

# Využití molekulárních markerů v systematice a populační biologii rostlin

1. Úvodní charakteristika a přehled technik

Tomáš Fér

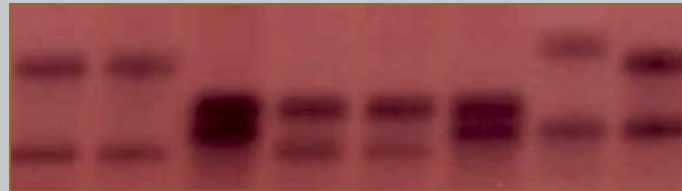
[tomas.fer@centrum.cz](mailto:tomas.fer@centrum.cz)

# Co jsou to molekulární markery ?

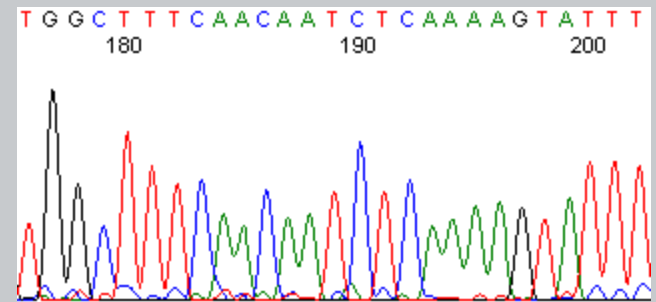
- informace o organismu získaná na základě analýzy jeho molekul – proteinů, DNA
- marker – znak, jednotka informace – cíleně či náhodně vybraná část celkové informace
- markery vypovídají o genetické podobnosti (příbuznosti) jedinců, populací nebo druhů

# Příklady markerů

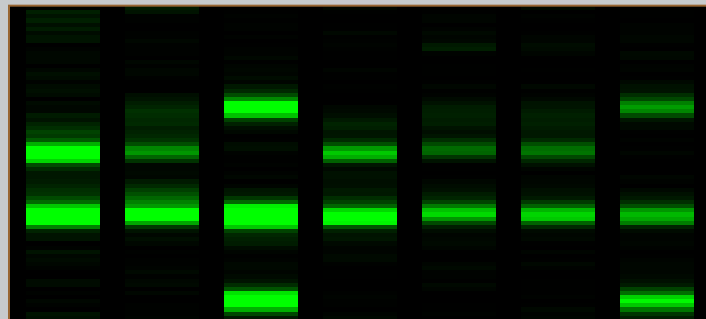
- informace o molekule enzymu (např. její náboj)



- pořadí nukleotidů v řetězci DNA



- délka fragmentu řetězce DNA



# Povaha molekulárních dat

- poskytují informaci o genotypu jedince
- tj. informace nezávislá na podmínkách prostředí (není plasticita)
- předpoklad selektivní neutrality – tj. není vliv na fitness jedince
  - zkoumáme informaci z nekodujících úseků DNA
  - předpokládáme stejnou funkčnost jednotlivých izozymů
- kvalitativní informace – presence fragmentu, alela, nukleotid
- jedinečná informace o organismu – identifikace klonu
- mění se při generativním rozmnožování – rekombinace

# Uložení genetické informace

## jádro

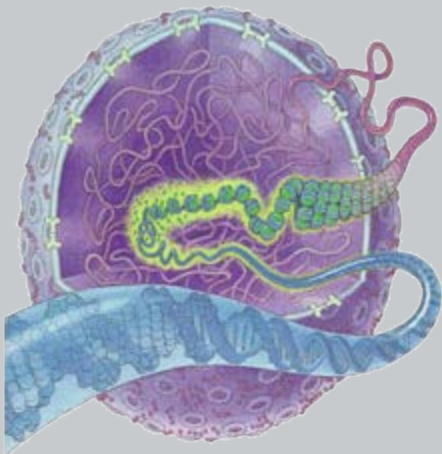
- různá ploidie
- rekombince
- biparentální přenos

## plastidy

- 1 kruhová molekula
- bez rekombince
- uniparentální přenos

## mitochondrie

- strukturně komplikovaná
- strukturní přestavby
- uniparentální přenos



# Charakteristika genomů

	nDNA zvířata	rostliny	cpDNA	mtDNA zvířata	rostliny
<b>dědičnost</b>	biparentální	biparentální	krytosemené maternální, konifery paternální	maternální	maternální
<b>struktura</b>	lineární	lineární	cirkulární	cirkulární	cirkulární, komplexní
<b>velikost (kb)</b>	$4.9 \times 10^4 - 7.0 \times 10^8$	$5.0 \times 10^4 - 3.0 \times 10^8$	71 – 214	15 – 20	200 – 2400
<b>substituční rychlost</b>	$3.5 \times 10^{-9}$	$4.1 - 5.7 \times 10^{-9}$	$0.86 - 1.20 \times 10^{-9}$	$56 \times 10^{-9}$	$0.36 - 0.50 \times 10^{-9}$
<b>substituční rychlost relativně vůči rostlinné mtDNA</b>	8.1	11.4	2.4	130.2	1.0
<b>cizorodé sekvence</b>	běžné	běžné	vzácné	vzácné	běžné
<b>strukturní mutace</b>	běžné	běžné	vzácné	vzácné	běžné
<b>rekombinace</b>	ano	ano	intramolekulární	ne	inter- a intramolekulární

# Přehled molekulárních markerů

1. proteiny – *isozymy*

2. DNA markery

- **RFLP** (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism)
- založené na PCR – analýza fragmentů DNA
  - údaje o pořadí nukleotidů – *sekvence*
  - délkový polymorfismus fragmentů
    - analýza „celého“ genomu
      - **RAPD** (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA)
      - **AFLP** (**A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism)
      - **ISSRs** (**I**nter **S**imple **S**equences **R**epeats)
    - informace z konkrétních částí genomu
      - **PCR-RFLP** (**P**olymerase **C**hain **R**eaction – RFLP)
      - **mikrosatelity** (**S**imple **S**equences **R**epeats – SSRs)
      - **SSCP** (**S**ingle **S**train **C**onformation **P**olymorphism)
  - celogenomové markery – **SNP**, whole genome sequencing

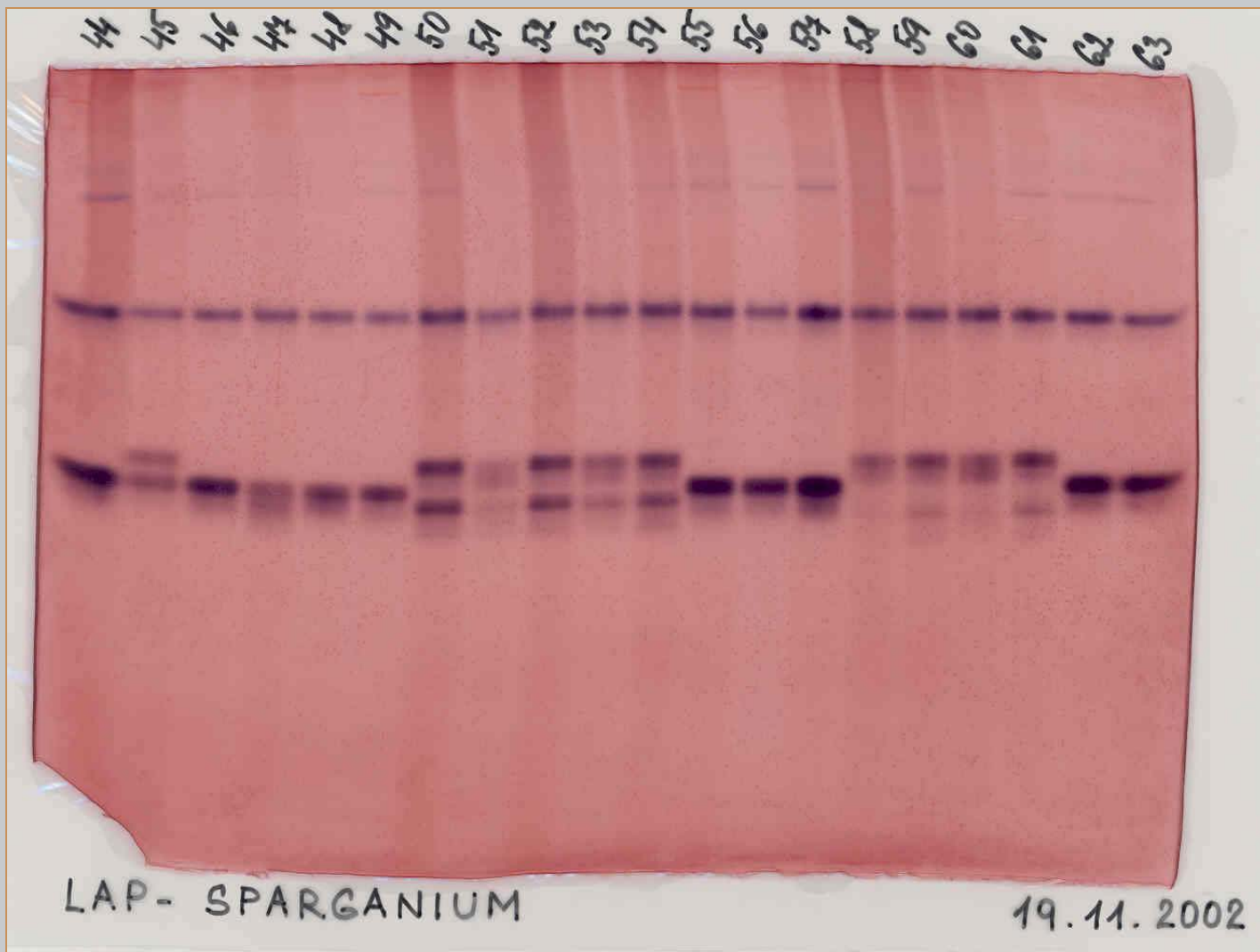
# Isoenzymy (isozymy, allozymy)

