

Využití molekulárních markerů v systematice a populační biologii rostlin

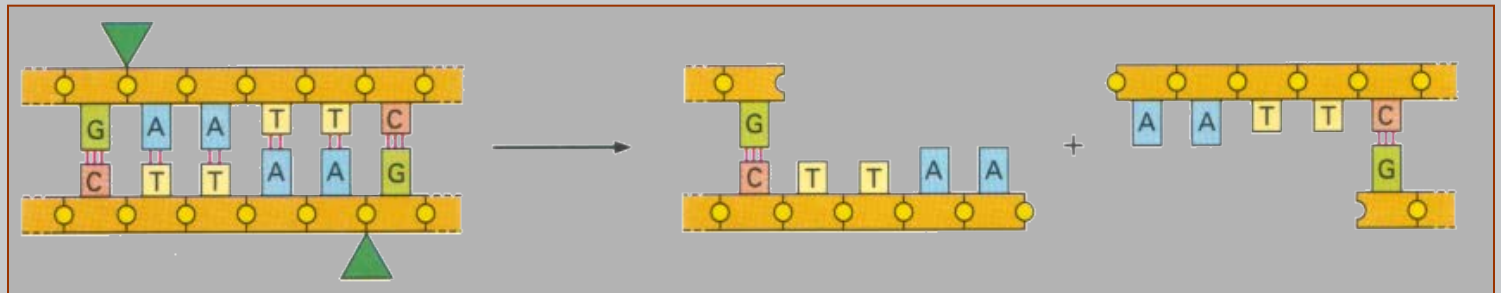
6. RFLP, cpDNA

Restriction Fragment Length Polymorphism

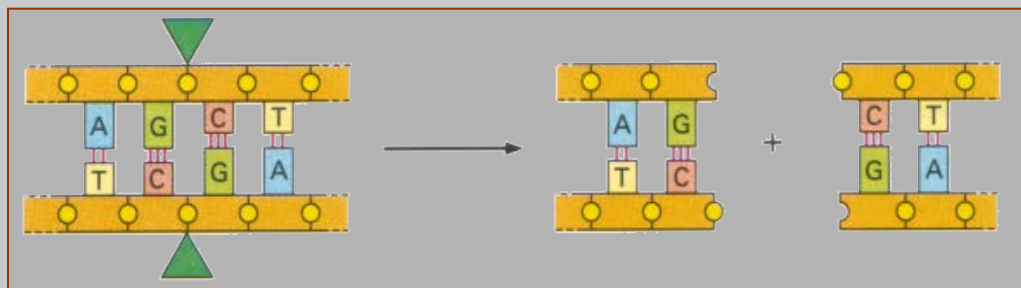
- polymorfismus v délce restričních fragmentů
- základní princip metody
 - štěpení celkové DNA na fragmenty pomocí restričních endonukleáz
 - elektroforetické rozdělení fragmentů dle délky
 - přenos fragmentů na membránu
 - hybridizace se značenou probou

Restrikční endonukleázy

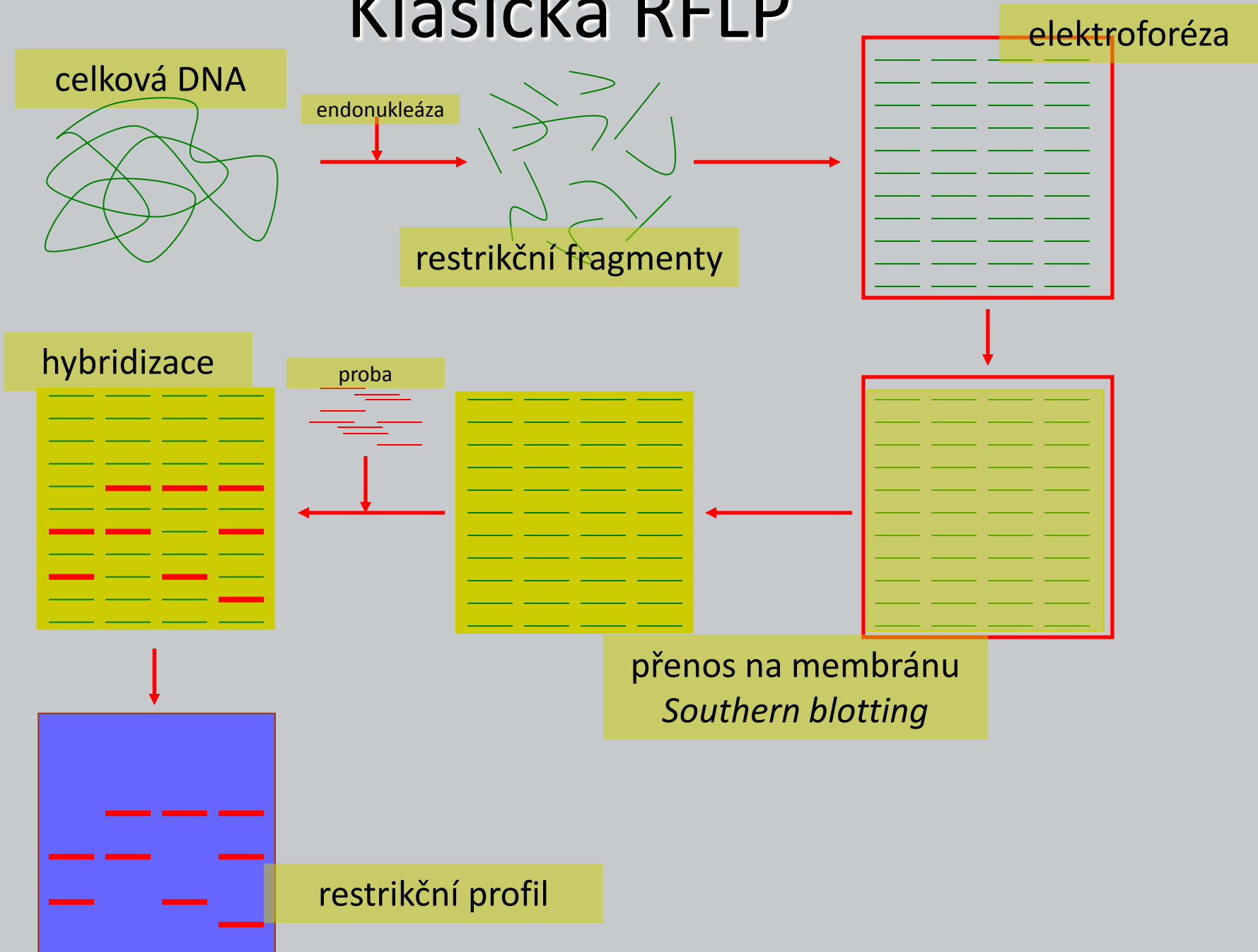
- enzymy izolovány z bakterií
 - *EcoRI* – *Escherichia coli*, *AluI* - *Arthrobacter luteus* ...
- specifické štěpení dsDNA (dvouřetězcová – *double stranded*)
- rozpoznávají určitou sekvence
 - palindrom - symetrie podle centrálního bodu
 - nejčastěji 4 bp nebo 6 bp
 - asymetrické štěpení (lepivé konce – *sticky ends*) – např. *EcoRI*



- symetrické štěpení (tupé konce – *blunt ends*) – např. *AluI*



Klasická RFLP

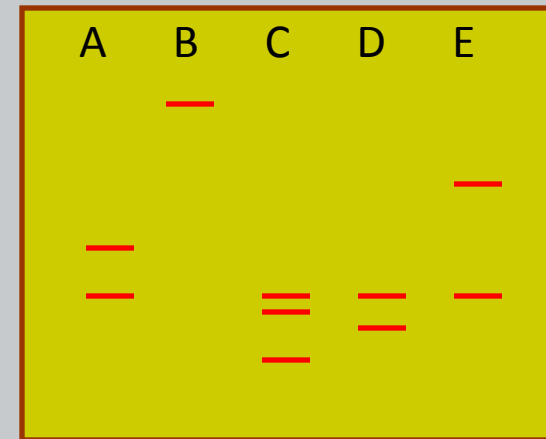
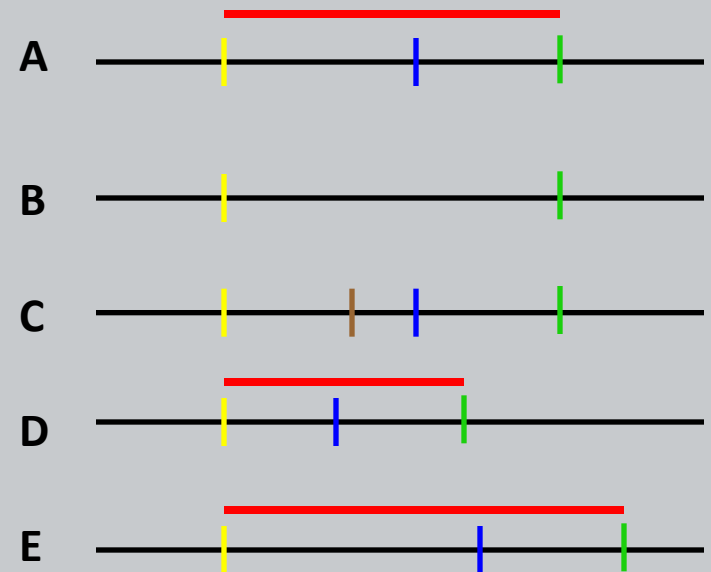


Příprava probe (sondy)

- bakteriální naklonování konkrétní části DNA (genu, operonu)
- (ne)radioaktivní označení produktu – ^{32}P , ^{35}S , fluorescenční aj. značení
- použití sondy ze studovaných nebo podobných taxonů
- např. sonda pro rDNA – na gelu zviditelní fragmenty DNA pocházející z této oblasti
- časté použití chloroplastových sond – variabilita na úrovni celého chloroplastu

Polymorfismus

- *mutace* v místě štěpení
 - ztráta (B) mnohem pravděpodobnější než vznik nového (stačí jediná změna na jakékoliv pozici)
 - nové místo (C)
 - specifická změna
- *inserce* (E) nebo *delece* (D) mezi dvěma restričními místy



— hybridizující část DNA
—|— restriční místo na zkoumané DNA

RFLP

výhody

- vysoce reprodukovatelné pattern
- variabilita v konkrétní části genomu (např. cpDNA ...)

nevýhody

- potřeba velkého množství DNA
- nutnost mít množství značené proby
- drahá a komplikovaná
 - vybavení na blotting
 - práce se značenými materiály

