

Využití molekulárních markerů v systematice a populační biologii rostlin

2. Přehled aplikací a otázek

Přehled molekulárních markerů

1. proteiny – *isozymy*

2. DNA markery

- **RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)**
- založené na PCR – analýza fragmentů DNA
 - údaje o pořadí nukleotidů – *sekvence*
 - délkový polymorfismus fragmentů
 - analýza „celého“ genomu
 - **RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)**
 - **AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)**
 - **ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats)**
 - informace z konkrétních částí genomu
 - **PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-RFLP)**
 - **mikrosatelity (Simple Sequence Repeats - SSRs)**
 - **SSCP (Single Strain Conformation Polymorphism)**
- celogenomové markery – **SNP**, whole genome sequencing

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

Typy otázek

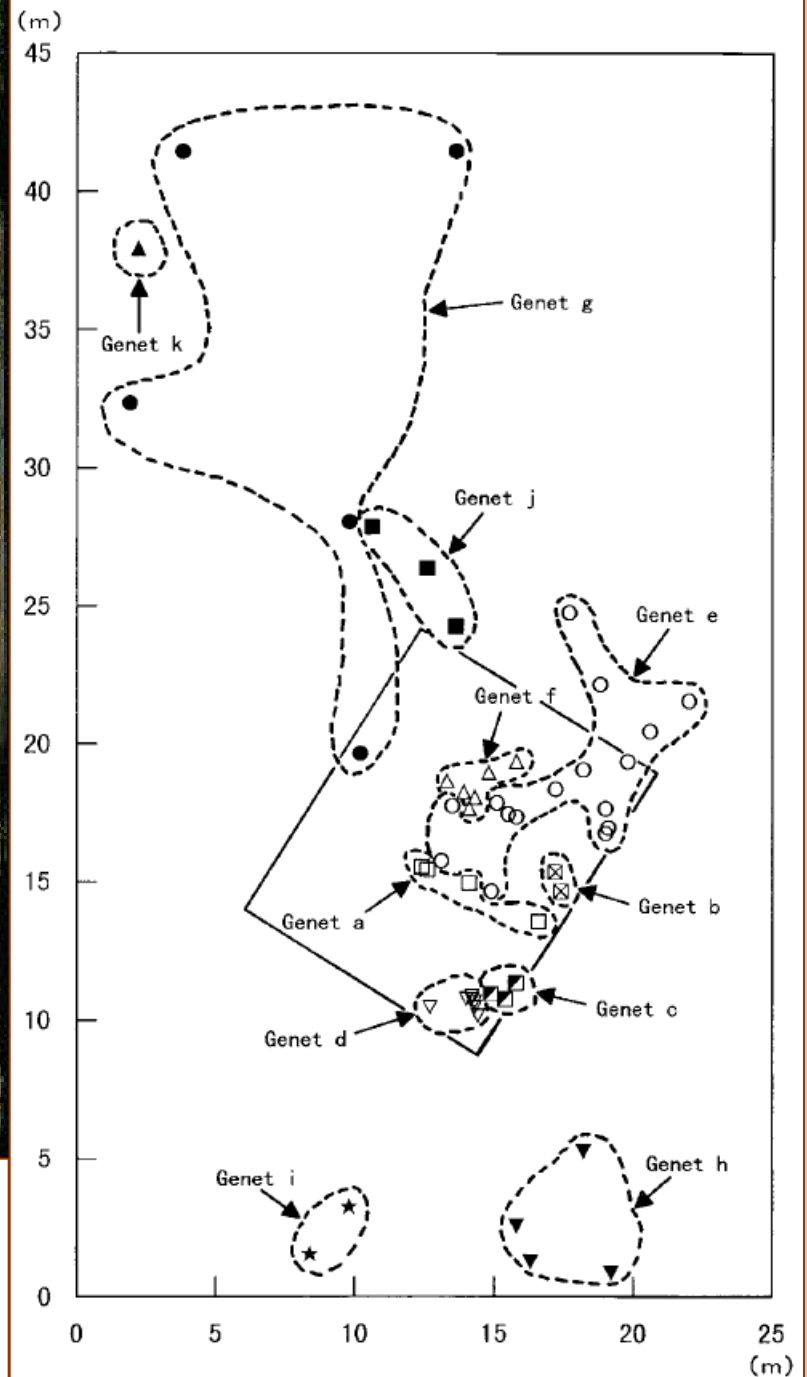
- identifikace klonů
 - genetická diverzita klonálních rostlin
- genetická struktura populací
 - vnitropopulační genetická diverzita
 - test H-W rovnováhy
 - vztahy mezi populacemi, rozdělení genetické variability
 - genový tok
- studium migrace rostlin
 - fylogeografie
 - studium invazí
- typ reprodukčního systému
- systematické studie na všech úrovních, rekonstrukce fylogeneze
- hybridizace, polyploidizace

Identifikace klonů

- počet genotypů v populaci a prostorové rozložení genet vs. ramet
- poměr vegetativního a generativního rozmnožování
- četnost generativního rozmnožování
 - RSR – *repeated seedling recruitment*
 - ISR – *initial seedling recruitment*



Miwa et al. (2001): Analysis of clonal structure of *Melaleuca cajuputi* (Myrtaceae) at a barren sandy site in Thailand using microsatellite polymorphism. Trees 15:242-248



Markery k identifikaci klonů

- izozymy – někdy nedostatečná variabilita
- RAPD
- AFLP
- mikrosatelity

- nadhodnocení klonální variability
 - ramety téže genety jsou označeny jako různé
 - chyba metody – nutno znát tzv. *error rate* (opakované analýzy)
 - somatické mutace?
- podhodnocení klonální variability
 - jako klon jsou určeni i jedinci vzniklí nezávisle
 - nedostatečná variability markeru
 - malé množství markerů
 - sílu markeru lze spočítat (pravděpodobnost, že dva jedinci se stejným genotypem vznikli nezávislým sexuálním procesem)

Typ reprodukčního systému

- Hardy-Weinbergova rovnováha – předpokládá *random mating* – často nesplněno:

předpoklady H-W rovnováhy:

- náhodné párování
- nekonečně velká populace (není drift)
- nejsou mutace (nevznikají nové alely)
- není migrace
- není selekce
- (diploid, sexuální reprodukce, nepřekrývající se generace)

Typ reprodukčního systému

- Hardy-Weinbergova rovnováha – předpokládá *random mating* – často nesplněno:
 - *positive assortative mating*
 - *inbreeding*
 - regulerní *inbreeding* – autogamie
- autogamie
 - nízká variabilita v rámci populace – 2 čisté homozygotní linie
 - vysoká variabilita mezi populacemi – lokálně adaptované
- allogamie
 - vysoká variabilita v rámci populace – stálý vznik heterozygotů
 - nízká variabilita mezi populacemi
- ALE – rozdělení variability závisí i na *gene flow*