- proteiny katalyzující základní biochemické reakce
- extrakce z jakýchkoliv živých pletiv – nejlépe listů
- na základě různě velkého elektrického náboje jsou jednotlivé „typy“ (= alely) rozděleny elektroforézou
- vizualizace pomocí „barevných reakcí“





# Příklad isoenzymového gelu



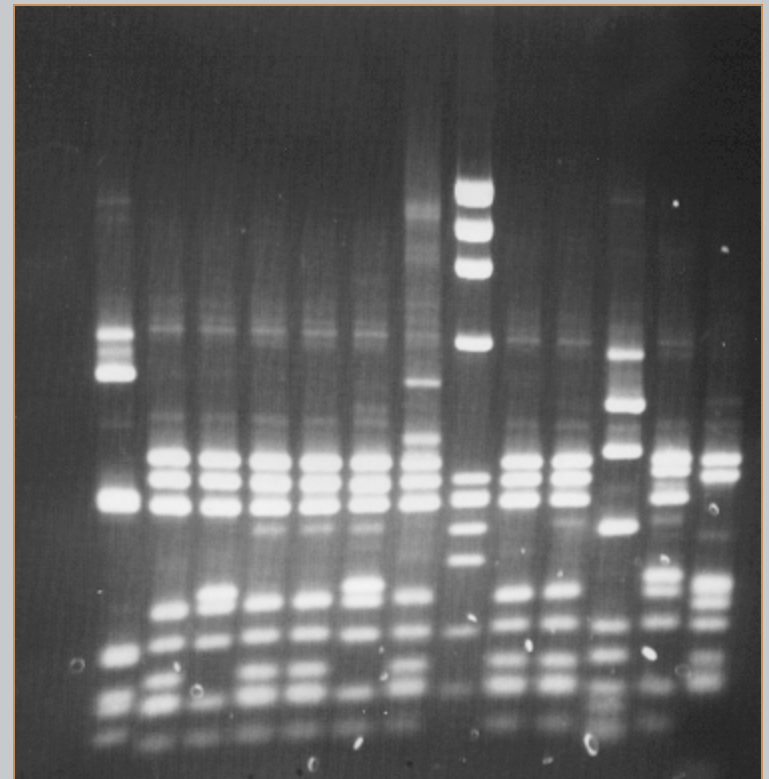
# RFLP

## Restriction Fragment Length Polymorphism

- DNA je specificky štěpena na fragmenty restriční enzymem
- elektroforéza – délkové rozdělení
- velké množství fragmentů – část je vizualizována hybridizací se značenou sondou (*Southern blotting*) – například vizualizace pouze chloroplastové DNA
- variabilita – inserce/delece nebo mutace v restričním místě

- + vysoce reprodukovatelné pattern
- potřeba značených sond

# Příklady RFLP gelů



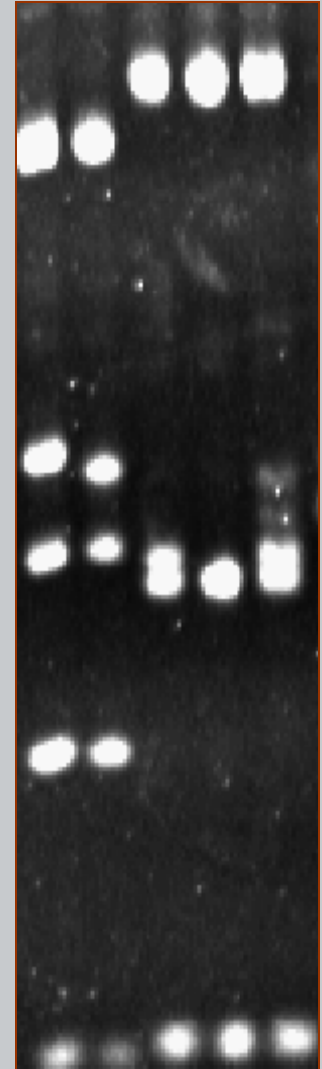
<http://www.ufpe.br/biolmol/Tec-mol-biol/RFLP-real.JPG>

# PCR-RFLP

- PCR s dvojicí specifických primerů je namnožen konkrétní úsek DNA
- využití konsenzuálních primerů (např. cpDNA)
  - použitelné takřka u všech druhů
- štěpení namnoženého úseku různými restriktčními enzymy
- elektroforéza fragmentů

