

15. Molekulární markery a jejich využití

Použití molekulárních markerů významně doplňuje různé klasické metody genetické analýzy. Dříve byly jako molekulární markery používané především bílkoviny a jejich různé varianty, tzv. izoenzymy. V současné době se však využívá nejčastěji DNA markerů, které jsou oproti izoenzymům více variabilní a mohou charakterizovat celý genom.

15.1 Charakteristika DNA markerů

DNA markery jsou založeny na polymorfizmu, tedy variabilitě v sekvencích DNA. Jako DNA markery mohou být využity jen ty sekvence, které mají následující vlastnosti:

- (1) vysoký polymorfizmus,
- (2) nejlépe kodominantní charakter dědičnosti,
- (3) častý výskyt v genomu,
- (4) nezávislost na podmínkách prostředí,
- (5) snadné a rychlé testování,
- (6) vysoká reprodukovatelnost,
- (7) snadná výměna údajů mezi laboratořemi.

Není snadné najít marker, který by splňoval všechna kritéria. Podle cíle studia je potřeba zvolit nejvhodnější typ markerů. Z hlediska použité metody se DNA markery dělí na markery založené na hybridizaci DNA a markery založené na polymerázové řetězové reakci (PCR). V první skupině markerů se DNA profily vizualizují prostřednictvím hybridizace fragmentů DNA štěpené restrikcí enzymem se značenou sondou. DNA sonda je fragment DNA známého původu a sekvence. Ve druhé skupině jsou markery založené na *in vitro* amplifikaci určitých sekvencí DNA nebo lokusů prostřednictvím specifických i nespecifických primerů (nukleotidových sekvencí) za účasti termostabilního enzymu DNA polymerázy. Amplifikované fragmenty se separují elektroforeticky a spektra jsou detekována po obarvení (např. ethidiumbromidem) nebo autoradiograficky.

15.2. Typy DNA markerů

15.2.1 Jednokopiové a vícekopiové sondy

RFLP

RFLP (angl. restriction fragment length polymorphism) markery jsou založeny na změnách v sekvencích DNA, ke kterým docházelo během evoluce. Tyto změny způsobují bodové mutace v místech štěpení restriktivními enzymy, inserce nebo delece, mohou být důsledkem nerovnoměrného crossing-overu v rámci určitého chromozomu. Analýza RFLP markerů využívá štěpení restriktivními enzymy, elektroforetické rozdělení získaných fragmentů, přenos na membránu a vizualizaci hybridizací se speciální sondou. RFLP markery byly u rostlin poprvé použity ke konstrukci genetických map. Jsou to kodominantní markery, které umožňují určit, zda je vázaný znak přítomen u určitého jedince v homozygotním nebo heterozygotním stavu. Nevýhodou je vysoká výchozí koncentrace DNA potřebná pro restriktivní štěpení a Southernovu hybridizaci. Také radioaktivní značení sondy přináší určitá rizika. Byla však již vypracována řada neradioaktivních metod značení sondy. Analýza je časově dosti náročná a pracná a jen několik markerů má polymorfní charakter, což je nevýhodné především u blízké příbuzných druhů.

SSCP

SSCP (angl. single strand conformation polymorphism) je vhodná metoda pro analýzu genů zvláště při detekci bodových mutací a zjišťování DNA polymorfizmu. Je možné identifikovat heterozygotnost fragmentů DNA o stejné molekulové hmotnosti a je možné detekovat změny v několika nukleotidech, protože mobilita jednořetězcové DNA se mění se změnou jeho obsahu GC bazí vlivem konformačních změn.

