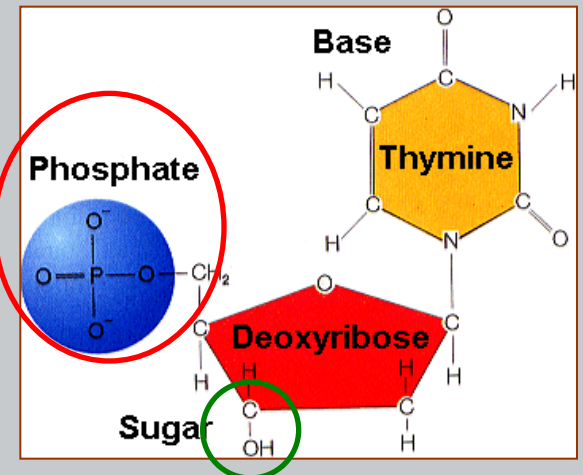
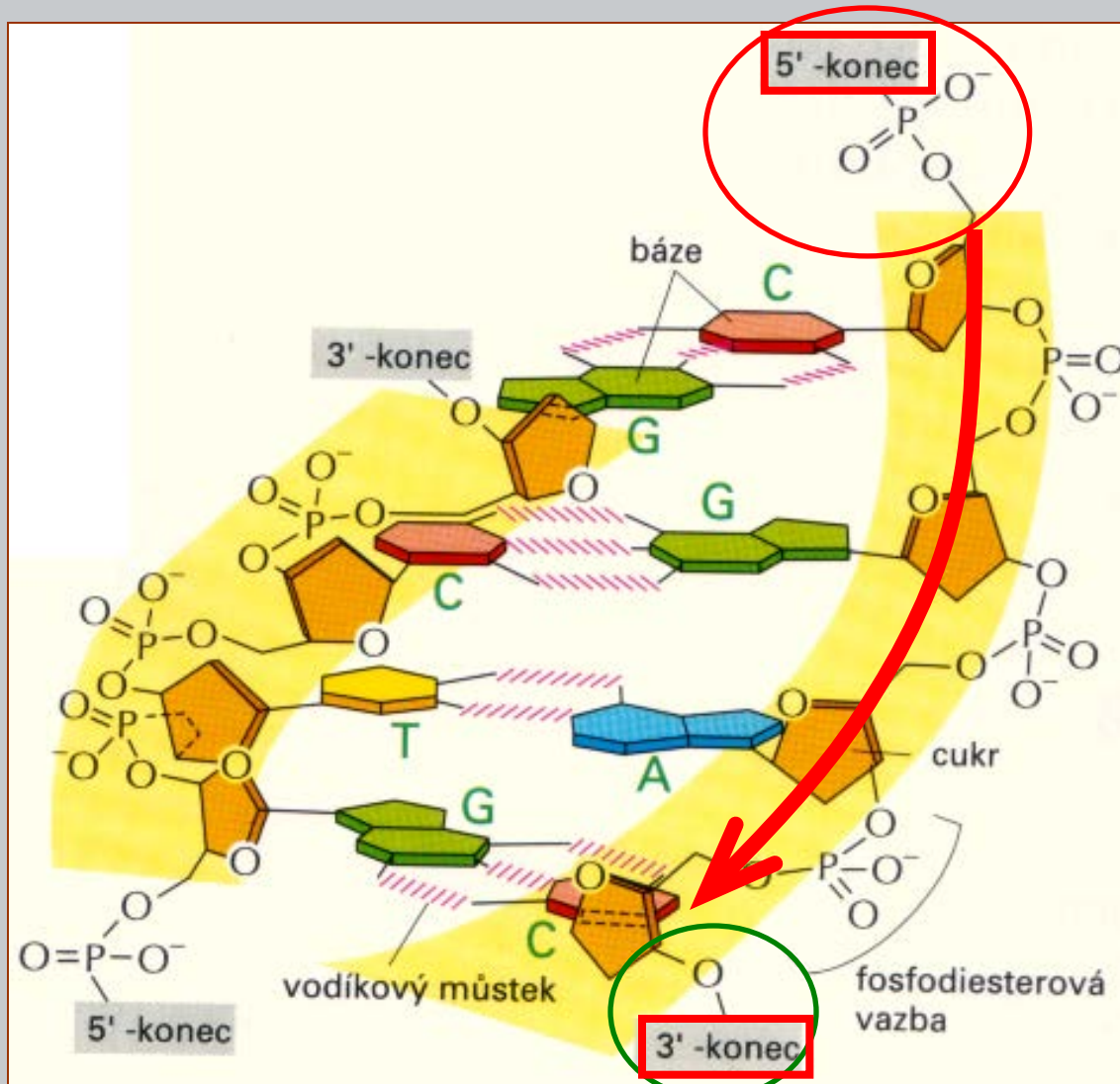


Využití molekulárních markerů v systematice a populační biologii rostlin

4. DNA, PCR, RAPD

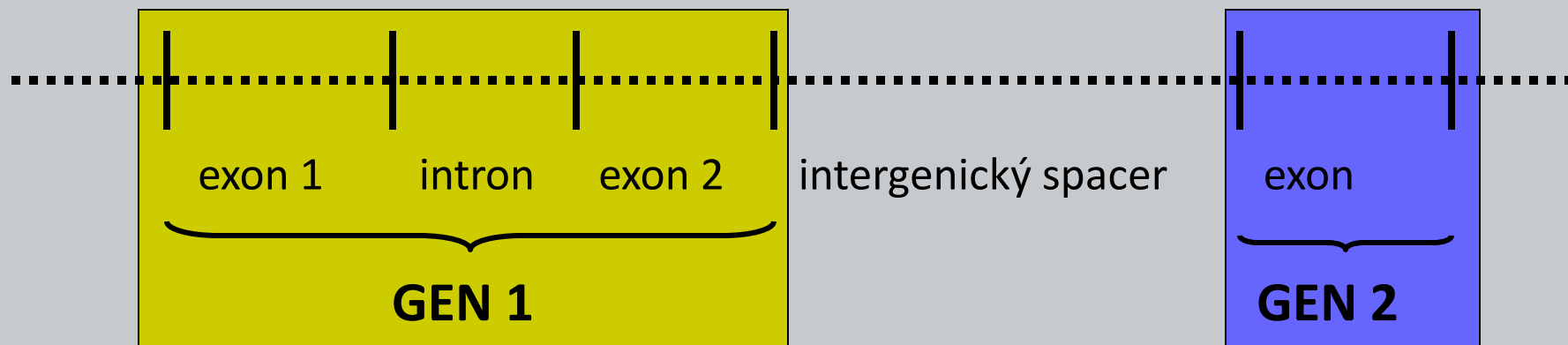
Struktura DNA



- dvoušroubovice
- 2 antiparalelní řetězce
- cukr-fosfátová kostra
- báze
 - puriny (A, G)
 - pyrimidiny (C, T)
- párování
 - G≡C
 - A=T

Struktura DNA II.

- genetická informace – pořadí nukleotidů (ACGT)



- kodující úseky – exony – *konzervativnější*
- nekodující úseky – introny, spacery - *variabilnější*

Rostlinný genom

- jaderná – nDNA
 - chromozómy
 - velikost – $9 \cdot 10^7$ - $1 \cdot 10^{11}$ bp
 - unikátní informace jedince, rekombinace
- chloroplastová – cpDNA
 - kruhová molekula
 - 120-200 kbp (*Nicotiana* – 156 kbp)
 - některé specifické geny
- mitochondriální – mtDNA
 - četné repetitivní sekvence
 - 180-2000 kbp, časté rekombinace, inserce/delece

Přístupy ke studiu DNA

- sekvenování
 - pořadí nukleotidů
- restriční štěpení
 - délkový polymorfismus restričních fragmentů
 - RFLP, PCR-RFLP
- PCR
 - délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů
 - RAPD, AFLP, mikrosatelity...

