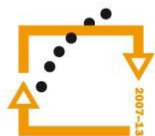




MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí“

Reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/28.0032



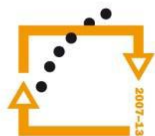
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Moderní metody pro studium diverzity a evoluce rostlin

Hana Šimková

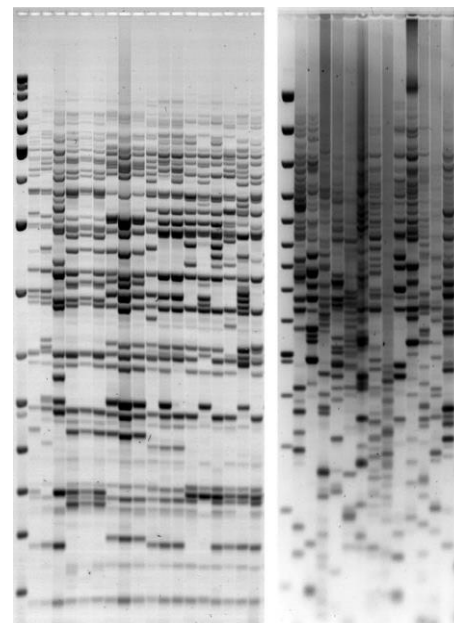


Metody pro studium diverzity

A. Analýza
morfologických,
anatomických a
biochemických znaků



B. Analýza na úrovni
DNA





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



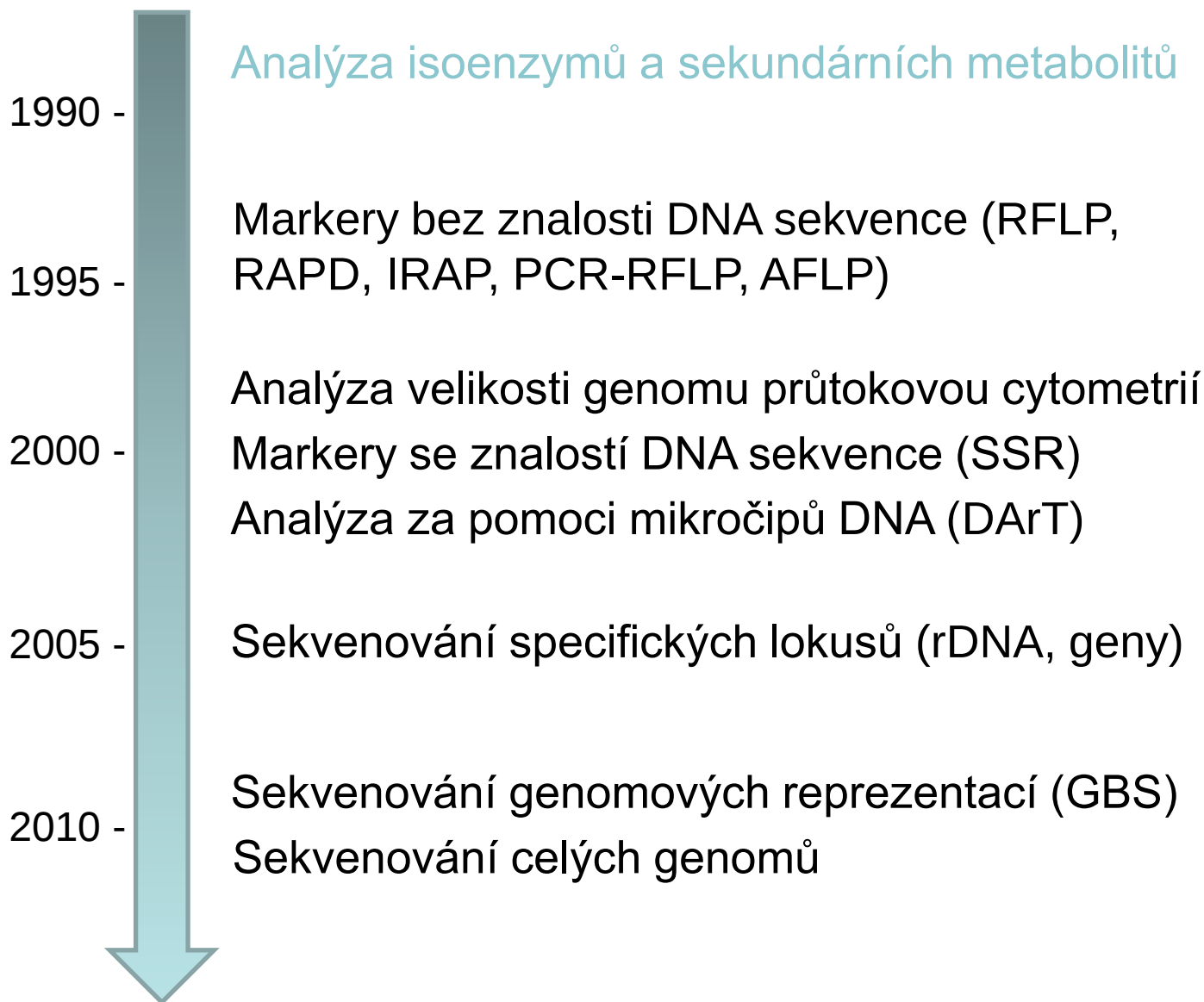
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Vývoj metod pro studium diverzity





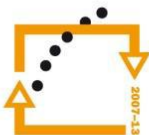
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

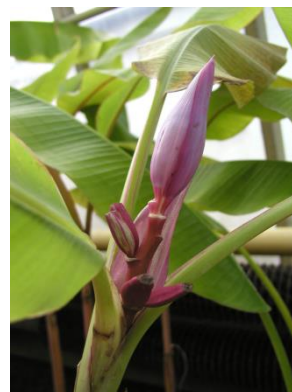


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

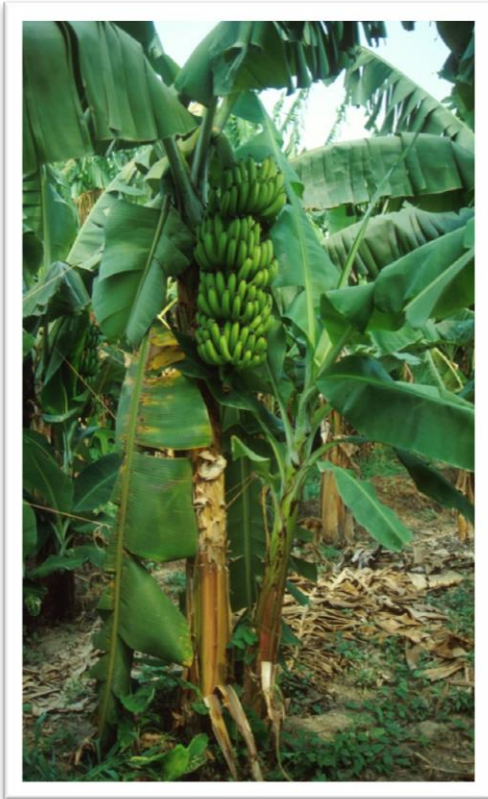
INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Banánovník (*Musa sp.*)

