

Genetika a šlechtění lesních dřevin

Genetické markery - princip a využití

Doc. Ing. RNDr. Eva Palátová, PhD.

Ing. R. Longauer, CSc.

Ústav zakládání a pěstění lesů

LDF MENDELU Brno



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Genetické markery

= znaky, které informují o genotypu

Musí tedy splňovat podmínky:

- a) nejsou ovlivňovány prostředím
- b) mají jednoduchou genetickou kontrolu
(nejlépe alelami jednoho lokusu = genové markery)
- c) dědí se s neúplnou dominancí nebo – co je výhodou – jsou kodominantní a z fenotypu lze zjistit genotyp.

Využití genetických markerů:

- studium populací
- studium geografické proměnlivosti
- identifikace šlechtitelského materiálu
- selekce na odolnost (markery rezistence)
- prokazování identity a původu reprod. materiálu
- studium genetického materiálu
- taxonomie

1. Markery morfologické

- barevné a tvarové odchylky listů, popř. habitu (mutanti)

stříhanolisté a kadeřavé formy

purpurové formy (BK, JV, BŘ, JL..)

chlorofyloví mutanti (formy aurea, albina u SM, BO)

Mutantní jedinci *Drosophilla melanogaster* studovány J. H. Morganem od r. 1905

2. Biochemické markery

2.1 Fenoly

- sekundární metabolity
- kvalitativní složení stálé, kvantita ovlivňována prostředím a mění se v ontogenet. vývoji
- pokud se vlivy omezí a standardizuje se věk, lze je použít jako genetické markery

Využití:

- identifikace klonů TP
- studium klinálních trendů proměnlivosti
- markery rezistence k chorobám a škůdcům (lze identifikovat potenciálně rezistentní genotypy)

Nevýhody:

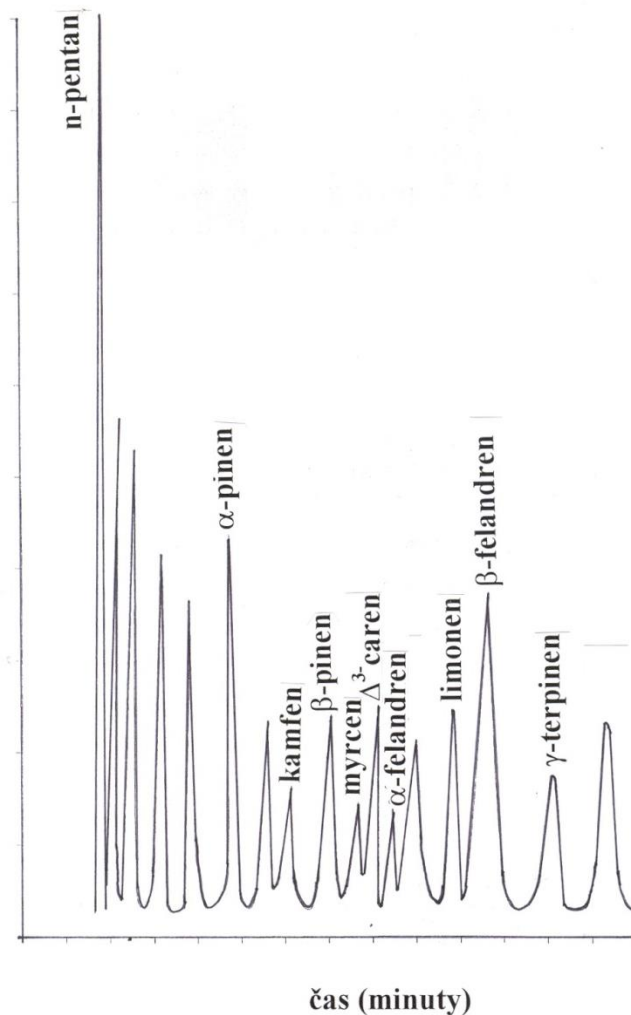
- **analytické problémy** (extrakce, rychlá oxidace, problémy se skladováním)
- **variabilita v rámci rostliny, ovlivnění prostředím**

2.2 Terpeny

- **sekundární metabolity**
- **součást pryskyřic a eterických olejů**
- **výskyt u jehličnanů** ve všech ontogenetických stádiích a všech orgánech
- **existence oddělených pryskyřičných systémů** (kůra, xylem, semena, jehlice..)
- **méně citlivé na vlivy prostředí než fenoly**
- **jenom některé kódovány jedním genem**
(α -pinen, β -pinen, myrcen, Δ -3 karenen, limonen, caryophylen, β -felandren)

Princip analýzy:

-zjišťování
kvantity a kvality
terpenů kapilární
plynovou
chromatografií



Ukázka chromatogramu monoterpenů
a n-uhlovodíků (Squilace 1976 ex Sabor 1998)

Výhody:

