



Molekulární metody hodnocení genotypů – Marker Assisted Breeding

14.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Molekulární metody hodnocení genotypů

14.1. Izolace DNA

V aplikacích zaměřených na analýzu rostlinného genomu je samozřejmým předpokladem mít dostatečné množství izolované DNA. Požadovaný stupeň čistoty a kvalita izolované DNA pak závisí na metodě, jejíž použití se předpokládá. Např. v případě AFLP, nebo starší metody RFLP to hlavně znamená čistotu umožňující štěpení DNA restričními endonukleázami a také počáteční vysokomolekularitu izolované DNA. Pro aplikace zahrnující polymerázovou řetězovou reakci (dále jen PCR) nesmí izolát obsahovat kontaminanty, které interferují s některou ze složek PCR reakce. Nároky na vysokomolekularitu zde již nejsou tak vysoké. Celkově by zvolený postup izolace DNA měl být rychlý, jednoduchý a levný.

DNA je možné izolovat klasickými metodami založenými na bázi svépomocí připravených roztoků, nebo za použití komerčních kitů, kterých je na trhu nabízena celá řada. Pracují na obecně známých principech, kdy jednotlivé reagenty jsou dodávány ve formě již hotových roztoků. Součástí kitu bývají také potřebné laboratorní plasty, často kolony pro zachycení DNA. Použití kitů je pohodlné, snadné a jejich značnou výhodou je rychlost izolace DNA. K nevýhodám lze přičíst vyšší cenu a u některých kitů také relativně malé množství získané DNA, které nemusí být pro některé aplikace dostatečné.

Obecný postup izolace DNA

Izolace DNA ať už klasickými postupy, nebo při použití komerčních kitů, zahrnuje několik základních kroků. V některých protokolech mohou být určité kroky sloučeny, nebo zcela vynechány – vždy záleží na požadované kvalitě a kvantitě DNA. Každá izolace začíná narušením buněk pletiva, z něhož je DNA izolována. Většinou následuje odstranění kontaminujících látek, z nichž nejsledovanější jsou proteiny, RNA, polysacharidy a polyfenoly. V závěru je DNA oddělena z roztoku srážením alkoholem, nebo absorpcí na pevné fázi, přečištěna a rozpuštěna (nejčastěji v TE pufru).

Homogenizace materiálu a lýza buněk

Základním cílem tohoto kroku je narušení buněk a vylití buněčného obsahu do roztoku. Použitá metoda homogenizace se řídí typem pletiva, které je třeba homogenizovat, plánovanou metodou izolace DNA a v neposlední řadě technickým vybavením laboratoře. Menší počet vzorků je možné rozdrtit v třecí misce. Aby nedocházelo k oxidaci, provádí se homogenizace buď za nízkých teplot (vymražení misek v hlubokomrazícím boxu, nebo použití tekutého dusíku), nebo v třecím pufru. Pro vysoké počty vzorků jsou na trhu dostupné různé homogenizéry, případně automaty, které provádějí celý proces izolace za minimální potřeby lidské síly. Při izolaci DNA



např. z bakteriálních kultur často postačí pouhé povaření bakteriální suspenze ve vodném roztoku.

Homogenizované pletivo je obvykle převedeno do roztoku, který obsahuje detergenty, případně enzymy, jejichž úkolem je lýza dosud nenarušených buněk. Pro zlepšení efektivity tohoto kroku je obvykle vzorek inkubován po dobu několika minut při teplotách 65 – 68°C

Odstranění kontaminujících látek

RNA

Pro odstranění nežádoucí RNA z izolátů se v běžných protokolech nejčastěji využívá digesce ribonukleázou, přičemž moment zařazení tohoto kroku do postupu izolace se může u jednotlivých protokolů lišit.

Proteiny

Přítomnost proteinů je v roztoku DNA určeném pro analýzy molekulárně genetickými metodami nežádoucí, mj. protože precipitáty izolované DNA se při jejich kontaminaci spolusráženými proteiny zpětně rozpouštějí poměrně špatně. Vysoký obsah proteinů v konečném izolátu DNA může také negativně ovlivňovat průběh PCR reakce.

Tento krok ve standardních protokolech nejčastěji následuje po úpravě vzorku RNázou, čímž je současně z roztoku odstraněn tento použitý enzym.

Proteiny mohou být odstraněny použitím dodecylsulfátu draselného (součást roztoku používaného při lýzi), který tvoří s proteiny nerozpustné komplexy. Tento způsob ale může být nedostatečný pro některá pletiva bohatá na proteiny.

K razantním metodám odstranění bílkovin patří jejich denaturace pomocí organických rozpouštědel (nejčastěji směs fenol - chloroform - isoamylalkohol v poměru 25:24:1). Denaturované proteiny pak můžeme pozorovat jako šedou suspenzní vrstvu v interfázi mezi vodnou a organickou fází. Ve vodné fázi je rozpuštěna DNA, která je v dalším kroku odpipetována. Jelikož fenol i chloroform patří k toxickým látkám, nepatří tento postup odstraňování bílkovin v současné době k běžně používaným.

Obr. č. Chloroform-isoamylalkoholová extrakce



Polysacharidy

Rostlinné buňky jsou většinou na polysacharidy velmi bohaté. Podílejí se totiž na výstavbě buněčných stěn, mnoho rostlinných buněk pak obsahuje přímo zrnka škrobu. Navíc některé rostliny akumulují i tzv. gelující polysacharidy, což platí zvláště pro rostlinná pletiva vystavená enviromentálním stresům. Stejně jako u proteinů je hlavním cílem zabránit spolusrázení polysacharidů s DNA (to může opět znamenat špatné zpětné rozpouštění takovýchto sraženin). Při vyšších koncentracích mohou být také příčinou gelovitého charakteru izolátu. Navíc přítomnost polysacharidů může bránit účinku enzymů působících na DNA a tím inhibovat takové procesy jako je štěpení restrikcími enzymy nebo PCR. Nevýhodou také je, že působí jako interferenty při spektrofotometrické kvantifikaci obsahu nukleových kyselin v izolátech.

Někteří autoři pro jejich odstraňování doporučují použití hydrolytických enzymů nebo kolon s iontoměničemi. Častěji se ale spolusrázení DNA a polysacharidů zabraňuje vytvořením takového prostředí, ve kterém je jedna složka udržována jako roztok, zatímco druhá se v daném prostředí sráží. Jako vhodný reagent je pro tento účel v pracovních protokolech izolace DNA využíván např. CTAB (cetyltrimetylamonium bromid), kdy jsou při precipitaci DNA polysacharidy udržovány v roztoku.

Polyfenoly

Mnoho rostlin obsahuje škálu látek fenolického charakteru včetně polyfenolů, které jsou snadno oxidovatelné. V homogenátu, kde došlo k degradaci buněčných stěn, je usnadněno působení příslušných oxidáz a vznikají tak hnědé oxidované polyfenoly, které mají tendenci se spolusrážet s proteiny a nukleovými kyselinami. Pro většinu proteinů to znamená jejich denaturaci a nukleové kyseliny se stávají nerozpustné, popř. velmi špatně rozpustné. Většinou je narušena jejich štěpitelnost restrikcími enzymy i jejich použití jako templátů pro PCR. Nejčastěji je používán přídavek polyvinylpyrrolidinu (PVP) do extrakčního pufru, který slouží jako absorbent

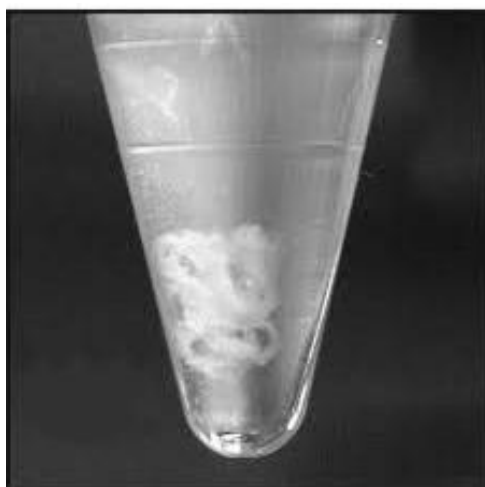


polyfenolů, nebo přídavek reagentů s SH skupinou, které zajišťují antioxidační vlastnosti prostředí (cystein, β -merkaptoetanol).

Srážení DNA

Jakmile je z roztoku odstraněna většina kontaminantů, provádí se ještě dočištění DNA. U klasických postupů je většinou DNA vysrážena vysoce koncentrovaným alkoholem (90% etanol, isopropanol), sraženina je pomocí centrifugace usazena na dno zkumavky a zbývající roztok je odstraněn. Sraženinu je možné ještě několikrát promýt alkoholem a poté vysušit a znovu rozpustit v deionizované vodě, nebo lépe v TE pufru.

Obr.č. – DNA vysrážená alkoholem



Extrakce na pevné fázi

DNA v přítomnosti chaotropních solí adhezuje na silikátový povrch. Této její vlastnosti lze dobře využít během izolace. DNA je navázána na silikagelu, zatímco kontaminující látky zůstávají v roztoku a mohou být snadno odděleny centrifugací. Přechištěnou DNA na povrchu částic lze pak snadno uvolnit přidáním vody, nebo vhodného roztoku s nízkou iontovou silou. Silikát může být použit ve formě suspenze, častěji je umístěn ve formě modifikované membrány uprostřed mikrozkušavky (tzv. kolona) – tento přístup využívá řada společností při výrobě kitů pro izolaci DNA.

Využití magnetických částic při izolaci DNA

Samotný magnet DNA neváže, proto se při izolaci využívají kovové částice s upraveným povrchem. Pro izolaci DNA je nejčastěji používán právě silikátový povrch kovových částic (viz předchozí kapitola), ale kovové částice mohou být také pokryty oligo dT konci pro vazbu polyadenilovaných konců RNA, různými protilátkami atd... Magnet je poté používán pro snadné oddělení těchto kovových částic z roztoku. Tento princip často využívají poloautomatické stroje na izolaci DNA.



14.2 Kontrola kvantity a kvality izolované DNA

Znalost množství a kvality vyizolované DNA není nutná pro všechny molekulárně genetické aplikace a proto lze tento krok v některých případech přeskočit. U některých analýz jde však o informaci velmi důležitou a podstatnou pro dobrý výsledek. V takovém případě je lépe použít i více metod ke zjištění koncentrace a výsledky vzájemně porovnat.

Spektrofotometry

Na spektrofotometru je změřena absorbance roztoku při $\lambda = 260$ a 280 nm. Tímto postupem lze získat poměrně přesnou informaci o množství vyizolované DNA, nikoliv však o její kvalitě. Nevýhodou je, že také polysacharidy vykazují absorbanci při podobných vlnových délkách a při jejich nedokonalém odstranění může docházet ke zkreslení výsledků.

Obr.č.: Spektrofotometr Helios



Fluorometry

DNA je obarvena fluorescenčním barvivem a na fluorometru je změřena intenzita signálu. Výhodou je specificita, protože barvivo interkaluje do dvoušroubovice DNA a případné kontaminace izolátu nemají zásadní vliv na naměřenou koncentraci. Tímto postupem ovšem nelze získat informace o kvalitě izolované DNA.

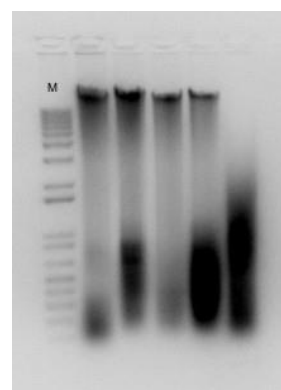
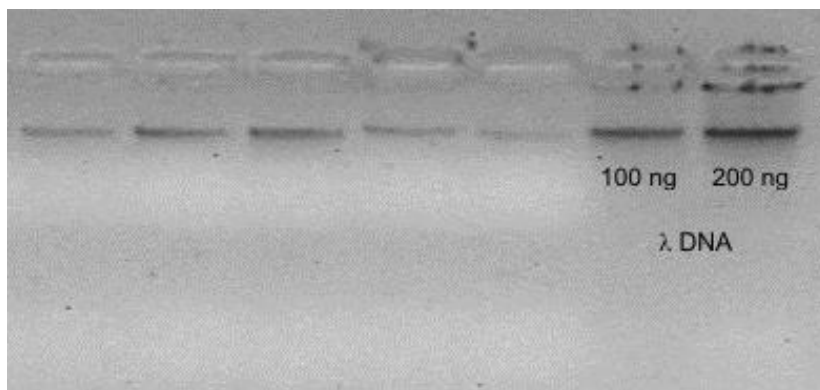
Obr.č.: Fluorometr



Elektroforeticky

Izolovaná DNA je separována v agarózovém gelu a intenzita získaného signálu je porovnána s hmotnostním standardem (často λ DNA). Pro výpočet intenzity jednotlivých signálů lze využít software, nicméně i tak je tento výsledek méně přesný, než výše uvedené metody. Na druhou stranu získáváme informaci o kvalitě izolované NK. Podle formy signálu na gelu je možné poznat, zda je získaná NK vysokomolekulární, nebo již degradovaná. K degradaci DNA může dojít během izolace, ale i před ní. Velmi záleží na materiálu, který byl pro izolaci DNA použit.

Obr.č.: Izolovaná nepoškozená DNA. 10 μ l DNA bylo nadávkováno na 1% agarózový gel Množství DNA lze odhadnout vypočítáním intenzity signálu hmotnostního standardu λ DNA a jeho porovnáním s intenzitou jednotlivých vzorků DNA např. pomocí programu GeneTools, na vedlejším obrázku je degradovaná DNA



14.3 Využití elektroforézy v molekulární genetice

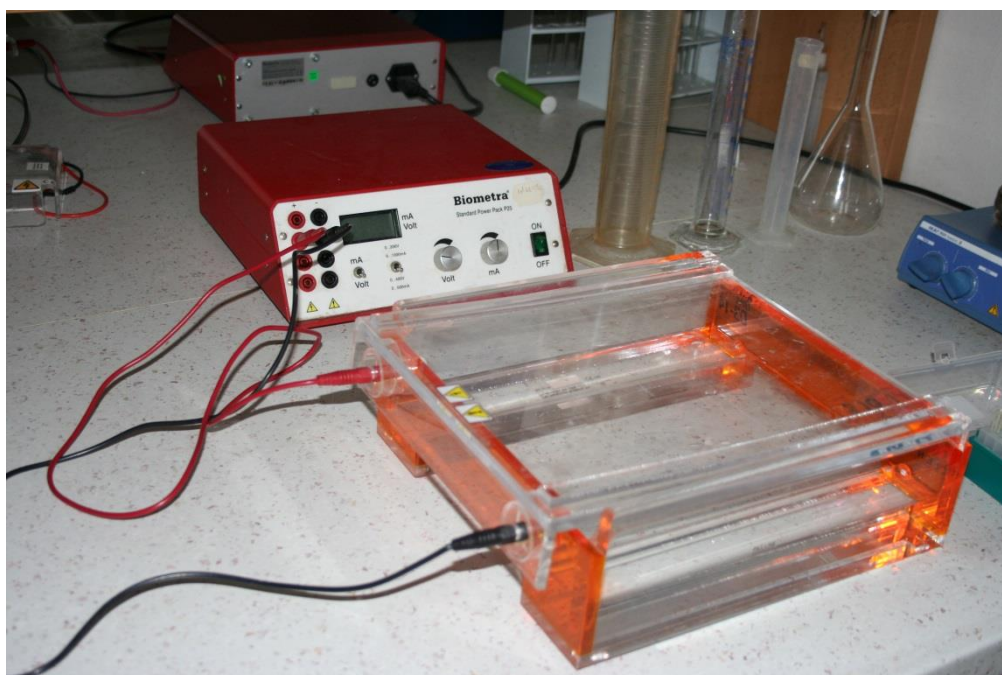
Elektroforéza nukleových kyselin je založena na skutečnosti, že nukleové kyseliny (dále NK) jsou v neutrálním nebo zásaditém prostředí polyanionty. Protože se zvyšujícím se počtem nukleotidů v molekule DNA (RNA) úměrně roste i náboj molekuly, poměr mezi molekulovou hmotností a nábojem je konstantní. Tento fakt znemožňuje účinné rozdělení nukleových kyselin ve volném roztoku na základě jejich velikosti. Elektroforéza NK se proto provádí na vhodném nosiči a to i z praktických důvodů (snadná manipulace, stálost získaného rozdělení apod.). Jako tyto nosiče se nejlépe osvědčily agarózové a polyakrylamidové gely.