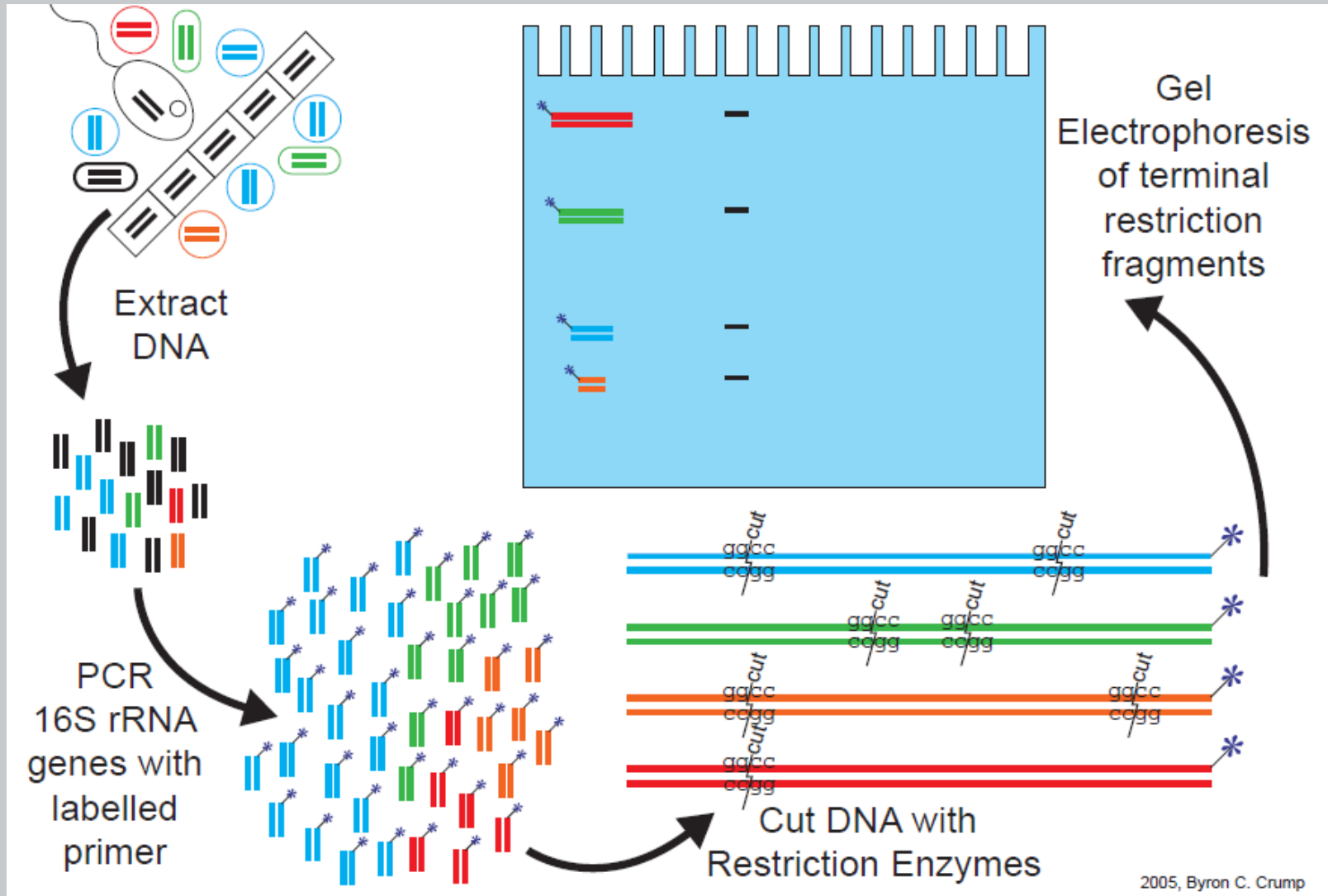
+ univerzální metoda

– nižší variabilita při použití cpDNA



# tRFLP

terminal - **R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism

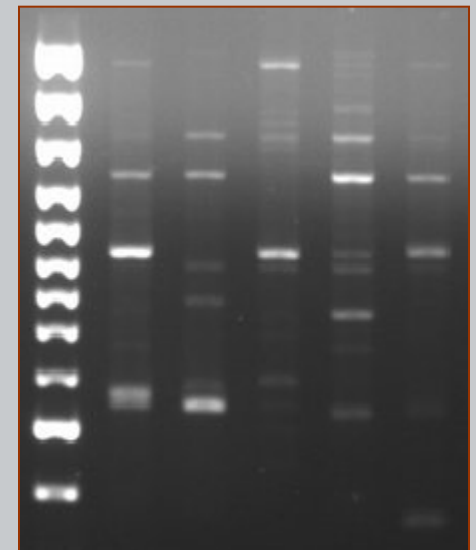


# RAPD

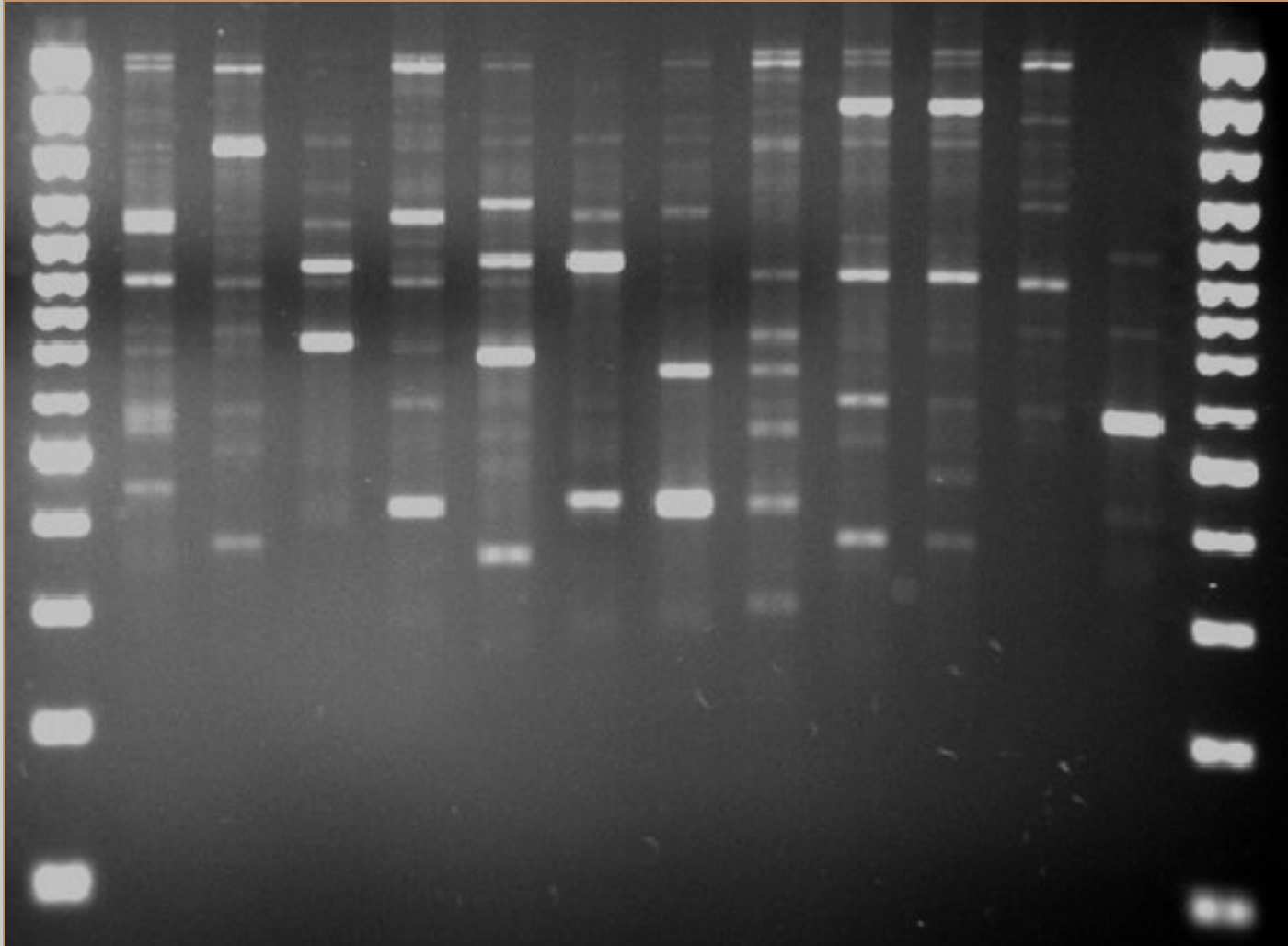
## Random **A**mplified **P**olymorphic **D**N

- generování fragmentů pomocí PCR s použitím arbitrárního primeru (dekanukleotid)
- elektroforetické rozdělení fragmentů dle délky
- polymorfismus je dán
  - mutací v místě nasedání primerů (*priming site*)
  - insercí/delecí v amplifikované části DNA

- + jednoduchá metoda
- výsledky obtížně reprodukovatelné, neporovnatelné mezi laboratořemi



# Příklad RAPD gelu



# AFLP

## Amplified Fragment Length Polymorphism

- kombinace RFLP a následné PCR určitých fragmentů
- založená na restrikci DNA dvěma enzymy
- selektivní namnožení jen některých proužků
- fluorescenční vizualizace proužků na gelu

