

Využití molekulárních markerů v systematice a populační biologii rostlin

10. Další metody...

Další molekulární markery

- tRFLP
- ISSRs
- (retro)transpozony
- kombinace a modifikace různých metod
- real-time PCR
- ...

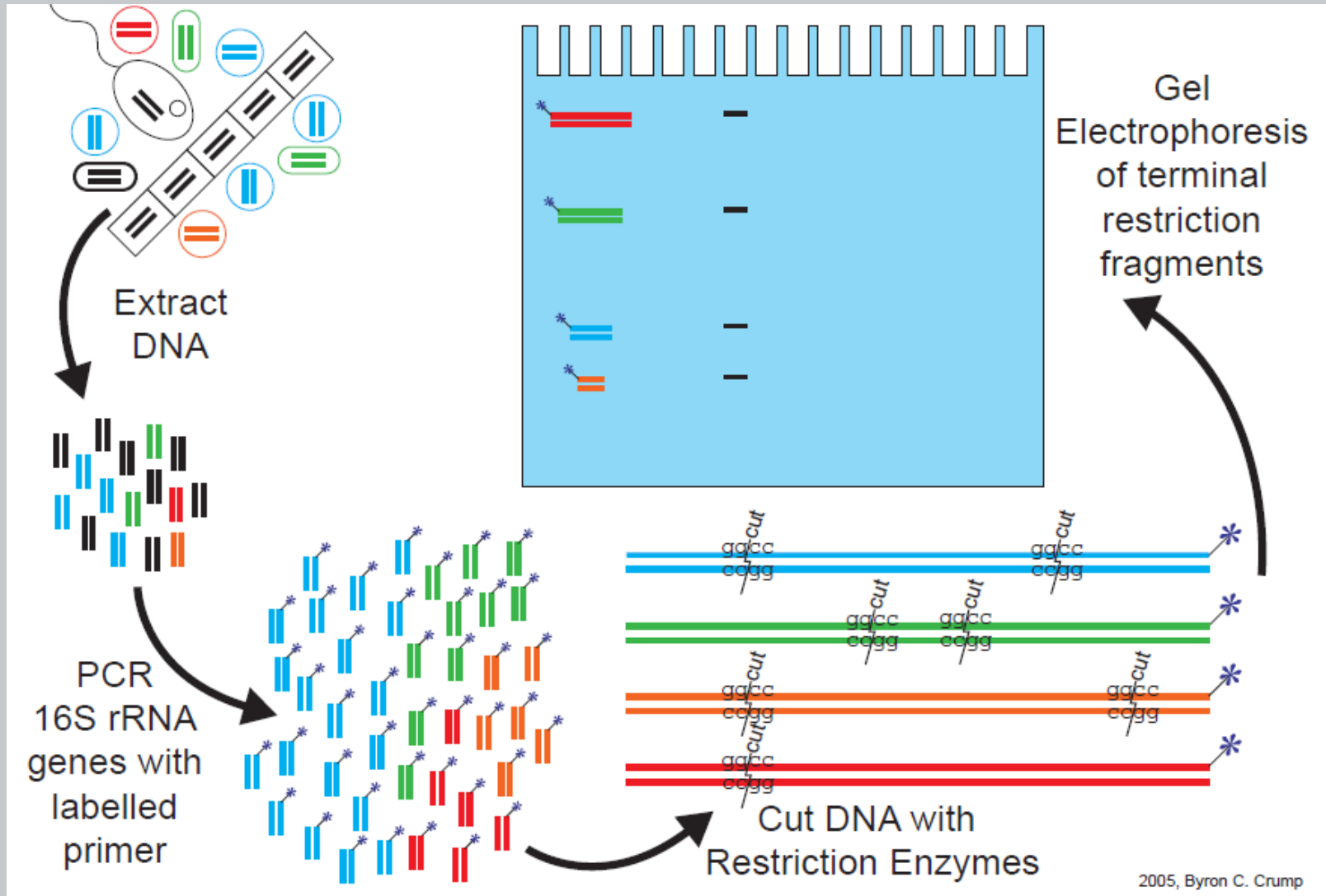
tRFLP

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

- ke zjištění diverzity mikrobiálního společenstva
- cenově efektivnější než sekvenování stovek klonů
- základní princip
 - amplifikace 16S rDNA – jeden primer fluorescenčně označen
 - restrikce endonukleázou
 - elektroforéza (stanovení délky fragmentu k prvnímu štěpnému místu)
 - srovnání délkového profilu s databází