Gelová elektroforéza je metoda pro separaci a analýzu makromolekul (DNA, RNA a proteinů) v závislosti na jejich velikosti, uspořádání a náboji. Využívá gely o různé velikosti pórů, skrze které se fragmenty makromolekul pohybují. Gely tvoří poměrně hustou síť, kterou větší molekuly procházejí pomaleji než menší molekuly – mluvíme proto o technice molekulového síta.

Nukleové kyseliny v zásaditém prostředí nesou záporný náboj a proto se pohybují v elektrickém poli od katody k anodě. Díky pravidelné struktuře molekul DNA (páteř polynukleotidu typu pentóza - kys. trihydrogenfosforečná – pentóza - kys. trihydrogenfosforečná) je i rozložení záporného náboje podél molekuly konstantní. O rychlosti elektromigrace rozhoduje tedy pouze průchodnost molekul DNA gelem. Přibližně platí, že rychlost migrace lineárních DNA fragmentů gelem je nepřímo úměrná dekadickému logaritmu jejich molekulární hmotnosti.

Pro většinu aplikací se použité napětí pohybuje v rozmezí $4-10 \text{ V.cm}^{-1}$ (počítá se vzdálenost mezi elektrodami, ne velikost gelu). Pokud je napětí příliš vysoké, jsou pruhy na gelu nevyrovnané, a to zvláště v případě fragmentů větších než 12 -15 kpb (zde raději používáme napětí od 1 do 2 V.cm^{-1}). Naopak pokud je zvolené napětí příliš nízké, může se u menších fragmentů začít projevovat jejich přirozená difúze.

Obr.č.: Horizontální gelová elektroforéza zapojená do zdroje elektrického napětí





Elektrolyt

Elektrolyt používaný při elektroforéze NK má takové pH, při kterém molekuly DNA získávají záporný náboj. Během elektroforézy dochází také k elektrolytickému rozkladu vodného prostředí, přičemž na anodě jsou generovány protony (H^+) a na katodě hydroxylové anionty (OH^-). Tento jev způsobuje vznik gradientu pH v okolí elektrod, a proto je pro elektroforézu nabitých molekul potřebné použití pufovacího systému. Dva nejčastěji užívané pufrů při elektroforéze DNA jsou **TAE** - Tris-acetát s EDTA (40 mM Tris-acetát, 1mM EDTA) a **TBE** - Tris-borát s EDTA (89 mM Tris-borát, 1 mM EDTA). Protože pH těchto pufrů je zásadité, je z kyselých -OH skupin na pentózafosfátové kostře DNA odštěpován proton, molekula DNA celkově získává záporný náboj a migruje ke kladně nabitě anodě.

Agaróza

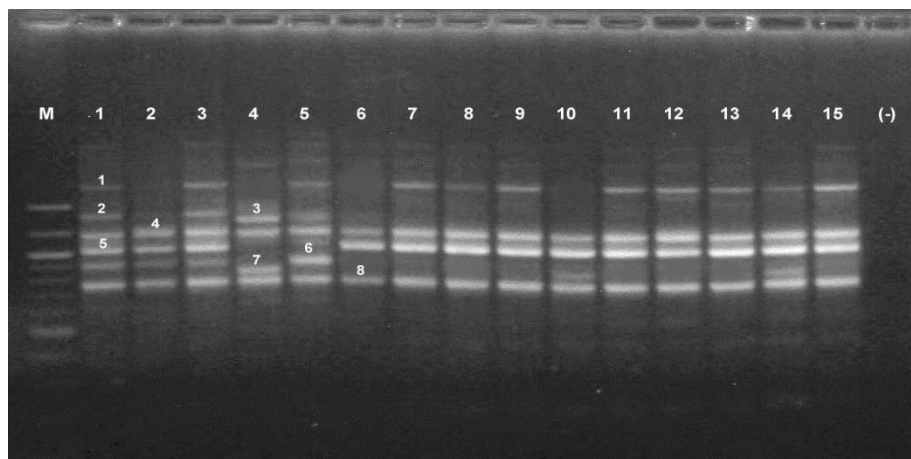
Agaróza je polysacharid tvořený D-galaktosou a anhydro-L-galaktosou, který produkují některé mořské řasy a pod názvem agar se používá k výrobě gelů v potravinářství, mikrobiologii, imunologii či biochemii.

Ve struktuře těchto polysacharidů se vyskytují i některé jiné nabitě skupiny jako jsou pyruváty nebo sírany, jejichž obsah může ovlivňovat mnoho důležitých vlastností agarózy. Nejsledovanější z nich je elektroendoosmóza (zkr. EEO), která je uváděna pro upřesnění elektroforetických vlastností agarózy téměř každým jejím výrobcem. Průměrnou velikost pórů ve ztuhlém gelu ovlivňuje koncentrace a typ agarózy, obvykle se ale pohybují v rozmezí 100-300 nm.

Pro elektroforézu nukleových kyselin se používají gely obsahující 0,5 až 4 % agarosy. Čím je obsah polysacharidu vyšší, tím je lepší rozlišovací schopnost gelu, ale tím je také průběh elektroforézy pomalejší a příprava gelu je technicky náročnější.

K výhodám agarózového gelu patří jeho snadná příprava a zdravotní nezávadnost. K nevýhodám potom nižší rozlišovací schopnost a poměrně vysoká cena. Při izolaci DNA z agarózového gelu je náročnější získat čistý izolát DNA.

Obr.: Separace PCR produktů na agarózovém gelu, RAPD u skupiny genotypů rodu *Prunus* L., použitý primer: OPE-1



Polyakrylamid

Polyakrylamid (poly(2-propenamid)) je polymer ($-\text{CH}_2\text{CHCONH}_2-$) tvořený z akrylamidových podjednotek. Může být lineární nebo sesíťovaný, typicky N,N'-methylenbisakrylamidem. Připravuje se z akrylamidu a bisakrylamidu, jejichž smísením dochází k polymeraci. Samotný polyakrylamidový gel není teoreticky toxický, ale vstupní akrylamid je látka s prokázaným neurotoxickým účinkem a testuje se jeho genotoxicita a karcinogenita. Navíc má schopnost se v organismu kumulovat. Při přípravě gelů je proto nutné brát tato rizika vážně. Připravený gel může obsahovat zbytky nezpolymerovaného akrylamidu a podle toho je s ním třeba nakládat a používat příslušné ochranné osobní prostředky.

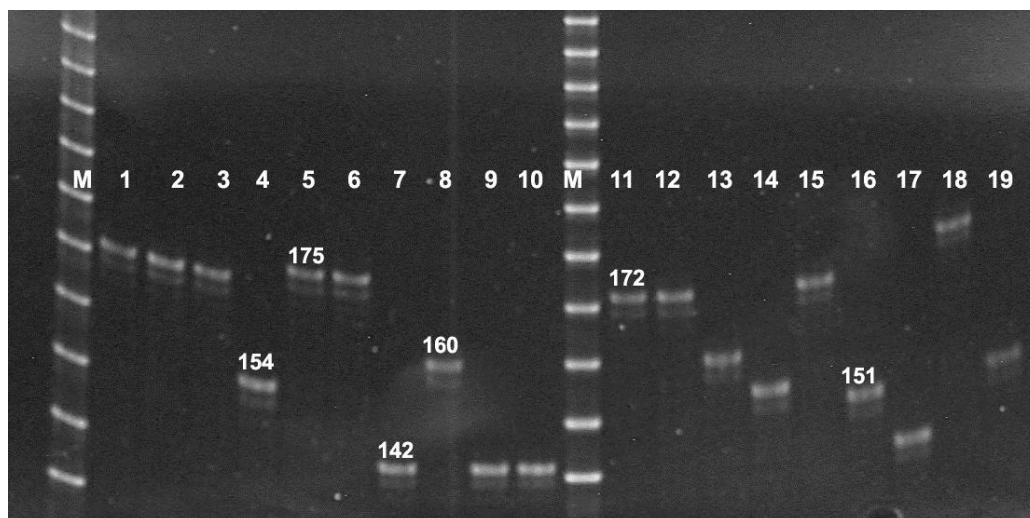
Příprava polyakrylamidového gelu je poměrně pracná a manipulace s ním náročná. V dnešní době je možné koupit hotové gely a vlastní přípravě se tak vyhnout. K jeho výhodám patří vysoká rozlišovací schopnost – při dostatečné délce gelu je možné rozlišovat fragmenty DNA lišící se o 1 pb. DNA izolovaná z polyakrylamidového gelu je vysoce čistá, což může být důležité pro další aplikace.

Obr.č.: Vertikální gelová elektroforéza





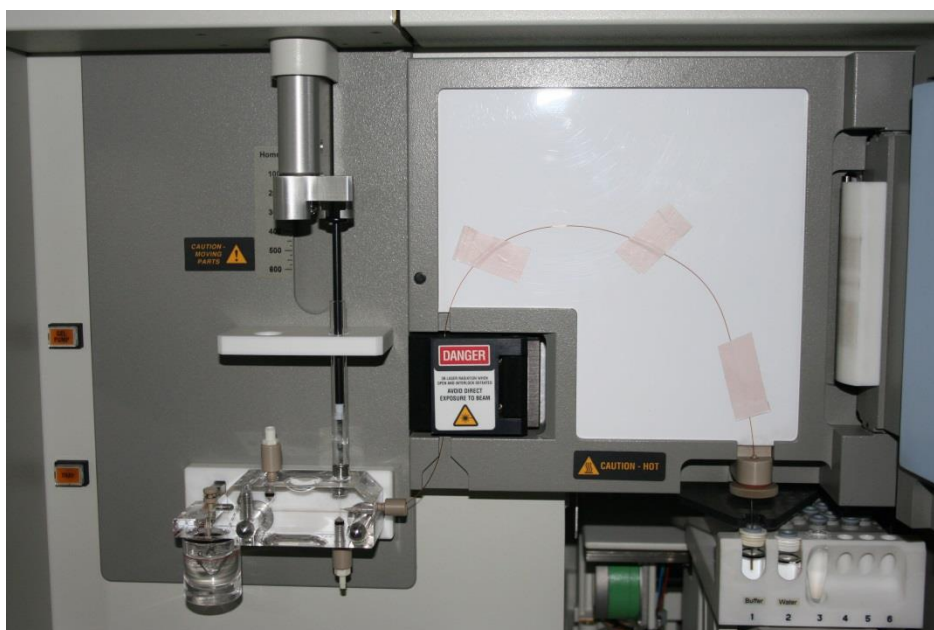
Obr.: Záznam separace produktů SSR reakce na denaturačním polyakrylamidovém gelu při analýze mikrosatelitního lokusu 5S



Kapilární gelová elektroforéza

Separace NK probíhá v kapiláře naplněné gelem v roztoku základního elektrolytu. Charakter gelu používaného pro přeplňování separačních kapilár je obvykle výrobním tajemstvím výrobce daného přístroje. Instrumentální systém kapilární elektroforézy je relativně jednoduchý. Skládá se z kapiláry, nádobek ze základním elektrolytem, nádobky se vzorkem, zdroje vysokého napětí s výstupem na platinové elektrody a detektoru, který je nejčastěji upevněn přímo na kapiláře. Tento detektor je napojen na počítač, který zaznamenává signál detektoru v čase. Nejčastěji se k měření používají křemenné kapiláry s ochrannou vrstvou polyimidu. Separované fragmenty DNA musí být fluorescenčně značeny, aby je mohl detektor zaznamenat. Na základě změřené rychlosti průchodu kapilárou potom přístroj vypočítává velikost DNA fragmentu. Na principu kapilární elektroforézy pracují genetické analyzátoři. Rozlišovací schopnost těchto přístrojů je velmi vysoká a je možné je použít i k sekvenaci DNA.

Obr.č.: genetický analyzátor ABI Prism 310

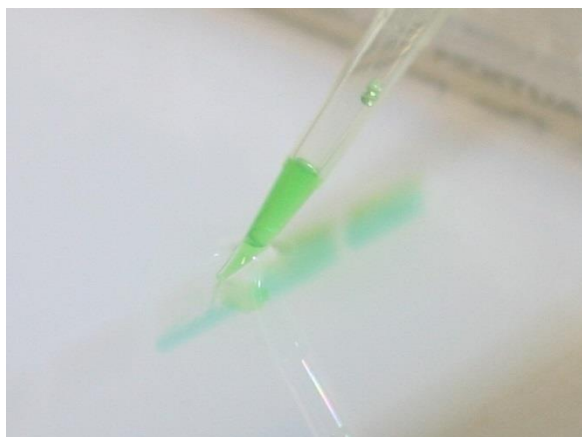


Dávkovací pufr

Pro dávkování roztoku DNA na gel se používá tzv. dávkovací pufr. Ten sestává z několika složek, přičemž každá z nich má svůj účel. Hlavní funkcí dávkovacího pufru je omezit difuzi molekul DNA po jejich nadávkování do komory v gelu. K těmto účelům se používal např. viskózní glycerol, který je v současné době stále častěji nahrazován polymerem Ficoll 400. Součástí dávkovacího pufru je také barevná složka (obvykle acidobazický indikátor), která v průběhu elektroforézy migruje gelem ve stejném směru jako DNA. Tato složka funguje jako vizuální kontrola průběhu elektroforézy a umožňuje u různých experimentů alespoň zhruba ukončit elektroforézu vždy ve stejné fázi (např. ukončujeme elektroforézu v okamžiku, kdy modrý pruh odpovídající bromfenolové modři dosáhne 3 cm od okraje gelu).



