

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

Reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/28.0032



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Využitie prietokovej cytometrie vo fylogeografii

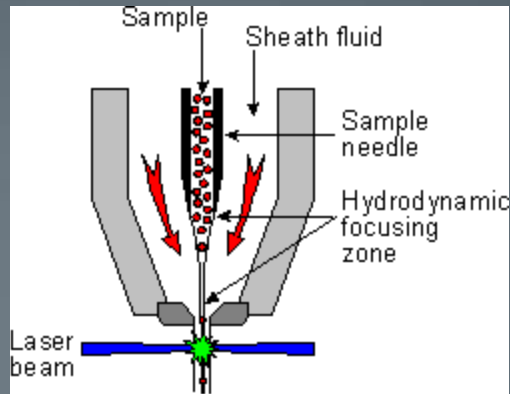
Ľuboš Majeský
Katedra botaniky PrF UP



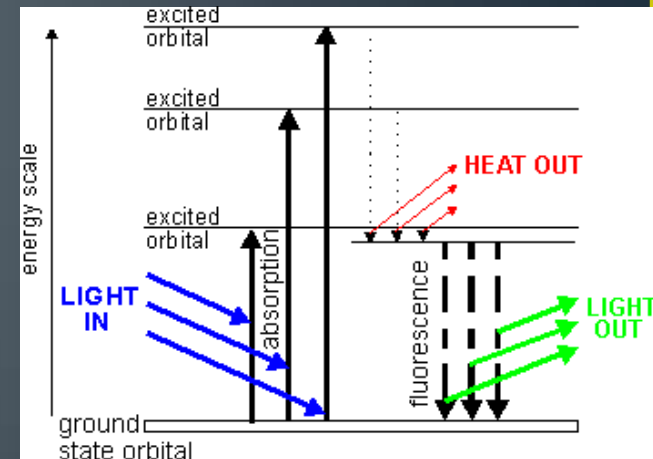
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Flow Cytometry – princípy

- Meranie a analýza optických vlastností častíc (buniek, jadier, chromozómov) jednotlivo prúdiacich v úzkom stĺpci nosnej kvapaliny



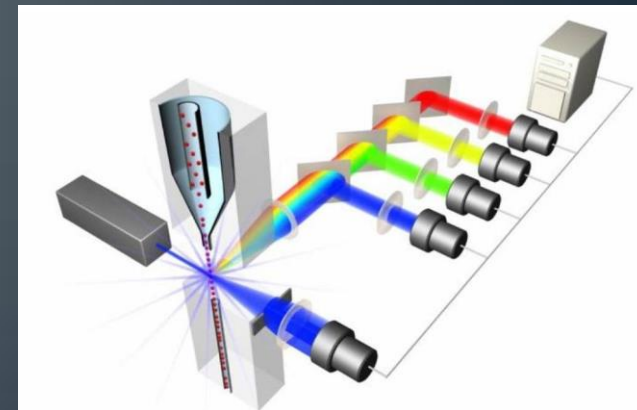
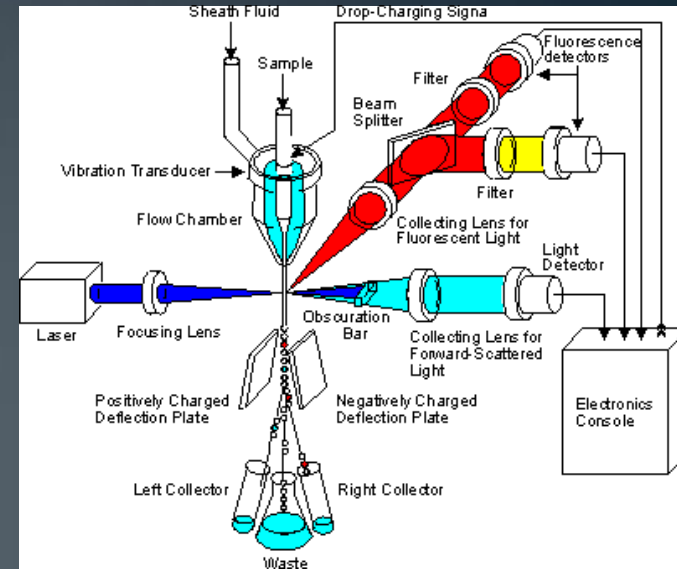
- Ak ofarbíme nejakú časticu (napr. DNA) špecifickým farbivom a následne ju ožiarime svetlom s vhodnou vlnovou dĺžkou dôjde k excitácii fluorochromu a v konečnom dôsledku k vyžiareniu svetelnej energie s inou vlnovou dĺžkou než spôsobila excitáciu. Tento svetelný signál je zachytený pomocou detektorov a následne spracovaný



