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

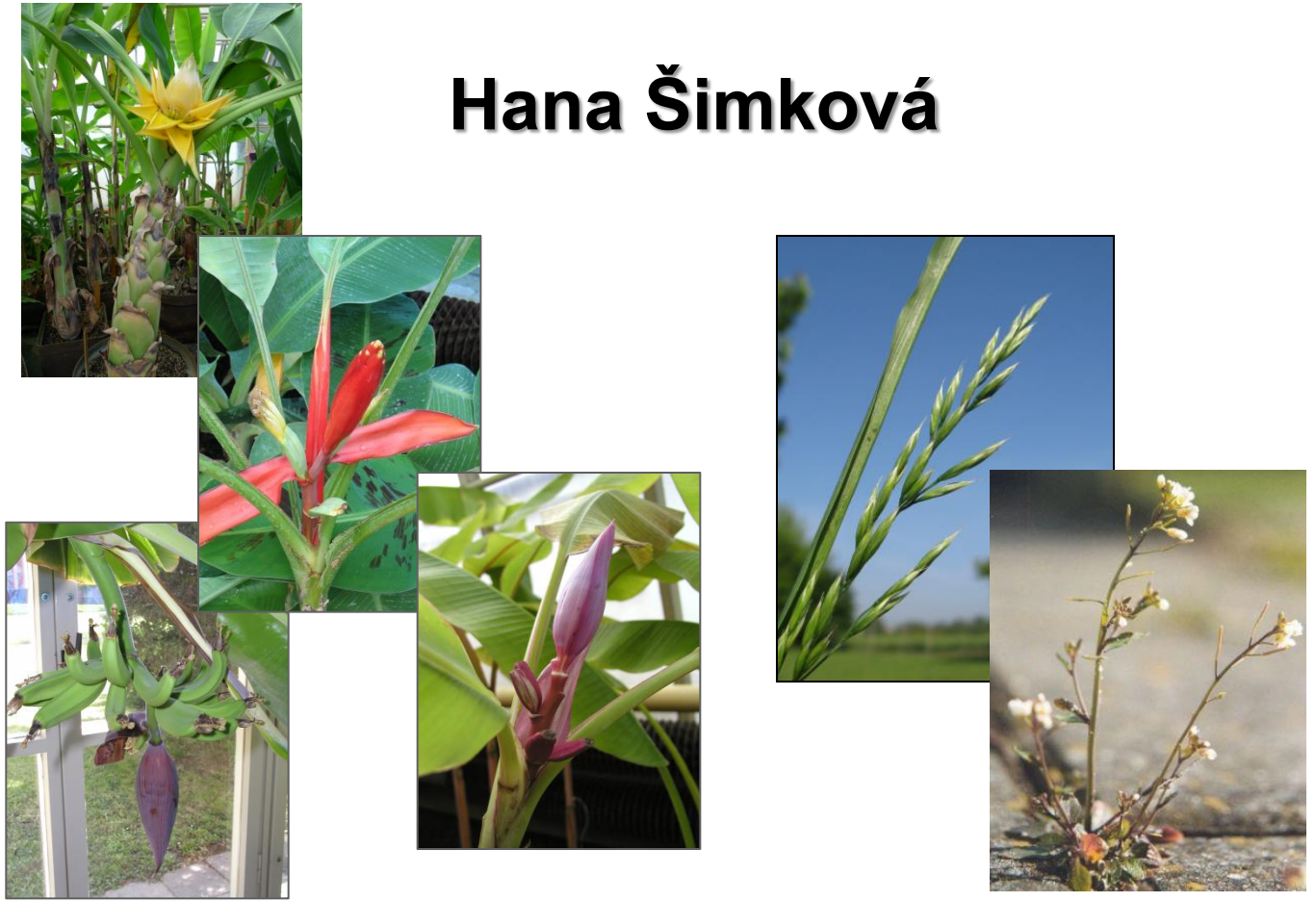
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Moderní metody pro studium diverzity a evoluce rostlin

Hana Šimková



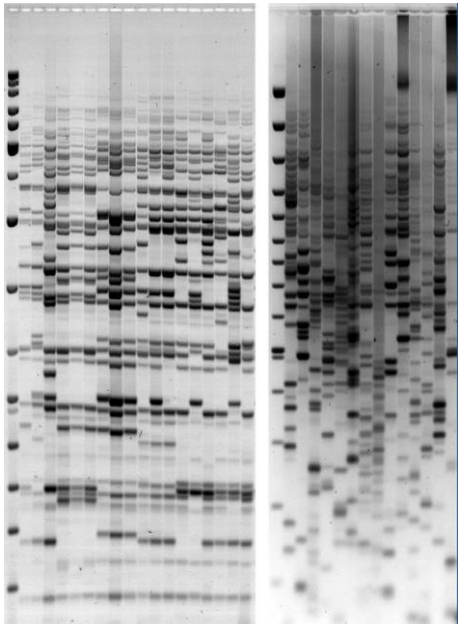
Ekologie a aplikovaná biotechnologie rostlin, 27.3.2015

evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Metody pro studium diverzity

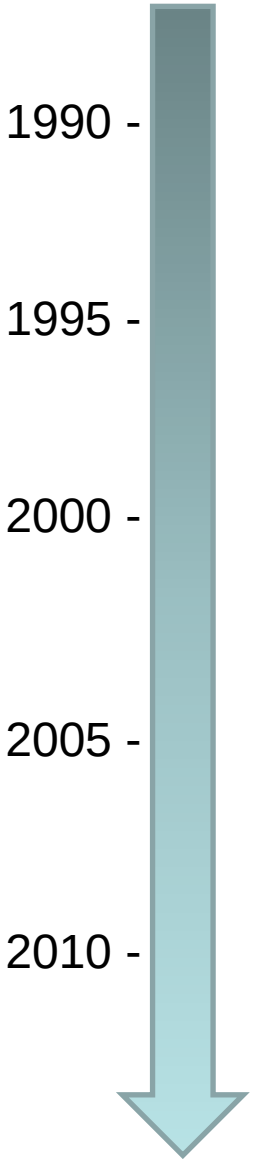
A. Analýza morfologických, anatomických a biochemických znaků

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



1990 - Analýza isoenzymů a sekundárních metabolitů

1995 - Markery bez znalosti DNA sekvence (RFLP, RAPD, IRAP, PCR-RFLP, AFLP)

2000 - Analýza velikosti genomu průtokovou cytometrií
Markery se znalostí DNA sekvence (SSR)
Analýza za pomoci mikročipů DNA (DArT)

2005 - Sekvenování specifických lokusů (rDNA, geny)

2010 - Sekvenování genomových reprezentací (GBS)
Sekvenování celých genomů

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**

evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Banánovník (*Musa* sp.)

- Řád: Zingiberales
- Čeleď: Musaceae

Musa *Ensete* *Musella*

Sekce
- Eumusa (2n = 22)
- Rhodochlamys (2n = 22)
- Callimusa (2n = 20, 18)
- Australimusa (2n = 20)

Společný projekt Ústavu experimentální botaniky AV ČR a Bioversity International

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

evropský sociální fond v ČR

EVROPSKÁ UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

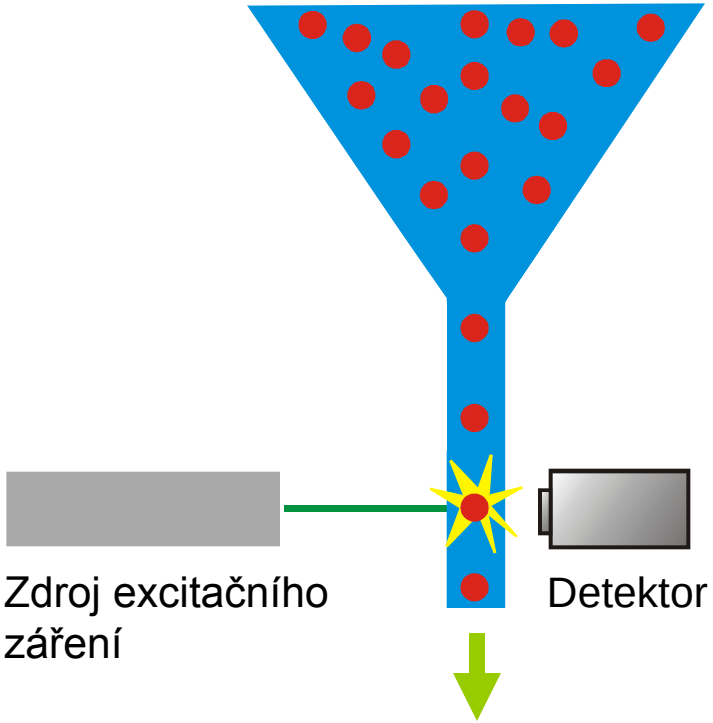
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

