

# Uplatnění molekulárních přístupů ve studiu biodiverzity, v taxonomii a v rekonstrukci evoluce

## 2. použití při studiu polyploidizace a ve fylogeografii

Tomáš Fér  
Katedra botaniky PŘF UK

# Využití markerů pro různé okruhy otázek

	Allo- zomy	Fragment-based			Sekvenování				NGS		
		RAPD	AFLP	SSR	nDNA	cpDNA	mtDNA (rostliny)	mtDNA (zvířata)	Hyb-Seq	RADseq	resekvenování
Genetická diverzita	++	++	++	++	+++	++	+	++	+++	+++	+++
Diferenciace pooplací	+++	++	++	++	+++	++	++	+++	++?	+++	+++
Genový tok	++	(+)	(+)	+++	+++	++	(+)	++	?	+++	+++
Polyploidizace	+++	-	(+)	+	++	++	-	-	+++	++	+++
Hybridizace	++	++	++	+	++	++	+	+	+++	+++	+++
Fylogeneze	(+)	-	++	(+)	+++	+++	(+)	+++	+++	++	+++
Genotypování jedinců	(+)	+++	+++	+++	+++	-	-	-	?		+++
Fylogeografie	(+)	-	++	-	(+)	+++	(+)	+++	(+)	+++	+++
Selekce	(+)	(+)	(+)	+	++	-	-	-	++	++	+++
Diverzifikace	?	?	(+)	-	++	++	?	++	+++	+++	+++

+++ velmi vhodné (+)

++ dobře použitelné -

+ OK ?

bylo použito

nevhodné

nejisté nebo nepoužito

první část podle Lowe et al. 2004

# Polyploidizace

- auto-, allopolyploidi
- jednorázová, opakovaná
- procesy ve smíšených populacích více cytotypů (primární, sekundární)
- jaderná DNA – identifikace informace rodičovských genomů v genomu hybrida
- cpDNA – mateřský taxon

# Metody používané ke studiu polyploidizace

- cpDNA – počet polyploidizačních událostí
- single-copy nDNA – detekce komplexního pattern („vyklonované“ jednotlivé rodičovské sekvence)
- AFLP – sdílené fragmenty, intermediární pozice ve stromu
- allozomy – disomická vs. tetrasomická dědičnost

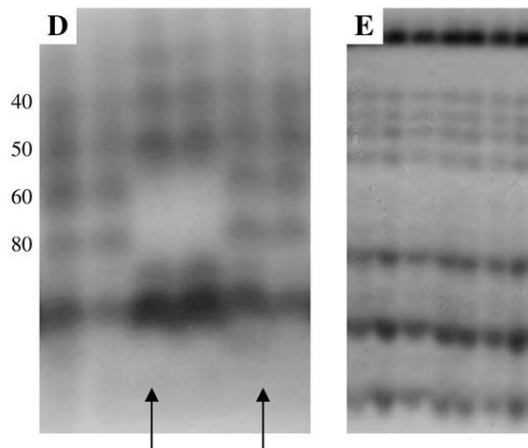
# Polyploidizace – allozomy

- tetrasomická dědičnost



*Anemone nemorosa* (autotetraploid)  
(Stehlik & Holderegger 2000)

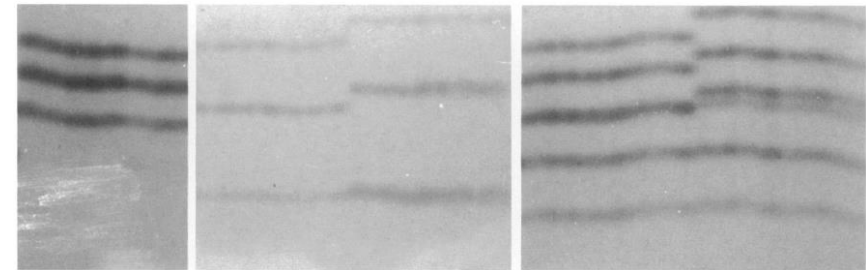
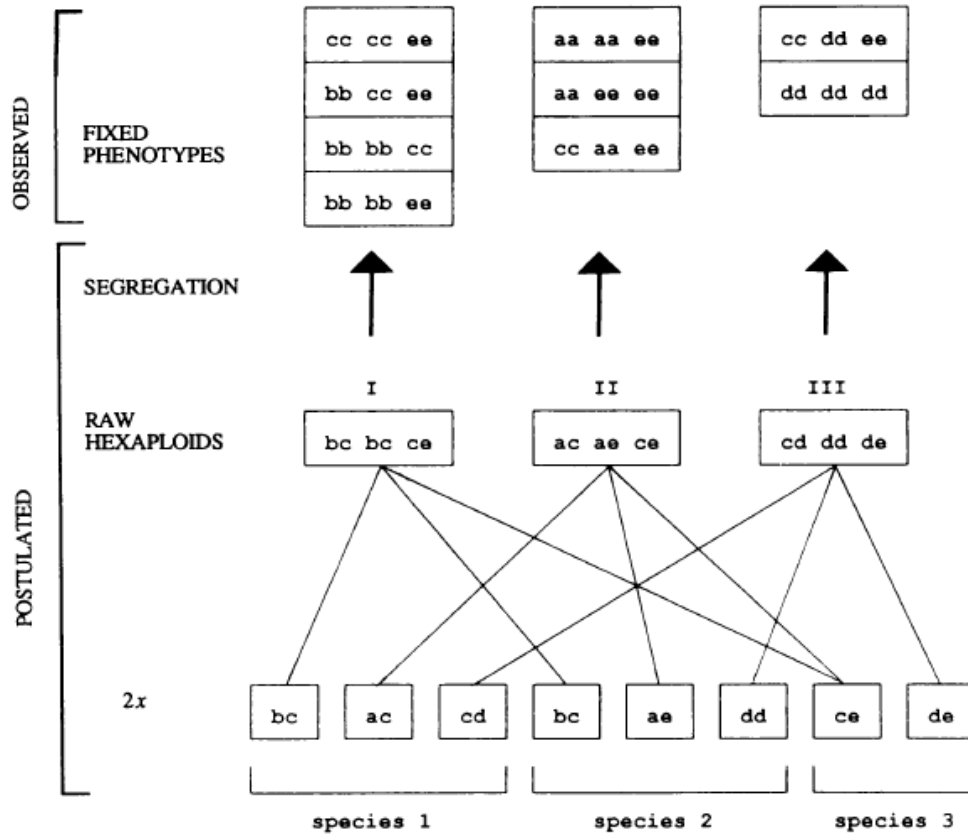
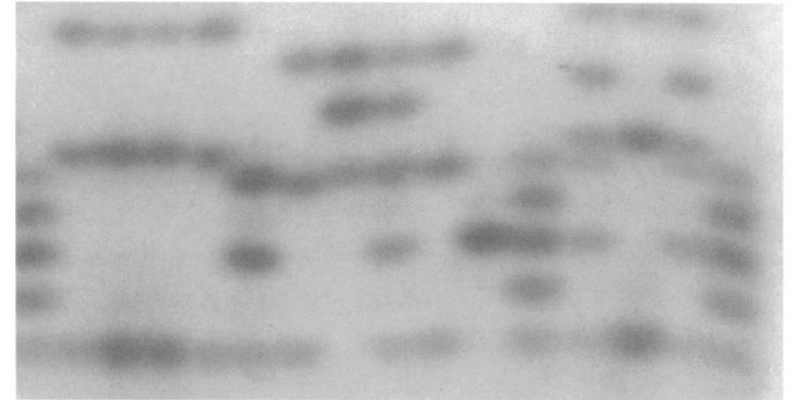
- disomická dědičnost (fixovaná heterozygozita)



*Cerastium alpinum* (allooktoploid?)  
(Berglund et al. 2006)



# Polyploidizace – allozomy



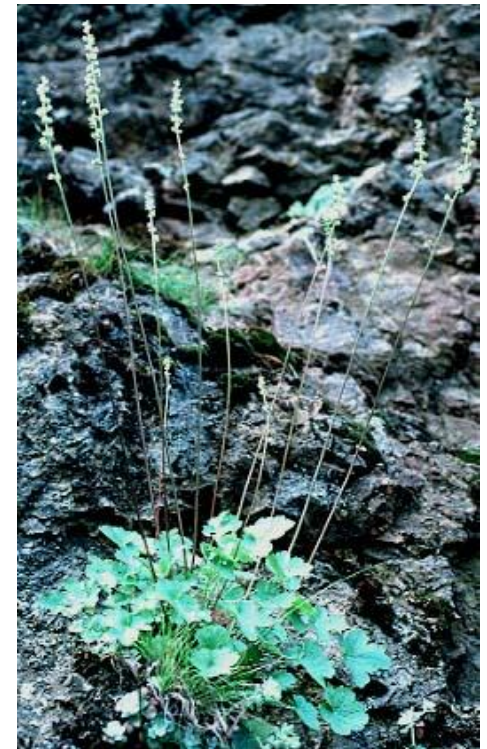
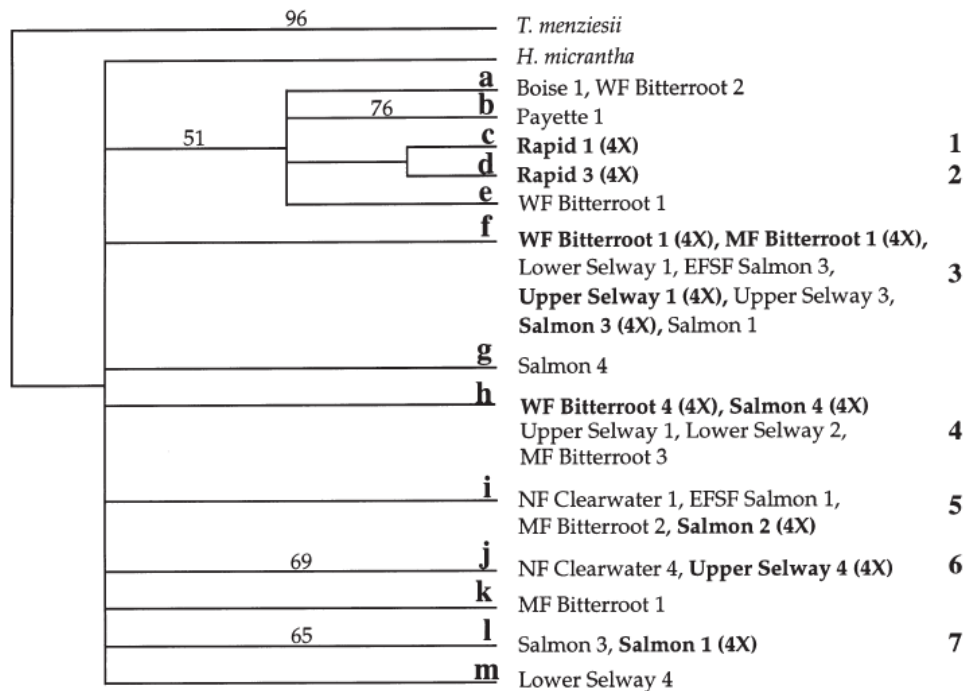
potomstvo (fixovaná heterozygota)

*Draba norvegica*  
 allohexaploid  
 nejméně 13x opakovaný vznik  
 Brochmann et al. 1992

# Polyploidizace – cpDNA

- detekce počtu polyploidních událostí (nezávislý vznik různých linií z diploidů s různými haplotypy)
- spíše podhodnocuje počet událostí (omezená variabilita DNA)
- staří polyploidi – mohou se lišit díky následné evoluci!