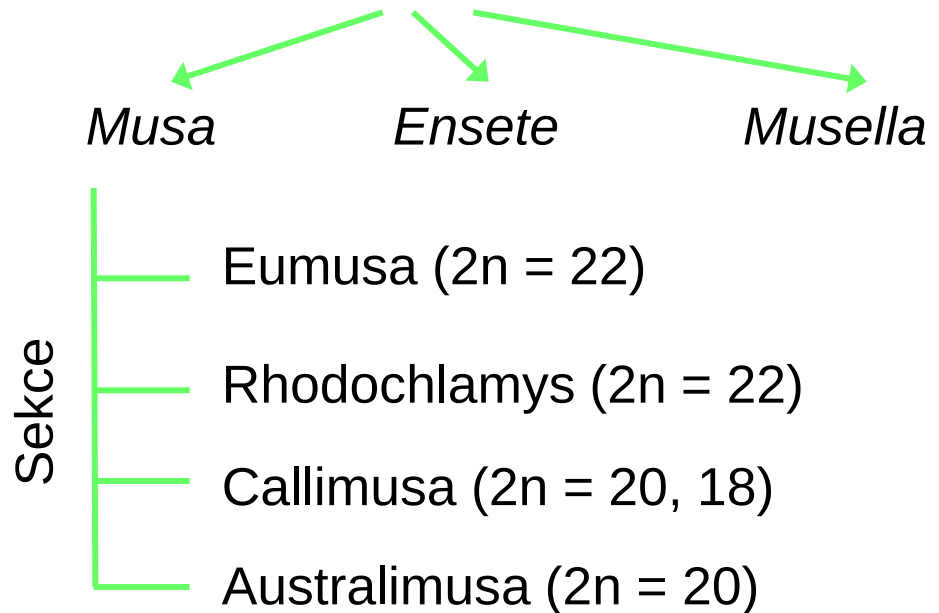
- Jedna z nejdůležitějších plodin v tropických a subtropických oblastech
- Jedlé typy banánovníku jsou klony rozmnožující se odnožemi, většinou triploidní (kombinace genomů A a B)
- Náchylné vůči chorobám a škůdcům, šlechtění rezistentních odrůd **hybridizací s planými druhy**
- Lepší znalost struktury genomu a genetické diverzity → efektivní **využití biotechnologických postupů pro získání rezistentních kultivarů a pro ochranu a konzervaci existujícího genofondu**



Banánovník (*Musa* sp.)



- Řád: Zingiberales
- Čeleď: Musaceae



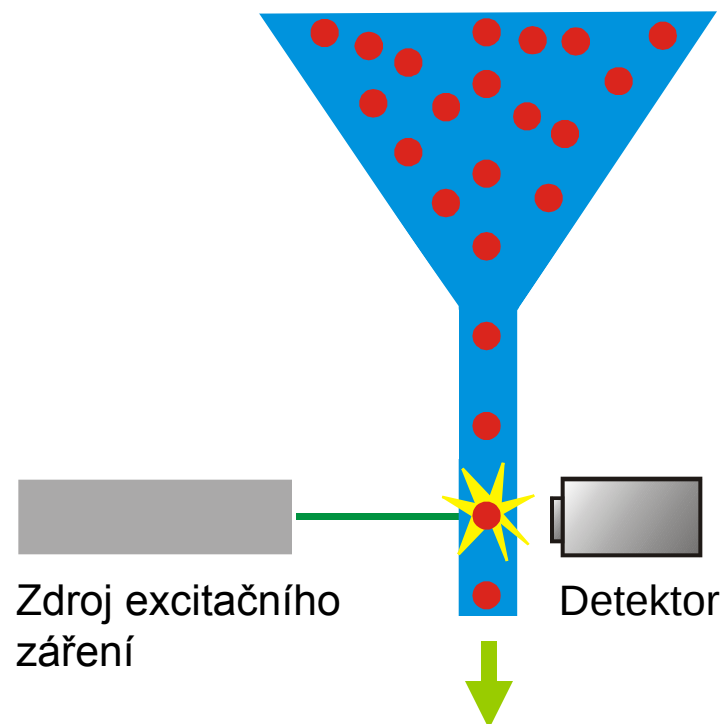
**Společný projekt Ústavu experimentální botaniky AV ČR a
Biodiversity International**

- Charakterizace položek z genové banky banánovníku v Lovani, studium diverzity

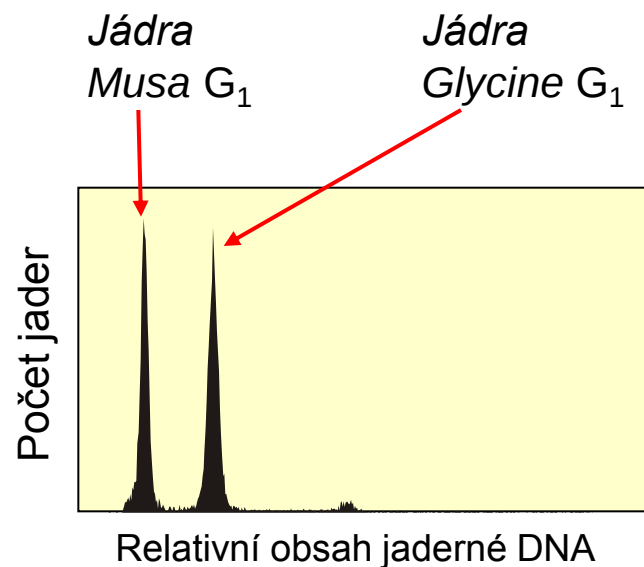
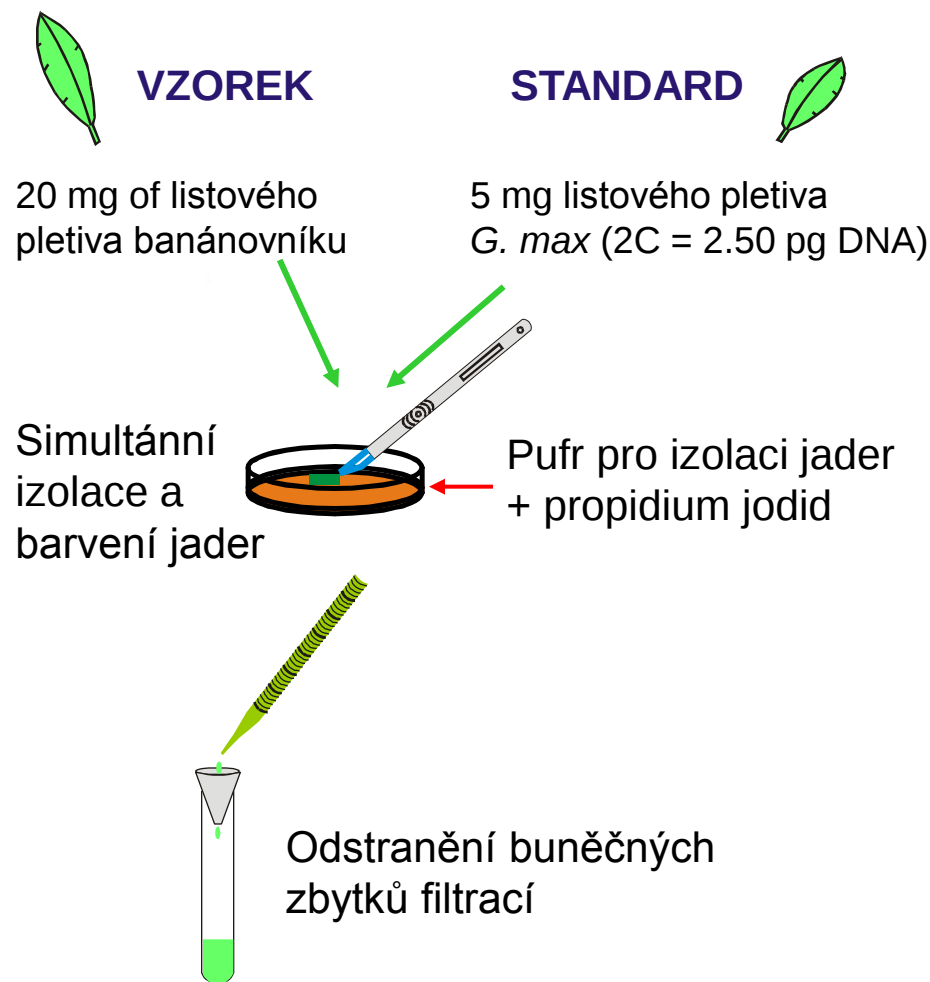
Analýza velikosti genomu průtokovou cytometrií

Průtoková cytometrie analyzuje optické parametry mikroskopických částic za pohybu v úzkém vodním paprsku

Vzorek musí mít formu vodní suspenze jednotlivých částic (např. jader).

