



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR  
InoBio – CZ.1.07/2.2.00/28.0018**

# **Genetické markery**

# **Genetické markery**

**= znaky, které informují o genotypu**

**- vhodné jsou znaky, které:**

a) nejsou ovlivňovány prostředím

b) mají jednoduchou genetickou kontrolu  
(nejlépe alelami jednoho lokusu = genové markery)

c) dědí se s neúplnou dominancí nebo jsou kodominantní

## 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)

## **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**

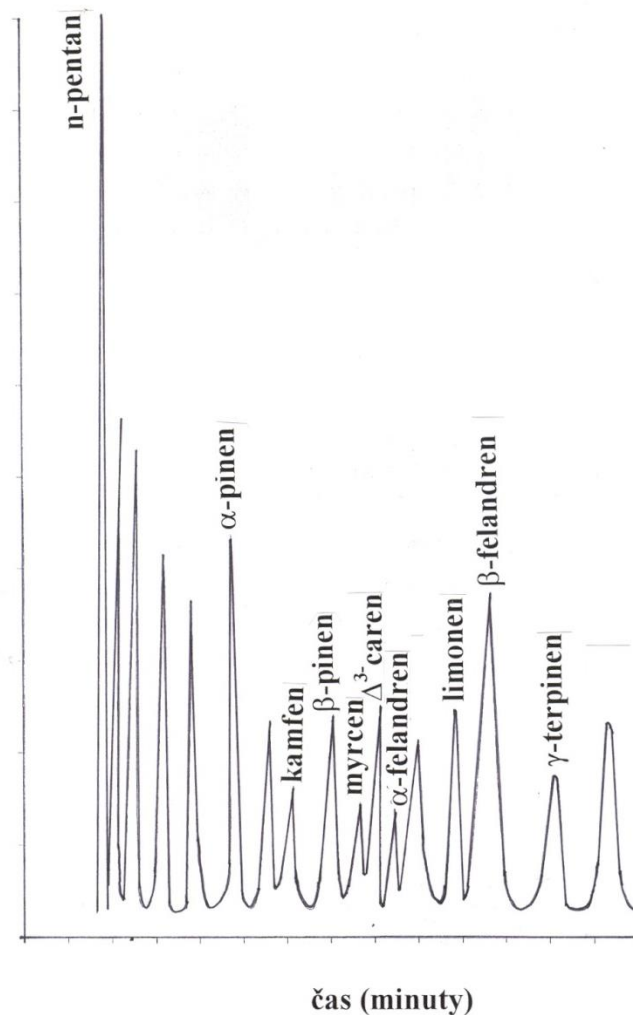
## 2.2 Terpeny

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



## Princip analýzy:

-zjišťování  
kvantity a kvality  
terpenů kapilární  
plynovou  
chromatografií



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

## **Výhody:**

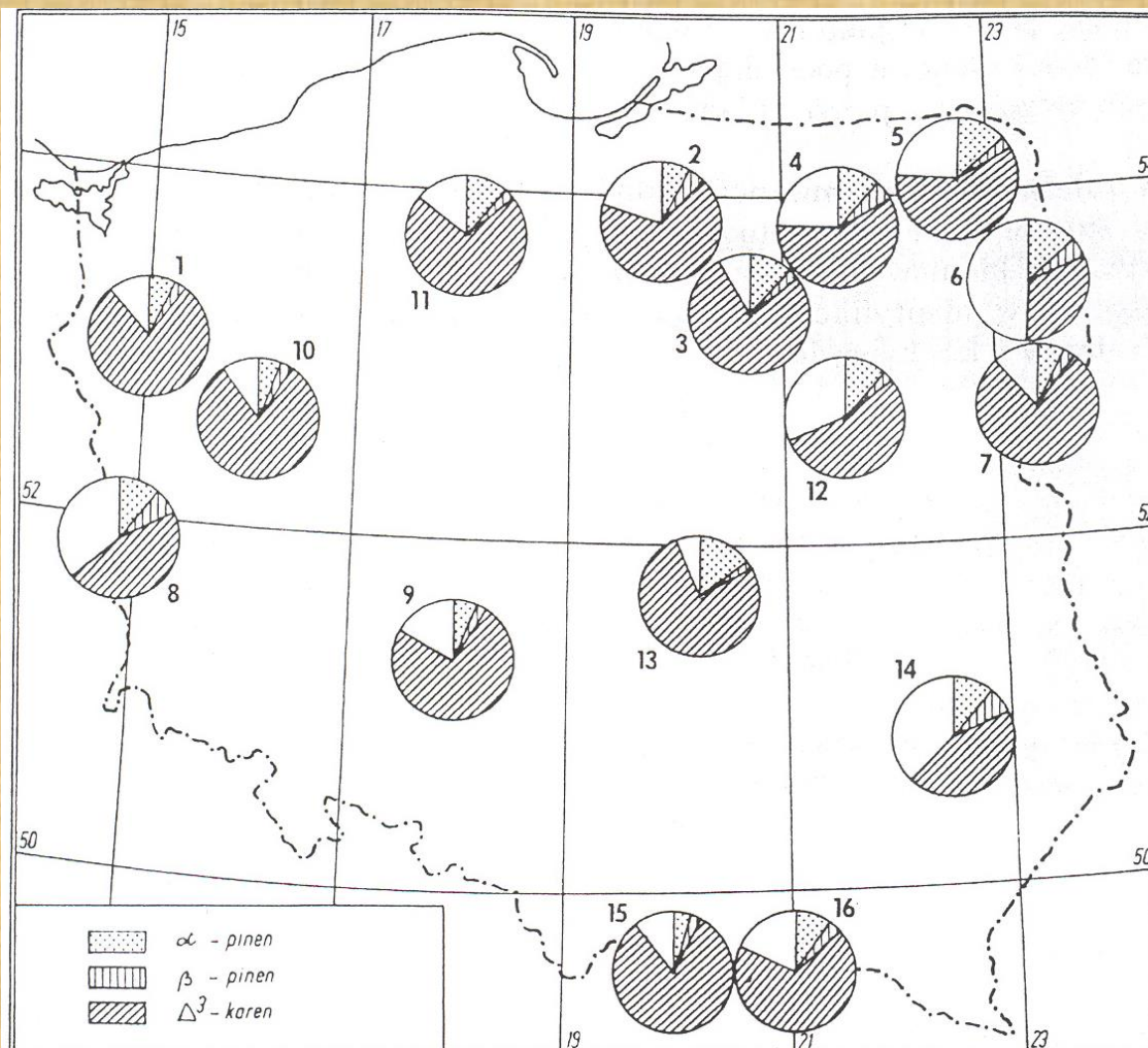
- **snadná a rychlá analýza** (není třeba extrakce, jen u jehlic)
- **stálé** (po extrakci se nemění)
- **negenetická variabilita existuje, ale dá se standardizovat**