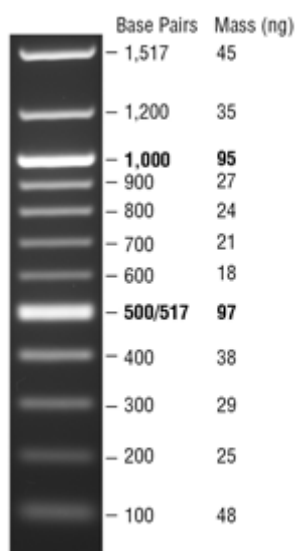
Obr. č. : Dávkování vzorku DNA do komor agarózového gelu. DNA byla smíchána s dávkovacím pufrem 5 x Green GoTaq® Flexi Buffer (fa. Promega)



Velikostní standardy

Velikostní standard (marker) je směs fragmentů DNA o známé délce. Do každé řady vzorků na gelu je vhodné dávkovat alespoň jeden velikostní standard, aby bylo možné odečíst velikost separovaných fragmentů DNA. Velikostních markerů je na trhu dostupná široká škála a výběr vhodného standardu pro danou analýzu je řízen očekávanou velikostí fragmentů, použitou technikou separace a rovněž barvivem použitým k vizualizaci NK.

Obr.č. : 100 bp DNA ladder (©:New England Biolabs®), barveno ethidium bromidem, separace v 1,3 % agarózovém gelu



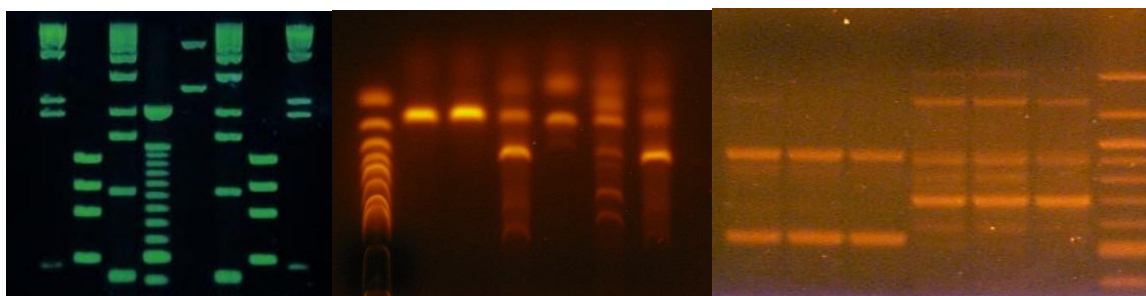
Barvení a vizualizace separovaných fragmentů NK



Protože DNA samotná není v gelu vidět, je pro její zviditelnění do gelu vnášena určitá koncentrace barvicího činidla. Tato barviva interkalují do závitů ve šroubovicové struktuře DNA, přičemž takto vytvořený komplex pod UV zářením emituje světlo. Pro barvení DNA je na trhu dostupná celá řada barviv. K často používaným patří ethidium bromid. Vzhledem k jeho schopnosti vmezřovat se do struktury DNA se ale jedná o silný mutagen. Pro práci s tímto barvivem je vhodné mít vyčleněnu zvláštní místnost a kontaminované laboratorní vybavení z ní nevynášet ven. Alternativou jsou podstatně dražší barviva, jako např. SYBR® Green, GelRed™ a další, u kterých je dle výrobců toxicita výrazně nižší.

Barviva jsou přidávána do gelu již před tuhnutím, nebo je možné barvit gely po ukončení elektroforézy ve vodní lázni. Ke zviditelnění pruhů DNA se potom používá UV transiluminátor, kterým je obarvený gel prosvícen. Získané výsledky se dokumentují pomocí digitálního fotoaparátu. Snímky je možno dále upravovat pomocí běžných programů určených pro úpravu fotografií. Důležitý je zejména popis jednotlivých vzorků.

Obr.č. Gely obarvené pomocí Sybr Green ®, Gel Red® a Ethidium bromidu



14.4 Základní molekulárně genetické metody

14.4.1 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD byla poprvé popsána v roce 1990 dvěma nezávisle na sobě pracujícími skupinami (WILLIAMS *et al.*, 1990; WELSH *et McCLELLAND* 1990). Jedná se o jednu z prvních metod založených na principu PCR, která pro svou jednoduchost rychle nahradila do té doby používanou metodu RFLP (z anglického Restriction Fragment Length Polymorphism). RFLP je založena na restrikním štěpení vysokomolekulární DNA, po kterém následuje přenos fragmentů z gelu na nylonovou membránu (southern blotting) a hybridizace s radioaktivně značenou sondou. RFLP poskytuje kodominantní markery, což je důvod, proč ji některé laboratoře v menším měřítku využívají dodnes. Nicméně se jedná o metodu relativně složitou, jejímž velkým nedostatkem je obvykle používané radioaktivní značení sond. Ve své době měla tato technika zásadní vliv na rozvoj molekulární genetiky, v současnosti se ale jedná o okrajovou metodu.

RAPD pracuje na principu tzv. asymetrické PCR: v reakci používá jediného oligonukleotidového primeru, u kterého navíc není potřeba znát konkrétní sekvence cílových oblastí DNA. Tento primer je značně kratší (obvykle kolem 10 bází) než primery používané ve standardní PCR reakci, což znamená použití nižších teplot pro hybridizaci primerů s templátovou DNA (35-37 °C). Amplifikované fragmenty po jejich



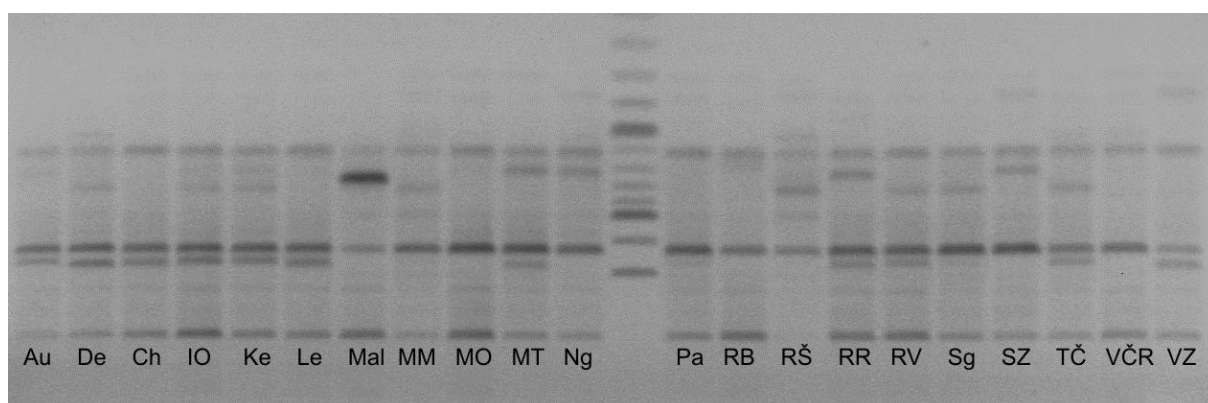
elektroforetickém rozdělení na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu vytvářejí genomový fingerprint, jedinečný pro každou kombinaci primer-genom.

V RAPD profilu se obvykle objevuje 3-15 diskrétních pruhů. Velikost většiny vyhodnocovaných reakčních produktů se pohybuje v rozmezí 300 až 2000 pb. Příčinou je jak limitovaná schopnost agarózových gelů separovat zároveň větší i menší produkty, tak i limitovaná schopnost tvorby delších produktů za daných přijatých podmínek PCR reakce (ovlivňuje ji hlavně čas zadaný pro fázi prodlužování nového řetězce).

Polymorfismus je zde důsledkem buď mutace přímo v místě hybridizace primeru nebo přeskupení v uspořádání templátové DNA mezi cílovými místy primeru. Produkty RAPD obvykle představují dominantní genetické markery a jsou děděny v rámci mendelistických pravidel. RAPD markery, které by vykazovaly kodominantní charakter, byly detekovány jen velmi zřídka a jsou pravděpodobně důsledkem interních delecí a inzercí.

I když je reakce opakována za totožných podmínek, objevují se v porovnávaných spektrech občas nereprodukovatelné produkty. Jedná se o důsledek dobře známé skutečnosti, že citlivost výsledků RAPD na změnu podmínek reakce je velmi vysoká. Na druhou stranu reprodukovatelnost a správnost výsledků RAPD analýz je uspokojivá v rámci podmínek a protokolů zavedených v jedné laboratoři. Je poměrně časté, že v případě nereprodukovatelných pruhů se jedná o pruhy se slabou intenzitou, které jsou označovány jako sekundární nebo terciární produkty. Proto je doporučováno pracovat pouze se silnými produkty, které alespoň ve dvou opakováních potvrdily svou reprodukovatelnost. Přes výše uvedené nevýhody se stále jedná o poměrně populární metodu, o čemž svědčí fakt, že výsledky této metody jsou i v současné době stále publikovatelné a to v nemalém počtu odborných článků.

Obr.č.: RAPD fingerprinty – separace PCR produktů v agarózovém gelu, barveno Ethidium bromidem. Analyzován soubor odrůd révy vinné, uprostřed velikostní standard. (© Baránková)



Oblasti využití RAPD

Předpokládá se, že cílová místa pro příslušný primer jsou na templátové DNA rozmístěna náhodně a pokrývají jak konzervativní tak i hypervariabilní oblasti, přičemž některé při RAPD amplifikované produkty jsou polymorfní.

Takto získaný polymorfismus může být použit jako genetický marker ve velmi široké škále možných aplikací. Nejčastější okruhy použití RAPD techniky jsou pro



identifikaci odrůd, určení rodičovství, analýza genetických vztahů v rámci sledované skupiny genotypů, vývoj genetických vazebných map, získávání markerů pro geny odpovědné za rezistenci.

14.4.2. SSR (Simple Sequence Repeat)

Mikrosatelity představují oblasti v DNA složené z mnohokrát se opakujících jednoduchých motivů o délce 1 - 6 nukleotidů jako jsou např. $(A)_n$, $(AG)_n$, $(GATA)_n$. Tyto opakující se motivy nazýváme jednotky repetice. Jejich celková délka obvykle nepřesahuje 100 pb. Podle složení lze mikrosatelity rozdělit na dokonalé, nedokonalé a složené. Dokonalý mikrosatelit je tvořen souvislou jednotkou repetice, např. $(AG)_{24}$, u nedokonalého mikrosatelitu je jednotka repetice přerušena sledem náhodných bází. Složený mikrosatelit je tvořen několika různými jednotkami repetice, např. $(AG)_{14}(AT)_{35}$

Funkční význam mikrosatelitů v genomech prozatím ještě není zcela objasněn. Na rozdíl od dřívějších názorů je však stále více zřejmé, že se nejedná o jakousi nadbytečnou DNA. Byly provedeny experimenty zaměřené na studium jejich vlivu na regulaci rekombinace, replikace a transkripce.

Princip analýzy mikrosatelitních lokusů spočívá v tom, že variace v počtu tandemových repeticí je identifikována amplifikací oblasti, která tato opakování obsahuje. Jako primery jsou navrženy sekvence komplementární se sekvencemi sousedícími s těmito tandemovými repeticemi, přičemž zároveň musí být zachovány obecné podmínky pro navrhování primerů pro PCR. Polymorfní signály jsou detekovány na základě rozdílů ve velikosti amplifikovaných produktů, které jsou odrazem rozdílného počtu opakování jednotky repetice. Sekvence PCR primerů sousedících s tandemovými repeticemi mikrosatelitů jsou obvykle navrhovány tak, aby velikost SSR amplifikovaných produktů byla v rozmezí 100-250 pb.

Mikrosatelity jsou rovnoměrně rozmístěny napříč genomem a vykazují relativně vysokou míru polymorfizmu. Pro tyto vlastnosti spojené s jejich poměrně snadnou detekcí jsou SSR markery velmi oblíbené. Jejich potenciál pro možnou automatizaci a kodominantní charakter znamenají potom další výhody ve srovnání s jinými používanými DNA markery. Masivnější využití tohoto typu markerů bylo omezeno hlavně technickou náročností procesů, v rámci kterých byly ve své době v genomech sledovaného druhu vyhledávány a ověřovány vhodné mikrosatelitní sekvence a jejich příslušné sousední sekvence, vhodné pro navržení univerzálně funkčních primerů pro PCR amplifikaci. K historickým postupům patří například skrínink genomových knihoven na základě hybridizace se značenými oligonukleotidy obsahujícími sledovanou repetici. Ve srovnání s ostatními metodami používanými k izolaci mikrosatelitů je tato metoda pracná, což například dokumentuje izolace SSR u borovice, kdy bylo prověřeno 6000 klonů s výsledkem 8 vybraných a použitelných mikrosatelitních lokusů. Další pokrok ve své době znamenaly přístupy, kde ke zlepšení účinnosti izolace mikrosatelitních sekvencí byly navrženy metody zaměřené na konstrukci knihoven obohacených o SSR sekvence a to již před, nebo po vytvoření knihovny. V posledních letech, spolu s rozvojem sekvenačních technologií, však jsou velmi častým zdrojem potenciálních mikrosatelitních sekvencí resp. příslušných SSR markerů sekvenční databáze. Velkou výhodou v tomto případě je, že mikrosatelity



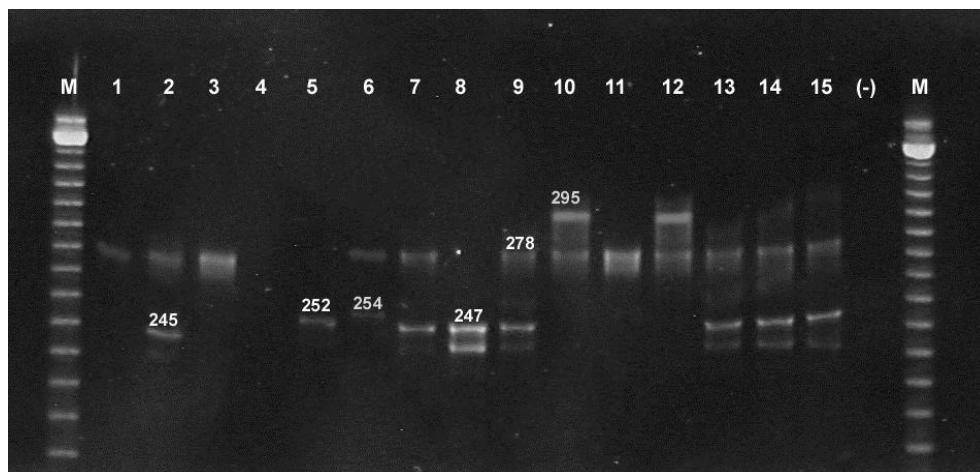
odvozené z databází jsou lehce identifikovatelné za pomoci elektronického zpracování dat a vyžadují pouze navržení a ověření vhodných primerů sousedících s těmito nově nalezenými mikrosatelitními sekvencemi. Specifickým případem u tohoto způsobu získávání SSR markerů jsou markery odvozené z EST databází (z anglického Expressed Sequence Tag). Mimo zmiňovanou možnost jejich snadného nalezení mají další výhody. Jedná se například o to, že jsou vhodné pro mapování vzhledem k jejich poloze v blízkosti genů se známou funkcí a jsou vysoce přenositelné na příbuzné druhy. Mezi nevýhody mikrosatelitů odvozených z EST může patřit skutečnost, že mohou být méně polymorfní ve srovnání s mikrosatelity získanými v rámci genomu náhodně. To je přirozeným důsledkem toho, že jsou součástí relativně konzervativních oblastí s geny. Přesto však EST-odvozené mikrosatelity, jak ukazuje řada publikací, vykazují stále dostatečnou míru polymorfizmu pro jejich využití při mapování nebo fingerprintinku.