tRFLP

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

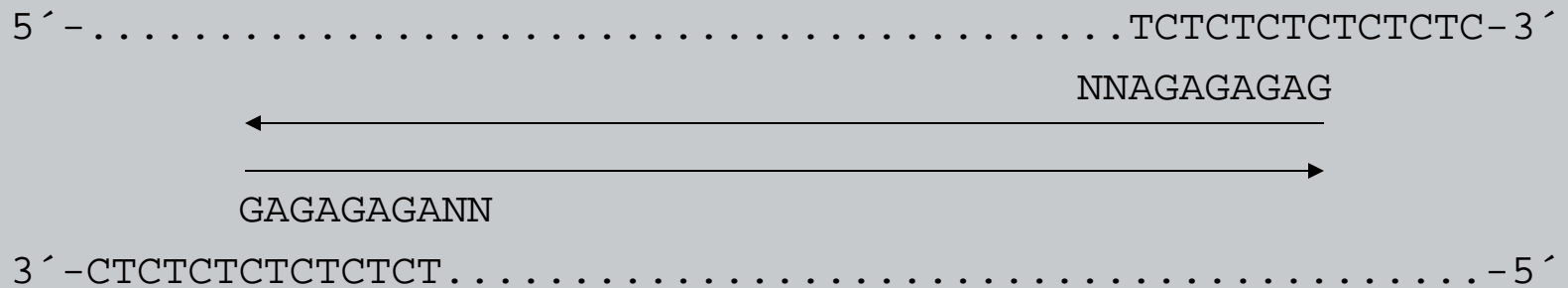


ISSRs – Inter Simple Sequence Repeats

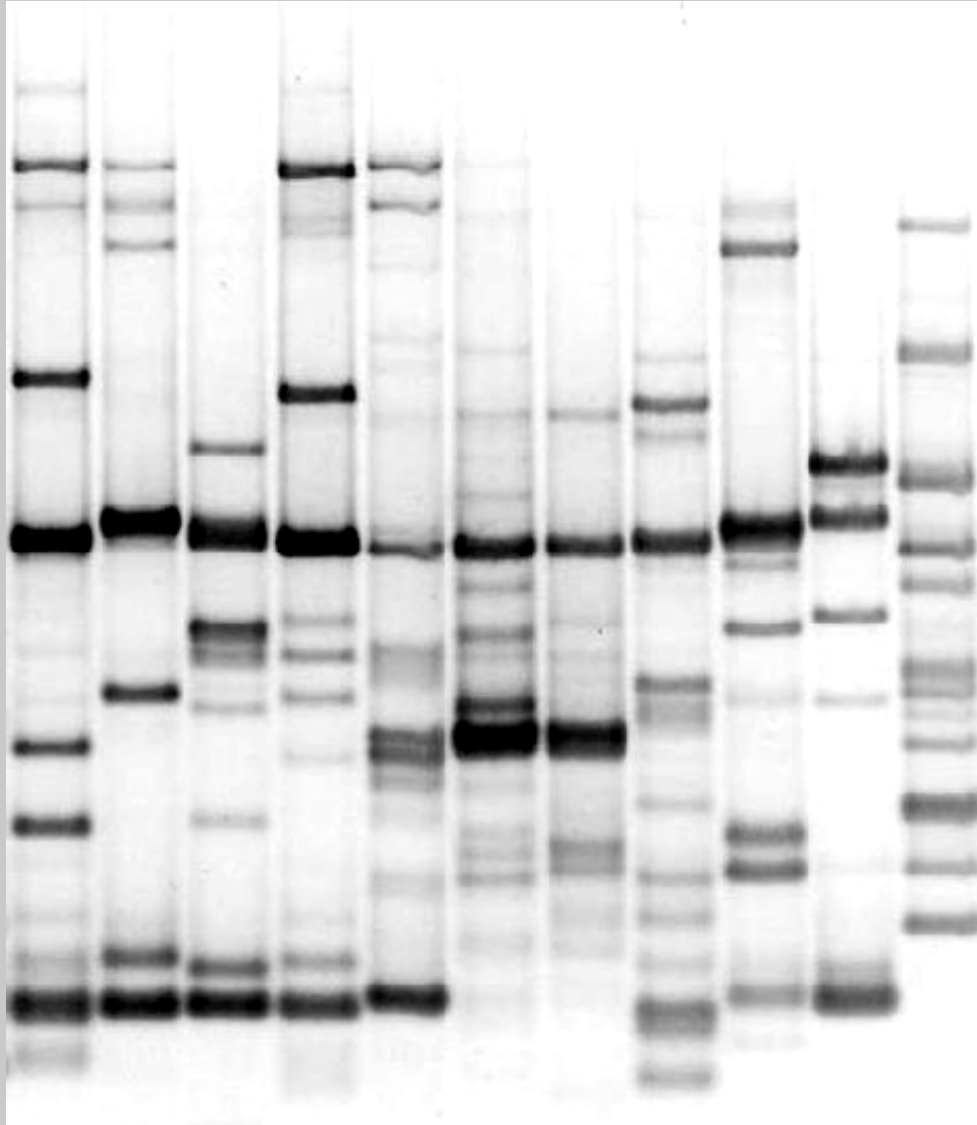
- primer – mikrosatelitová sekvence
- amplifikuje se úsek mezi mikrosatelitovými lokusy
- polymorfismus
 - změna počtu jednotek mikrosatelitu
 - indely mezi mikrosatelitovými motivy
- velmi variabilní marker
 - použití na populační úrovni
 - detekce klonů
- dominantní marker
 - nutná optimalizace, error rate
 - robustnější než RAPD