## **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**
- soubor enzymů stálý, prostředím ovlivňována jen kvantita**
- enzym primární produkt transkripce a translace**

## DNA

gen

úsek DNA



**genová mutace**

**alela**

variaanta  
genu

## proteiny

enzym

protein s  
katalytickou funkcí



**izoenzym**

molekulární forma  
enzymu

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

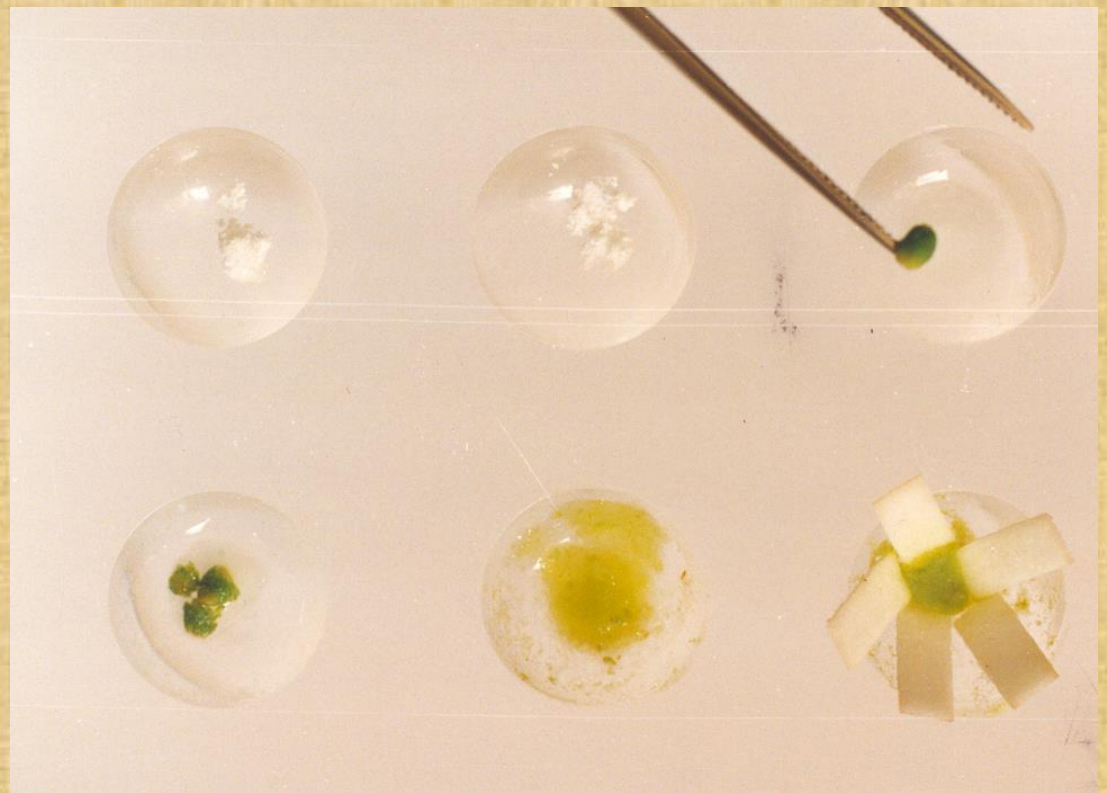
**- vznikají genovými mutacemi (liší se v jedné nebo více AMK)**

- **katalyzují stejnou reakci, liší se v elektrickém náboji**
- **méně ovlivňovány prostředím než fenoly a terpeny**
- **při analýze sledujeme přímo projevy genů**

# Postup izoenzymové analýzy

## 1. izolace izoenzymu z pletiv

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



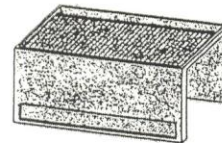
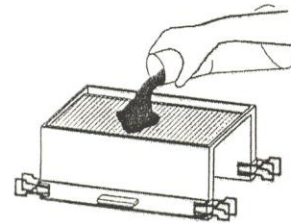
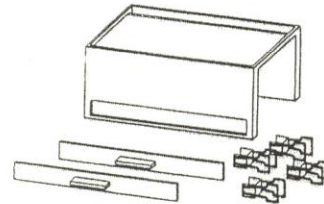
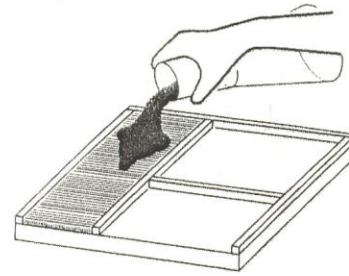


