

# „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

# Využití chloroplastové DNA vo fylogeografii

Ľuboš Majeský

Katedra botaniky PŘ UP



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

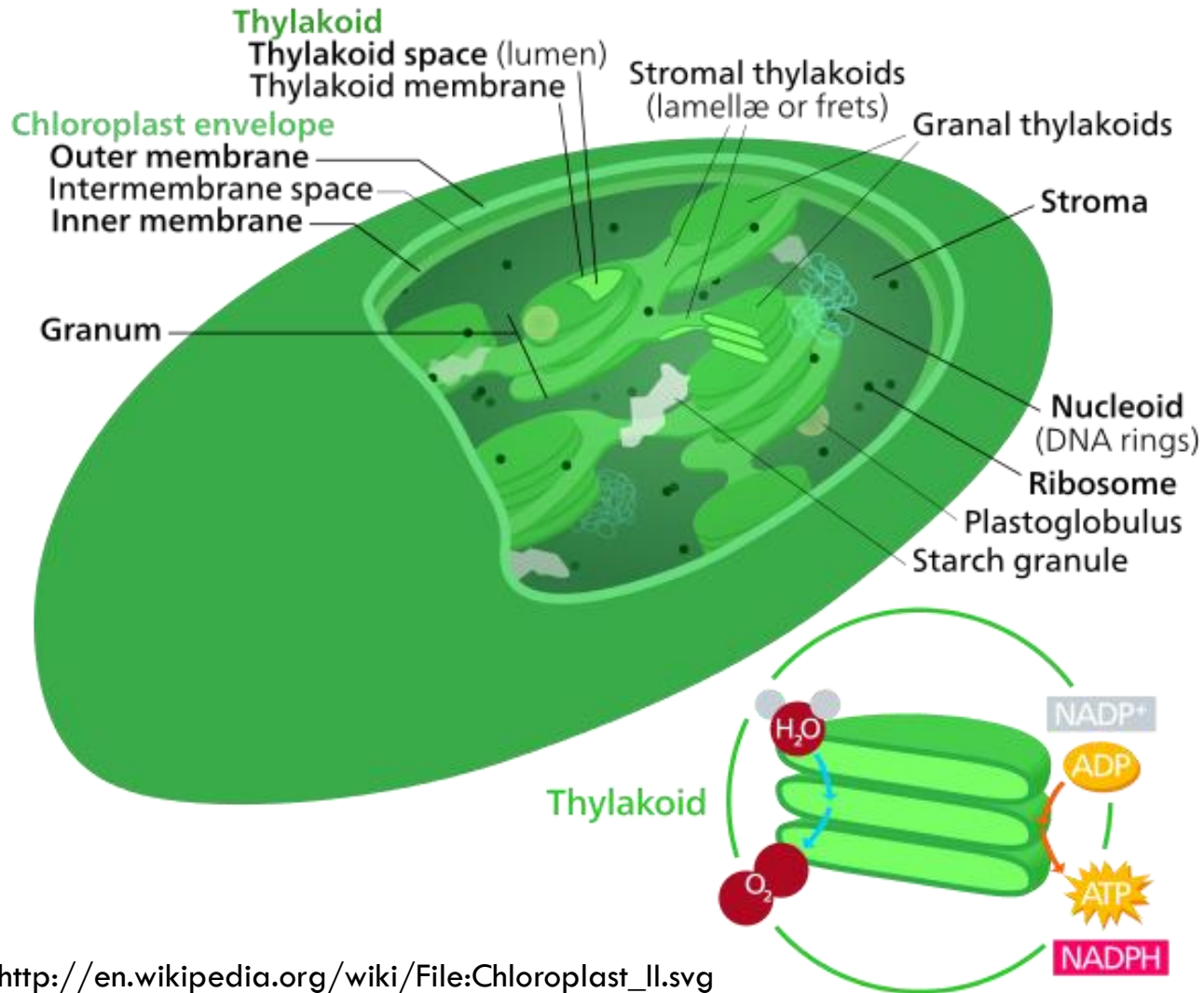
# Chloroplast

- Špecializovaná bunková organela prítomná v bunkách rias a rastlín
- Jedna z hlavných funkcií chloroplastov je prevod energie slnečného žiarenia do energie v chemickej väzbe (ATP a NADPH) za uvoľňovania  $O_2$  z  $H_2O$
- Energia z ATP a NADPH sa následne využíva v Calvinovom cykle kde dochádza k zabudovávaniu  $CO_2$  do organických molekúl