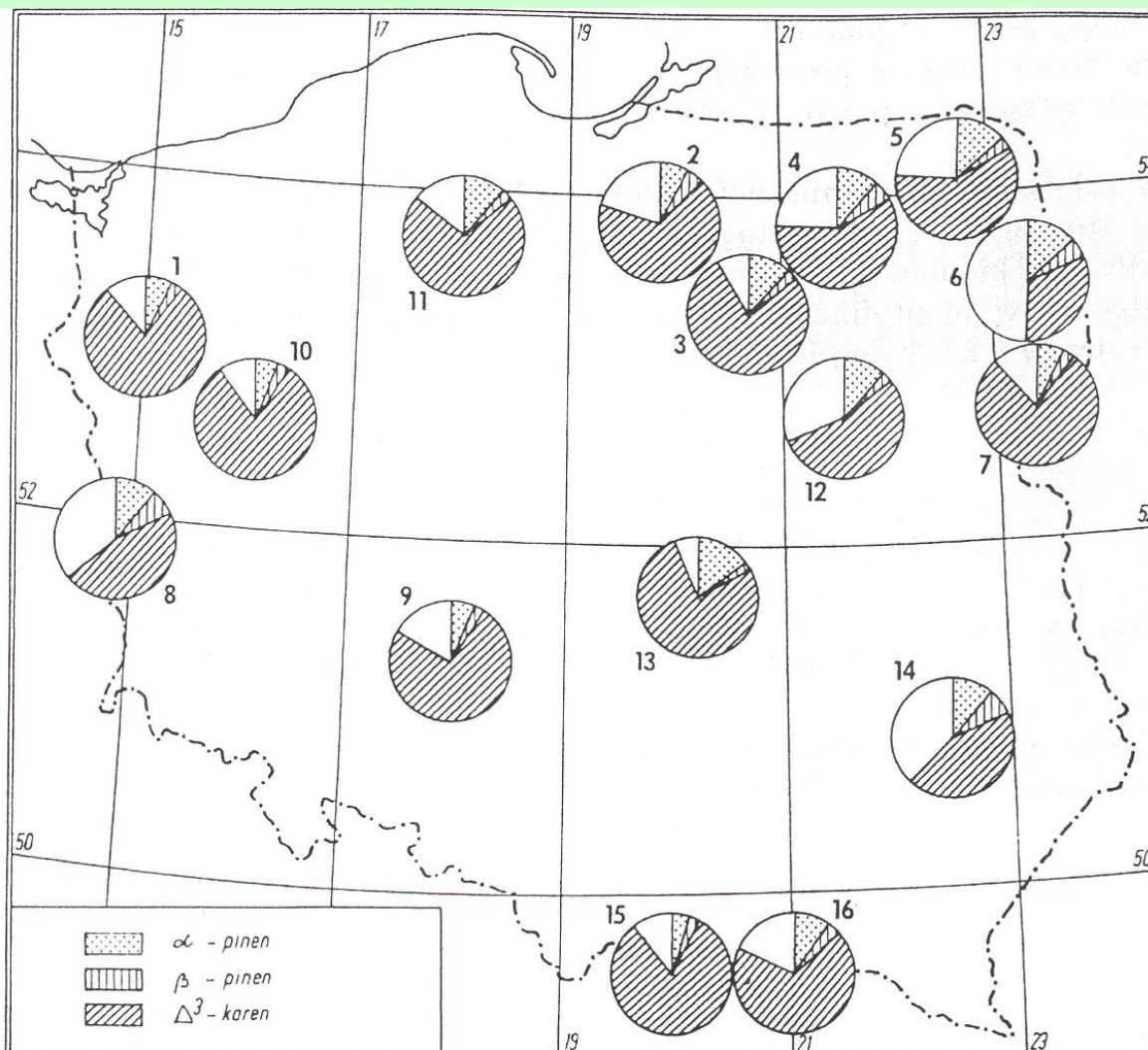
- **snadná a rychlá analýza** (není třeba extrakce, jen u jehlic)
- **stálé** (po extrakci se nemění)
- **negenetická variabilita existuje, ale dá se standardizovat**

Nevýhody:

- **složení se v počátečních vývojových stádiích mění** ⇒ používat materiál od určitého věku
- **sezónní fluktuace terpenů v jehlicích** (v době rašení)
- **variabilita uvnitř rostliny** ⇒ pro odběry volit standardizovaný bod

Využití:

a) studium variability populací



geografická variabilita terpenů v kůře borovice

b) identifikace původu (JD)

c) identifikace spontánních mezidruhových hybridů a studium introgrese

(introgrese = dlouhotrvající spontánní mezidruhová hybridizace, která vede k šíření genů jednoho druhu do druhého druhu)

d) identifikace klonů a kultivarů

c) markery rezistence ke škůdcům (býložravcům, hmyzu) a patogenům (houbám)

2.3 Izoenzymy

- **enzymy = bílkoviny s katalytickou funkcí,**
- **enzym je primární produkt transkripce a translace ,**
- **soubor enzymů přítomných v organismu je stálý (nesouvisí s roční dobou nebo ontogenetických stadiem,**
- **prostředím může v organismu ovlivnit jenom jejich kvantitu („látkové množství“)**

DNA

proteiny

gen

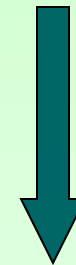
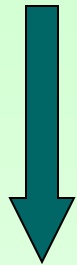
kóduje

enzym

úsek DNA

protein s
katalytickou funkcí

genová mutace



alela

varianta
genu

kóduje

izoenzym

molekulární forma
enzymu

Izoenzymy = enzymy se stejnou nebo podobnou funkcí v metabolismu, které se liší v primární struktuře (různé varianty téhož enzymu)

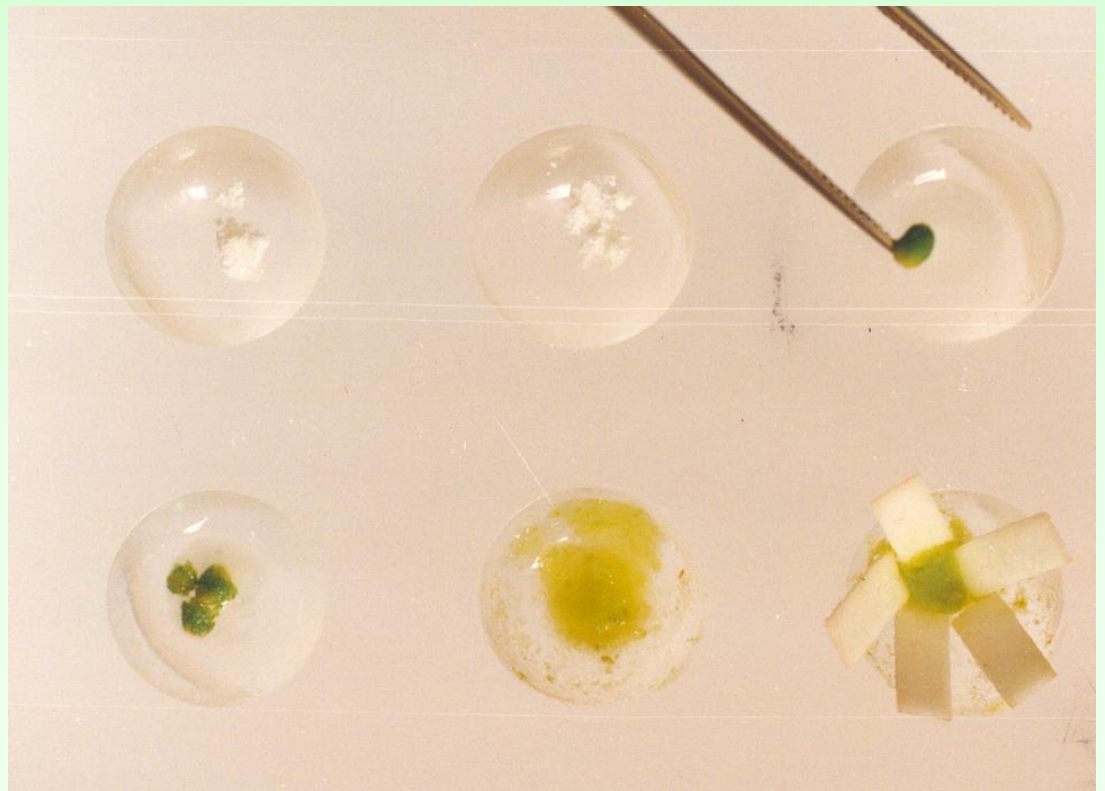
Izoenzymy

- katalyzují stejnou reakci, liší se v elektrickém náboji
- vznikají genovými mutacemi (liší se v jedné nebo více AMK)
- méně ovlivňovány prostředím než fenoly a terpeny
- izoenzymovou analýzou zjišťujeme přítomnost izoenzymů a prostřednictvím nich přítomnost alel, jež je kódují