## 2. Elektroforetická separace

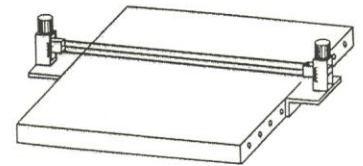
### a) medium pro separaci

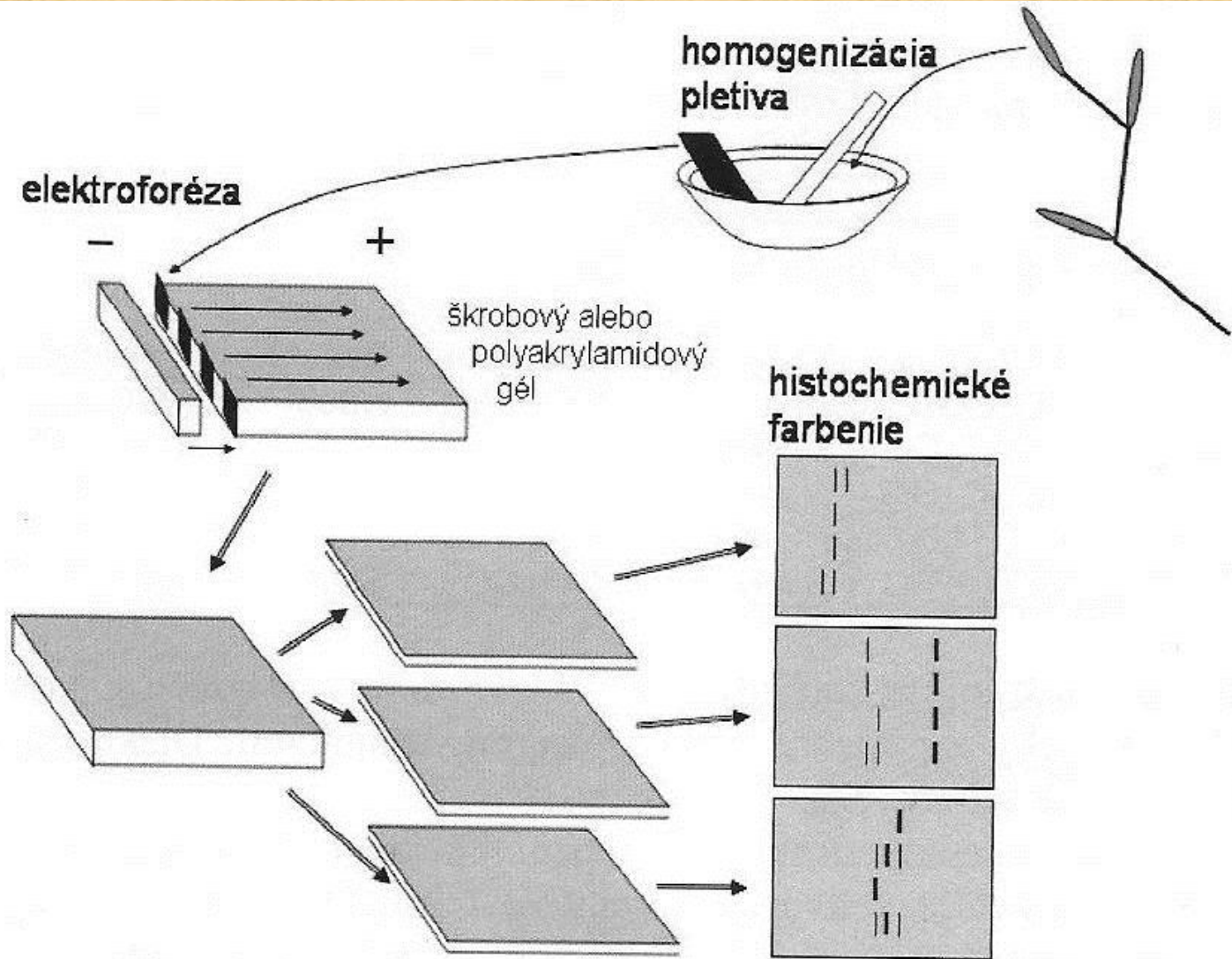
- škrobový nebo polyakrylamidový gel (polymerní řetězcové molekuly)
- působí jako molekulární síto