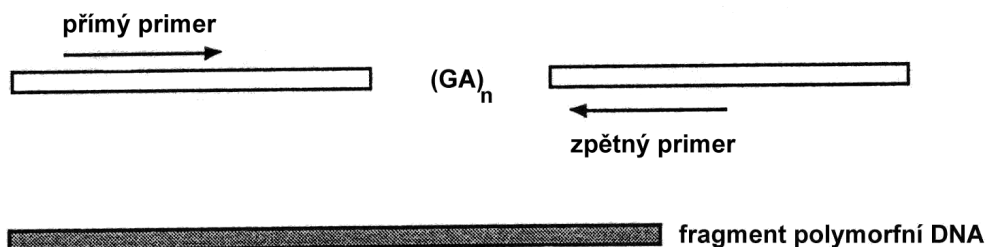
15.2.2 Mnohokopiové sondy

SSR

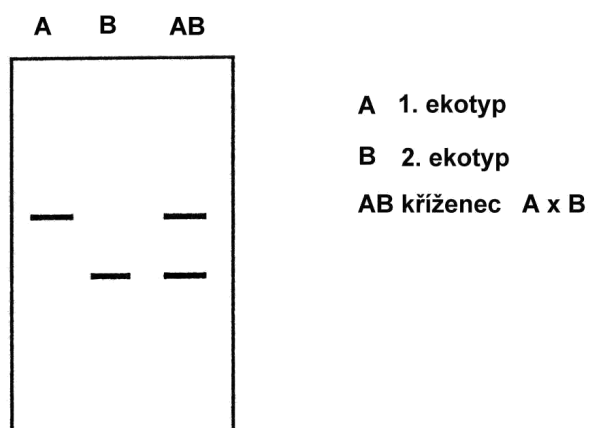
Sekvence mikrosatelitů jsou obvykle polymorfní u různých ekotypů *A. thaliana*, a proto jsou vhodné jako molekulární markery (SSR - angl. simple sequence repeats, SSLP - angl. simple sequence length polymorphisms, STR - angl. short tandem repeats). Často se vyskytují opakování $(GA)_n$, $(A)_n$, $(CAG)_n$. Obvykle se tato polymorfní místa vyskytují v nekódujících oblastech, protože by měnily čtecí rámec odpovídajícího bílkovinného produktu. Aby byl vytvořen PCR marker, nukleotidy z ohraničující oblasti jsou vytvořeny tak, aby amplifikovaly malý úsek zahrnující polymorfní sekvenci. SSR jsou kodominantní markery, takže umožňují rozlišení homozygotů (1 fragment) a heterozygotů (2 fragmenty) po elektroforéze (obr. 15.1). Obvyklá délka fragmentů je 100 až 250 bp.

Obr. 15.1: Vizualizace mikrosatelitového markeru polymerázovou řetězovou reakcí.

A PCR



B Elektroforéza



VNTR

Metoda VNTR (angl. variable number tandem repeats) kombinuje sondy, které jsou hybridizovány s membránami obsahujícími DNA, která byla štěpena restrikcí enzymy. Polymorfismus je způsoben rozdíly v počtu opakování.

RAPD, AP-PCR, DAF

Markery RAPD (angl. random amplified polymorphic DNA), AP-PCR (angl. arbitrary primed PCR) a DAF (angl. DNA amplification fingerprinting) využívají jednoho nebo více syntetických oligonukleotidů různé délky jako hraniční sekvence pro specifická nebo nespecifická místa v genomu. Většinou jde o dominantní markery, které neodlišují heterozygoty od dominantních homozygotů.

Metoda RAPD je založena na možnosti cyklické amplifikace DNA fragmentů. Reakce probíhá za přítomnosti jednoho krátkého oligonukleotidu (8 - 10 nukleotidů) s náhodně vybranou sekvencí bazí, genomové DNA, směsi nukleotidů dNTP, reakčního pufru a termostabilní DNA polymerázy. Reakce probíhá v programovatelném termocyklu. RAPD na rozdíl od specifické PCR nevyžaduje znalost cílových sekvencí DNA.

Informativní charakter RAPD markerů lze zvýšit další modifikací, kterou umožňuje metoda RAMPO (angl. random amplified microsatellite polymorphism). V první fázi je genomová DNA amplifikována pomocí jednoho náhodného primeru nebo pomocí dvojice primerů komplementárních k sekvenci mikrosatelitů. Po elektroforetické separaci produktu amplifikace a jeho přenesení na membránu se provádí hybridizace se značenou mikrosatelitovou sondou.

DAF (angl. DNA amplification fingerprinting) je modifikovaná RAPD. Na rozdíl od RAPD je produkt PCR separován v polyakrylamidovém gelu a vizualizován po barvení stříbrem. Primery jsou až 5 nukleotidů dlouhé a vytváří komplexní spektrum. Aplikace metody je vhodná především pro získání genomového otisku (tzv. fingerprint).

DGGE

DGGE (angl. denaturing gradient gel-electrophoresis) umožňuje rozlišit dva fragmenty podobné nebo stejné délky. Rozdíly i v jedné bázi mají za následek různou migraci fragmentů a v důsledku toho se tvoří polymorfní fragmenty. Proto je tato metoda velice vhodná pro autogamní druhy. Tato metoda byla úspěšně použita např. u pšenice a ječmene. Jeden nebo dva primery stačily k rozlišení dvou linií. Metoda je také vhodná při fylogenetické analýze a identifikaci odrůd.