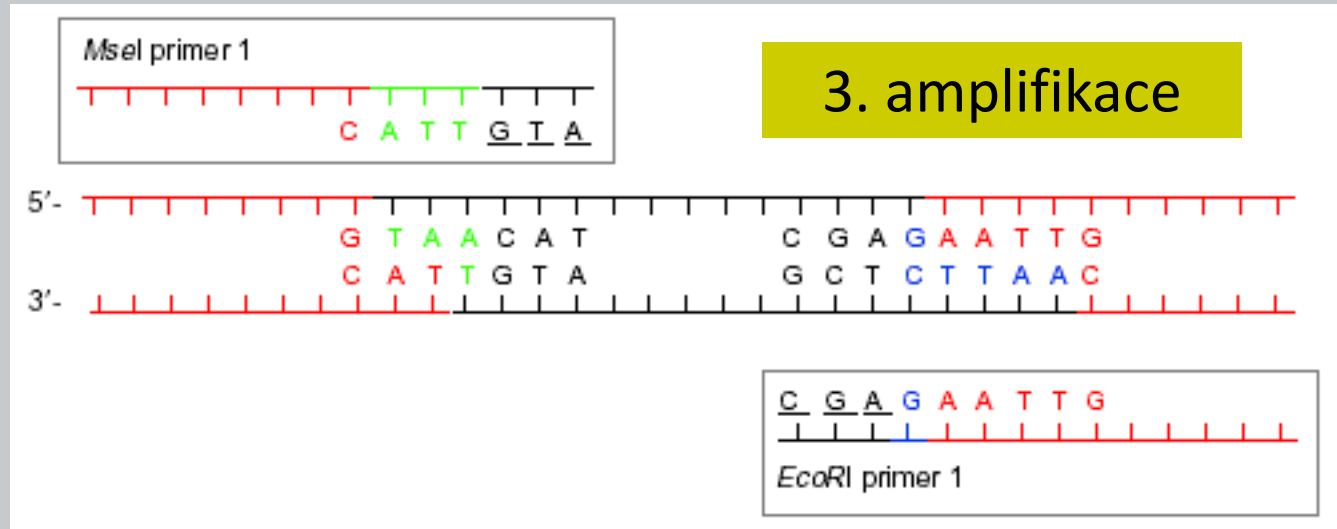
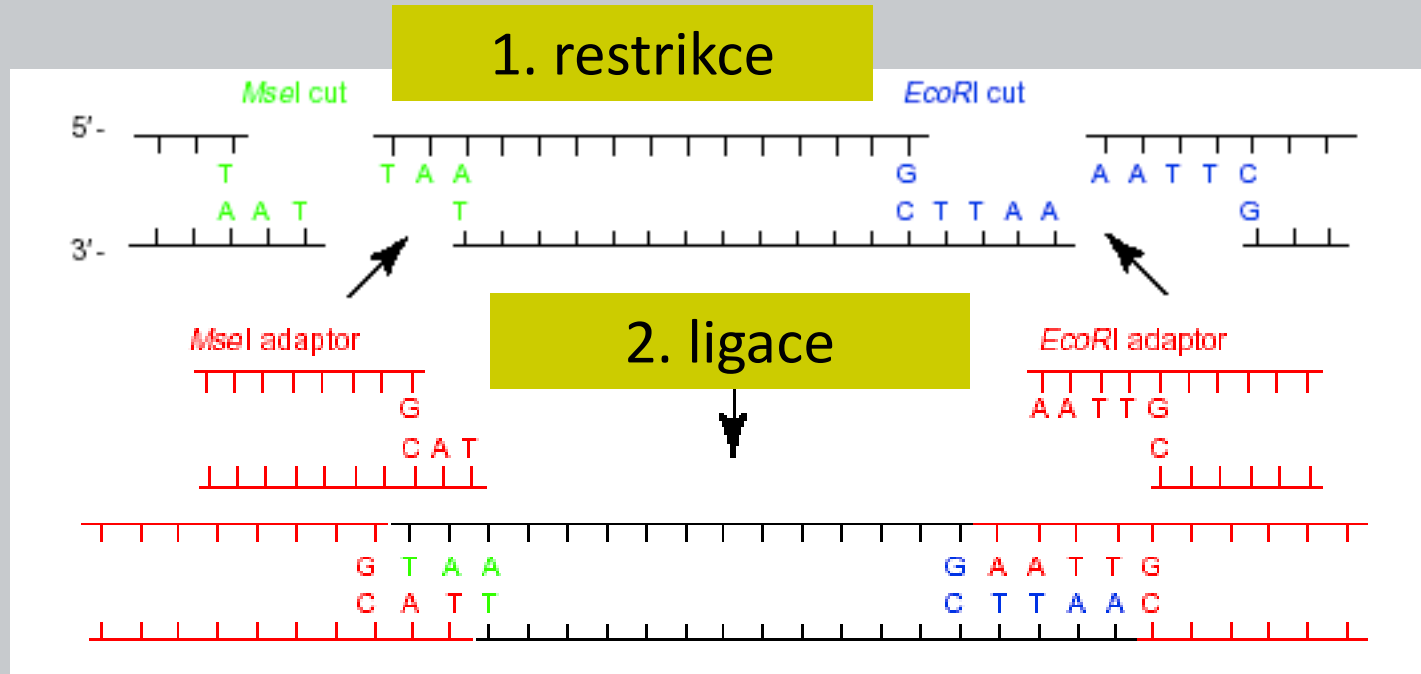
- + velmi polymorfní, odráží variabilitu „celého“ genomu
- + vysoká reprodukovatelnost, spolehlivost
- dominantní marker – neodlišení homo- a heterozygotů



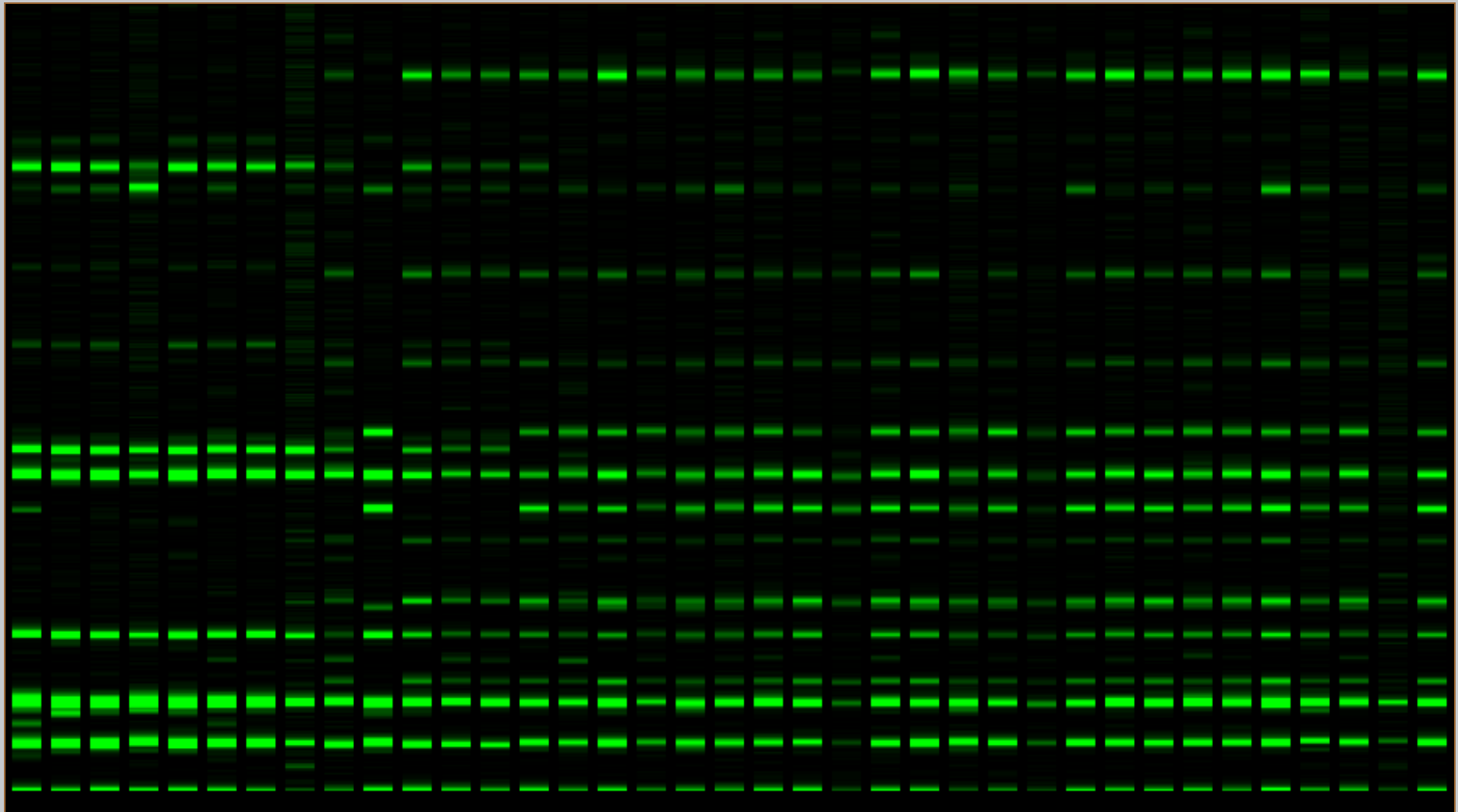
# AFLP — Amplified Fragment Length Polymorphism