Replikace *in vitro*

PCR – polymerase chain reaction

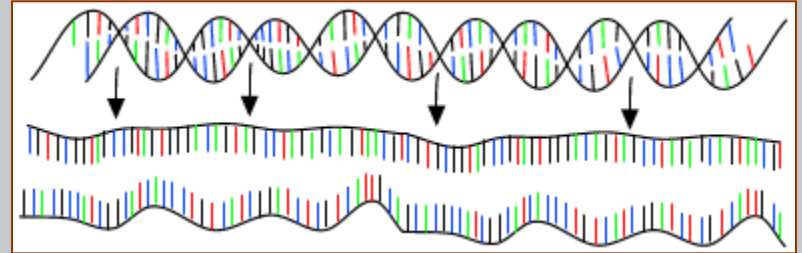
- namnožení konkrétní části genomu
- potřebujeme
 - zkoumanou DNA (templát)
 - primery – oligonukleotidy o délce 10-25 bází
 - dNTP – „stavební kameny“ DNA
 - *Taq* DNA polymerázu (termostabilní)
 - pufr s $MgCl_2$ – stabilizace
- amplifikace střídáním teploty

Princip PCR

„pouhé“ střídání tří teplot

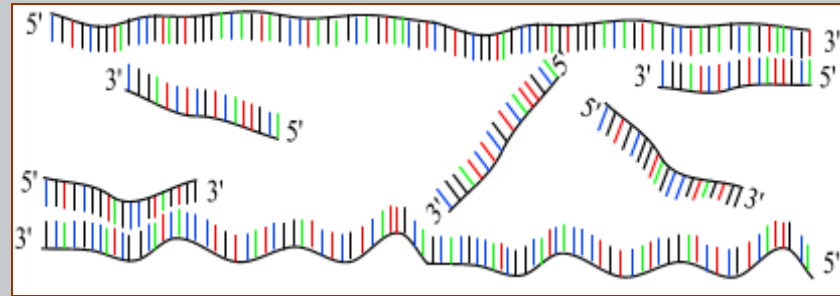
1. 95 °C – denaturace

- oddělení obou řetězců dvoušroubovice od sebe



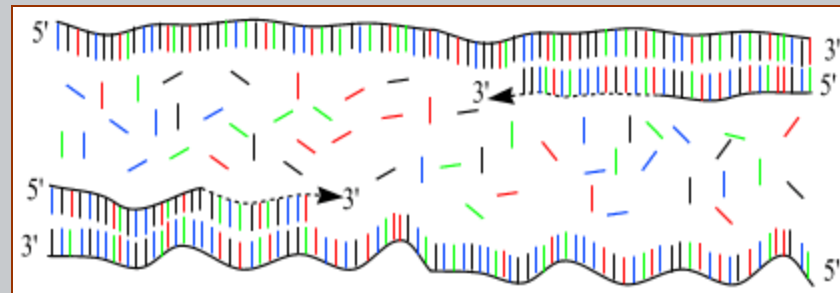
2. 35-65 °C – annealing

- specifické párování primerů s DNA

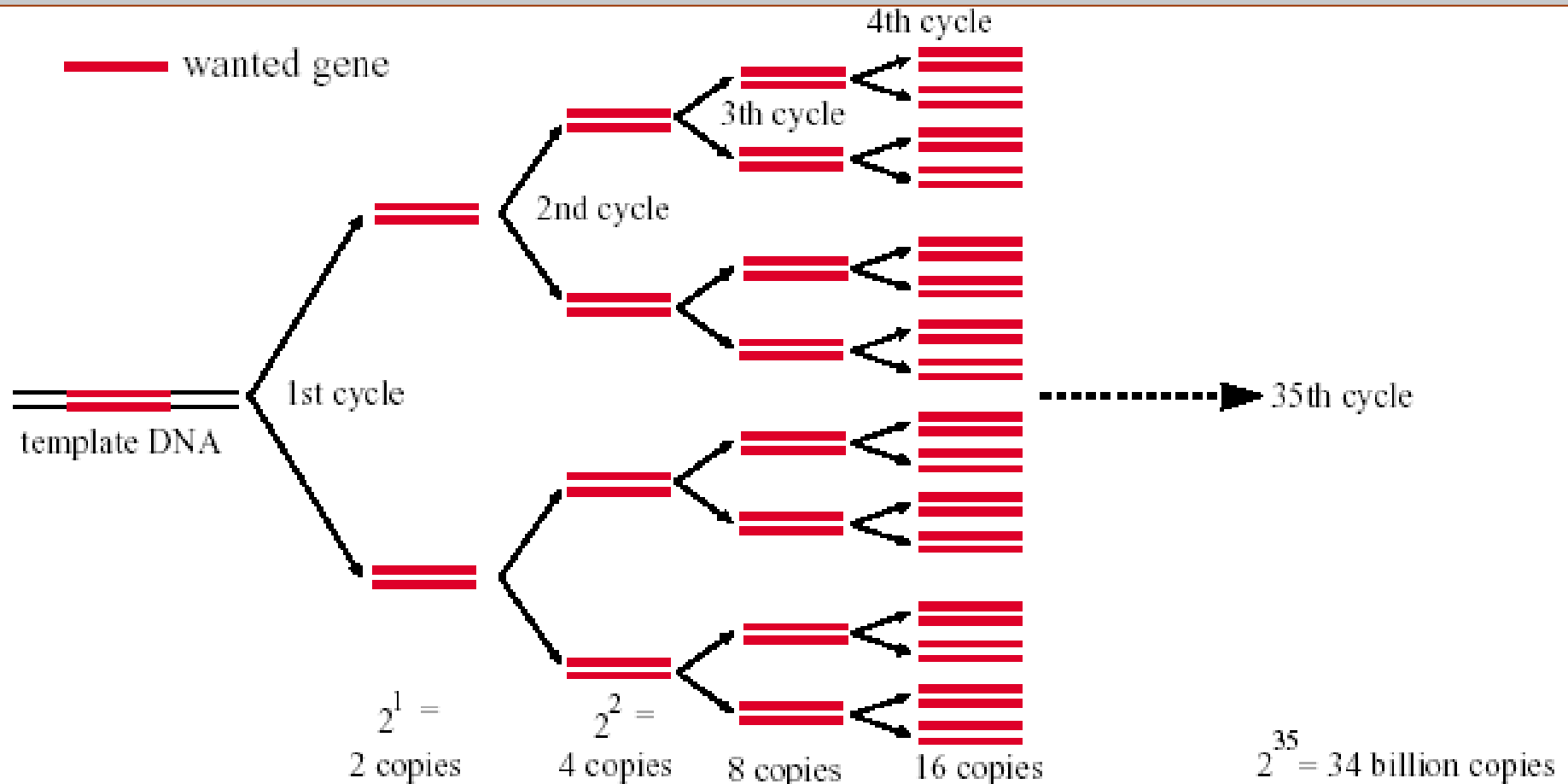


3. 72 °C – polymerace

- prodlužování řetězce DNA (5' → 3')