SCAR

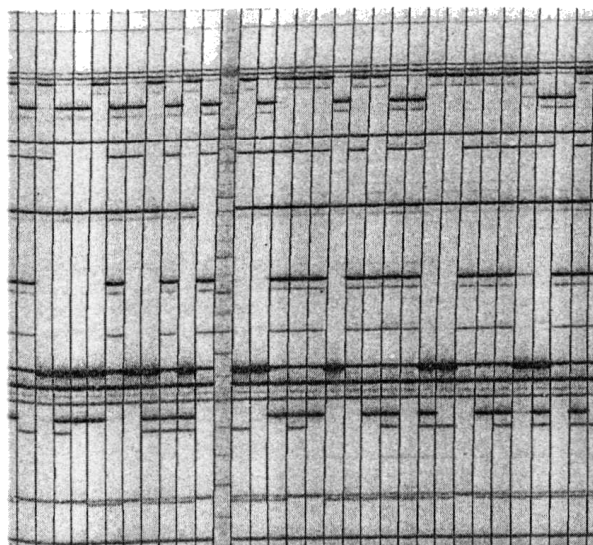
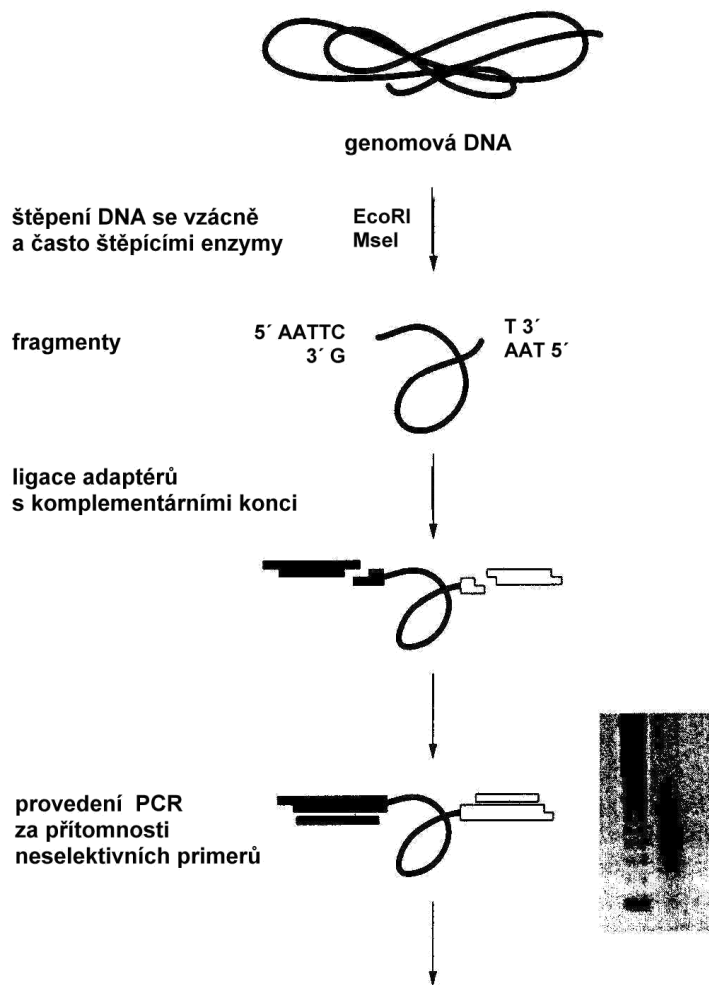
U metody SCAR (angl. sequence characterised amplified regions) se využívá polymorfního RAPD markeru (DNA fragment), který je klonován a sekvenován. 22 až 24 nukleotidů je využito k určení nových primerů pro amplifikaci dalšího fragmentu. V tomto případě jde o specifický marker vhodný pro amplifikaci určitého lokusu. Tyto markery jsou lépe reprodukovatelné v porovnání s RAPD.

