

Využití molekulárních markerů v systematice a populační biologii rostlin

12. Shrnutí, ...

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

Rozdíly mezi markery

<i>variabilita</i>	<i>vysoká</i>	<i>nízká</i>
	SSRs, AFLP	allozomy, cpDNA
<i>dědičnost</i>	<i>kodominantní</i>	<i>dominantní</i>
	allozomy, SSRs	AFLP, RAPD, ISSR
<i>rekombinace</i>	<i>ano</i>	<i>ne</i>
	jaderné markery	cpDNA, mtDNA
<i>přenos do další generace</i>	<i>biparentální</i>	<i>uniparentální</i>
	jaderné markery	cpDNA, mtDNA
<i>mutační rychlost</i>	<i>vysoká</i>	<i>nízká</i>
	SSRs	allozomy

Markery – důležité rozdíly

	variabilita	dědičnost	výhody	nevýhody	
isozymy	xx	kodominantní	levné, univerzální	čerstvý materiál, omezená variabilita, selekce?	
RAPD	xxx	dominantní	levné, mnoho proužků	omezená opakovatelnost	
AFLP	xxxx	dominantní	vysoký polymorfismus, reproducibilita	komplikované	
ISSR	xxx	dominantní	jednoduché, polymorfní		
SSR	xxxx	kodominantní	vysoce variabilní	druhově specifické	
sekvence	cpDNA	x	haploidní	možnost srovnání, nerekombinované	často nízká variabilita
	nDNA	x - xxxx	kodominantní	rekombinované, mnoho analytických metod	

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

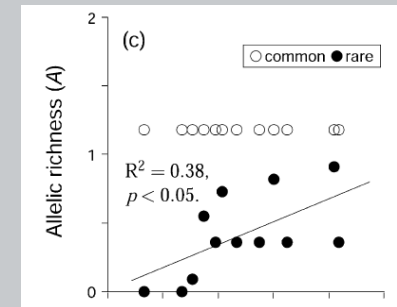
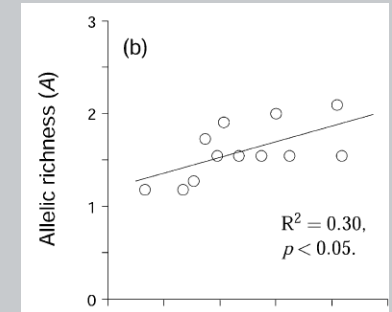
Typy „populačních“ otázek

- genetická diverzita ve fragmentované krajině
- nepřímé určení genetického toku
- vliv velikosti populace na genetickou diverzitu
- podíl toku semen a pylu na genovém toku
- přímá identifikace genového toku v populacích - analýza rodičovství
- detekce klonality
- fylogeografie na kontinentálním měřítku
- identifikace postglaciální migrace – genetické ochuzení populací, *founder effect*

Genetická diverzita populací

- menší diverzita v malých populacích
- vymizení vzácných alel v malých populacích
- vyšší inbreeding v malých populacích
- identifikace barrier pro genový tok
- nepřímé určení intenzity genového toku
- rozložení variability – v rámci a mezi populacemi

Among regions	1	0.311	5.89
Among populations	15	1.075	20.38
Within populations	110	3.888	73.73
Total	126		100



- kodominantní markery (allozomy, SSRs), ale i RAPD, AFLP



Podíl toku semen a pylu na genovém toku

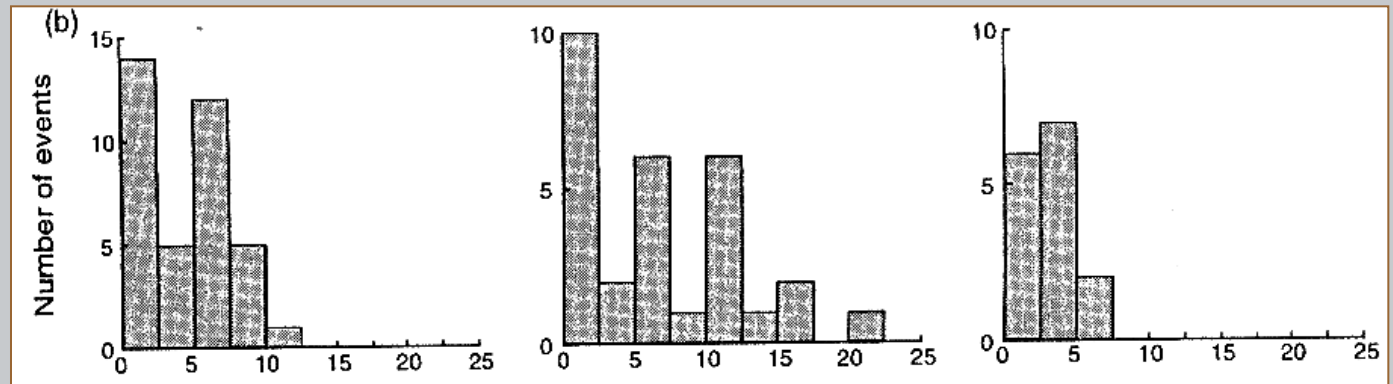
- kombinované studium jaderných a chloroplastových markerů (např. allozymy, SSRs a PCR-RFLP cpDNA)
- F_{ST} pro každý marker zvlášť – poměr
- na různé úrovni – populace, krajina