# Opakovaná polyploidizace – cpDNA

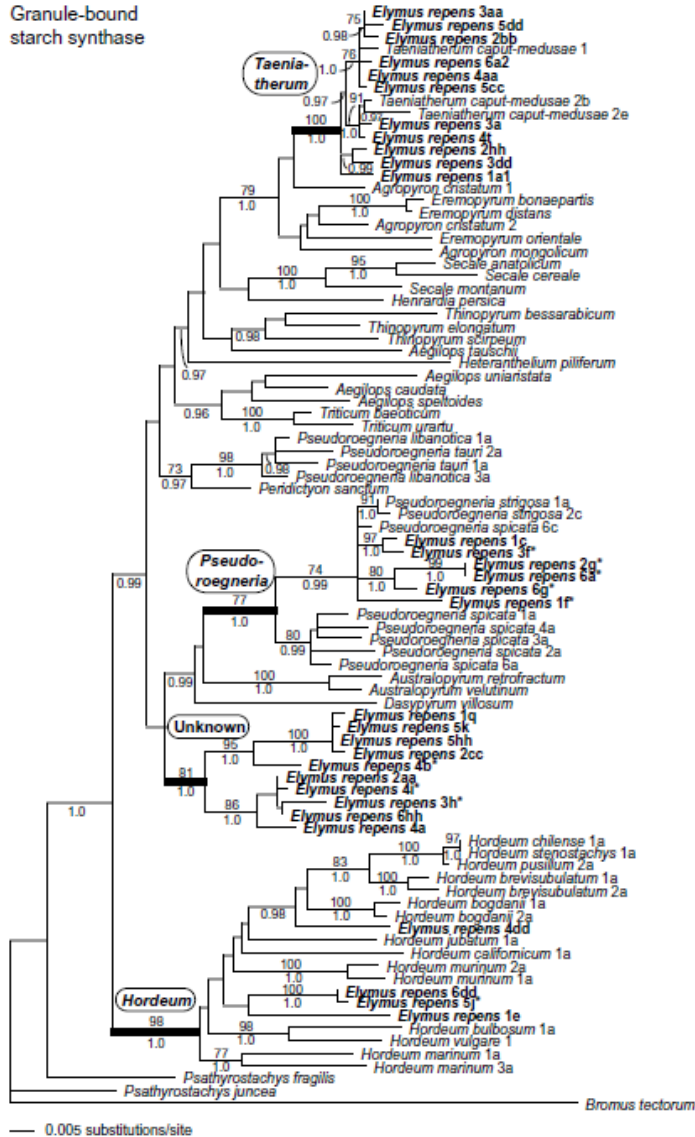


*Heuchera grossulariifolia*  
tetraploid  
nejméně 2x-7x opakovaný vznik  
Segraves et al. 1999



# Původ allohexaploida

Granule-bound starch synthase



*Taeniatherum*

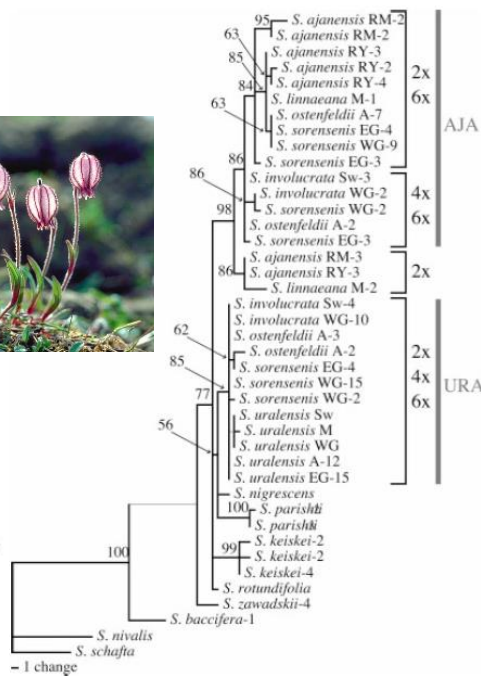
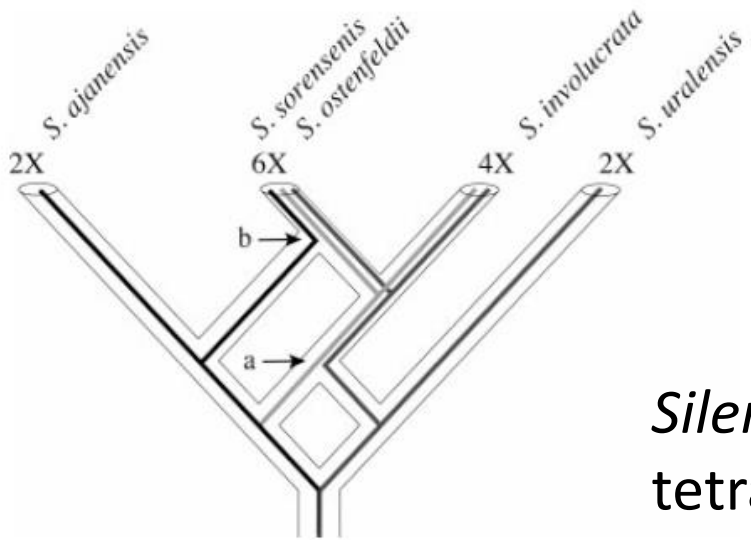
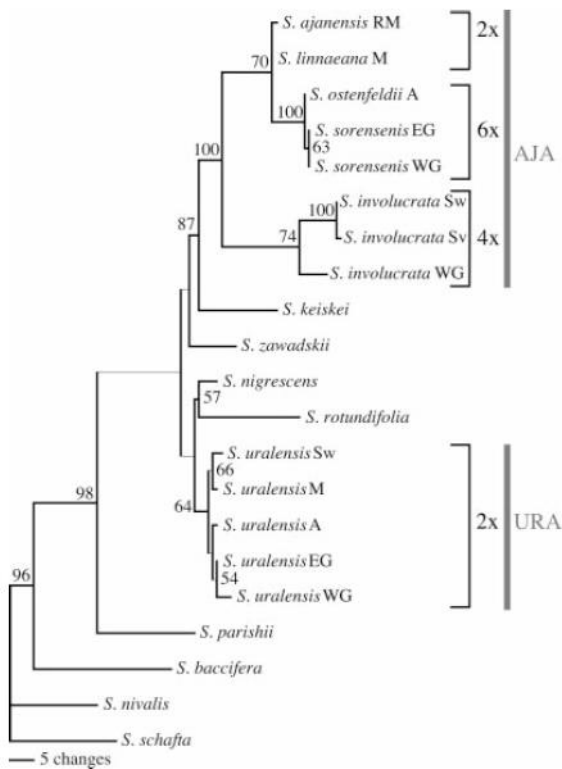