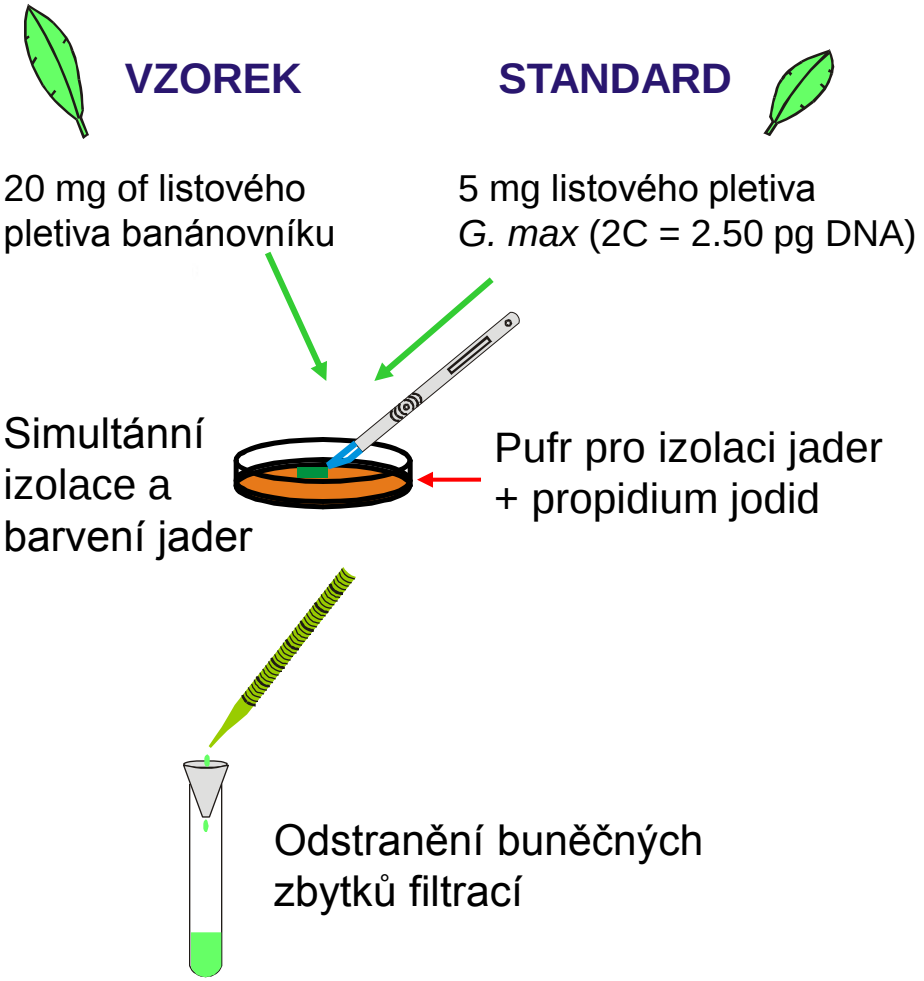
Analýza velikosti genomu průtokovou cytometrií

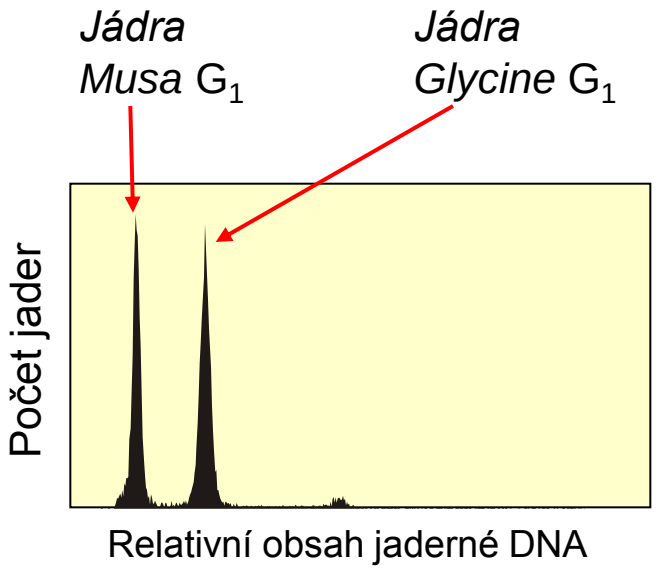
Průtoková cytometrie analyzuje optické parametry mikroskopických částic za pohybu v úzkém vodním paprsku