celková DNA



# Příklad AFLP gelu



# Mikrosatelity

SSRs – simple sequence repeats

- opakující se několikanukleotidové sekvence

AGGATATATATATAGGCA 1

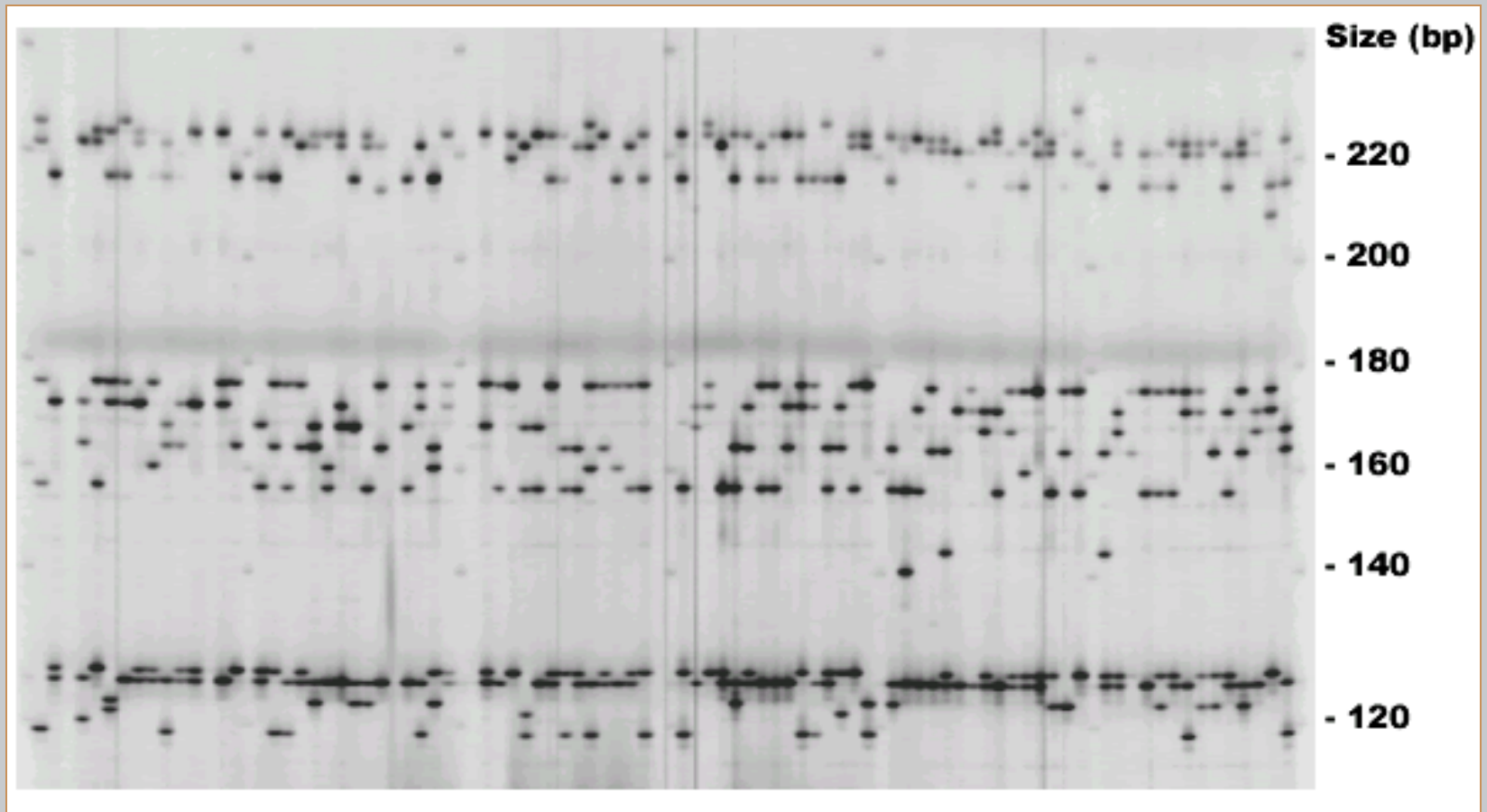
AGGATATATATA--GGCA 2



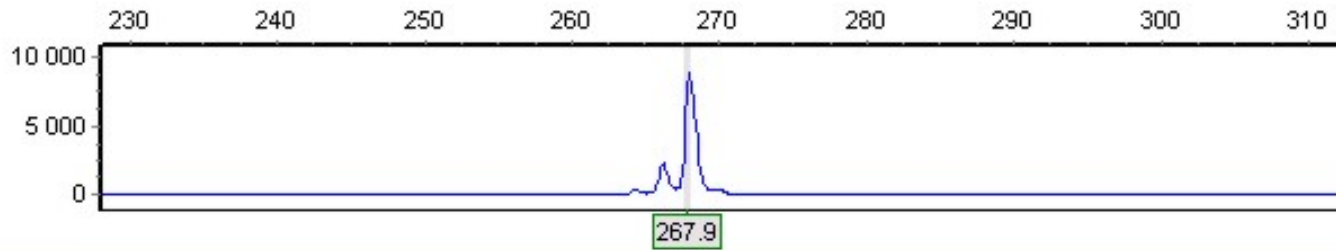
- alely – liší se počtem opakování

- + kodominantní marker, velmi variabilní
- + určitá představa o vztazích mezi alelami
- nutnost vytvořit primery pro studovaný druh

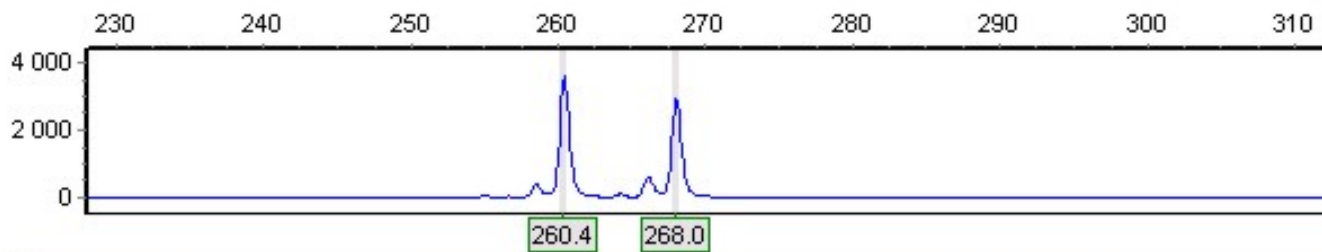
# Příklad analýzy mikrosatelitů



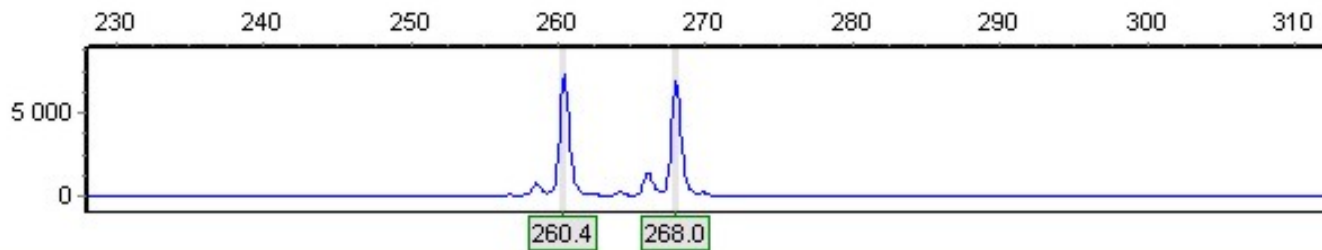
12\_4.fsa



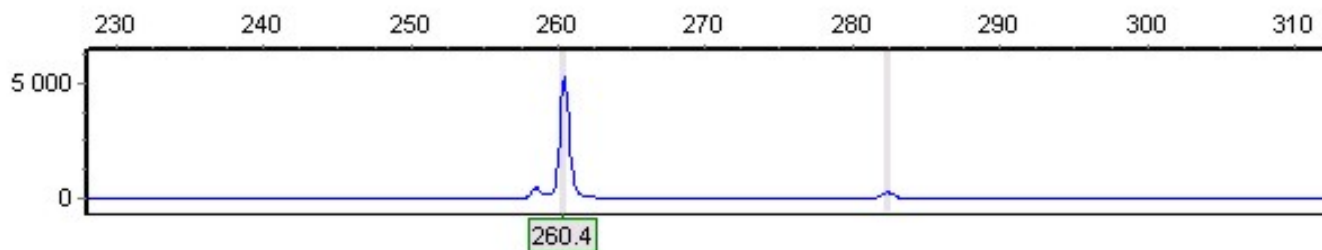
13\_1.fsa



10\_2.fsa



09\_1.fsa

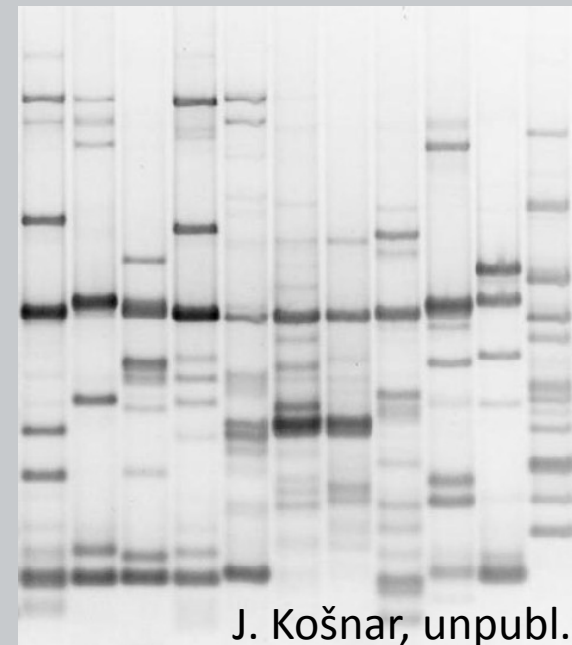


Mikrosateliti -  
homozygoti a  
heterozygoti  
(*Nuphar lutea*)