*Pseudoroegneria*

*Hordeum*

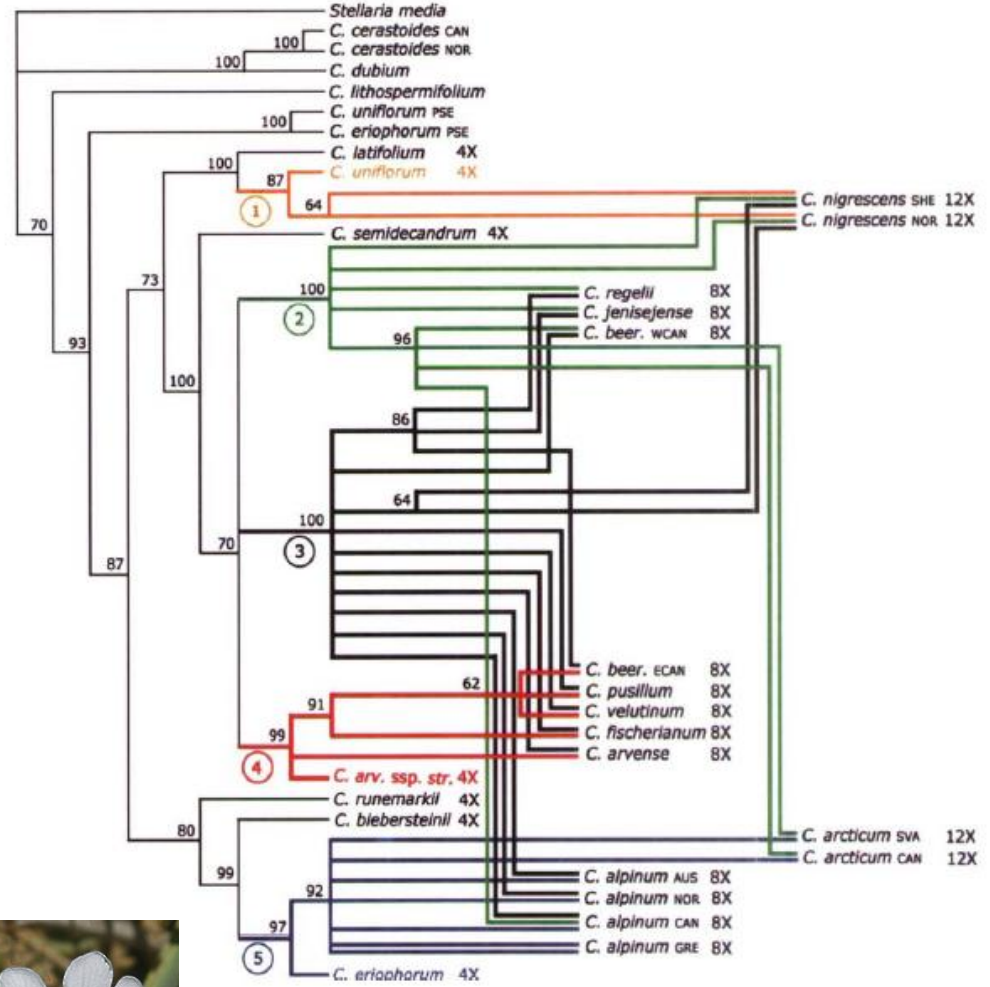
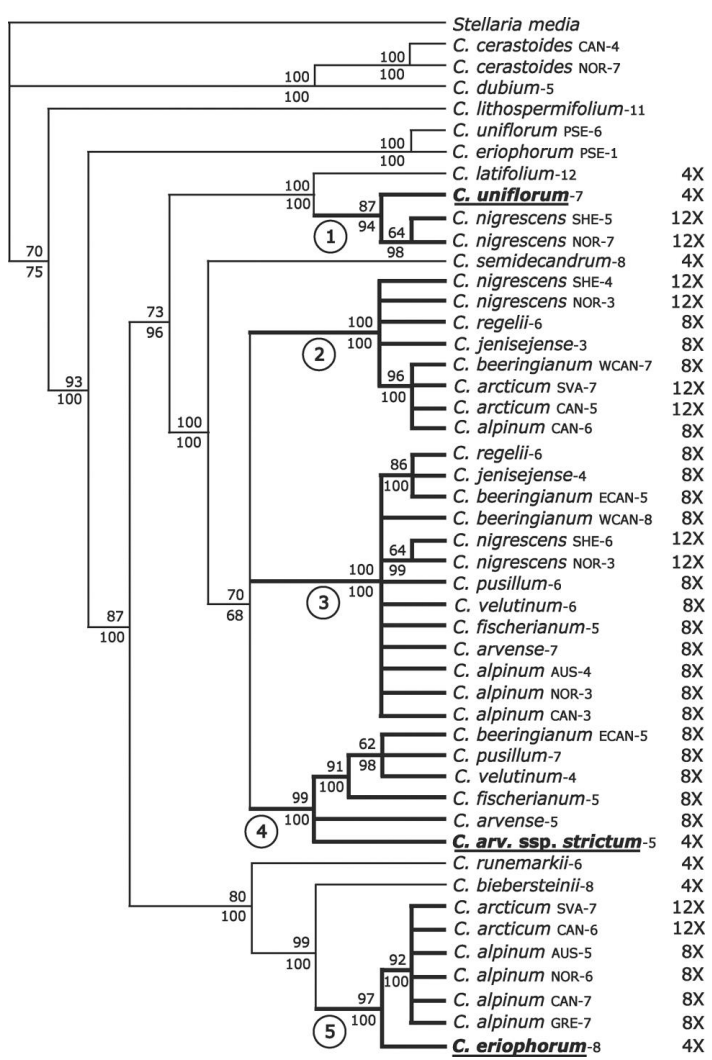
*Elymus repens*  
GBSSI (single-copy)  
Mason-Gamer 2008

# Vznik allopolyploidů – single-copy geny



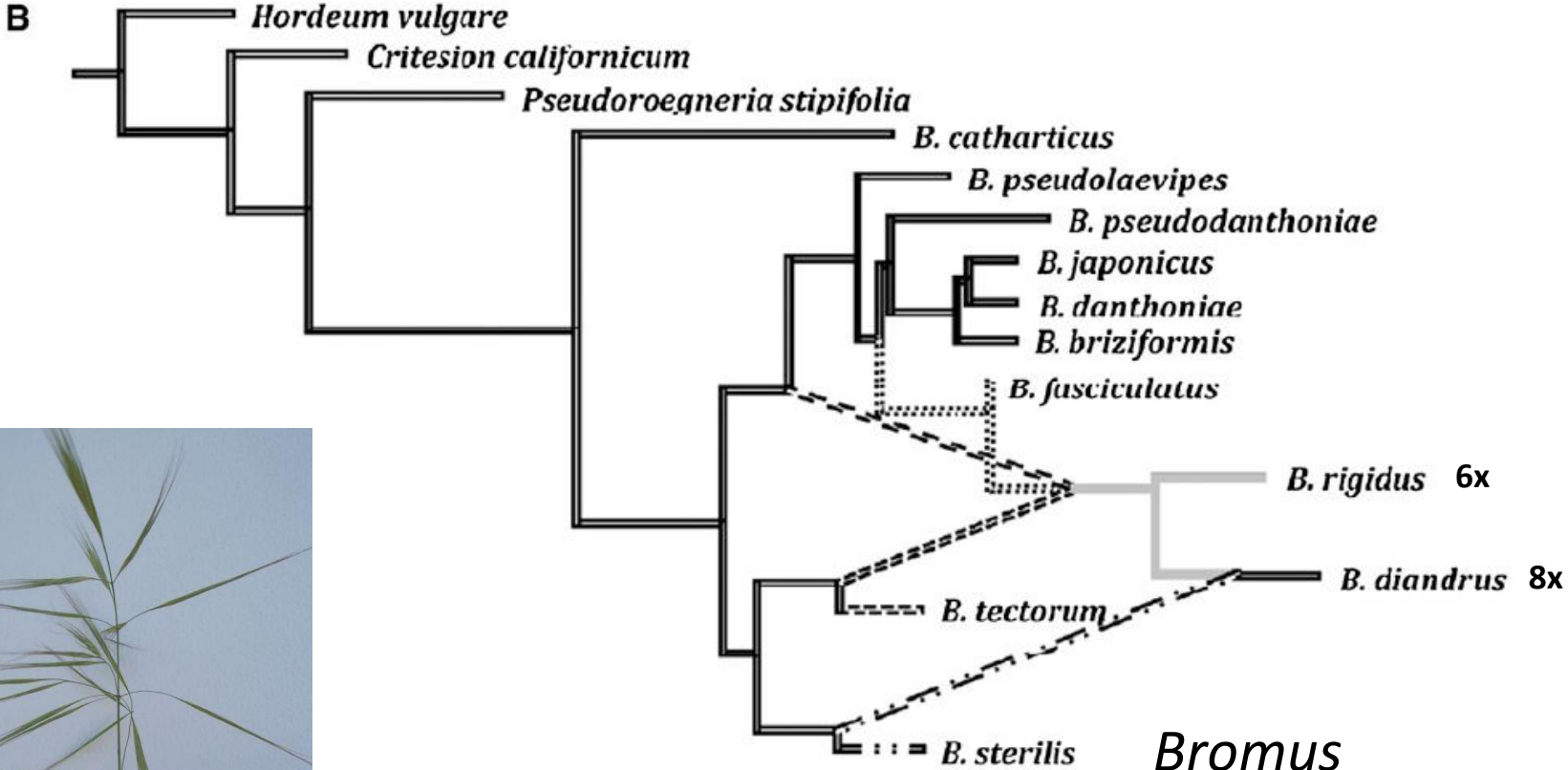
*Silene*  
tetraploidi, hexaploidi  
RP introny  
Popp et al. 2005