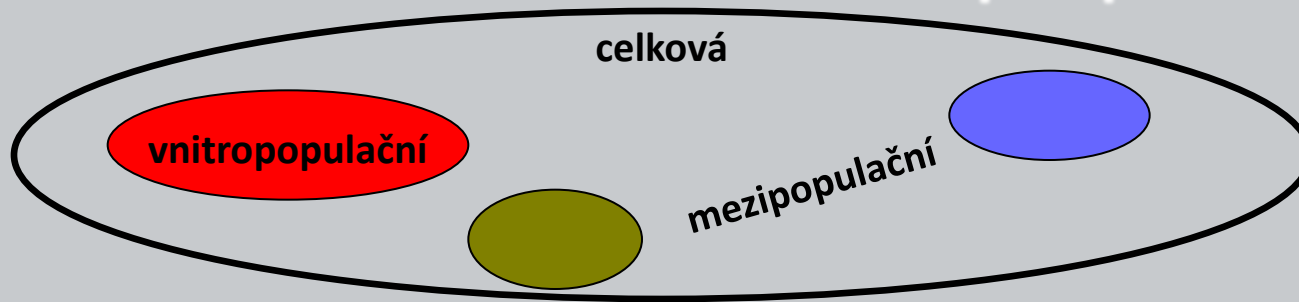
Test reprodukčního systému

- míra *inbreedingu* – koeficient inbreedingu
 - F_{IS} – deficit heterozygotů
- srovnání genetické informace mateřské rostliny a jejích semen – míra autogamie
- kodominantní markery
 - isozymy
 - mikrosatelity

Genetická diverzita

- heterozygosita
 - pozorovaná (H_o – *observed*)
 - očekávaná (H_e – *expected*)
 - = genová diversita (*gene diversity* – pravděpodobnost, že dvě náhodně vybrané alely jsou shodné)
- různé koeficienty diversity – např. Shannon
- počet alel
- alelická bohatost (*allelic richness*)
 - počet alel standardizovaný na velikost vzorku
- počet vzácných nebo privátních alel
 - DW-index...
- molekulární diverzita
 - nukleotidová diversita (π) – průměrný počet párových rozdílů/počet nukleotidů + případná korekce na mnohonásobné mutace...
 - počet polymorfních míst (S)

Genetická struktura populací



- genetická diverzita – index diverzity (H)
 - ve vztahu k velikosti populace, geografické poloze...
- rozložení genetické variability na
 - vnitropopulační (*within populations*)
 - mezipopulační (*among populations*)
- celková diverzita – H_T
- vnitropopulační diverzita – H_S
- interpopulační diverzita – $D_{ST} = H_T - H_S$

$$G_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

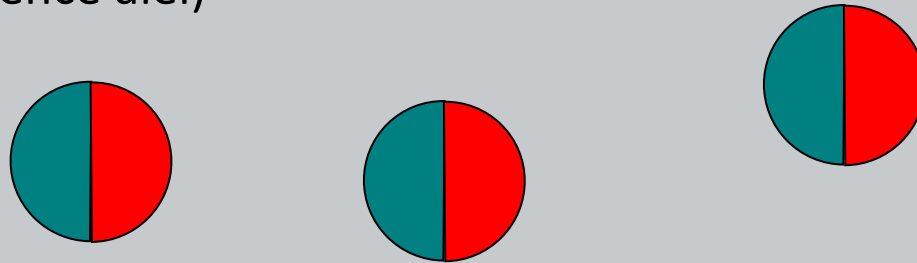
koeficient genetické diferenciacie - míra
diferenciacie na subpopulace

Genový tok – *gene flow*

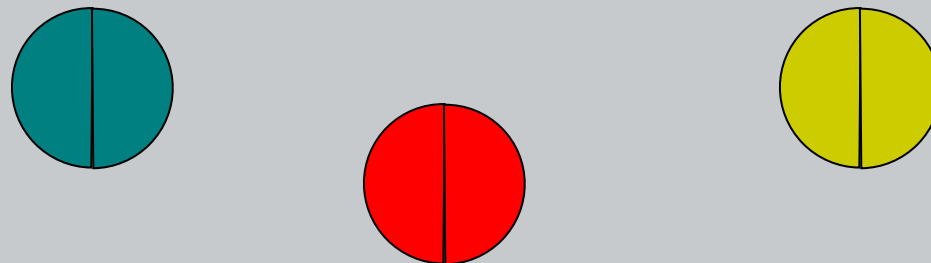
- jsou populace v kontaktu nebo izolované ?
- jak je velký *gene flow* mezi populacemi ?
gene flow = míra komunikace, tj. šíření semen a pylu
- jak daleko se šíří semena ?
- na jakou vzdálenost je přenášen pyl ?
- prostorová autokorelační analýza
 - korelace genetické a fyzické vzdálenosti
- **nepřímé** určení intenzity *gene flow*
 - z rozložení genetické variability mezi populacemi – G_{ST}
- **přímé**
 - analýza rodičovství (*parentage analysis*)

Určení velikosti *gene flow*

- interpretace G_{ST}
 - stupeň diferenciace na subpopulace
 - 0 – žádná genetická struktura populací (všechny populace mají stejné frekvence alel)



- 1 – maximální genetická struktura (každá populace fixovaná pro jinou alelu)



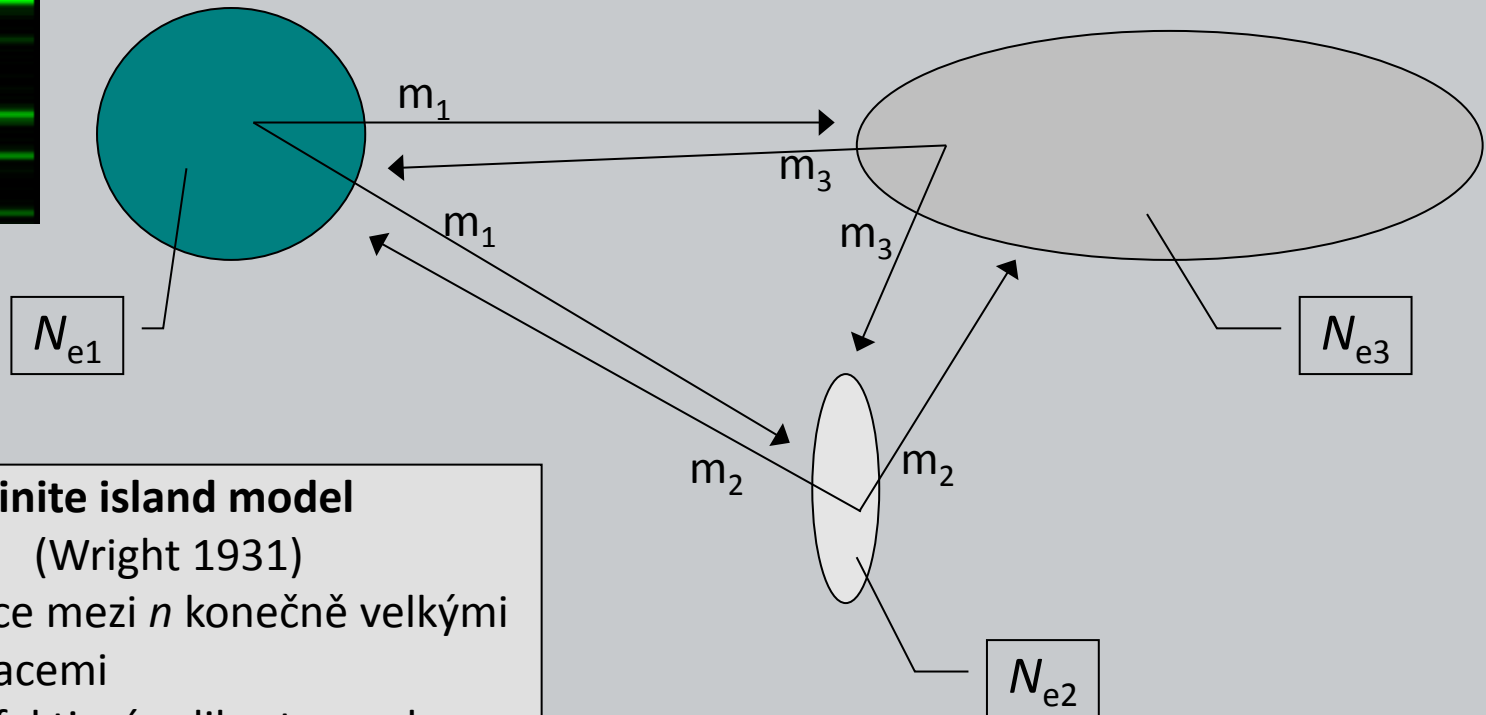
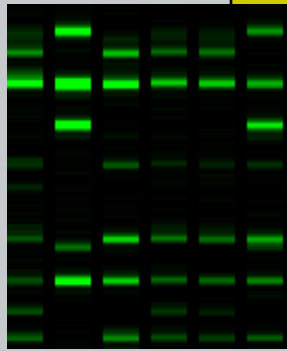
- na základě populačně genetických modelů odpovídá konkrétnímu počtu migrantů za generaci