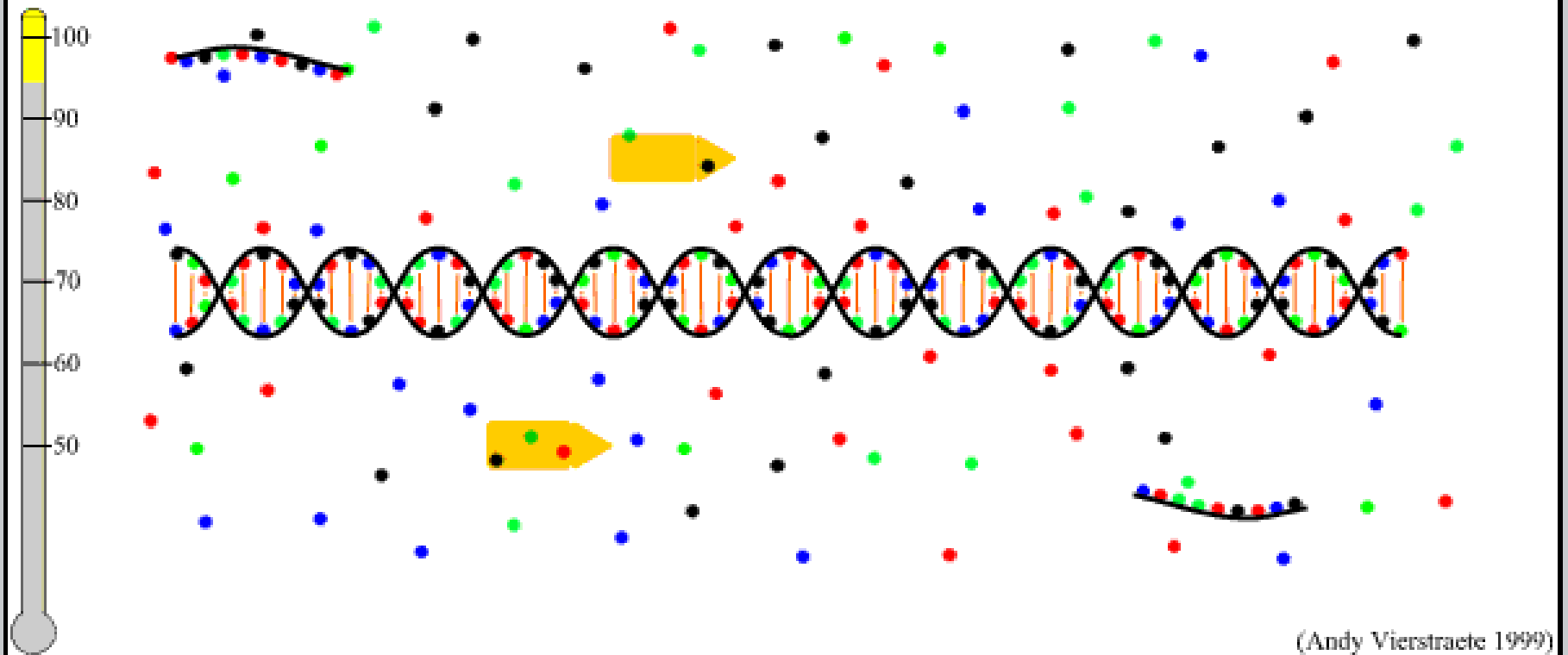


Exponenciální amplifikace



PCR :

Denaturation 94°C



(Andy Vierstraete 1999)

Přehled PCR technik

- *RAPD* – využití jednoho oligonukleotidu jako primeru (délkový polymorfismus, dominantní)
- *PCR-RFLP* – kombinace PCR a následné restrikce získaného fragmentu restrikčním enzymem (délkový polymorfismus, kodominantní) - často cpDNA (haploidní)
- *AFLP* – restrikce celého genomu dvěma restrikčními enzymy a následná amplifikace pouze části získaných fragmentů (délkový polymorfismus, dominantní)
- *mikrosatelity (SSRs)* – amplifikace konkrétní repetitivní oblasti genomu (polymorfismus je dán počtem opakování 2-4 nukleotidové sekvence, kodominantní)
- další techniky (ISSR, SSCP...)

Princip RAPD metody

1. PCR s jedním primerem

- primer – oligonukleotid s arbitrární sekvencí
- příslušný PCR produkt se vytvoří v případě, že
 - existují dvě identická (nebo velmi podobná) místa pro nasednutí primeru na protiběžných DNA řetězcích
 - amplifikovatelná vzdálenost mezi oběma místy je zpravidla do cca 3000 bp

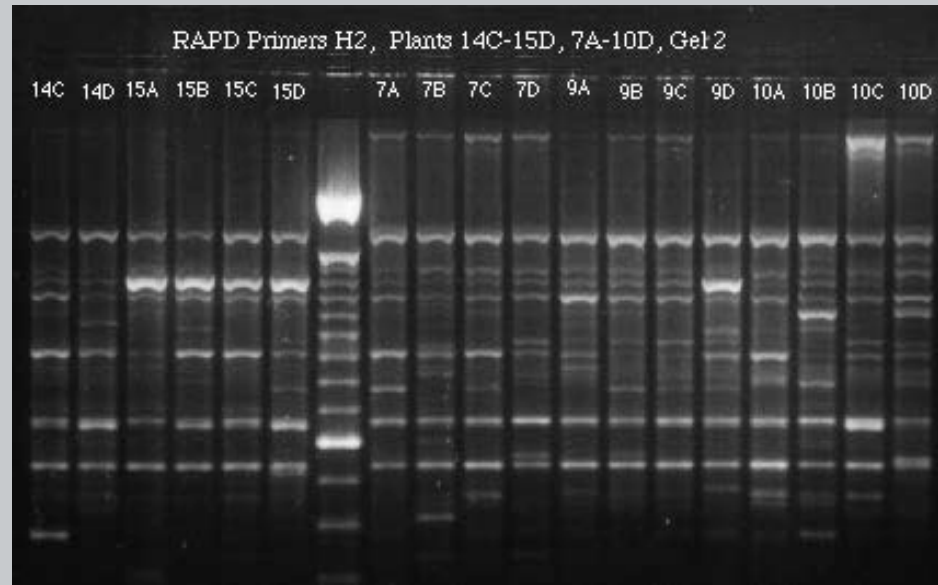
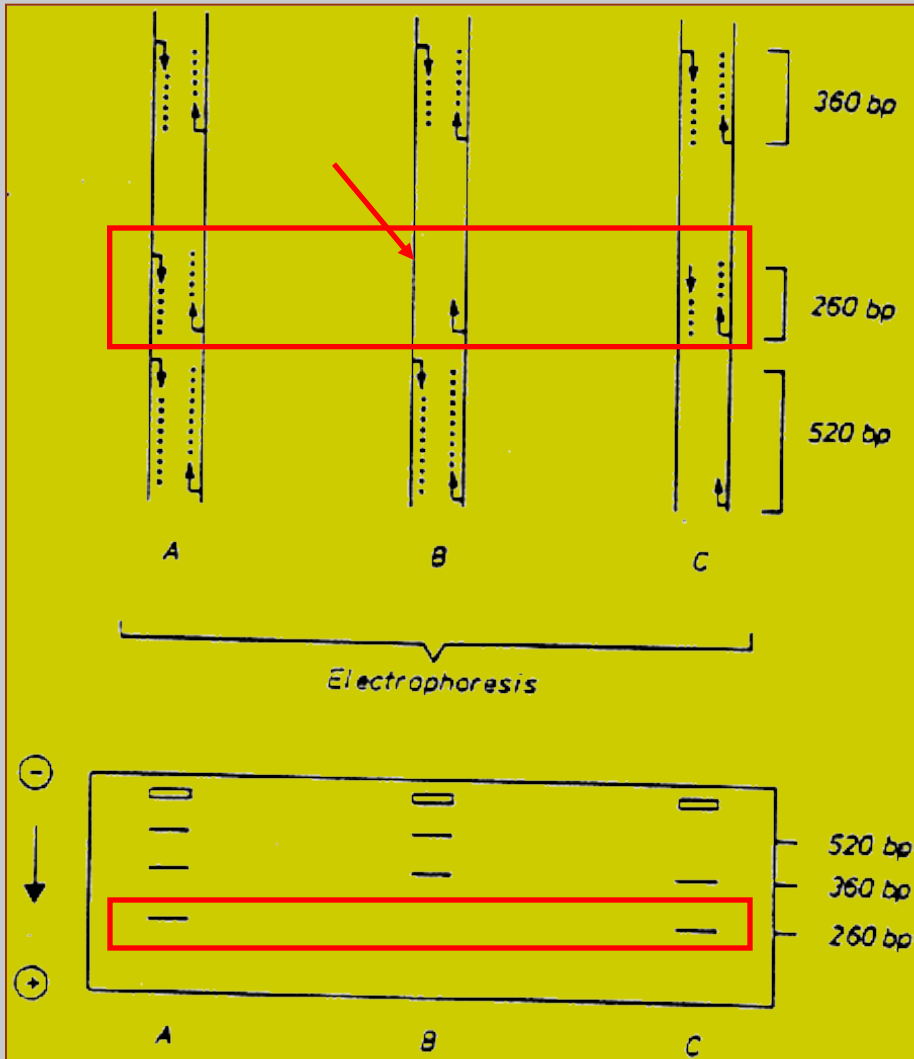
2. elektroforéza – rozdělení podle délky