Příprava škrobového gelu pro izoenzymovou analýzu



Pomůcka pro horizontální řezání gelu

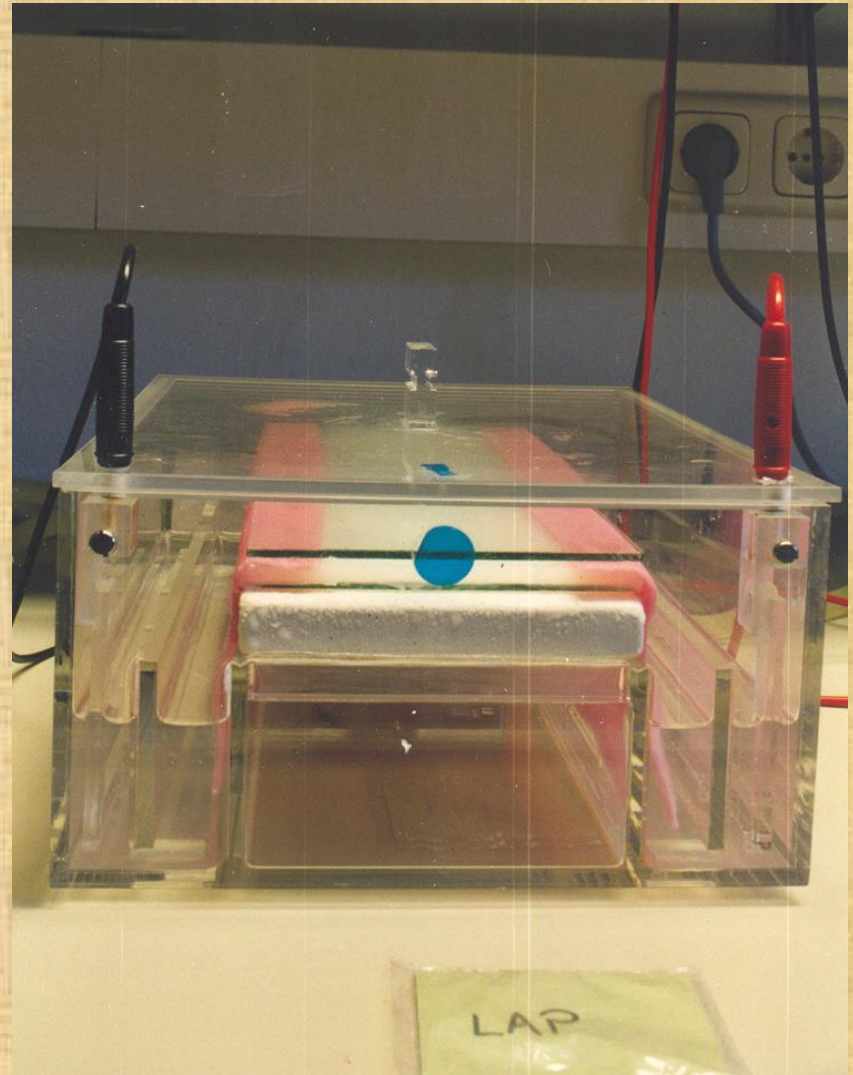


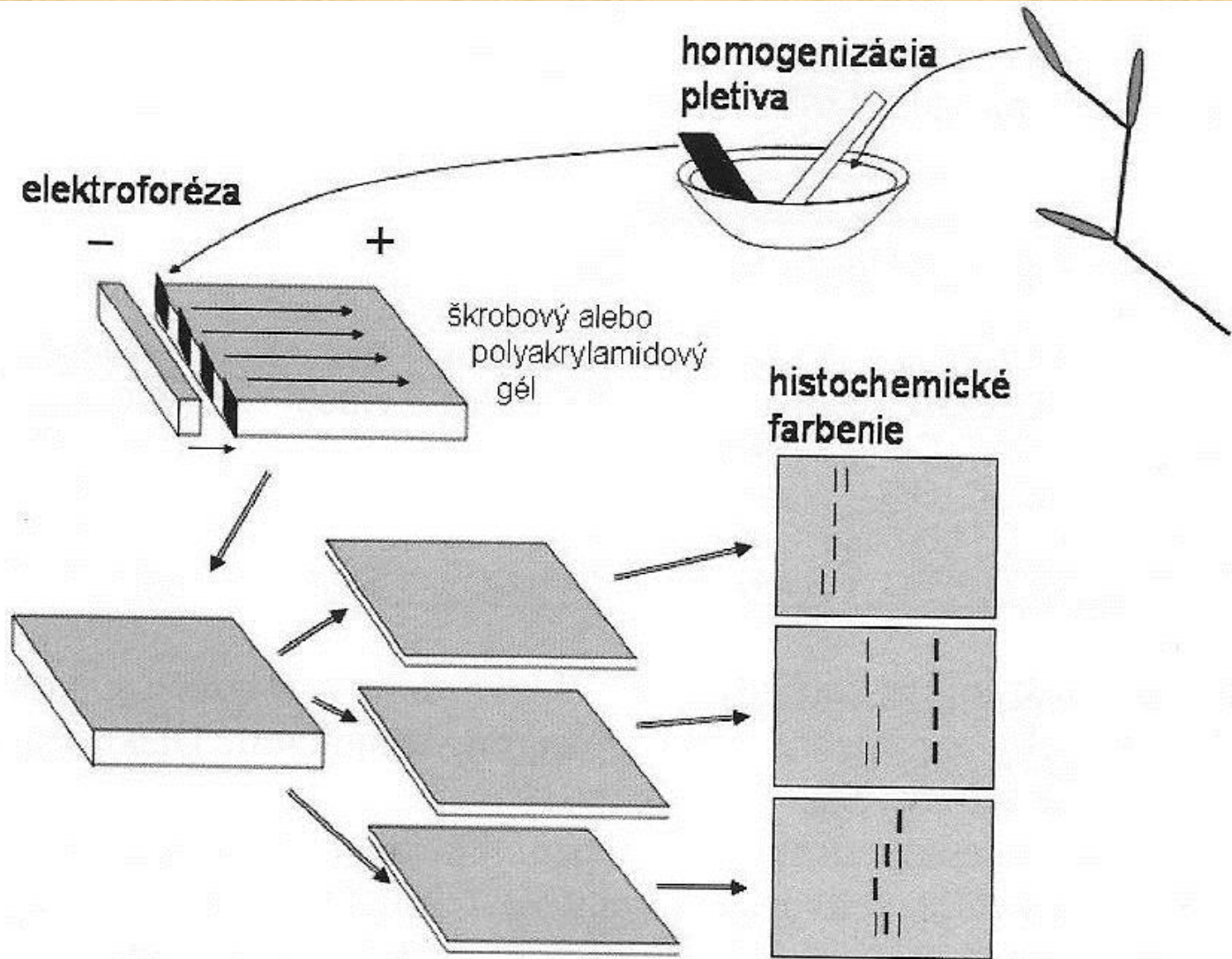


## b) elektroforéza

Princip:

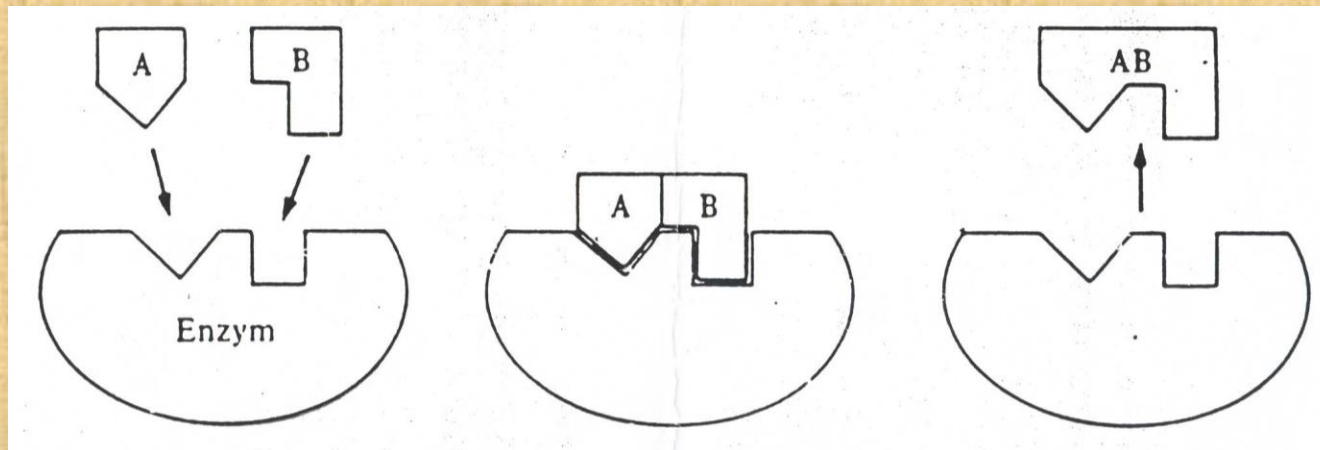
- izoenzymy se liší nábojem (dle zastoupení el. nabitých AMK)
- rychlost pohybu dle velikosti molekuly a náboje





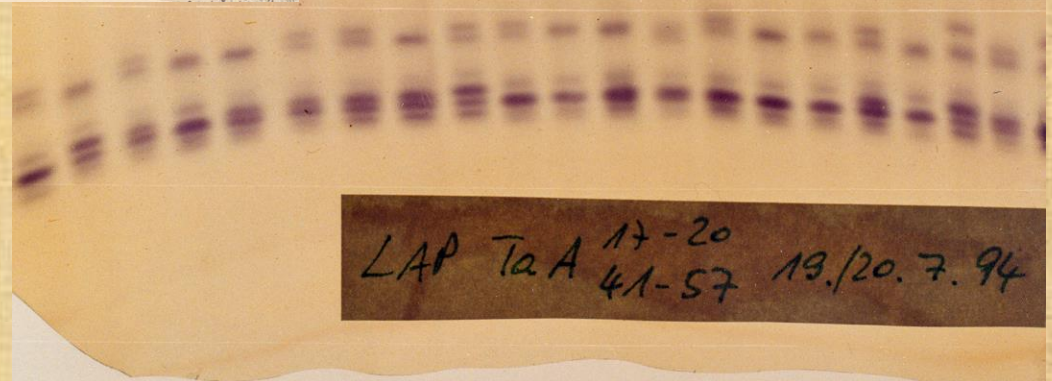
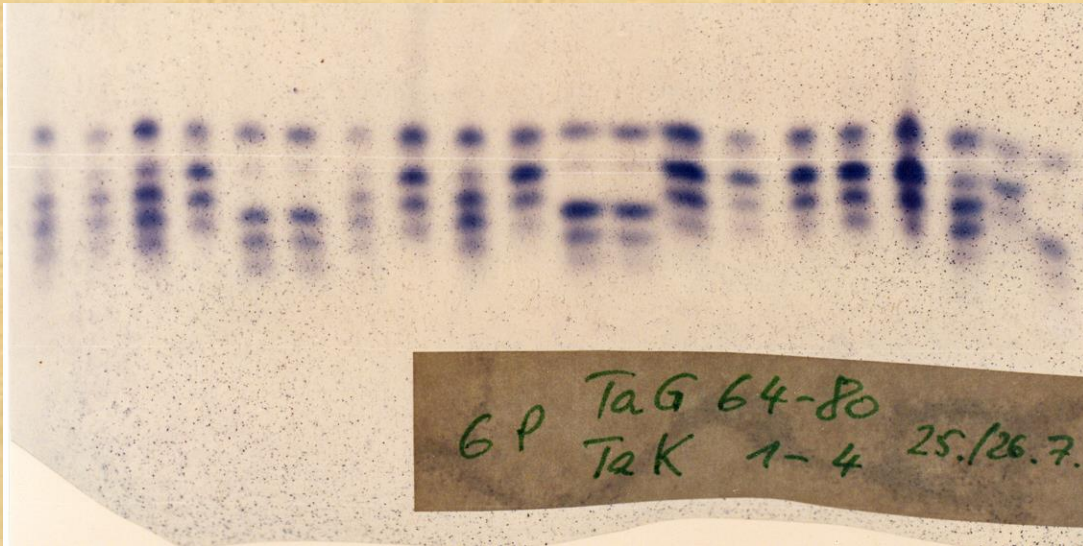
### 3. vizualizace enzymově-specifickým barvením

- enzymaticky katalyzovaná reakce, při níž vznikají barevné nerozpustné produkty



## 4. hodnocení zymogramu

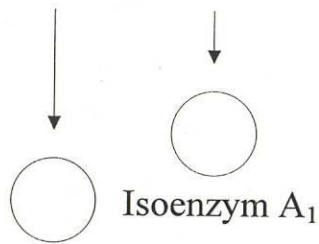
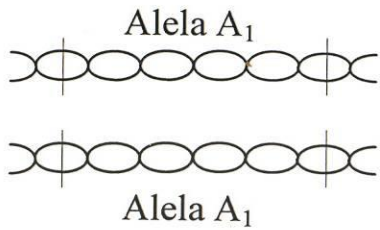
- **zymogram** = výřez gelu s barevnými proužky v různých polohách
- všechny proužky jsou formy téhož enzymu (izoenzymy)