# Chloroplast

- Chloroplasty obsahujú vlastnú DNA a ribozómy – **ctDNA/cpDNA**
- Označuje sa ako **plastóm** = súbor všetkých chloroplastových génov nachádzajúcich sa v organizme
- Chloroplast predstavujú pozostatok cyanobaktérie, ktorá bola v evolučnej histórii pohltená eukaryotickou bunkou » » » z cyanobaktérie sa stal endosymbiont
- Ich prítomnosť v mnohých nepříbuzných líniach poukazuje na niekoľko nezávislých endosymbiotických udalostí

# the chloroplast



[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Chloroplast\\_II.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Chloroplast_II.svg)

# cpDNA - všobecne

- Plastóm má jednoduchú a stabilnú štruktúru
- Je **haploidný** » » v organizme sa nachádza len jeden typ
- Nepodlieha rekombinácii (iba veľmi ojedinele)
- Dedičnosť cpDNA je **uniparentálna!!!**
  - Kryošenné rastliny – **matrilinéálna**
  - Nahosemenné rastliny – **patrilinéárna**
  - V oboch prípadoch existujú výnimky!
- cpDNA je rovnaká v celom organizme
- Mnoho cpDNA génov sú *single-copy genes*

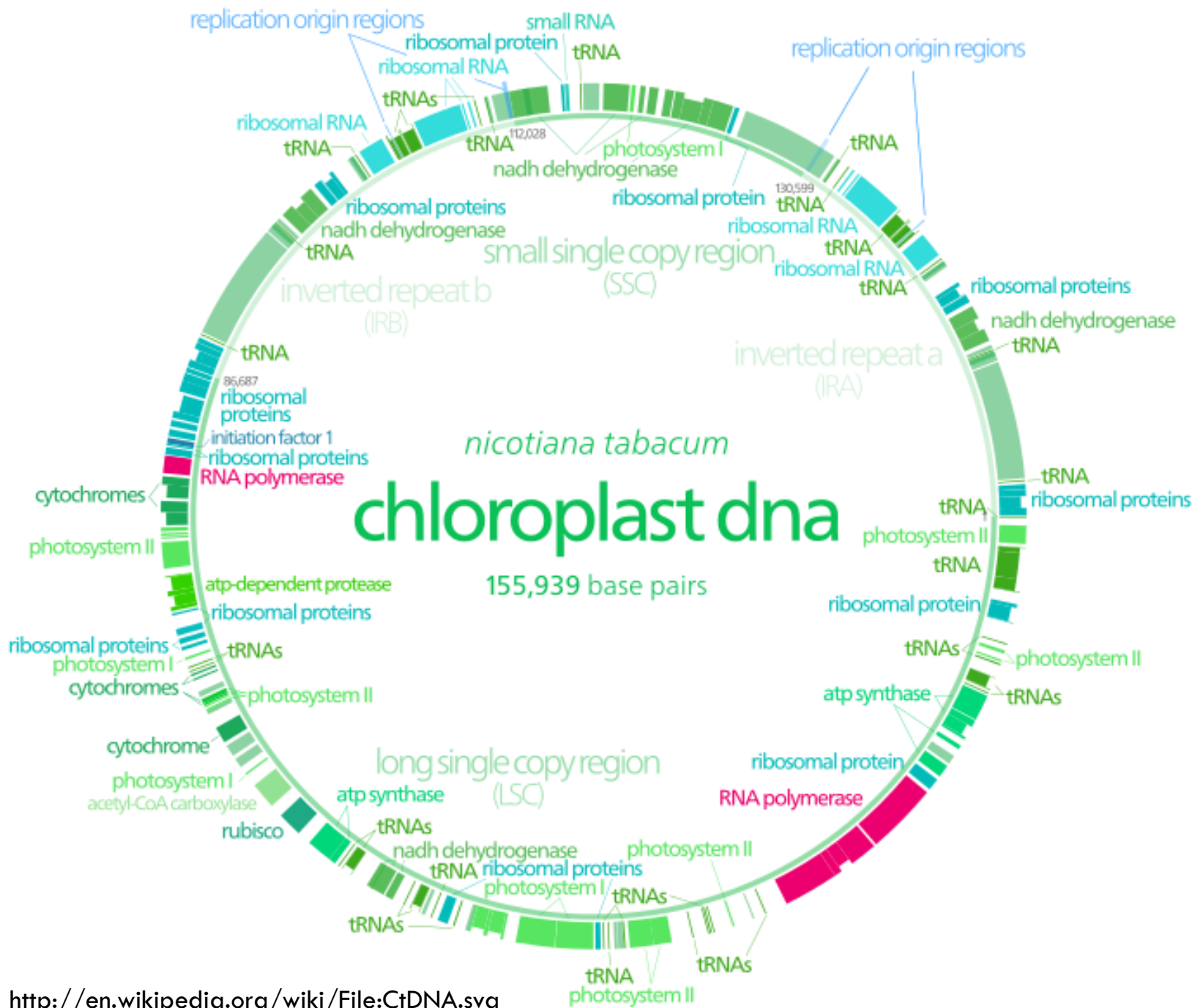
# cpDNA - štruktúra

- cpDNA má veľkosť medzi 120tis-170tis bp
- Obsahuje:
  - **Dlhú jedinečnú kópiu** (LSC=Long single copy region)
  - **Krátku jedinečnú kópiu** (SSC=Small single copy region)
  - **Dva Obrátené repetitívne úseky** (Inverted repeats copy A and copy B= IRA/IRB), odeľujú LSC a SSC
- Gény prítomné v LSC/SSC sú prítomné len v jednej kópii » sú „**single copy genes**“
- IRA a IRB sú podobné a obsahujú rovnaké sekvencie no v obrátenom poradí komplementárnych báz
  - Obsahujú gény pre rRNA chloroplastov, NADH, tRNA
- IR **sú** značne **konzervatívne**
- Plastóm obsahuje približne 100 génov:
  - 4 rRNAs
  - 30-31 tRNAs
  - 4 podjednotky RNA polymerázy
  - Proteíny a podjednotky enzýmov fotosyntézy
  - 28 proteínov tylakoidov

# cpDNA - štruktúra

- Inak povedané plastóm obsahuje:
  - Gény kódujúce proteíny
  - Nekódujúce úseky:
    - Intróny
    - Medzigénové medzerníky (IGS=InterGenic Spacers)
- Mutačná rýchlosť je vyššia v LSC a SSC než v IR
- Vývoj cpDNA génov je veľmi konzervatívny
  - » týka sa to veľkosti cpDNA a výskytu veľkých mutácií → inzercií a delécií
  - » poradie génov a ich sekvencie v rámci cpDNA je konzervatívne
- Nevýhoda pri použití ako molekulárneho markeru na vnútrodruhovej alebo populačnej úrovni
- + Možnosť vytvoriť univerzálne primery na amplifikáciu miest medzi konzervatívnymi úsekmi – „noncoding regions“