# ISSRs – Inter Simple Sequence Repeats

- délková variabilita mezi mikrosatelitovými lokusy
- primer – mikrosatelitová sekvence

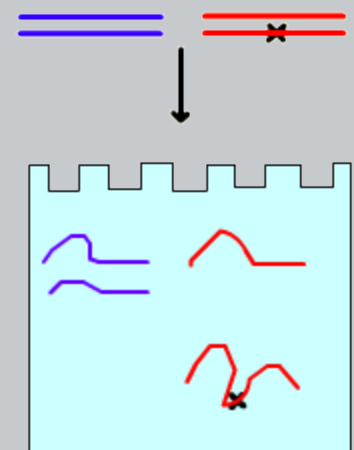
- + variabilní marker
- + jednoduchá metoda
- dominantní marker



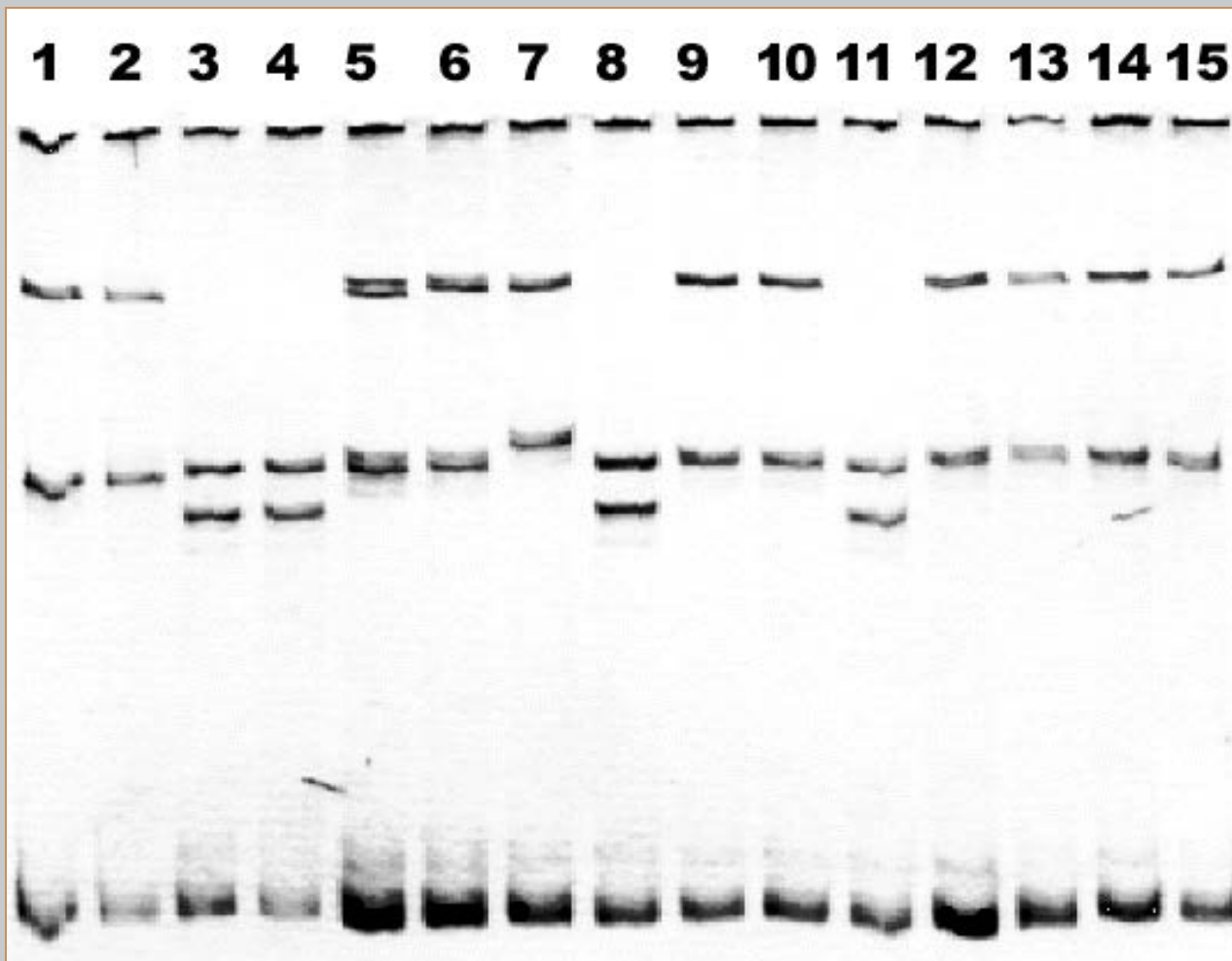
J. Košnar, unpubl.

# SSCP – Single Strand Conformation Polymorphism

- metoda hledání neznámé bodové mutace
- PCR amplifikace konkrétního úseku
- denaturace – elektroforéza ssDNA
- mutace změní tercierní strukturu (konformaci) řetězce a tím jeho mobilitu v gelu



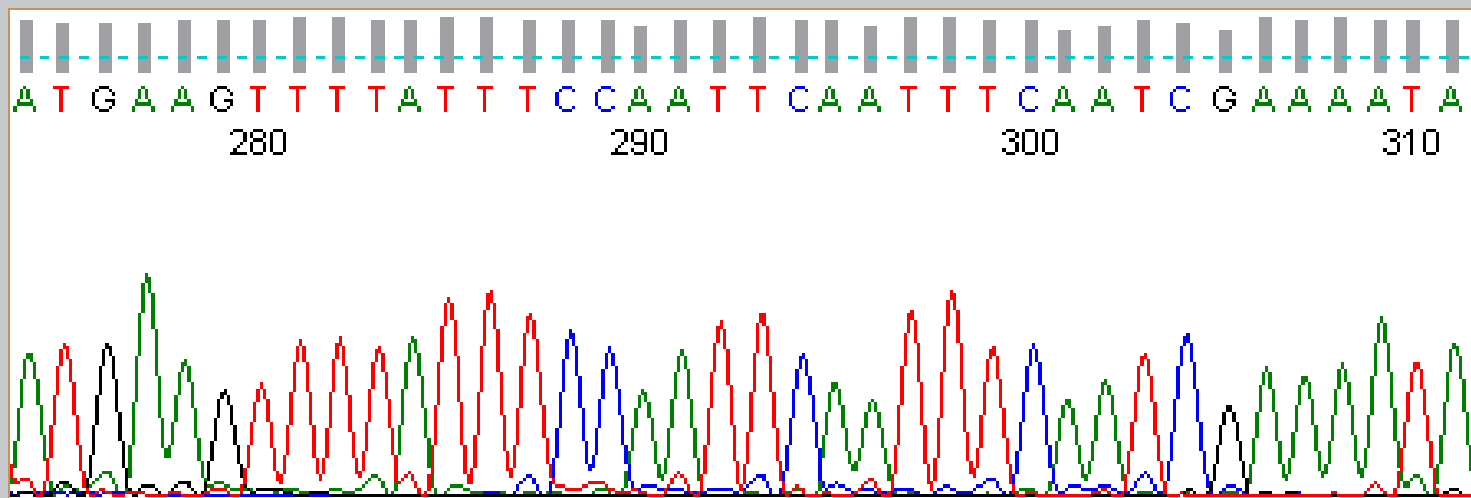
# Příklad SSCP gelu





# Sekvenování DNA

- určení pořadí nukleotidů v řetězci DNA
- využití automatických sekvenátorů – *fluorescenční značení bazí*
- potřeba specifických primerů pro PCR amplifikaci sekvenovaného úseku