Marker	Genetic parameter	Among populations	Cabane-La-Plaine
cpDNA	H_S	0.295	0.197
	H_T	0.614	0.531
	F_{ST} (SD)	0.238 (0.146)	0.546 (0.466)
Allozymes	H_S	0.334	0.293
	H_T	0.348	0.309
	F_{ST} (SD)	0.021 (0.07)	0.019 (0.035)
	P/S	13.55	59.41

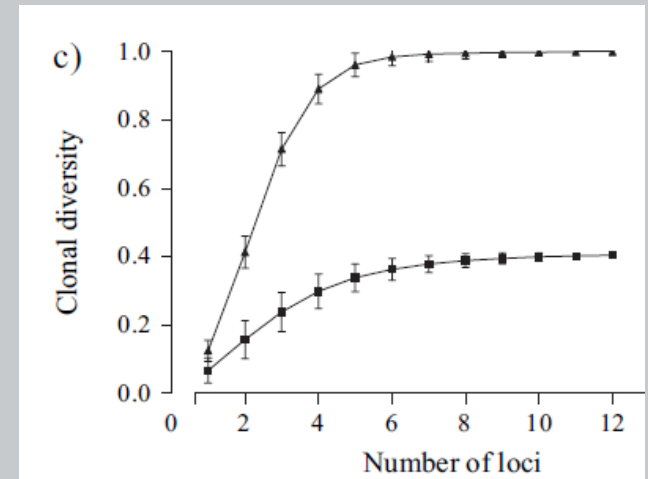
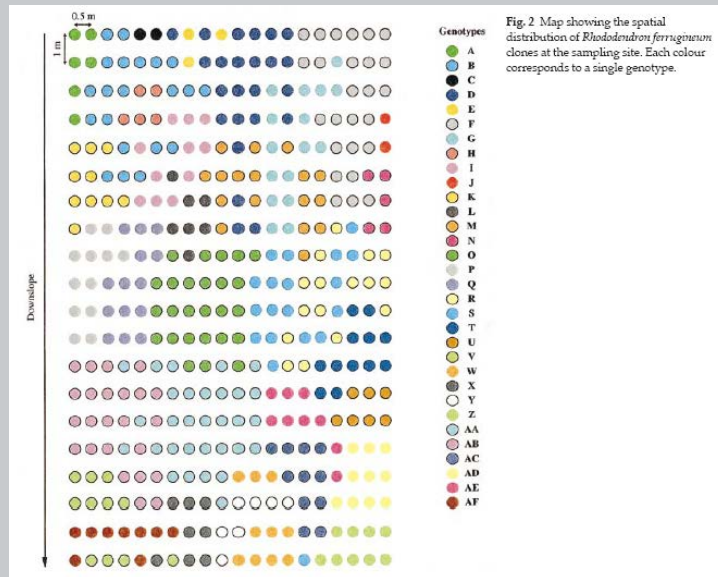
Přímá identifikace genového toku v populacích – analýza rodičovství

- genový tok do populace, mezi populacemi
- minimální vzdálenosti šíření semen
- vzdálenost šíření pylu
- procento autogamicky vzniklých semen
- SSRs, AFLP