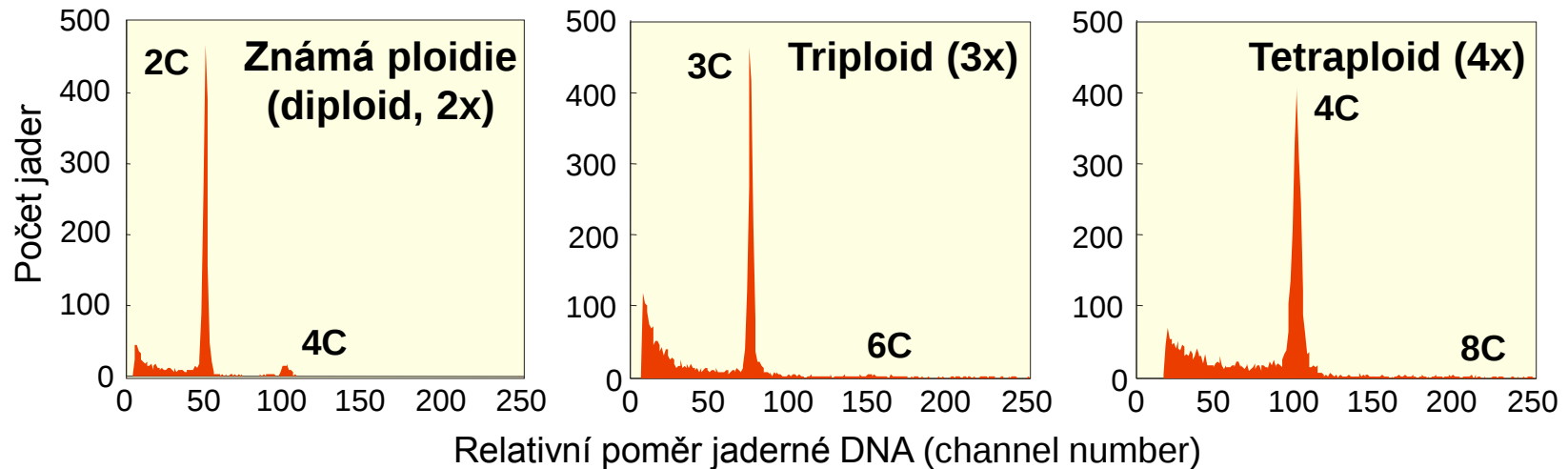


Stanovení velikosti jaderného genomu



Poměr pozice G₁ píku *Glycine* ku *Musa* je 1,984 => obsah jaderné DNA (2C) *M. acuminata errans* je $2,50 / 1,984 = 1,26$ pg DNA (tj. 608 Mbp / 1C)

Stanovení ploidie



Výhody:

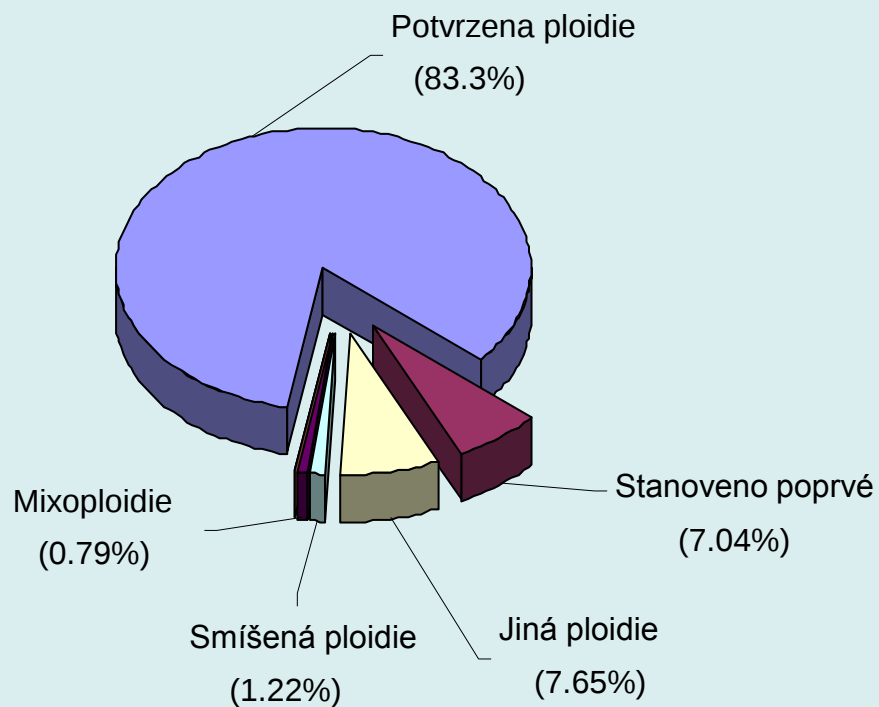
- Jednoduché a rychlé (>100 vzorků za pracovní den)
- Nedestruktivní (stačí miligramová množství rostlinného pletiva)

Ploidie položek v genové bance banánovníku

Průtoková cytometrie byla použita k ověření klasifikace položek rodu *Musa* v genové bance INIBAP Transit Centre (KU Leuven, Belgie)

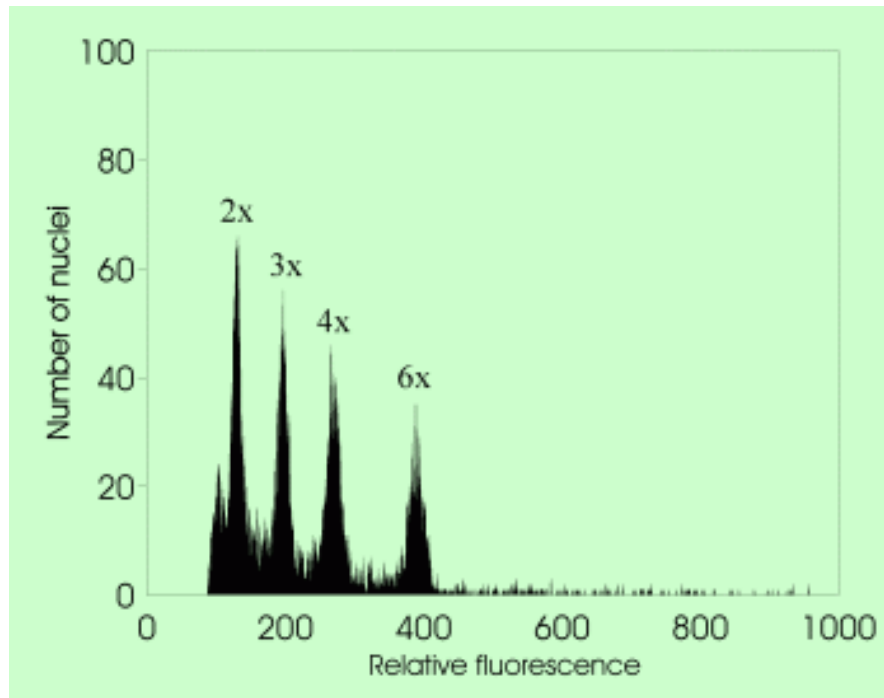


Analýza ploidie u 1150 z 1175 položek



Aplikace v biosystematice

- Identifikace vzácných cytotypů



Různé cytotypy *Lythrum salicaria* identifikované pomocí průtokové cytometrie (vzorky měřeny simultánně)