- Základné súčasti cytometru sú: prietoková komôrka, zdroj excitačného žiarenia (laser, HBO lampa), optická sústava, fotonásobiče, zosilovače a PC

Flow Cytometry - princípy

- Prietoková komôrka:
 - Na to, aby častice pri prechode cez detektor prúdili samostatne sa využíva tzv. **hydrodynamické zaostrovanie**. K tomuto dochádza vo vnútri prietokovej komôrky, v ktorej dôjde k zoradeniu jednotlivých častíc. Častice sa začnú pohybovať v úzkom stredovom zväzku jedna za druhou. Priemer otvoru, cez ktorý prúdia častice je od 50 – 100 mikrometrov, rýchlosť prúdenia častíc je 1-10m/s – častice potom prechádzajú lúčom laseru rýchlosťou 100 – 1000 častíc/s.
- Zdroj excitačného svetla:
 - Laser: má vysoký výkon a vyžaruje monochromatické svetlo
 - HBO (vysokotlaková ortuťová výbojka)
- Fluorochromy:
 - propídium jodid (PI), ethídium bromid (EtBr) – neselektívne
 - DAPI, DIPI, Hoechst – selektívne, väzba na A-T bohaté miesta
 - Antibiotika: mitramicyn, chromomicyn, olivomicyn – väzba na C-G bázy
- Fluorescencia častice po prechode laserom je zachytená optickou sústavou – pomocou fotonásobičov je premieňaná na elektrické impulzy ktoré sú spracovávané a digitalizované na výstupnom PC zariadení.
- Typický digitalizovaný výstup analýzy je **histogram**
 - Zobrazujúci relatívnu intenzitu fluorescence jednotlivých meraných častíc



Flow Cytometry - využitie

- Analýza rastlinných protoplastov
 - Veľkosť protoplastov, obsah chlorofylu a alkaloidov, obsah DNA a RNA, expresia membránových antigénov, ...
- Analýza izolovaných jadier
 - Obsah DNA, obsah báz DNA, DNA syntéza, chromatinová štruktúra, ...
- Analýza izolovaných chromozómov
 - Veľkosť chromozómov, AT:GC pomer, delenie chromozómov podľa veľkosti, ...

Flow Cytometry – analýza jadrovej DNA

- Je nutné získať suspenziu neporušených jadier
 - Relatívne rýchly a jednoduchý proces » množstvo protokolov
 - Závisí to od rastlinného druhu a obsahu sekundárnych metabolitov

Meranie ploidity

- Používa sa štandard so známym počtom chromozómov » ploidia analyzovaných vzoriek sa vzťahuje k štandardu (pomer píkov v G₁ fáze)