- horizontální – agarosový gel
- vertikální – polyakrylamidový gel

3. vizualizace fragmentů

- EtBr (ethidium bromid) – selektivně se váže na DNA

RAPD obrazem



Předpoklady variability

- *priming sites* (místa, kde se navazuje primer)
 - náhodně rozmístěny v genomu
 - tj. v kodující i nekodující oblasti
- variabilita (presence/absence proužku v daném místě) se předpokládá díky
 - mutaci v místě navazování primeru
 - inserci/deleci v amplifikované oblasti

Typy metod

- **RAPD** (*random amplified polymorphic DNA*) – Williams et al. 1990
 - kratší primery (obvykle 10 bp)
 - konstantní teplota *annealingu* (34-37 °C)
- **AP-PCR** (*arbitrarily primed PCR*) – Welsh & McClelland 1990
 - delší primery (20 bp nebo delší)
 - nízká iniciační teplota *annealingu* (40 °C – nižší specifická vazba primerů)
 - následuje vyšší teplota (60 °C – vyšší specifická vazba, primery se už striktně vážou na již vytvořené fragmenty)
- **DAF** (*DNA amplification fingerprints*) – Caetano-Anollés et. al. 1991
 - použití velmi krátkých primerů – 5 nukleotidů

Primery

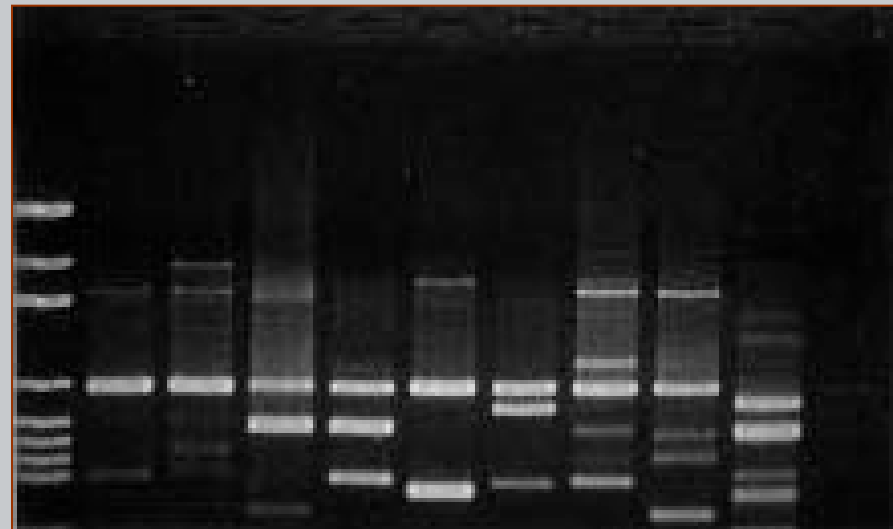
- dekanukleotidy
- 1 048 576 různých možných dekanukleotidů
- omezení pro primery
 - 60-70% obsah GC – zbývá 24 576 kombinací
 - důležité pro úspěšný annealing při nízké teplotě (GC – tři vodíkové vazby – větší stabilita komplexu templát-primer) a extenzi při 72 °C
 - nižší teplota *annealingu* – umožňuje určitý stupeň neúplného párování (*imperfect priming*)

Výhody a přednosti metody

- není potřeba žádná předchozí molekulární znalost o zkoumaném taxonu
- stačí malé množství DNA k analýze – cca 25 ng
- jednoduchá a rychlá metoda
- produkováno mnoho polymorfních fragmentů
- fragmenty jsou (teoreticky) náhodně rozmístěny po celém genomu – tj. odráží variabilitu skrz celý genom

Nevýhody a úskalí metody

- citlivost k mnoha parametrům – opakovatelnost?
 - nemožnost srovnání mezi různými studiemi
- problémy při vyhodnocování
 - dominantní marker – nevíme co je lokus
 - homologie fragmentů
 - intenzita proužků



Ovlivnění výsledků

skoro cokoliv může ovlivnit pattern proužků

- rozdíly v čistotě DNA
- koncentrace MgCl_2
- poměr primeru a templátové DNA
- teplota annealingu
- typ (výrobce, šarže) termostabilní polymerázy
- teplotní profil PCR (*ramping time* – rychlost ohřevu a chlazení)
- použitý termocykler

opakovatelnost metody roste s

- koncentrací polymerázy
- pozvolnějším nárůstem teploty mezi annealingem a extenzí

Ovlivnění výsledků

skoro cokoliv může ovlivnit pattern proužků

základním předpokladem správné interpretace je

- spolehlivá amplifikace diagnostických fragmentů
- striktní standardizace metody
 - teplotní profil PCR (*ramping time* – rychlost ohřevu a chlazení)
 - použitý termocykler

opakovatelnost metody roste s

- koncentrací polymerázy
- pozvolnějším nárůstem teploty mezi annealingem a extenzí

RAPD jako dominantní marker

- polymorfismus – **mutace** v místě navazování primeru (zabrání amplifikaci příslušného markeru)
- nepotvrzený předpoklad – ale používá se, když hodnotíme markery navzájem nezávisle (v 0-1 matici)
- pokud je polymorfismus dán **insercí/delečí** v amplifikované sekvenci a oba typy jsou namnoženy – *kodominance*
 - *Helianthus* – cca 5% lokusů vykazovalo kodominanci
 - odchylky od mendelovské dědičnosti
 - organelární proužky
 - *Brassica* – 0.7% z cpDNA, 4.9% z mtDNA
 - *Pseudotsuga* – 49% zřejmě z mtDNA (striktní maternální dědičnost)
 - *Zea mays* – nenalezeny

Homologie fragmentů

- předpoklad – komigrující proužky jsou homologní
- lze otestovat
 - Southernova hybridizace – jeden proužek je z gelu vyříznut a použit jako proba při hybridizaci s ostatními
 - téměř vždy nalezena homologie, ale...
 - *Helianthus* – 91% proužků bylo homologních
 - restriční štěpení fragmentů izolovaných z gelu
 - homologické, pokud mají stejný restriční profil (pouze aproximativní)
 - sekvenování
- nezávislost fragmentů ?
 - neznámé alelické vztahy
 - formování heteroduplexů
 - negenetické artefakty