# Vznik allopolyploidů – single-copy geny



*Cerastium*  
 4x, 8x, 12x  
 RPB2 strom, network  
 Brysting et al. 2007

# Vznik allopolyploidů – single-copy geny



*Bromus*  
 6x, 8x  
 waxy  
 Fortune et al. 2008

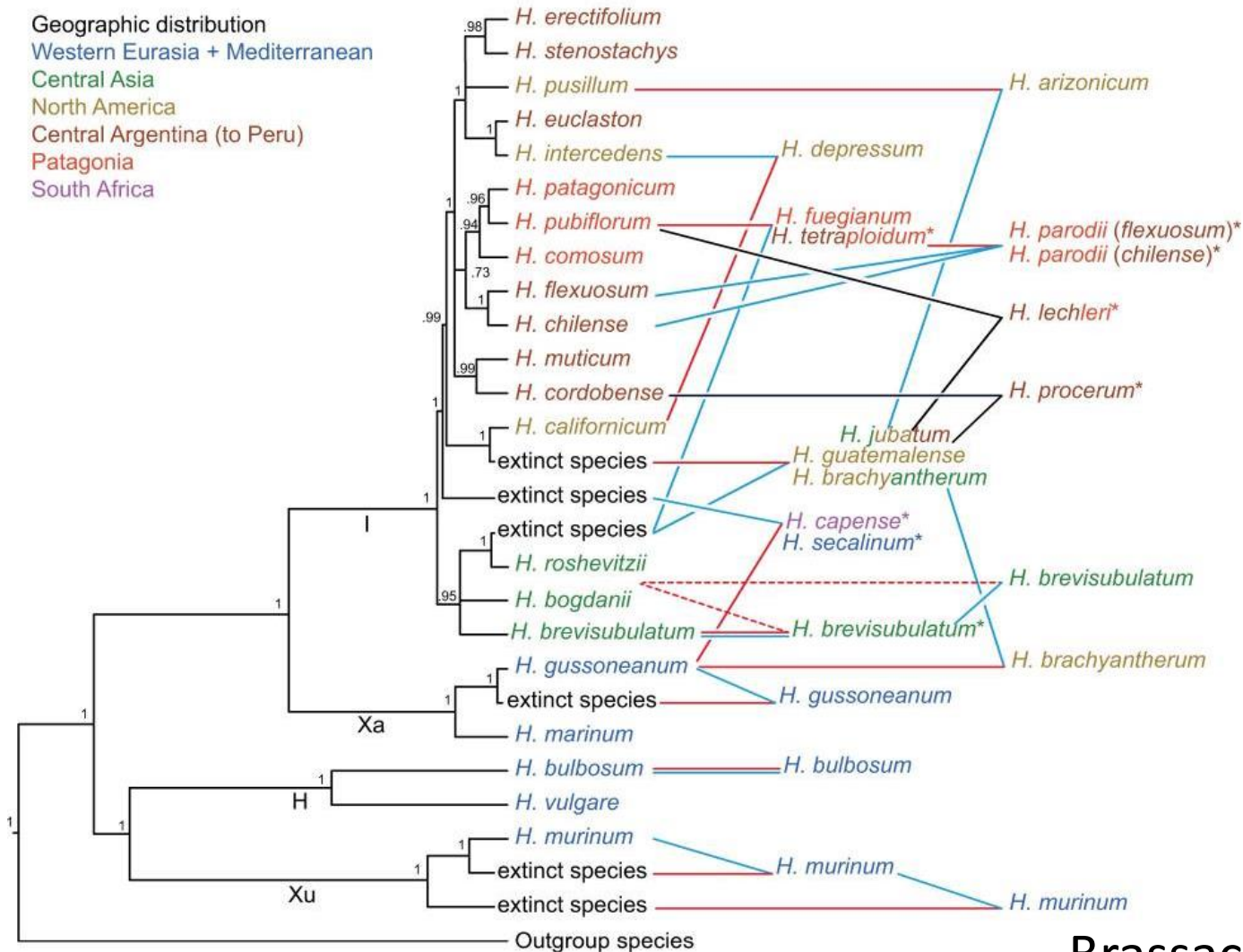


# Vznik allopolyploidů – single-copy geny

4x

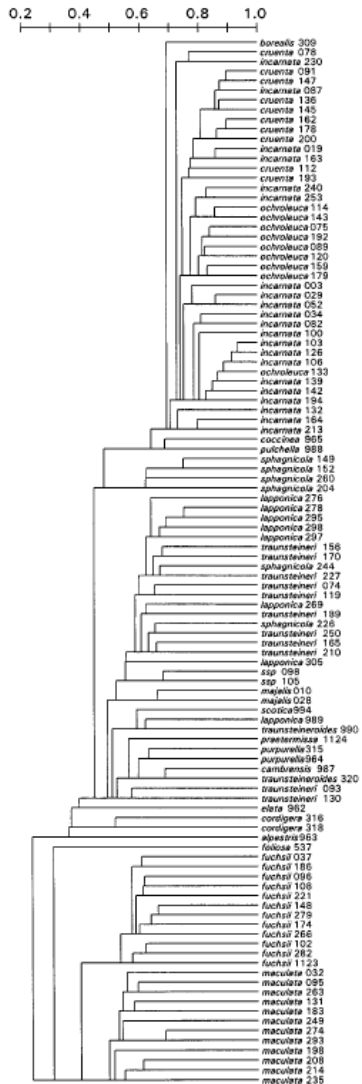
6x

Geographic distribution  
 Western Eurasia + Mediterranean  
 Central Asia  
 North America  
 Central Argentina (to Peru)  
 Patagonia  
 South Africa

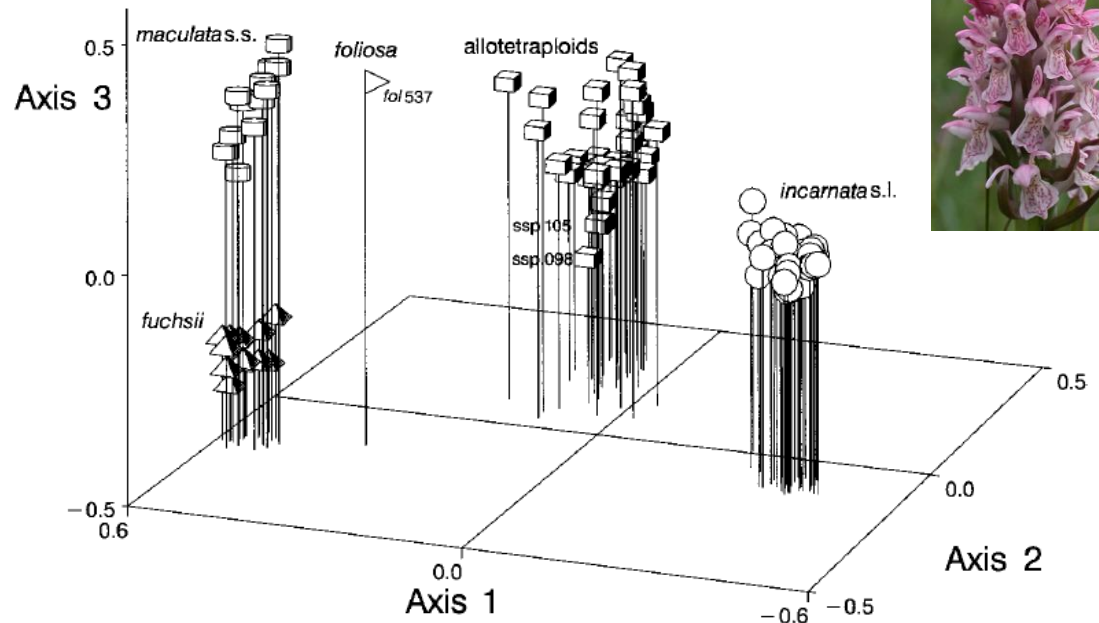


*Hordeum*  
 2x, 4x, 6x  
 12 genů

# Polyploidizace – AFLP

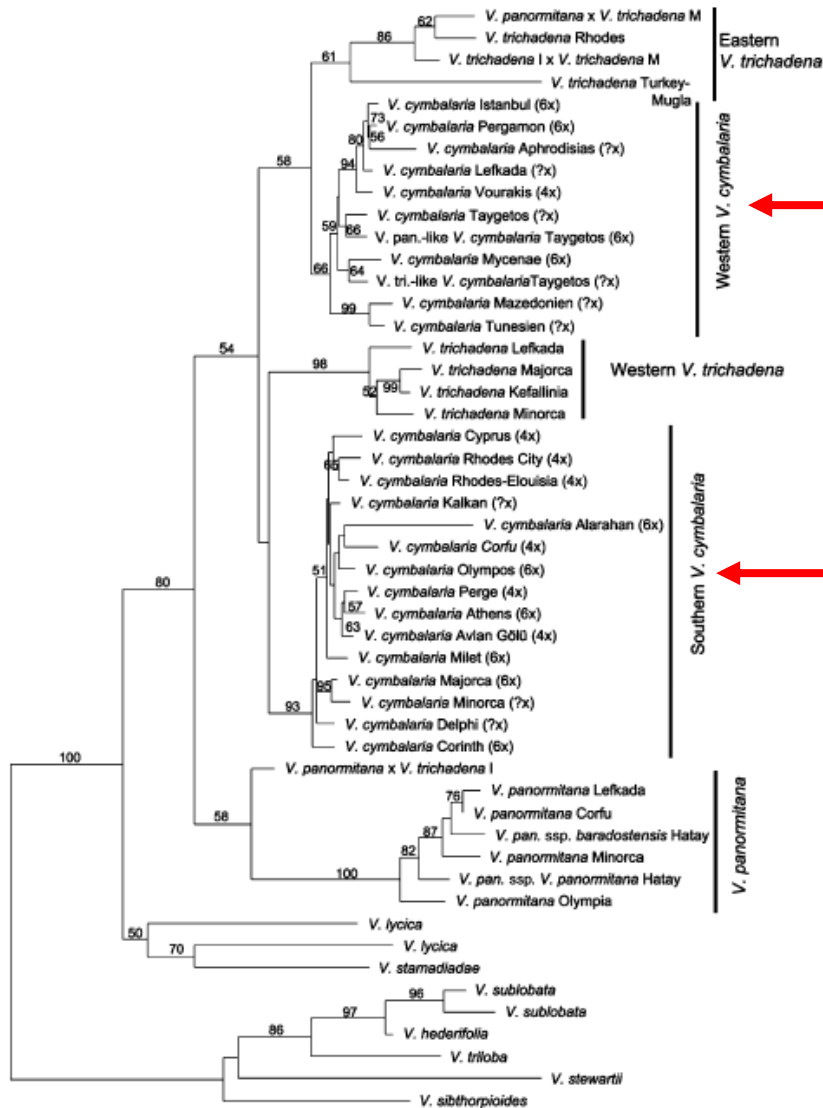


*incarnata s.l.*



*Dactylorhiza*  
 allotetraploidi  
 Hedrén et al. 2001

# Mnohonásobná polyploidizace – AFLP



*Veronica cymbalaria*  
tetraploidi – nejméně dvakrát  
hexaploidi – vícekrát  
Albach 2007