ISSRs – Inter Simple Sequence Repeats

- využití tzv. anchored primerů

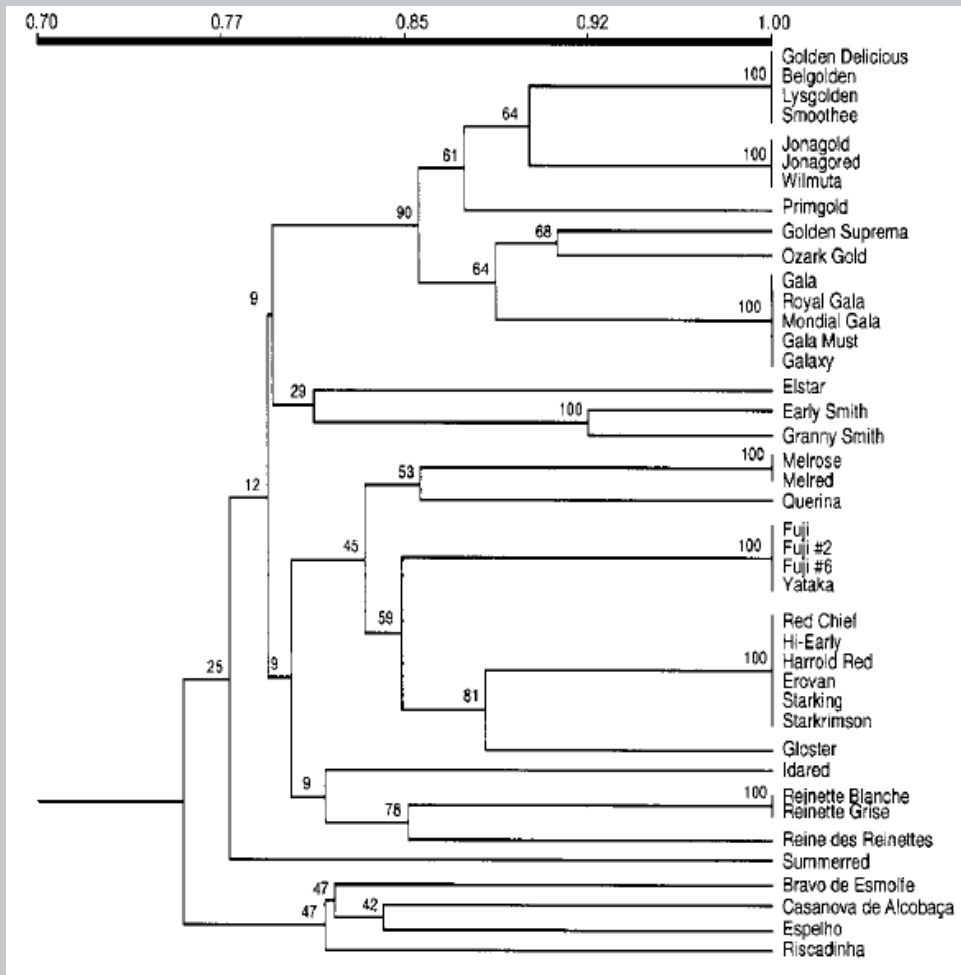


ISSRs – Inter Simple Sequence Repeats



J. Košnar, unpubl.

ISSR – kultivary jabloně

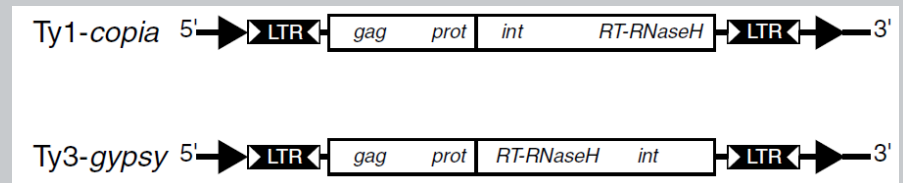


ISSR primer	Number of scored bands	Number of polymorphic bands
(AG)8YT	44	25
(AGC)4YT	40	24
(CA)8R	33	22
(GA)8YG	31	20
DBD(CA)7	32	27
VHV(GT)7	32	26
HVH(TG)7	40	32

Transpozony

- class I (šíření skrze RNA, tj. reverzní transkripce do DNA - retrotranspozony)

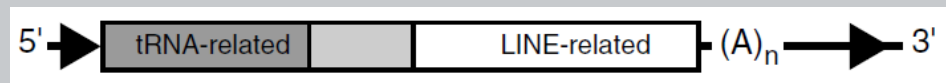
- retroviry
- LTR (long terminal repeats)
 - Ty1-*copia*
 - Ty3-*gypsy*



- LINEs (long interspersed elements)