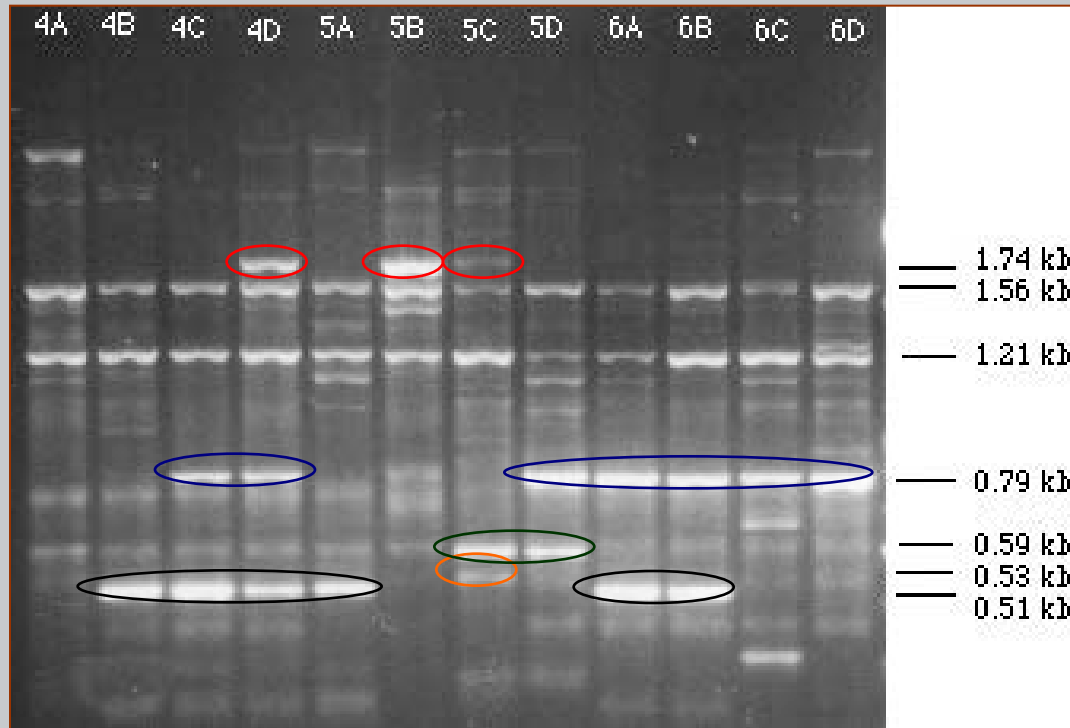
Variabilita v intenzitě proužků

- různý stupeň neúplného navázání primerů (*primer mismatch*) – dáno relativně nízkou teplotou annealingu
 - potvrzeno sekvenováním RAPD fragmentů
- heterozygosita
- slabší proužky jsou obecně méně robustní
- intenzitě se nepřikládá význam a vyhodnocuje se pouze presence/absence fragmentů

Vyhodnocování RAPD pattern

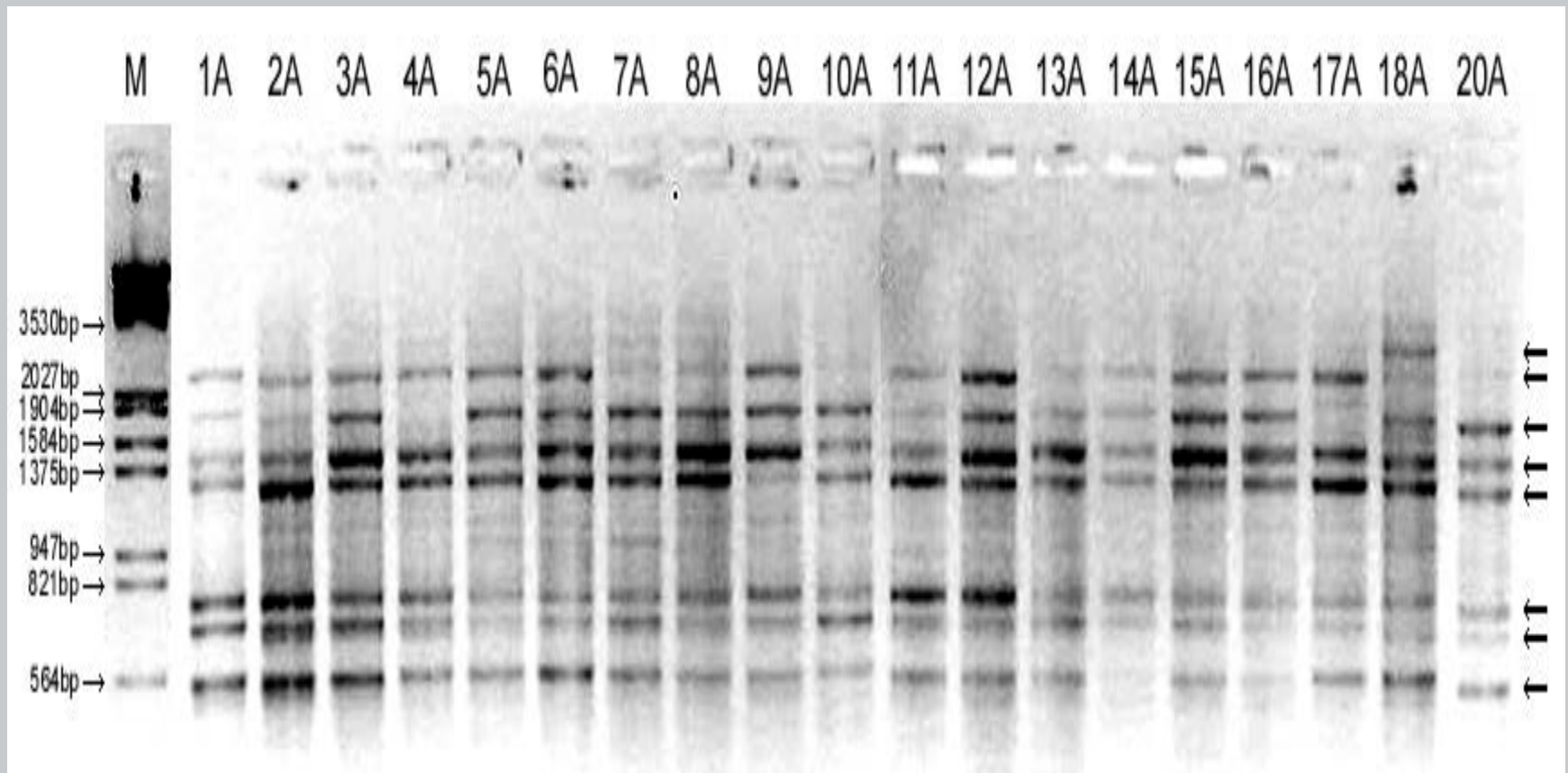
- absence/presence proužků – 0-1 matice
- které proužky brát a které ne?
 - jen v omezeném rozsahu
 - jen proužky s vyšší intenzitou – vyšší reproducibilita
 - i menší počet spolehlivých proužků zvyšuje hodnověrnost metody
 - srovnání opakovaných reakcí (od extrakce DNA po elektroforézu) s týmiž vzorky – jen proužky, které se objevily znovu

Vyhodnocení RAPD gelu



Band (kb)	4-A	4-B	4-C	4-D	5-A	5-B	5-C	5-D	6-A	6-B	6-C	6-D
1.74	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
1.56	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1.21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0.79	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
0.59	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
0.53	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
0.51	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0

Příklad RAPD gelu



Použití indexů podobnosti

- *Jaccard* (1908)
 - proporce sdílených proužků (pozitivní shoda)
- *Nei & Li coefficient* (1979)
 - pravděpodobnost, že proužek amplifikovaný v jednom vzorku bude amplifikován i ve druhém
 - odhad očekávané proporce shodných proužků sdílených proto, že jsou zděděny od jednoho společného předka
- nevhodný je *simple matching*
 - zahrnuje i negativní shodu
 - nepřítomnost proužku je mnohem pravděpodobněji nehomologní

matice vzdáleností → dendrogram (UPGMA, NJ)