Další možností jak překonat nutnost znát přesné sekvence sousedící s daným mikrosatelitem je pokusit se použít SSR markery popsané u jiných příbuzných druhů také u druhu, který aktuálně chceme analyzovat. Výhody takového postupu jsou jasné. Opět tu odpadají pracné a finančně náročné kroky potřebné při jejich přímé izolaci. Mezi příklady, ve kterých byly úspěšně použity mikrosatelity odvozené z více či méně příbuzných rostlinných druhů, lze uvést mikrosatelity izolované z genomu broskvoně obecné (*Prunus persica* /L./ Batsch) byly amplifikovány u meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.) a dokonce také i u huseníčku Thallova (*Arabidopsis thaliana* L.). Základním omezením v případě použití mikrosatelitních sekvencí mezi příbuznými rostlinnými druhy je skutečnost, že takto přenositelných je jenom část. K dalším problémům může patřit potřeba nové optimalizace původního protokolu, zvýšená pravděpodobnost výskytu produktů s neočekávanou velikostí. Mohou se také vyskytnout případy, kdy produkt o předpokládané velikosti neobsahuje mikrosatelitní sekvenci.

Mezi metody nejčastěji používané k určování velikosti produktů SSR amplifikace a ke sledování jejich polymorfizmu patří elektroforéza na agaróze, polyakrylamidová gelová elektroforéza (dále PAGE), denaturační PAGE a kapilární elektroforéza. Obecně platí, že čím jednodušší a levnější separační systém, tím jsou výsledky separace méně přesné.

Ve srovnání s RFLP technikou kladou mikrosatelity menší nároky na laboratorní vybavení, vyžadují mnohem nižší množství izolované DNA, vykazují vyšší polymorfizmus a jsou potenciálně automatizovatelné. Jelikož je každý lokus definován konkrétní primerovou sekvencí, mohou být výsledky SSR analýz snadno porovnávány mezi různými pracovišti, na rozdíl od metody RAPD. Je ovšem třeba brát v potaz možné problémy se správným určením velikosti výsledných produktů. Další výhodou je kodominantní charakter SSR markerů, což je přínosné zvláště při jejich aplikacích v procesu genetického mapování.

Obr.č. Záznam separace produktů SSR analýzy na polyakrylamidovém denaturačním gelu při studiu lokusu P6-18 na souboru genotypů *Prunus* L. Čísla v řádku označují jednotlivé genotypy, čísla vepsaná do fingerprintu velikosti alel odhadnuté porovnáním s velikostním standardem (M) (© Baránek)



Obr.č.: Záznam výsledků SSR analýzy odrůdy révy Ryzlinku rýnského při separaci produktů v kapiláře genetického analyzátoru ABI Prism 310. Přístroj je schopen současně detekovat signál na čtyřech vlnových délkách, proto byly primery označeny třemi různými fluorescenčními značkami (NED, JOE, FAM, značka ROX je vyhrazena pro velikostní standard). Vzhledem k tomu, že vždy dva SSR lokusy poskytují alely výrazně odlišné velikosti, bylo tak možné současně v jednom běhu separovat 6 lokusů (na obrázku označeny zkratkou VVS, VVMD a VrZag v kombinaci s číslem). Čísla vyjadřují velikosti alel (pb) odečtené přístrojem. (© Baránková)



14.4.3 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Princip této metody byl poprvé zveřejněn v publikaci VOS *et al.* (1995). V podstatě využívá jak principu polymerázové řetězové reakce, tak i restriktivního štěpení.

Pracovní protokol začíná štěpením sledované DNA jednou nebo více restriktivními endonukleázami. Poté se k takto vzniklým štěpům pomocí enzymu ligázy připojí tzv. adaptér o známé sekvenci. DNA amplifikace se poté provádí s primery komplementárními k sekvenci adaptéru. Tyto primery obsahují navíc jednu nebo více bází na jejich 3' konci, která zajišťuje selektivitu amplifikace omezením počtu případů úplné komplementarity primeru a komplexu adaptér + templátová DNA. Výsledné produkty takto provedené amplifikace mohou být detekovány např. pomocí radioaktivního značení jednoho z primerů po jejich separaci v prostředí polyakrylamidového. V současné době je spíše používáno fluorescenčního značení ve spojení s některým z komerčně prodávaných systémů pro sekvencování v kapiláře (např. Applied Biosystems, USA). V případě organismů se složitějším genomem se používá tzv. preamplifikace. Naředitelné produkty první amplifikace se poté používají jako templát pro druhou amplifikaci s primery prodlouženými o tzv. selektivní nukleotidy.

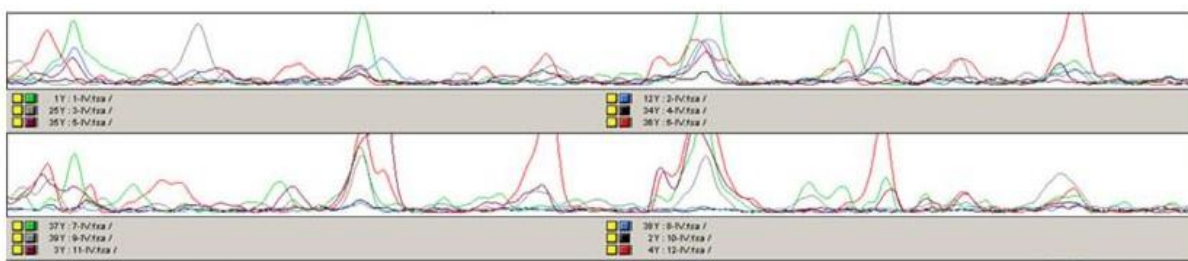


Získané spektrum produktů AFLP reakce je obvykle poměrně složité, v rámci jednoho fingerprintu bývá detekováno 50-100 produktů. Výhodou je, že tato složitost spekter, a s tím spojený počet zachytitelných polymorfních signálů, je závislý od výběru sekvence primeru a použité endonukleázy. Takováto flexibilita potom dovoluje nastavení podmínek na požadovanou úroveň počtu detekovaných pruhů. V případě AFLP metody získáváme spektrum produktů, které jsou obvykle vyhodnocovány ve formě 0/1 signálů, což je ostatně typické pro většinu metod založených na primerech s náhodně uspořádanými sekvencemi.

Předmětem diskuse může být reprodukovatelnost AFLP experimentů. Ve srovnání s ostatními metodami používajícími náhodně vybrané primery je však opakovatelnost výsledků výrazně lepší. Toto zlepšení je zapříčiněno pravděpodobně PCR amplifikací využívající dlouhých primerů, které jsou v úplné komplementaritě s komplexem adaptér + genomická DNA jakožto templátem. Pro amplifikaci se navíc používá podmínek, které podporují úplnou hybridizaci mezi DNA templátem a primerem. Při pečlivé kontrole chemikálií a dodržování metodiky tak mohou být dlouhodobě získávány spolehlivé výsledky. Výše zmiňované výhody AFLP markerů jsou tedy hojně využívány při analýzách příbuznosti, rodičovství a dalších genetických parametrů, zvláště pak s přihlédnutím ke skutečnosti, že AFLP markery jsou obvykle prosté artefaktů. Pro své vlastnosti se tak AFLP metoda stala v krátké době poměrně populární.

Obr. č.: AFLP profily genotypů hrušní při separaci produktů v kapiláře genetického anlyzátoru ABI Prism 310. (© Wolf)

Při použití třech fluorescenčních barviv umožňuje přístroj separaci PCR produktů třech různých primerových kombinací v jednom běhu. Na obrázku je vidět výsek z grafického výstupu programu GeneScan, který analyzuje data odečtená přístrojem. Program umožňuje sledovat profily mnoha různých genotypů současně (každý má jinou barvu křivky) a tak snadno odlišovat polymorfní od monomorfních produktů.



Selekce za pomoci markerů

Marker lze zjednodušeně chápat jako „identifikační znak“. Ve šlechtění se markery využívají zejména z důvodu urychlení, zefektivnění, a tudíž i zlevnění šlechtitelského procesu. Pro efektivní využití MAS by měly být splněny následující podmínky.

Správně navržený marker je v úzké vazbě se zájmovým genem. Tento gen (případně skupina genů) kóduje požadovanou vlastnost rostliny. Mnoho šlechtitelsky zajímavých vlastností se může projevit až po několika měsících, případně letech pěstování, zatímco markery, které jsou s těmito vlastnostmi ve vazbě, je možné identifikovat často již u semenáčů.



Pro přenos požadované vlastnosti, jako může být např. rezistence vůči některému z biotických faktorů, používají šlechtitelé nejčastěji zpětného křížení. Zdrojem požadované alely bývá velmi často některý z příbuzných planě rostoucích rostlinných druhů. F₁ generace je zpětně křížena s rekurentním rodičem, aby došlo k eliminaci nežádoucích znaků vnesených ze strany rezistentního rodiče, přičemž tento proces je opakován pětkrát až desetkrát. Mnoho ekonomicky zajímavých vlastností se však projevuje pouze u dospělých jedinců a je možné je hodnotit až po několika měsících nebo dokonce letech po jejich výsevu. Možnost včasné selekce a zúžení souboru dále pěstovaných jedinců na základě výsledků jejich DNA analýzy pak může přinášet finanční úspory. Navíc použití DNA markerů může pomoci zredukovat šlechtiteli míru přenosu nežádoucích částí genomu donoru a zrychlit tak proces přibližování se nově vznikajících generací fenotypu rekurentního rodiče.

Ve šlechtění rostlin je možné využívat hned několik typů markerů.

Morfologické markery

Z praktického hlediska nejvýhodnějším a nejjednodušším je marker morfologický. Jedná se o fenotypový znak, který se projeví již u velmi mladých rostlin, jako je např. barva děložních lístků, skvrna na palistu a jiné. Morfologické znaky mají několik nevýhod, pokud jsou používány jako markery v rostlinné genetice. Recesivní alely mohou být ve svém projevu maskovány přítomností aktivní či dominantní alely. Také epistatický nebo pleiotropický efekt některých genů může limitovat počet markerů použitelných v jednom souboru. Nalezení morfologického markeru je velmi náročná a zdlouhavá práce. Zásadní vliv na výsledek má správný výběr rodičů, kdy jeden z nich nese požadovanou vlastnost a druhý nikoliv. V dalším kroku probíhá velmi podrobné sledování potomstva a statistické vyhodnocení dat. I v případech, kdy je sledováno velké množství znaků a počet sledovaných F₁ hybridů je dostatečně vysoký, je nutná i velká dávka štěstí, aby se podařilo nalézt v praxi použitelný morfologický marker, který by byl v dostatečně úzké vazbě s požadovanou vlastností. Z tohoto důvodu je dobrých morfologických markerů poskrovnu a hledají se snazší cesty k nalezení vhodných markerů použitelných ve šlechtění.

Molekulární markery

Nalezení molekulárního markeru je v současné době jednodušší, než hledání markeru morfologického. Díky poměrně vysokému polymorfismu je pravděpodobnost nalezení vhodného markeru daleko vyšší. Jako molekulární chápeme markery biochemické a DNA markery

Použití molekulárních markerů má oproti morfologickým klasickým znakům výhody i v možnosti sledování většího počtu žádaných znaků a jsou více nezávislé na vnějších podmínkách prostředí. Tyto teoretické předpoklady o výhodnosti využití MAS však naráží na reálnou praxi ve šlechtitelských firmách, kde jsou tyto metody v podmínkách ČR využívány pouze omezeně.

Z praktického hlediska by pak pro efektivní využití MAS měly být splněny tyto podmínky:



- markery by se sledovanou vlastností měly kosegregovat nebo být alespoň v těsné vazbě (1 cM). Tato hodnota by měla minimalizovat možnost falešně pozitivních či negativních výsledků při třídění potomstva
- použitý systém by měl umožňovat selekci i velkých potomstev, neměl by tedy být příliš technicky náročný.
- použitá metoda by měla mít dostatečnou míru reprodukovatelnosti při přenosu mezi laboratořemi a neměla by být příliš ekonomicky náročná (CHAWLA, 2004).

Biochemické markery

Bílkoviny mohou velmi dobře splňovat kritéria pro genetické markery, neboť se vyznačují vysokým stupněm geneticky fixovaného polymorfismu, kodominantní dědičností, rozlišitelností alel v individuích, jistou mírou nezávislosti na vnějších podmínkách. Takovými systémy mohou být zásobní bílkoviny nebo isoenzymy (molekulární formy enzymů). V principu všechny bílkoviny vykazující genetický polymorfismus, mohou být využity jako diferenční markery u odrůd, a to s větším efektem než klasické morfologické markery.

Isoenzymy (též isozymy) jsou enzymy, které mají v organismu stejnou funkci - katalyzují stejnou reakci, ale mají rozdílnou primární strukturu (tzn. jsou kódovány rozdílným genem). Allozymy jsou kódovány různými alelami téhož genu. Alely většiny isoenzymových lokusů jsou kodominantní a mohou se pak projevit i v případě recesivity nebo pleiotropie. Tato kodominance také umožňuje rozlišit heterozygoty od homozygotů. Isoenzymy jen zřídka vykazují epistatický projev, což pak umožňuje použít u daného materiálu značně rozsáhlejší počet markerů. Analýza isozymů patří k jednoduchým a levným technikám (oproti analýze DNA). Na druhou stranu neposkytuje tak vysoký polymorfismus a je omezena pouze na kódující část genomu. Pro analýzu je také třeba čerstvého materiálu.

Podstatně méně se využívá polymorfismu jiných biologických molekul, jako jsou mastné kyseliny, sekundární metabolity a pigmenty. I tyto biologické makromolekuly, markerovací systémy, v různé míře splňují požadavky biochemických markerů, tj. nezávislost na podmínkách prostředí, genetický polymorfismus, přítomnost vhodné separační a detekční techniky.

DNA markery

Oproti biochemickým jsou DNA markery zcela nezávislé na okolním prostředí. Odrážejí čistě genotyp analyzovaného jedince. Nalezení vhodného DNA markeru je finančně poměrně náročný proces, nicméně jeho samotné využívání v praxi by mělo být snadné a jednoznačně levnější než standardní šlechtitelský postup.

Starším přístupem k hledání DNA markeru je analýza potomstva vhodně zvolených rodičů. Je možné použít řadu metod, mezi ty výhodné se řadí metody, které poskytují vysoký polymorfismus a větší počet produktů. Pravděpodobnost, že se mezi nimi podaří nalézt ten, který je v úzké vazbě s požadovanou vlastností, je tak vyšší. K tomuto



základnímu screeningu se často využívá tzv. „bulkové analýzy“, kde se analyzuje jeden směsný vzorek s genotypy nesoucí požadovaný znak a druhý směsný vzorek s genotypy, které tento znak nevykazují. Získané profily se porovnávají také s výsledky analýz rodičů. V případě, že se podaří nalézt vhodný marker, je možné jej po otestování na větším souboru jedinců se známými vlastnostmi v praxi používat. Vhodnější ale je jej převést na tzv. SCAR marker.

SCAR (z anglického: Sequence Characterized Amplified Region)

SCAR markery jsou velmi vhodné právě pro využití ve šlechtění rostlin, protože samotná analýza je snadná a rychlá, přičemž vyžaduje pouze základní vybavení molekulární laboratoře. Jedná se prakticky pouze o jednoduchou přípravu mixu, PCR a separaci produktů na agarózovém gelu. Přítomnost či nepřítomnost produktu definované velikosti potom vypovídá o tom, zda testovaná rostlina bude, či nebude vykazovat požadovanou vlastnost (praktické cvičení 14.9.2).