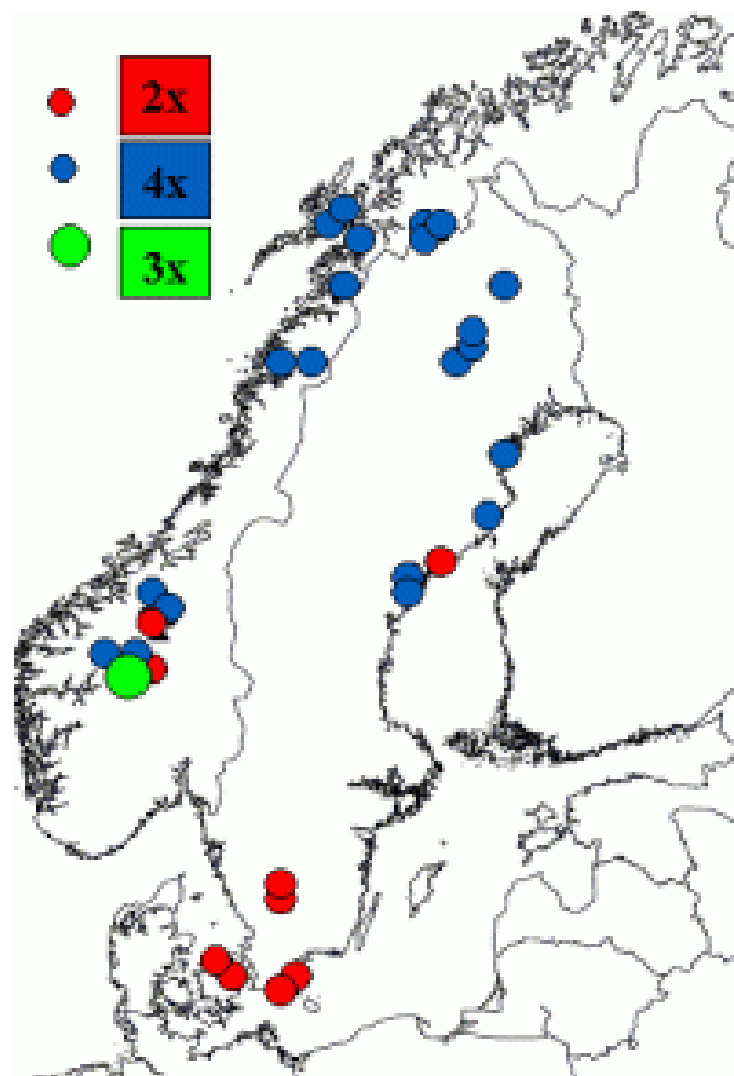
Kyprej vrba
(*Lythrum salicaria*)

Aplikace v biosystematice

- Prostorová distribuce cytotypů

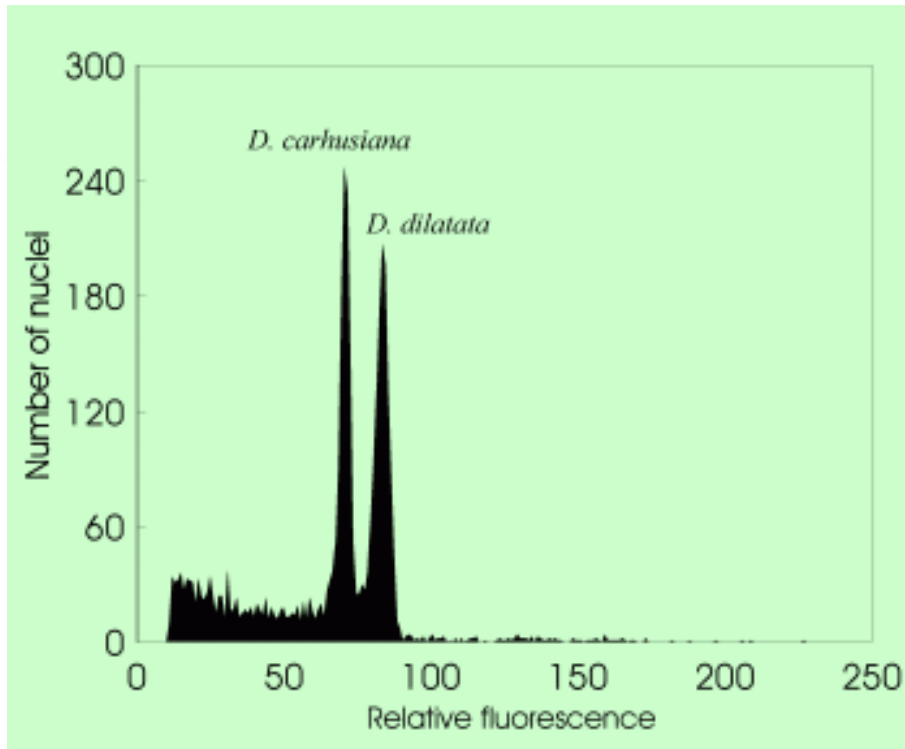


Distribuce *cytotypů*
Empetrum (šicha) ve
Skandinávii



Aplikace v biosystematice

- Identifikace druhů se stejným počtem chromozómů
(druhově specifická velikost genomu je pozorována u mnoha rodů)



Diskriminace mezi druhy se stejným počtem chromozómů
avšak odlišnou velikostí genomu u *Dryopteris*



Kaprad' rozložená
(*Dryopteris dilatata*)

Analýza diverzity za pomoci SSR markerů

Mikrosatelity (SSR)

- krátké repetice DNA (jednotka 1-6 bp)
- zejména mezi geny a v nekódujících oblastech

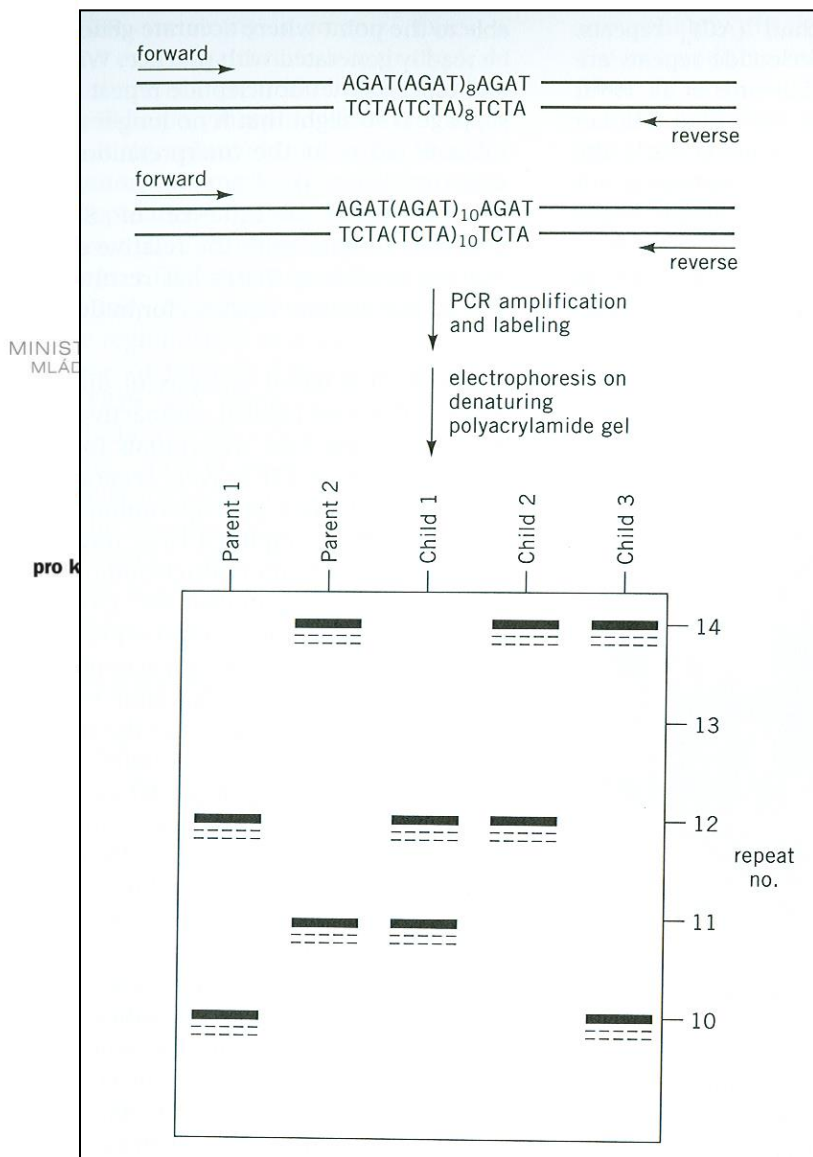
😊 četný výskyt, vysoce polymorfní, mnoho alel, reprodukovatelné, vysokokapacitní (*high-throughput*)