# Next generation sequencing – NGS

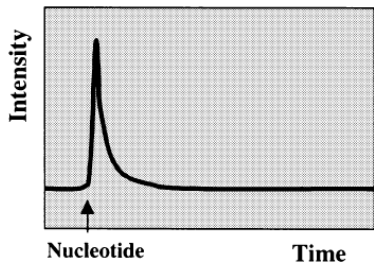
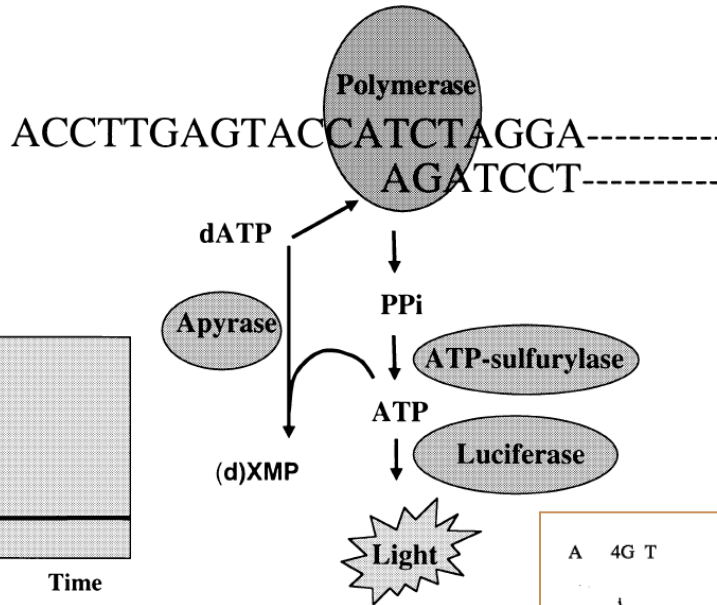
masivní paralelní sekvenování

několik komerčních řešení

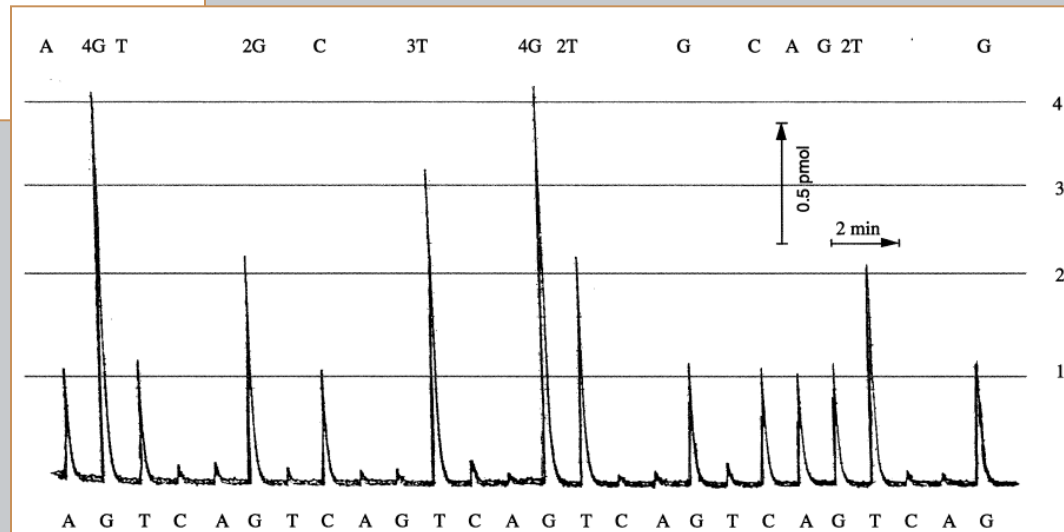
- 454 (Roche) - pyrosekvenování
- Illumina (Solexa)
- SOLiD

různé přístupy/aplikace

- shotgun sekvenování
- amplikonové sekvenování



princip pyrosekvenování



# Sekvenování

1. kodující geny – *konzervativní*
  - systematika na úrovni čeledí, rodů (*rbcL*)
2. spacers, introny – *variabilnější oblasti*
  - systematika na rodové, druhové a nižší úrovni (*trnL-trnF*, *atpB-rbcL*)

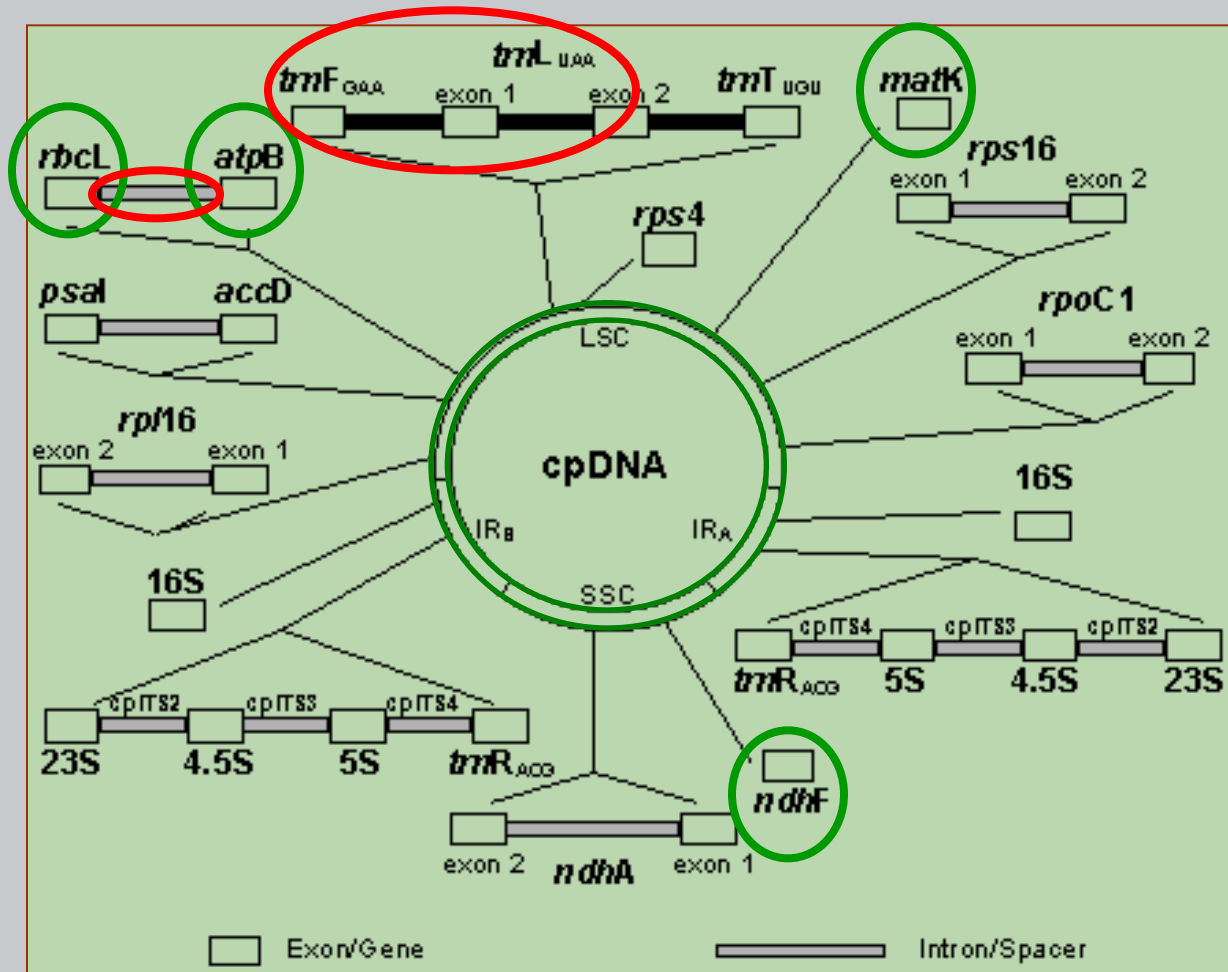
## chloroplastové geny

- *rbcL*
- *atpB*
- *matK* ...

## jaderné geny

- ITS
- 18S rDNA
- 26S rDNA ...

# Chloroplastová DNA



# SNP

## single-nucleotide polymorphism

- variabilita v DNA na jednom konkrétním místě (záměna báze)

...ACTGGAGTCGACTG...

...ACTGGAGACGACTG...

