Hodnota frekvence je převáděna na mapové jednotky **centiMorgany (cM)**. 1cM je gen. vzdálenost mezi 2 lokusy s frekvencí rekombinace, kt. činí 1%
- pro tvorbu GM je zapotřebí získat data z velkého počtu jedinců. Za tímto účelem jsou vytvářeny **mapovací populace** jako základní nástroje pro konstrukci genetických map.

velká množství dat získaná analýzou jedinců z mapovacích populací jsou rutinně zpracovávána počítačovými programy (MAPMAKER, Lander *et al.*, 1987; JoinMap, Stam, 1993)

- vznikají kontrolovaným křížením jedinců jednoho druhu, příp. křížením mezi příbuznými druhy
- křížení jedinci se liší ve znaku, kt. je předmětem studia. **Výběr rodičů, kteří tvoří základ mapovací populace, je kritickým faktorem při plánování experimentu.** Obecně platí, že vysoká genetická diverzita mezi rodiči, usnadňuje umístňování markerů na genetickou mapu.
- pro konstrukci genetické mapy s malým rozlišením je dostačující populace o velikosti 100 jedinců

### Mapovací populace

- vznikají kontrolovaným křížením jedinců jednoho druhu, příp. křížením mezi příbuznými druhy
- křížení jedinci se liší ve znaku, kt. je předmětem studia. **Výběr rodičů, kteří tvoří základ mapovací populace, je kritickým faktorem při plánování experimentu.** Obecně platí, že vysoká genetická diverzita mezi rodiči, usnadňuje umístňování markerů na genetickou mapu.

- pro konstrukci genetické mapy s malým rozlišením je dostačující populace o velikosti 100 jedinců
- **výběr mapovací populace** se liší v závislosti na způsobu rozmnožování rostlin.
- **pro samosprašné rostliny** jsou vhodné F2 populace, populace zpětných kříženců (BC), rekombinantní inbredné linie (RILs), a dihaploidní linie (DHL), případně další typy populací, z daných populací odvozené
- **pro cizosprašné druhy** jsou k mapování využívány F1 populace a populace zpětných kříženců (BC)

## Mapovací populace vhodné pro samosprašné rostliny

### F2 populace

- populace jedinců F2 generace představují nejjednodušší formu mapovací populace
- **proces:** v první fázi jsou kříženi dva homozygotní rodiče (čisté linie) lišící se v studovaném znaku. Jedinci vzniklé F1 generace jsou všichni heterozygotní. U těchto jedinců dojde k samosprašení. Následně vzniklé rostliny představují mapovací populaci F2. Jedinci F2 generace se vzájemně liší svou genetickou konstitucí.
- nenáročná na výrobu, která je vytvořena během 2 generací

### Populace zpětných kříženců (BC, backcross population)

- populace BC jsou používány ke studiu určitého znaku nacházejícího se u jednoho z rodičů (donor) na pozadí genotypu druhého rodiče (recipient). Za tímto účelem je vytvořena F1 populace křížením 2 homozygotních rodičovských linií. Heterozygotní jedinci F1 generace jsou poté kříženi s rodičem, jenž je označován jako recipient.

### Izogenní linie (Nearly isogenic lines, NILs)

- pokročilým zpětným křížením (7 – 10 generací) a využitím selekce za pomoci markerů a kontroly fenotypu (přítomnosti žádoucího znaku) můžeme získat téměř izogenní linie
- jedná se o rostliny, které z genomu donora obsahují minimální úsek DNA odpovídající jednomu nebo několika málo lokusům

### Dihaploidní linie (DHL, double haploid lines)

- jsou využívány k vytvoření **zcela homozygotních linií**, u kterých není přítomna žádná zbytková heterozygotnost. Takto vytvořené rostliny mohou být poté použity jako homozygotní rodičovské linie pro tvorbu jiných typů mapovacích populací.
- k produkci DHL dochází z haploidních rostlin. Ty se vyskytují buď přirozeně (řepka, kukuřice) nebo je haploidního stavu dosaženo kultivací nezralých prašníků či mikrospor

na speciálním médiu. Ke zdvojení počtu chromozómů dochází u některých druhů spontánně, případně je zdvojení indukováno působením kolchicinu.