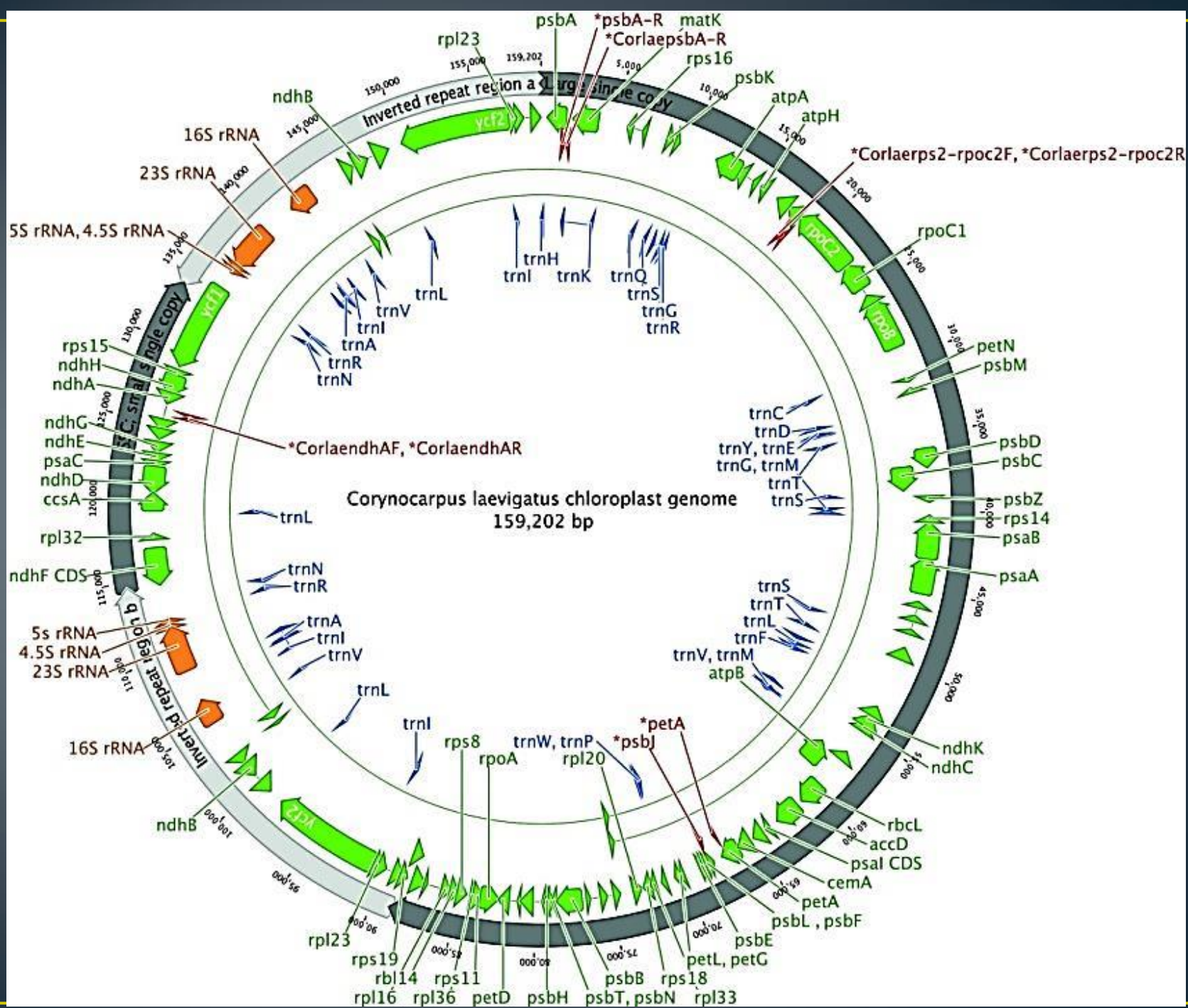




- **Výhody použitia cpDNA:**
  - cpDNA nepodlieha génovým duplikáciam a ich deléciám
  - v cpDNA nedochádza ku vzniku *pseudogénov*
  - cpDNA nepodlieha „*concerted evolution*“
  - cpDNA je relatívne krátka » dá sa ľahšie študovať
  - cpDNA je početná » nie je problém s jej izoláciou
- **Informatívna hodnota jednotlivých úsekov je rozdielna medzi jednotlivými vývojovými vetvami rastlín**
  - Rozdiely na úrovni čel'adí, rodov, druhov, ...
  - Výber úseku je často subjektívna záležitosť
- **cpDNA umožňuje štúdium:**
  - fylogenetických vzťahov medzi rastlinami
  - šírenia rastlín (kolonizácia, migrácia)
  - introgresie, hybridizácie
  - vnútrodruhej-rodovej štruktúre
- **Pri fylogenetických štúdiách je vhodné použiť okrem cpDNA markrov aj jadrové markre » porovnať informácie**

# Najčastejšie využívané gény

- *atpB* =  $\beta$ -podjednotka ATP-syntázy
- *matK* = maturáza K
- *ndhA* = podjednotka NADH-oxidoreduktázy
- *ndhF* = podjednotka NADPH-oxidoreduktázy
- *psaI* = podjednotka fotosystému I
- *rbcL* = ribulózo-1,5-bisfosfát-karboxyláza
- *rpoC1* = RNA-polymeráza
- *rp16*, *rps4*, *16* = proteíny 30S/50S-ribosomálnej podjednotky
- *trnT* = tRNA-Treonín
- *trnL* = tRNA-Leucín
- *trnF* = tRNA-Fenylalanín
- *trnR* = tRNA-Arginín