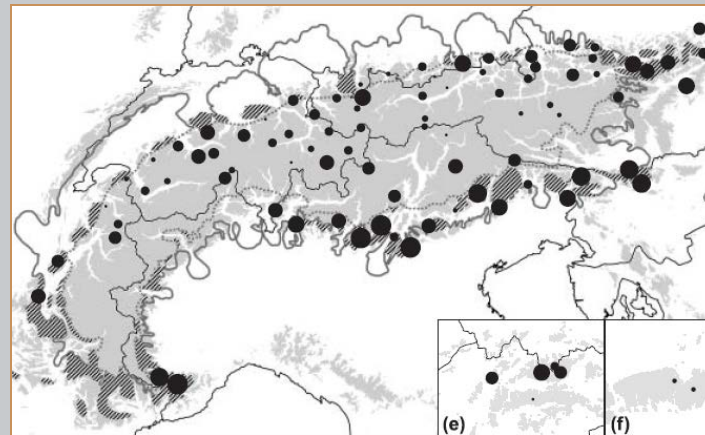
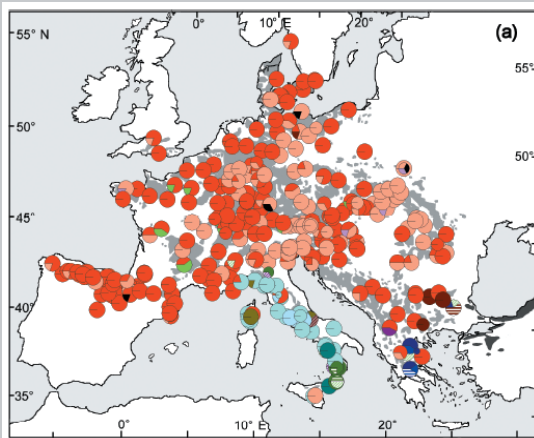
Detekce klonality

- velmi variabilní marker (AFLP, RAPD, SSRs, ISSR)
- nadhodnocení/podhodnocení klonální variability – variabilita a síla markeru



Postglaciální migrace

- vztah mezi geografickou a genetickou strukturou
- vnitropopulační diverzita, divergence – refugia vs. nově vzniklé populace (variabilní a vzácné fragmenty)
- identifikace refugií
- postglaciální migrační cesty
- cpDNA (sekvence, SSRs, PCR-RFLP), AFLP



Typy „systematických“ otázek

- vliv *breeding system* na genetickou variabilitu
- analýza polyploidních serií – genetická variabilita
- mnohonásobný vznik polyploidů
- fylogeneze na úrovni rodu
- fylogeneze na úrovni čeledi
- mezidruhová hybridizace

Vliv *breeding system* na genetickou variabilitu

- apomikti – nízká vnitropopulační variabilita, extrémně vysoké hodnoty F_{ST}
- allogamický druh – vyšší vnitropopulační variabilita
- hlavní roli na rozdělení genetické variability (F_{ST}) v malých populacích má genetický drift



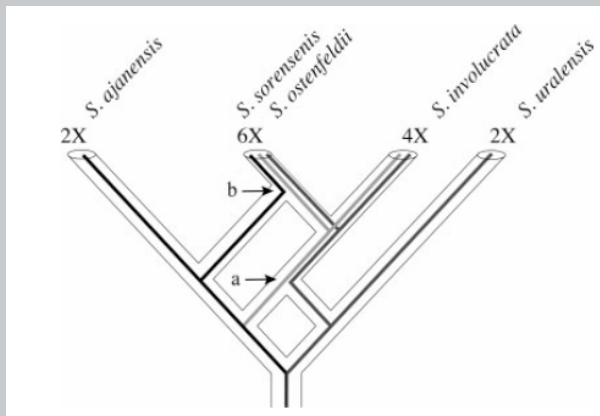
Analýza polyploidních serií

- autopolyploidi mají většinou stejné alely jako $2n$
- větší počet genotypů u polyploidů
- trend k vyšší genetické diversitě u polyploidů
- primární vs. sekundární kontakt mezi di- a polyploidy
- cpDNA, low-copy nDNA markery
- SSRs – problém s alelickým hodnocením



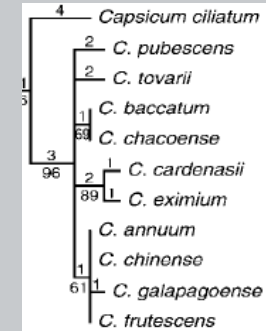
Mnohonásobný vznik polyploidů

- využití cpDNA haplotypů
- stejné haplotypy nalezené u polyploidů i $2n$
- různé haplotypy u polyploidů znamenají nezávislou polyploidisační událost
- detekce původu allopolyploidů



Studium fylogeneze

- využití různých markerů – sekvence (jaderné, chloroplastové), AFLP, cpDNA SSRs
- nutno zvolit přiměřeně variabilní marker
- identifikace monofyletických skupin
- příbuznost skupin
- porovnání molekulárních a morfologických dat
- molekulární hodiny – datování