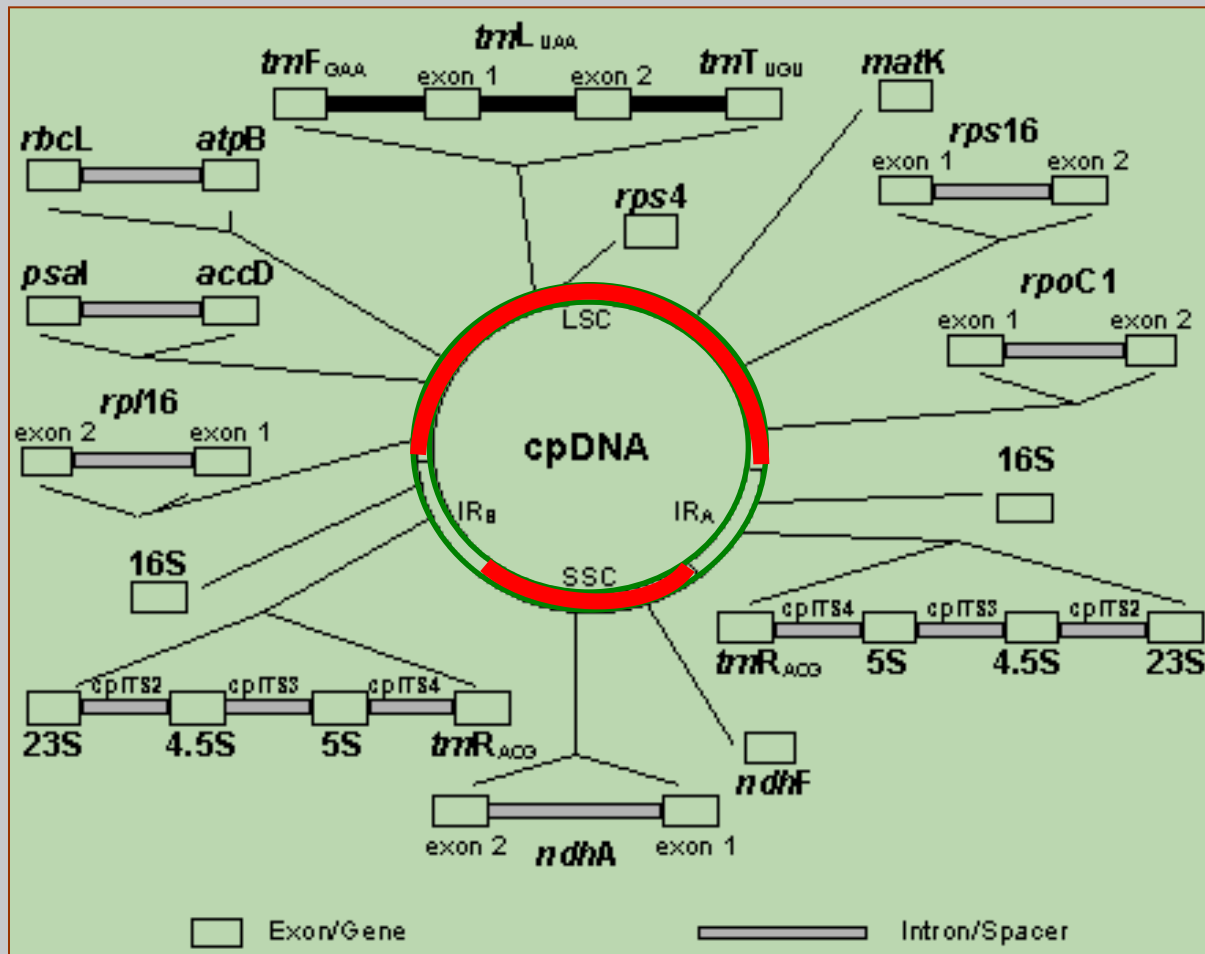
PCR-RFLP

- synonymum – CAPS (**C**leaved **A**mplified **P**olymorphic **S**equences)
- princip metody
 - pomocí dvojice primerů PCR amplifikace konkrétního úseku DNA
 - restrikce PCR produktů endonuklázou
 - elektroforéza
 - vizualizace fragmentů pomocí ethidium bromidu

PCR-RFLP

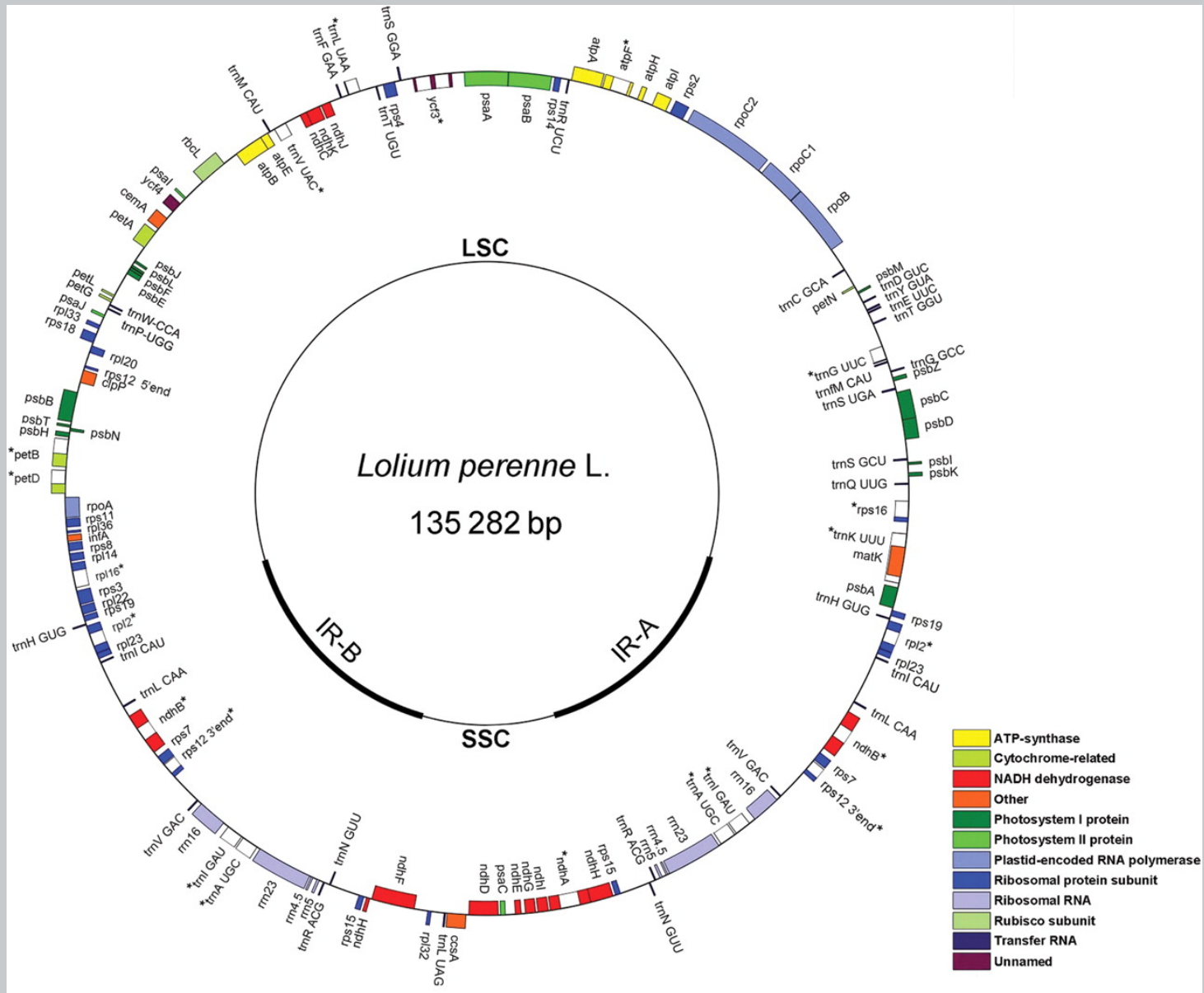
- výhody
 - stačí malé množství DNA
 - odpadá nutnost blottování a práce s radioaktivně značeným materiálem – jednoduchá metoda
- časté použití u cpDNA a rDNA (ITS)
 - PCR amplifikace nekodujících úseků
 - využití univerzálních primerů

Chloroplastový genom (cpDNA)



- kruhová molekula
- 70-200 kb
- 30-100 v plastidu
- homoplazmie
- 2 podjednotky – LSC, SSC
- IR – inverted repeats
- geny pro
 - fotosystém – *ps*
 - tRNA – *trn*
 - RUBISCO – *rbc*
 - ...

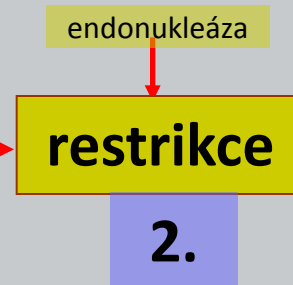
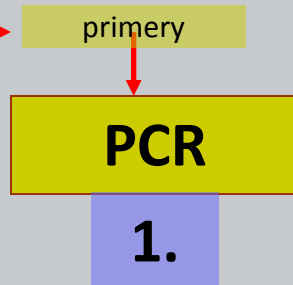
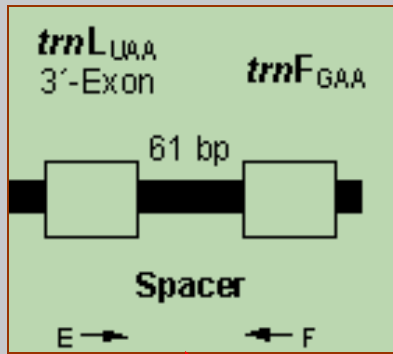
Chloroplastový genom (cpDNA)



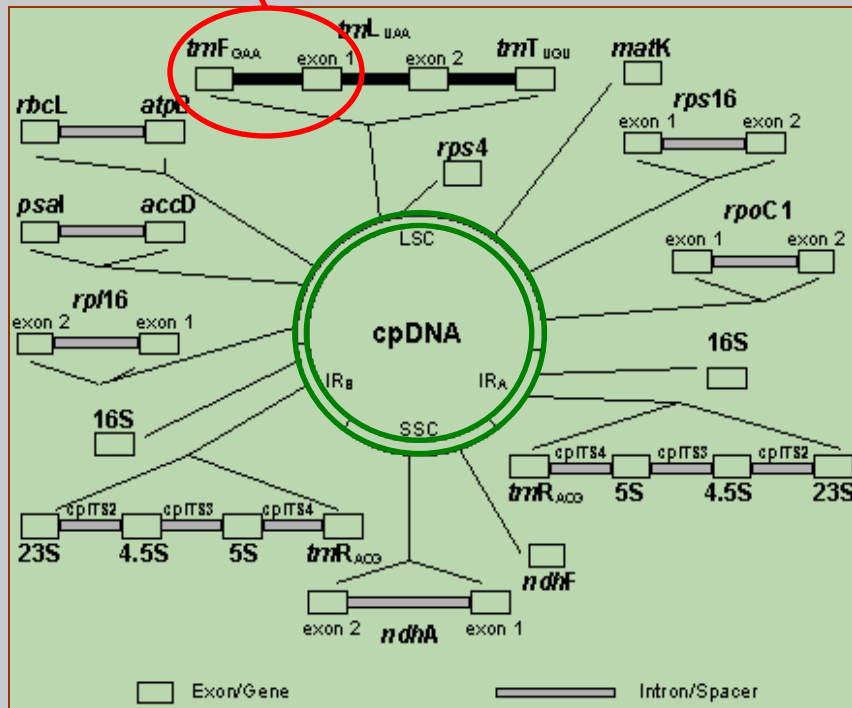
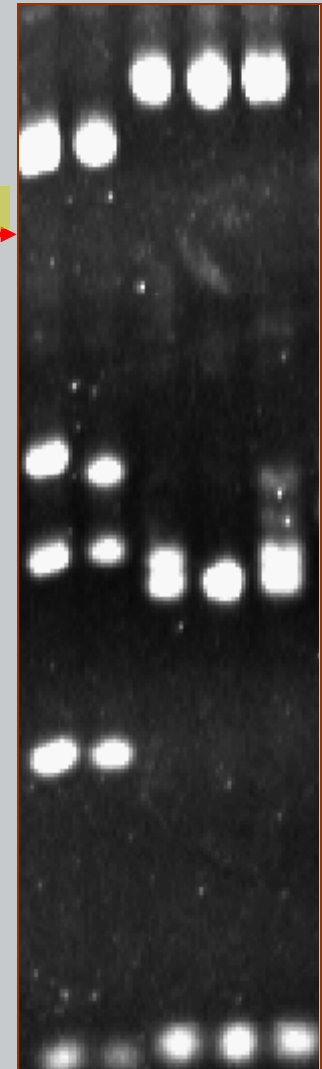
Specifičnost cpDNA