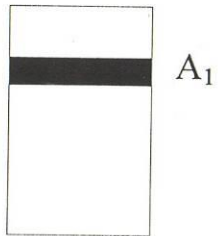
### Individuum1

homozygot

$A_1 A_1$



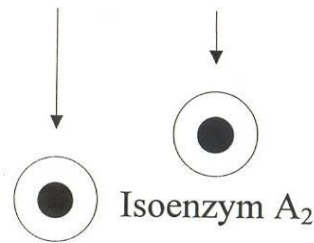
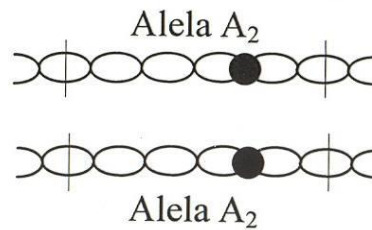
Isoenzym  $A_1$



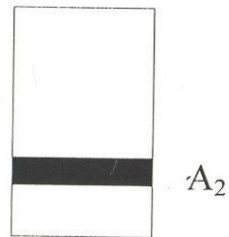
### Individuum2

homozygot

$A_2 A_2$



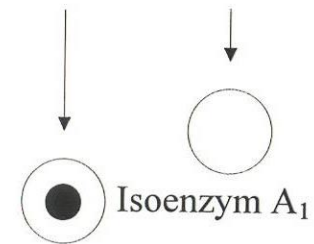
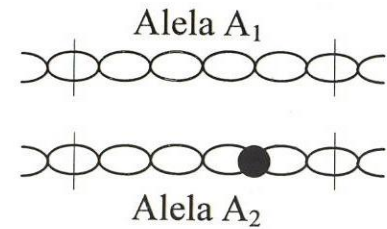
Isoenzym  $A_2$



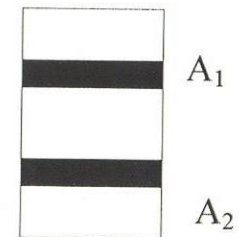
### Individuum3

heterozygot









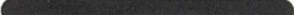







$A_1 A_2$



Isoenzym  $A_2$



- 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**

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

## **Nevýhody**

- pro málo enzym. systémů (20 - 40) jsou separační a barvicí techniky → lze analyzovat jen malý počet genů
- 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



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'

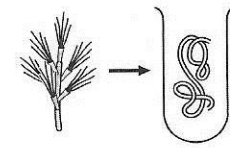
Tab. 3.4: Restriční enzymy štěpí molekuly DNA na určitých specifických místech krátkých nukleotidových sekvencí (jsou uvedeny čtyř- a šestinukleotidové sekvence).



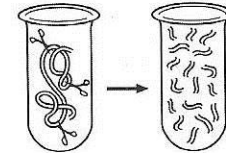
# Postup:

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

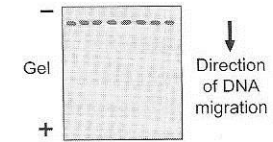
STEP 1  
DNA isolation



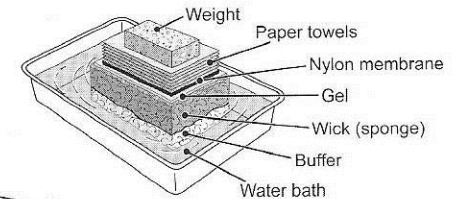
STEP 2  
Restriction enzyme  
digestion of  
genomic DNA



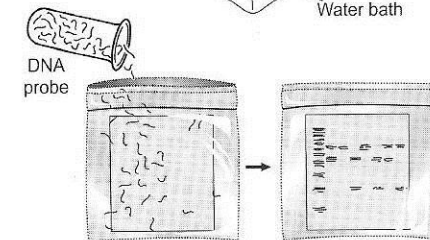
STEP 3  
Electrophoresis  
of DNA samples



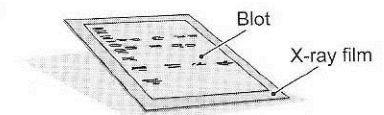
STEP 4  
Southern blotting



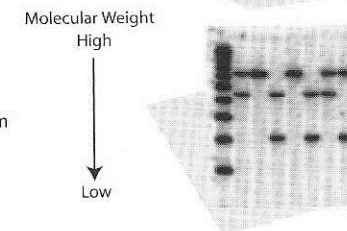
STEP 5  
Probing of  
Southern blot



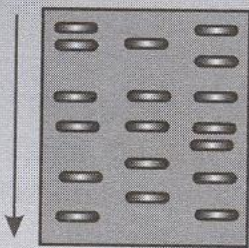
STEP 6  
Autoradiography



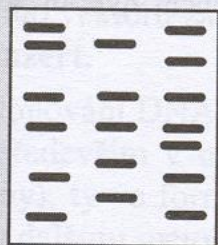
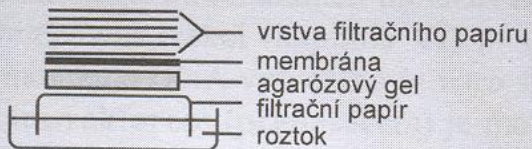
STEP 7  
Autoradiogram  
with RFLPs



Restrikční fragmenty DNA separované elektroforézou.



Přenos na membránu.



Fragmenty DNA přenesené na membránu.