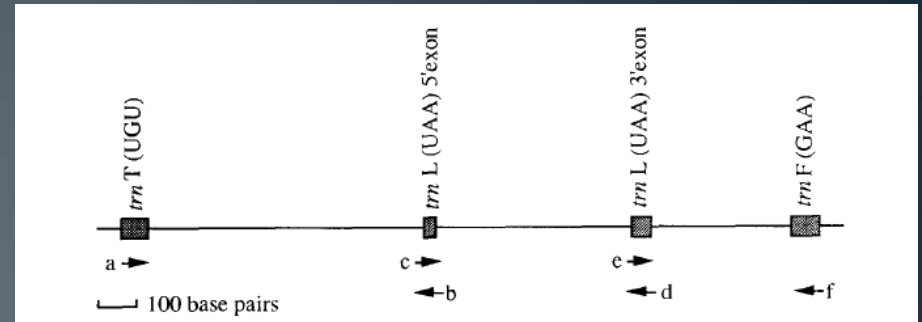


# Najčastejšie využívané gény

- *rbcL* (LSC)
  - Gén pre enzým ribulózo-1,5-bisfosát-karboxylázu/oxygenázu (RuBisCO)
  - Jeden z prvých sekvenovaných génov
  - Prvá fylogenetická štúdia semených rastlín založená na molekulárnom markry, 499 taxónov (Chase et al. 1993)
  - Je to veľmi konzervatívny úsek
    - Vhodný na štúdium vzťahov medzi čel'ad'ami alebo rodmi
- *matK* (LSC)
  - Gén kódujúci maturázu, ktorá sa zúčastňuje „splicingu“ plastidových génov
  - Má malý počet indelov
  - Vodný na štúdium vzťahov na medzidruhovej a medzirodovej úrovni
- *ndhF* (SSC)
  - Gén kódujúci podjednotku cp NADH-dehydrogenázy
  - Má približne 2x viacej substitúcií než *rbcL*
  - Využíva sa na rodovej úrovni