AFLP

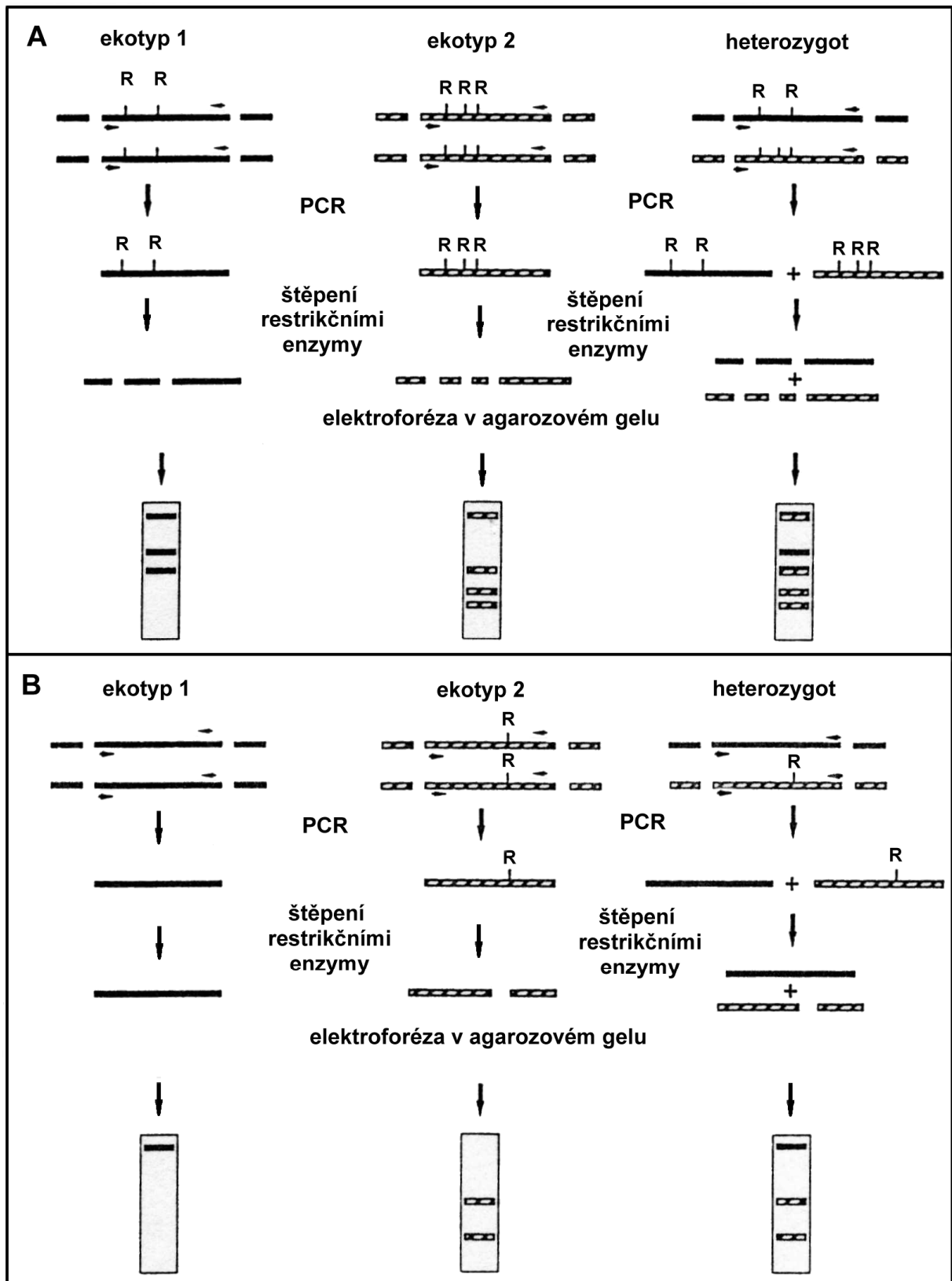
Metoda AFLP (angl. amplified fragment length polymorphism) kombinuje postupy jak RFLP tak PCR. Uskutečňuje se v několika krocích a je založena na detekci fragmentů DNA získaných štěpením restrikcími endonukleázami prostřednictvím PCR amplifikace (obr. 15.2). V prvním kroku se provede štěpení rostlinné genomové DNA restrikcími endonukleázami. Používají se dvě, často a vzácně štěpící rostlinnou DNA, např. *EcoRI* a *MseI*. V dalším kroku se provádí ligace adaptérů, což jsou krátké většinou radioaktivně značené oligonukleotidy, které jsou komplementární k vytvořeným restrikcími místům rostlinné DNA. Dále se provede amplifikace fragmentů s primery, které se komplementárně vážou na sekvence adaptérů a sousední selektivní nukleotidy. V dalším kroku se provede elektroforéza v polyakrylamidovém gelu a autoradiografie.

Spektrum fragmentů je možné získat bez předcházející znalosti sekvence a počet fragmentů detekovaných v jedné reakci je „vyladěn“ sadami specifických primerů. Metoda je vhodná především k detekci polymorfizmu u blízké příbuzných genotypů.

Obr. 15.2: Jednotlivé kroky při identifikaci AFLP markerů.