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



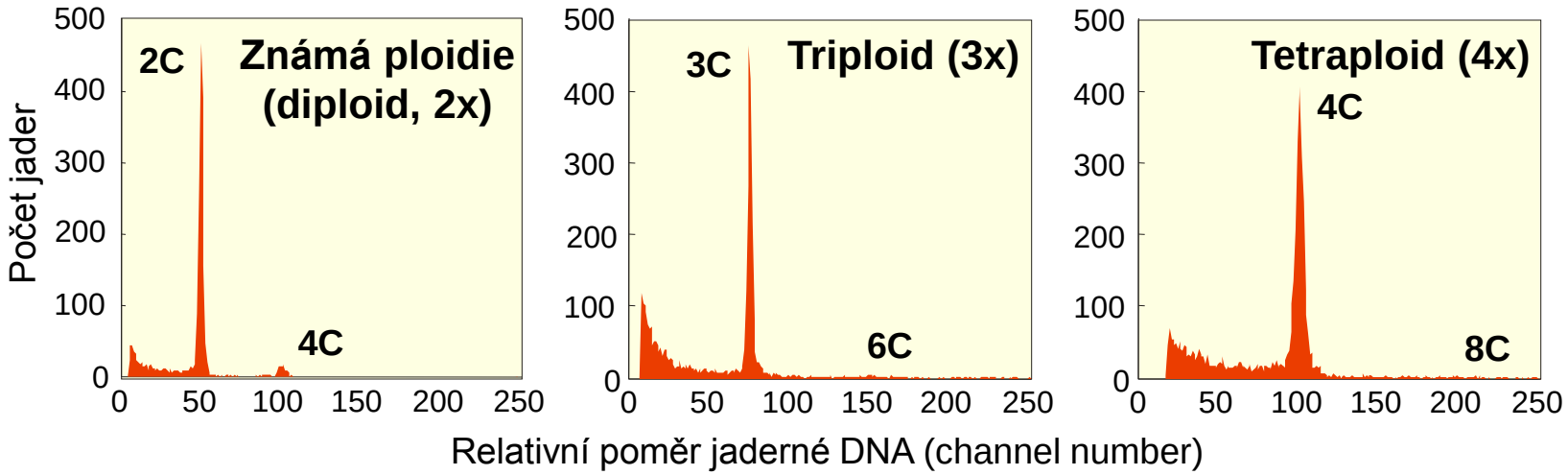
Stanovení velikosti jaderného genomu





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

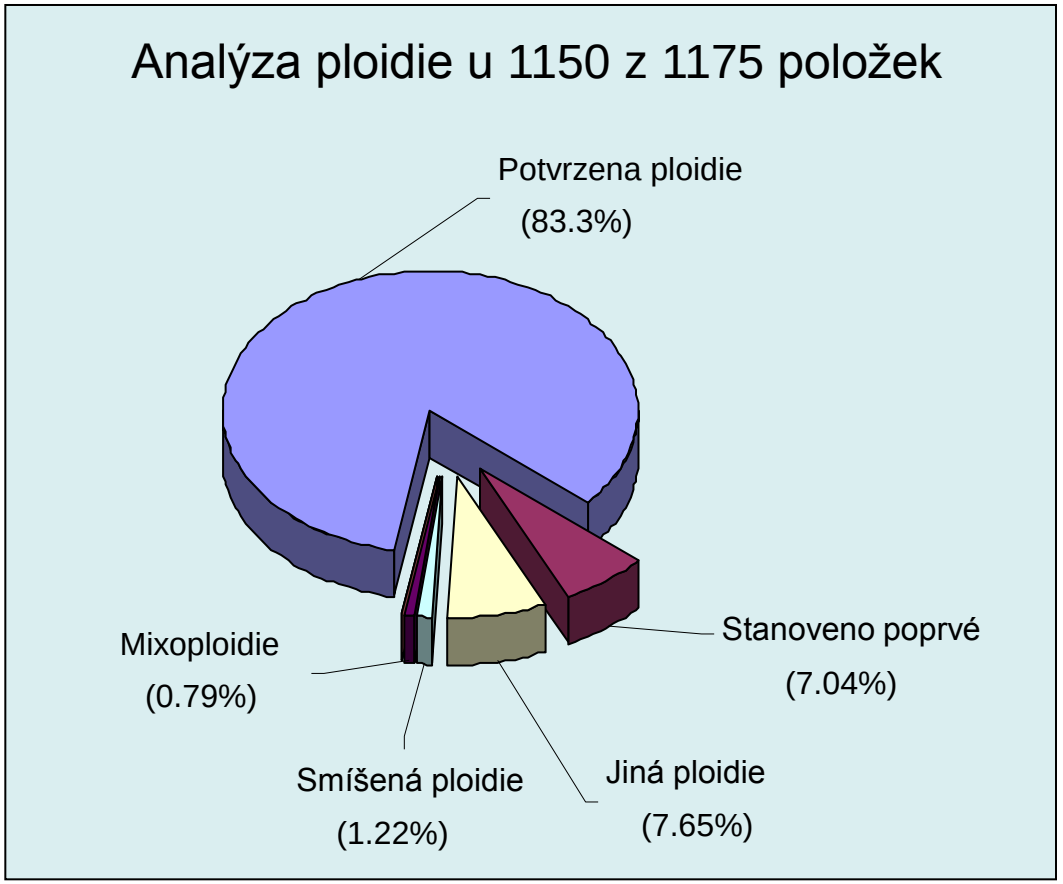


Výhody:

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

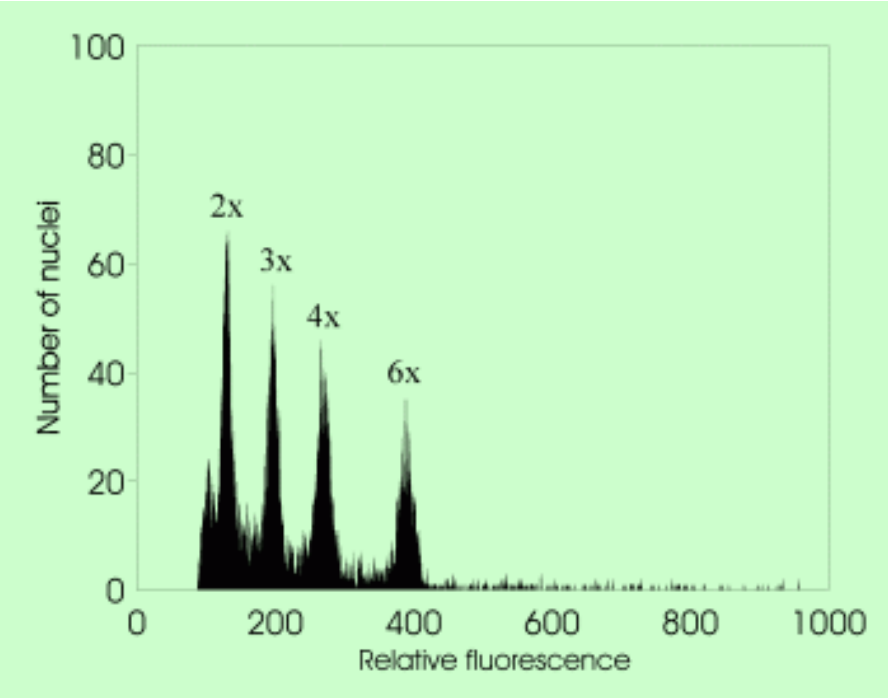
Ploidie položek v genové bance banánovníku

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



Aplikace v biosystematice

- Identifikace vzácných cytotypů



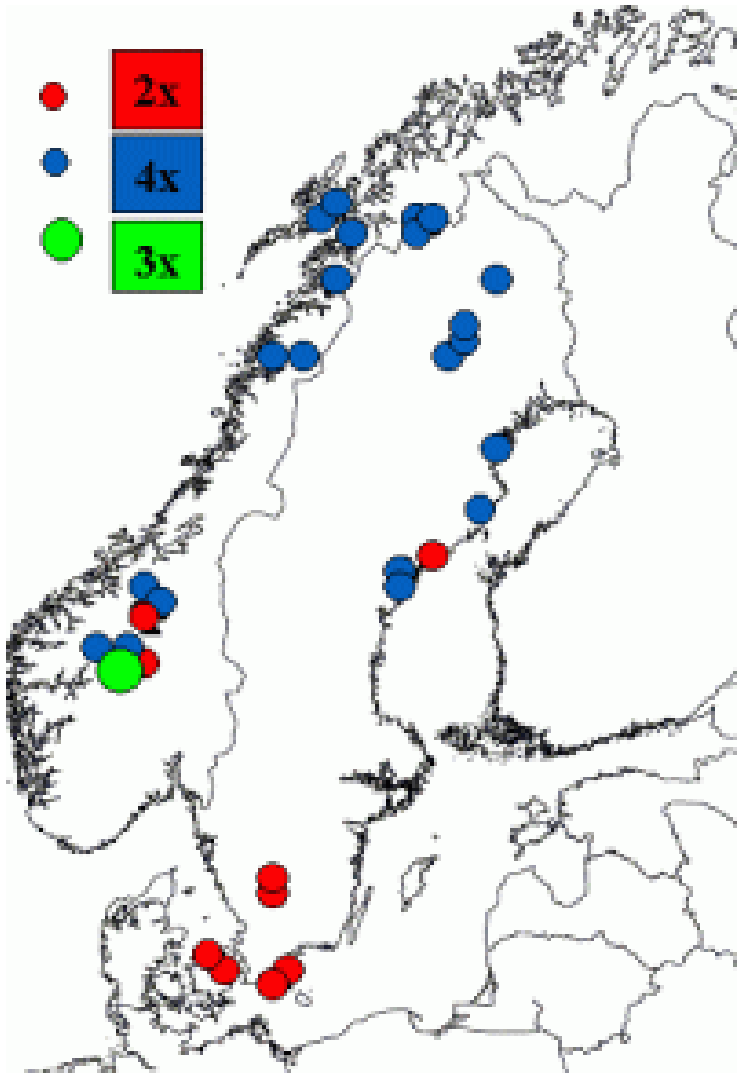
Různé cytotypy *Lythrum salicaria* identifikované pomocí průtokové cytometrie (vzorky měřeny simultánně)

Kyprej vrbice
(Lythrum salicaria)