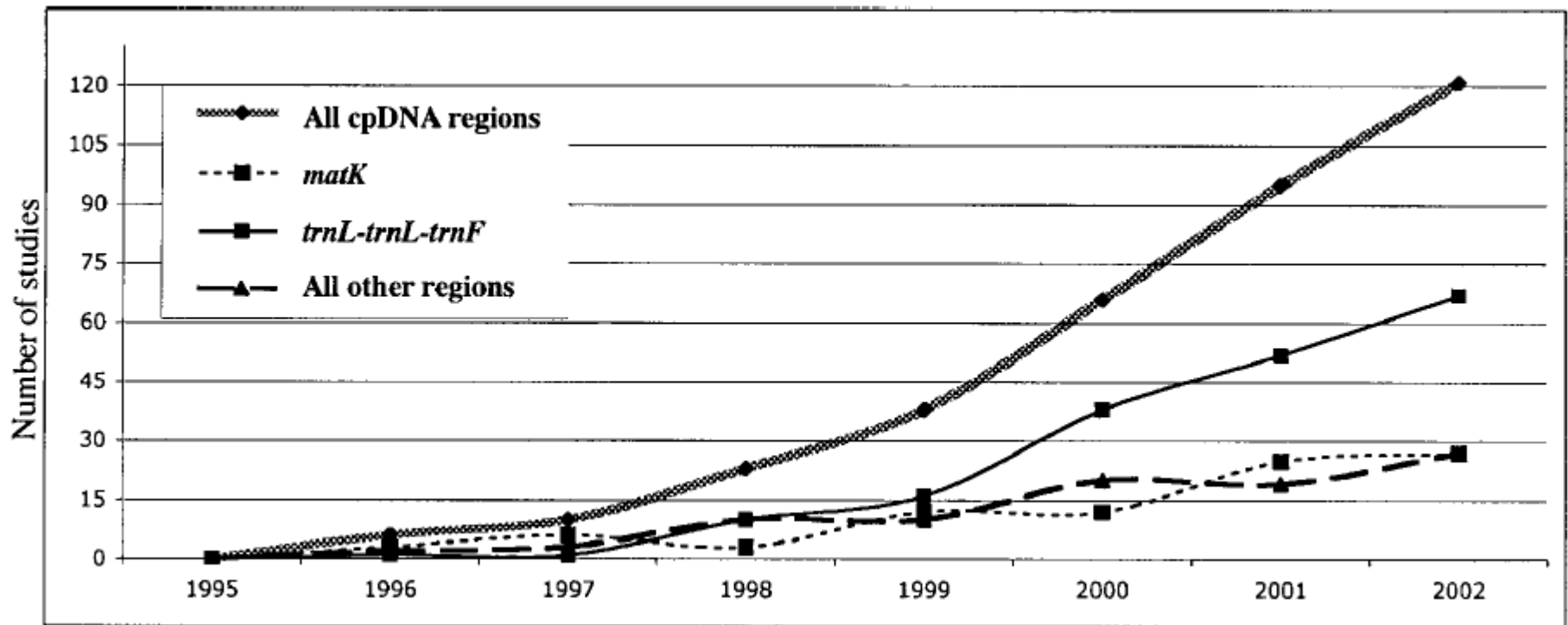
# Nekódujúce úseky

- *trnT-trnL* spacer
- *trnL* intron
- *trnL-trnF* spacer
- Taberlet et al. (1991) vytvoril univerzálne primery na amplifikáciu týchto úsekov
  - Jedny z najčastejšie používaných úsekov cpDNA vo fylogenetických a fylogeografických štúdiách
- *trnK* intron – *matK* gén
- *atpB-rbcL* intergenic spacer
- *trnH-psbA* intergenic spacer
- Vhodné na vytvorenie tzv. čiarového kódu = barcode (barcoding)