Interpretace G_{ST}

způsob migrace
mezi populacemi

distribuce genetických
markerů

demografický
model



finite island model
(Wright 1931)

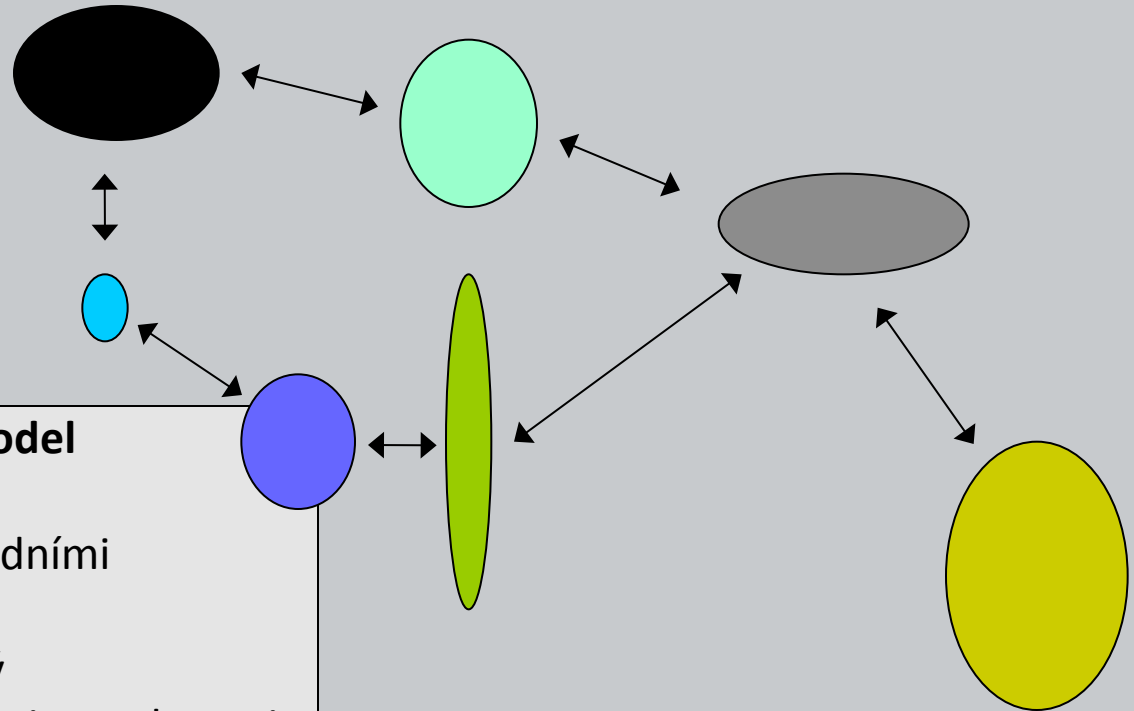
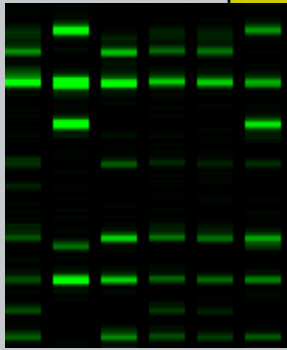
- migrace mezi n konečně velkými populacemi
- N_e – efektivní velikost populace
- každá populace dodává $N_e m$ migrantů všem ostatním stejně