Detekce:

- pomocí PCR - primery navržené na okolní sekvenci

Vizualizace:

- Elektroforéza – agaróza (více než 3%)
 - PAGE – denaturující
 - nedenaturující
- Pomocí sekvenátoru – umožňuje *multiplexing*



Aplikace při analýze položek banánovníku

- Analýza genetické diverzity 250 položek rodu *Musa* z genové banky
 - pomocí 19 SSR markerů
 - standardizovaný postup (Christelová et al., Annals of Botany, 2011)

Fluorophore	Marker	Motif	Primers nucleotide sequence		Annealing temperature	Reference	GenBank accession
			FWD (5'-3')	REV (5'-3')			
6-FAM	mMaCIR01	(GA) ₂₀	TTAAAGGTGGGTTAGCATTAGG	TTTGATGTCACAATGGTGTTC	55°C	Lagoda et al. 1998	X87262
6-FAM	mMaCIR03	(GA) ₁₀	TGACCCACGAGAAAAGAAGC	CTCCTCCATAGCCTGACTGC	55°C	Lagoda et al. 1998	X87263
NED	mMaCIR07	(GA) ₁₃	AACAAC TAGGATGGTAATGTGTGGAA	GATCTGAGGATGGTTCTGTTGGAGTG	53°C	Lagoda et al. 1998	X87258
VIC	mMaCIR08	(TC) ₆ N ₂₄ (TC) ₇	ACTTATTCCTCCGCACTCAA	ACTCTCGCCCATCTTCATCC	55°C	Lagoda et al. 1998	X87264
PET	mMaCIR13	(GA) ₁₆ N ₇₆ (GA) ₈	TCCCAACCCCTGCAACCACT	ATGACCTGTGGAACATCCTTT	53°C	Lagoda et al. 1998	X90745
PET	mMaCIR24	(TC) ₇	ATCTTTCTTATCCTTCTAACG	ATTAGATCACCGAAGAACTC	48°C	Lagoda et al. 1998	Z85972
VIC	mMaCIR39	(CA) ₅ GATA(GA) ₅	AACACCGTACAGGGAGTCAC	GATACATAAGGCAGTCACATTG	52°C	Lagoda et al. 1998	Z85970
6-FAM	mMaCIR40	(GA) ₁₃	GGCAGCAACAACATACTACGAC	CATCTTACCCCCAATCTTTTA	54°C	Lagoda et al. 1998	Z85977
6-FAM	mMaCIR45	(TA) ₄ CA(CTCGA) ₄	TGCTGCCTTCATCGCTACTA	ACCGCACCTCCACCTCCTG	57°C	Lagoda et al. 1998	Z85968
VIC	mMaCIR150	(CA) ₁₀	ATGCTGTCAITGCCTTGT	GAATGCTGATACCTCTTGG	54°C	Hippolyte et al. 2010	AM950440
6-FAM	mMaCIR152	(CTT) ₁₈ , (CT) ₁₇ , (CA) ₆	CCACCTTTGAGTTCTCTCC	TTTCCCTCTTCGATTCTGT	54°C	Hippolyte et al. 2010	AM950442
VIC	mMaCIR164	(AC) ₁₄	AAGACAAGTTCATTGCTTG	GTTCCGGGCTTTCGGT	55°C	Hippolyte et al. 2010	AM950454
NED	mMaCIR196	(TA) ₄ , (TC) ₁₇ , (TC) ₃	GCTCCAAACCTCCCTTT	CGATGCCACACTGGAC	55°C	Hippolyte et al. 2010	AM950462
NED	mMaCIR214	(AC) ₇	CCATTGAGAGATCAACCC	CTATTTGACGTTGGTGGTC	53°C	Hippolyte et al. 2010	AM950480
NED	mMaCIR231	(TC) ₁₀	GCAATAGTCAAGGGAATCA	ACCCAGGTCTATCAGGTCA	55°C	Hippolyte et al. 2010	AM950497
PET	mMaCIR260	(TG) ₈	GATGTTTGGGCTGTTTCTT	AAGCAGGTGAGATTGTTCC	55°C	Hippolyte et al. 2010	AM950515
6-FAM	mMaCIR264	(CT) ₁₇	AGGAGTGGGAGCCTATTT	CTCCTCGGTCAGTCCTC	53°C	Hippolyte et al. 2010	AM950519
NED	mMaCIR307	(CA) ₆	AGACTTGATCGCTTGGTAAA	ACGCTGCACCAGTCAA	54°C	Hippolyte et al. 2010	AM950533
PET	Ma-3-90	(CT) ₁₁	GCACGAAGAGGCATCAC	GGCCAAATTTGATGGACT	53°C	Crouch et al. 1998	n/a

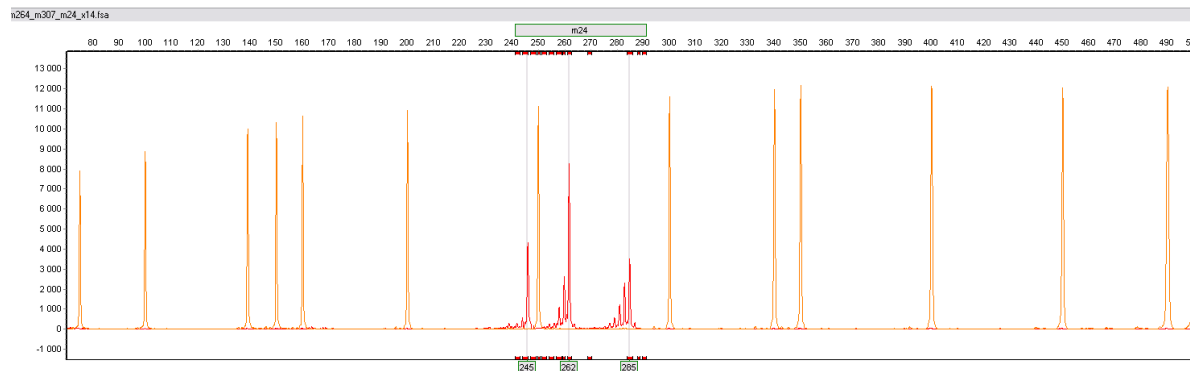
Aplikace při analýze položek banánovníku

- Analýza SSR profilů na sekvenátoru (fragmentační analýza, program GeneMarker)



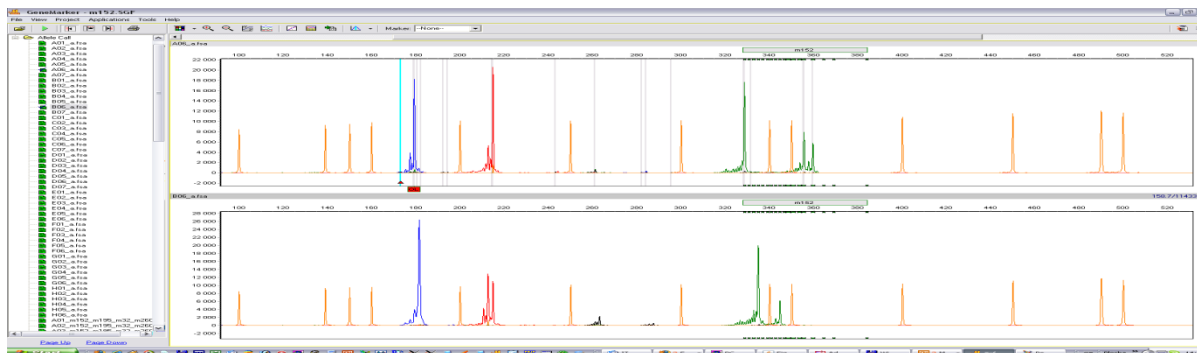
3730xl DNA analyzer

Přesná identifikace velikosti alel s vysokým rozlišením



SSR profil genotypu
Sport of Silk (AAB)
pro marker
mMaCIR24 (červené
píky)