- Vlivem tohoto mitotického jedu dochází k zabránění tvorby mitotického vřeténka, a proto nedojde k rozdělení chromozómů do dvou dceřiných buněk
- NEVÝHODA: poměrně nákladný a náročný vývoj vzhledem k tomu, že získávání haploidních jedinců z mikrospor, případně z vajíček je pracné a úspěšnost je závislá na použitém genotypu

### **Rekombinantní inbrední linie (RILs, recombinant inbred lines)**

- jsou homozygotními potomky jedinců F2 generace
- k jejich vzniku dochází opakovaným samosprášením rostlin po 7 – 10 generací. Vzhledem k tomu, že dochází k několika samosprášením, prochází genom postupně několika meiózami a tím je dosažena větší přesnost mapování
- výsledné rostliny jsou homozygotní, je možné je i nadále množit beze změn GI
- jejich vývoj je podstatně delší než v případě DHL, ale zároveň je mnohem méně finančně a technicky náročný. RILs jsou dostupné např. pro rýži, oves či *Arabidopsis*

### **Mapovací populace vhodné pro cizosprašné rostliny**

- podstatně složitější než u samosprašných rostlin
- protože není možné získat zcela homozygotní rodiče, jsou základem populace rodiče **heterozygotní**
- při genetickém mapování je používána F1 populace, případně mohou být jedinci F1 generace zpětně kříženi s jedním z rodičů, pak vzniká populace zpětných kříženců (BC).

### **Genetické markery**

- určité dědičné znaky umožňující detekovat rozdíl v sekvenci DNA mezi dvěma jedinci. Tento rozdíl může být detekován na úrovni fenotypové, proteinové nebo na úrovni DNA v závislosti na použití markerového systému.
- Markery jsou podle toho děleny na:
  - morfologické (variace na fenotypové úrovni)
  - biochemické (variace na úrovni proteinového produktu)
  - DNA markery (variace na úrovni DNA)

## Morfologické (fenotypové) markery

- provedeno první genetické mapování (velikost či barva orgánů nebo velikost organismu)
- z hlediska hodnocení se jedná o nejjednodušší a také nejlevnější systém
- NEVÝHODA: celá řada znaků se vyskytuje jen v určitých fázích vývoje, což může podstatně prodlužovat dobu analýzy
- genetické mapy sestavené s pomocí těchto markerů byly vytvořeny např. pro kukuřici, hrách či rajče

## Biochemické markery – Izoenzymy

- prvními markery studujícími variaci mezi jedinci na molekulární úrovni
- jedná se o izoformy proteinů, které se liší velikostí, složením AMK, a nábojem. Je tedy možné je elektroforeticky separovat na škrobových nebo PAA gelech na základě velikosti a náboje
- NEVÝHODY: poměrně nízká míra polymorfismu, analyzované proteinové produkty mohou být rovněž tkáňově specifické, či mohou být ovlivněny fází vývoje organismu nebo podmínkami prostředí

## DNA markery

- v současnosti dnes nejnovějšími a nejpoužívanějšími
- založeno na přirozeně se vyskytujících polymorfismech v sekvencích DNA
- výběr vhodného markerovacího systému závisí na aplikaci, struktuře genomu studovaného organismu a dostupném laboratorním vybavení
- ideální markerový systém by měl být dostatečně citlivý, jednoduchý na užívání a dostatečně reprodukovatelný
- použité markery by měly být rovnoměrně a četně zastoupeny v genomu a měly by vykazovat vysokou míru polymorfismu
- **RFLP** (Restriction fragment length polymorphism)
- **RAPD** (Random amplified polymorphism detection)
- **AFLP** (Amplified fragment length polymorphism)
- **SSR** (Simple sequence repeat)

## **RFLP Restriction fragment length polymorphism (Polymorfismus v délce restrikčních fragmentů)**

- historicky prvními DNA markery (Botstein *et al.*, 1980)
- princip: hybridizace značené sondy na gDNA různých jedinců štěpenou RE

### **RFLP pro a proti**

- **kodominantní markery**
- **dobrá reprodukovatelnost**
- **RFLP polymorfismus není příliš častý**
- **drahé a relativně pomalé**
- **velké množství kvalitní DNA**

## **RAPD Random amplified polymorphism detection (Variabilita délek náhodně amplifikované DNA)**

- libovolné primery o délce 8 -12nt
- princip: náhodná amplifikace z různých míst genomu, primer dosedne na různých místech a v různých směrech amplifikuje DNA fragmenty