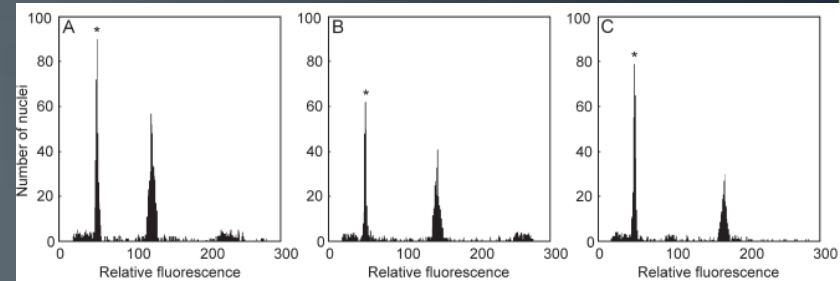


Fig. 1. – Fluorescence histograms of individual DNA ploidy levels of *Allium oleraceum*. Nuclei were simultaneously isolated from fresh leaf tissue of *Allium oleraceum* and an internal reference standard, *Triticum aestivum* 'Saxana', stained with DAPI and analyzed on a flow cytometer. A: tetraploid plant (population no. 7), B: pentaploid plant (population no. 16), C: hexaploid plant (population no. 9). The reference peak is marked with an asterisk.

Šafářová & Duchoslav, 2010; Preslia

Meranie absolútneho obsahu DNA v pg

- Porovnávanie štandardu so známym, presne stanoveným obsahom DNA, s meranou rastlinou (porovnávanie G₁ pík)

$$2C \text{ DNA (pg)} = \frac{\text{pozícia } G_1 \text{ píku vzorky} * \text{obsah } 2C \text{ DNA štandardu (pg)}}{\text{pozícia } G_1 \text{ píku štandard}}$$

- Obsah DNA v pg sa dá vyjadriť v počte básových párov

$$1 \text{ pg} = 965 \text{ Mbp (Dolezel et al. 2003)}$$

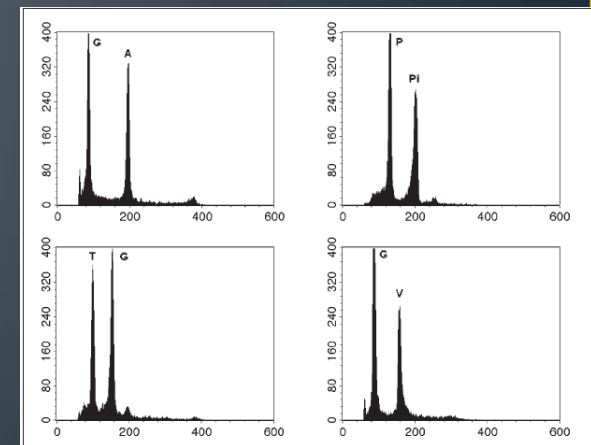


Fig. 2 — Flow cytometric histograms of relative fluorescence intensity (propidium iodide) obtained after simultaneous analysis of nuclei of reference standard (G = *Glycine max* 'Polanka', 2C = 2.37 pg DNA or PI = *Pisum sativum* 'Citrad', 2C = 8.76 pg DNA) and *Onosma* samples studied, A = *O. arenaria*, P = *O. pseudoarenaria*, T = *O. torrensis*, V = *O. visianii*.

Mártonfi et al., 2008; Caryologia

Flow Cytometry – použitie v praxi

- Meranie relatívneho množstva DNA » ploidiie slúži na rýchle spoznanie cytotypu taxónov
 - Umožňuje odlíšiť druhy v taxonomicky náročných skupinách
 - Umožňuje detegovať polyploidné skupiny taxónov (*Symphytum tuberosum*, *Pilosella officinarum*, *Allium oleraceum*, ...)
 - Umožňuje odhaliť medzidruhové hybridy
 - Umožňuje určiť spôsob rozmnožovania
- Meranie absolútneho množstva DNA » obsah DNA v pg alebo vyjadrený v počte Mbp
 - Umožňuje študovať fylogenetické príbuznosti
 - Umožňuje študovať vzťahy medzi ekologickými a fenologickými charakteristikami
 - Umožňuje rozlíšiť hybridy so zhodnou ploidiou ako rodičia

Genome size correlates with growth form, habitat and phylogeny in the Andean genus *Lasiocephalus* (Asteraceae)

Velikost genomu andského rodu *Lasiocephalus* (Asteraceae) souvisí s životní formou, ekologií a fylogenezí

Eva Dušková¹, Filip Kolář^{1,2}, Petr Sklenář¹, Jana Rauchová^{2,1}, Magdalena Kubešová^{1,2}, Tomáš Fér¹, Jan Suda^{1,2} & Karol Marhold^{3,1}