Postup při navrhování SCAR markeru: pomocí některé vhodné techniky analýzy DNA (např. RAPD, AFLP a mnoha dalších) je potřeba nalézt marker, který je přítomen pouze u jedinců s požadovanou vlastností (např. bezsemenost bobulí révy), zatímco u jedinců, které tuto vlastnost nevykazují, přítomen není. Tento produkt je vyřezán z gelu, ve kterém proběhla separace, PCR produkt je vyčištěn od agarózy a DNA je sekvenována. Pomocí vhodného programu jsou k této sekvenci navrženy dva specifické primery, které je třeba otestovat nejprve na potomstvu použitém k hledání markeru, posléze na širším souboru genotypů známých vlastností. Obr.č.

Vyhledávání vhodných markerů v databázích

V současné době jsou ve volně přístupných databázích k dispozici kompletní sekvence důležitých rostlinných druhů a díky rychlému vývoji sekvenačních technologií, velkému konkurenčnímu boji, který tlačí na snižování cen, každým dnem přibývají sekvence dalších druhů. Tato skutečnost mění postupy některých metod. I hledání vhodných DNA markerů tak v dnešní době již nemusí probíhat v laboratoři testováním potomstev, ale u počítače procházením databází. V případě, že známe gen, který požadovanou vlastnost kóduje, je možné tento vyhledat v sekvenci daného rostlinného druhu a navrhnout specifické primery bez předchozího testování potomstva. Nicméně stále je nutné prověřit jeho funkčnost a spolehlivost laboratorně na dostatečně širokém souboru genotypů. Tento postup lze použít pouze u vlastností, které jsou řízeny jedním genem, u kvantitativně založených znaků je třeba zvolit klasický, výše popsáný postup.

14.5 Identifikace genotypů rostlin

Molekulární metody představují velmi hodnotné a poměrně spolehlivé nástroje používané při identifikaci genotypů rostlin. U zemědělské produkce jsou molekulárně



genetické metody používány jak pro kontrolu odrůdové pravosti, či čistoty osiva, tak sadbového materiálu včetně použitých podnoží a to zejména u trvalých kultur. Lze rovněž ověřovat pravost sklizených produktů, případně polotovarů z nich připravených. Z hlediska šlechtění rostlin je analýza genetických vztahů používána při výběru vhodných rodičů, případně je možné ověřovat pravost rodičů před začátkem samotného křížení. Stejně tak je možné zpětně odhalit rodiče u hybridů s nejasným, nebo nevěrohodným původem. Lze ověřovat úspěšnost křížení, nebo díky vhodným markerům eliminovat linie, které vznikly nežádoucím samoopylením. K novější problematice pak rovněž patří možnost identifikace transgenních rostlin a jejich odlišení od materiálů geneticky neupravených.

Identifikace u rostlin by měla být spíše chápána jako cesta k rozčlenění rostlin do jistých skupin, než snaha o potvrzení jejich úplné genetické identity. Rozlišovat genotypy na úrovni rodů a druhů má význam zejména z vědeckého hlediska, ale v zemědělské praxi nenalézají tyto typy analýz široké uplatnění, na rozdíl od možnosti identifikovat genotypy na úrovni odrůdy.

Identifikace odrůd

V zahradnické praxi jsou odrůdy vzájemně odlišovány pomocí morfologických znaků. Podle národních klasifikátorů se v rámci druhových kolekcí hodnotí pomologické a významné hospodářské znaky, jako jsou plně vyvinuté zdravé listy dospělé rostliny, plody, květy, ale i nástup jednotlivých fenofází. Na fenotyp může mít výrazný vliv prostředí a zdravotní stav rostliny. Kontrola pravosti odrůdy je ovšem nejpotřebnější již při výsadbě. Řízky i sazenice jsou dodávány v bezlisté formě, nemluvě o kontrole použitých podnoží. Na omyl, či podvod se tak přijde až po několika letech, nebo vůbec. Podobná situace může nastat při nákupu plodů, nebo suroviny pro další zpracování. Například při výrobě vín hraje odrůdová pravost hroznů významnou roli.

DNA polymorfismus je velmi užitečný pro odlišení odrůd, jelikož výsledky přímo odráží genotyp. DNA je prakticky identická ve všech buňkách, pletivech a všech vývojových fázích rostliny. Analýzy mohou být provedeny kdykoliv během roku a charakteristika není závislá na prostředí a zdravotním stavu rostliny.

Pro identifikaci odrůd se prozatím ukázala jako nejvhodnější metoda SSR. Mikrosatelitní markery jsou vysoce polymorfní, kodominantní a opakovatelné. Dle současných poznatků jsou ostatní metody ve srovnání s SSR buď nedostatečně opakovatelné, nebo příliš ekonomicky a technicky náročné.

Nejpropracovanější systém identifikace byl dosud vyvinut pro révu. V rámci mezinárodního projektu EU GENRES 081 bylo doporučeno 6 mikrosatelitních lokusů jako identifikační minimum. Byl propracován systém referenčních odrůd a kódování velikosti alel, který umožňuje přesné porovnání výsledků SSR analýz a zohledňuje tak možné nesrovnalosti vznikající používáním rozdílných protokolů a separačních technik různými laboratořemi. Celý systém je podrobně popsán na stránkách „Vitis database“, kde lze také dohledat výsledky mnoha nejen evropských laboratoří ve formě jak absolutní, tak kódované velikosti alel většiny komerčně pěstovaných odrůd.

Rovněž další druhy byly předmětem rozsáhlých SSR analýz a v současné době je již možné dohledat SSR primery prakticky pro všechny pěstované ovocné druhy. Trendem je navrhovat univerzální SSR primery, které jsou použitelné pro více příbuzných druhů – např. pro celou čeleď *Rosaceae*. Ačkoliv bylo publikováno velké množství výsledků,



bohužel u ostatních ovocných druhů chybí ucelený systém porovnávání dat, jako je tomu u révy. Mezinárodní databáze založená na systému porovnávání výsledků s referenčními odrůdami by byla jistě pro ovocnáře velkým přínosem.

14.6. Studium genetických vztahů na základě molekulárně genetických studií

Genetický fingerprint uchovávaných genotypů a určování genetické diverzity použitím molekulárních markerů jsou dvě odlišné, přesto však poměrně provázané problematiky. Výsledky generované některou z molekulárně-genetických metod totiž mohou být použity k oběma zmiňovaným účelům. V případě fingerprintinku jde v podstatě o určení uceleného genetického profilu odrůdy, případně jednotlivce, který by měl být jedinečný a tím pádem také odlišitelný od ostatních. Při stanovení genetické diverzity jde o relativní měření genetických vzdáleností v rámci skupiny sledovaných genotypů pomocí vybraných markerů. Konečně stanovené vzdálenosti jsou potom určovány složením sledované skupiny a také použitým druhem markerů. Mezi nejpoužívanější metody pak patří RAPD, RFLP, SSR a AFLP.

V literatuře jsou při výpočtu genetické rozdílnosti mezi dvěma jednotlivci nejčastěji zmiňovány a používány tyto tři koeficienty:

- 1) koeficient Dice / NEI a LI (1979), který má tvar $D_{NL} = 1 - \frac{2n_{11}}{2n_{11} + n_{10} + n_{01}}$
- 2) koeficient JACCARD (1908), který má tvar $D_J = 1 - \frac{n_{11}}{n_{11} + n_{10} + n_{01}}$
- 3) koeficient SOKAL a MICHENER (1958), tvar $D_{SM} = \frac{n_{11} + n_{00}}{n_{11} + n_{00} + n_{10} + n_{01}}$

V případě stanovení genetické rozdílnosti mezi dvěma odrůdami na základě výsledků některé z fragmentačních molekulárně genetických metod představuje n_{11} počet produktů vyskytujících se u obou odrůd, n_{10} zachycuje počet produktů vyskytujících se u první odrůdy a absentujících u odrůdy druhé a n_{01} naopak počet produktů vyskytujících se u druhé odrůdy při absenci u odrůdy první. V případě n_{00} se jedná o vyhodnocení případů, kdy se produkt, který se vyskytoval alespoň jednou v rámci sledované kolekce, nevyskytoval u porovnávaných genotypů. Ze tří výše zmiňovaných koeficientů je pravděpodobně nejpoužívanějším koeficient D_{NL} , i když při srovnání s D_J je možné říci, že obě funkce vyjadřují stejnou informaci.

14.6.1 Využití molekulárních markerů při správě genetických zdrojů

Během posledních sedmdesáti let došlo k výraznému zintenzivnění vývoje kvalitnějších kultivarů s vyššími užitnými vlastnostmi. Současně ale dochází postupnému vymizení krajových odrůd, případně planě rostoucích druhů, které jsou nezřídka nositeli cenných genů rezistence vůči patogenům, či odolnosti k náročnějším



ekologickým podmínkám. Tak dochází zvláště u hospodářsky nejdůležitějších druhů ke stálému zužování jejich genetického základu. Proto jsou zajímavé genotypy shromažďovány v tzv. genofondech. Při správě genetických zdrojů mohou být mimo standardně využívaných fenotypových vlastností a biochemických parametrů velmi dobře využity i výsledky molekulárních analýz.

Efektivní uchování a využití rostlinných genových zdrojů závisí ve značné míře na dostupnosti informací o úrovni a distribuci genetické diverzity v rámci sledovaného druhu. Takovéto informace umožňují optimální výběr konečně uchovávaných materiálů, vylepšují samotnou strategii uchovávání a usnadňují selekci materiálů, které jsou nejpravděpodobnějšími nositeli žádaných vlastností. Tyto vlastnosti mohou být odrazem jejich rozdílných agro-biologických vlastností, rozdílné úrovně odezvy na přítomnost škůdců či chorob, nebo také rozdílných biochemických vlastností jako je např. obsah zásobních proteinů. To všechno jsou samozřejmě vlastnosti, které jsou určeny DNA sekvencí daného organismu. Při popisu a vedení takovýchto genetických kolekcí se proto postupně stále více uplatňují také metody molekulární genetiky.

Genetické markery mohou v rámci správy genetických zdrojů napomoci například při inovaci genetických zdrojů (navržení strategie doplňování kolekce o nové vzorky a určení, která skupina není v rámci kolekce zastoupena dostatečně a naopak).

Další možné využití je v rámci údržby genetických zdrojů (např. při kontrole alelické frekvence u populace, při vyřazování duplikátů v rámci genofondů). Z literatury týkající se určování duplikátů v rámci kolekcí ale vyplývá, že použití jediné metody nemusí vždy vést ke správným závěrům.

Molekulárně genetické metody dále pomáhají při charakterizaci položek (např. u nových položek, u kterých jsou dostupná pouze některá, nebo žádná data) a při snaze o jejich efektivnější využití. Předpokládá se například, že k heterozii dochází převážně kvůli přítomnosti rozprostřených dominantních alel v rodičovských kultivarech. Šlechtitelé zaměřeni na produkci hybridních linií se pro maximální využití heterozního efektu často snaží nalézt takové linie, které se liší v co možná největším počtu lokusů.

14.6 Sekvenování DNA

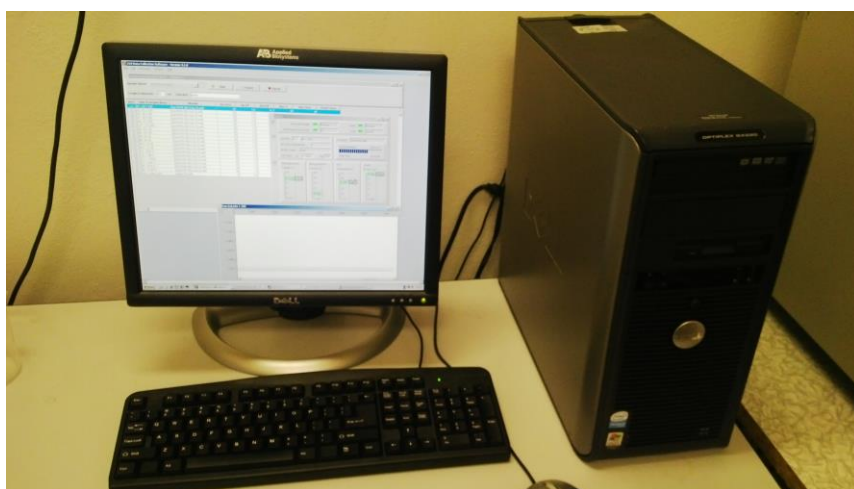
Řetězec DNA sestává mj. z po sobě jdoucích dusíkatých bází (A-adenin, C-cytosin, G-guanin, T-thymin), jejichž pořadí určuje tzv. sekvenci DNA. Sekvenování DNA je pak souhrnný termín pro biochemické metody, jimiž se pořadí bází v DNA zjišťuje.

Od sedmdesátých let 20. století je nejvíce používána enzymová metoda Fredericka Sangera, která využívá v klasické podobě dideoxyribonukleotidů a následné elektroforézy. V poslední době se do popředí dostávají hlavně metody pro masivně paralelní sekvenace nové generace a další metody, jež slibují zrychlení, znásobení a také zlevnění celého procesu. Sekvenování DNA je užitečné nejen v základním výzkumu biologických procesů, ale i v aplikovaných oborech, jimiž je diagnostika patogenů či forenzní medicína. Sekvenování se uplatnilo např. v projektu čtení lidského genomu (Human Genome Project), ale přečteny byly genomy i mnoha jiných organismů, včetně některých rostlin, živočichů, hub, mikrobů či virů. Někdy se sekvenují pouze určité části genomů, exonů či konkrétních genů. Většinou pak PCR amplikony nebo do plazmidů zaklonovné fragmenty, tyto parciální úseky DNA, slouží např. k identifikaci patogena nebo k pokročilejším genetickým či fylogenetickým analýzám.

14.6.1 Metody sekvenování

Bylo vyvinuto značné množství technik sloužících k sekvenování DNA, tyto techniky se liší některými základními principy a dále především cenou a rychlostí. Dvěma základními - historicky původními - metodami je tzv. Maxam-Gilbertovo sekvenování a Sangerovo sekvenování. Obě mají společné to, že využívají k rozřídění nukleotidů gelové elektroforézy, liší se však způsoby, jak jsou sekvence nukleotidů čteny.

Obr.č. PC s ovládacím a vyhodnocovacím software pro kapilární sekvenátor ABI PRISM 310 (Applied Biosystems)



Maxam-Gilbertova metoda

Metoda, kterou vyvinuli Allan Maxam a Walter Gilbert, se též označuje jako „chemické sekvenování“. Vzorek obsahuje krátkou sekvenci DNA (a to jak dvouvláknovou či jednovláknovou), která je na svém 5' konci radioaktivně označena fosforem ^{32}P . Tento vzorek je rozdělen v klasickém případě na pět částí a každá je vystavena reagensům, které specificky štípají sekvenci DNA v místě, kde rozpoznají jistou nukleovou bázi.