- téměř výhradně bialelické, tj. dvě varianty (např. A/T)
- kodominantní marker
- detekce známých SNP vs objevení nových variant
- detekce (viz např. [http://en.wikipedia.org/wiki/SNP\\_genotyping](http://en.wikipedia.org/wiki/SNP_genotyping))
  - sekvenování
  - PCR-RFLP
  - SSCP, TGGE, DGGE
  - hybridizace (alelicky specifické proby)
  - MALDI-TOF hmotnostní spektrofotometrie (Sequenom MassARRAY...)
  - microarrays
  - NGS

# Typy molekulárních markerů

co jsou důležité rozdíly

- variabilita

vysoká × nízká

<b>vysoká</b>	<b>nízká</b>
mikrosatelity	allozomy
AFLP	chloroplastové markery

# Typy molekulárních markerů

co jsou důležité rozdíly

- variabilita vysoká × nízká
- typ dědičnosti dominantní × kodominantní

<b>dominantní</b>	<b>kodominantní</b>
AFLP	allozomy
RAPD	mikrosatellity
RFLP	(PCR-RFLP jaderné DNA)

# Typy molekulárních markerů

co jsou důležité rozdíly

- variabilita vysoká × nízká
- typ dědičnosti dominantní × kodominantní
- rekombinace ano × ne

<b>ano</b>	<b>ne</b>
jaderné markery (diploidní)	organelární (cp, mt) (haploidní)



# Typy molekulárních markerů

co jsou důležité rozdíly

- variabilita vysoká × nízká
- typ dědičnosti dominantní × kodominantní
- rekombinace ano × ne
- přenos do další generace biparentální × uniparentální

## **biparentální**

jaderné markery  
(semeny i pylem)

## **uniparentální**

krytosemenné – cp i mt DNA maternálně (semeny)  
nahosemenné – cp DNA paternálně (pylem),  
mtDNA maternálně

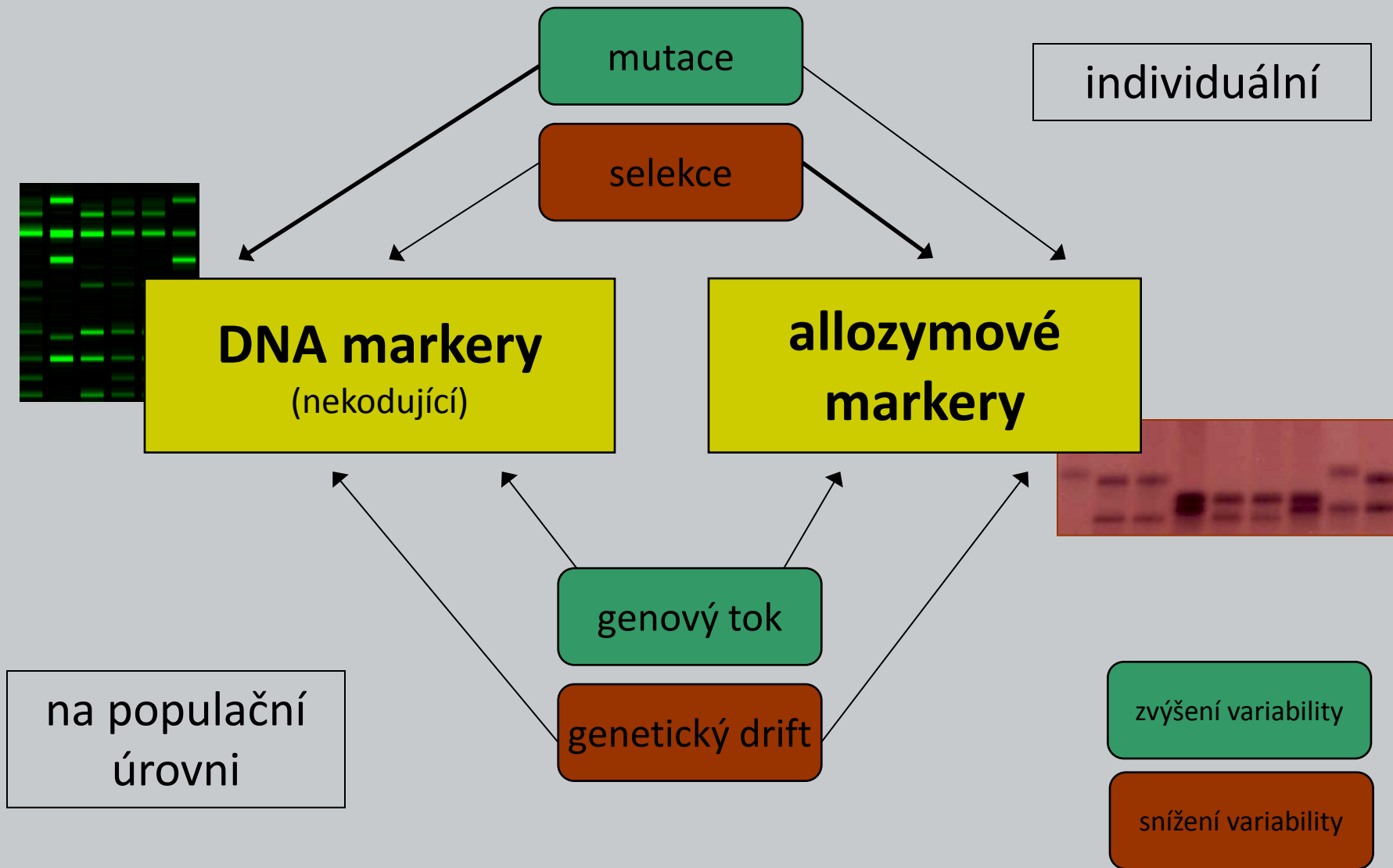
# Typy molekulárních markerů

co jsou důležité rozdíly

- variabilita vysoká × nízká
- typ dědičnosti dominantní × kodominantní
- rekombinace ano × ne
- přenos do další generace biparentální × uniparentální
- mutační rychlost vysoká × nízká

vysoká	nízká
mikrosatelity	allozomy
introny, spacery	exony

# Jaké faktory ovlivňují markery?



# Využití markerů pro různé okruhy otázek

	RFPL a PCR-RFLP						sekvenování					
	allozymy	nDNA	cpDNA	mtDNA (rostliny)	mtDNA (zvířata)	RAPD	AFLP	SSR	nDNA	cpDNA	mtDNA (rostliny)	mtDNA (zvířata)
Genetická diverzita	++	+++	+	+	+	++	++	++	+++	++	+	++
Diferenciace populací	+++	++	++	++	++	++	++	++	+++	++	++	+++
Genový tok	++	++	+	(+)	+	(+)	(+)	+++	+++	++	(+)	++
Polyplodizace	+++	+++	++	-	-	-	-	+	++	++	-	-
Hybridizace	++	+++	++	+	+	++	++	+	++	++	+	+
Fylogeneze	(+)	+	++	(+)	++	-	-	(+)	+++	+++	(+)	+++
Genotypování jedinců	(+)	++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Fylogeografie	(+)	?	++	(+)	++	-	++	-	(+)	+++	(+)	+++

+++	velmi vhodné	(+)	bylo použito
++	dobře použitelné	-	nepoužitelné
+	OK	?	nejisté nebo nepoužito

podle Lowe et al. 2004

# Literatura

Avise J.C. (2004): Molecular markers, natural history and evolution.

Baker A.J. (2000): Molecular methods in ecology.

Beebee T. & Rowe G. (2004): An introduction to molecular ecology.

Caetano-Anollés G. & Gresshoff P.M. (1998): DNA markers. Protocols, applications, and overviews.

Henry R.J. (2001): Plant genotyping. The DNA fingerprinting of plants.

Karp A. et al. (1998): Molecular tools for screening biodiversity.

Lowe A., Harris S. & Ashton P. (2004): Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application.

Weising K. et al. (2005): DNA fingerprinting in plants. Principles, methods, and applications.

DeSalle R. & Schierwater (1998): Molecular Approaches to Ecology and Evolution.

Karp A. et al. (1996): Molecular techniques in the assesment of botanical diversity. *Annals of Botany* 78:143-149

Ouborg N.J. et al. (1999): Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *J. Ecol.* 87:551-568.

Parker G.P. et al. (1998): What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361-382

Vekemans X. & Jacquemart (1997): Perspectives on the use of molecular markers in plant population biology. *Belg. J. Bot.* 129:91-100

# Molekulární markery v systematice a populační biologii rostlin

1. (9.10.) **molekulární markery** – charakteristika, rozdíly, přehled technik
2. (16.10.) **molekulární markery** – přehled aplikací a možných otázek
3. (23.10.) **isozymy** – elektroforéza, vyhodnocování kodominantních dat; populační genetika
4. (30.10.) **DNA** – struktura, metody studia, PCR techniky, aplikace, **RAPD**
5. (6.11.) **AFLP** – princip, výhody, využití, vyhodnocování dominantních dat
6. (13.11.) **restrikční techniky** (RFLP, PCR-RFLP), specifika *cpDNA*; fylogeografie
7. (20.11.) **mikrosatelity** – jaderné, chloroplastové, izolace, vyhodnocování dat, využití; studium klonality
8. (27.11.) **sekvenování** – chloroplastová DNA, sekvenování genů a nekodujících oblastí
9. (4.12.) **sekvenování II** – jaderná DNA, rDNA, ITS, *low-copy* markery
10. (11.12.) **"nové" a další metody** (ISSRs, transpozony, real-time PCR...)
11. (18.12.) **NGS** - přehled a principy metod, příklady aplikací
12. (8.1.2014) **shrnutí**, další příklady využití molekulárních markerů
13. (15.1.) prezentace studentů, zkouška...