Postup izoenzymové analýzy

1. izolace izoenzymu z pletiv

- listy, jehlice, pupeny, semena (u jehličnatých)
- homogenizace v pufru a nasátí homogenátu do výřezu filtr. papíru

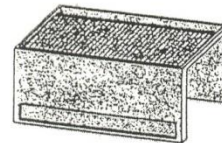
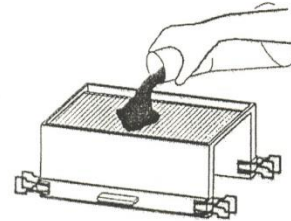
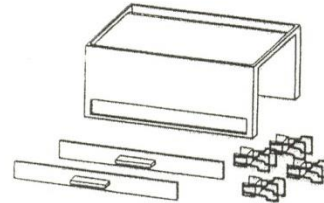
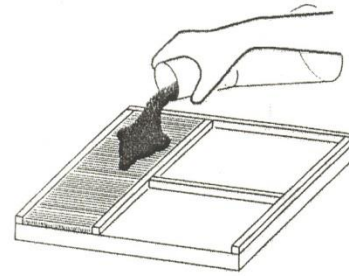


2. Elektroforetická separace

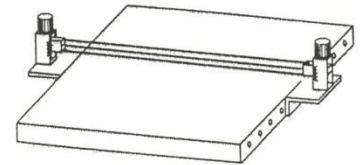
a) medium pro separaci

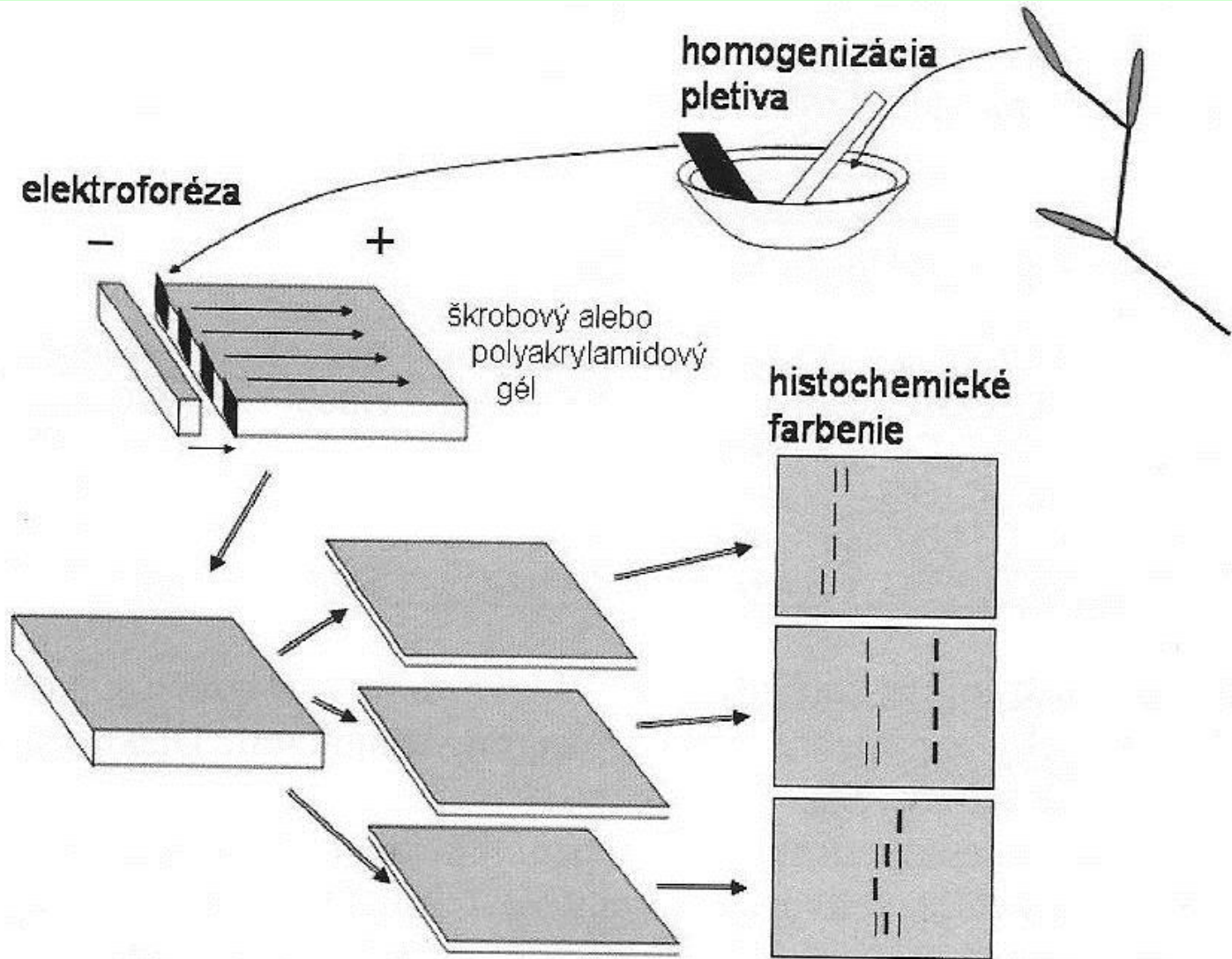
- škrobový nebo polyakrylamidový gel (polymerní řetězcové molekuly)
- působí jako molekulární síto