Interpretace G_{ST}

způsob migrace
mezi populacemi

distribuce genetických
markerů

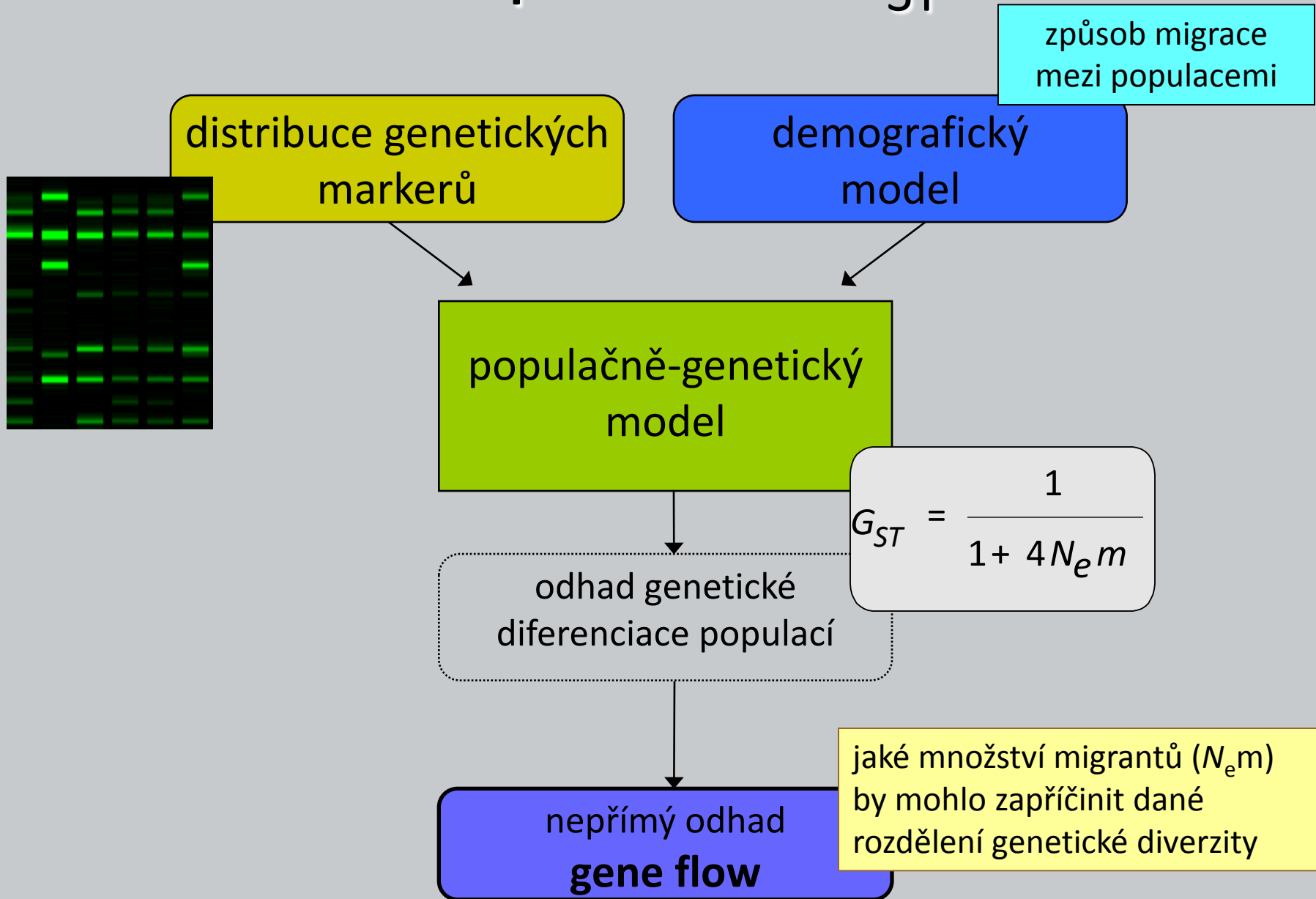
demografický
model



stepping stone model
(Kimura 1953)

- migrace pouze mezi sousedními populacemi
- jedno nebo dvourozměrný
- disperze mezi nesousedními populacemi je zprostředkována více kroky

Interpretace G_{ST}



Interpretace G_{ST}

způsob migrace
mezi populacemi

distribuce genetických
markerů

demografický
model

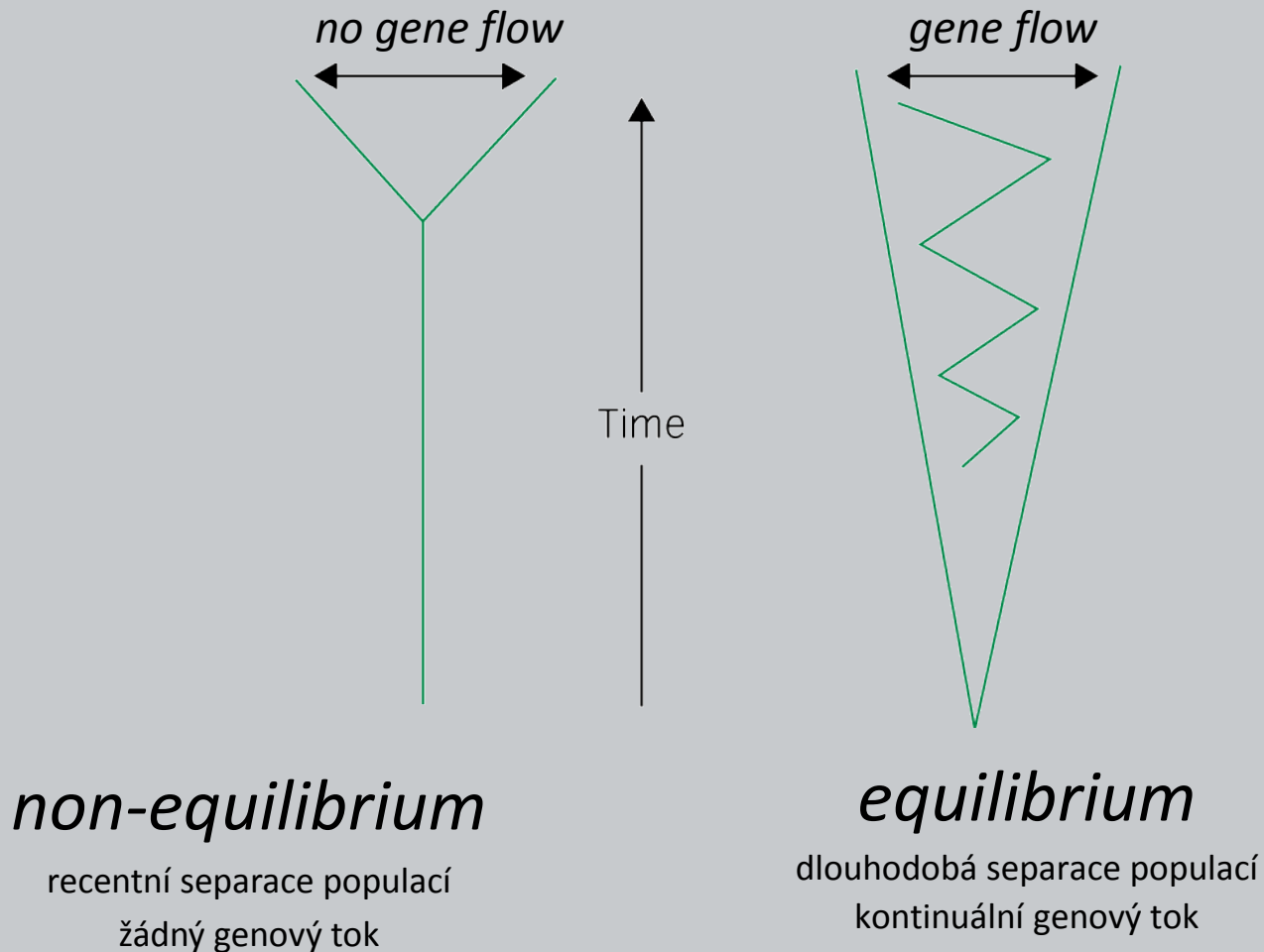
podmínky pro tuto interpretaci

- rovnováha mezi genovým tokem a driftem
- genový tok je konstantní v čase
- mutace jsou mnohem nižší než migrace

nepřímý odhad
gene flow

jaké množství migrantů ($N_e m$)
by mohlo zapříčinit dané
rozdělení genetické diverzity