http://www.ibot.cas.cz/fcm/suda/

Aplikace v biosystematice

- Prostorová distribuce cytotypů

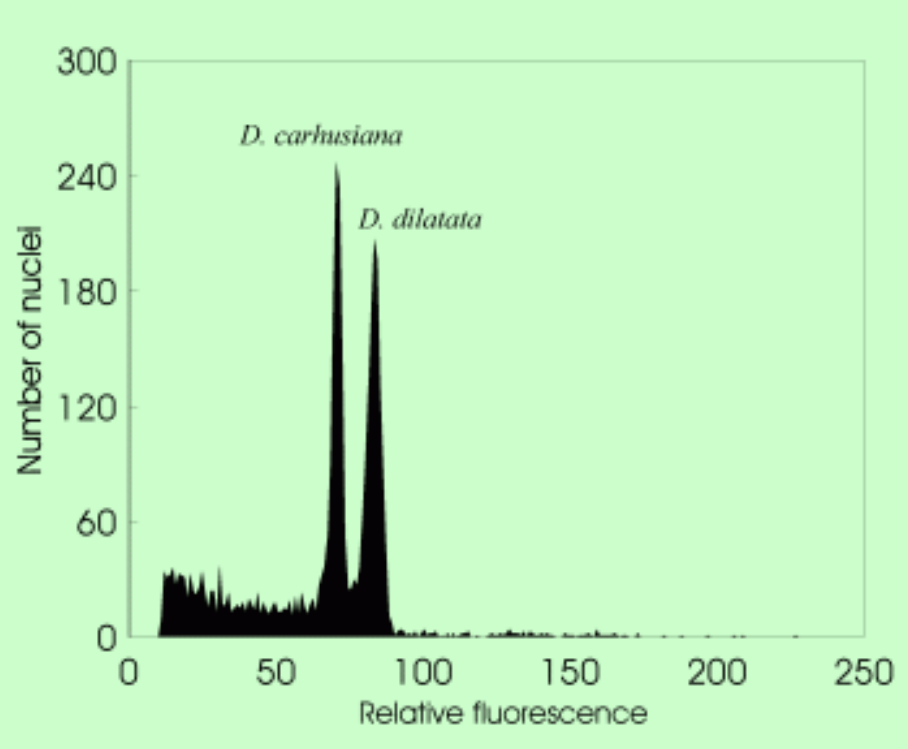


Distribuce *cytotypů* *Empetrum* (šicha) ve Skandinávii

http://www.ibot.cas.cz/fcm/suda/

Aplikace v biosystematice

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

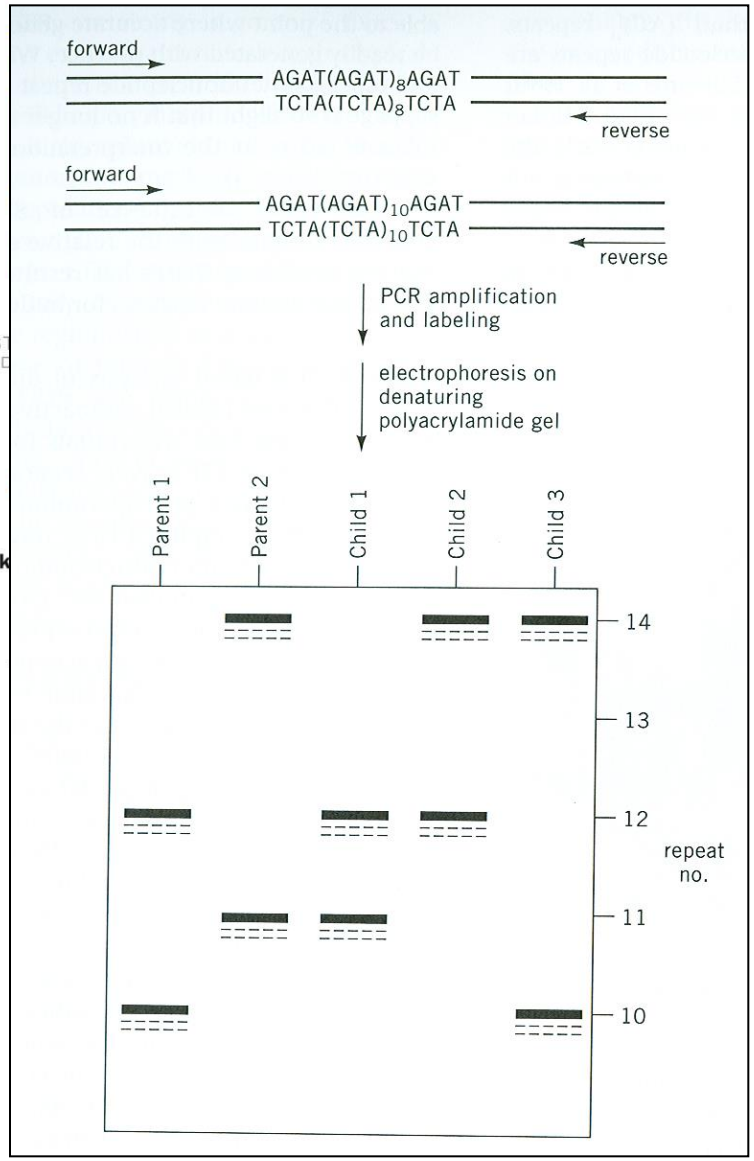


Diskriminace mezi druhy se stejným počtem chromozómů avšak odlišnou velikostí genomu u *Dryopteris*

Kapraď rozložená (Dryopteris dilatata)

http://www.ibot.cas.cz/fcm/suda/

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:
a) Elektroforéza – agaróza (více než 3%)
- PAGE – denaturující
- nedenaturující

b) 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)

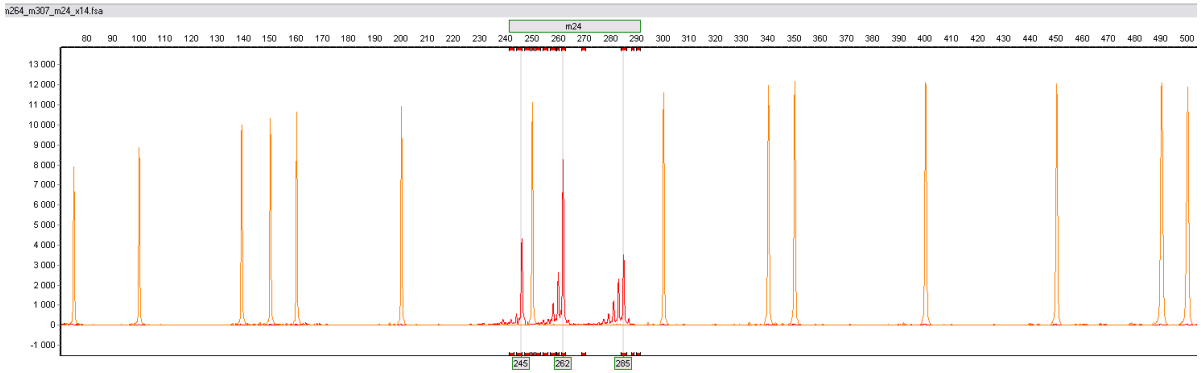
Fluorophore	Marker	Motif	Primers nucleotide sequence		Annealing temperature	Reference	GenBank accession
			FWD (5'-3')	REV (5'-3')			
6-FAM	mMaCIR01	(GA)20	TTAAAGGTGGGTTAGCATTAGG	TTTGATGTCACAATGGTGTTCC	55°C	Lagoda et al. 1998	X87262
6-FAM	mMaCIR03	(GA)10	TGACCCACGAGAAAAGAAGC	CTCCTCCATAGCCTGACTGC	55°C	Lagoda et al. 1998	X87263
NED	mMaCIR07	(GA)13	AACAACTAGGATGGTAATGTGTGGAA	GATCTGAGGATGGTTCTGTTGGAGTG	53°C	Lagoda et al. 1998	X87258
VIC	mMaCIR08	(TC)6N24(TC)7	ACTTATTCCCCCGCACTCAA	ACTCTCGCCCATCTTCATCC	55°C	Lagoda et al. 1998	X87264
PET	mMaCIR13	(GA)16N76(GA)8	TCCCAACCCCTGCAACCACT	ATGACCTGTCGAACATCCTTT	53°C	Lagoda et al. 1998	X90745
PET	mMaCIR24	(TC)7	ATCTTTTCTTATCCTTCTAACG	ATTAGATCACCGAAGAACTC	48°C	Lagoda et al. 1998	Z85972
VIC	mMaCIR39	(CA)5GATA(GA)5	AACACCGTACAGGGAGTCAC	GATACATAAGGCAGTCACATTG	52°C	Lagoda et al. 1998	Z85970
6-FAM	mMaCIR40	(GA)13	GGCAGCAACAACATACTACGAC	CATCTTCACCCCCATTCTTTTA	54°C	Lagoda et al. 1998	Z85977
6-FAM	mMaCIR45	(TA)4CA(CTCGA)4	TGCTGCCTTCATCGCTACTA	ACCGCACCTCCACCTCCTG	57°C	Lagoda et al. 1998	Z85968
VIC	mMaCIR150	(CA)10	ATGCTGTCATTGCCTTGT	GAATGCTGATACCTCTTTGG	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	AAGACAAGTTCCATTGCTTG	GTTCGGGCTTTCGGT	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	GCAAATAGTCAAGGGAATCA	ACCCAGGTCTATCAGGTCA	55°C	Hippolyte et al. 2010	AM950497
PET	mMaCIR260	(TG)8	GATGTTTGGGCTGTTTCTT	AAGCAGGTCAGATTGTTCC	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	AGACTTGTATCGCTTGGTAAA	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)