Příprava škrobového gelu pro izoenzymovou analýzu



Pomůcka pro horizontální řezání gelu

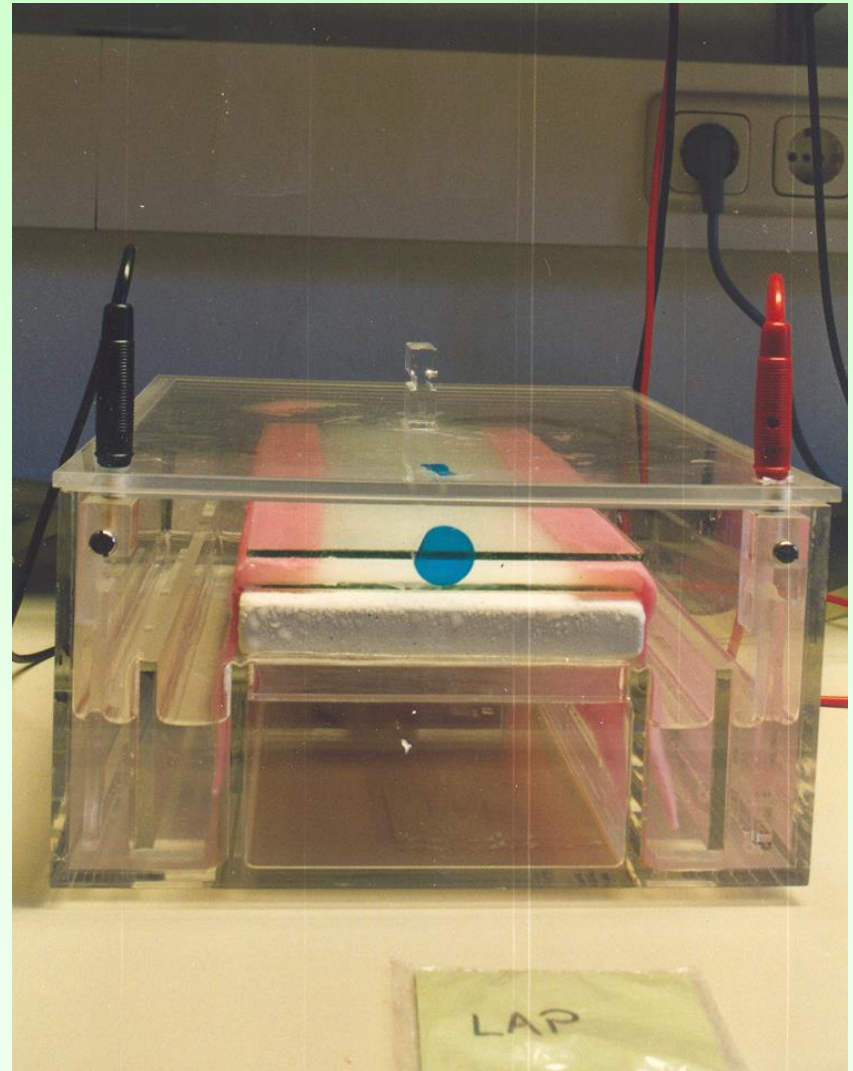


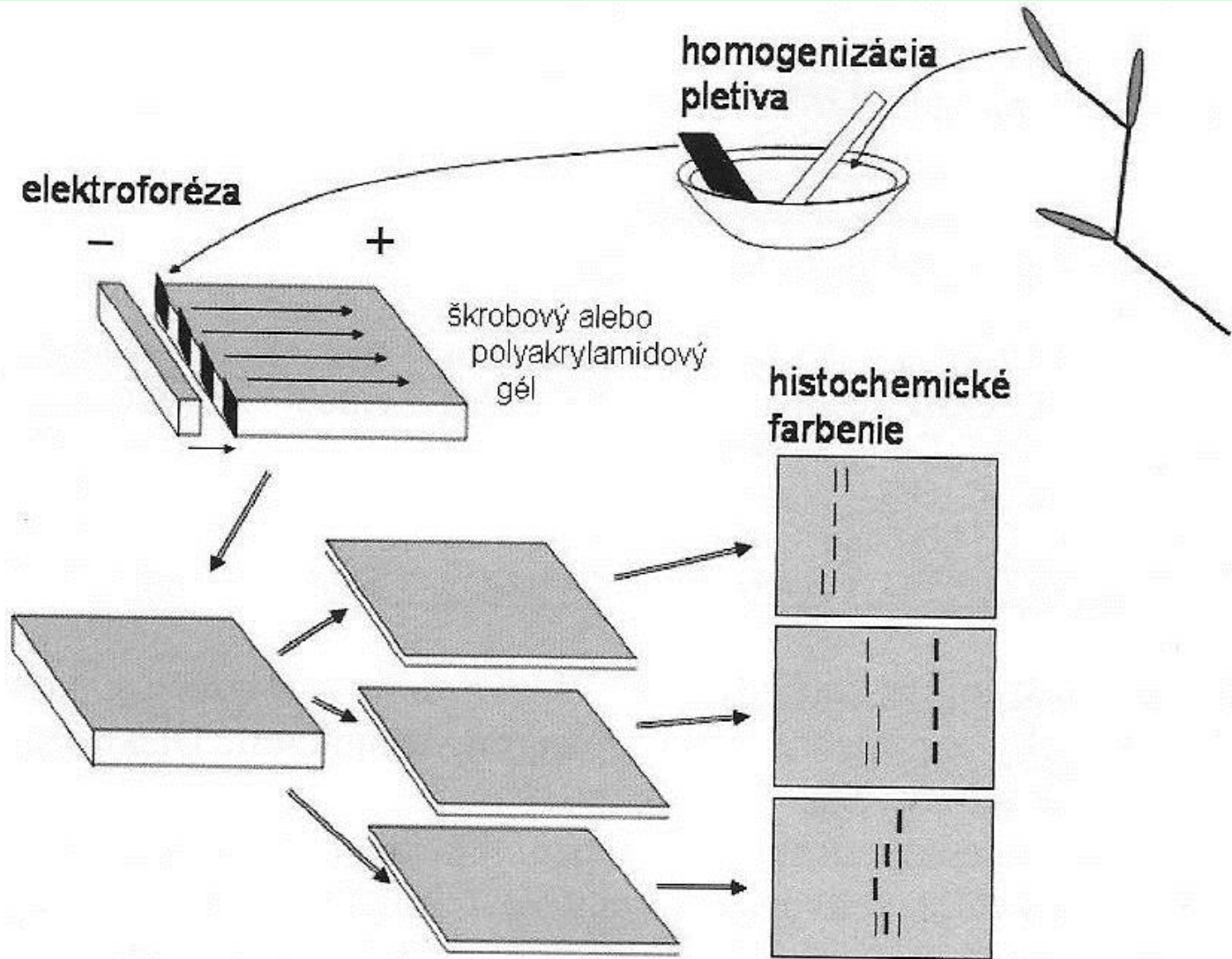


b) elektroforéza

Princip:

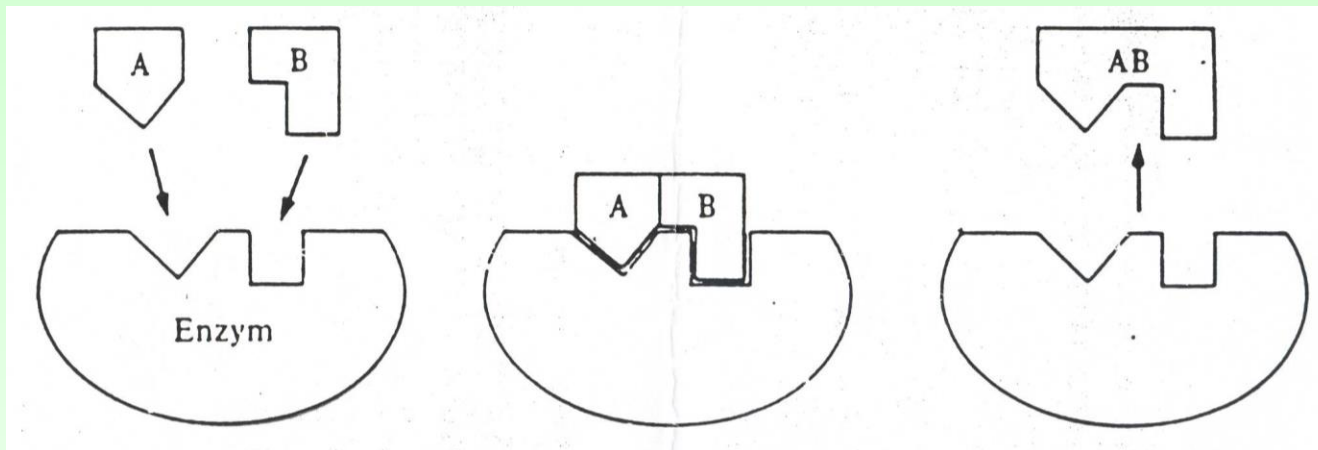
- izoenzymy se liší nábojem (dle zastoupení el. nabitých AMK)
- rychlost pohybu dle velikosti molekuly a náboje





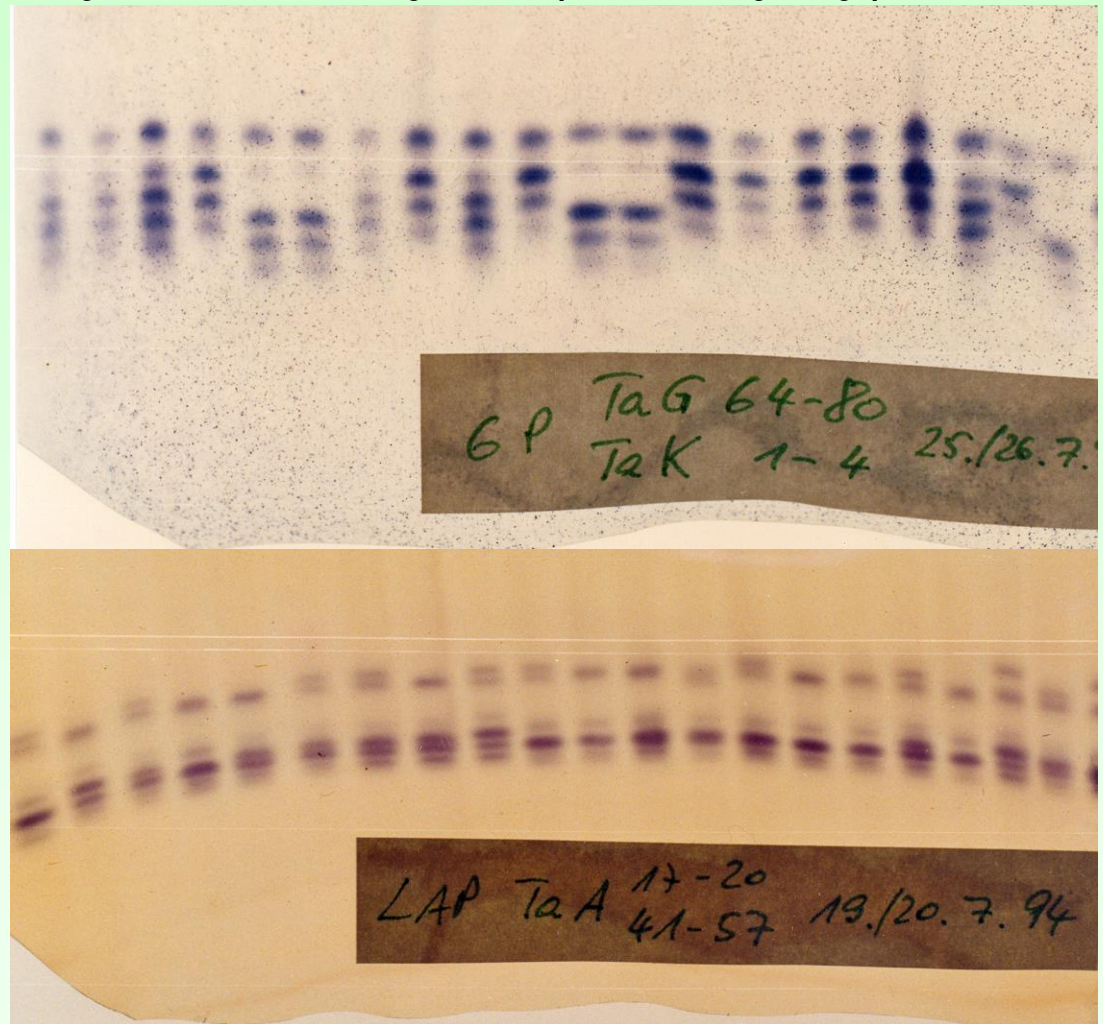
3. vizualizace enzymově-specifickým barvením