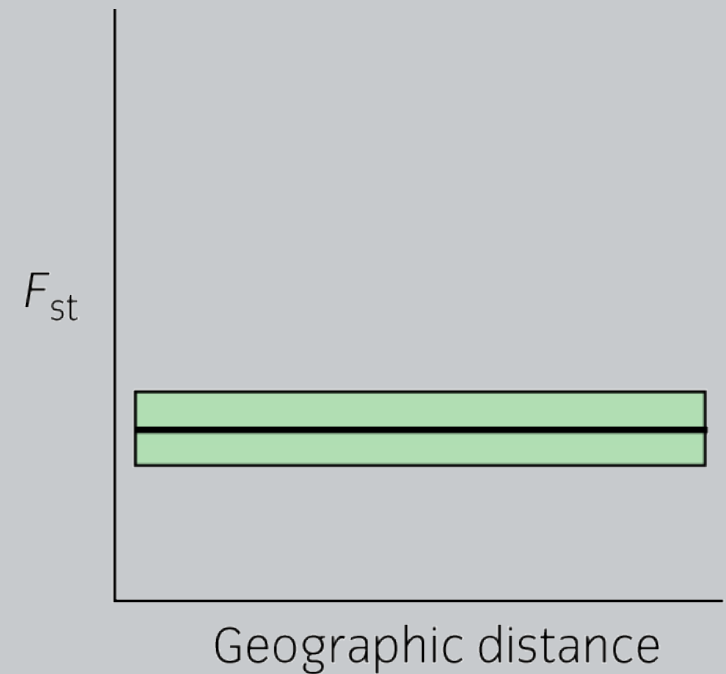
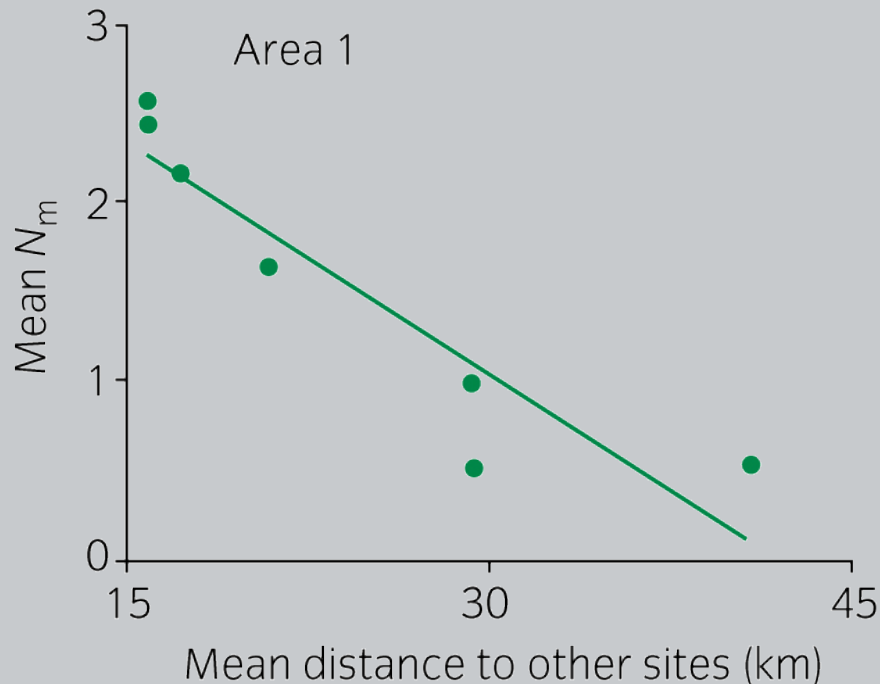
Historický a současný genový tok



z alelických frekvencí nelze jednoduše odlišit genový tok probíhající v současnosti od podobnosti dané společným původem

Vztah mezi genetickou a geografickou strukturou

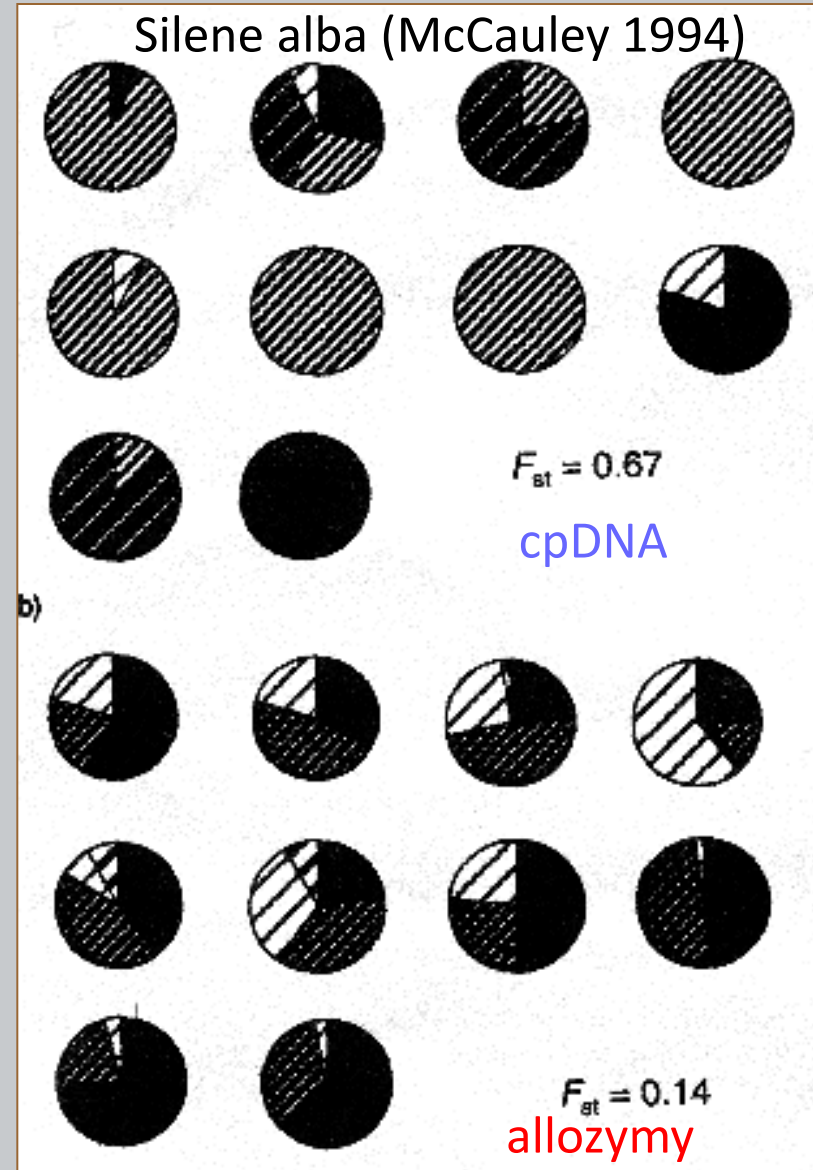
- *isolation-by-distance*
- intenzivní *gene flow*



Podíl přenosu pylu a semen na genovém toku

- **pyl** - haploidní **jaderná DNA**
- **semena** - diploidní **jaderná DNA**
- **cpDNA**

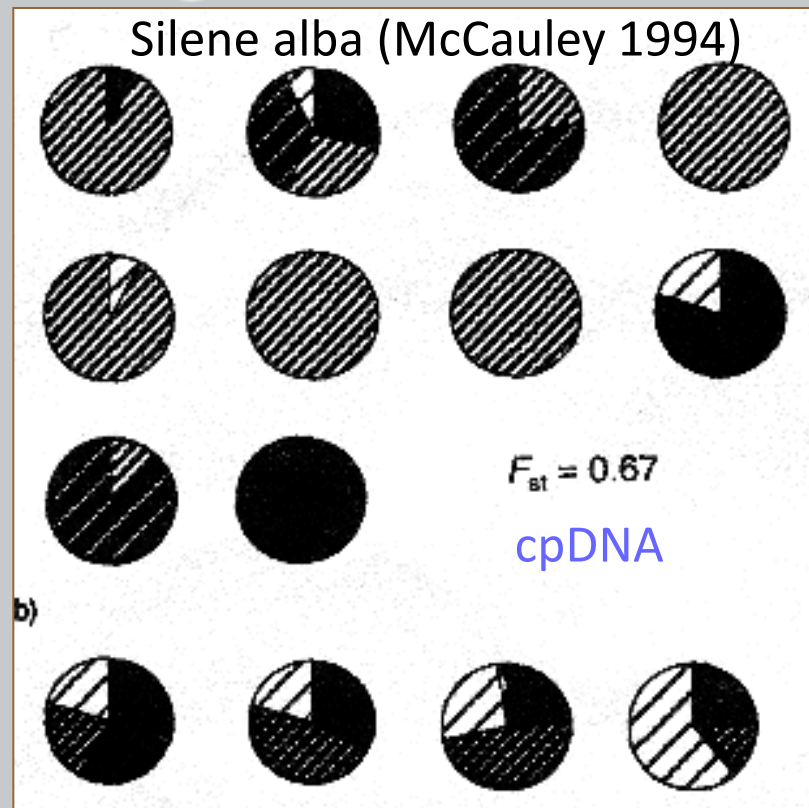
$$\frac{\text{migrace pylu}}{\text{migrace semen}} \approx \frac{\left(\frac{1}{F_{STb}} - 1\right) - 2\left(\frac{1}{F_{STm}} - 1\right)}{\left(\frac{1}{F_{STm}} - 1\right)}$$