- SINEs (short interspersed elements)



- class II (šíření skrze DNA)

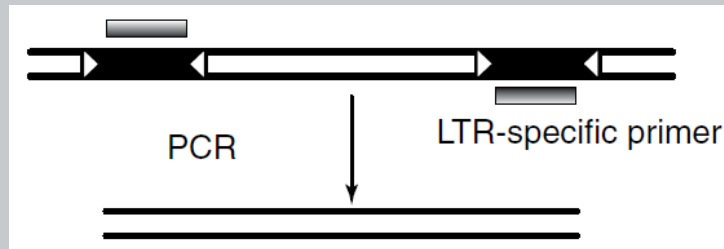
- několik tzv. superrodin – *Ac* family, CACTA family, *Mutator*-like elements, *Tc1-Mariner*-like elements (MLEs)

- MITEs (miniature inverted-repeat transposable elements)

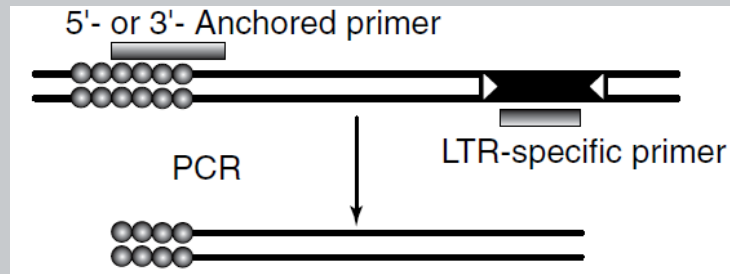
- malá velikost (< 500bp), mnoho kopií, vysoká divergence

Transpozony jako dominantní molekulární markery

- IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism)



- REMAP (retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism)

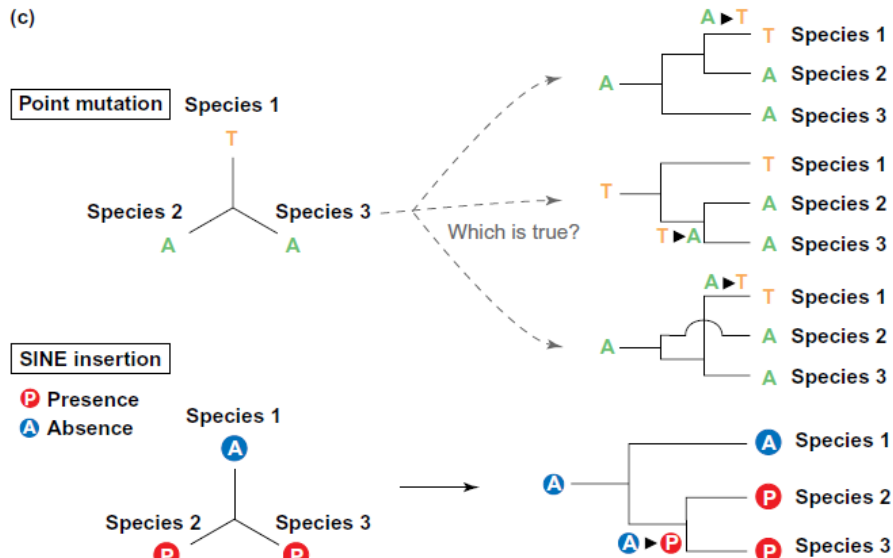


- IMPS (inter-MITE polymorphisms)
 - primery designované do terminal inverted repeats