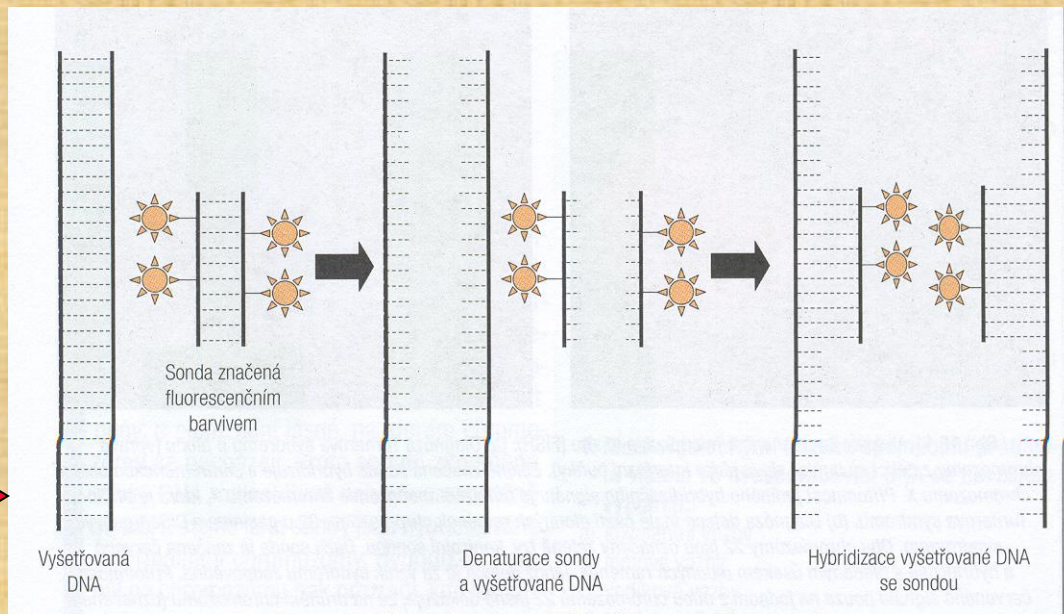
Hybridizace se sondou (zde značenou radioaktivně).

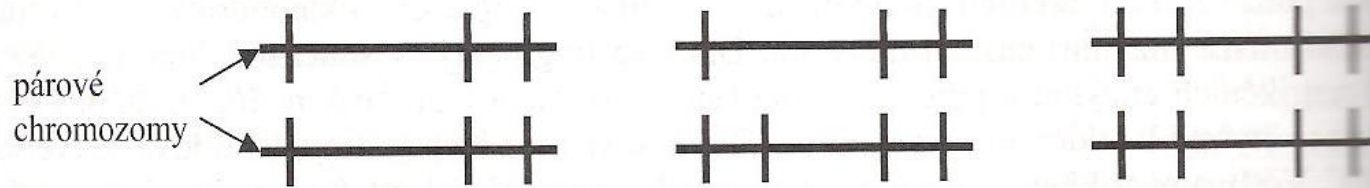


autoradiogram

Fragmenty, k nimž sonda hybridizovala.

## Schéma metody RFLP



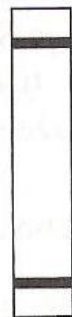


genotyp

*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)