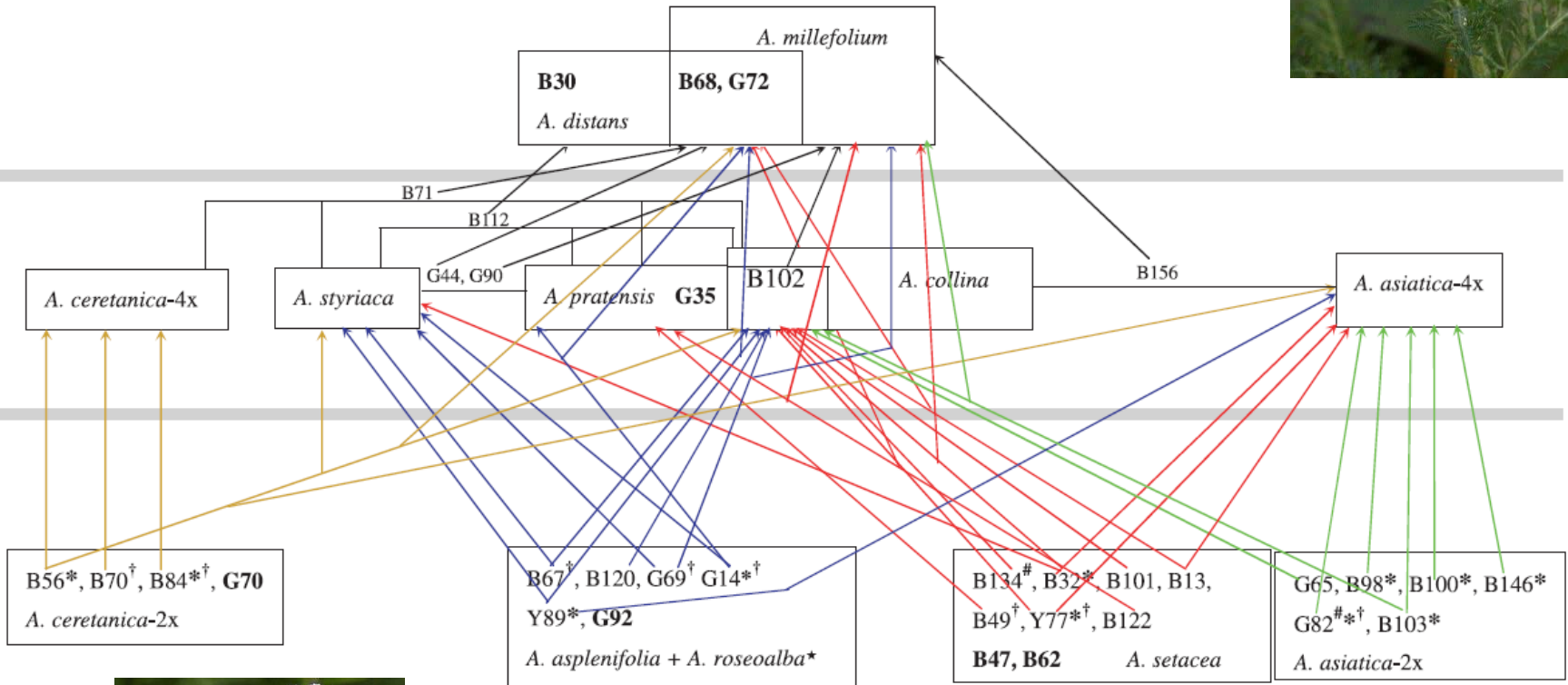
# Polyploidizace – AFLP



6x

4x

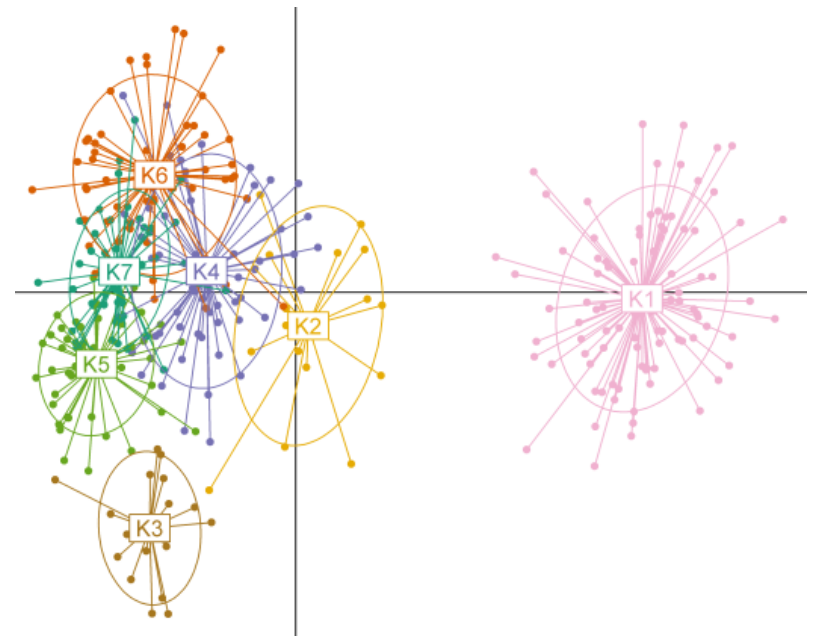
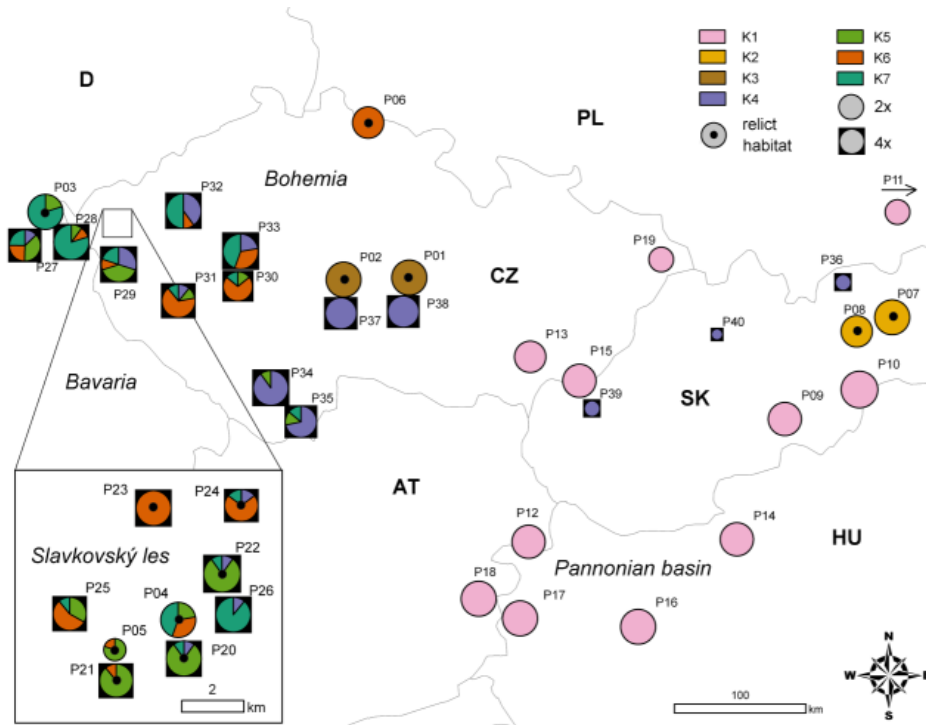
2x



*Achillea*  
sdílené fragmenty  
Guo et al. 2005



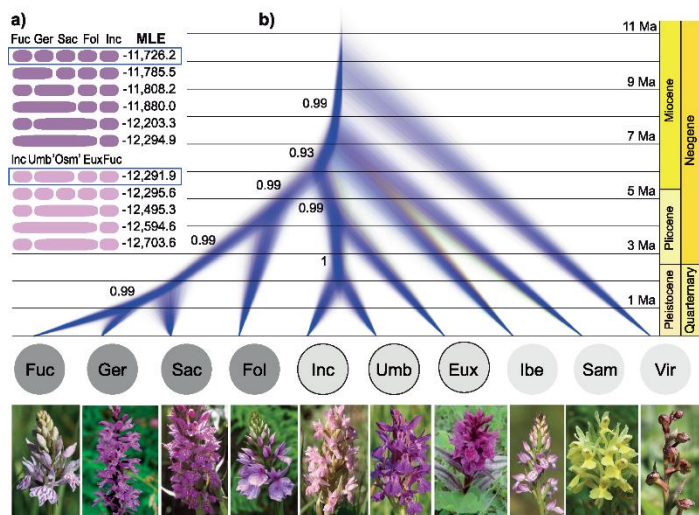
# Procesy ve smíšených populacích



*Knautia arvensis*  
AFLP  
diploidi, tetraploidi  
Kolář et al. 2012

# RADseq – allotetraploidi

diploids



allotetraploids

Fuc×Inc <sup>d</sup>	N <sup>b</sup>	P <sup>c</sup>	R <sub>Fuc</sub> /R <sub>Inc</sub> <sup>d</sup>	C <sub>Fuc</sub> /C <sub>Inc</sub>
Maj	13	1854	-0.004/0.012	0.023/-0.008
Etr	3	1664	0.004/0.009	0.026/-0.013
Tra	22	1359	0.003/0.010	0.042/-0.032
Pra	5	852	0.007/0.010	0.052/-0.046
Bal	3	243	0.008/0.018	0.020/-0.017
Pur	5	186	0.008/0.016	0.042/-0.043
Mac×Inc <sup>d</sup>	N <sup>b</sup>	P <sup>c</sup>	R <sub>MacW</sub> /R <sub>Inc</sub> <sup>d</sup>	C <sub>MacW</sub> /C <sub>Inc</sub>
Ela	7	5945	0.053/-0.009	0.056/-0.036
Sph	5	1187	0.163/0.008	0.040/-0.030
Ker	1	572	0.120/0.005	0.064/-0.030

private alleles

relatedness

relatedness cp

**Diploids:** Eux = *D. euxina*, Fol = *D. foliosa*, Fuc = *D. fuchsii*, Ger = *D. gervasiana*, Ibe = *D. iberica*, Inc = *D. incarnata*, Sac = *D. saccifera*, Sam = *D. sambucina*, Umb = *D. umbrosa*, Vir = *D. viridis*.

**Tetraploids:** Bal = *D. baltica* (incl. *D. ruthei*); Ela = *D. elata*; Etr = *D. elatior*; Ker = *D. kerryensis*; Maj = *D. majalis*; Pra = *D. praetermissa*; Pur = *D. purpurella*; Sph = *D. sphagnicola* (incl. *D. calcifugiens*); Tra = *D. traunsteineri*.