- relativně *konzervativní* – nízká mutační rychlost
- existence intraspecifické *variability*
- typy mutací
 - bodové
 - inserce/delece – časté v nekodujících oblastech
- *nerekombinovaná* jednotka dědičnosti
- *haploidní* ve smyslu variability – haplotypy
- uniparentální dědičnost
 - *maternální* přenos u krytosemených – semeny
 - *paternální* přenos u nahosemenných – pylem

PCR-RFLP cpDNA



elektroforéza



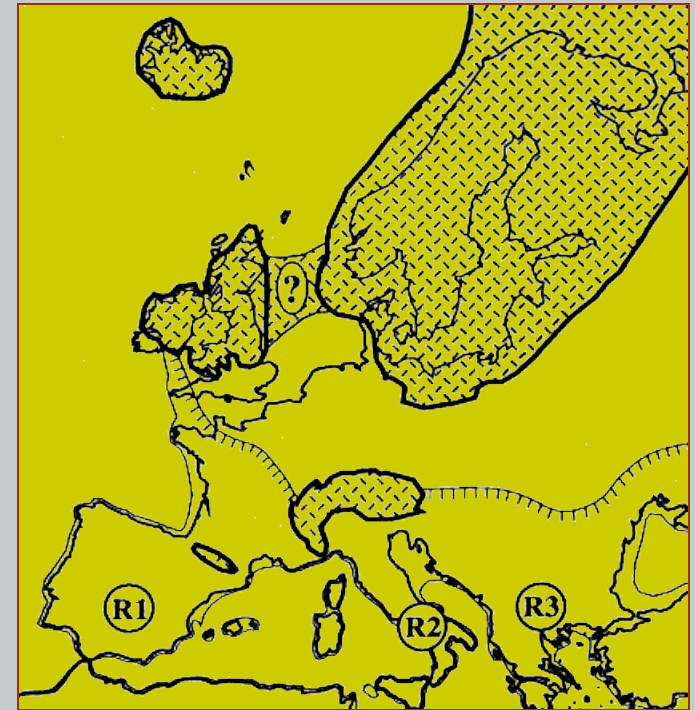
Využití studia cpDNA

- fylogeografie
 - geografie genových linií (haplotypů)
 - rekonstrukce postglaciální rekolonizace
- studium genového toku semeny
 - jaký vliv má cpDNA na celkovou genetickou diferenciaci populací
- systematika
 - rekonstrukce fylogeneze
- studium hybridizace
 - identifikace mateřského taxonu (jedince)

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
- můžeme vysledovat jednotlivé linie (*cpDNA haplotypy*) a ty korelovat s geografickým rozšířením



maximální rozsah zalednění během poslední ledové doby

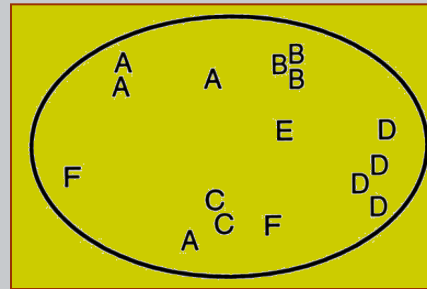


hranice permafrostu

R1, R2, R3 - hlavní refugia

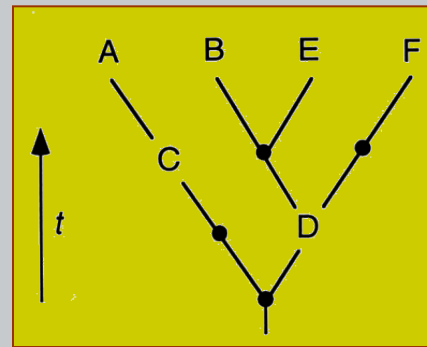
cpDNA haplotypy na populační úrovni

- geografické rozložení alel

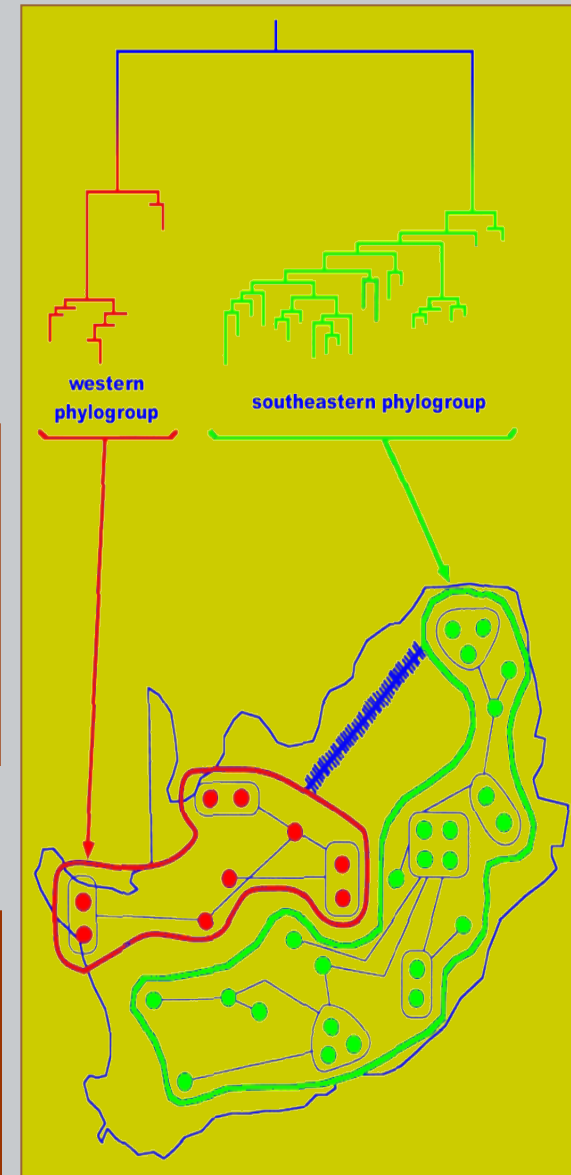
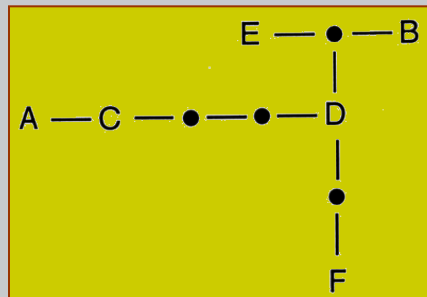


- prostřednictvím mutací se objevují nové alely
- všechny existující alely v populaci jsou odvozené z jedné jediné alely

⊠ existovala někdy v minulosti

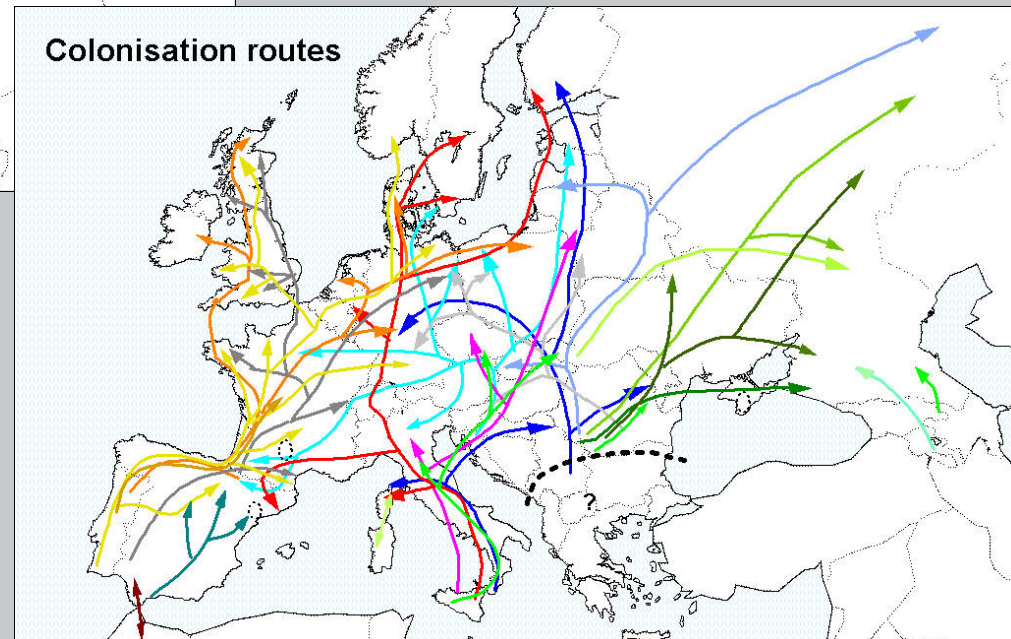
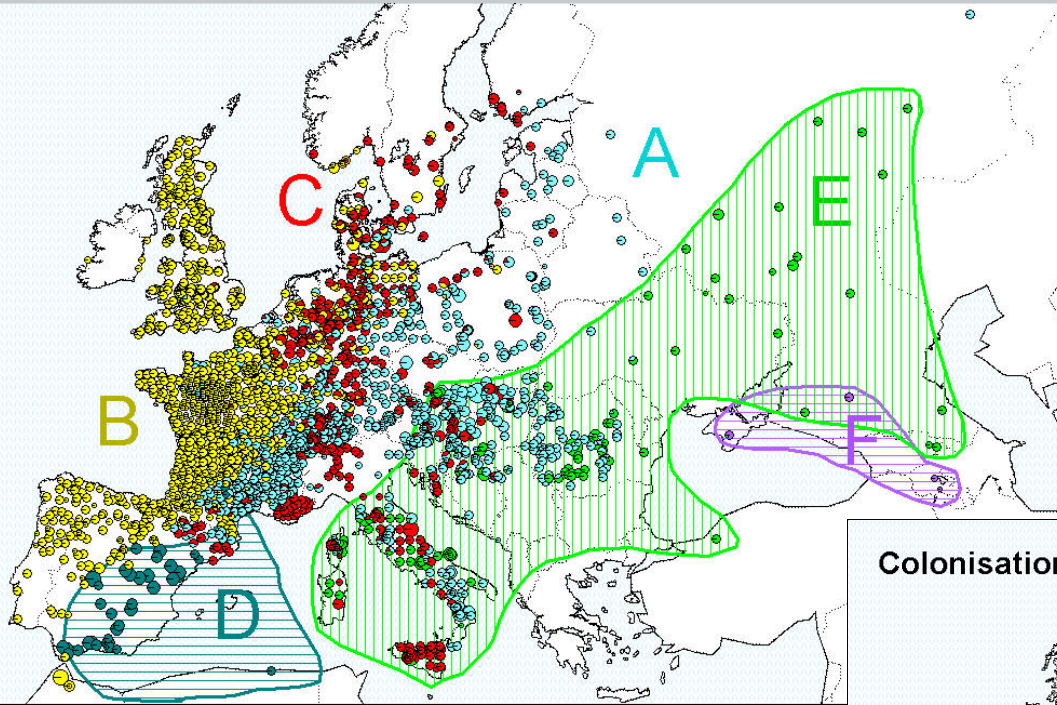