### **RAPD pro a proti**

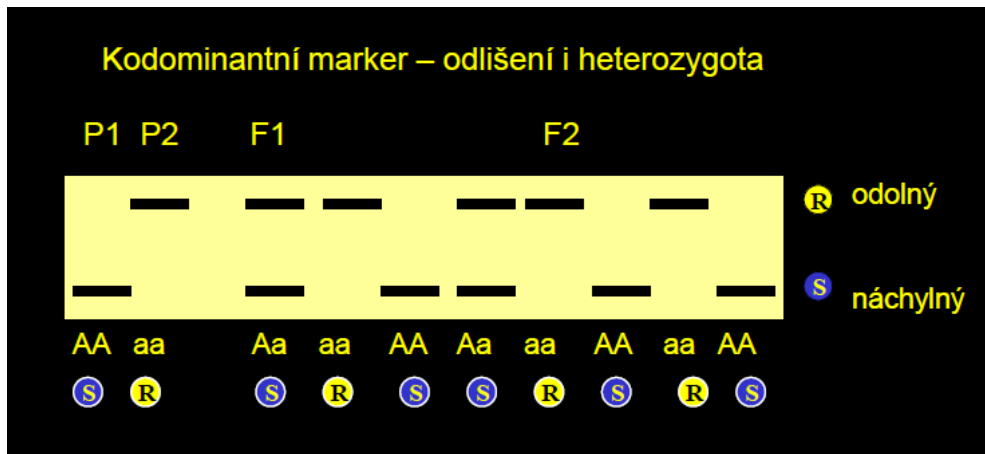
- **velmi levné**
- **rychlé a snadné = stačí velmi málo DNA, poměrně dost fragmentů**
- **horší reprodukovatelnost**
- **omezená hodnota informace (dominantní povaha)**

## **SSR Simple sequence repeat (Repetice jednoduchých sekvencí)**

- krátké, tandemově se opakující jednoduché sekvenční motivy zpravidla o délce 2-6bp
- princip: sklouznutí nt řetězce během replikace (replication slippage) = hlavní zdroj vysoké proměnlivosti

### **SSR pro a proti**

- **kodominantní charakter**
- **vysoká variabilita**
- **rozmístění po celém genomu**
- **dobrá reprodukovatelnost**
- **jednoduchost analýzy**
- **optimalizace PCR**
- **obtížné hledání výchozích markerů**

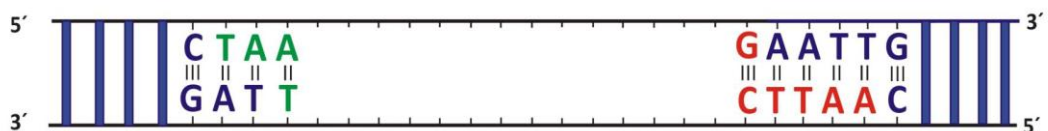
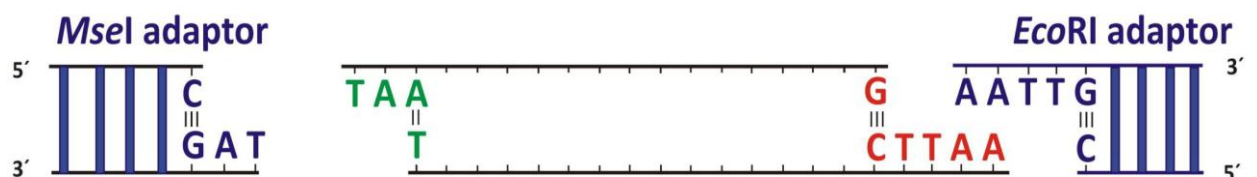


### AFLP Amplified fragment length polymorphism (Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů)

- princip: metoda založena na restrikci DNA 2 enzymy
- postup: relativně složitý (4 fáze)
  - **RESTRIKCE** – specifické rozštěpení DNA 2 RE

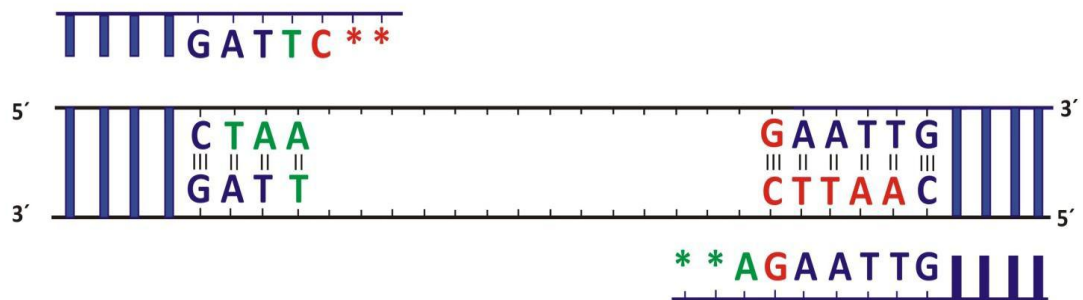


- **LIGACE** – pomocí T4 ligázy jsou k fragmentům přidávány adaporty



- PRESELEKTIVNÍ AMPLIFIKACE – klasická PCR s primery komplementárními k sekvenci adaptorů, navíc +1 nt směrem dovnitř amplifikovaného úseku
- SELEKTIVNÍ AMPLIFIKACE – se provádí se 3mi selektivními nt (s přesahem „dovnitř“ amplifikovaných fragmentů)