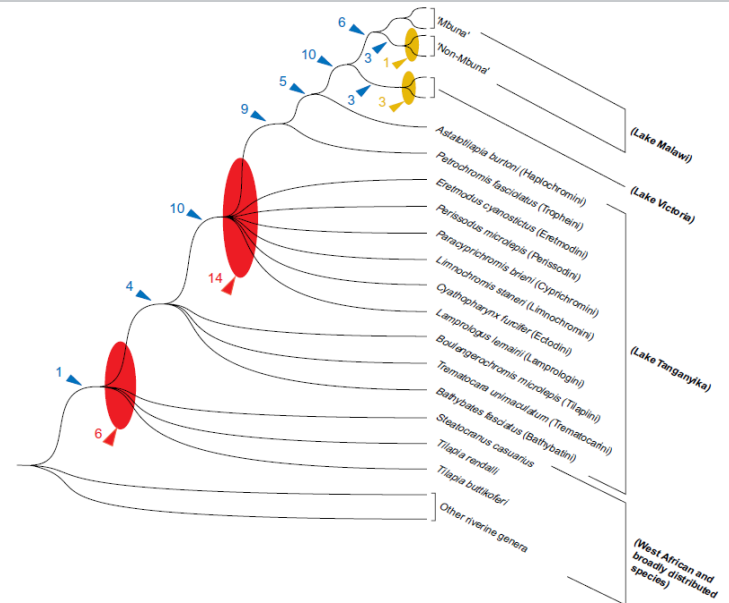
Transpozony jako molekulární markery

- REMAP, IMAP
 - variabilnější než ISSRs
 - často příliš variabilní pro mezidruhové rozlišení
 - vhodné pro vnitrodruhovou úroveň
- IMPs
 - rozlišení mezi kultivary
 - degenerované primery použitelné u řady rostlinných čeledí

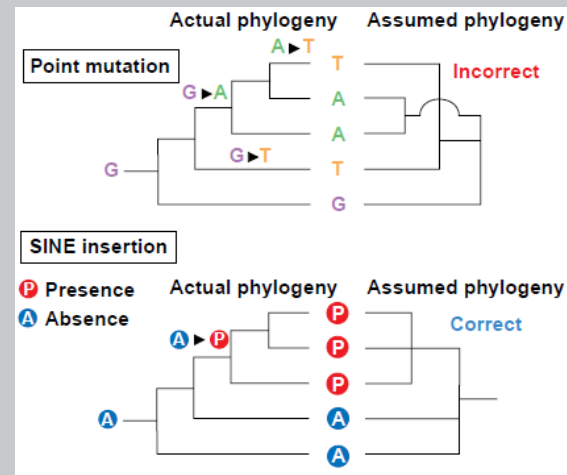
SINEs – správné určení fylogeneze?



TRENDS in Ecology & Evolution



- inserce SINE do genu je nevratný proces – není reverse
- inserce SINE je náhodná – minimalizace paralelismu
- sdílená inserce umožňuje rozhodnout o správné fylogenezi