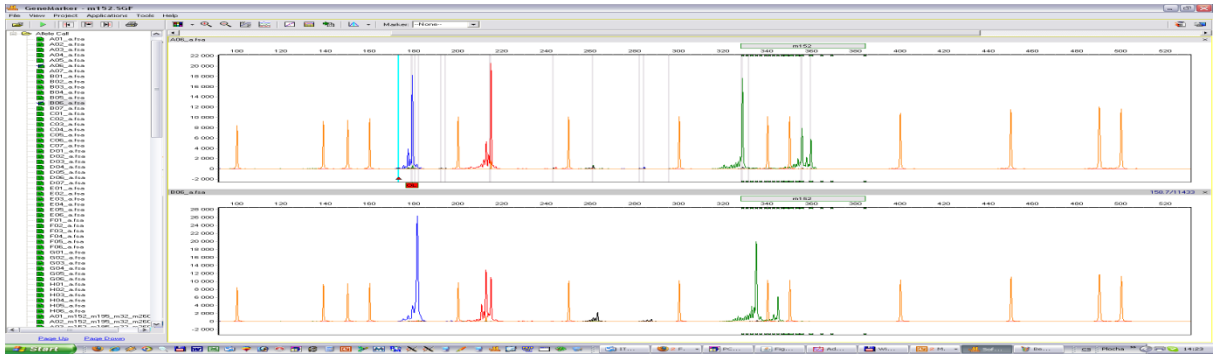
3730*xl* DNA analyzer

Přesná identifikace velikosti alel s vysokým rozlišením



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

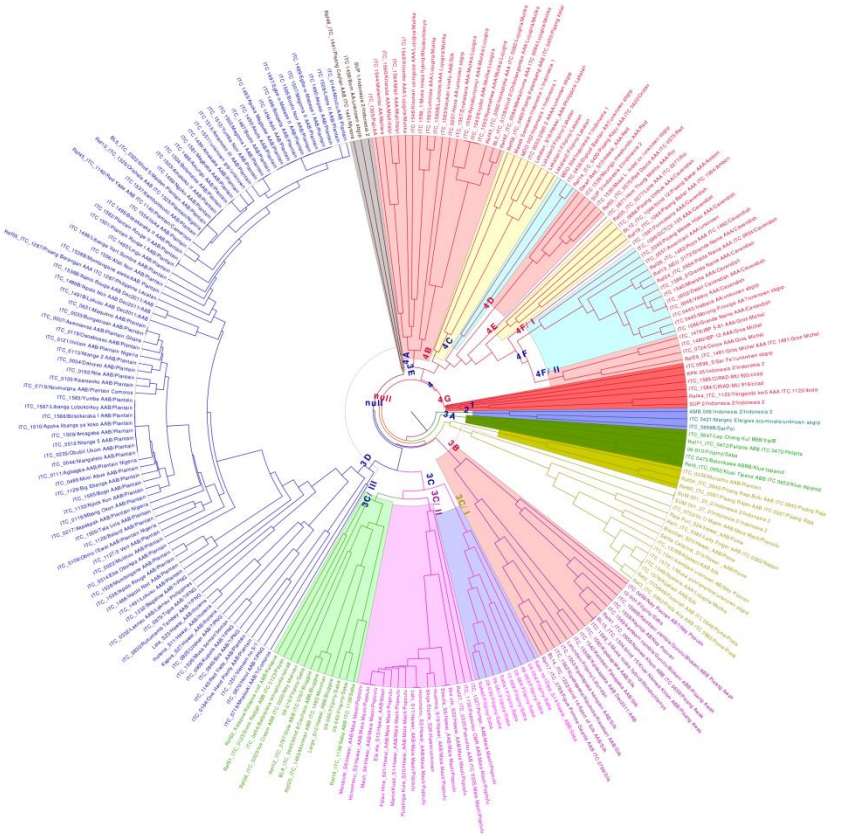
High-throughput, multiplexing



Multiplexing SSR profilů genotypu Mbwazirume (AAA) pro SSR markery
mMaCIR152 (zelený)
mMaCIR195 (modrý)
Ma1_32 (černý)
mMaCIR260 (červený)

Aplikace při analýze položek banánovníku

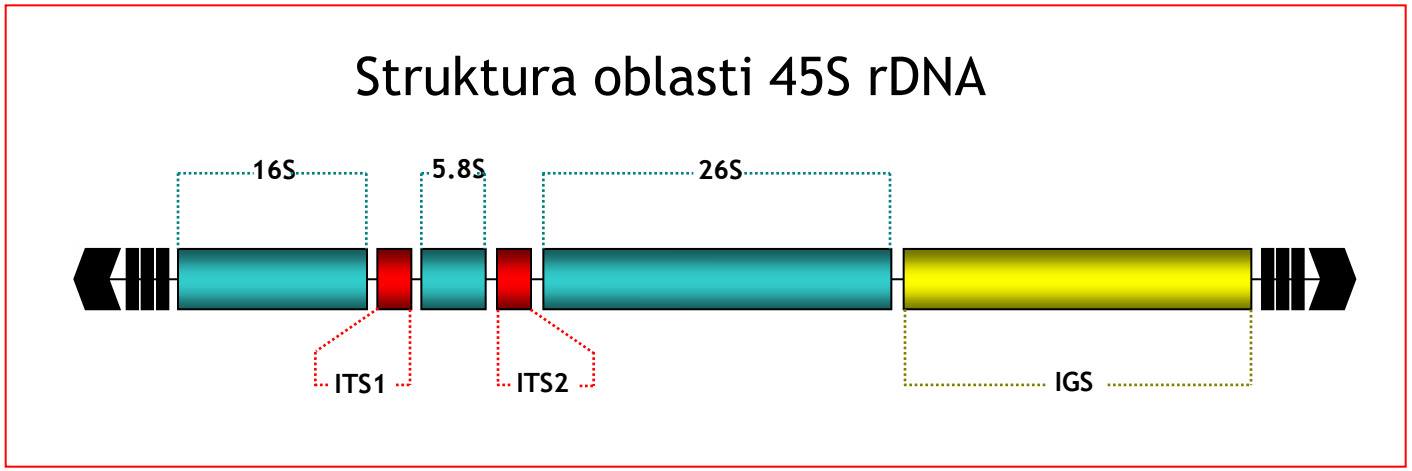
Kladogram DIPLOIDNÍCH položek



Kladogram TRIPLOIDNÍCH položek

Analýza diverzity sekvenováním specifických lokusů

➢ ITS



Postup:

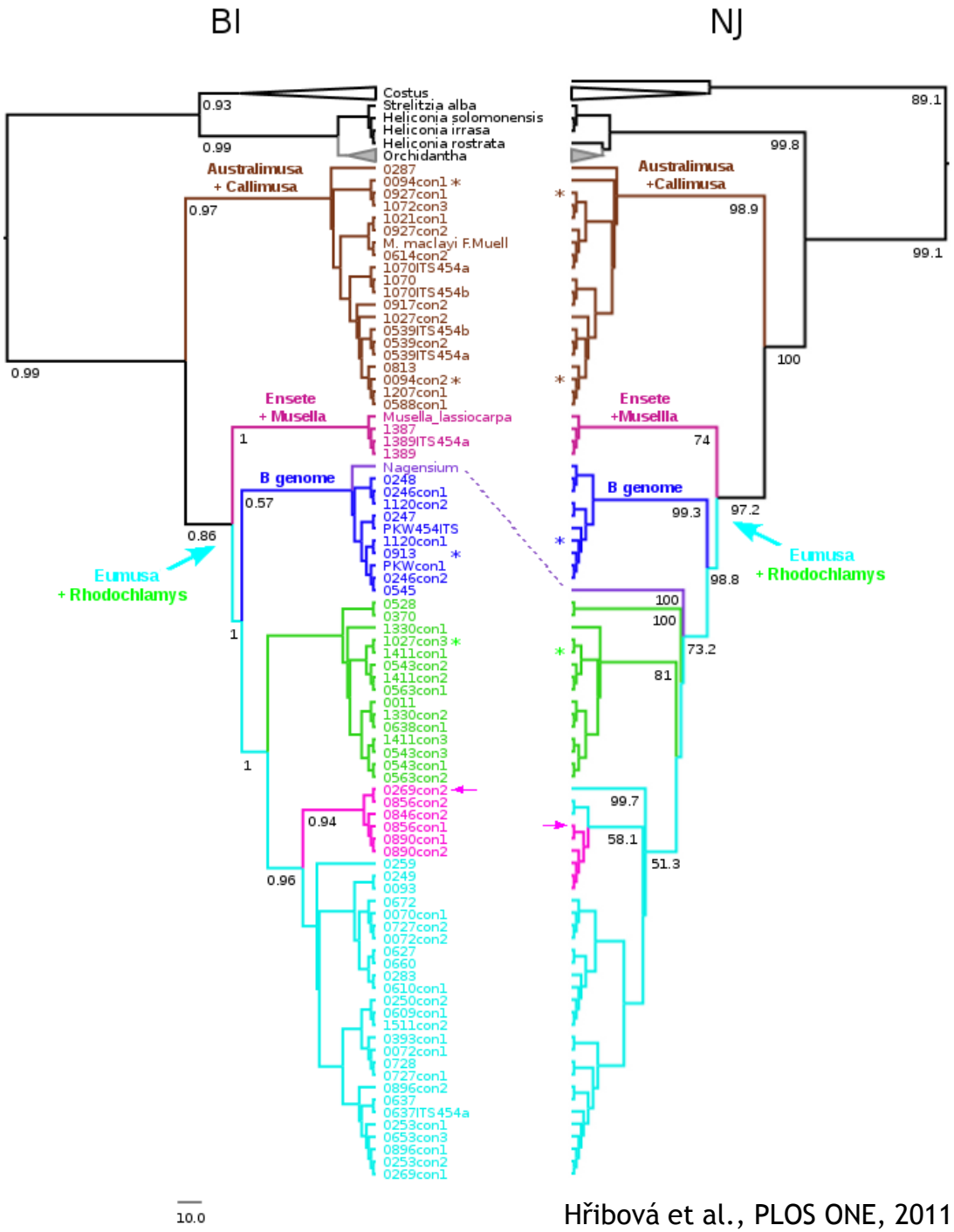
- Izolace genomické DNA → PCR amplifikace oblasti ITS (inter-transcribed spacer) z primerů komplementárních k rDNA (konzervované sekvence) → sekvenování
- Analýza sekvenčních dat (ClustalW, BioEdit) → konstrukce fylogenetických stromů na základě sekvence ITS1 a ITS2

Hřibová et al., PLOS ONE, 2011

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



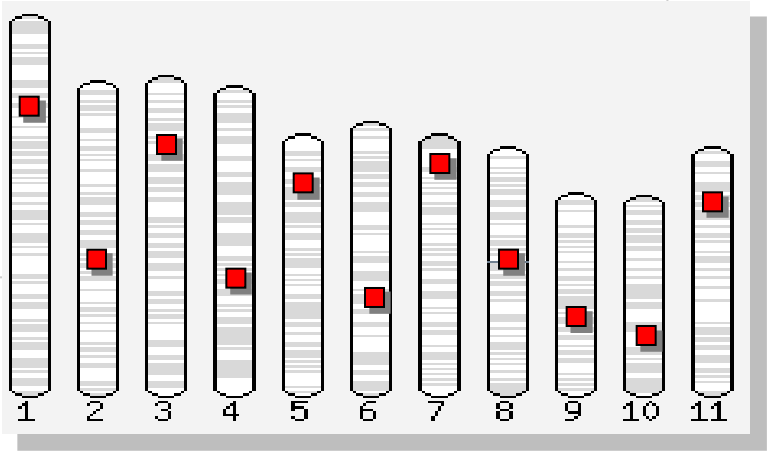
Hřibová et al., PLOS ONE, 2011

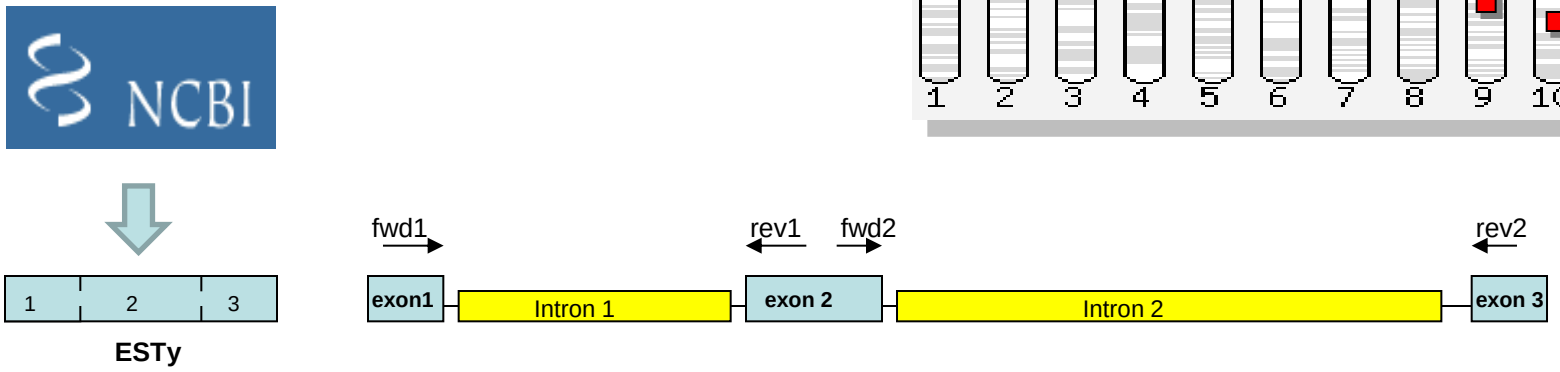
Analýza diverzity sekvenováním specifických lokusů

➢ geny

Primery pro PCR odvozeny z exonů (EST)

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





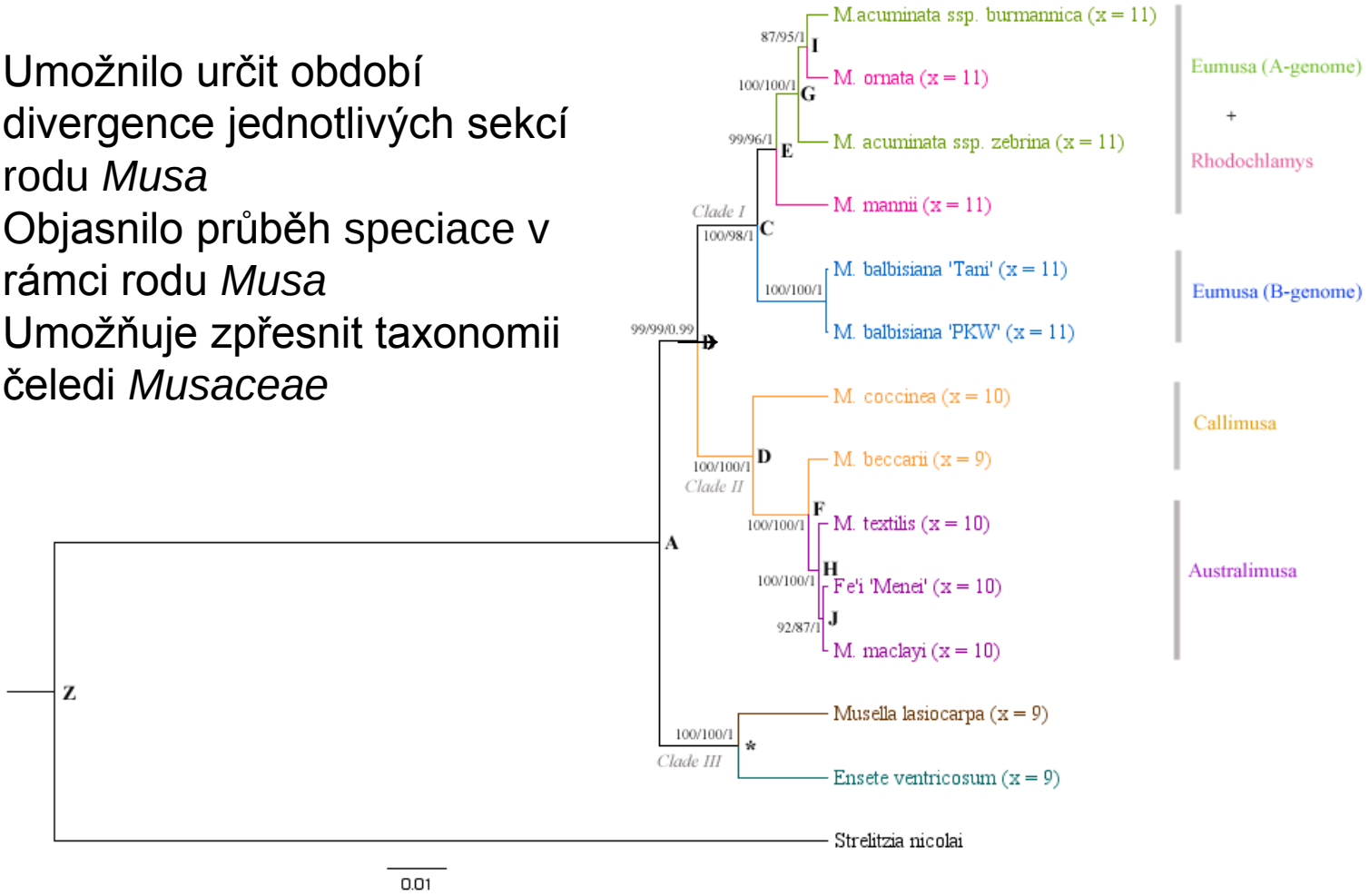
Templátem pro PCR – genomická DNA
- v produktu amplifikace přítomné **introny** – vyšší pravděpodobnost výskytu mutace