Všechny sekvence DNA se následně umístí vedle sebe do polyakrylamidového gelu a je spuštěna elektroforéza. V gelu se seřadí všechny sekvence podle své délky: nejdále v gelu doputují ty nejkratší sekvence. Dalším krokem je přiložení tohoto gelu k filmu citlivému na rentgenové záření. Na vyvolaném filmu jsou pak všechny sekvence z gelu s 5' koncem označeným radioaktivním fosforem patrné jako svítící proužky, tato metoda je označovaná jako autoradiografie. Nakonec se podle pozice těchto proužků ve srovnání s ostatními proužky vyhodnocuje, jaké bylo původní řazení nukleových bází ve vzorku DNA.

Sangerova metoda



Původní Sangerova metoda bývá často označována jako metoda „plus/mínus“. Tato metoda je vhodná k sekvenování krátké sekvence jednovláknové DNA. Ve své podstatě využívá biologického procesu replikace DNA. Výsledkem je směs různě dlouhých sekvencí DNA, které začínají radioaktivním primerem a končí daným dideoxyribonukleotidtrifosfátem. Když se seřadí na elektroforéze (podobně jako u metody Maxam–Gilbert) podle délky, je možné snadno porovnáním čtyřech vedle sebe umístěných elektroforetických gelů zjistit, jak za sebou následovaly nukleové báze ve zkoumané sekvenci DNA.

Revolučním krokem je další metoda, jež využívá fluorescenční barviva navázaná na jednotlivé dideoxyribonukleotidtrifosfáty. Tato metoda je však v principu velmi podobná Sangerovu původnímu protokolu – prodlužování sekvence skončí, když se naváže jeden z dideoxyribonukleotidtrifosfátů. Má však výhodu v tom, že je možné místo čtyř zkumavek použít jenom jednu, protože při elektroforéze jsou jednotlivé nukleotidové báze označené různými fluorescenčními barvami. Díky značení mohou být fragmenty separovány pomocí kapilární elektroforézy a separace tak může být do velké míry automatizována a tedy velice zrychlena. Nejnovějším a nejvýkonnějším typem přístroje pro kapilární sekvenaci je 3500 Genetic Analyzer (ABI/Life Technologies), který disponuje možností sekvenovat v jednom běhu až 960 vzorků.

Obr.č. Nejnovější typ kapilárního sekvenátoru 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), přístroj disponuje 24 kapilárami



Next generation sequencing



Budoucností sekvenování představují metody „next generation sequencing“ nebo-li sekvenace nové generace, zejména pak s využitím tzv. „benchtop high-throughput instruments“, tedy tzv. stolních vysoce výkonných přístrojů. Pořizovací cena těchto přístrojů je v dnešní době již relativně přijatelná a výsledky, které tyto přístroje (založené na masivně paralelním způsobu sekvenace) produkují, jsou dosud bez obdoby s ohledem na výkonnost a přesnost sekvenačních reakcí.

V dnešní době jsou dostupné 3 přístroje, které jsou velmi vhodné do laboratoří standardních možností. Jsou to přístroje, které mají rozdílné vlastnosti a využívají různých sekvenačních platform. Konkrétně se jedná o MiSeq (Illumina), 454 GS Junior (Roche) a Ion Torrent PGM (Life Technologies). Každý z těchto přístrojů je schopen generovat data k analýze genomů v rámci jednoho až několika dní. Ve studii Loman et al. (2012) je srovnán výkon těchto přístrojů na příkladu sekvenace izolátu bakterie *Escherichia coli* O104:H4, která způsobila závažná onemocnění lidí otravou z potravin roku 2011 v Německu. MiSeq vykazoval nejvyšší výkon na jeden běh (1,6 Gb/běh, 60 Mb/h) a nejnižší poměr chyb. 454 GS Junior generoval nejdelší čtení (až do 600 bází) a kvalitní srovnání sekvencovaných úseků (contigů), ale vykazoval nejnižší výstup (pouze 70 Mb/běh, 9 Mb/h). Ion Torrent PGM vykazoval nejvyšší výkonnost na jednotku času (80-100 Mb/h). Na rozdíl od MiSeq, Ion Torrent PGM a 454 GS Junior produkovaly chyby homopolymerní povahy (tzv. indel chyby 1,5 a 0,38 chyb na 100 bází) (Loman et al., 2012).

Nejpoužívanější typy masivně paralelních sekvenací

Sekvenace syntézou

Tuto platformu využívá Illumina, momentálně se jedná o světově nejúspěšnější a nejrozšířenější platformu pro NGS. Využití tzv. TruSeq technologie podporuje masivně paralelní sekvenaci při využití vlastních reverzibilních terminátorů, které jsou založeny na metodě, která umožňuje detekci jediné báze, která inkorporuje do rostoucího vlákna DNA. Fluorescenčně značený terminátor je zobrazen jako dNTP, po přidání do řetězce je štěpen a umožňuje inkorporaci další báze. Všechny čtyři reverzibilní na terminátor vázané dNTP jsou přítomny během každého sekvenačního cyklu. Přirozená soutěž těchto dNTP minimalizuje inkorporační odchylky. Konečný výsledek je přesná sekvence báze za bázi, která poskytuje průmyslově nejpřesnější data pro široké spektrum aplikací. Na webových stránkách www.illumina.com/publications jsou uvedeny publikace, které přímo využily NGS na platformě Illumina k sekvenaci rostlinných genomů, genů a transkriptomů.

Pyrosekvenace

Pyrosekvenační platformu využívají systémy Roche, jsou také založeny na sekvenaci syntézou. Detekce je založena na uvolnění pyrofosfátu v momentě inkorporace nukleotidu. Sekvence DNA je determinována emitovaným světlem za inkorporací dalšího komplementárního nukleotidu. CCD kamera zachycuje světlo, které je uvolňováno ze sekvenační reakce a výsledné signály jsou uspořádány do pořadí (Marguiles et al., 2005). Předcházející nukleotid je degradován před dalším



nukleotidem, který je synteticky přidán. Tento proces je opakován s každým ze čtyř nukleotidů, dokud sekvence DNA jednořetězcového templátu není zcela přečtena.

Semikonduktorová sekvenace

Tuto platformu využívá Life Technologies pro přístroj Ion Torrent či Ion Proton, které jsou prvními přístroji, jenž pracují se semikonduktorovým čipem, který je schopen přímo překládat chemické signály do digitální formy. Semikonduktorová sekvenace také spadá mezi způsoby sekvenace syntézou, která je však založena na detekci vodíkových iontů, které jsou uvolněny během polymerizace DNA. Jedná se o první komerční sekvenační technologii, která nevyužívá světla. Ion Torrent sekvenace využívá pouze přirozené (label-free) reagenty a reakce probíhá na Ion semikonduktorovém mikročipu (Rothberg a Myers, 2011).

Charakteristika tzv. „benchtop sekvenátorů“

Velikost genomu, rovnoměrné pokrytí, délka čtení a kvalita čtení jsou 4 zásadní faktory, které determinují možnost rekonstrukce sekvence genomu ze sekvenčních dat. Existují značné rozdíly v počtu, predikované kvalitě a délce čtení, které jsou získávány použitím zmiňovaných platform. Studie Loman et al. (2012) uvádí, že 454 GS Junior poskytuje nejdelší čtení s průměrnou délkou 522 bází, ale vykazuje nejnižší výkon ze srovnávaných instrumentů (70-71 megabází). Ion Torrent PGM generuje v běžích 4× více dat než 454 GS Junior, ale zároveň generuje data pomocí nejkratšího čtení (v průměru 121 bází). Běh přístroje MiSeq produkuje nejvyšší výkon (1,6 gigabází) se čteními delšími než Ion Torrent PGM, což plně umožňuje multiplexing 7 ras-subtypů *E.coli* v jednom běhu při pokrytí (coverage) 40× celého genomu. U přístroje MiSeq bylo ve studii využito čtení párových konců (paired-end), což znamená, že fragmenty byly sekvencovány v obou směrech.

Charakteristika tzv. „high high-throughput sekvenátorů“

Mezi takovéto přístroje řadíme přístroje jako HiSeq2500, FLX Roche, PacBio nebo Ion Proton.

HiSeq2500 (Illumina) momentálně patří k lídrům na trhu v oblasti celogenomového a celotranskriptomového sekvenování, využívá párová čtení 2×150 bp s celkovým výstupem 180 Gb. Přístroj FLX (Roche) je schopen produkovat délku čtení až do 1000 bp s celkovým výstupem 700 Mb. PacBio RSII (Pacific Biosciences) je přístroj, který má schopnost produkovat čtení až 30 tis. bází a celkový výstup může činit až 375 Mb. Nejvýkonnějším přístrojem v rámci společnosti Life Technologies je Ion Proton, který disponuje délkou čtení 200 bp a celkovým výstupem až 10 Gb.

Genetické databáze

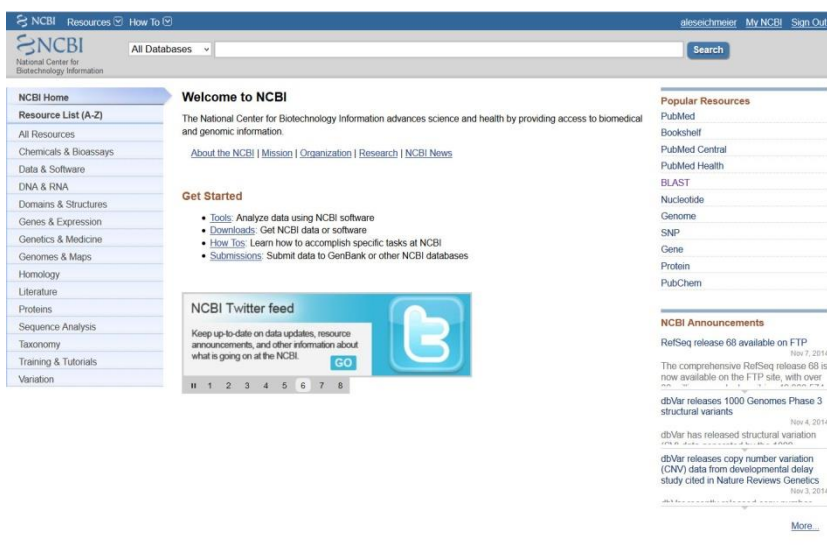
Genetické databáze jsou většinou serverové úschovny, do kterých se ukládají získané sekvence genů různých organismů, mohou to být kódující i nekódující sekvence, mohou to být také celé genomy. Ukládají se zde DNA sekvence a také sekvence



aminokyselin. Jednou z nejdůležitějších a nejnavštěvovanějších databází je databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information, tedy Národní centrum biotechnologických informací), která sídlí v USA ve městě Bethesda ve státě Maryland.

Pokud je pomocí protokolu sekvenace získána sekvence DNA, prvním krokem zpravidla bývá upravení „surové“ DNA sekvence tzv. trimmingem, což je „ořezání“ DNA sekvence o redundantní data, tedy o data nekvalitní či nadbytečná. Dalším krokem je využití některé z genetických databází k vyhledání co nejpodobnější sekvence, která je v databázi již zpravidla uložena (u některých genů se jedná o stovky či tisíce DNA sekvencí téhož úseku, tzn. DNA sekvence, které kódují např. stejný gen).

Obr.č. Úvodní stránka NCBI, tedy National Center for Biotechnology Information, na obrázku je po levé straně patrné, kolika zdroji databáze disponuje, jsou zde seřazeny od A do Z. Po pravé straně je potom sloupec populární odkazy (zdroje), kde jsou i vyhledávací nástroje jako např. BLAST (vyhledávání nukleotidových a aminokyselinových sekvencí na bázi podobnosti).



14.7 Mapování

V prvopočátcích experimentů zaměřených na genetické mapování bylo hlavním cílem identifikovat geny odpovědné za daný fenotyp anebo mutace navozující danou variantu. Určitě je vhodné připomenout, že první práce zahrnující principy genetického mapování a zařazení genů na chromozomy vzešla z pracoviště T.H. Morgana v roce 1913, tzn. hluboce před rozeznáním DNA jakožto nositelky genetické informace v roce 1953.

V té době hlavní ambicí bylo alespoň umístění daného genu na konkrétní chromozom a pokud možno kvantifikovat vzdálenost s některými dalšími kvalitativními geny, pokud se nachází na stejném chromozomu. Při určování vzdálenosti mezi geny se u tohoto klasického přístupu využívá teoretického



předpokladu, že pravděpodobnost crossing overu a tím pádem i rekombinace mezi alelami sledovaných genů je určována jejich vzdáleností na chromozomu. Mezi alelami genů, které jsou na chromozomu velmi blízko sebe, ke crossing overu a tedy i k rekombinaci prakticky nedochází a do příští generace ve zvýšené míře kosegregují v rodičovské konstituci alel. Tím, že jsou genetické mapy založeny na sledování vzájemných vztahů (vazeb) mezi geny, jsou tyto mapy někdy označovány také jako mapy „vazbové“. Kvalita genetických/vazbových map je určována dvěma hlavními faktory a to počtem genetických markerů a velikostí potomstva, přičemž spolu s rozvojem využití nejrůznějších DNA markerů není v posledních letech problém tento první nárok na počet mapovaných markerů splnit.

Rozvoj molekulární genetiky v následném období přináší možnost vytváření i tzv. fyzických map, které se svým principem od map vazbových výrazně liší. Zatímco genetické mapy jsou obvykle založeny na sledování počtu rekombinantů v potomstvu, přičemž vzdálenost mezi geny se udává jako síla vazby v centi-Morganech (cM), fyzické mapy používají fyzické vyjádření vzdálenosti, obvykle v párech bazí. Poměr mezi genetickou vzdáleností a fyzickou vzdáleností přitom nelze nijak univerzálně vyjádřit, neboť silně varíruje podle toho, ve které oblasti chromozomu se sledované geny nachází (blízko centromery, euchromatin, heterochromatin aj.).

Donedávna byly na základě svých poměrně rozdílných principů výsledky genetického a fyzického mapování poměrně striktně odděleny. Spolu s rozvojem sekvenčních technologií však stále častěji dochází k integraci znalostí poskytovaných oběma těmito přístupy a z genů na genetických mapách, o jejichž biochemické podstatě jsme donedávna nic nevěděli, se pomalu stávají konkrétní sekvence s konkrétní funkcí daného proteinu.

V případě nejdůležitějších ovocných dřevin dnes již tedy máme dispozici jak nasycené genetické mapy se stovkami zařazených DNA markerů popř. markerů pro některý fenotyp, tak i fyzické mapy jednotlivých chromozomů vzešlé ze sekvenčních projektů. Nyní je tedy jedinečná možnost využít existující informace nejenom pro vytváření map, ale také pro intenzivnější využití ve šlechtění a hlubší pochopení samotné biologie ovocných dřevin.

14.7.1 Nároky a dostupnost

Je třeba přiznat, že proces vytváření genetických popř. fyzických map u ovocných dřevin nemá v podmínkách ČR významnou tradici. Lze sice nalézt několik málo příkladů, i v nich se však obvykle jedná o případy, kdy pracovníci z českých institucí byli přizváni do širšího mezinárodního konsorcia. Důvodem je pravděpodobně skutečnost, že mapovací experimenty vyžadují vysoké finanční náklady, a proto jsou obvykle realizovány ve státech, kde daný druh představuje hospodářsky důležitou komoditu. Proto nezbývá než konstatovat, že bez finanční podpory některé z agentur podporujících vědu a výzkum nelze v podmínkách ČR zásadnější experimenty v oblasti mapování genomu některého z ovocných druhů uskutečnit.