# Prehľad 445 fylogenetických štúdií využívajúcich cpDNA markre



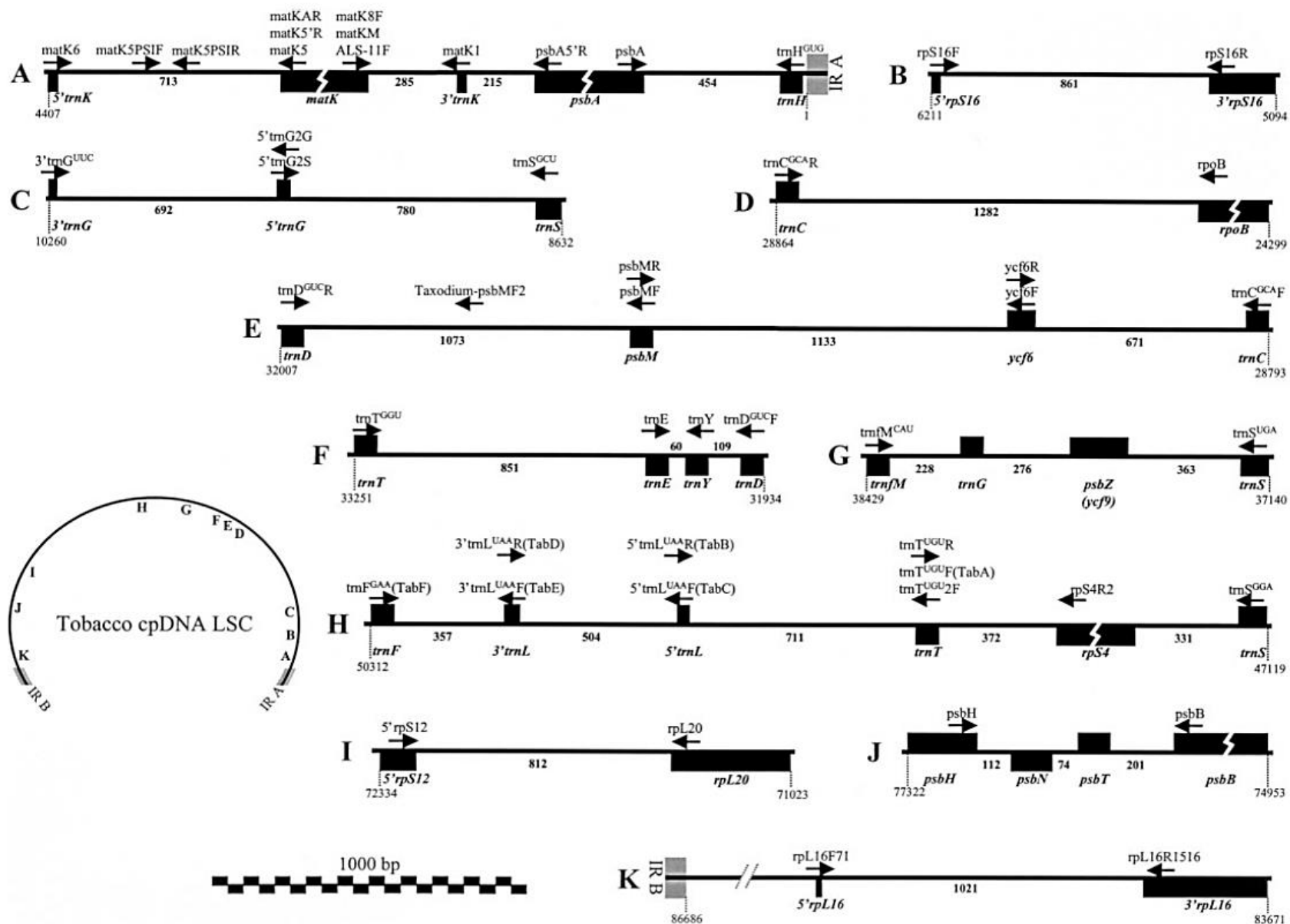
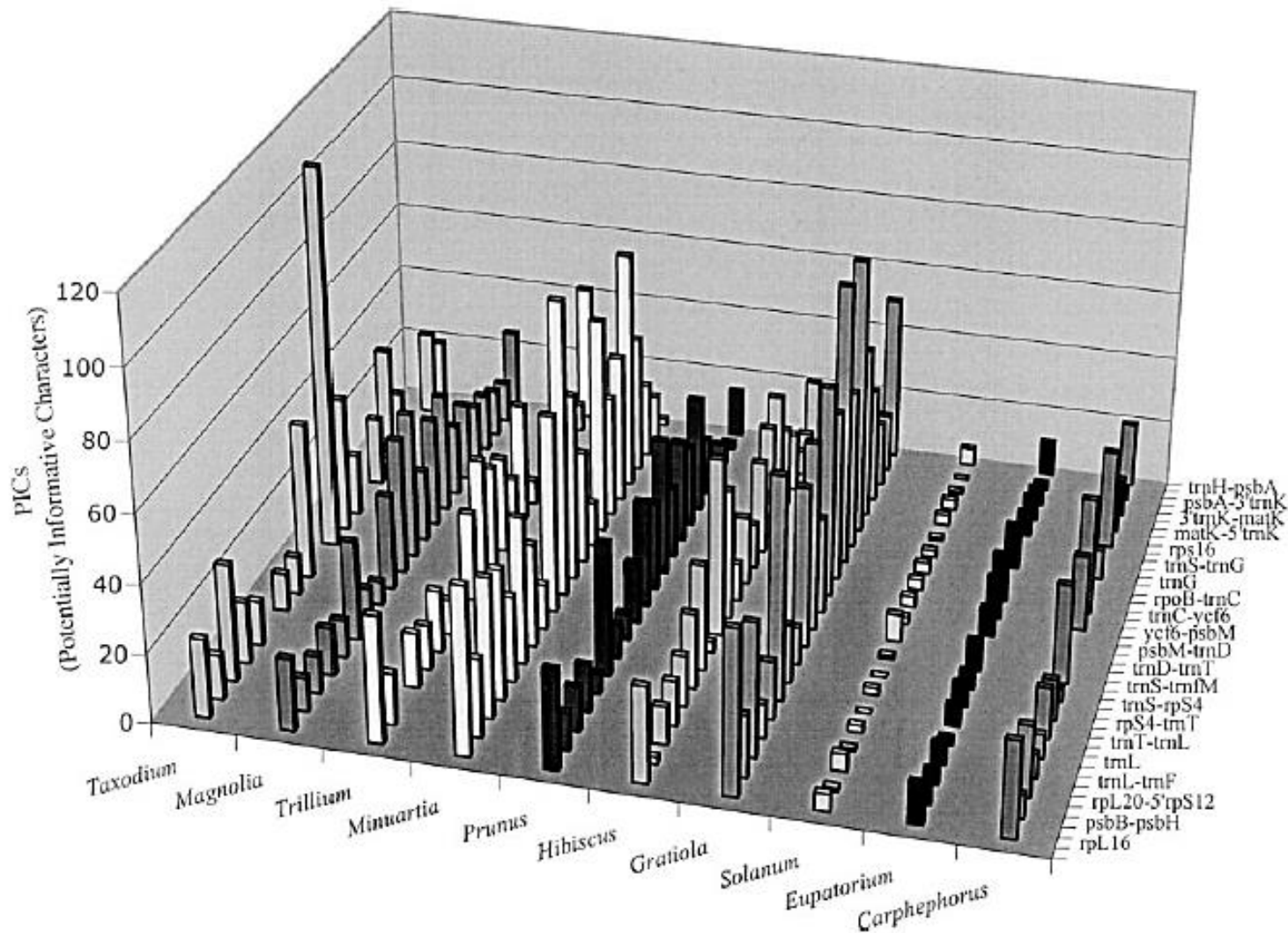