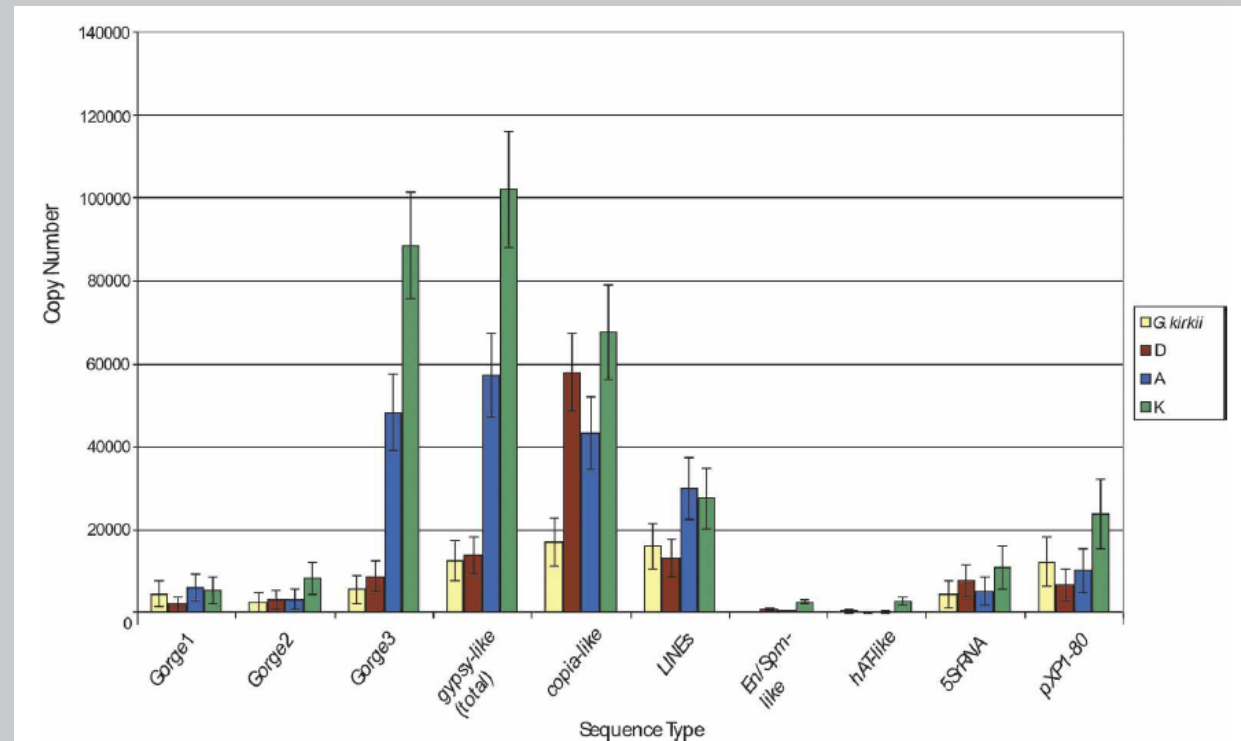


Transpozony a velikost genomu



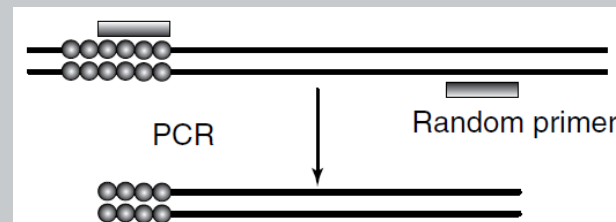
Gossypium (bavlník)

- 1C=880-2460 Mb
- 40-65% genomu jsou TEs
- v každé linii zmnožení různých TEs
- *Copia*-like v liniích a malým genomem
- *Gypsy*-like v liniích s velkým genomem
- trojnásobné zvětšení genomu za 5-10 mil. let díky akumulaci LTRs

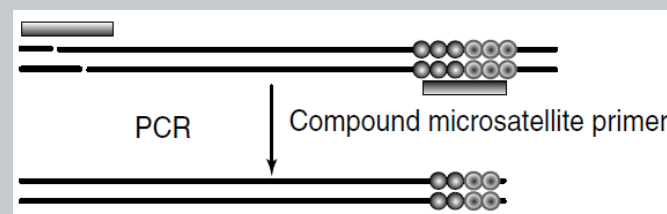


Kombinace a modifikace metod

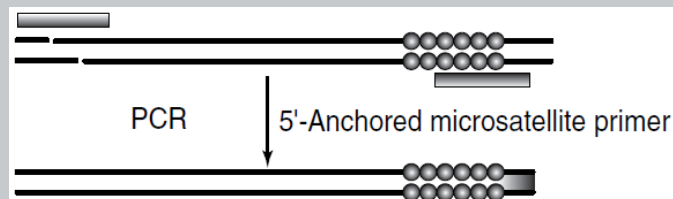
- **RAMP** (random amplified microsatellite polymorphism)
 - kombinace arbitrárního dekameru a anchored oligonukleotidové repetice



- **SAMPL** (selective amplification of microsatellite polymorphic loci)
 - kombinace složeného mikrosatelitového primeru s AFLP primerem