*Dactylorhiza*

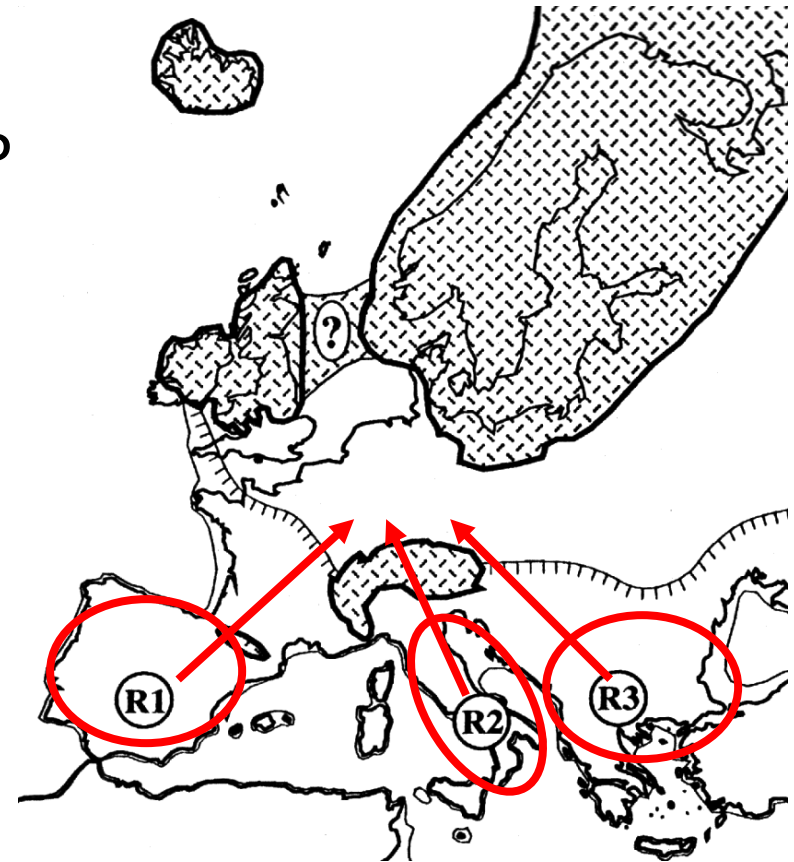
Bradrud et al. 2019

# Fylogeografie

- detekce vnitrodruhového polymorfismu
- geografická distribuce genových linií (haplotypů)
- interpretace rozšíření v souvislosti se změnou areálu (např. postglaciální migrace)

# Zalednění, refugia, postglaciální migrace, fylogeografie

- maximální *zalednění* – 20-18 tis. BP
- maximální (koncentrovaná) variabilita v mediteránu
- 3 základní *refugia* – iberské, apeninské, bálkánské
- *rekolonizace* od cca 13 tis. BP
- jen malá část variability zpět do Evropy

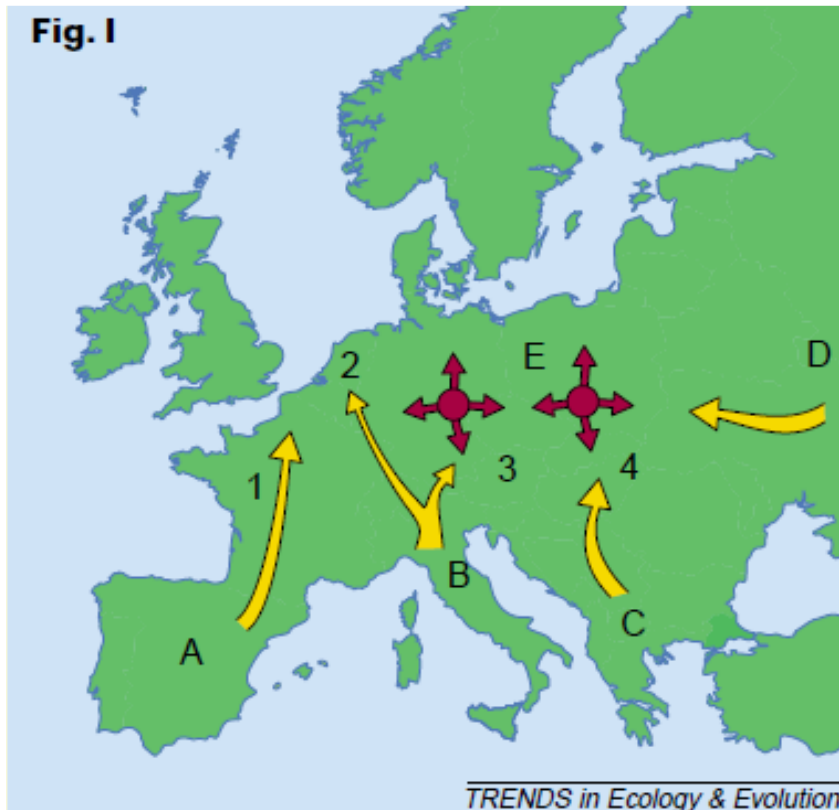


maximální rozsah zalednění  
během posledního glaciálu

hranice permafrostu

R1, R2, R3 – hlavní refugia

# Postglaciální kolonizace – komplexní pattern



A, B, C – 3 jižní refugia  
D – východní refugium  
E – malá severní refugia

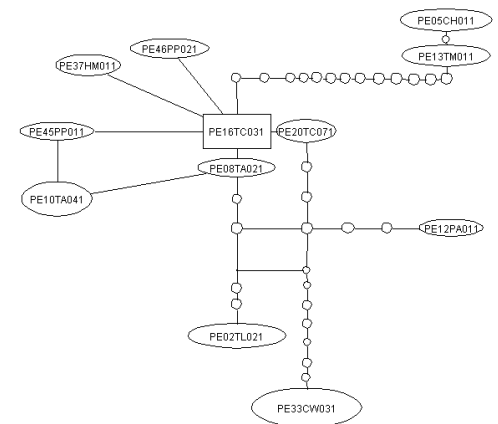
1 – kolonizace bez překážek  
2 – kolonizace směřována předchozí kolonizací  
3 – kolonizace zastavena předchozí kolonizací  
4 – kolonizace provázená hybridizací

# Metody používané ve fylogeografii

- cpDNA – maternálně dědičná (u krytosemenných)
  - RFLP, PCR-RFLP
  - mikrosatelity
  - sekvence
- AFLP
  - detekce pattern
  - diverzita
  - divergence (vzácné fragmenty, DW-index...)
- allozomy

# Fylogeografie – cpDNA

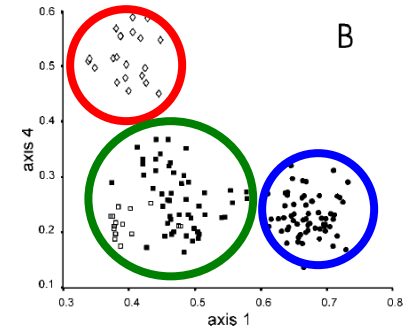
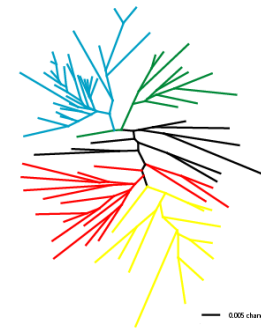
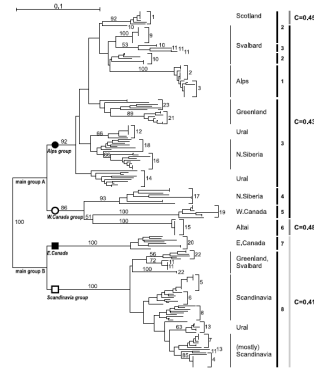
- haploidní – haplotypy
- nerekombinovaná
- maternální přenos u krytosemenných
- vztahy mezi haplotypy – sítě
- test fylogeografického pattern



# AFLP – geografická struktura

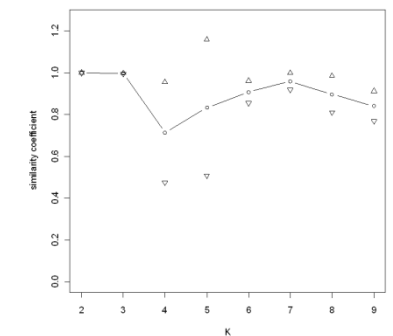
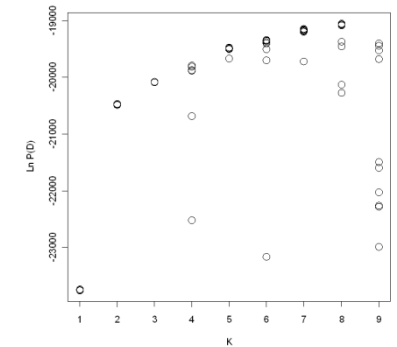
- detekce linií

- strom
- síť
- PCoA



- Bayesovské clusterování (BAPS, Structure)

- optimální počet skupin
- rozřazení jedinců (mixture, admixture)