Obr. 15.3: Dva příklady (A, B) identifikace polymorfních kodominantních CAPS markerů.



Markery CAPS (angl. cleaved amplified polymorphic sequences) jsou založeny na polymorfizmu pro restriční štěpení endonukleázami. Prvním krokem při identifikaci těchto markerů je polymerázová řetězová reakce specifická pro určité sekvence. Avšak produkt amplifikace nemá různou délku fragmentu u různých ekotypů. Polymorfizmus se projeví až po štěpení restriktázou, jestliže primery při PCR ohraničují polymorfni restriční místo (obr. 15.3 A, B). Řada CAPS markerů byla doposud vytvořena především u modelového objektu *A. thaliana*.

Tab. 15.1: Přehled nejčastěji využívaných DNA markerů a jejich charakteristika.

	RFLP	RAPD	Mikrosatelity	AFLP
Typ dědičnosti	kodominantní	většinou dominantní	kodominantní	dominantní
Polymorfizmus	střední	vysoký	vysoký	velmi vysoký
Detekce alel	ano	ne	ano	ne
Počet detekovaných lokusů	1 - 3	1 - 10	1 - 5	20 - 100
Obtížnost	střední	malá	malá	střední
Reprodukovatelnost	vysoká	střední	vysoká	vysoká
Výchozí koncentrace DNA	20-30µg	1-100 ng	50-100 ng	100 ng
Typ sondy	genomová DNA cDNA klon	oligonukleotid oktamer	specifická repetice	specifická DNA
Časová náročnost	náročné	rychlé	rychlé	střední
Spolehlivost	vysoká	střední	vysoká	vysoká

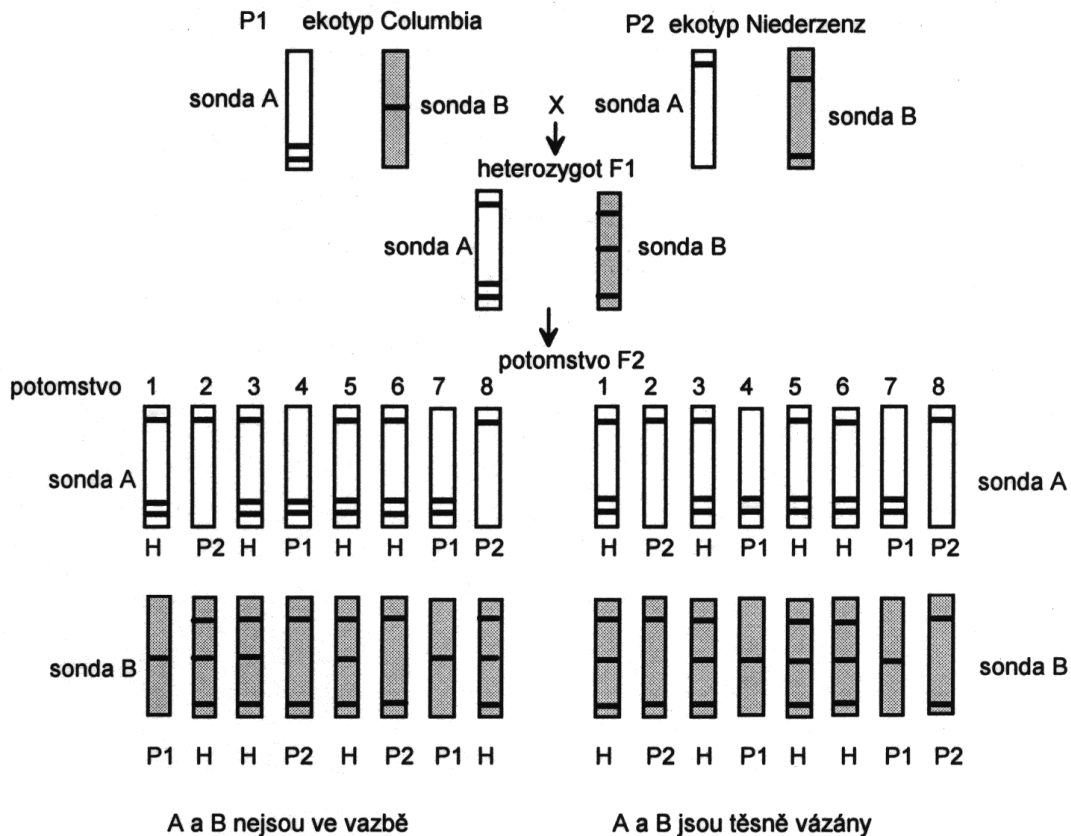
15.3 Využití molekulárních markerů při studiu rostlinných genomů a ve šlechtění