- Rod *Lasiocephalus* obsahuje ca 30 vysokohorských druhů rozšířených od Venezuely do Bolívie
 - Dve základné rastové formy
 - Drevnatejúce liány – rastúce v horských lesoch až po hornú hranicu lesa
 - Byliny a polokry vysokohorských polôh *páramo*
- Ciel' práce:
 - Zohrala duplikácia genómu úlohu v diverzifikácii rodu a aké cytotypy sú prítomné v rode, existujú cytotypovo zmiešané populácie?
 - Aká je variabilita vo veľkosti genómu
 - Koreluje veľkosť genómu a stupeň ploidie s rastovou formou a ekologickou preferenciou?
 - Koreluje veľkosť genómu a stupeň ploidie s fylogenezou rodu?



- **Metódy:**

- Rastlinný materiál:

- 189 jedincov
 - 101 populácií
 - 20 druhov
- 3 jedince príbuzného *Culcitium nivale*

- FCM

- Stanovenie ploidie
- Stanovenie veľkosti genómu

- Karyológia

- Sekvenovanie ITS regiónu (ITS1-5.8S rDNA-ITS2)
- Fylogenetické a štatistické analýzy

- **Výsledky:**

- Veľká variabilita v obsahu jadrovej DNA » 1.64 násobné rozpätie
- Odhalené dva cytotypy: diploidy ($2n=2x=40$) a triploidy (3 druhy)
- Priemerné 2C-hodnoty obsahu DNA boli v rozpätí 13.28 pg – 17.27 pg
- *Culcitium nivale* má menší genóm než druhy v rode *Lasiocephalus*
- Pozorované medzirodové hybridy medzi L x C » najnižšie 2C-hodnoty spomedzi všetkých druhov *Lasiocephalus*

- Pozorovaná veľká variabilita vo veľkosti genómu korelovala s rastovou formou a ekologickými podmienkami

- Veľkosť genómu analyzovaných druhov rástla so znižujúcou sa nadmorskou výškou, v ktorej dané druhy rastú
- Veľkosť genómu vzhľadom k rastovej forme má podobný priebeh:

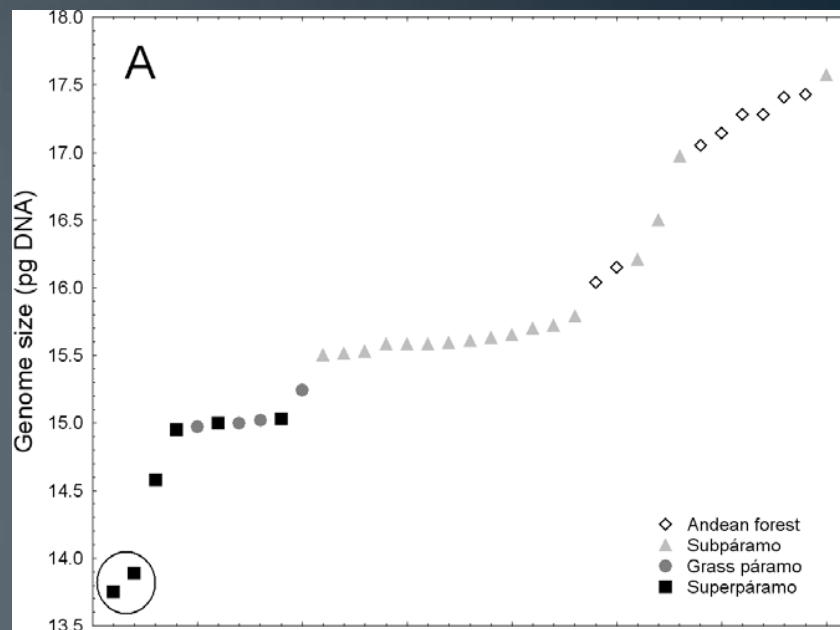
úzkolisté byliny < širokolisté byliny < liany < kry