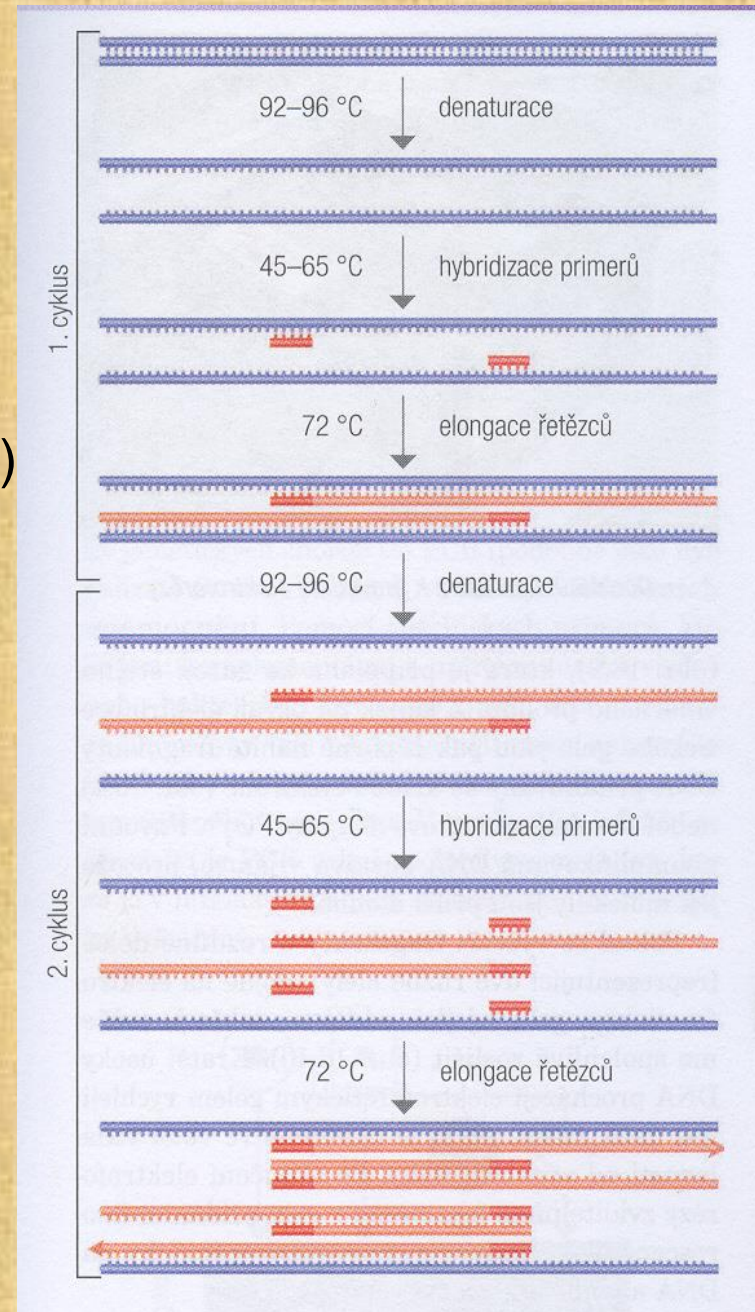


### 3 kroky cyklu

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 polymorphism**

= polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů

**VNTR – variable number of tandem repeats**

= minisatelite

**SSR – simple sequence repeats**

= mikrosatelite

## Využití genetických markerů

### 1. taxonomie

*fenoly, terpeny*

### 2. studium geografické proměnlivosti

*terpeny*

### 3. studium genetické struktury přirozených a šlechtitelských populací a procesů na populační úrovni

*terpeny, izoenzymy*

### 4. identifikace a verifikace šlechtitelského materiálu (klonů a jejich směsí, hybridů)

*izoenzymy, DNA - markery*

### 5. selekce na odolnost (markery rezistence)

*fenoly, terpeny*

### 6. studium genetického materiálu

*DNA - markery*

# Prokazování identity a původu reprodukčního materiálu pomocí genet. markerů v les. praxi

## Podmínky použitelnosti markeru:

ontogenetická stabilita

výskyt ve všech ontogen. stádiích



**izoenzymy, DNA-markery**

# Charakter reprodukční materiálu lesních dřevin

- **klonový (TP, VR, SM)**

- **generativní**

  - z porostu**

    - (sta až tisíce genotypů, každý 1x)

  - z klonového semenného sadu**

    - (několik desítek různých genotypů, každý zastoupen několika jedinci)

# Princip prokazování identity a původu

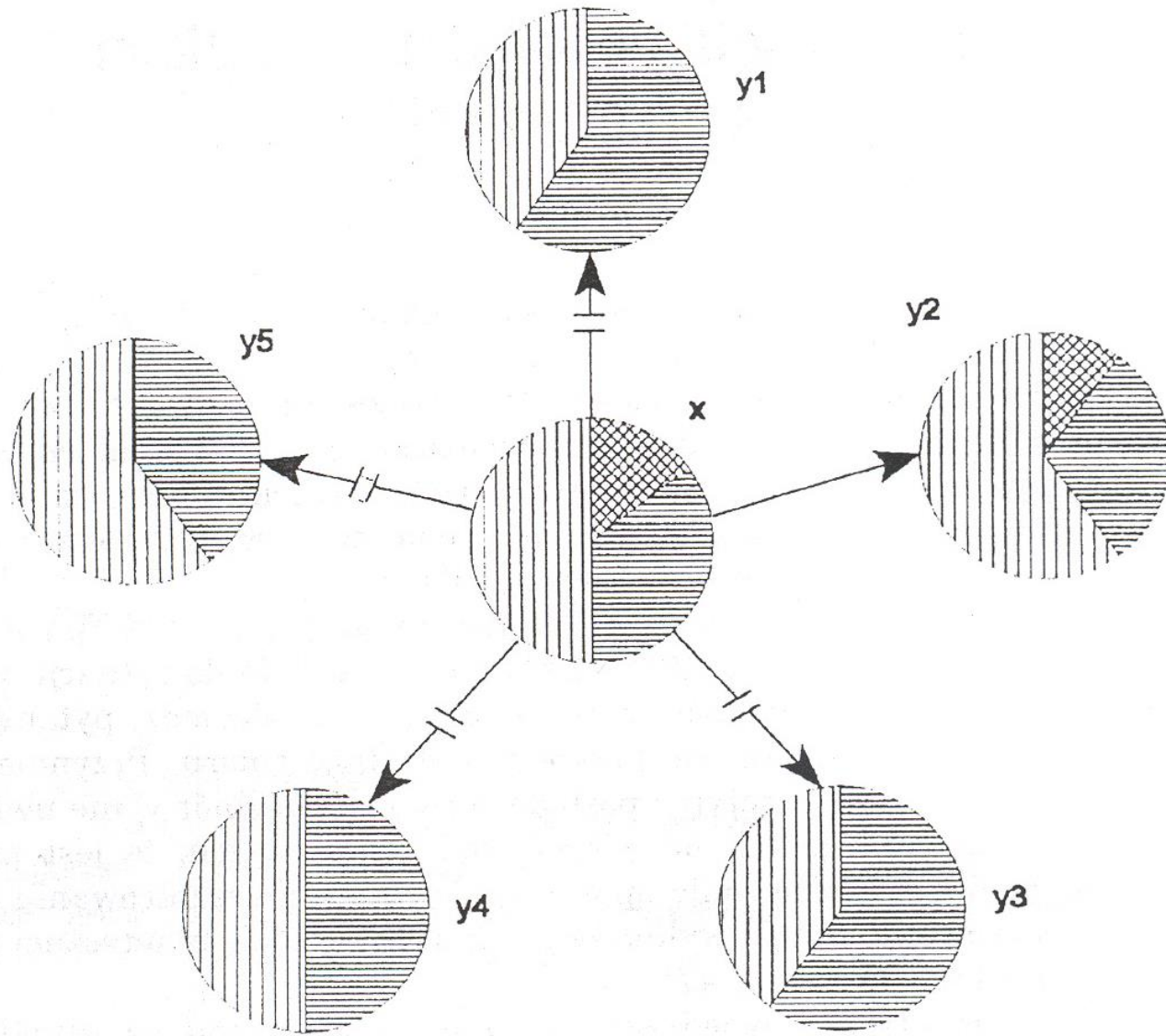
## 🌐 klonového mat.

- všichni jedinci stejný genotyp  $\Rightarrow$  srovnat zymogramy

## 🌐 generativní materiál

- srovnání genetické struktury zdrojového porostu nebo sadu a potomstva (osivo, sazenice) na základě

**a) přítomnosti/absence genů/alel ve zdrojovém porostu a potomstvu**



***problémy:***

- ***pokud se alela nalezená v potomstvu nevyskytuje ve výběrovém souboru mateřské populace, neznamená to, že se v ní nemůže vyskytovat***
- ***velikost souboru ovlivňuje spolehlivost závěru***

## **b) srovnání frekvence alel ve zdrojovém porostu a potomstvu**

- ***problém, nakořik potomstvo reprezentuje mateř. porost (sběr jen z některých stromů, ztráty při zpracování a pěstování...)***



**původ nelze jednoznačně potvrdit**