High-throughput, multiplexing



Multiplexing SSR profilů
genotypu Mbwazirume (AAA)
pro SSR markery
mMaCIR152 (zelený)
mMaCIR195 (modrý)
MaI_32 (černý)
mMaCIR260 (červený)

Aplikace při analýze položek banánovníku

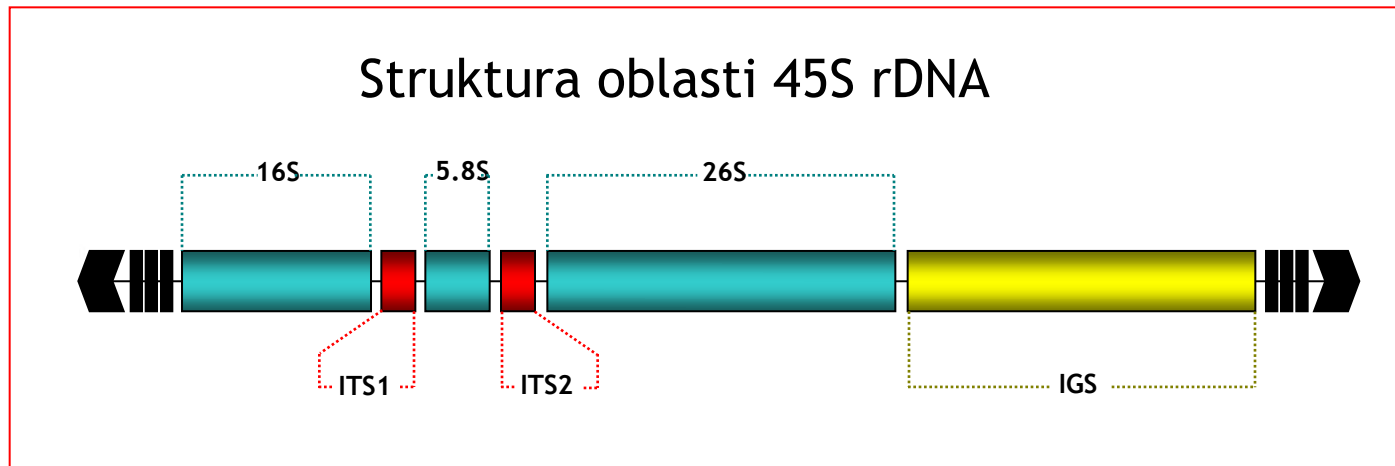


Kladogram DIPLOIDNÍCH položek

Kladogram TRIPLOIDNÍCH položek

Analýza diverzity sekvenováním specifických lokusů

➤ ITS



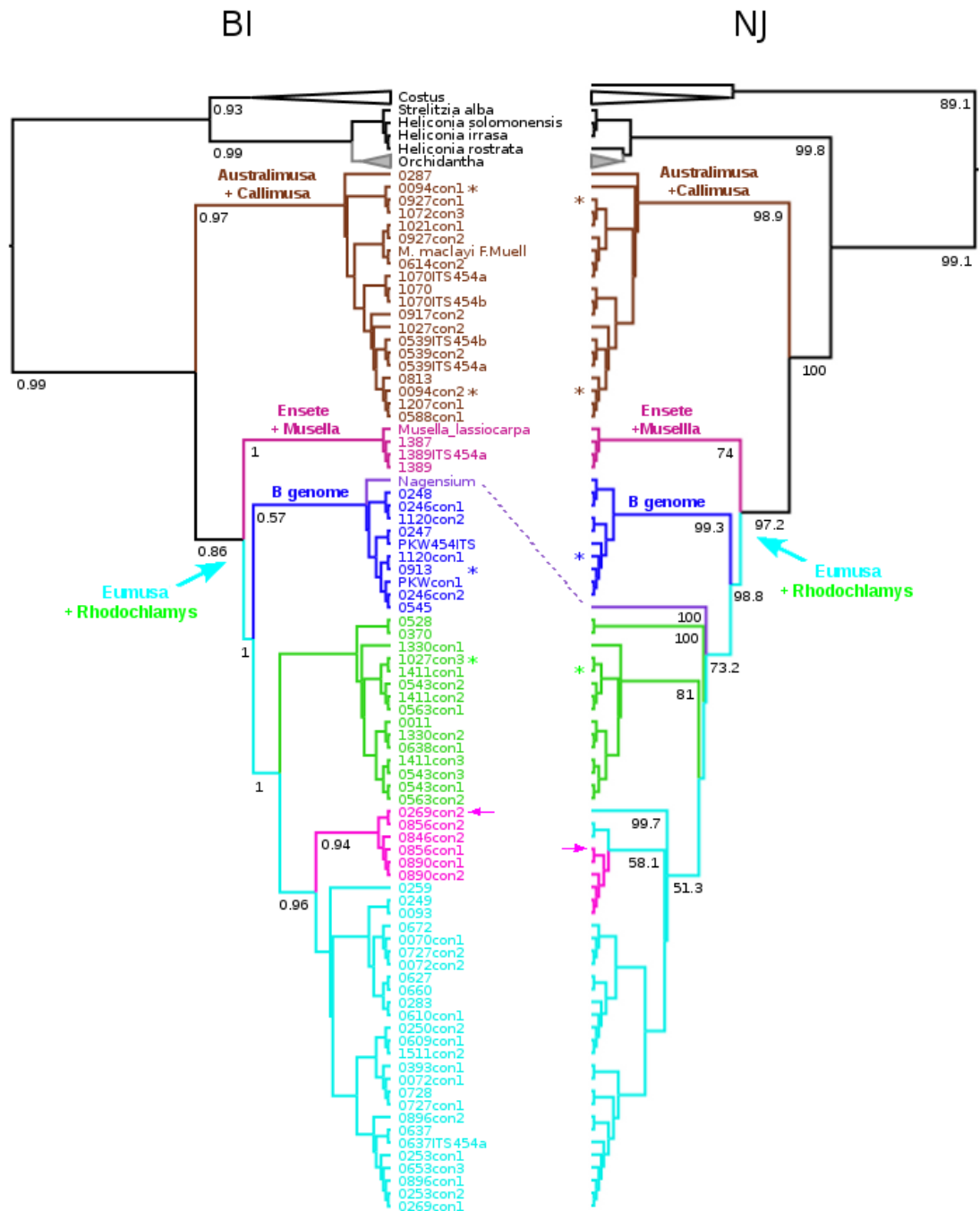
Postup:

- Izolace genomické DNA → PCR amplifikace oblasti ITS (inter-transcribed spacer) z primerů komplementárních k rDNA (konzervované sekvence) → sekvenování
- Analýza sekvenčních dat (ClustalW, BioEdit) → konstrukce fylogenetických stromů na základě sekvence ITS1 a ITS2

Fylogenetické stromy rodu *Musa* a příbuzných druhů na základě sekvence oblastí ITS1-ITS2

Analýza zahrnovala také hybridy banánovníku a vybrané druhy příbuzných čeledí *Strelitziaceae*, *Lowiaceae*, *Heliconiaceae* a *Costaceae*

BI: Bayesian inference
NJ: Neighbor joining

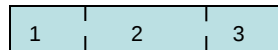


Analýza diverzity sekvenováním specifických lokusů

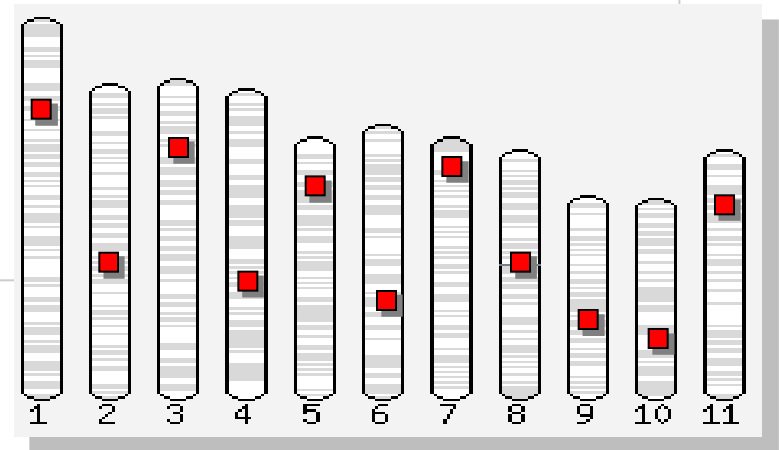
➤ geny

Primery pro PCR odvozeny z exonů (EST)