Podíl přenosu pylu a semen na genovém toku

- **pyl** - haploidní **jaderná DNA**
- **semena** - diploidní **jaderná DNA**
- **cpDNA**

$$\frac{\text{migrace pylu}}{\text{migrace semen}} \approx \frac{\left(\frac{1}{F_{STb}} - 1\right) - 2\left(\frac{1}{F_{STm}} - 1\right)}{\left(\frac{1}{F_{STm}} - 1\right)}$$



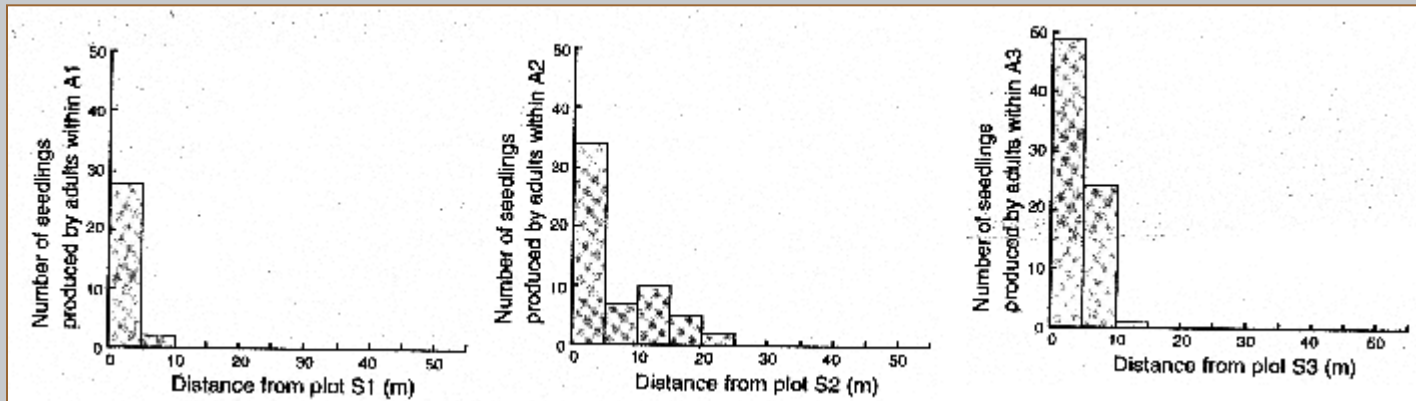
| Druh | šíření pylu | šíření semen | poměr pyl/semena | Reference |
|------------------------------------|-------------|--------------|------------------|------------------------------|
| <i>Quercus</i> sp. | vítr | ptáci | 196 | Kremer et al. (1991) |
| <i>Pinus contorta</i> | vítr | vítr | 28 | Dong and Wagner (1993) |
| <i>Argania spinosa</i> | hmyz | přežvýkavci | 2.5 | El Mousadik and Petit (1996) |
| <i>Pinus sylvestris</i> (Scotland) | vítr | vítr | 18 | Sinclair et al. (1998) |
| <i>Pinus sylvestris</i> (Spain) | vítr | vítr | 105 | Sinclair et al. (1999) |

Využití markerů pro populační studie

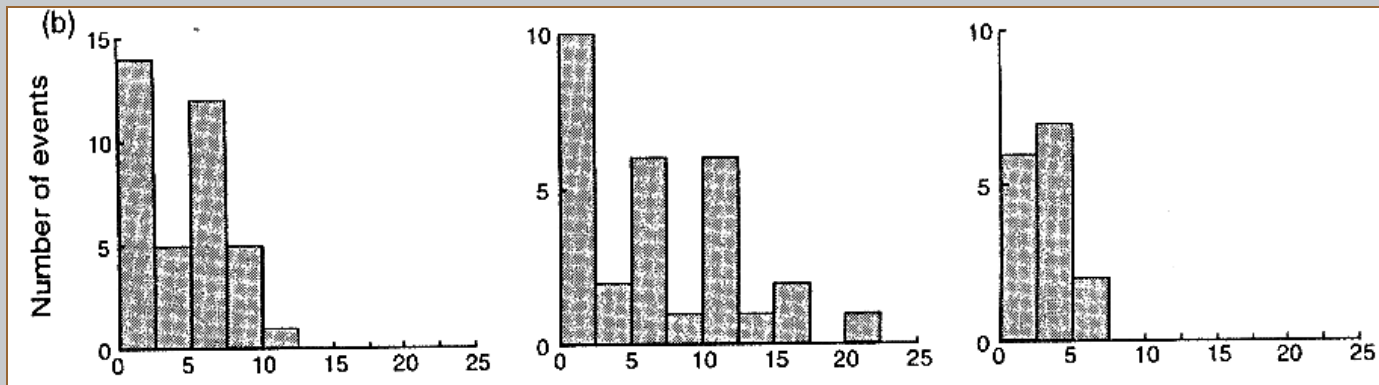
- jaderná (resp. celková) DNA
 - izozymy, mikrosatelity – kodominantní
 - RAPD, AFLP
 - sekvenování (ITS...), *low-copy* markery
- chloroplastová DNA
 - RFLP, PCR-RFLP
 - cpDNA mikrosatelity
 - sekvenování (*trnL-trnF*...)

Analýza rodičovství (*parentage analysis*)

- pohyb genů (*gene flow*) v subpopulaci
 - dán vzdáleností rodičů od semenáčků

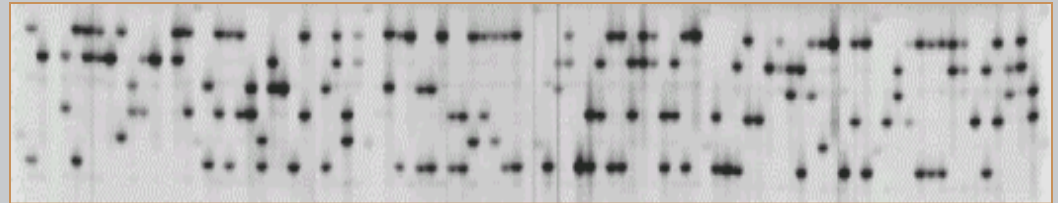


- pohyb pylu (*pollen flow*) v subpopulaci
 - pylový přenos dán vzájemnou vzdáleností rodičů