### Msel primer



### EcoRI primer

- DETEKCE
  - primery jsou fluorescenčně značeny = sekvenátor
  - primery bez značení = PAGE elfo

### AFLP pro a proti

- rychlé získání polymorfismu až 100 fragmentů na 1 prim. kombinaci = relativně levná
- vysoce reprodukovatelný pattern
- odráží variabilitu skrz celý genom dominantní marker

### Postup mapování – genetická fáze

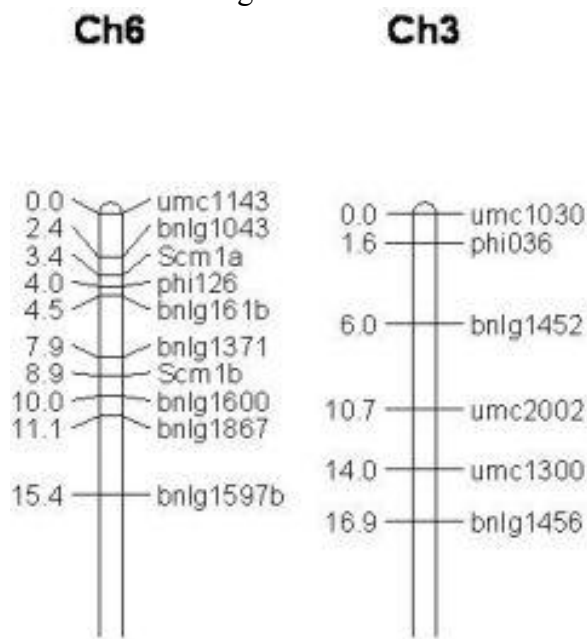
- 1) najít výrazný a **spolehlivý fenotyp** pro gen, kt. hledáme
- 2) zkřížit kontrastní fenotypy – odvodit **mapovací populaci** – pro hrubou analýzu F2 (200 – 300 jedinců), pro dominantní fenotyp potvrdit v F3
- 3) **vyhodnotit vazbu** dostupných markerů
- 4) určit **polohu genu** na genetické mapě vzhledem k okolním markerům
- 5) získat **nové markery** – např. z analýzy skupin segregantů (BSA) nebo z databází příbuzných organismů (kolinearita)
- 6) pro zjištění těsnější vazby odvodit **pokročilejší mapovací populace**, napr. RIL nebo NIL (několik tisíc jedinců)
- 7) najít markery v co nejtěsnější vazbě – optimálně **pod 0,5cM** – z obou stran genu

### Konkrétní příklad hledání markerů ve vazbě s genem zájmu



- **Rostlinný materiál.** Jako výchozí rodičovský materiál byly vybrány 2 inbrední linie, evropská inbrední linie **TR42 (rezistentní k SCMV)** a U.S inbrední linie **TR56 (vysoce náchylná k SCMV)**. Křížením rodičovských linií vznikla generace F1, která byla dále křížena za vzniku generace F2. **Soubor 120 F3** linií vznikl samosprášením individuálních rostlin F2 generace.
- **PCR – SSR ampifikace.** Pro skrínink rodičovských linií bylo použito celkem 135 SSR, získaných z Maize Genetic a Genomic databáze (<http://maizegdb.org/ssr.php>). Lokusy, u kterých byl potvrzen polymorfní charakter (14), byly použity ke konstrukci vazební mapy

**Obrázek:** Vazební mapa obsahující 14 polymorfních SSR lokusů, kterými byl analyzován soubor 120 rostlin F3 generace u křížení TR56 x TR42



- na chromozomu 6 byly identifikovány 2 QTL související s rezistencí k SCMV. Geny rezistence detekovány na chromozomu 6 **Scm1a** byly lemovány SSR markery **bnlg1043 a phi126** s genetickou vzdáleností 1,0 a 0,6cM v tomto pořadí, zatímco genetická vzdálenost mezi dvěma lemovujícími markery **bnlg1371 a bnlg1600** a genem rezistence **Scm1b** byly 1,0 a 1,1cM v tomto pořadí.