15.3.1 Tvorba genetických map a selekce rostlin určitých genotypů

Na obr. 15.4 je schéma restričního mapování u *A. thaliana*. Varianty v délce restričních fragmentů detekované sondami A a B jsou analogické alelám genů A a B. Pro zjednodušení jsou uvedeny pouze dva ekotypy, pouze dvě sondy a jediná restriční endonukleáza (*EcoR1*). Ve skutečnosti je nutné použít více různých ekotypů, sond a restričních enzymů. Také v F₂ je zapotřebí analyzovat dostatečný počet potomstva. genotypy rodičů jsou polymorfni pro obě sondy. Heterozygotní potomstvo F₁ dá po autogamii v F₂ při volné kombinaci genů A a B

(levá část obrázku) štěpný poměr 1 : 2 : 1 (homozygot P₁ : heterozygot : homozygot P₂). Z odchylky od tohoto štěpného poměru ve prospěch jedinců s nerekombinovanou sestavou alel genů A a B se vypočítá síla vazby, která je měřítkem vzdálenosti genů na genetické mapě. V pravé části obrázku je potomstvo F₂ při úplné vazbě (nevyskytují se jedinci s rekombinovanou sestavou pruhů - alel).

Obr. 15.4: Schéma restričního mapování u *Arabidopsis thaliana*.



Různé metody založené na amplifikaci prostřednictvím specifických i nespecifických primerů se ve stále širší míře uplatňují v aplikovaném výzkumu v oblasti šlechtění rostlin. Dnes již existují molekulární genetické mapy téměř u všech kulturních rostlin. Jsou identifikovány markery některých důležitých znaků. U rostlin byly první molekulární genetické mapy sestaveny u kukuřice, rajčete, bramboru, dále u rýže a huseníčku.

Genetické mapování představuje přiřazení molekulárního markeru k vazbovým skupinám. Každá vazbová skupina odpovídá určitému chromozomu a lokalizace je dána mapovou délkou v cM (centimorgany). Pro genetické mapování jsou používány zejména sondy jedinečné nebo sondy s nízkým počtem opakování, protože dávají málo dobře vyhodnotitelných pruhů. Zpočátku byla většina genetických map založena na RFLP, popř. RAPD. V současné době se při genetickém mapování stále častěji uplatňují mikrosatelitové markery. Důvodem je zejména jejich vysoký stupeň polymorfizmu, velká variabilita ve srovnání např. s RFLP markery a jednoduchý skrining pomocí PCR. Navíc pro analýzu stačí 50 až 100 ng DNA. U mikrosatelitů je polymorfizmus dán zejména rozdílem v počtu opakování základního motivu, ale také změnami v okolí mikrosatelitu. Mikrosatelitové lokusy s více než 10 opakováními tak mají obvykle více alel. Byl vypracován postup, který umožňuje

poměrně rychlou detekci polymorfizmu. Genomová DNA jedinců mapované populace se amplifikuje v PCR pomocí primerů, které jsou odvozeny ze sekvencí obklopujících vybraný mikrosatelitový lokus. Po rozdělení produktů amplifikace na agarózovém nebo PAA (polyakrylamidovém) gelu lze polymorfizmus daného mikrosatelitového lokusu vyhodnotit běžnými postupy segreganční a vazbové analýzy.

Populace určená pro hodnocení je složena z F₂ rostlin homozygotních pro určitou recesivní mutaci. Spočítáme chromozomy, ve kterých má SSR popř. CAPS marker alelu ekotypu A, a počet chromozomů, ve kterých má marker alelu ekotypu B. Rostliny, u nichž je marker v homozygotním stavu pro alelu A, počítáme jako 2 A chromozomy, heterozygoty počítáme jako 1 A chromozom a 1 B chromozom, homozygoty pro B počítáme jako 2 B chromozomy. Četnost rekombinátů *r* mezi sledovaným genem a markerem vypočítáme jako odhad počtu B chromozomů z celkového počtu chromozomů (%). Při zjišťování mapové vzdálenosti musíme počítat s interferencí. Odhad mapové vzdálenosti v jednotkách centimorganech (cM) je dán např. Kosambiho funkcí ve tvaru:

$$D = 25 \ln \frac{100 + 2r}{100 - 2r}$$

U několika rostlinných genomů byly sestaveny genetické mapy založené alespoň z části na mikrosatelitových markerech – huseníček rolní, sója luštinatá, ječmen setý, kukuřice setá, rýže setá, lilek rajče a citrus.