- enzymaticky katalyzovaná reakce, při níž vznikají barevné nerozpustné produkty



4. hodnocení zymogramu

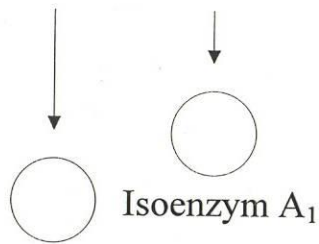
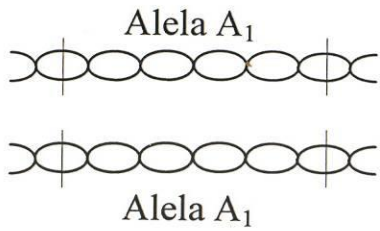
- **zymogram** = výřez gelu s barevnými proužky v různých polohách
- všechny proužky jsou formy téhož enzymu (izoenzymy)



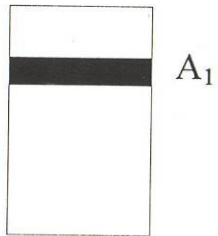
Individuum1

homozygot

$A_1 A_1$



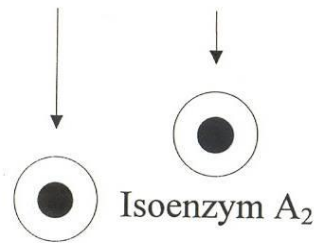
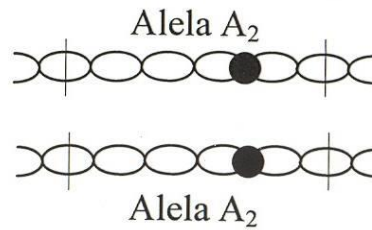
Isoenzym A₁



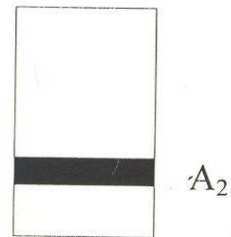
Individuum2

homozygot

$A_2 A_2$



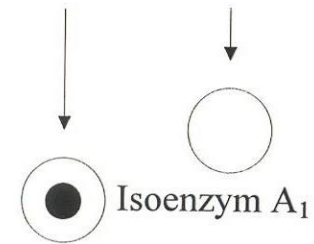
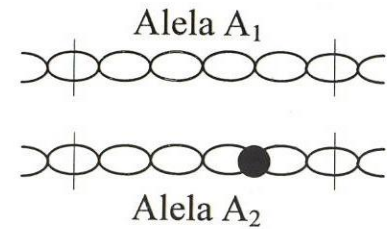
Isoenzym A₂



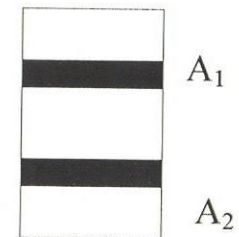
Individuum3

heterozygot





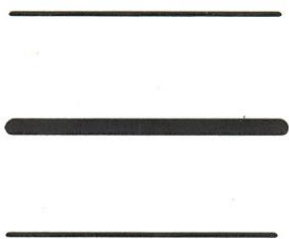


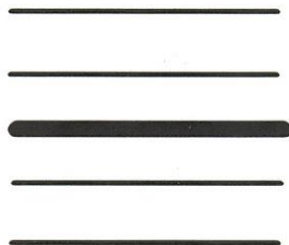

$A_1 A_2$



Isoenzym A₂



- počet proužků rozdílný pro enzymy monomerní a multimerní

	Homozygot	Heterozygot	Homozygot
Monomerní enzym			
Dimerní enzym			
Tetramerní enzym			

- **izoenzymy jsou označovány zkratkou enzymu, např.**

LAP – leucinamino peptidáza

IDH – izocitrát dehydrogenáza

PEPCA- fosfoenolpyruvát karboxyláza....

**a pořadovým číslem podle rychlosti pohybu v gelu
(nejrychlejší mají nejmenší číslo LAP1, LAP2...)**

Výhody

- jsou stejné u všech druhů
- vyskytují se ve všech tkáních a
- neprojevuje se vliv prostředí
- analýza snadná, nenáročná, rychlá
- jednoduché zařízení
- stačí malé vzorky pletiv
- možné sériové analýzy

Nevýhody

- separační a barvicí techniky jsou k dispozici pro relativně omezený počet enzymových systémů (< 40)
- je potřeba ověřovat mendelistickou dědičnost
- většinou neznáme vztah mezi izoenzymy a hospodářskými znaky

Využití:

a) studium populačních charakteristik

- genetické inventury (struktura populace)
- potvrzení autochtonnosti (JD, SM)
- tok genů, introgrese
- vliv pěstebních opatření na genetickou strukturu
- důsledky selekce způsobené imisemi...

b) studium reprodukčních charakteristik

- systém sprášení v SS

c) identifikace rostlinného materiálu

- identifikace klonů
- rozlišení blízce příbuzných druhů a hybridů
- potvrzení autenticity kontrol. křížení

d) studium dědičnosti a vazeb lokusů

3. Molekulární markery

3.1 DNA - markery

- analyzujeme přímo genetický materiál (DNA)**
- jsou stejné ve všech vývojových stádiích a pletivech**
- nejsou ovlivněny prostředím**
- lze studovat kteroukoliv část genomu**
- souborný pojem, zahrnující rozdílné metody a typy markerů**

- 2 hlavní techniky

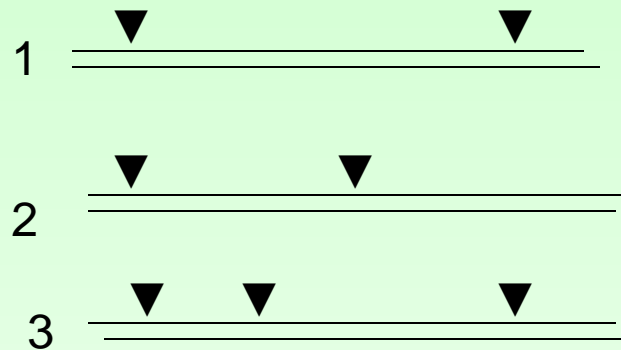
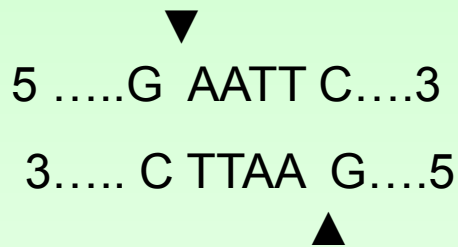
a) zjišťování polymorfismu délky restrikčních fragmentů

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

b) techniky založené na PCR- polymerázové řetězové reakci

a) Zjišťování polymorfismu délky restričních fragmentů (metoda RFLP)