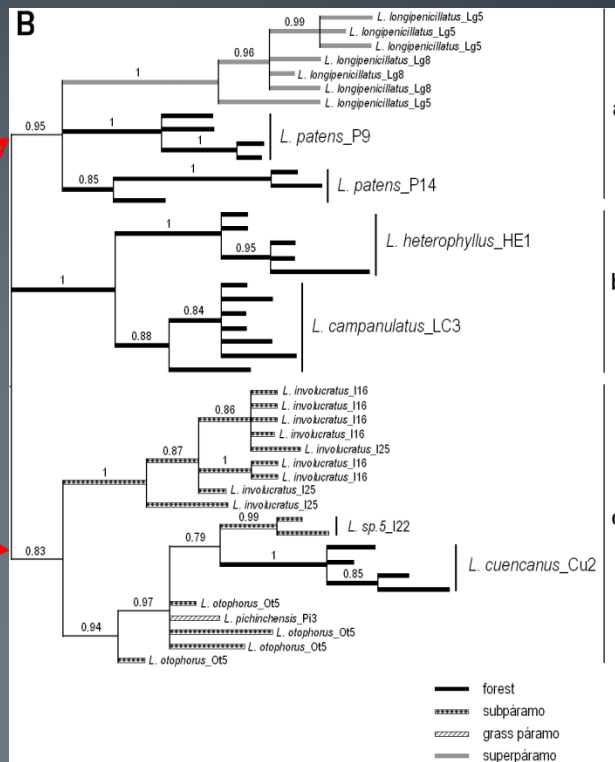
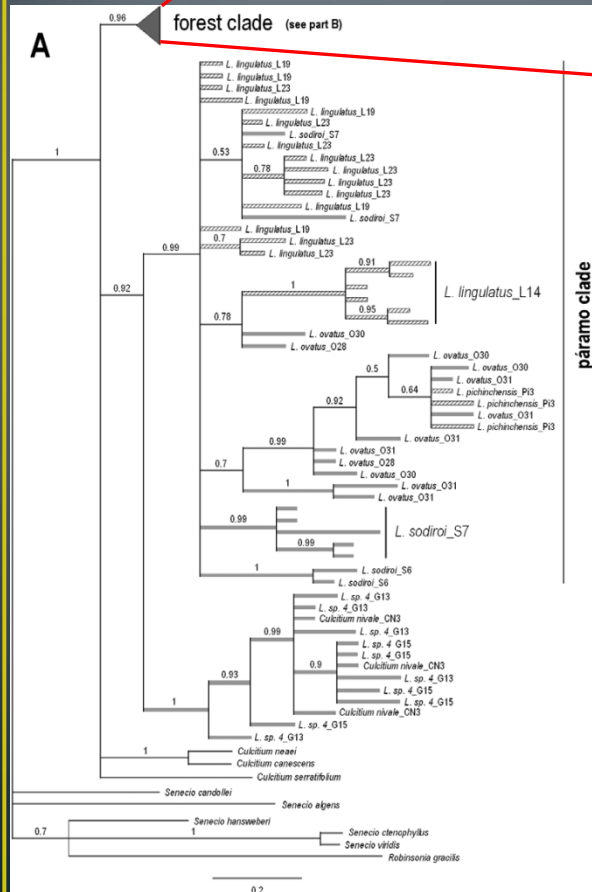
- ITS fylogenéza odhalila v rode dve základné línie s vysokou podporou

- Línia lesných druhov – „forest clade“
 - Forest + superpáramo taxa - a
 - Entirely forest taxa - b
 - Forest + subpáramo taxa - c
- Línia vysokohorských druhov – „páramo clade“

- „Forest“ a „Páramo“ línie sa výrazne líšili v ploidii a obsahu DNA

- 3x boli prítomné len v „páramo“ línii, zatiaľ čo „forest“ línia bola cytotypovo uniformná
 - 3x sú vývojovo mladé a ide o autopolyploidy
- 2x druhy z „páramo“ línie mali nižší obsah DNA než 2x druhy z „forest“ línie