Christelová et al., BMC Evolutionary Biology, 2011

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*



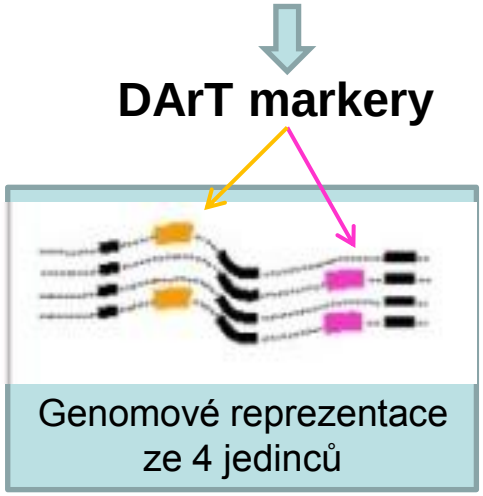
Christelová et al., BMC Evolutionary Biology, 2011

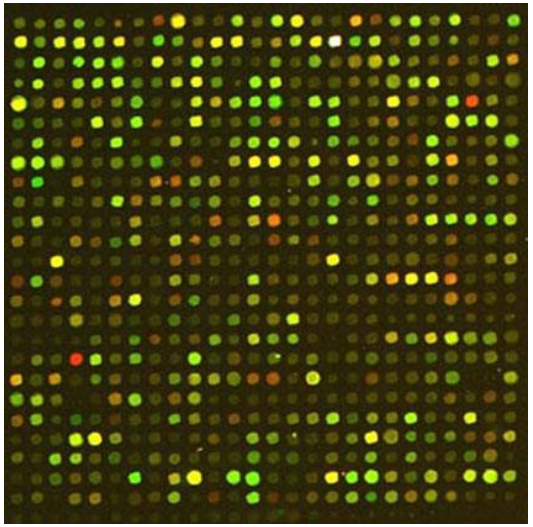
Analýza za pomoci mikročipů DNA

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

DArT

Jak DArT detekuje polymorfismus DNA

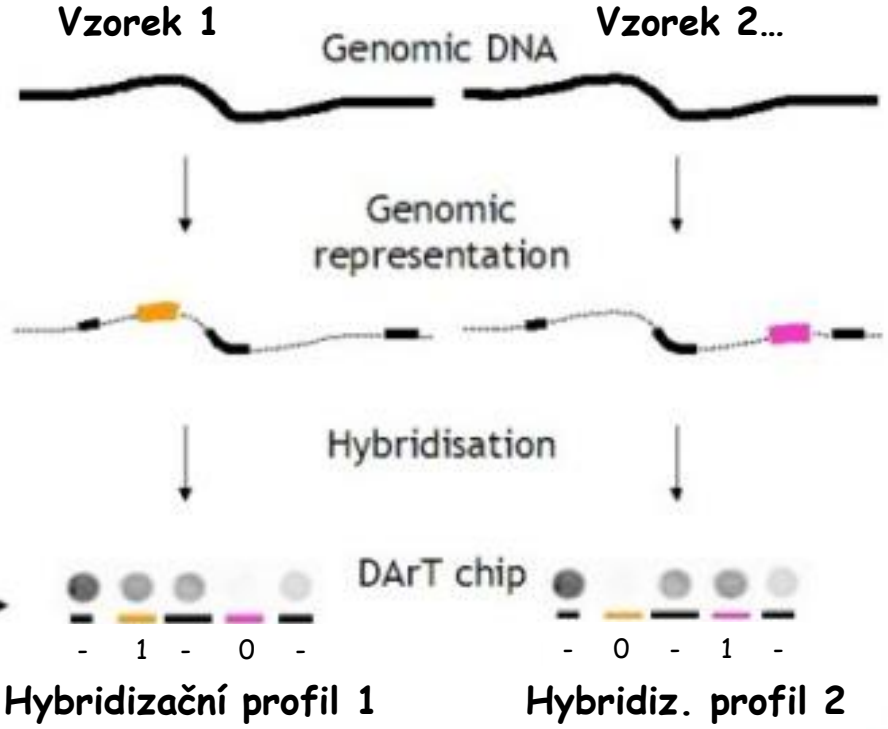
A) Vývoj arraye

Směs vzorků (odrůdy,linie)