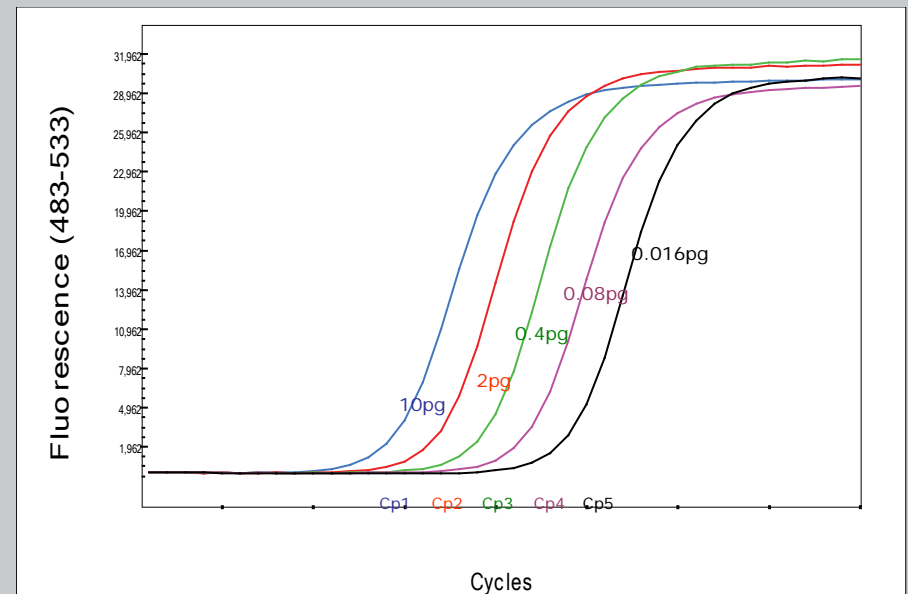


- **MFLP** (microsatellite-AFLP)
 - kombinace anchored oligonukleotidové repetice a AFLP primeru



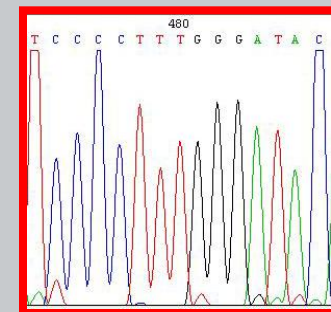
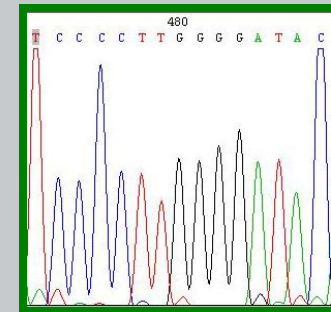
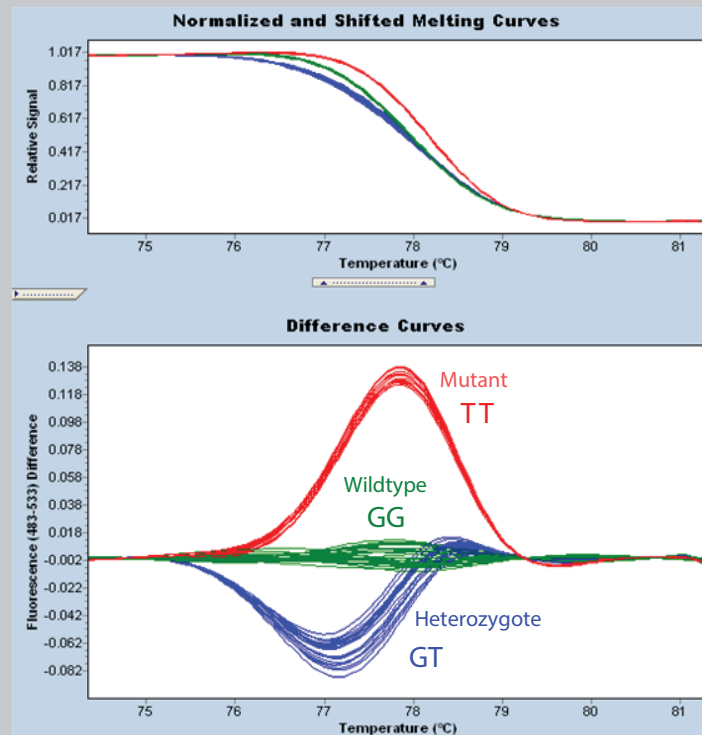
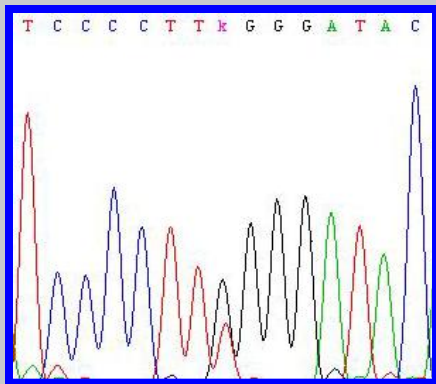
Real-Time PCR

- detekce množství produktu v každém cyklu
- průběh exponenciální fáze přímo závisí na množství templátu
- absolutní/relativní kvantifikace
- fluorescence
 - nespecifická
 - interkalační barvičky (SYBR Green...)
 - značené primery
 - specifická podle sekvence
 - sondy (TaqMan...)