- využívá restričních endonukeláz, tzn. enzymů, které štěpí DNA v tzv. palindromových sekvencích (místech se zrcadlovou symetrií)



EcoRI – endonukleáza získaná z *Escherichia coli*

- počet a délka fragmentů závisí od počtu a rozdělení restričních míst
- délka fragmentů se měří počtem párů bází (bp)

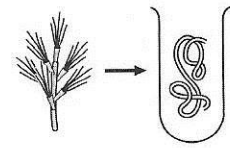
Restriktáza	Štěpené místo
<i>AluI</i>	5' -- AG CT -- 3'
	3' -- TC GA -- 5'
<i>HhaI</i>	5' -- G CG C -- 3'
	3' -- C GC G -- 5'
<i>HaeIII</i>	5' -- GG CC -- 3'
	3' -- CC GG -- 5'
<i>EcoRI</i>	5' -- G AATT C -- 3'
	3' -- C TTAA G -- 5'
<i>BamHI</i>	5' -- G GATC C -- 3'
	3' -- C CTAG G -- 5'
<i>XhoI</i>	5' -- C TCGA G -- 3'
	3' -- G AGCT C -- 5'

Tab. 3.4: Restriční enzymy štěpí molekuly DNA na určitých specifických místech krátkých nukleotidových sekvencí (jsou uvedeny čtyř- a šestinukleotidové sekvence).

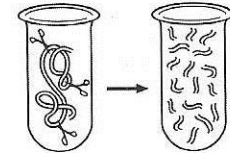
Postup:

- izolace DNA
- štěpení restriční endonukleázou
- vznik fragmentů DNA
- elektroforéza
- přenos na nylonovou membránu
- podélné rozštěpení DNA
- hybridizace se značenou sondou
- vizualizace radiografií

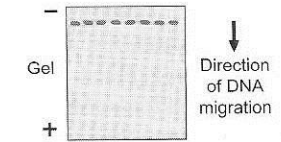
STEP 1
DNA isolation



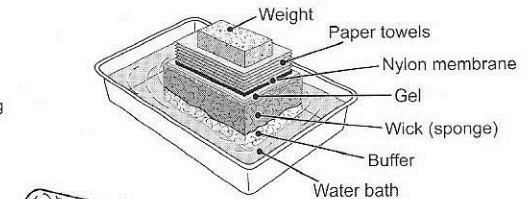
STEP 2
Restriction enzyme
digestion of
genomic DNA



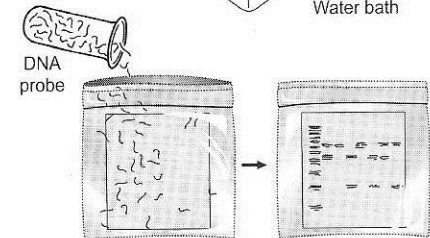
STEP 3
Electrophoresis
of DNA samples



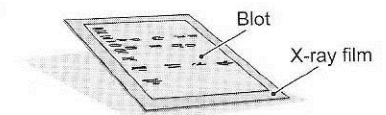
STEP 4
Southern blotting



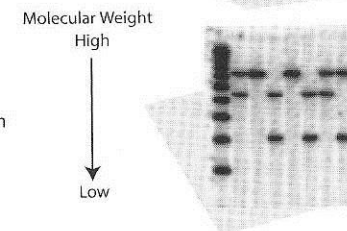
STEP 5
Probing of
Southern blot



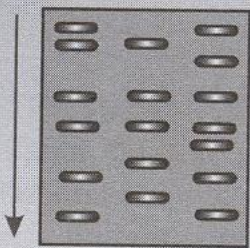
STEP 6
Audiography



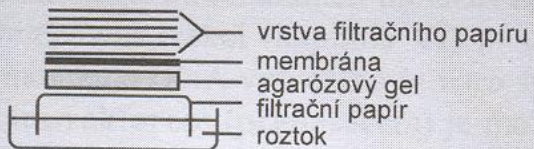
STEP 7
Autoradiogram
with RFLPs



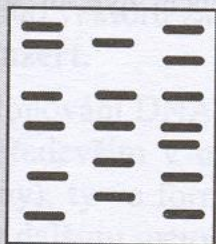
Restrikční fragmenty DNA separované elektroforézou.



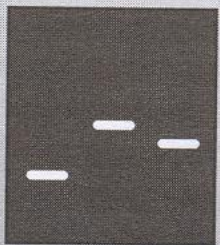
Přenos na membránu.



Fragmenty DNA přenesené na membránu.



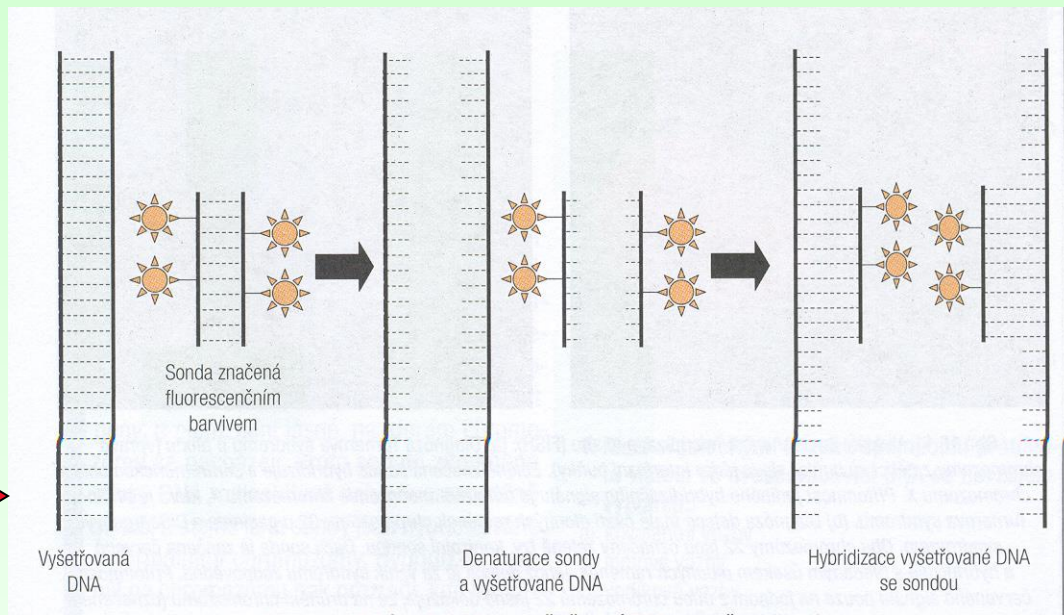
Hybridizace se sondou (zde značenou radioaktivně).