Mikrosatelitové markery mají však i své nevýhody. Tento marker je potřeba nejprve získat, a to se neobejde bez přípravy genomové knihovny, částečného sekvenování a syntézy primerů. Mikrosatelitový marker se nejčastěji získává prohledáváním známých sekvencí obsažených v různých databázích (např. EMBL, GenBank – u většiny rostlin je zde uloženo málo informací; výjimkou je modelová rostlina huseníček rolní, rýže, kukuřice) nebo izolací z různých typů knihoven DNA.

Lokalizované markery je možné využít při identifikaci různých znaků, které mají význam ve šlechtění – rezistence k původcům různých chorob (tab. 15.2), výnos, tolerance k biotickým i abiotickým stresům, kvalita semen apod. Byla zjištěna vazba s celou řadou genů jak s monogenní tak polygenní dědičností. Tyto molekulární markery je možné využít při detekci určitých genů u nových genotypů, které byly získány např. hybridizací, transgenozí apod.

Molekulární markery se využívají i při identifikaci a mapování genů kódujících kvantitativní znaky. Polygenní typ dědičnosti má řada zemědělsky důležitých znaků, jako je např. rezistence vůči chorobám, tolerance vůči suchu, chladu a mrazu, výnos. Pro mapování těchto znaků je výchozí křížení mezi dvěma inbredními liniemi, které se liší ve sledovaných kvantitativních znacích. Markery se geneticky a molekulárně analyzují v segregující populaci.

Molekulární markery mohou sloužit jako výchozí body při izolaci genů, se kterými jsou v těsné vazbě, metodou kráčení po chromozomu.

15.3.2 Otisk DNA (fingerprint), identifikace odrůd

Molekulární markery se často využívají při zjišťování genetické variability v rámci druhů nebo i mezi druhy. Stávají se tak nástrojem pro taxonomickou klasifikaci.

Pokud je k dispozici určitý počet vhodných markerů, je možné rozlišit i různé odrůdy v rámci druhu, popř. šlechtitelsky významné genotypy. Sleduje se polymorfizmus (záměny bazí, změny v počtu opakování repetice) mezi testovanými vzorky. S tímto cílem se využívají různé

typy molekulárních markerů. Zvláště sondy hybridizující s repetitivní DNA mohou vytvářet vysoce specifické otisky DNA. Tyto postupy umožňují zjistit hybridní charakter odrůd a slouží tak ke kontrole čistoty osiva a k ochraně práv šlechtitelů (konvence UPOV).

RFLP byly prvním typem markerů, které byly využity při studiu genetické diverzity u rostlin. Byly úspěšně aplikovány u ječmene, kukuřice a pšenice. 214 odrůd pšenice se podařilo rozdělit do 53 skupin na základě polymorfizmu v oblasti organizátoru jádérka (NOR). Alely Nor byly lokalizovány na chromozomech 1B a 6B. 98 RFLP sond bylo použito k objasnění genetických vztahů u australských pšenic. RAPD markery vykazují nižší úroveň polymorfizmu ve srovnání s RFLP, proto se např. u obilovin, jež mají velký genom, nevyžívají. Zde jsou vhodnější AFLP markery.

Tab. 15.2: Jednotlivé geny determinující rezistenci k patogenům mapované pomocí molekulárních markerů (¹ tomato yellow mosaic virus, ² tobacco mosaic virus, ³ soybean mosaic virus, ⁴ bean yellow mosaic virus, ⁵ beet necrotic yellow vein virus, ⁶ potato virus X).

Druh	Choroba	Patogenní organizmus	Gen rezistence
<i>Triticum aestivum</i>	prašná sněť pšeničná	<i>Ustilago tritici</i>	T10
	mazlavá sněť pšeničná	<i>Tilletia tritici</i> , <i>laevis</i>	T. Bt-10
	rez pšeničná	<i>Puccinia recondita</i> f.sp. <i>tritici</i>	Lr9, Lr24
	padlí travní	<i>Erysiphe graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	Pm1, Pm2, Pm3, Pm4
<i>Zea mays</i>	skvrnitost	<i>Bipolaris maydis</i>	Rhm n
	spála kukuřice	<i>Septosphaeria turcica</i> (anamorpha: <i>Helminthosporium turcicum</i>) rasa 1	Ht1
<i>Hordeum vulgare</i>	rez travní	<i>Puccinia graminis</i>	Rpg4
	skvrnitost	<i>Rynchosporium secalis</i>	Rh, Rh2, Rh13
	padlí travní	<i>Blumeria graminis</i>	ml-o, mla, Ml(La)
	rez ječná	<i>Puccinia hordei</i>	RphQ
	virus mozaiky ječmene		ym4
<i>Avena sativa</i>	rez travní	<i>Puccinia graminis</i>	Pg3
	rez korunkatá	<i>Puccinia coronata</i>	Pc68
<i>Oryza sativa</i>	bakteriální plíseň	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Xa-1, Xa-3, Xa-4
		<i>Pyricularia oryzae</i>	Pi-2(t), Pi-4(t), Pi-5(t), Pi-7(t), Pi-10(t), Pi(t)
<i>Lycopersicon</i>	verticiliové vadnutí	<i>Verticilium dahliae</i>	Ve