- problematika polarity – využití *minimum spanning tree* (minimální kostra) minimalizace počtu mutací



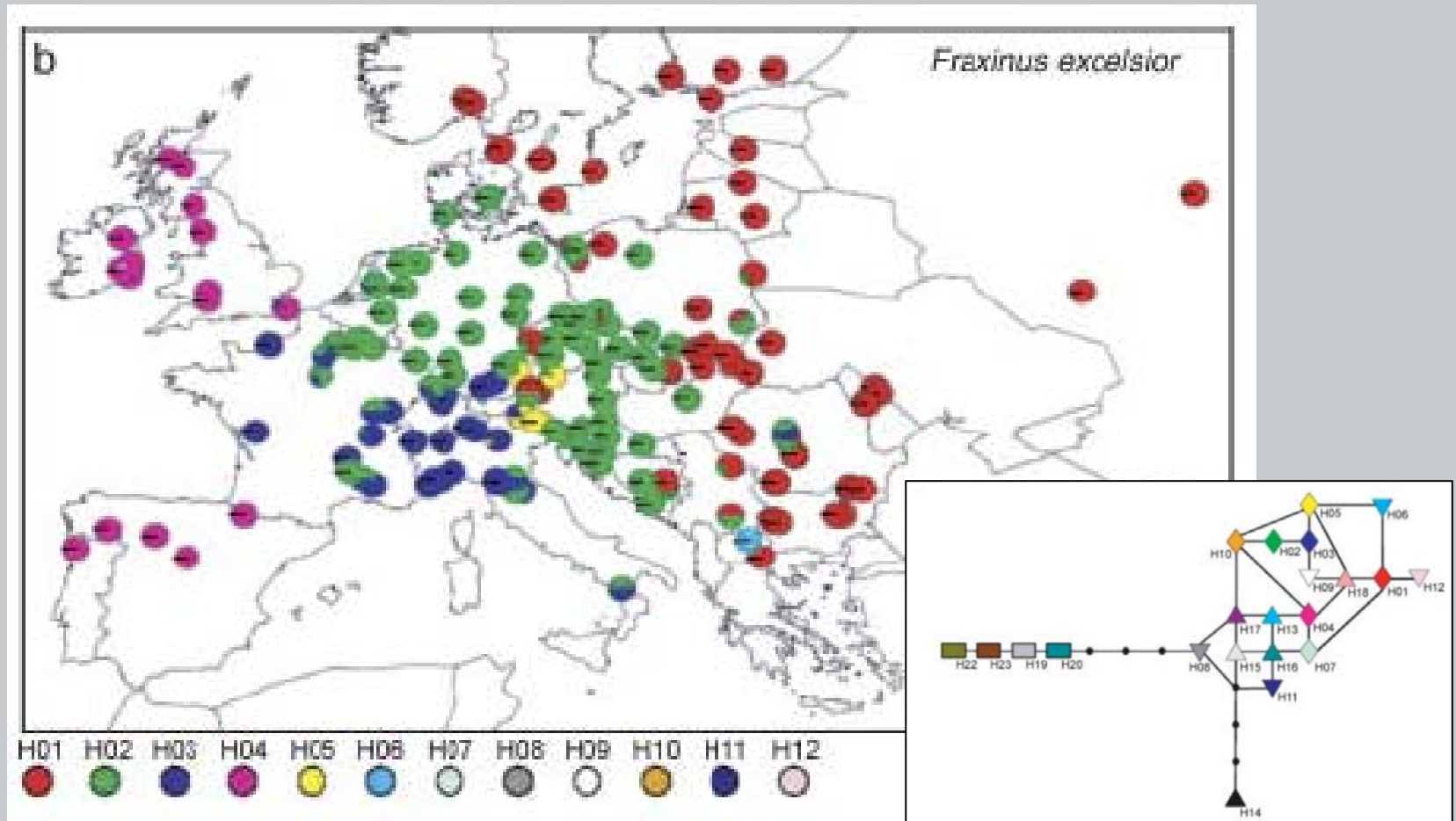
Postglaciální rekolonizace Evropy

Quercus sp.