ESTy = části exprimovaných sekvencí
- získány z databáze NCBI
- rozloženy na různých chromozómech



ESTy



Templátem pro PCR – genomická DNA

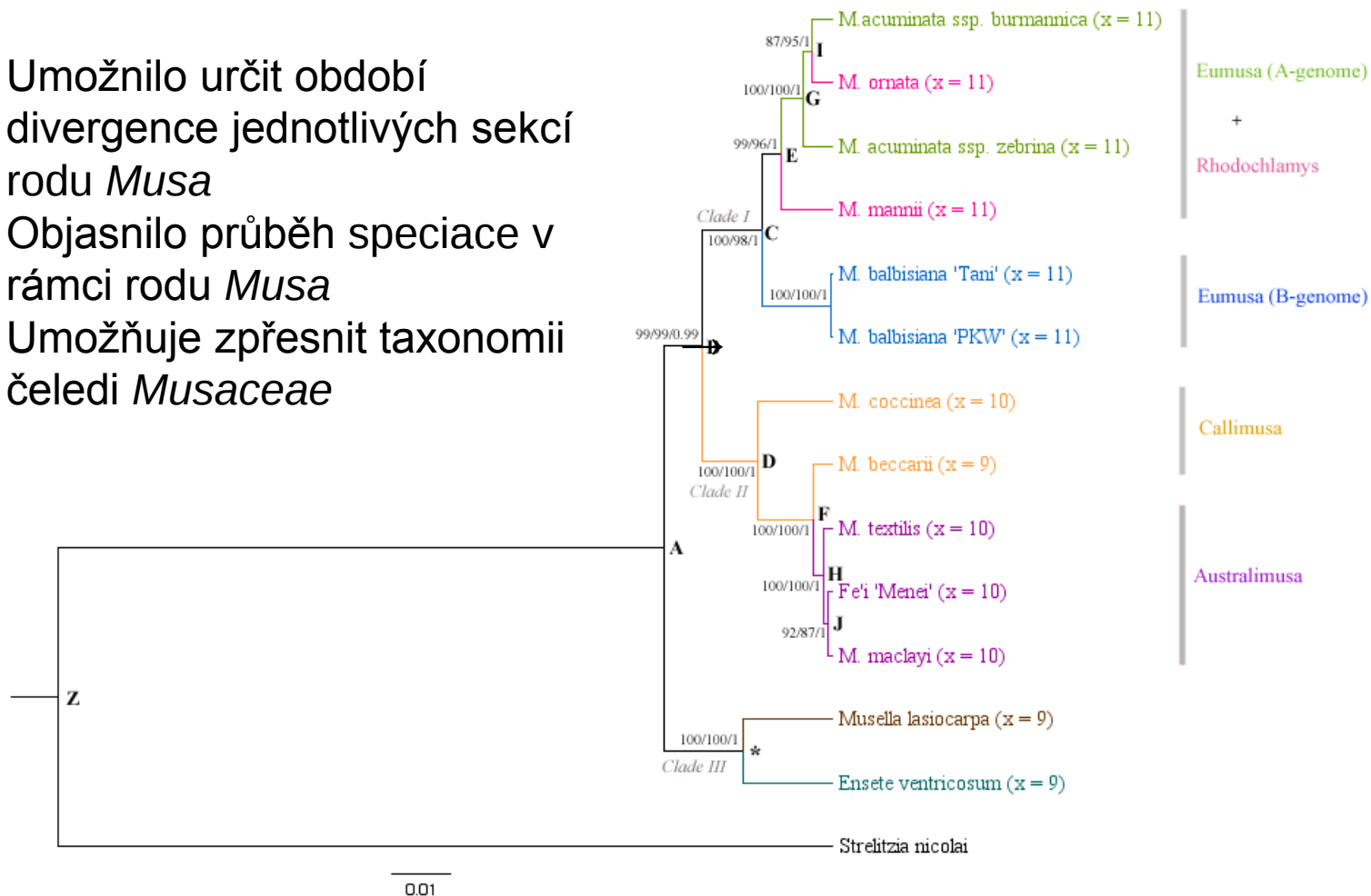
- v produktu amplifikace přítomné **introny** – vyšší pravděpodobnost výskytu mutace



Fylogenetické stromy rodu *Musa* a příbuzných druhů na základě sekvence 19 genových lokusů

Sekvenování → analýza sekvencí → rekonstrukce fylogeneze

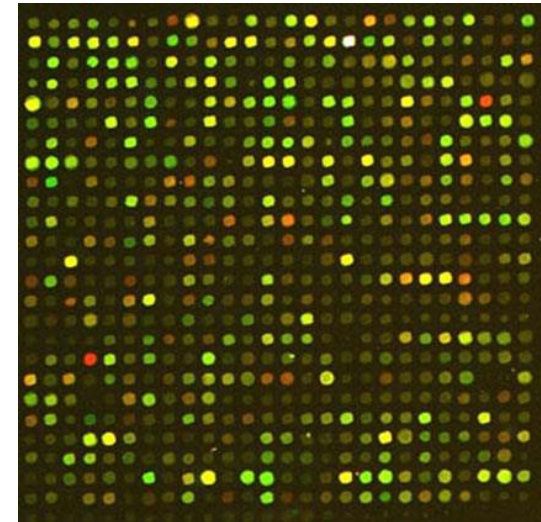
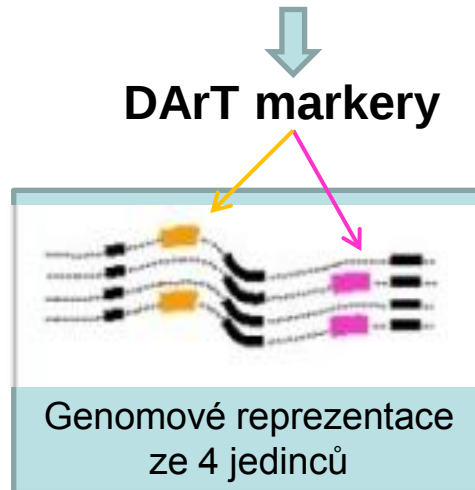
- Umožnilo určit období divergence jednotlivých sekcí rodu *Musa*
- Objasnilo průběh speciace v rámci rodu *Musa*
- Umožňuje zpřesnit taxonomii čeledi *Musaceae*



Analýza za pomoci mikročipů DNA

Diversity Arrays Technology (DArT)

- umožňuje detekovat variabilitu genomu v tisícovkách lokusů genomu současně. Vhodné pro studium diverzity druhu, *genotyping* (charakterizaci genotypu), konstrukci genetických map.
- Analýza probíhá na základě **hybridizace DNA na mikročipu** (DArT array)
 - na sklíčku upevněny sondy - fragmenty DNA z nezametylovaných oblastí genomu (často geny), tzv. **genomové reprezentace**. Ty se připravují ze souboru (desítek) jedinců téhož druhu/rodu.
 - fragmenty lišící se mezi jednotlivými jedinci



www.diversityarrays.com

DArT arraye vytvořeny pro desítky druhů rostlin a živočichů

Jak DArT detekuje polymorfismus DNA

A) Vývoj arraye

Směs vzorků (odrůdy, linie)



Směs genom. reprezentací



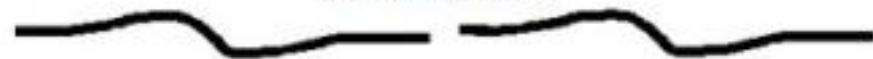
Fragmenty
se zaklonují
a vytvoří se
array

B) Analýza genotypů

Vzorek 1

Vzorek 2...