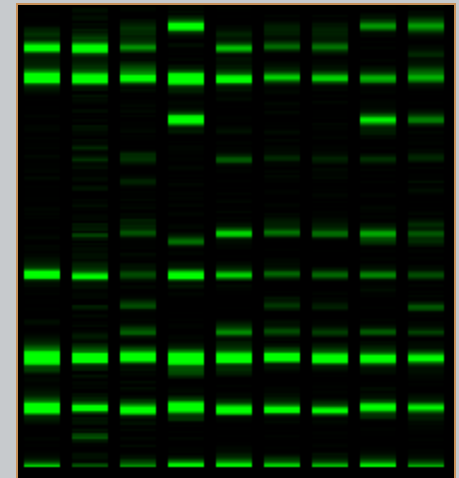
Markery pro *parentage analysis*

- mikrosatelity



- AFLP

- vysoká spolehlivost
- velká variabilita



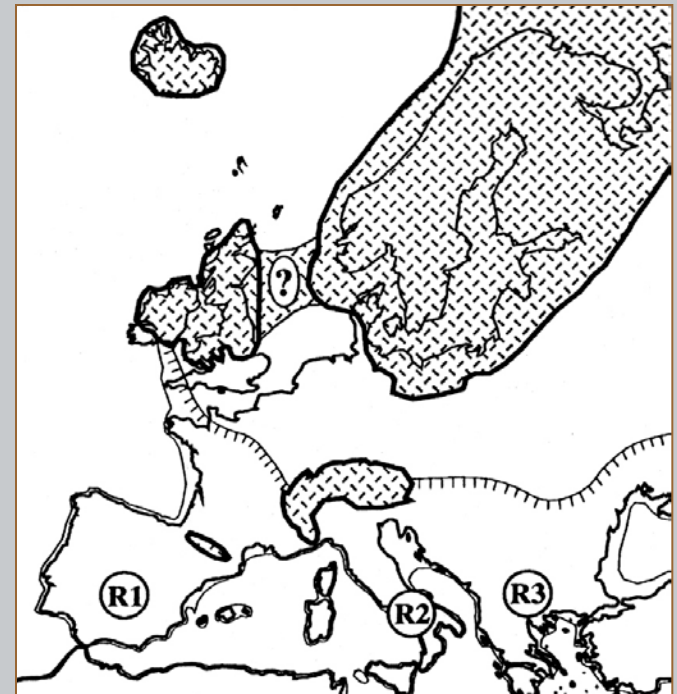
Studium migrace druhů

- *fylogeografie* – studium postglaciální migrace
 - identifikace migračních cest
 - využití cpDNA
 - maternální přenos (tj. semeny u krytosemenných)
 - haploidní
 - absence rekombinací
- vztahy mezi rozšířením druhů a jejich příbuzností
- recentní migrace druhů v krajině
 - rostlinné invaze
 - ...

Fylogeografie

vliv historických faktorů (typicky zalednění) na geografickou distribuci genových linií

- maximální zalednění – 20-18 tis. BP
- maximální (koncentrovaná) variabilita v mediteránu
- 3 základní refugia – iberské, apeninské, bálkánské
- jen malá část variability zpět do Evropy
- rekolonizace od cca 13 tis. BP
- metody studia – využití **cpDNA**
- můžeme vysledovat jednotlivé linie (haplotypy) a ty korelovat s geografickým rozšířením



maximální rozsah zalednění během poslední ledové doby

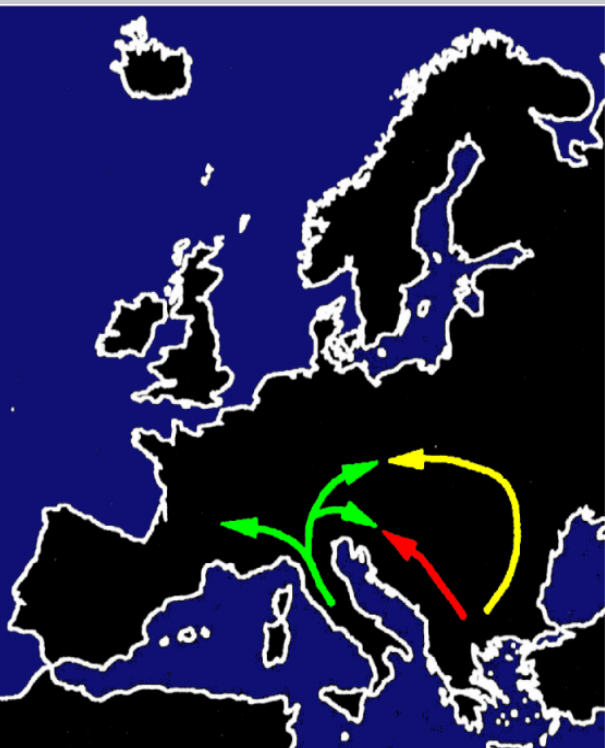


hranice permafrostu

R1, R2, R3 - hlavní refugia

Postglaciální rekolonizace Evropy

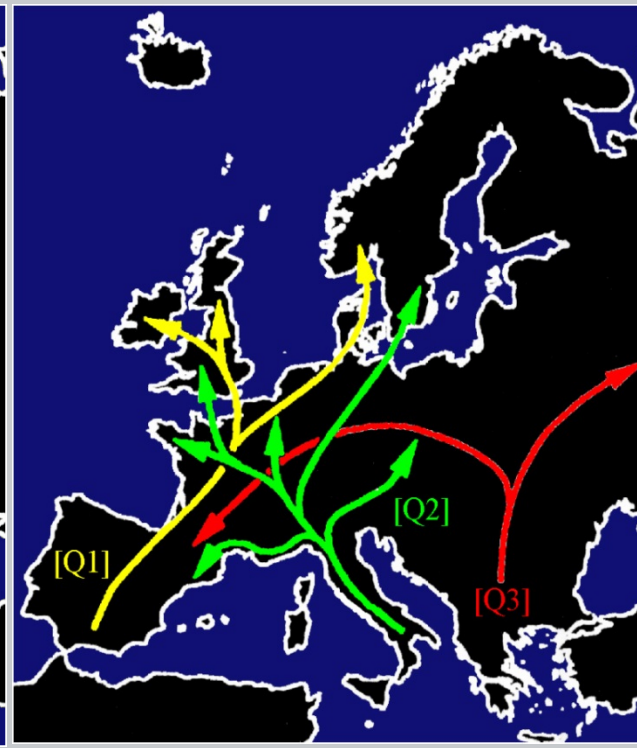
migrační cesty dřevin



jedle



buk



dub

Systematické studie

na všech úrovních

- evoluce (vyšších) rostlin
 - monofylie skupin, příbuznost čeledí
 - primitivní, odvozené čeledi
- vztahy mezi rody v rámci čeledí, druhy v rámci rodu
- identifikace mikrospecií a jejich vznik
- vznik a šíření nových druhů
- vztahy mezi ploidiemi, vznik polyploidů
- hybridizace, identifikace rodičovských taxonů...