NA druhou stranu výsledky generované velkými týmy v zahraničí naštěstí nejsou ponechávány v tajnosti a obvykle jsou sdíleny prostřednictvím veřejně přístupných portálů a databází (<http://www.rosaceae.org/>; [http://cri.fmach.eu/Research/Genomics-and-Biology-of-Fruit-Crop](http://cri.fmach.eu/Research/Genomics-and-Biology-of-Fruit-Crop;); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/388>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=malus>).



14.8 Praktická cvičení

14.8.1 Analýza genetické diverzity

Potřebné vybavení: počítač s předem staženým freewarem: FreeTree (<http://web.natur.cuni.cz/flegr/programs/freetree.htm>) a TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>), Excel, nebo jiný tabulkový editor, vytištěné fotografie gelů, tužky

Během posledních sedmdesáti let došlo k výraznému zintenzivnění vývoje kvalitnějších kultivarů s vyššími užitnými vlastnostmi. Současně ale dochází postupnému vymizení krajových odrůd, případně planě rostoucích druhů, které jsou nezřídka nositeli cenných genů rezistence vůči patogenům, či odolnosti k náročnějším ekologickým podmínkám. Tak dochází zvláště u hospodářsky nejdůležitějších druhů ke stálému zužování jejich genetického základu. Proto jsou zajímavé genotypy shromažďovány v tzv. genofondech. Při správě genetických zdrojů mohou být mimo standardně využívaných fenotypových vlastností a biochemických parametrů velmi dobře využity i výsledky molekulárních analýz. Zatímco při identifikaci odrůd jde o stanovení genetického profilu, který by měl být jedinečný a tím také odlišitelný od ostatních, při stanovení genetické diverzity jde o relativní měření genetických vzdáleností v rámci skupiny sledovaných genotypů pomocí vybraných markerů. V literatuře jsou při výpočtu genetické rozdílnosti mezi dvěma jednotlivci nejčastěji zmiňovány a používány tyto tři koeficienty : Dice / NEI a LI (1979), JACCARD (1908), SOKAL a MICHENER (1958).

K analýze genetické diverzity je vhodné využívat metody molekulární genetiky, které poskytují více produktů v rámci jednoho experimentu. Na úrovni rodů a druhů, případně odrůd většinou postačí metoda RAPD (případně další metody), která je technicky poměrně jednoduchá a relativně levná. Pro analýzu úzce příbuzných genotypů, jako jsou odrůdy a zejména klony je vhodná metoda AFLP. Tato je technicky a finančně náročnější, vyžadují již jisté zkušenosti a přesné dodržování protokolu. Na druhou stranu v rámci jednoho experimentu poskytuje velké množství produktů a její výsledky bývají dobře opakovatelné.

Pracovní postup

V rámci cvičení studenti vyhodnotí již hotové fotografie RAPD fingerprintů. RAPD analýza byla provedena na souboru genotypů broskvoní z genofondu ZF v Lednici.

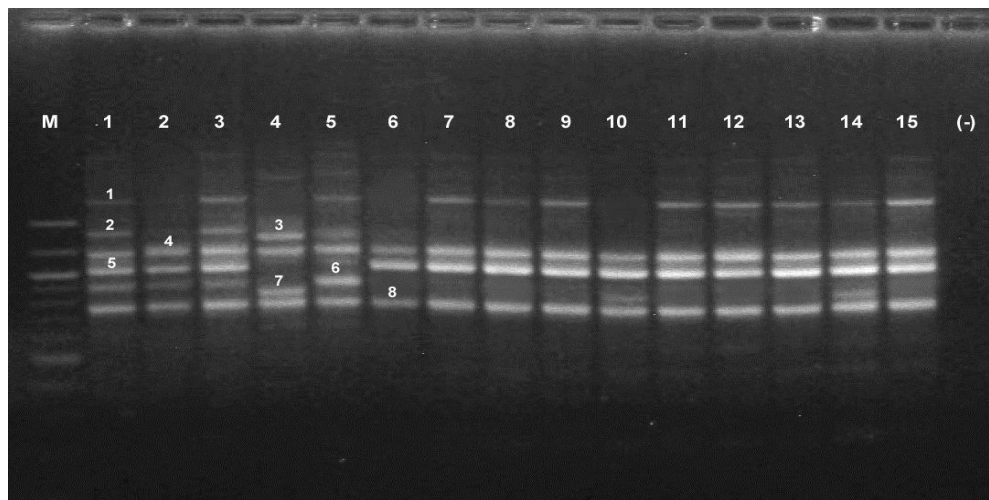
- Každý student (případně dvojice) obdrží vytištěnou fotografii gelu - optimálně každý jinou (soubor fotografií k dispozici na přiloženém CD, tak aby je bylo možné jednoduše vytisknout)

Obr.14.3: snímek agarózového gelu - spektrum RAPD produktů získaných při použití primeru OPE-1 u skupiny genotypů rodu *Prunus* L. M – velikostní standard 100 bp DNA ladder- velikost pruhů (pb) shora dolů: 3000, 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300. Čísla vepsaná do fingerprintu označují PCR produkty konkrétní velikosti, které byly hodnoceny.

Čísla nahoře v řádku označují jednotlivé genotypy *Prunus* L: broskvomandloně – Kando (1), GF 677 (2), Požár (3), BM-RL (6), botanický druh - *Prunus davidiana* /Carr./ Franch. (4), mandloň – IB 3 (5) a broskvoně - Favorita Morettini (7), Envoy (8), Springcrest (9), Harbrite



(10), Catherina (11), Redhaven (12), Baby Gold 5 (13), Baby Gold 6 (14), Harbinger (15) (©Baránek)



- Tužkou si v řádcích spojte produkty o stejné velikosti a pokuste se jejich velikost odhadnout podle velikostního standardu
- Na papír si připravte tabulku: do hlavičky sloupců napište označení jednotlivých genotypů, v řádcích bude uvedena velikost jednotlivých produktů

Tab.č. 14.1.: Ukázka vyhodnocení RAPD fingerprintu – hodnocen obrázek č. 14.3 (první sloupec nemusí studenti do svých poznámek zapisovat, slouží pouze pro snadnější pochopení principu hodnocení)

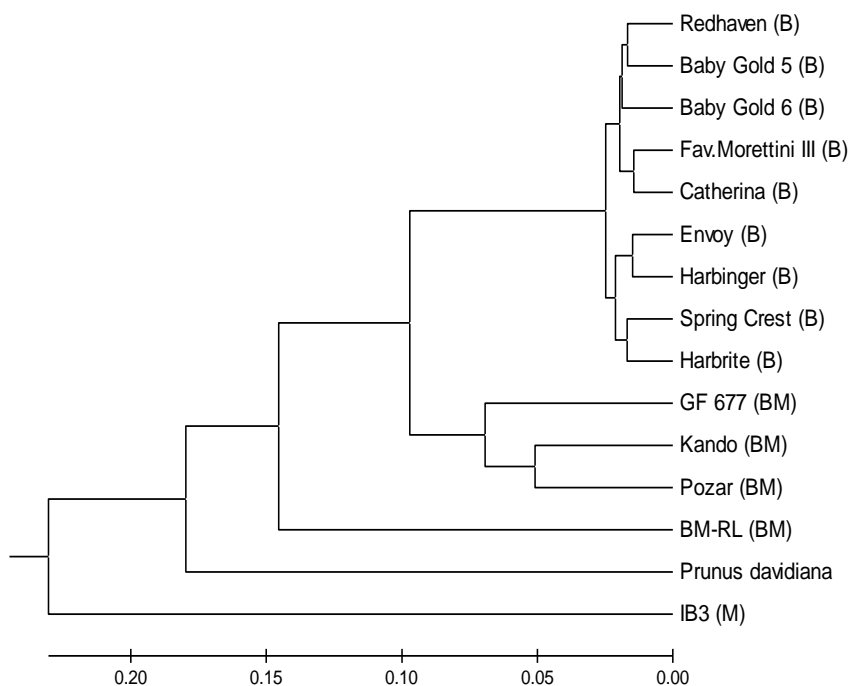
označení na fotce	velikost PCR produktu	genotypy broskvoní														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	3500	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
2	2500	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1600	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1050	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	900	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	820	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
8	750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

- Do tabulky postupně zapisujte čísla: 1 – v případě, že je PCR produkt dané velikosti u daného genotypu přítomen, nebo 0 – v případě že přítomen není – takto vytvořenou tabulku označujeme jako „binární matice“
- Hodnoťte pouze PCR produkty silné a střední intenzity, slabé produkty se nepovažují za věrohodné a jejich opakovatelnost bývá špatná
- Studenti po dokončení práce postupně zapisují získané výsledky do jedné souhrnné tabulky v Excelu (nebo jiném editoru) pod sebou bez vynechaných řádků – po zapsání všech dat zkontrolujte, zda jsou všechna políčka vyplněna – programy pro analýzu genetických dat neumí tato prázdná místa zpracovat
- Tabulku v Excelu označte včetně řádku s označením jednotlivých genotypů (pro větší přehlednost je lépe vypsát celá jména, než pouze čísla) a sloupce s velikostí alel
- Otevřete program FreeTree, z nabídky „File“ vyberte „new analyses“ a nakopírujte označená data z Excelu



- Rozklikněte odkaz „Distance/similarity matrix“, zatrhněte metodu výpočtu UPGMA a vyberte jeden z nabízených koeficientů – nejčastěji je používán Nei and Li/Dice. Program spočítá koeficienty podobnosti mezi analyzovanými genotypy
- Program spočítá koeficienty pro všechny kombinace genotypů. Získané číslo nám udává míru příbuznosti mezi dvěma konkrétními genotypy – např. 0,724 říká, že genotyp A má 72% PCR produktů stejných s genotypem B a 28 % je odlišných
- Rozklikněte odkaz „Reference Tree“ a objeví se velmi primitivní dendrogram. Zkopírujte algoritmus zobrazený v příkazovém řádku
- Otevřete program TreeView a rozklikněte nabídku „edit“ a vyberte možnost „paste“ Zobrazí se Vám strom genetické příbuznosti označovaný též jako dendrogram. Jedná se o grafické znázornění míry příbuznosti jednotlivých genotypů. Čím kratší jsou jednotlivé větve, tím blíže jsou jednotlivé genotypy vzájemně příbuzné. Klikáním v liště můžete přepínat mezi různými typy dendrogramů.

Obr.č. 14.4: Dendrogram genetické příbuznosti broskvoní. Bylo analyzováno 37 primerů a hodnoceno 218 PCR produktů, z nichž 84 % bylo polymorfních. (© Baránek)



- Podívejte se, jak jsou v dendrogram rozděleny jednotlivé genotypy. Odpovídá jejich rozdělení teoretickým předpokladům?
- Porovnejte dendrogram, který jste získali na základě vašeho hodnocení s výše uvedeným.
- Který vám připadá věrohodnější? Pokuste se svou domněnku zdůvodnit.

14.8.2 Využití DNA markerů pro ranou selekci genotypů révy podle barvy bobule



Nezbytné vybavení laboratoře: sada mikropipet a příslušné plastové špičky, mikrozkušavky, termocykler. Reagencie pro PCR, primery– VvmybA1(3)F (TGAATTCCTCTGGACGTAA) Vvmyb A1(3)R (TTATGGTGCATTACTGGCTT)

Postradatelné vybavení: minicentrifuga, vortex, chladicí stojánky na mikrozkušavky,

Smyslem tohoto cvičení je na jedné straně naučit studenty základům práce v molekulárně genetické laboratoři, seznámit je s principem PCR a přípravou reakčního mixu, na straně druhé jim na praktickém příkladu ukázat využití MAS v praxi. Navíc je možno studentům vysvětlit funkci retrotraspozonů v genomu, vznik a praktický dopad mutací zapříčiněných tímto biologickým mutagenem.

Řada odrůd révy se vyskytuje v různých mutacích v barvě bobulí (Např. Rulandské modré, šedé a bílé, Chrupka červená a bílá). Zajímavostí je, že SSR profil těchto odrůd je totožný a všechny tyto odrůdy mají ve svém genomu geny nutné pro syntézu barviv. Ukázalo se, že fakt, zda dojde k transkripci genů kódujících pigmentaci plodů je zodpovědná přítomnost, resp. nepřítomnost transkripčního faktoru, který je kódován regulačním genem *VvmybA1*. V případě, že je transkripce tohoto genu zablokována vložením retrotranspozonu *Gret 1* do jeho promotoru, transkripční faktor se netvoří a nedochází k syntéze barviv v plodech. Primerový pár VvmybA1(3) je komplementární k regulačnímu genu *VvmybA1* a v případě, že je tento gen zablokován retrotranspozonem, nenaleznou primery cílové místo k hybridizaci a nedochází k amplifikaci produktu o délce 193 pb. Tato varianta nastává u genotypů s bílou barvou hroznů. V případě, že gen retrotranspozonem zablokovaný není, na gelu nalezneme PCR produkt očekávané délky.

Pracovní protokol

Studenti pracují optimálně ve dvojicích, mají laboratorní pláště a rukavice. Každá dvojice obdrží stojánek s nachystanými reagensy.

- Do stojánku si nachystejte mikrozkušavky (0,2 ml) – víčka popište označením vzorků (1, 2, 3...blank.), které budete analyzovat
- V příložené tabulce si v posledním sloupci spočítejte objemy jednotlivých reagensů, které budete pro přípravu mixu potřebovat a to tak, že vynásobíte objem potřebný pro 1 reakci počtem analyzovaných vzorků, ke kterému přičtete. Rezerva pokrývá nepřesnosti při pipetování a může současně sloužit jako slepý (blank) vzorek (bez DNA)

Tab. 14.2: Složení PCR mixu při použití primerů VvMyb A1(3)



	c zásobních reagentů	c reagentů v reakci	1 reakce (μl)	celkový objem pro x vzorků
HPLC voda			12,1	
5 x pufr	5x	1x	5	
MgCl ₂	25mM	1,5mM	1,5	
dNTP	25mM	0,2 mM	0,2	
Primer F	10 μM	20 pmol	2	
Primer R	10 μM	20 pmol	2	
Polymeráza	5U/μl	1 U	0,2	
celkový objem pro 1 vzorek			23	23
DNA		20 ng	2	2
celkový objem reakce			25	

- Jednu mikrozkušavku označte „mix“ a postupně do ní pipetujte odměřené množství složek PCR v pořadí, v jakém jsou uvedeny v tabulce. Mastermix se připravuje pro všechny vzorky společně, proto pipetujeme hodnoty uvedené v posledním sloupci. Jako poslední přidejte polymerázu. Tento enzym se uchovává v glycerolu, proto se nemusí rozmrazovat. Z mrazáku ho vytahujeme pouze na nezbytně nutnou dobu a při práci udržujeme v chladícím stojánku.
- Jakmile jste do zkumavky s označením „mix“ přidali všechny potřebné reagenty, zkumavku uzavřete a obsah promíchejte na vortexu a stočte v centrifuze
- Mix rozpipetujte do malých mikrozkušavek po 23 μl – pokud jste správně počítali a pipetovali, vyjde objem i na „blank“ - kontrolní vzorek bez DNA, který ukazuje na čistotu chemikálií a pečlivost při přípravě mixu
- Do každé mikrozkušavky přidejte 2 μl analyzované DNA – pro každý vzorek je NUTNÉ použít ČISTOU ŠPIČKU a mikrozkušavky dobře uzavřít
- Mikrozkušavky naskládejte do termocykleru a zvolte příslušný program. Před spuštěním programu se ujistěte, že jsou vzorky nezaměnitelně označeny

Tab. 14.3: Teplotní profil PCR pro primery VvmybA1(3) – pro zvýšení specifity primerů je použit „Touch down“ program, kdy v prvním kroku dochází k hybridizaci primerů s analyzovanou DNA při relativně vysoké teplotě, což zvyšuje specifitu hybridizace. V každém dalším kroku se teplota hybridizace snižuje o 1°C až na 57°C. V dalších cyklech už se tato teplota nemění.

program →		t (°C)	čas		opakování
krok ↓			min.	sec.	
1	denaturace	94	3		
2	denaturace	94		45	
3	hybridizace primeru	62→57		45	6 x
4	prodlužování řetězce	72	1	30	
5	denaturace	94		45	
6	hybridizace primeru	57		45	25 x
7	prodlužování řetězce	72	1	30	
8	dosyntetizování řetězců	72	10		
9	chlazení	4		

Pozn.: na toto cvičení optimálně navazuje další cvičení – využití elektroforézy pro separaci nukleových kyselin. Bez navazujícího cvičení nemá smysl připravovat PCR s drahými reagenty a nácvik přípravy PCR mixu je možné provést s vodou.