<i>esculentum</i>	virus žluté mozaiky rajčete	TYMV ¹	Ty-1
	olivově hnědá skvrnitost rajčete	<i>Fulvia fulva</i>	Cf2, Cf9
	listová plíseň	<i>Leveillula taurica</i>	Lv
	padlí rajčete	<i>Oidium lycopersicon</i>	Pl-1
	šedá skvrnitost listů	<i>Stemphylium</i> sp.	Sm
	cystická nematoda	<i>Glodobera rostochiensis</i>	Hero
	fusariové vadnutí	<i>Fusarium oxysporum</i>	11, 12
	virus mozaiky tabáku	TMV ²	Tm-1, Tm-2, Tm-2a
	hád'átka	<i>Meloidogyne incognita</i>	Mi, Mi3
<i>Brassica napus</i>	bílá hiloba	<i>Albugo candida</i>	ACA1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	bakteriální hniloba	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	RPM1
<i>Glycine max</i>	virová mozaika sóje	SBMV ³	Rsv n
	kořenové a stonkové hniloby	<i>Phytophthora megasperma</i>	Rps1, Rps2, Rps3, Rps4, Rps5, Rps6, Rps7
<i>Phaseolus vulgaris</i>	antraknóza fazolu	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Are
	žlutá mozaika fazolu	BYMV ⁴	Bc-3
	rez fazolu	<i>Uromyces phaseoli</i>	Up2
<i>Lactuca sativa</i>	kořenová hniloba	<i>Plasmopara lactucaeradicis</i>	plr
	plíseň salátová	<i>Bremia lactucae</i>	Dm1, Dm3, Dm4, Dm5, Dm11, Dm13, Dm15, Dm16, Dm17, Dm18
<i>Saccharum officinarum</i>	rhizománie	BNYVV ⁵	Rp1
<i>Solanum tuberosum</i>	plíseň bramborová	<i>Phytophthora infestans</i>	R1, R3
	hád'átka	<i>Glodobera rostochiensis</i>	Gro1, H1
	virus X	PVX ⁶	Rx1, Rx2
<i>Cucumis melo</i>	fusariové vadnutí	<i>Fusarium</i> spp.	Fom2

15.3.3 Identifikace rostlinných patogenů

Molekulárních sond lze využít i pro identifikaci rostlinných patogenů (bakteriálních, houbových, virů a viroidů). Diagnostika různých patogenů je ve šlechtění rostlin nezbytností. Kromě klasických biologických metod je stále aktuálnější využití metod molekulární biologie.

Viroidy jsou nejmenší autonomně se replikující patogeny a jsou známé pouze u rostlin, u nichž vyvolávají závažná onemocnění. Jsou to jednořetězcové kruhové molekuly RNA, které mají délku 240 až 380 nukleotidů. Molekulární sondy pro jejich detekci jsou založené na kopiích cDNA, které jsou radioaktivně značeny, a ty umožní detekci viroidů v rostlinných pletivech metodou DNA-RNA hybridizace, nebo RNA-RNA.

15.3.4 Stanovení evolučních a fylogenetických vztahů (příbuznosti genotypů)

Metody molekulární biologie umožňují získat podrobné informace o genetické struktuře přírodních populací. RFLP i PCR markery lze využít při rekonstrukci fylogenetických vztahů u různých druhů. Často se pracuje se sondami pro repetitivní sekvence. Jejich homologní kopie byly často detekovány jen u nejbližších příbuzných druhů. Sledují se evoluční vztahy určitých druhů s jejich planými předky. Pro studium fylogenetických vztahů na mezidruhové úrovni se často využívá chloroplastová DNA. Dendrogramy fylogenetických vztahů v rámci rodu byly zkonstruovány např. u r. *Solanum*, *Glycine*, *Brassica*.