Fig. 3. Scaled map of the 21 noncoding cpDNA regions surveyed in this investigation (based on the *Nicotiana* chloroplast genome [Wakasugi et al., 1998]). The orientation and relative positions of the genes are identified (A–K) along the Large Single Copy (LSC) portion with specific positions denoted by offset numbers at the beginning and end of each region. Gene names are italicized below and amplification and sequencing primer names are in roman typeface above with directional arrows. Lengths of noncoding regions are centered below each intergenic spacer and intron.



Prehľad hodnôt PIC (Potentially Informative Characters) rôznych nekódujúcich úsekov cpDNA naprieč rôznymi fylogenetickými skupinami rastlín.



## Angiosperm genera in which complete chloroplast genomes have been determined in two or more species.

Genus	Species	Family	S <sub>max</sub>	Mean	Stdev
Acorus	<i>A. americanus</i>	Acoraceae	3	0.82	0.32
	<i>A. calamus</i>				
Aethionema	<i>Ae. cordifolium</i>	Brassicaceae	49	9.67	9.00
	<i>Ae. grandiflorum</i>				
Calycanthus	<i>C. chinensis</i>	Calycanthaceae	10	1.51	1.77
	<i>C. floridus</i> var. <i>glaucus</i>				
Chimonanthus	<i>Ch. nitens</i>	Calycanthaceae	10	1.32	1.49
	<i>Ch. praecox</i>				
Eucalyptus	<i>E. globulus</i> subsp. <i>globulus</i>	Myrtaceae	10	1.08	1.52
	<i>E. grandis</i>				
Gossypium	<i>G. barbadense</i>	Malvaceae	28	1.44	2.59
	<i>G. hirsutum</i>				
Nicotiana	<i>N. sylvestris</i>	Solanaceae	16	4.00	3.49
	<i>N. tabacum</i>				
	<i>N. tomentosiformis</i>				
Oenothera	<i>Oe. argillicola</i>	Onagraceae	42	2.17	3.94
	<i>Oe. biennis</i>				
	<i>Oe. glazloviana</i>				
	<i>Oe. parviflora</i>				
Oryza	<i>O. nivara</i>	Poaceae	11	0.82	1.43
	<i>O. sativa</i> subsp. <i>indica</i>				
Paeonia	<i>P. brownii</i>	Paeoniaceae	31	8.04	5.82
	<i>P. obovata</i>				
	<i>P. suffruticosa</i>				
Populus	<i>P. alba</i>	Salicaceae	18	2.02	2.53
	<i>P. trichocarpa</i>				
Solanum	<i>S. bulbocastanum</i>	Solanaceae	26	5.03	4.67
	<i>S. lycopersicum</i>				
	<i>S. tuberosum</i>				

Maximum number of polymorphic sites (S<sub>max</sub>), mean number of polymorphic sites, and standard deviation of polymorphic sites is shown for each genus.  
doi:10.1371/journal.pone.0035071.t001

**THINX**