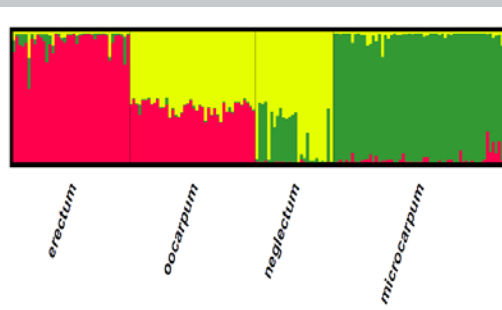
Ages calibrated on age of Mauritian node at 8 million years ago, as Mauritius emerged from Indian Ocean

	MP tree	ML tree
1. Time (million years ago)	229 ± 35.68	196 ± 32.68
2. Time (million years ago)	23.63 ± 3.79	19.11 ± 3.40
3. Time (million years ago)		8
4. ITS substitution rate (substitutions/site/year)	4.136 × 10 ⁻¹⁰	4.527 × 10 ⁻¹⁰
	5.716 × 10 ⁻¹⁰	6.486 × 10 ⁻¹⁰
5. Net diversification rate (species/million years)	0.154–0.217	0.187–0.269

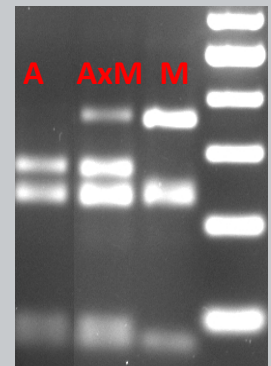


Mezidruhová hybridizace

- identifikace hybridních jedinců/taxonů
- hybridní/hybridogenní
- srovnání nDNA a cpDNA – určení mateřského jedince, asymetrie v hybridizaci (směr introgrese)
- jaderné sekvence, RAPD, PCR-RFLP ITS, SSRs, AFLP



T. latifolia	176	176	278	278	176	190	269	269	179	179	93	93	278	278
T. angustifolia	210	210	286	286	196	196	287	287	193	193	101	101	280	280
T. x glauca	180	210	278	286	190	196	269	287	179	193	93	101	278	280
advanced hybrid	176	210	278	286	190	196	287	287	179	193	93	101	278	280

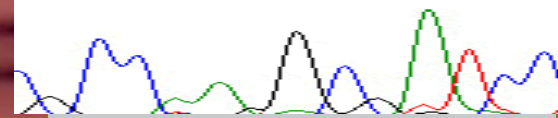
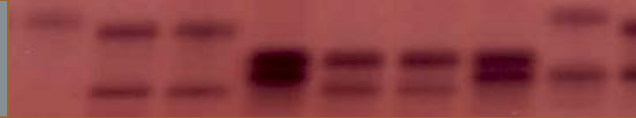


O čem jsme nemluvili...

- epigenetika – methylace (MSAP, bisulphite sequencing)
- populační genomika – velmi mnoho markerů (AFLP, genome-wide SNPs)
 - genome-wide association studies (GWAS), QTL, ...
 - identifikace lokusů asociovaných např. s určitým fenotypem, tj. ekologické adaptace nebo vztahy genů a fenotypu
 - genome scans
 - identifikace lokusů pod selekcí – např. pro identifikaci speciálních genů, genetické pozadí adaptace apod.
- microarray – SNP chips (paralelní detekce stovek až desítek tisíc SNPs), DArT (diversity array)...
- ...

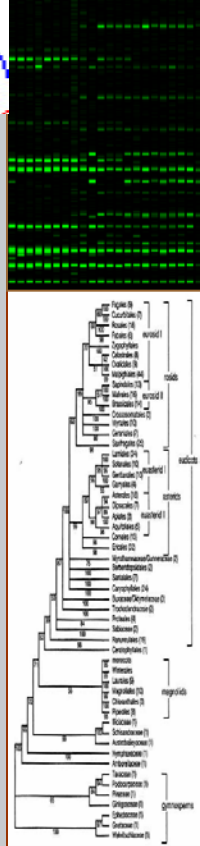
AGGATATATATATAGGCA

AGGATATATATA--GGCA

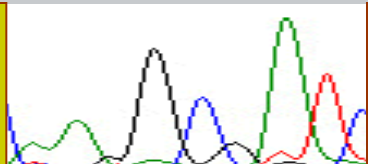


Závěrem ...

- existuje mnoho metod schopných „přečíst“ různou část genetické variability
- je důležité zvolit správnou metodu pro daný typ otázky
- neméně důležité je i vyhodnocení a interpretace
- molekulární metody nejsou všechno, často spíš jen velmi vhodně doplní nebo usměrní další data (populační parametry, morfologie...)



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



Fstat

Version 2.9.3.2 (Feb. 2002)