14.8.3 Využití elektroforézy k separaci nukleových kyselin

Potřebné vybavení laboratoře: odměrný válec, nádoba z varného skla, sada mikropipet, mikrovlnná trouba, elektromagnetická míchačka, horizontální elektroforéza + zdroj elektrického napětí, UV transiluminátor, digitální fotoaparát (optimálně fotodokumentační systém včetně černé komory propojený s počítačem)

Příprava agarózového gelu

- Spočítejte navážku práškové agarózy pro 1,5 % gel v potřebném objemu (řídí se velikostí formy pro nalévání gelu - obvykle cca 150 ml).
- Nařeďte si požadovaný objem elektroforetického pufru na koncentraci 1 x –příslušný pufr bývá v laboratoři obvykle skladován v koncentraci 50 x. Odměřený objem pufru nalijte do nádoby z varného skla (může být i zavařovací sklenice). Nádoba by měla mít dostatečný objem (alespoň dvojnásobný, jako objem gelu), aby nedošlo k vyvření gelu.
- Do pufru nasypete odvážené množství agarózy (kvalita pro elektroforézu – nelze použít agarózu pro přípravu médií v *in vitro*)
- Nádobu přiklopte (např. Petriho miskou, ne na pevnou), umístěte do mikrovlnné trouby a zahřívejte. Agarózový gel vařte tak dlouho, dokud nedosáhnete úplné čirosti - nesmí v něm plavat žádné nerozvařené zbytky agarózového prášku.
- Nádobu opatrně vyndejte z mikrovlnné trouby a za stálého míchání na magnetické míchačce nechejte přiklopený gel pozvolna chladit. Gel je možné nalévat do formy v okamžiku, kdy v něm nejsou žádné bublinky.
- Do gelu přidejte interkalační barvivo v koncentraci doporučené výrobcem a gel nechejte řádně promíchat. Nejčastěji je používán ethidium bromid: je ale dosti mutagenní a je třeba mít pro práci s takto barvenými gely k dispozici vyčleněnou zvláštní místnost. Lépe je tedy zejména pro práci se studenty použít dražší barviva jako např. GelRed, GelGreen, nebo Sybr Green, která mají nižší klasifikaci nebezpečnosti
- Částečně zchladlý obarvený gel (stále tekutý – bez sraženin) nalijeme do připravené formy a vložíme „hřeben“. Naléváním příliš horkého gelu zkracujeme životnost plastových forem. Počkáme, až gel ztuhne

Příprava vzorků pro dávkování

Dávkování vzorků vyžaduje jistou zručnost a pro méně šikovné začátečníky se jedná o poměrně náročný úkol. Je třeba si proto při přípravě cvičení vyčlenit dostatek času.

Vzorky: optimálně použijte PCR produkty, které jste si připravili v předcházejícím cvičení. Na gel je ovšem možné dávkovat jakoukoliv DNA (i genomickou DNA bez předchozí amplifikace), pro nácvik pak postačí i obyčejná voda. Optimální objem pro nácvik je 25 – 30 μ l, čemuž musí odpovídat i velikost dávkovací komůrky v gelu.



- Do stojánku si připravte mikrozkušavky se vzorky určenými k dávkování (nejlépe mikrozkušavky, které jste po amplifikaci vytáhli z cykleru a do doby cvičení uschovali v mrazáku)
- Ke každému vzorku (25 μ l) přidejte cca 5 μ l dávkovacího pufru (přesný objem není rozhodující pro výsledek). Dávkovací pufr díky své viskozitě strhává vzorky na dno dávkovací komůrky a obsahuje barevné složky, které se pohybují v elektrickém poli nezávisle na DNA a vytváří tak na gelu barevný pruh. Rychlost migrace jednotlivých barviv je známá - díky tomu můžeme odhadnout vhodnou dobu ukončení elektroforézy.
- Ze ztuhlého gelu opatrně uvolněte „hřeben“ a formu s gelem vložte do elektroforézy tak, aby elektroforetický pufr zaplnil komory vytvořené v gelu hřebenem.
- Mikropipetou naberte celý obsah mikrozkušavky – vzorek + dávkovací pufr (celkem cca 30 μ l), špičku vložte na okraj komůrky a obsah opatrně vypusťte do dávkovací komory. Díky barevnému dávkovacímu pufru uvidíte, jak vzorek klesá na dno komůrky. Při pipetování dávejte pozor, abyste špičkou nepropíchnuli dno komůrky, nebo již nadávkovaný vzorek nevysáli špičkou zpět z komory.

Obr.č. 14.5: Dávkování vzorků DNA do komor agarózového gelu.



- Do komory za posledním vzorkem (nebo uprostřed mezi vzorky) nadávkujte velikostní standard v objemu dle doporučení výrobce. Velikost zájmového PCR produktu z předcházejícího cvičení je 193 pb – pro tento PCR produkt je vhodné použít „100 bp DNA ladder“, nebo jiný s podobným rozmezím fragmentů.
- Během dávkování pečlivě kontrolujte sled jednotlivých vzorků, který si poznamenejte i s pozicí velikostního standardu a „blanku“
- Elektroforézu uzavřete a připojte ke zdroji a nastavte napětí 100 V
- Podle pohybu barevného pruhu v gelu odhadneme čas ukončení elektroforézy – např. Orange G se pohybuje přibližně stejnou rychlostí jako fragment DNA o velikosti 70 pb. Jakmile oranžový pruh doputuje asi 10 cm od komor, je separace PCR fragmentů dostatečná k tomu, aby bylo možné správně odlišit jednotlivé pruhy a orientačně stanovit jejich velikost podle velikostního standardu. Délka separace se dle nastavených podmínek pohybuje kolem 40 – 50 minut.
- Po ukončení separace vyjmeme formu i s gelem z elektroforézy, osušíme papírovým ručníkem a přeneseme na UV transiluminátor
- Během sledování pruhů DNA na gelu je nezbytné chránit si obličej a zejména zrak před účinky UV záření plastovým krytem, který bývá součástí transiluminátoru.

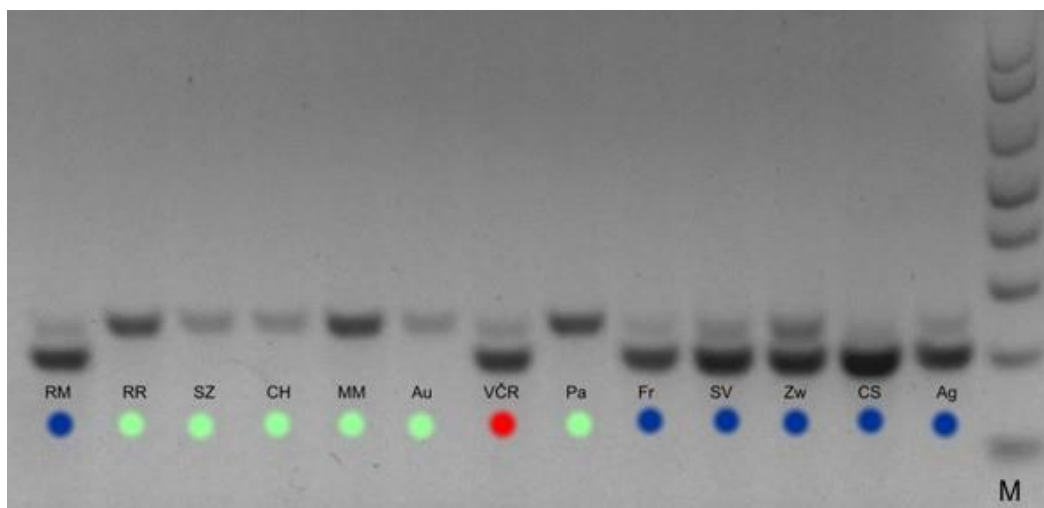


- Získaný výsledek dokumentujeme pomocí digitálního fotoaparátu. Získanou fotografii upravíme a vzorky popíšeme v některém z běžně dostupných programů pro úpravu fotografií.

14.8.4. Vyhodnocení praktického cvičení 14.8.2 a 14.8.3

Po úpravě fotografie byste měli získat podobný obrázek.

Obr.č.14.6: Marker pro barvu bobulí révy. Analýza provedena s primery VvMybA1(3). Produkt velikosti 193 pb (na obrázku ten dolní) je markerem pro červenou a modrou barvu bobule. Názvy odrůd révy uvedeny oficiálními zkratkami, barevné tečky udávají skutečnou barvu hroznů. Velikostní standard (marker) 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen) je označen „M“ – velikost jednotlivých fragmentů (pb) zesponu nahoru: 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000. (©: Baránková)



Vyhodnocení: v případě, že je produkt o velikosti 193 pb na gelu přítomen, hrozny mají barvu modrou, nebo červenou, v případě, že přítomen není, rostlina nemůže syntetizovat antokyany, barva bobulí je tudíž „bílá“ – žlutá.

Praktické využití MAS (selekcce za pomoci markeru) při šlechtění révy: Šlechtitel provedl křížení u révy a rád by mimo jiné vlastnosti získal nový hybrid s konkrétní barvou bobule. Po výsevu odebere z každého označeného semenáče jeden list, z kterého je v laboratoři izolována DNA. Po PCR reakci (cvičení 14.9.2) a separaci PCR produktů (cvičení 14.9.3), je možné šlechtiteli sdělit, jakou barvu hroznů budou jeho hybridi mít. Pro další práci tak může použít pouze vybrané rostliny a ušetří tak čas a náklady na 3 – 4 roky pěstování, než by novošlechtění hybridy přinesli první sklizeň.



14.9 Kontrolní otázky

- Jaké látky mohou kontaminovat izolát DNA a negativně ovlivňovat PCR?
- Je možné srážet DNA a jak?
- Proč je možné separovat DNA podle velikosti pomocí gelové elektroforézy?
- Jakou hlavní výhodu má polyakrylamidový gel oproti agarózovému při separaci fragmentů DNA?
- Jaké látky se používají pro vizualizaci DNA v gelu?
- Kolik primerů využívá metoda RAPD?
- Jakou oblast genomu analyzuje metoda SSR?
- Jaké dva přístupy k analýze DNA kombinuje metoda AFLP?
- Co je to marker?
- Jaké jsou hlavní důvody k využívání molekulárních markerů při selekci genotypů ve šlechtitelském procesu?
- Která je nejvhodnější metoda pro identifikace odrůd a proč?
- Jaký je rozdíl mezi vazbovou a fyzickou mapou?

Rejstřík pojmů

Adheze - přilnavost, zejména dvou rozdílných materiálů

Alela - konkrétní forma genu

Amplifikace - rozmnožení, zvýraznění, zesílení

Anoda - elektroda, která má kladný náboj a přitahuje záporně nabitě ionty

bulková analýza - analýza směsi genotypů vykazujících stejnou fenotypovou vlastnost

cM - centiMorgan - mapová jednotka vyjadřující sílu vazby (1% rekombinací v chromozomové oblasti vymezené 2 danými geny)

crossing over - proces, během kterého si dva homologní chromozomy spárované v profázi I meiózy vymění části chromozomů

diverzita - rozmanitost

DNA - deoxyribonukleová kyselina

Elektroforéza - separační metoda, která využívá k oddělení látek jejich rozdílnou pohyblivost ve stejnosměrném elektrickém poli

Elektrolyt - roztok (nebo tavenina), který vede elektrický proud



fingerprinting (DNA) - metoda (nebo soubor metod), pomocí níž lze identifikovat genotyp (jedince), nebo skupinu úzce příbuzných genotypů (klon, odrůda)

fluorescence - fotoluminiscenční záření vyvolané účinkem jiného záření, nebo účinkem dopadajících částic

fluorometr - přístroj měřící parametry fluorescence

genom - veškerá genetická informace konkrétního organismu - kompletní sekvence DNA (RNA u virů) jedné sady chromozomů + DNA mitochondrií a plastidů

genotyp - informace o genetické konstituci buňky, organismu, nebo jedince

heteroze - jev při křížení, kdy hybridi první generace kvalitativně převyšují své rodiče

hybridizace ve šlechtění - křížení

hybridizace v biochemii - navázání jednovláknové molekuly (RNA/DNA) na jinou jednovláknovou molekulu (DNA/RNA)

chaotropní soli - iontové sloučeniny, které snižují strukturovanost vody

isoenzym - proteiny, které se liší primární strukturou, ale katalyzují stejnou reakci

katoda - elektroda, která má záporný náboj a přitahuje kladně nabitě ionty

kit – sada

kodominance - vztah dvou odlišných alel téhož genu, kdy se u heterozygota uplatňují obě alely rovnocenně a paralelně

komplementarita DNA - vztah vzájemné doplňkovosti - párování purinových a pyrimidinových bazí v řetězci DNA ve smyslu A-T a G-C

lokus - přesné místo (pozice) na chromozomu

lýza - rozklad buněk v důsledku rozpadu jejich buněčné membrány

marker - identifikační znak

mikrosatelit - sekvence repetitivní DNA sestávající z opakujících se jednotek o velikosti 1 - 6 pb

polymerace - chemická reakce, při které z malých molekul (monomerů) vznikají vysokomolekulární látky (polymery)

polymorfismus - proměnlivost, schopnost zaujímat více forem

primer - krátký úsek NK (nebo proteinu), který slouží jako počáteční místo replikace

rekombinace (v genetice) - změny DNA vzniklé rozštípnutím a připojením k jinému řetězci, vznik nových vlastností

segregace (v genetice) - náhodný rozestup chromozomů do pohlavních buněk

silika - hydratovaný oxid křemičitý

spektrofotometrie - stanovení vlastností (např. koncentrace) vzorku na základě pohlcování světla v různých vlnových délkách