High-resolution melting (HRM)

- post-PCR analýza křivky tání
- křivky tání řetězců lišících se v jedné mutaci (SNP – *single nucleotide polymorphism*) jsou různé



Real-Time PCR – využití

- genotypování
 - detekce známých mutací
 - detekce neznámých typů
- kvantifikace genů
 - kvantifikace repetitivních úseků (rDNA, transpozony...)
 - kvantifikace specifických genů
- studium genové exprese

Real-time PCR kvantifikace LTR

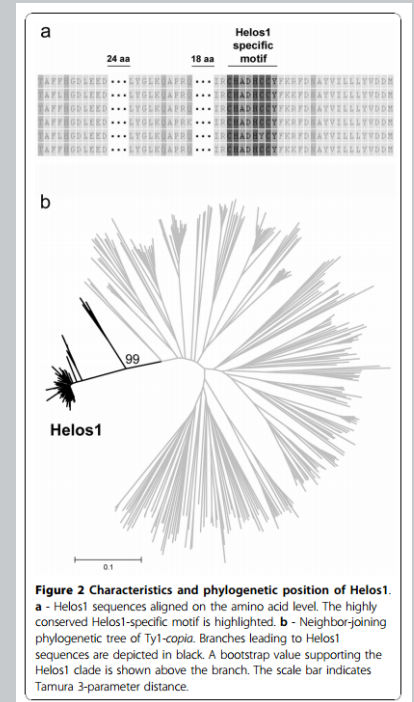
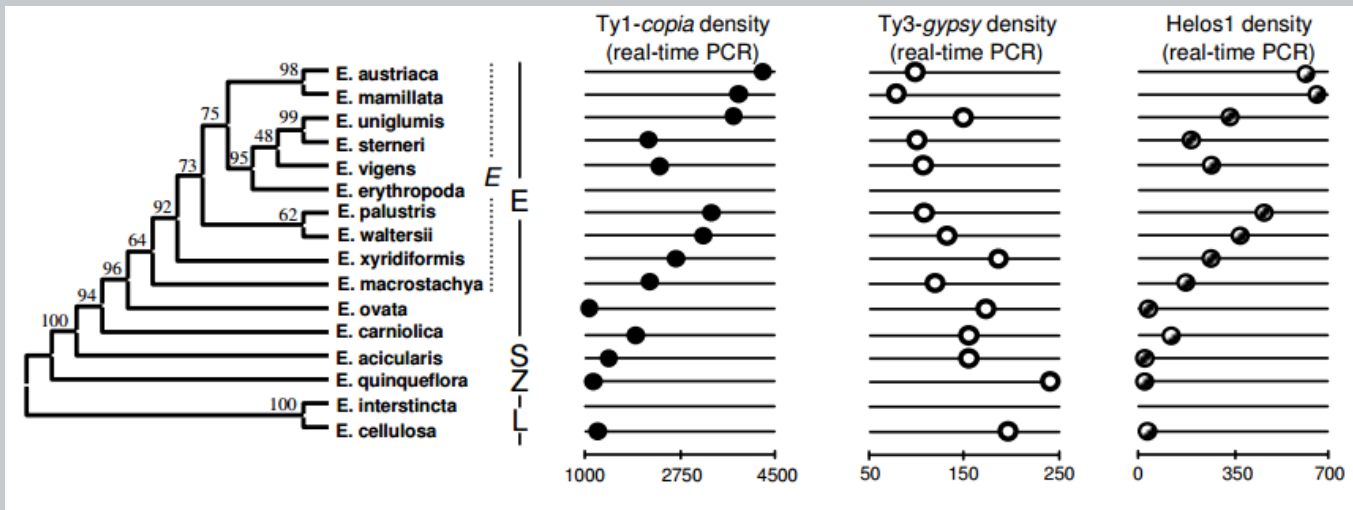


Figure 2 Characteristics and phylogenetic position of Helos1. **a** - Helos1 sequences aligned on the amino acid level. The highly conserved Helos1-specific motif is highlighted. **b** - Neighbor-joining phylogenetic tree of Ty1-copia. Branches leading to Helos1 sequences are depicted in black. A bootstrap value supporting the Helos1 clade is shown above the branch. The scale bar indicates Tamura 3-parameter distance.