Další možnosti vyhodnocení

- předpoklad bialelické podstaty RAPD lokusů
 - diskutabilní – předpokládáme pouze 2 alely
 - frekvenci recesivní alely odhadujeme
 - odmocnina z frekvence chybějících proužků (Weir 1990)
 - jiný odhad (Lynch and Milligan 1994)
- *Shannon's diversity index*

$$H_{Sh} = - \sum_{i=1}^k p_i \ln p_i$$

p_i – frekvence i -tého fragmentu

Další možnosti vyhodnocení

- před

20 jedinců: 16 presence 4 absence proužku

frekvence $a = \sqrt{4/20} = 0.4472$

genotypové frekvence

- dis

- fre

AA = $(0.5528)^2 = 0.3056 * 20 = 6.112$

- Aa = $2 * 0.5528 * 0.4472 = 0.4944 * 20 = 9.888$

- aa = $(0.4472)^2 = 0.2000 * 20 = 4$

tj. 6 AA, 10 Aa, 4 aa

- *Shannon's diversity index*

$$H_{Sh} = - \sum_{i=1}^k p_i \ln p_i$$

p_i – frekvence i -tého fragmentu

Analysis of **MO**lecular **VA**riance

- testování populačně genetické struktury
- rozdělení celkové variance na (ko)varianční komponenty skupiny, populace a jedince
- kolik procent celkové variability je
 - mezi jedinci v rámci populace
 - mezi populacemi
 - mezi skupinami populací ...
- výpočet analogu F-statistik (F_{ST})
- software – Arlequin v. 3.5 (Excoffier, Laval & Schneider 2005)
 - <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>

AMOVA design and results :

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among groups	4	33.295	0.05470 Va	15.73
Among populations within groups	5	5.298	0.01250 Vb	3.59
Within populations	662	185.745	0.28058 Vc	80.68
Total	671	224.339	0.34778	

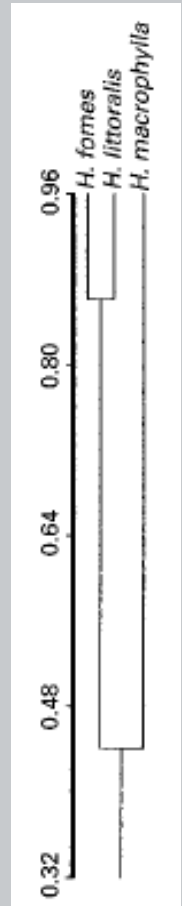
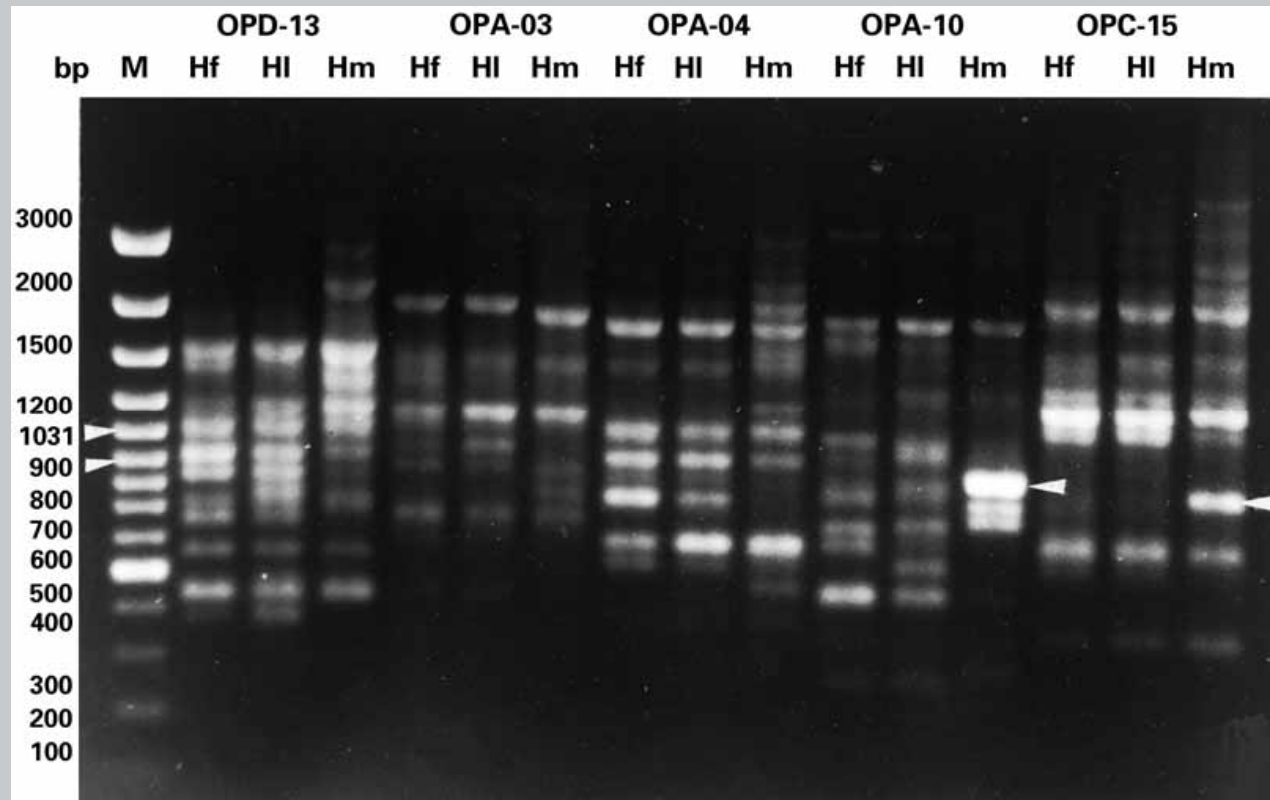
Fixation Indices

FSC : 0.04266
 FST : 0.19323
 FCT : 0.15728

Použití metody

- fenetické, kladistické studie
 - nejméně vhodná aplikace, ale občas využíváno
 - může být úspěšná pokud
 - zajistíme co nejstálější podmínky pro PCR
 - mezirodové vztahy – málo studií
 - není vhodná – komigrující proužky nemusí být homologní
 - vztahy v rámci druhu nebo mezi blízce příbuznými druhy
- odhady rozmnožovacího systému (*mating system*)
- identifikace klonů
- hybridizace – specifické proužky pro jednotlivé taxony