- Variabilita vo veľkosti genómu medzi 2x druhmi je pravdepodobne výsledok znásobenia/delécie negénovej repetitívnej DNA
- FCM dáta potvrdili prítomnosť interspecifických hybridov medzi „páramo“ druhmi a *C. nivale*, ITS dáta však nie (*C. nivale* ITS ribotyp)
 - Bias kvôli malému počtu sekvenovaných kolónii
 - „concerted evolution“ spôsobila homogenizáciu ITS kópii na typ prítomný v *C. nivale*
- Environmentálne podmienky zohrávajú významnú úlohu vo variabilite veľkosti genómu na nižších fylogenetických úrovniach
- Kľúčovým faktorom ovplyvňujúcim veľkosť genómu na vyšších úrovniach sú fylogenetické vzťahy medzi druhmi

Phylogeography of two closely related species of *Nolana* from the coastal Atacama Desert of Chile: post-glacial population expansions in response to climate fluctuations

Paulina G. Ossa^{1,2*}, Fernanda Pérez^{1,2} and Juan J. Armesto^{1,2}

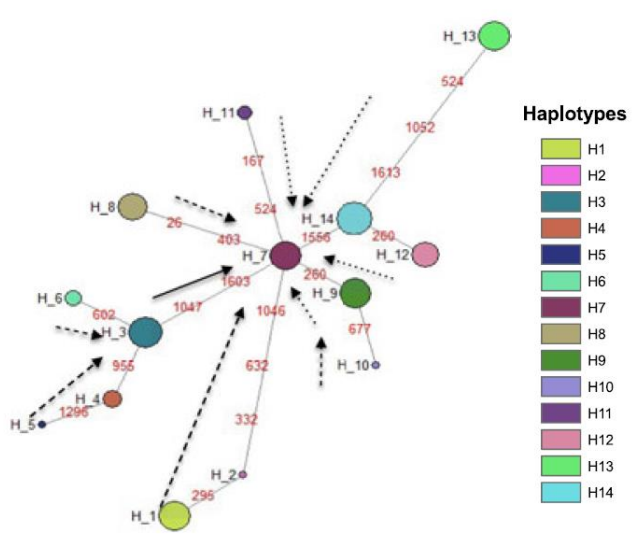


http://www.sacha.org/famil/nolana/n_incan.htm



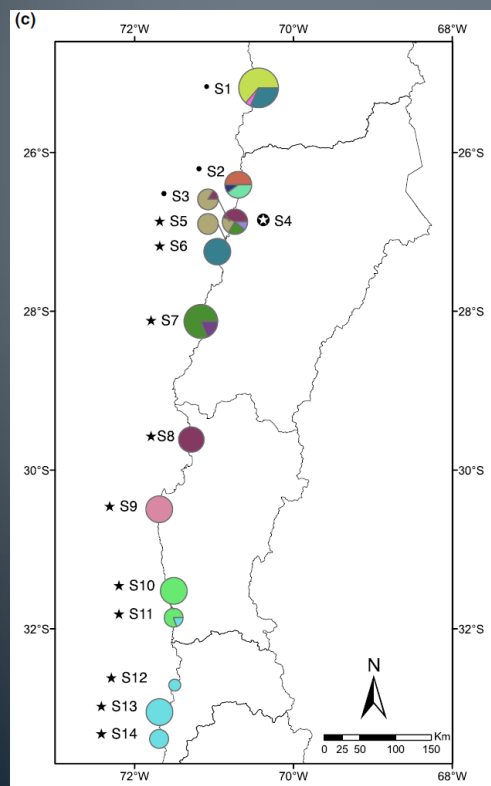
<http://www.chileflora.com/Florachilena/FloraEnglish/HighResPages/EH0418.htm>