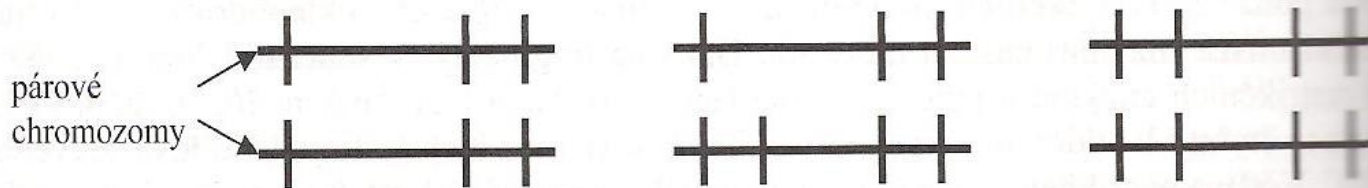


autoradiogram

Fragmenty, k nimž sonda hybridizovala.

Schéma metody RFLP





genotyp

AA

Aa

aa



gely po elektroforéze s pruhy DNA po restriční štěpení

Výhody

- lze použít u materiálu v každém stáří (pokud lze získat vhodné množství DNA)
- neprojevuje se vliv vývoje
- neomezený počet kombinací endonukleáz a vzorků
- lze vzorkovat celý genom

Nevýhody

- technická složitost
- vysoké pořizovací náklady na vybavení laboratoře
- časové nároky
- použití radioaktivních vzorků - bezpečnost, kvalifikovaný personál
- vyžaduje značné množství čisté DNA

b) **Techniky založené na PCR**

(PCR = polymerázová řetězová reakce)

izolace DNA

amplifikace (zmnožení) DNA v cyklu

(nutno dodat primer

deoxynukleotidfosfáty (dNTP)

DNA-polymerázu)

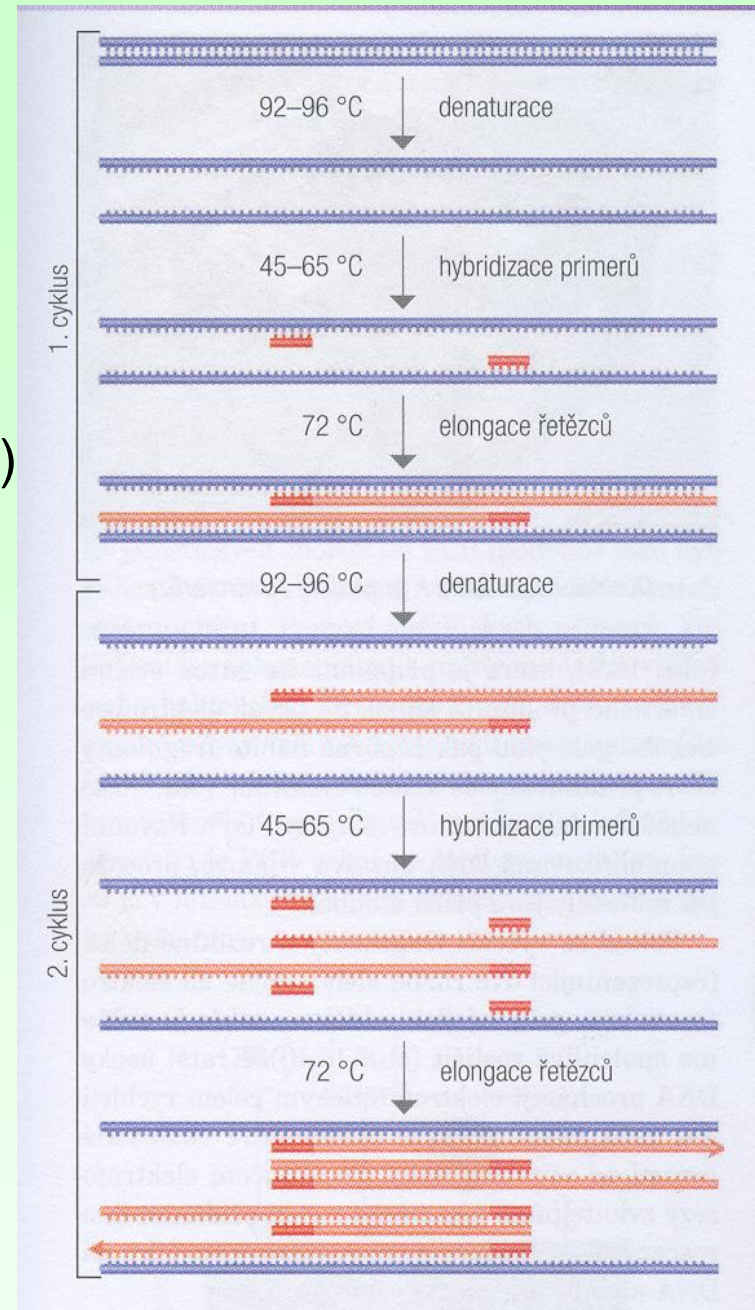


3 kroky cyklu

a) denaturace DNA (92-96 °C)

b) hybridizace primerů (45 – 65 °C)

c) elongace nukleotidových řetězců (72°C)



20 – 40 cyklů

- elektroforéza segmentů

- zviditelnění etidium bromidem

DNA markery využívající PCR

RAPD- Random Amplified Polymorphic DNA

= náhodně amplifikovaná polymorfní DNA

AFLP – Amplified Fragment Length Polymorfism

= polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů DNA

VNTR – Variable Number of Tandem Repeats

= minisatelite DNA

SSR – Simple Sequence Repeats (opakování sekvenci DNA)

= mikrosatelite DNA

Využití genetických markerů

1. taxonomie
2. studium geografické proměnlivosti
všechny typy genetických markerů
3. studium genetické struktury přirozených a šlechtitelských populací a procesů na populační úrovni
izoenzymy, DNA - markery
4. identifikace a verifikace šlechtitelského materiálu (klonů a jejich směsí, hybridů)
izoenzymy, DNA - markery
5. selekce - **na odolnost** (markery rezistence)
fenoly, terpeny, DNA markery genů se vztahem k odolnosti
- **na růst (produkci)**
DNA markery QTL – lokusů kvantitativních znaků
7. studium genomu, lokalizace a funkce genů = genomika
DNA – markery
8. prokazování identity a původu reprodukčního materiálu
izoenzymy, DNA - markery