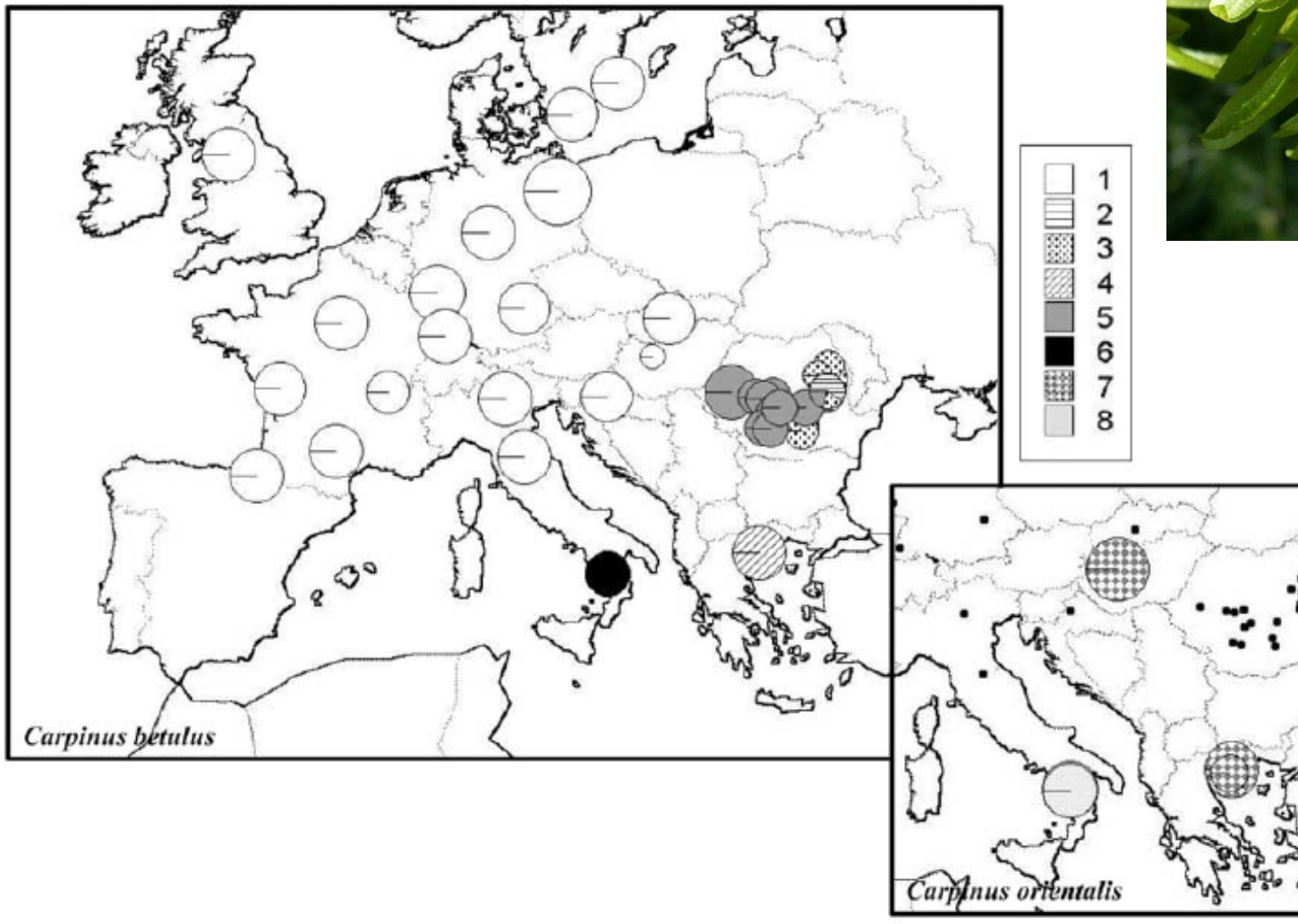
Fraxinus excelsior

Heuertz et al. 2006

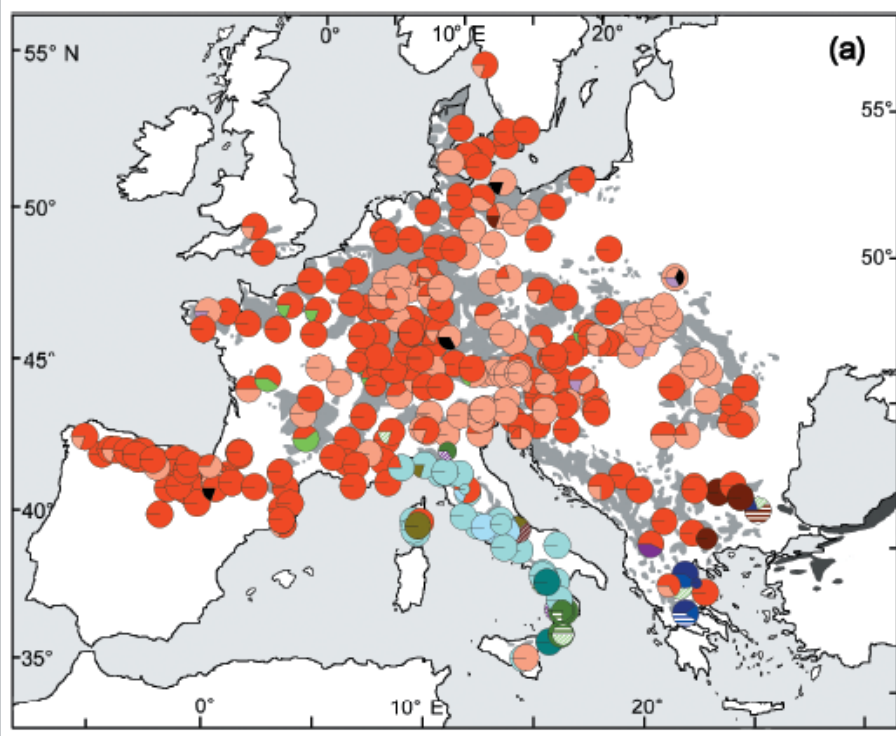


Carpinus betulus

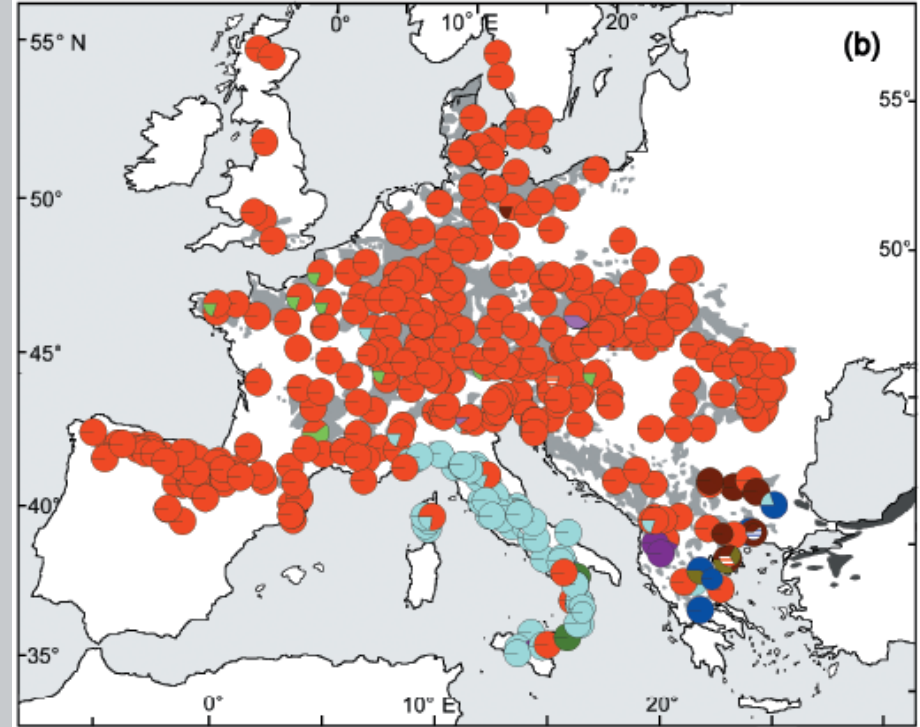
Grivet & Petit 2003



Rekonstrukce migrace buku

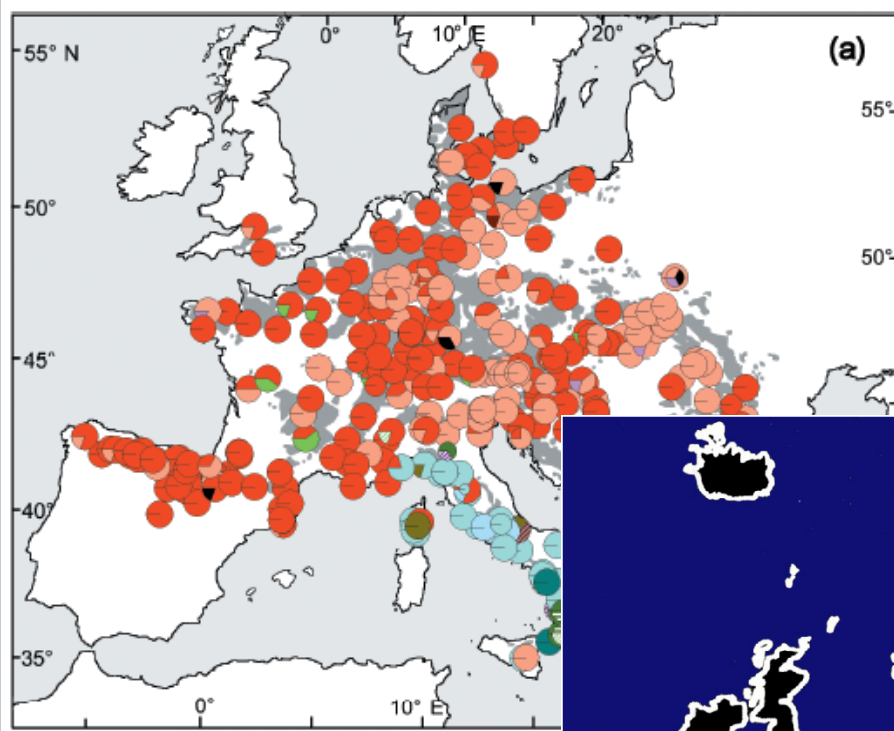


mikrosatelity v cpDNA

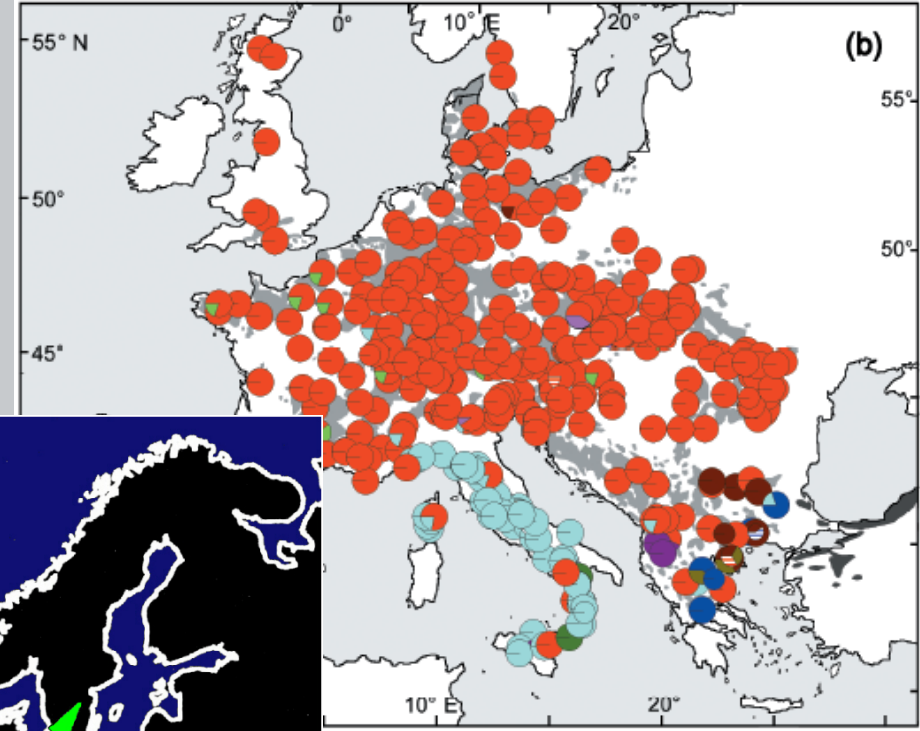


PCR-RFLP cpDNA

Rekonstrukce migrace buku



mikrosatelity v c

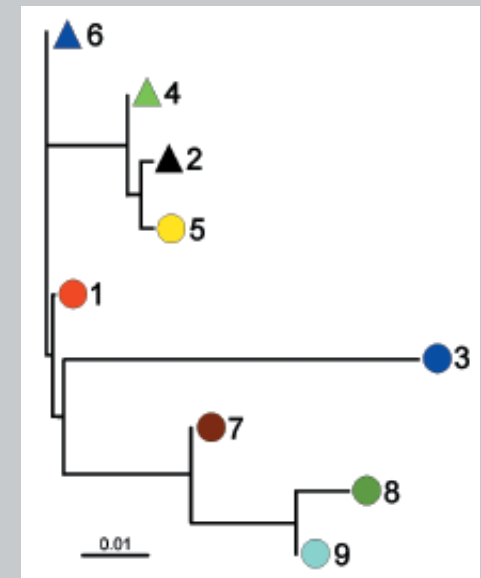
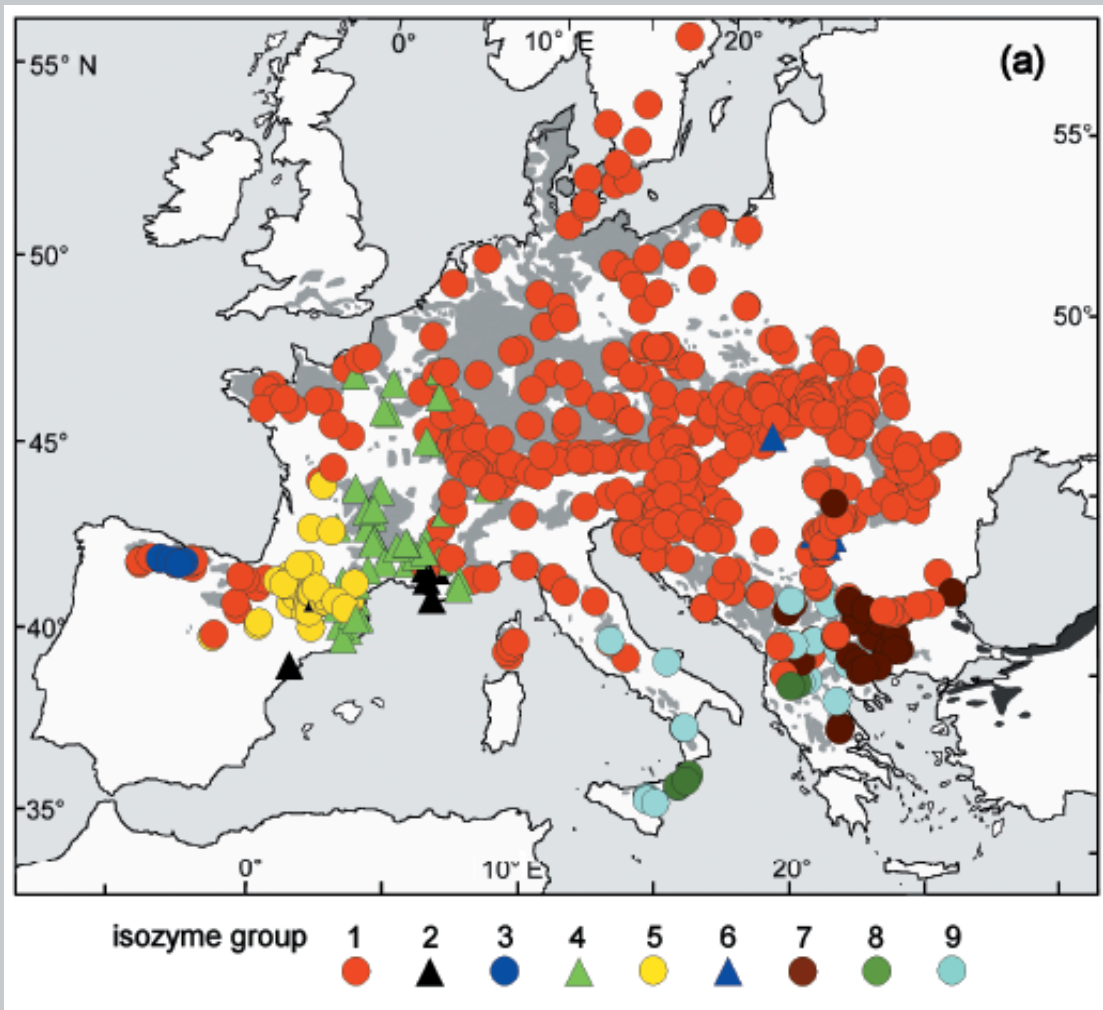