# AFLP – diverzita a divergence

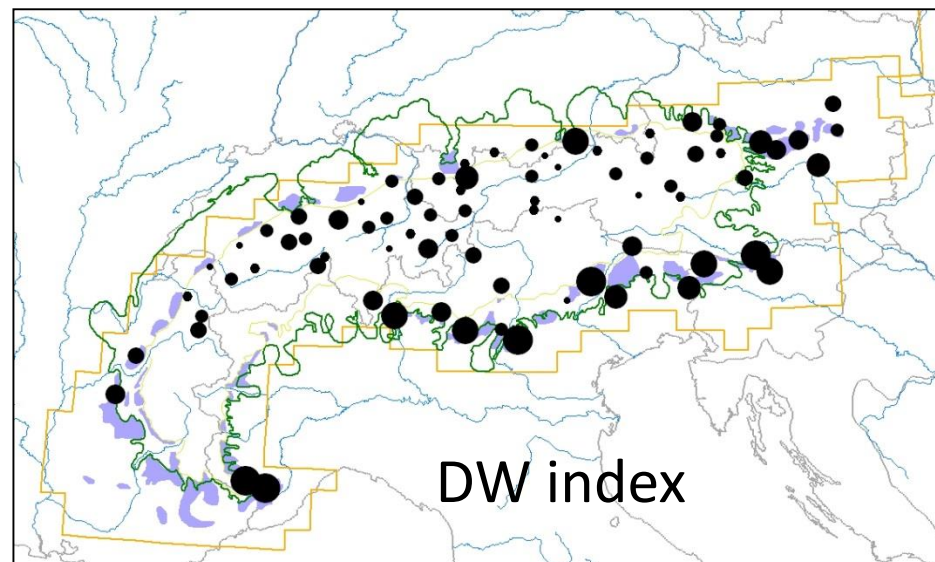
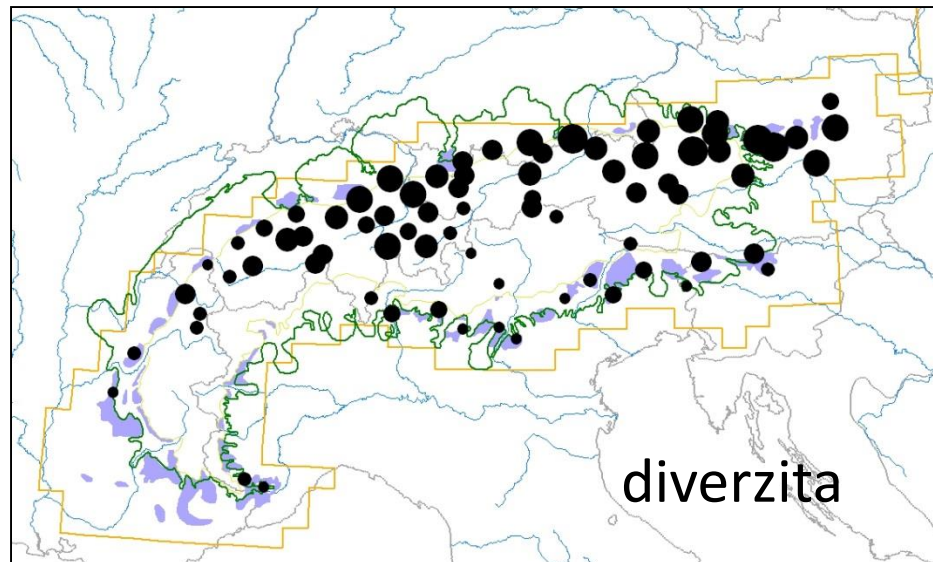
- genetická diverzita
  - Shannonův index diverzity
  - average gene diversity
  - reflektuje reprodukční systém, recentní procesy (genový tok, velikost populace...)
- vzácnost (*rarity*) – divergence
  - počet (nebo %) vzácných fragmentů (arbitrární definice vzácnosti)
  - počet (nebo %) unikátních (privátních) fragmentů
  - DW-index (*frequency down-weighted marker values*)
  - reflektuje historické procesy (dlouhodobá izolovanost...)

# DW-index

frequency down-weighted marker values



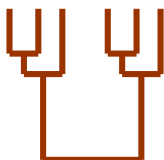



- počet výskytů AFLP markeru v populaci/počet výskytů markeru v celém datovém souboru -> součet hodnot pro všechny markery
- vyšší hodnoty v dlouhodobě izolovaných populacích (akumulace díky mutacím)
- nižší hodnoty v nově vzniklých populacích (recentní šíření)



*Ranunculus alpestris*, AFLP

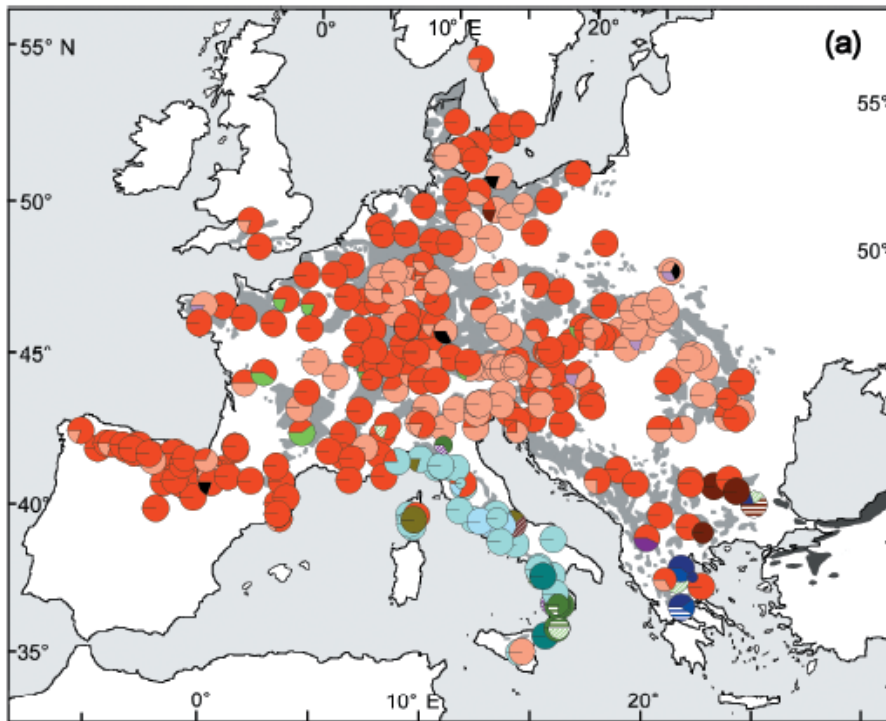
(Paun et al. 2008)

# Diverzita, divergence vs. populační historie

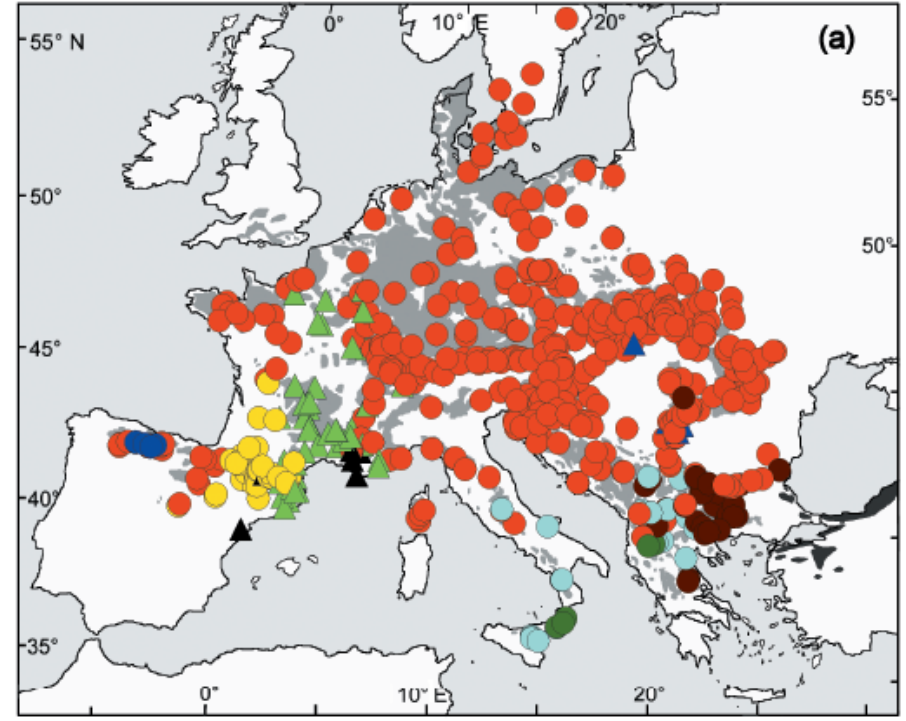
	vysoká genetická diverzita	nízká genetická diverzita
vysoká divergence (např. privátní & vzácné markery, vysoké DW)	omezený genový tok, přežívání <i>in situ</i> ve velkém refugiu 	bottleneck díky malým, izolovaným refugiálním populacím, přežívání <i>in situ</i> v refugiu 
nízká divergence	vysoký genový tok, imigrace 	bottleneck díky dálkovému šíření, imigrace 

podle Tribsch et al.