Sekvenování

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

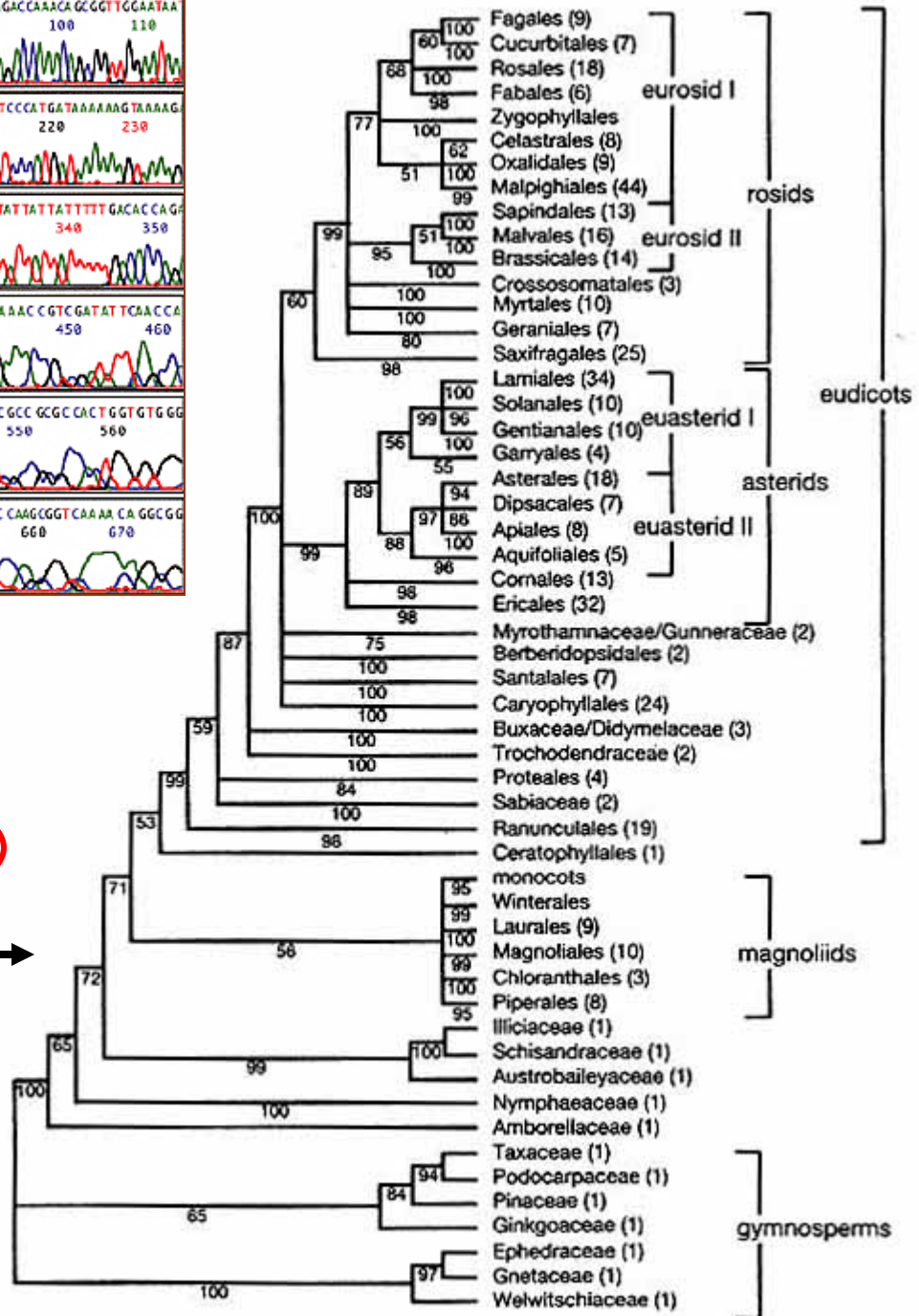
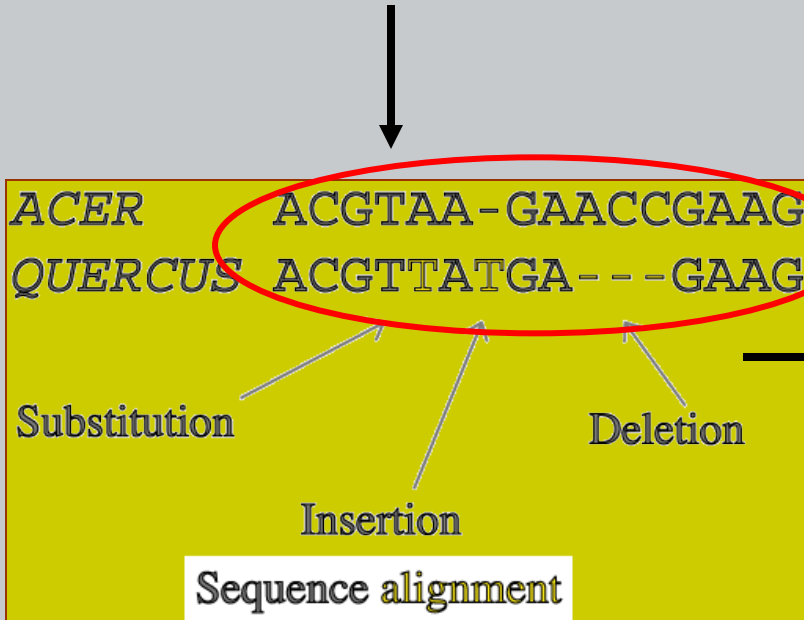
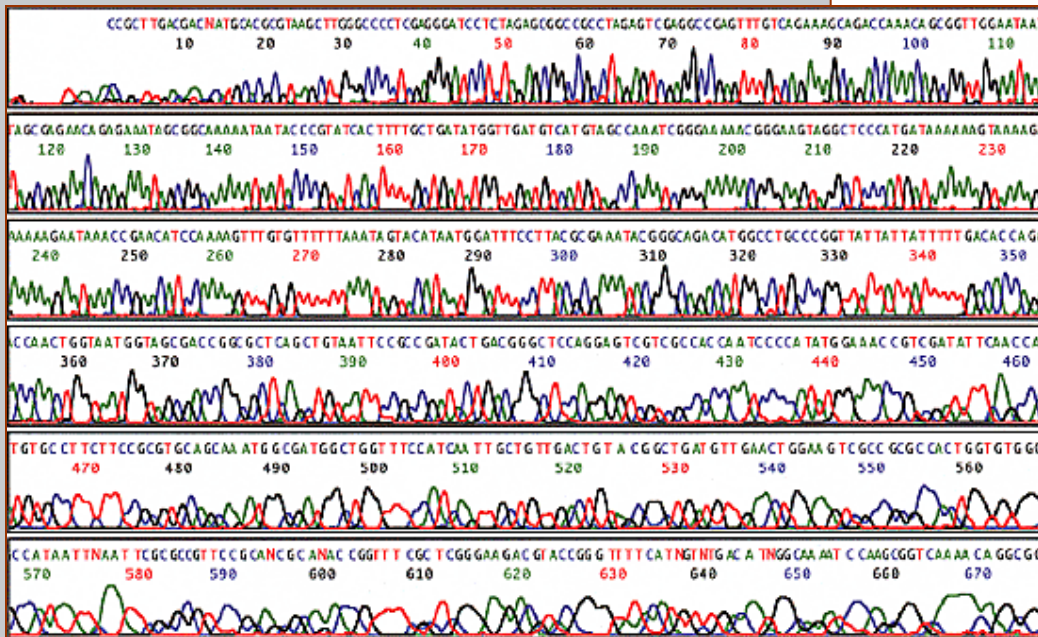
chloroplastové geny

- *rbcL*
- *matK*
- *trnL-trnF ...*

jaderné geny

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

3. sekvence celých genomů – cpDNA fylogenomika



Další markery v systematice

- RFLP chloroplastové DNA
- PCR-RFLP – např. identifikace hybridů
- AFLP – pro blízce příbuzné a recentně vznikající taxony
- (cpDNA) mikrosatelity – na úrovni druhů
- isozymy – odlišení velmi blízce příbuzných taxonů, studium polyploidizace a hybridizace

Literatura

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

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

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

Weising K. et al. (2005): DNA fingerprinting in plants. 2nd ed.

Soltis D.E. & al. [eds.] (1998): Molecular systematics of plants.II. DNA sequencing.

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

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

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