Směs genom. reprezentací

Fragmenty se zaklonují a vytvoří se array

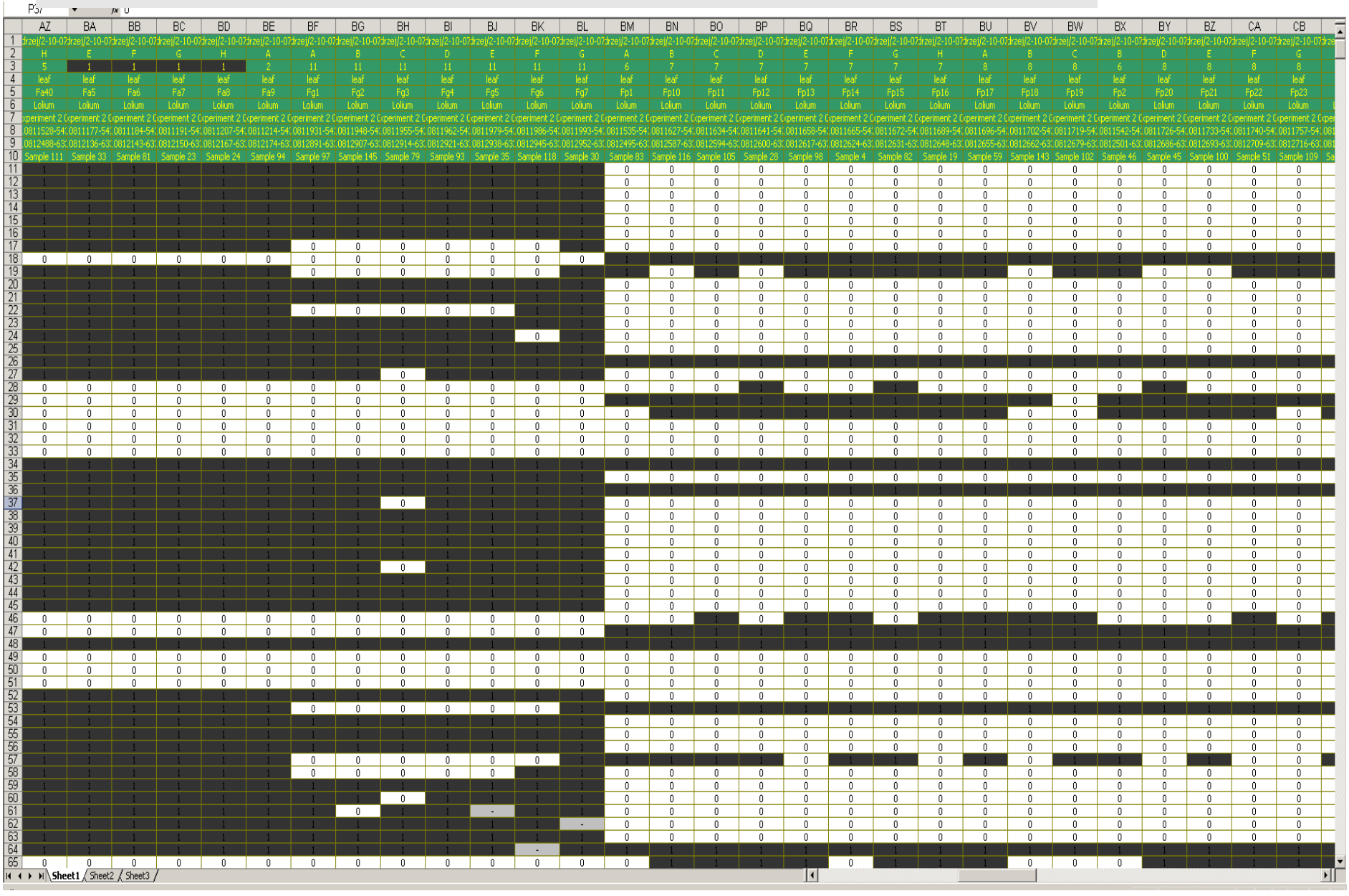
B) Analýza genotypů



Hybridizační profil 1

Hybridiz. profil 2

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



evropský sociální fond v ČR

EVROPSKÁ UNIE

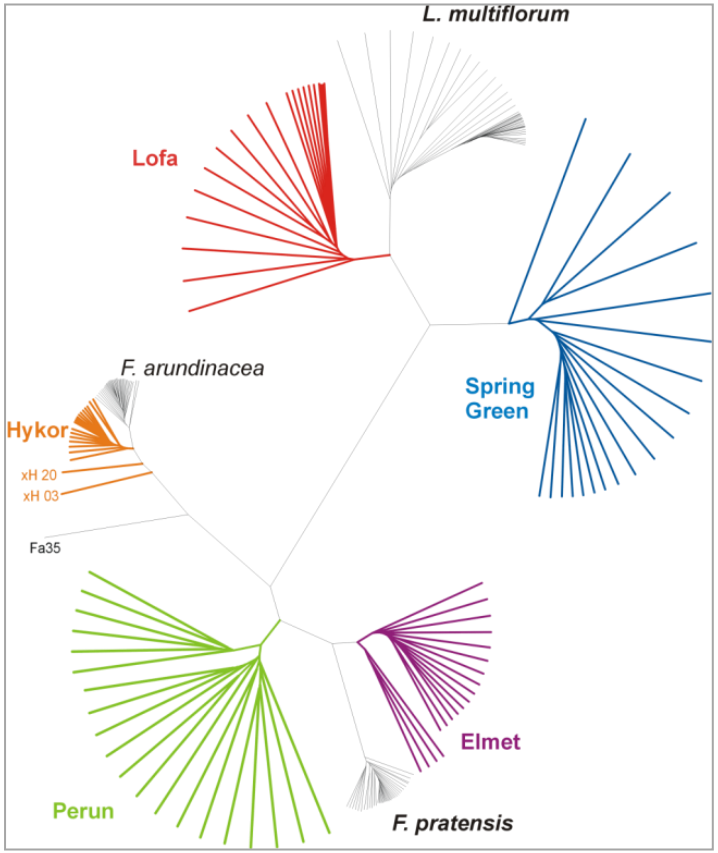
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

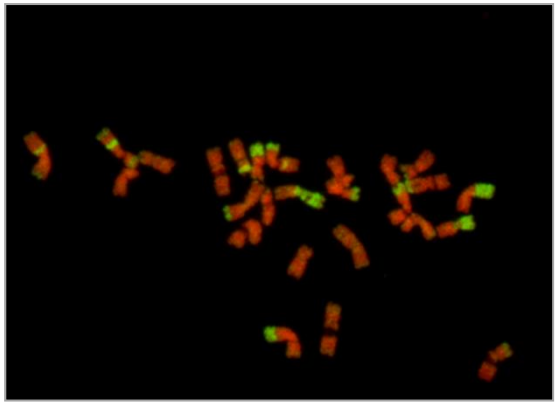
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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 **tisícovkách 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 komplexity):

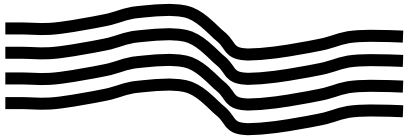
- selekce DNA fragmentů získaných štěpením restrikčními endonukleázami: **DArTseq** a obdobné technologie GBS
- ***exome capture*** - vychytání frakce genomu obohacené o exony pomocí čipů nebo mikrokuliček
- **RNAseq** - sekvenování transkriptomu (cDNA)

DArTseq

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

Příprava DArT databáze

Směs vzorků daného druhu



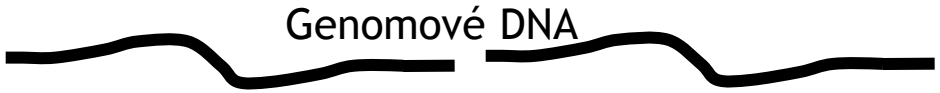
Genomové reprezentace

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

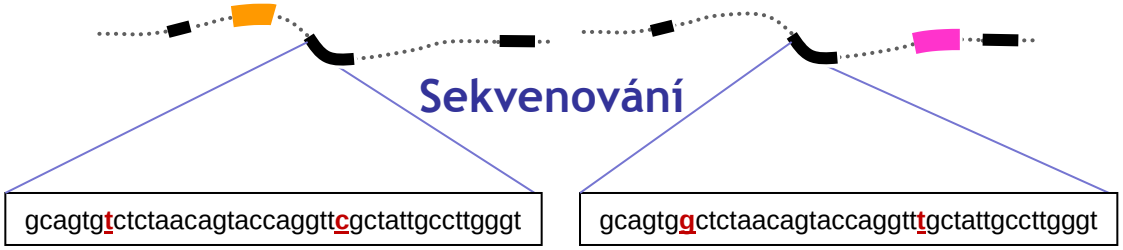
DArT databáze
daného druhu
(referenční genom)

Nalezení polymorfismů a genotyping

Vzorek 1 Vzorek 2 …



Genomové reprezentace



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*

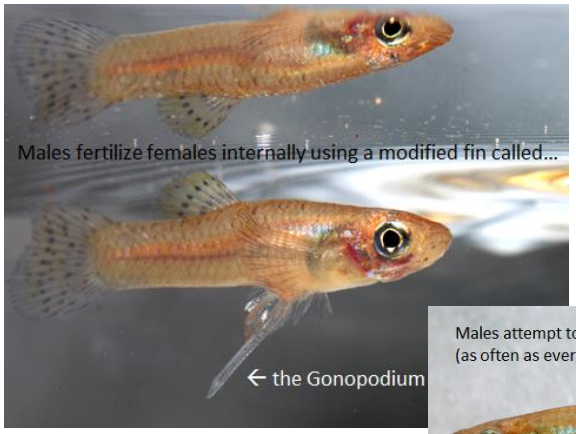
- Sekvenována 1001 linie huseníčku rolního
  - modelová rostlina, malý genom (110 Mb)

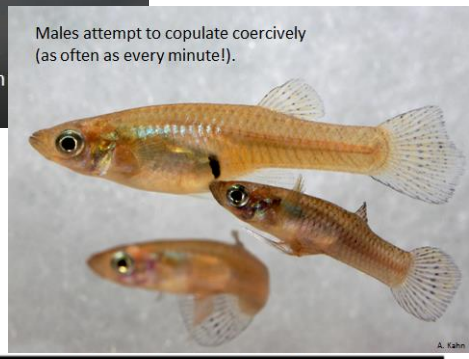
  Porovnáním nalezeny změny
  - v sekvenci i počtech repetitivních sekvencí
  - v regulačních sekvencích (některé geny se nepřepisují)
  - v sekvenci genů – některé vyřazeny z funkce:
    - geny pro adaptaci k podmínkám prostředí (zasolení půdy), rezistenci k patogenům, geny ovlivňující kvetení → praktické 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