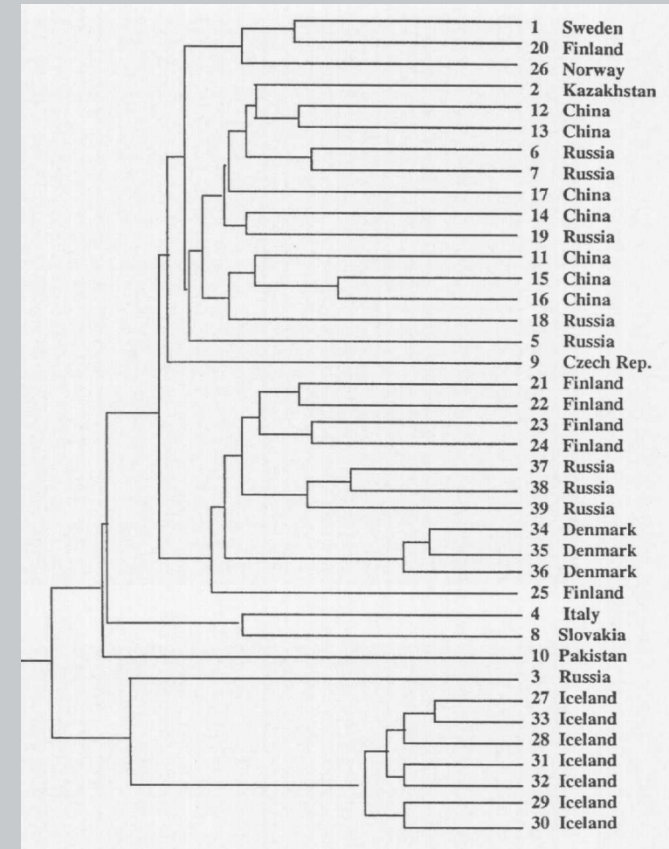
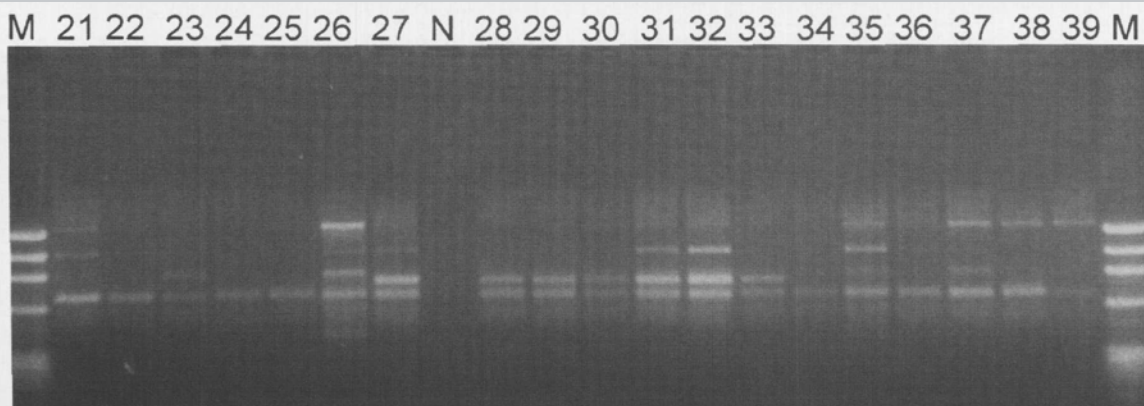
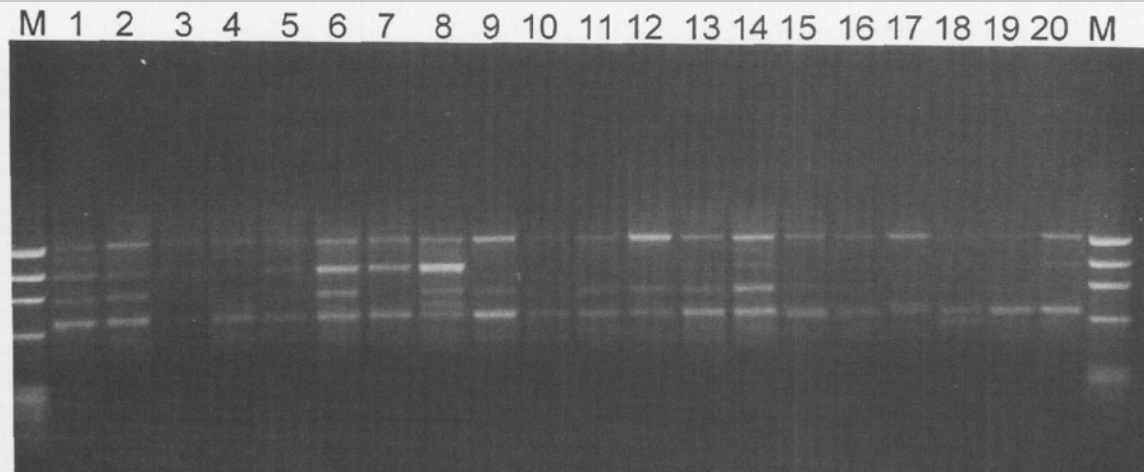
Mezidruhové vztahy *Heritiera*



Das et al. (1999)

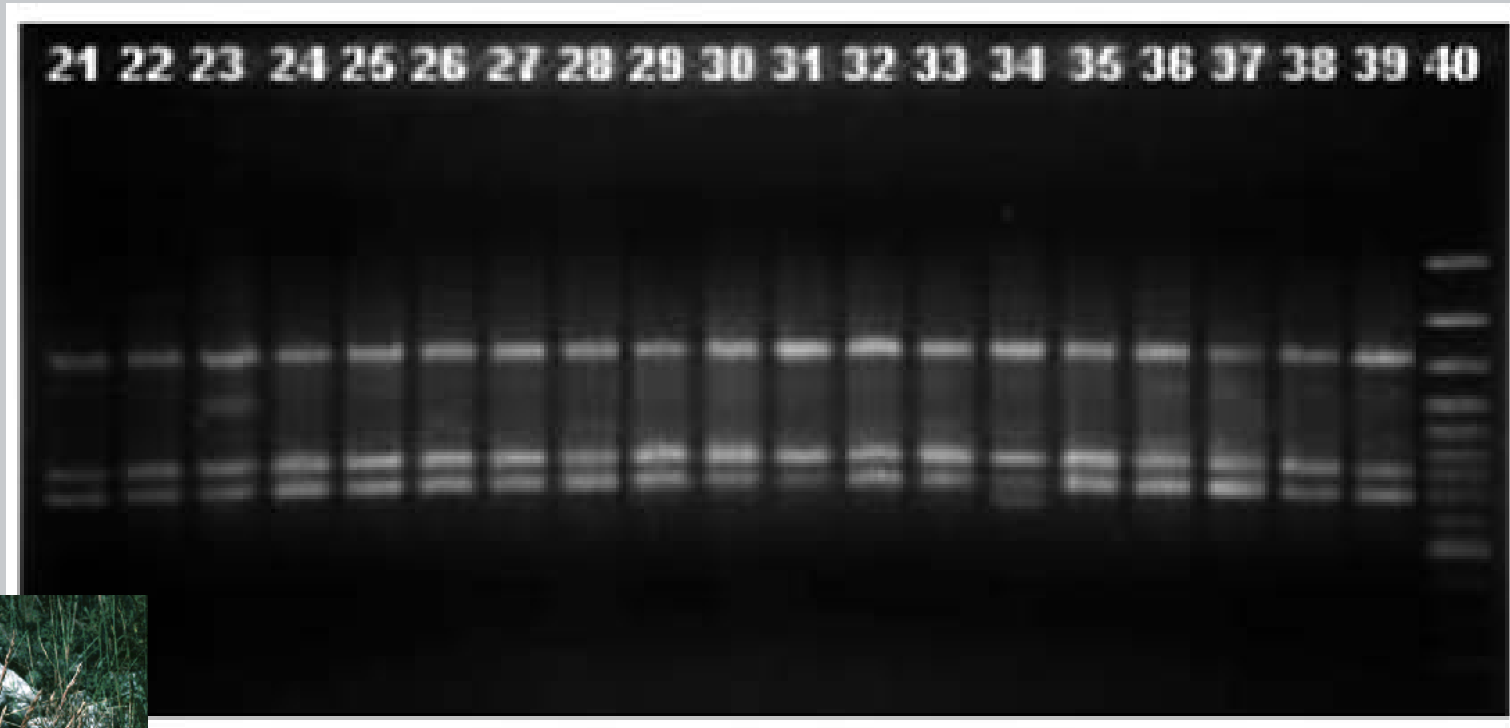
Vnitrodruhová variabilita

Elymus caninus



Sun et al. (1999)