- **Ciel':**
 - Zistiť dopad Kvartérnych klimatických cyklov na flóru púšte Atacama skúmaním fylogeografického paternu dvoch púštnych krov z čeľade *Solanaceae*.
- **Materiál:**
 - Príbuzné druhy *Nolana crassulifolia*, *N. incana*
 - zber medzi 25° a 33°S – 1000 km v 200 m transekte pozdĺž pobrežia
 - 14 lokalít: 3 NI; 10 NC; 1 sympatrická
 - celkovo bolo použitých 130 rastlín
- **Metódy:**
 - Sekvenovanie dvoch cpDNA úsekov
 - *rpl32-trnL* intergenic spacer
 - *rpl16* intron
 - Fylogenetické a štatistické analýzy



Výsledky:

- Identifikovaných 14 rôznych haplotypov
- 4 haplotypy (H3, H7-H9) zdieľané medzi oboma druhmi
- 3 haplotypy boli veľmi vzácne $f < 1\%$
- 6 haplotypov sa vyskytovalo viac než v 2 populáciách $f = 10-14\%$
- Najrozšírenejšie boli haplotypy H14, H7 a H3
- H14 prítomný v 4 populáciách, charakteristický pre juh (semi-arid region)
- H7 prítomný v 3 a H3 v dvoch populáciách, prítomný v severnom (hyper-arid) a centrálnom regióne (mostly-arid)
- Haplotypová sieť s centrálne umietneným H7 » pravdepodobne ide o ancestrálny haplotyp
- „star contraction algorithm“ odhalil niekoľko demografických expanzných udalostí
- $N_{ST} = 0.81$ » populácie sú výrazne odlišné a existuje medzi nimi fylogeografická štruktúra
- IBD podporuje izoláciu populácii s rastúcou geograf. vzdialenosťou



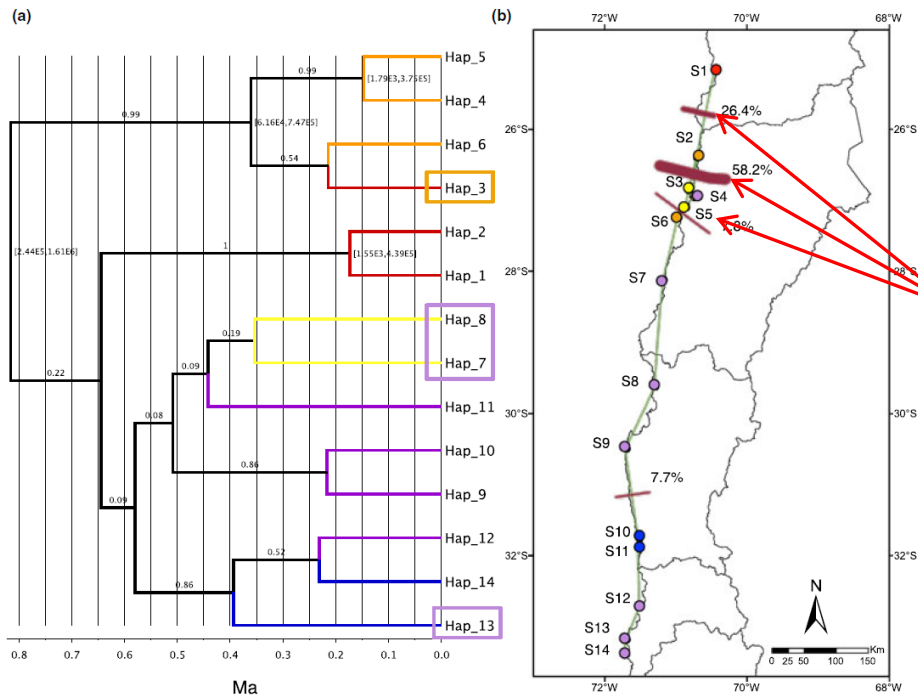


Figure 2 Geographical relationships among haplotypes of *Nolana* in Chile. (a) Bayesian chronogram of haplotypes; axis scale represents million years ago (Ma); numbers above branches represent posterior probabilities; only 95% intervals of nodes with posterior probabilities > 0.9 are shown; branch colours correspond to those shown in panel (b) and represent the SAMOVA groups in which these haplotypes were found; highlighted haplotypes are those shared between populations that belong to different groups. (b) Barriers obtained with Monmonier's algorithm and SAMOVA groups are shown on the map; the thickness of each barrier is proportional to the number of times it was included in one of the 10,000 computed barriers from bootstrap matrices and expressed as percentages; SAMOVA groups are represented by the colours red (Group 1), orange (Group 2), yellow (Group 3), purple (Group 4) and blue (Group 5).