Genomic DNA



Genomic
representation



Hybridisation



Hybridizační profil 1



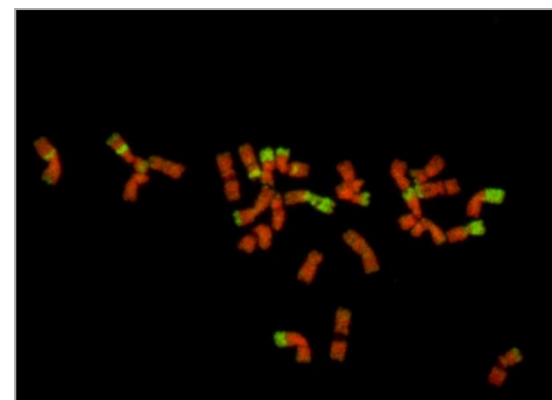
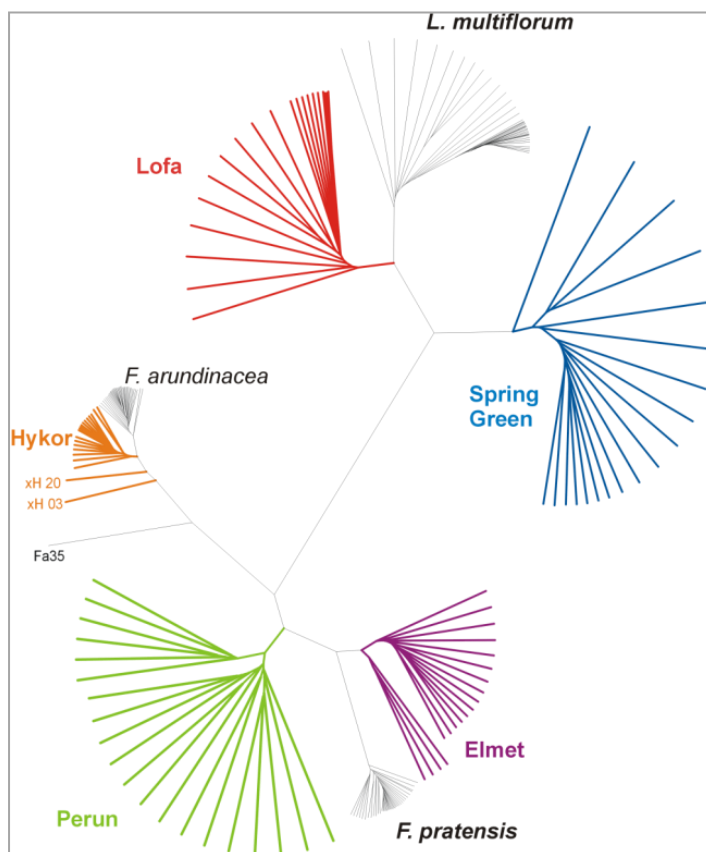
Hybridiz. profil 2

**Diversity
Arrays
Technology**

**Diversity
Arrays
Technology**

Využití DArTFest arraye ke studiu struktury genomu a evoluce u trav (jílky, kostřavy)

- také využití pro šlechtitele – analýza vytvořených hybridů jílků a kostřav



Kopecký et al., Theor. Appl. Genet., 2011

Sekvenování genomových reprezentací

Genotyping by sequencing (GBS)

- získání informace o genotypu v **tisícirovkách polymorfních lokusů** (jedonukleotidové polymorfismy, inzerce/delece, presence/absence) z dat získaných **sekvenováním** technologiemi nové generace (NGS) → *multiplexing*. Sekvenovány jsou obvykle jen určité části genomu (genomové reprezentace). Cílem sekvenování jsou zejména **geny**.



Možnosti získávání genomových reprezentací (redukce complexity):

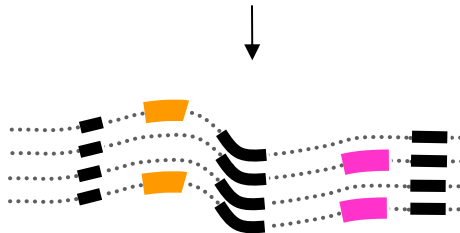
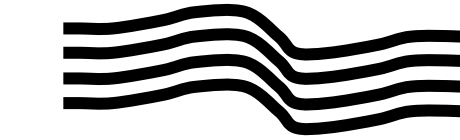
- selekce DNA fragmentů získaných štěpením restriktčními endonukleázami: **DArTseq** a obdobné technologie **GBS**
- **exome capture** - vychytání frakce genomu obohacené o exony pomocí čipů nebo mikrokuliček
- **RNAseq** - sekvenování transkriptomu (cDNA)

DArTseq

- k analýze genotypu využívá sekvenování technologiemi nové generace (NGS)

Příprava DArT databáze

Směs vzorků
daného druhu



Genomové reprezentace

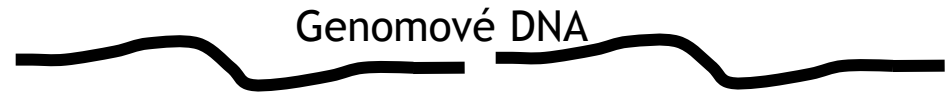
Sekvenování
fragmentů
→ *sequence tags*
(„sekvenční visačky“)

DArT databáze
daného druhu
(referenční genom)

Nalezení polymorfismů a genotyping

Vzorek 1

Vzorek 2 ...



Genomové reprezentace



Sekvenování

gcagtgtctctaacagtagggtcgctattgccttgggt

gcagtggctctaacagtagggttgctattgccttgggt

Sequence tags

Identifikace polymorfismů
PAV (+/-), SNP, inzerce/delece

Vyhodnocení alelických variant (např. t/g, c/t)
= **genotyping**



Ko/dominantní markery, více polymorfismů



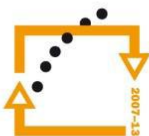
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Sekvenování celých genomů

1001 Genomes Project *Arabidopsis thaliana*

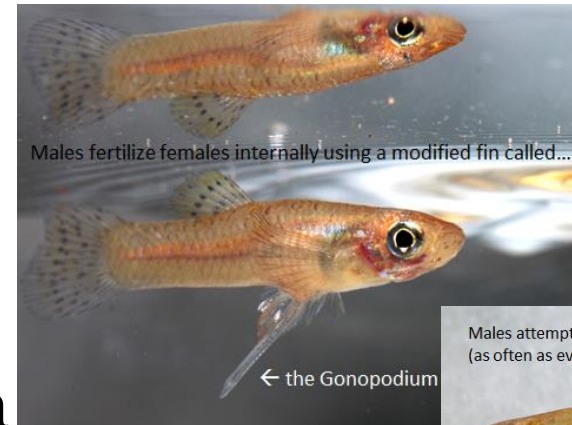
- Sekvenována 1001 linie huseníčku rolního
 - modelová rostlina, malý genom (110 Mb)
- Porovnáním nalezeny změny
 - v sekvenci i počtech repetitivních sekvencí
 - v regulačních sekvencích (některé geny se nepřepisují)
 - v sekvenci genů – některé vyřazeny z funkce:
 - geny pro adaptaci k podmínkám prostředí (zasolení půdy), rezistenci k patogenům, geny ovlivňující kvetení
→ praktické využití u zemědělských plodin



Does size matter? *Gambusia* case

DArTseq in Animals

- DArTseq developed for 50 new animal species within last year
- Significant fraction of service for marine biology (several tuna and sharks species)
- Genotyped 3,000 *Gambusia* fish and establish paternity of juveniles
- Identification of genes behind the preference for organ size ongoing



biology
letters
Animal behaviour

Females prefer to associate with males with longer intromittent organs in mosquitofish

Andrew T. Kahn*, Brian Mautz
and Michael D. Jennions

Research School of Biology, The Australian National University,
Canberra, Australian Capital Territory 0200, Australia