LP cpDNA



Magri et al. 2006

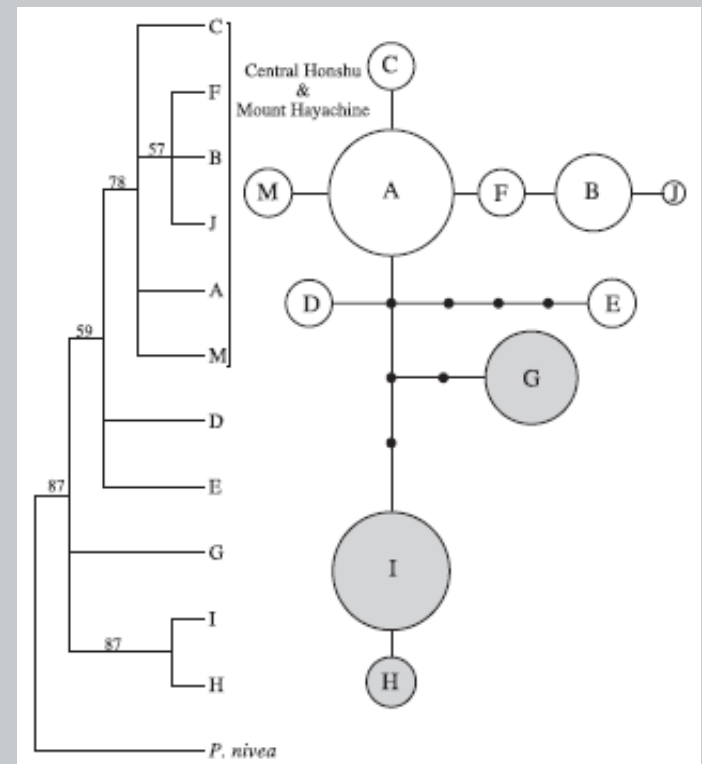
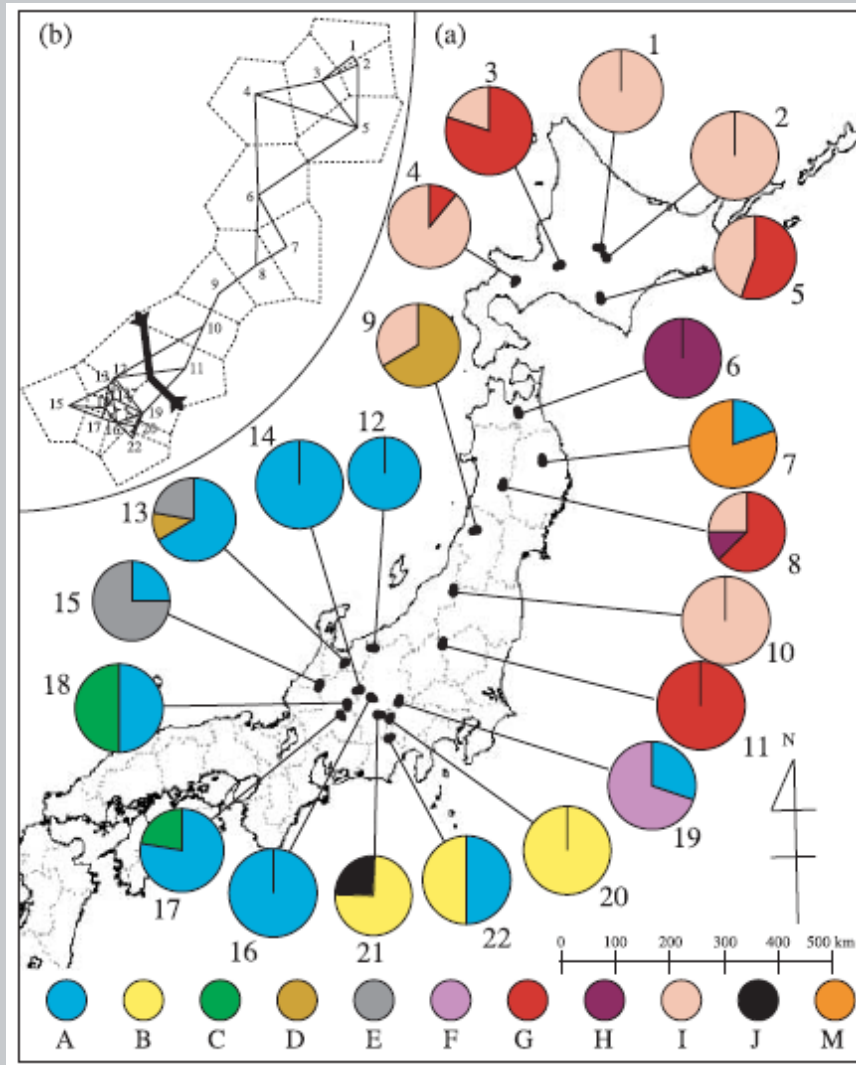
Fagus sylvatica – analýza izozymů



Magri et al. 2006

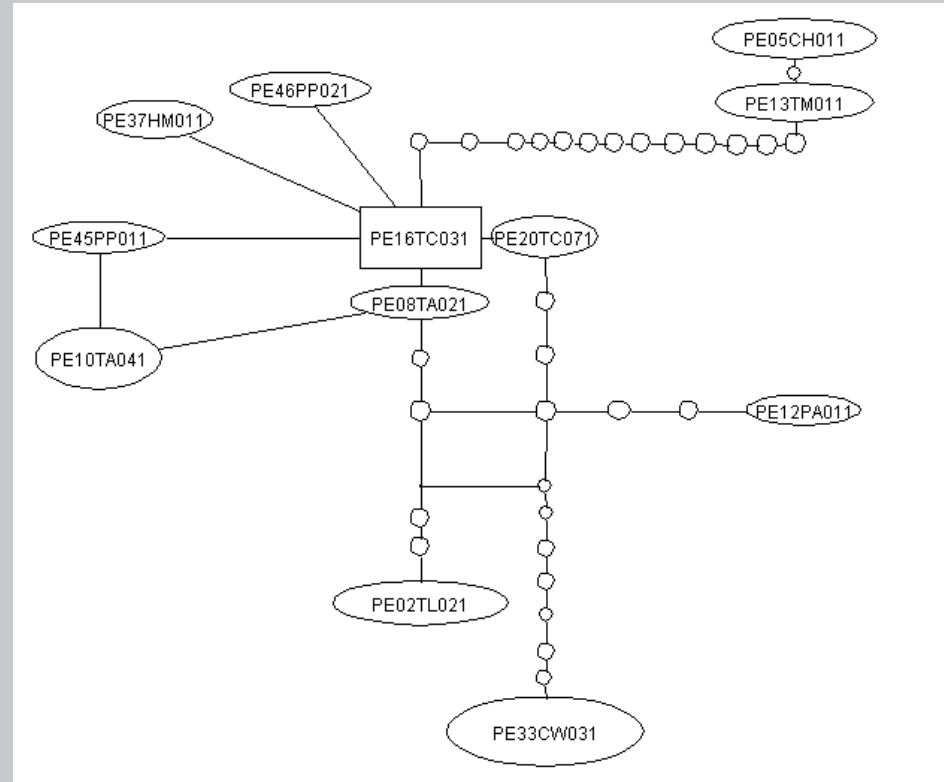
Fylogeografie alpinských rostlin v Japonsku

Potentilla matsumurae, Ikeda et al. 2006



Analýza fylogeografických dat - *statistical parsimony network of haplotypes*

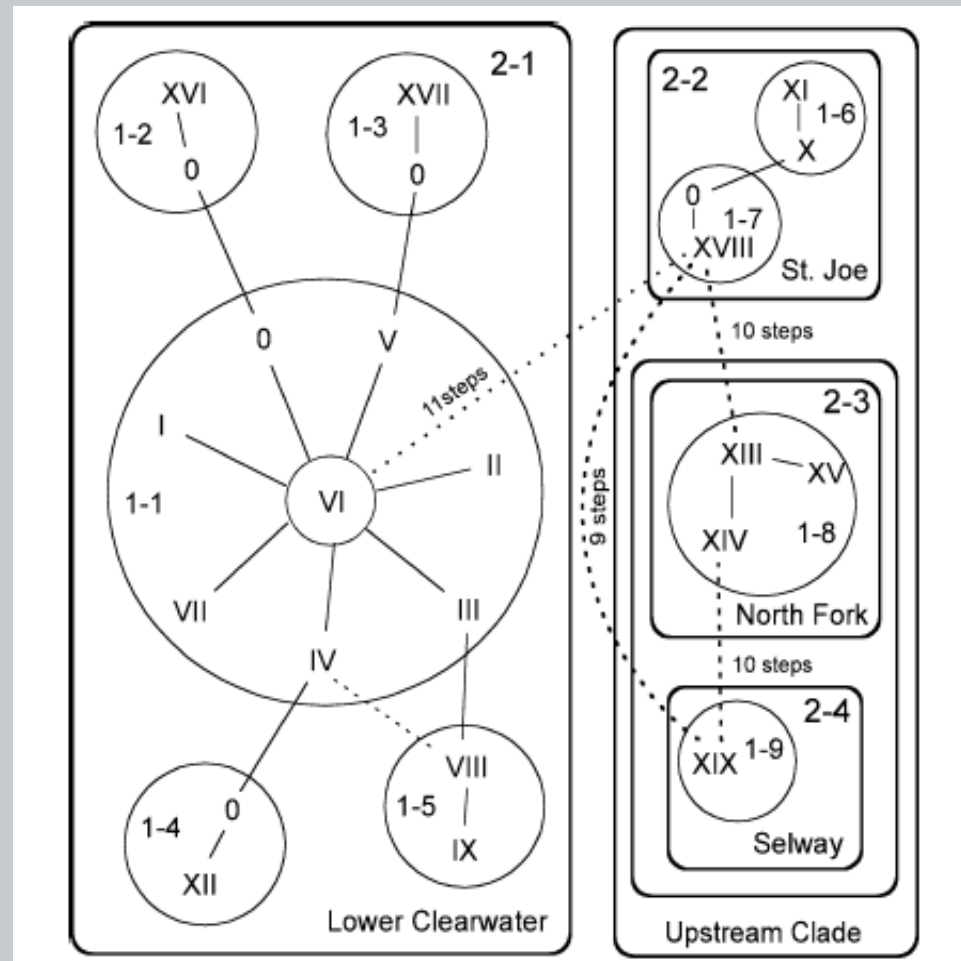
- *software – TCS 1.21*



- Posada D & Crandall KA (2001): *Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks*. Trends Ecol. Evol. 16(1): 37-45.
- Clement M, Posada D & Crandall KA (2000): *TCS: a computer program to estimate gene genealogies*. Molecular Ecology 9 (10): 1657-1660.
- Templeton, A. R., K. A. Crandall & C. F. Sing 1992. *A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation*. Genetics 132: 619-633.

Analýza fylogeografických dat - *nested clade analysis*

- software - GeoDis
- Templeton AR (1998): *Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history*. Molecular Ecology 7: 381-397.
- Posada D, Crandall KA and Templeton AR (2000): *GeoDis: A program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes*. Molecular Ecology 9(4): 487-488.
- Posada D, Crandall KA, Templeton AR (2006): *Nested clade analysis statistics*. Molecular Ecology Notes 6: 590-593.