- „Bayesian divergence time estimation“
 - Fylogram haplotypov kongruentný s fylo skupinami
 - Čas divergenencie jednotlivých liníí haplotypov bol odhadnutý medzi 700 tis až 150tis rokmi » Stredný pleistocén
- Genetická diverzita bola najvyššia na S
- S narastajúcou zemepisnou šírkou dochádzalo k redukcii vnútro populačnej genetickej diverzity

- Prítomnosť 5 fylogeografických skupín
 - Nepredstavujú jasne oddelené geografické celky
 - $G1=S1$; $G2=S2+S6$; $G3=S3+S5$;
 $G4=S4+S7+S8+S9+S12+S13+S14$; $S5=S10+S11$
 - V S časti boli prítomné 3 výrazné genetické bariéry
- „Genetic landscape analysis“ odhalilo zmenšovanie rozdielov medzi populáciami zo S na J
 - 2 zóny výraznej redukcie

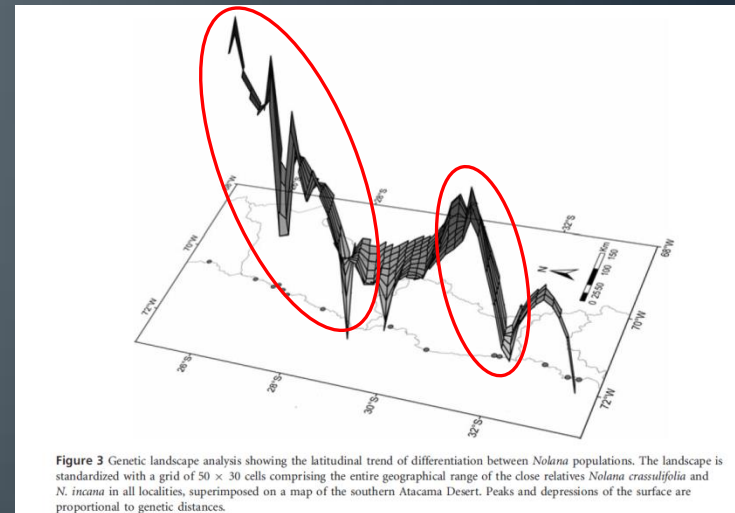


Figure 3 Genetic landscape analysis showing the latitudinal trend of differentiation between *Nolana* populations. The landscape is standardized with a grid of 50×30 cells comprising the entire geographical range of the close relatives *Nolana crassifolia* and *N. incana* in all localities, superimposed on a map of the southern Atacama Desert. Peaks and depressions of the surface are proportional to genetic distances.

zhrnutie

- cpDNA neodlíšila dva druhy a spoločné haplotypy podporujú hypotézu o recentnej divergencii týchto dvoch druhov
- Súčasné rozšírenie je pravdepodobne výsledkom niekoľkých kontrakcií/expanzií
 - Výsledky podporujú hypotézu o tom, že v čase Pleistocénneho zaľadnenia a počas vlhkejších období Holocénu druhy prežili v severných lokalitách
 - Po opätovnom vysušení vhodných stanovišť dochádzalo k postupnému šíreniu druhov smerom na juh » po zhoršení podmienok sa druhy sťahovali späť na sever, prípadne prežívali v plošne malých refugiálnych územiach » to spôsobilo pokles genetickej diverzity
- Populácie fixované pre jeden typ cp haplotypu predstavujú nedávno kolonizované územia
- Nízka genetická diverzita týchto populácií poukazuje na efekt „zakladateľ“
- Terajšie rozšírenie a štruktúra populácií sú výsledkom klimatických zmien posledného zaľadnenia a Holocénu

THINX