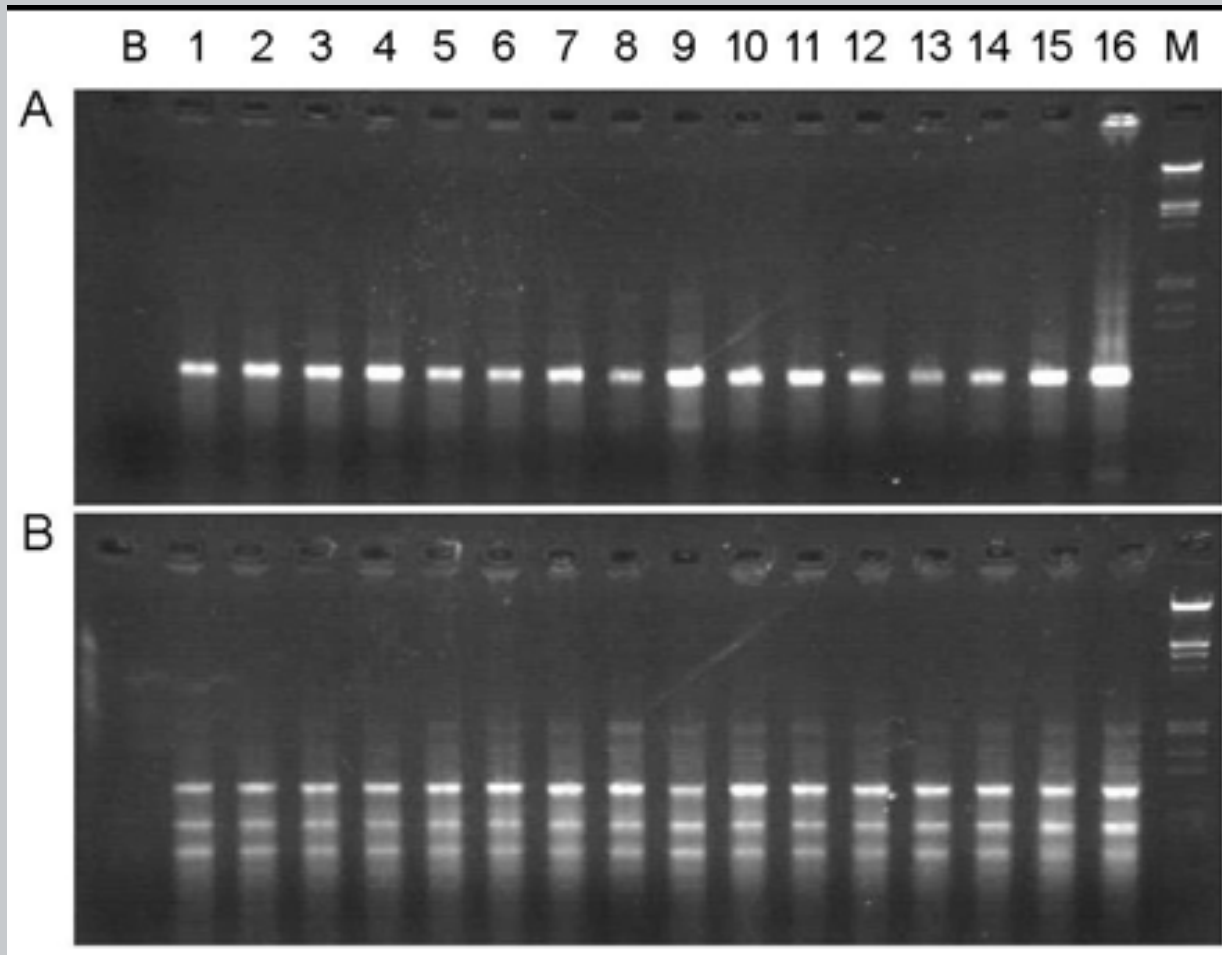
Autogamický *Elymus alaskanus*



Gaudett et al. (2005)

Identifikace klonů

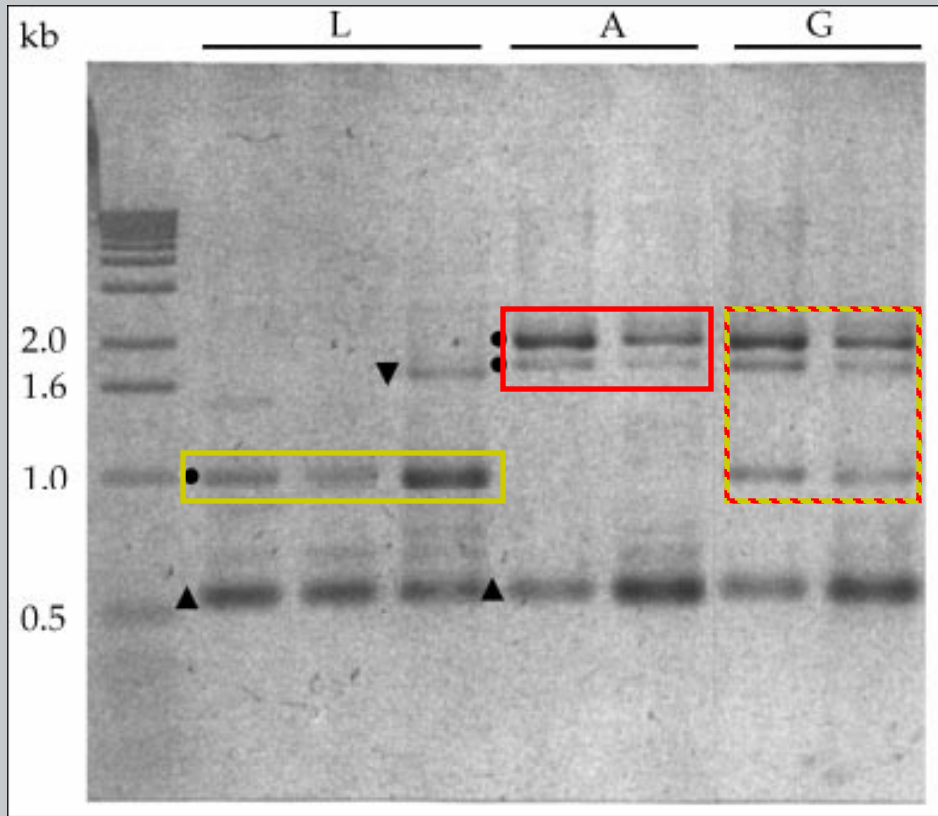
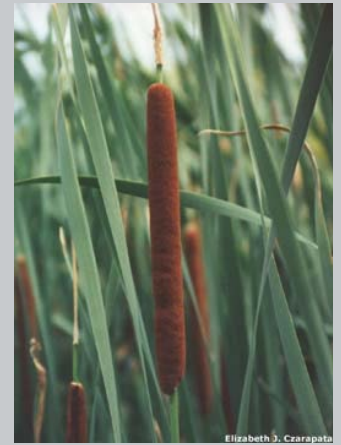
Camellia sinensis



Singh et al. (2004)

Hybridizace

Typha × *glauca*



- *T. angustifolia*
- *T. latifolia*

Kuehn et al. (1999)

Populační studie

Fisher M. & al. (2000): RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany* 87(8): 1128–1137.



(Bio)systematická studie

Sun M. & Wong K.C. (2001): Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. *American Journal of Botany* 88(12): 2180–2188.



Literatura

Harris S.A. (1999): *RAPDs in systematics – a useful methodology ?* In: Hollingsworth & al. [eds.]: *Molecular systematics and plant evolution*, pp. 211-228

Wolfe A.D. & Liston A. (1998): *Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology*. In: Soltis D.E. & al. [eds.]: *Molecular systematics of plants. II. DNA sequencing*, pp. 43-86

Simmons M.P., Zhang L.-B., Webb C.T., Müller K. (2007): *A penalty of using anonymous dominant markers (AFLPs, ISSRs, and RAPDs) for phylogenetic inference*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 528–542.

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

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