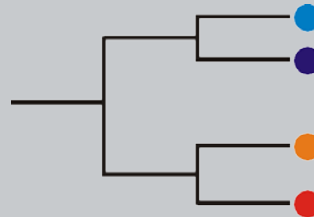
Analýza fylogeografických dat - *comparison of F_{ST} and N_{ST} – unordered vs. ordered alleles*

genetické vzdálenosti mezi alelami (haplotypy)

- bez fylogeneze (F_{ST} – *unordered alleles* – frekvence)

	●	●	●	●
●	0	1	1	1
●	1	0	1	1
●	1	1	0	1
●	1	1	1	0

- s fylogenezí (N_{ST} – *ordered alleles* – berou se v úvahu vzdálenosti mezi haplotypy)

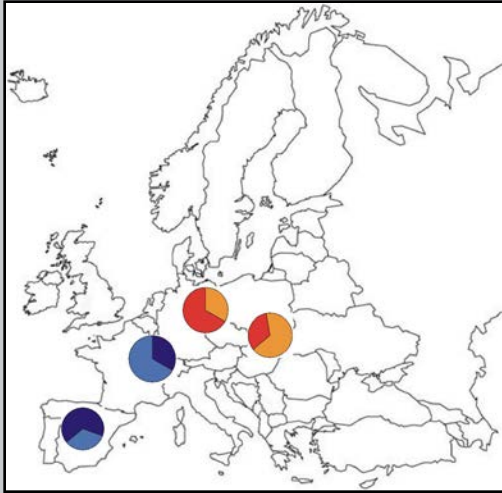


	●	●	●	●
●	0	1	3	3
●	1	0	2	2
●	3	2	0	2
●	3	2	2	0

- testování F_{ST} vs. N_{ST} vs. 0
- software – *PERMUT, SPAGeDi*

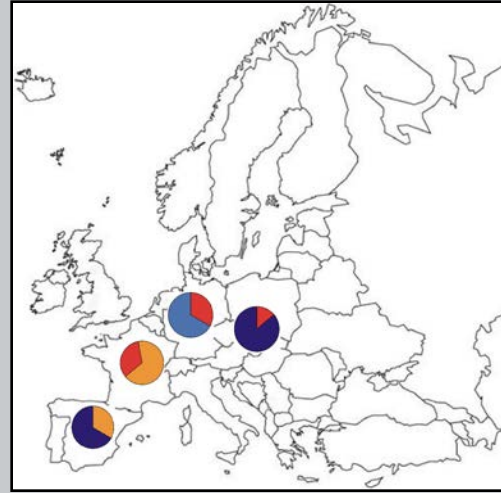
- Pons O. & Petit RJ (1996): *Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles*. Genetics 144: 1237-1245.

Analýza fylogeografických dat - *comparison of F_{ST} and N_{ST} – unordered vs. ordered alleles*



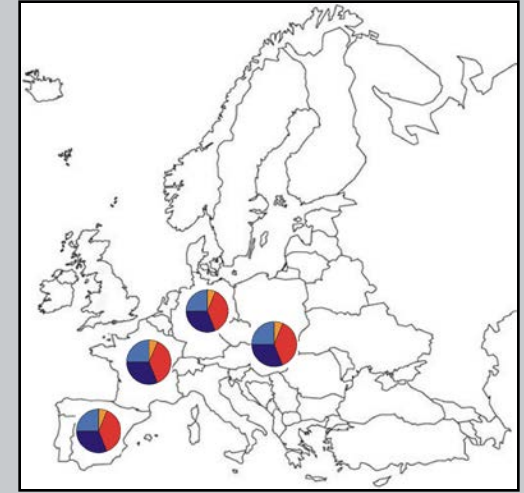
fylogeografické pattern

$$N_{ST} > F_{ST} > 0$$



genetická struktura bez
fylogeografického pattern

$$N_{ST} = F_{ST} > 0$$



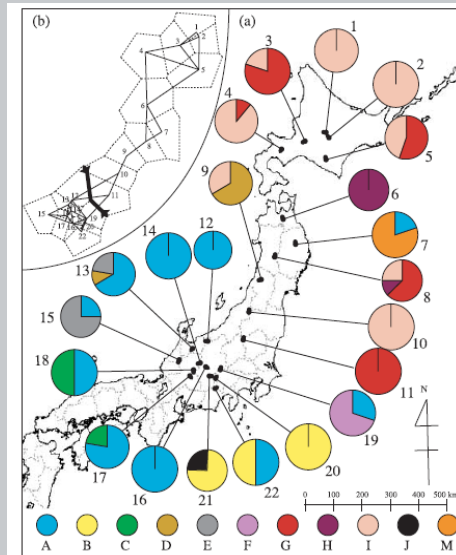
není genetická struktura

$$N_{ST} = F_{ST} = 0$$

fylogeografické pattern – když mutační rychlost $>$ migrace

Analýza fylogeografických dat – *identifikace ostrých změn v genetické podobnosti*

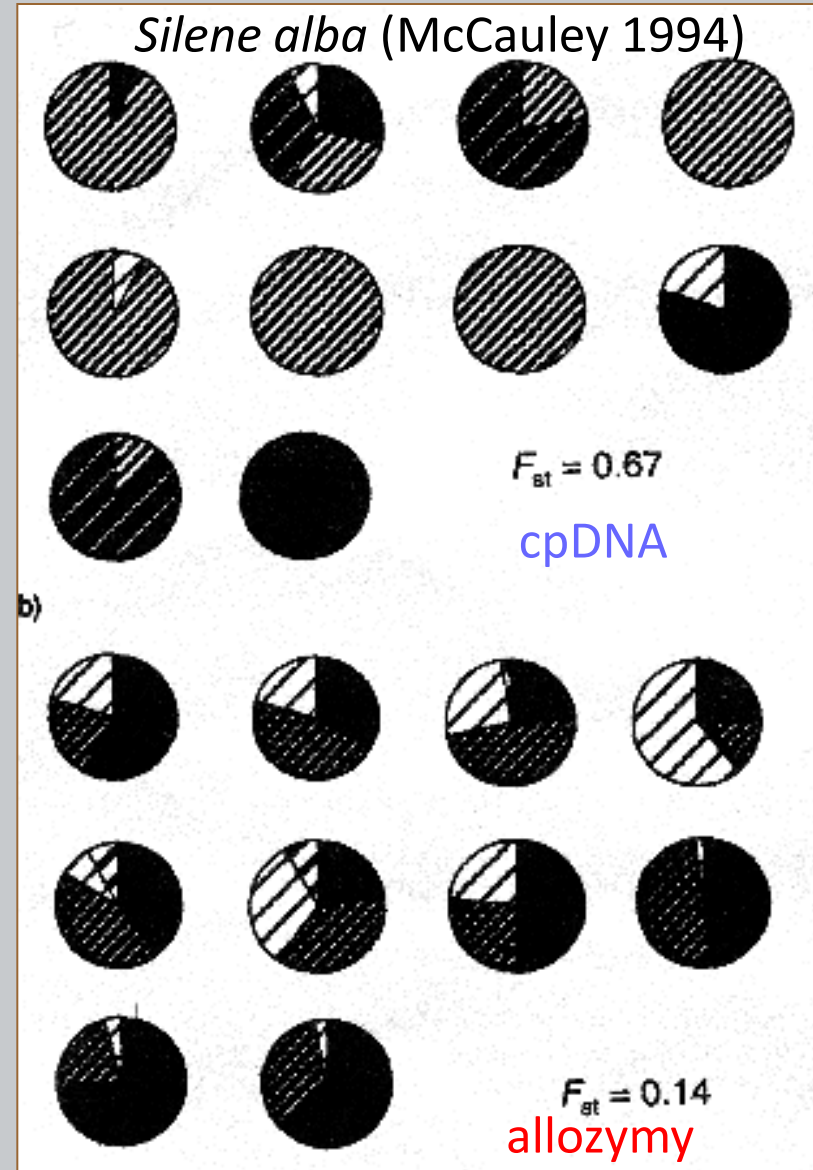
- software – *Barrier*
- *Mani et al. 2004*
- *Mani & Guérard 2004*



Podíl přenosu pylu a semen na genovém toku

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

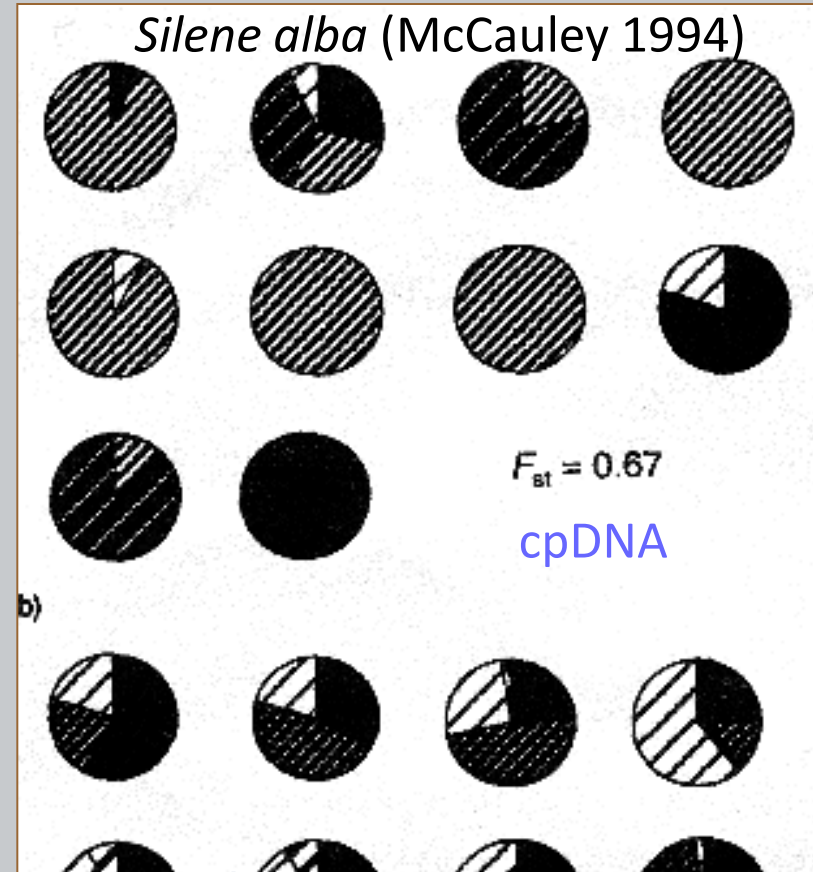
$$\frac{\text{migrace pylu}}{\text{migrace semen}} \approx \frac{\left(\frac{1}{F_{STb}} - 1\right) - 2\left(\frac{1}{F_{STm}} - 1\right)}{\left(\frac{1}{F_{STm}} - 1\right)}$$



Podíl přenosu pylu a semen na genovém toku

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

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

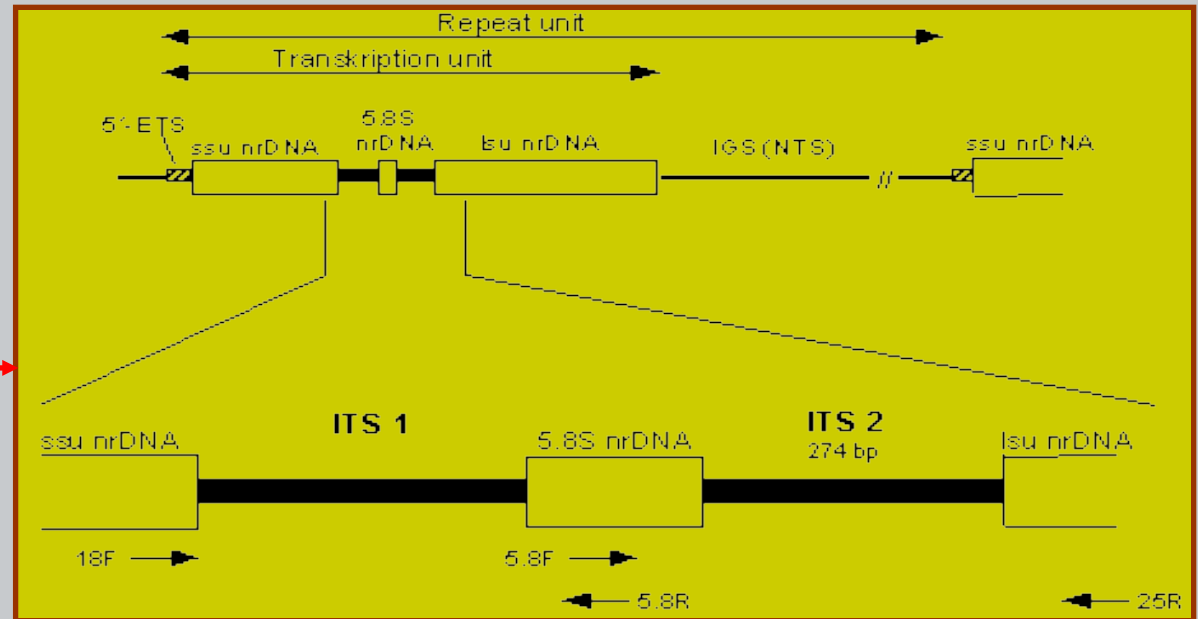


<i>Plant species</i>	<i>Pollen dispersal</i>	<i>Seed dispersal</i>	<i>Pollen/seed migration rate</i>	<i>Reference</i>
<i>Quercus</i> sp.	Wind	Bird	196	Kremer et al. (1991)
<i>Pinus contorta</i>	Wind	Wind	28	Dong and Wagner (1993)
<i>Argania spinosa</i>	Insect	Ruminant	2.5	El Mousadik and Petit (1996)
<i>Pinus sylvestris</i> (Scotland)	Wind	Wind	18	Sinclair et al. (1998)
<i>Pinus sylvestris</i> (Spain)	Wind	Wind	105	Sinclair et al. (1999)

RFLP v systematice

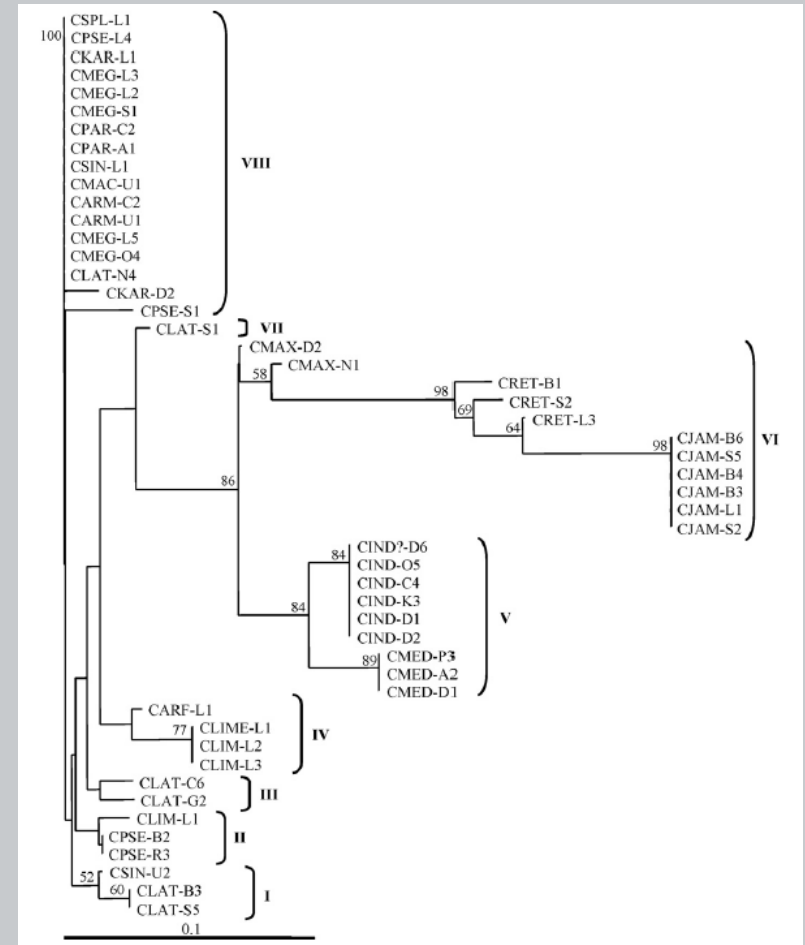
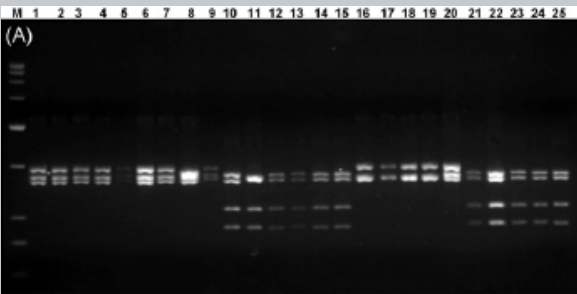
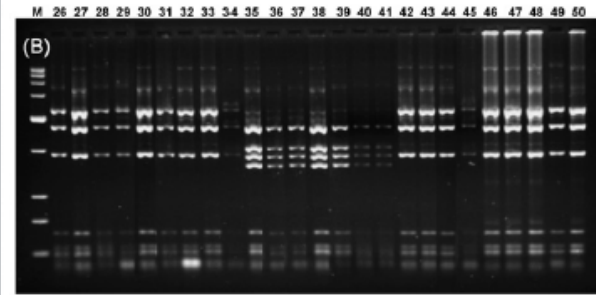
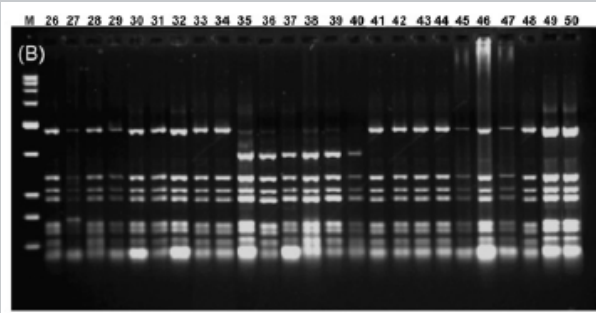
- RFLP + hybridizace
- PCR-RFLP

- cpDNA
- rDNA



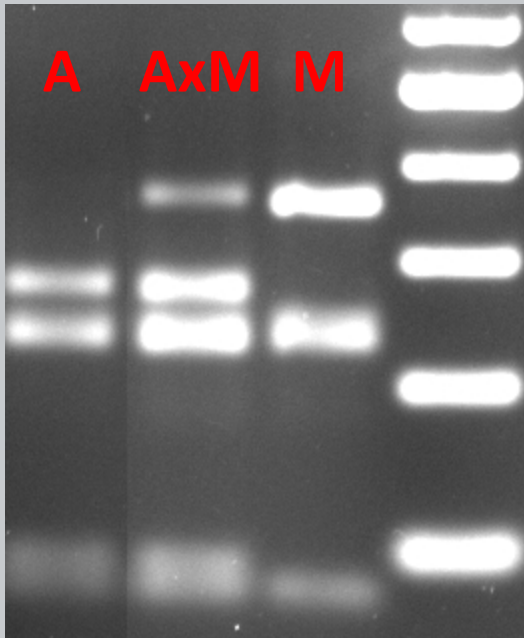
- mezidruhové i mezirodové vztahy
- hybridizace – možnost zjistit více kopií ITS

Mezidruhové vztahy

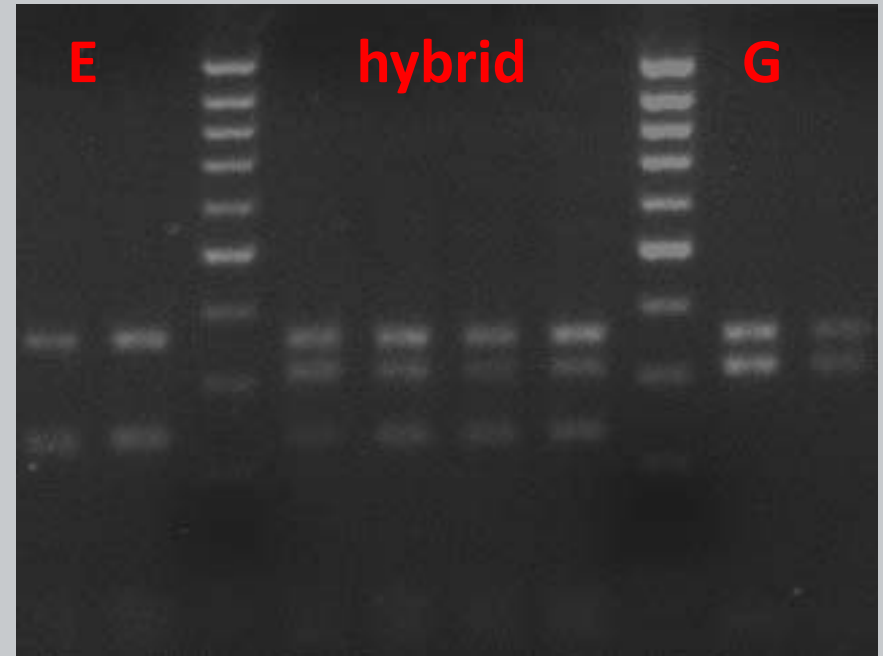


Citrus, Jena et al. 2009

Hybridizace – štěpení ITS úseku (PCR-RFLP)



Curcuma, unpubl.



Cardamine, Lihová et al. 2007

Populační studie

Tarayre M. (1997): The spatial genetic structure of cytoplasmic (cpDNA) and nuclear (allozyme) markers within and among populations of the gynodioecious *Thymus vulgaris* (Labiatae) in southern France. *American Journal of Botany* 84(12): 1675-1684



Systematická studie

Segraves K.A. et al. (1999): Multiple origins of polyploidy and the geographic structure of *Heuchera grossulariifolia*. *Molecular Ecology* 8:253-262



Literatura

- Palmer J.D. (1986): *Isolation and structural analysis of chloroplast DNA*. *Methods in Enzymology* 118:167-186
- McCauley D.E. (1995): *The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants*. *Trends in Ecology & Evolution* 10(5): 198-202
- Newton A.C. et al. (1999): *Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species*. *Trends in Ecology & Evolution* 14(4):140-145
- Petit R.J. & Vendramin G.G. (2007): *Plant phylogeography based on organelle genes: an introduction*. In: Weiss S. & Ferrand N. (eds.): *Phylogeography of Southern European Refugia*, pp. 23-97. Springer.
- Baker A.J. (2000): *Molecular methods in ecology*.
- Karp A. et al. (1998): *Molecular tools for screening biodiversity*.

<http://botany.natur.cuni.cz/fer/markers>