# Fylogeografie *Fagus sylvatica*

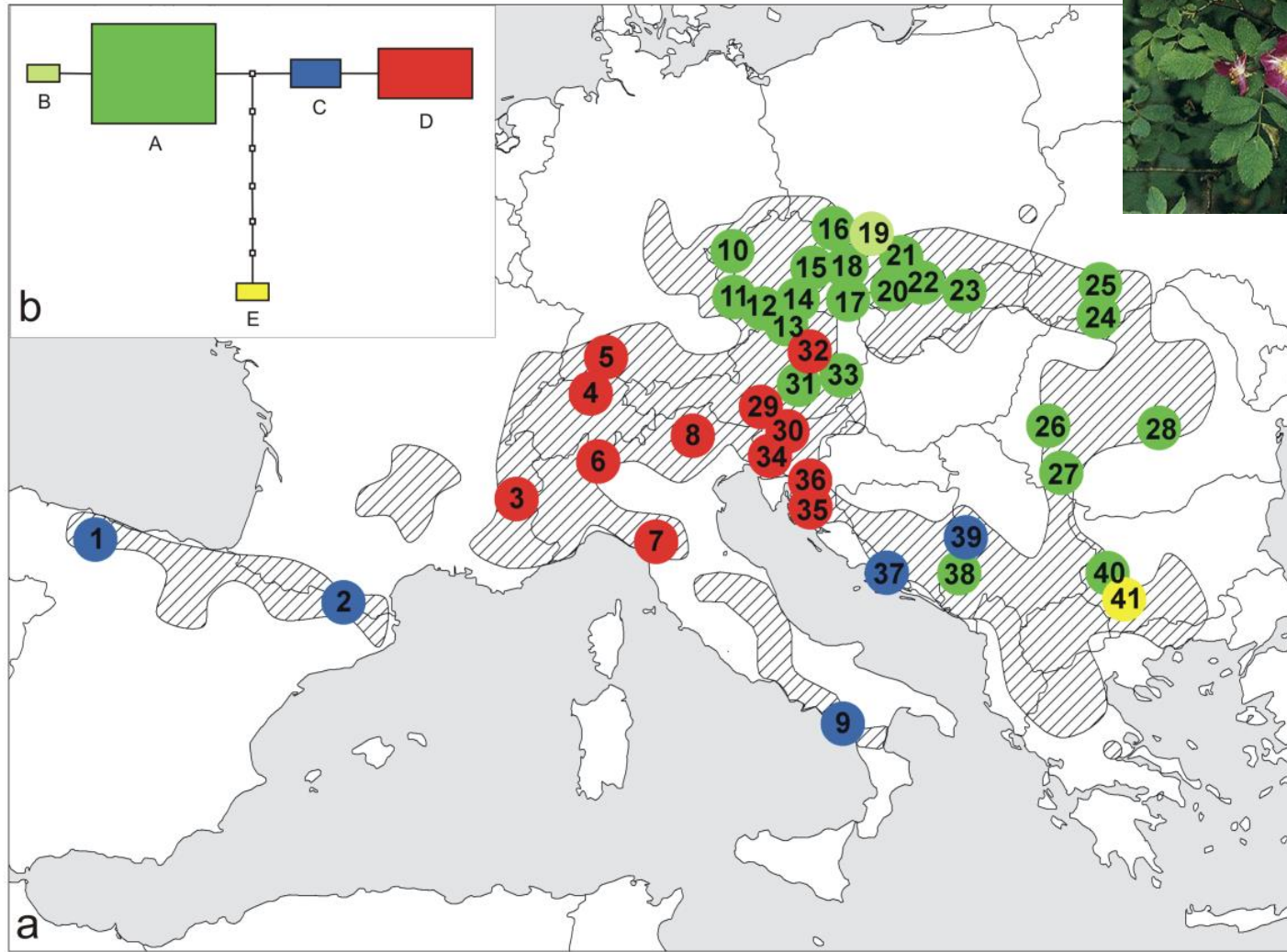


cpDNA mikrosatelity



isozymy

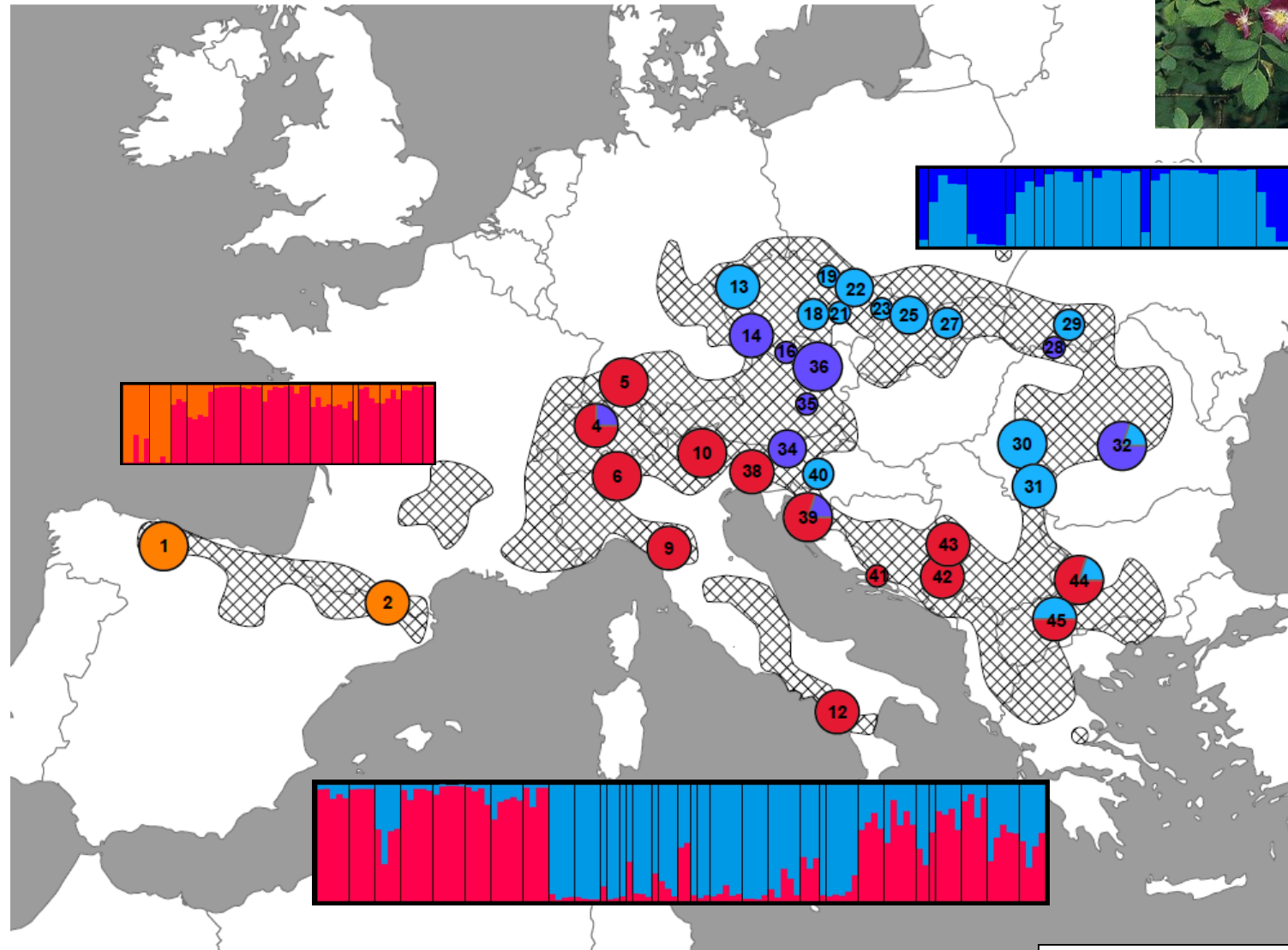
# *Rosa pendulina* – cpDNA



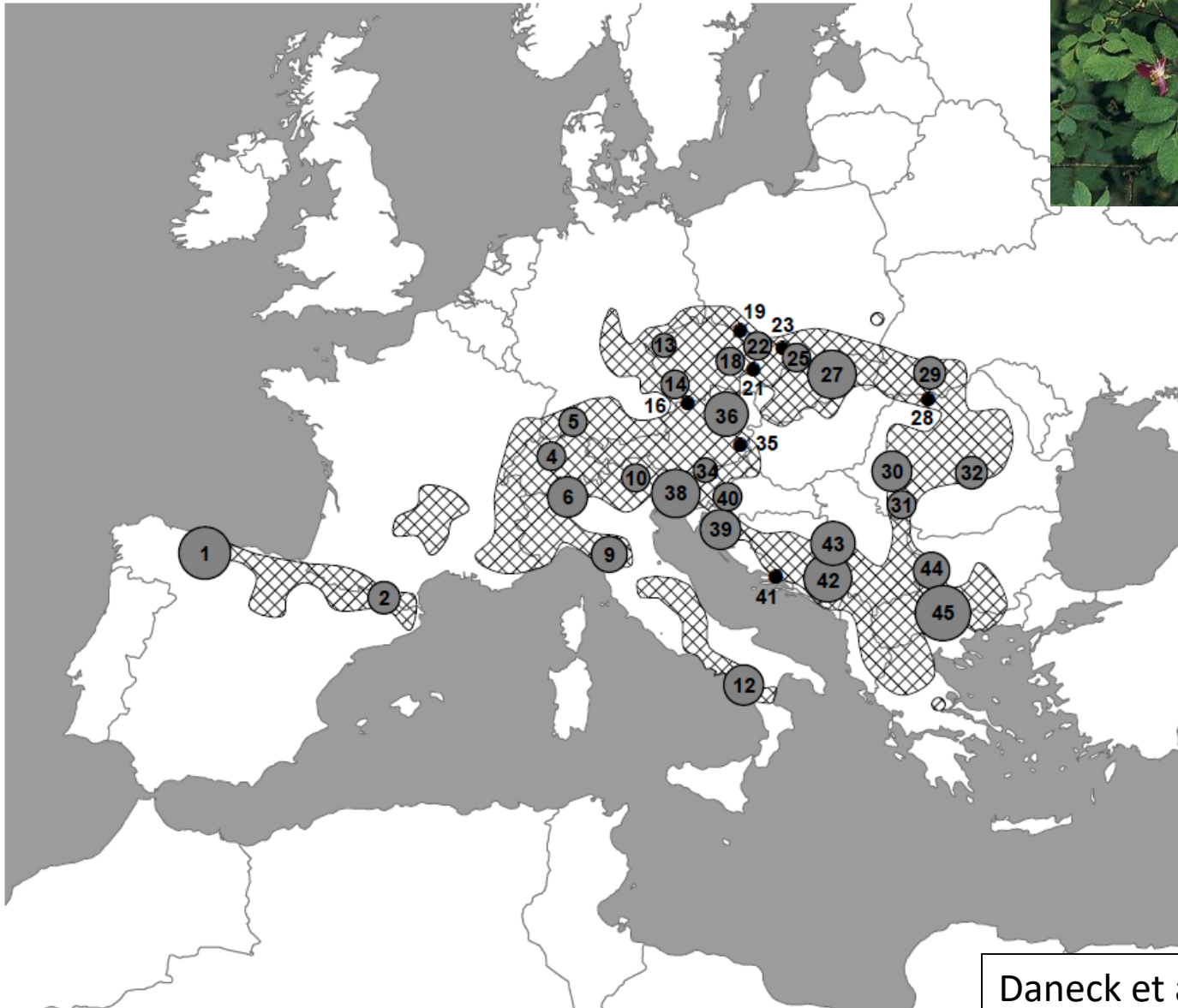
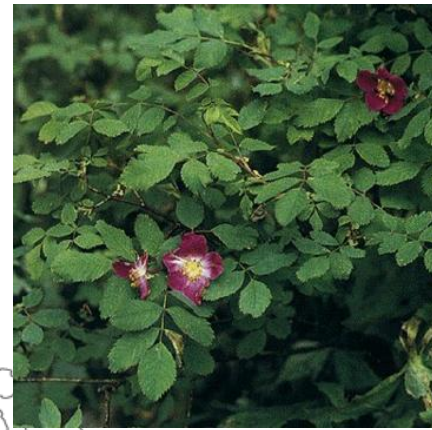
trnL-trnF sekvence  
Fér et al. 2007



# *Rosa pendulina* – AFLP pattern



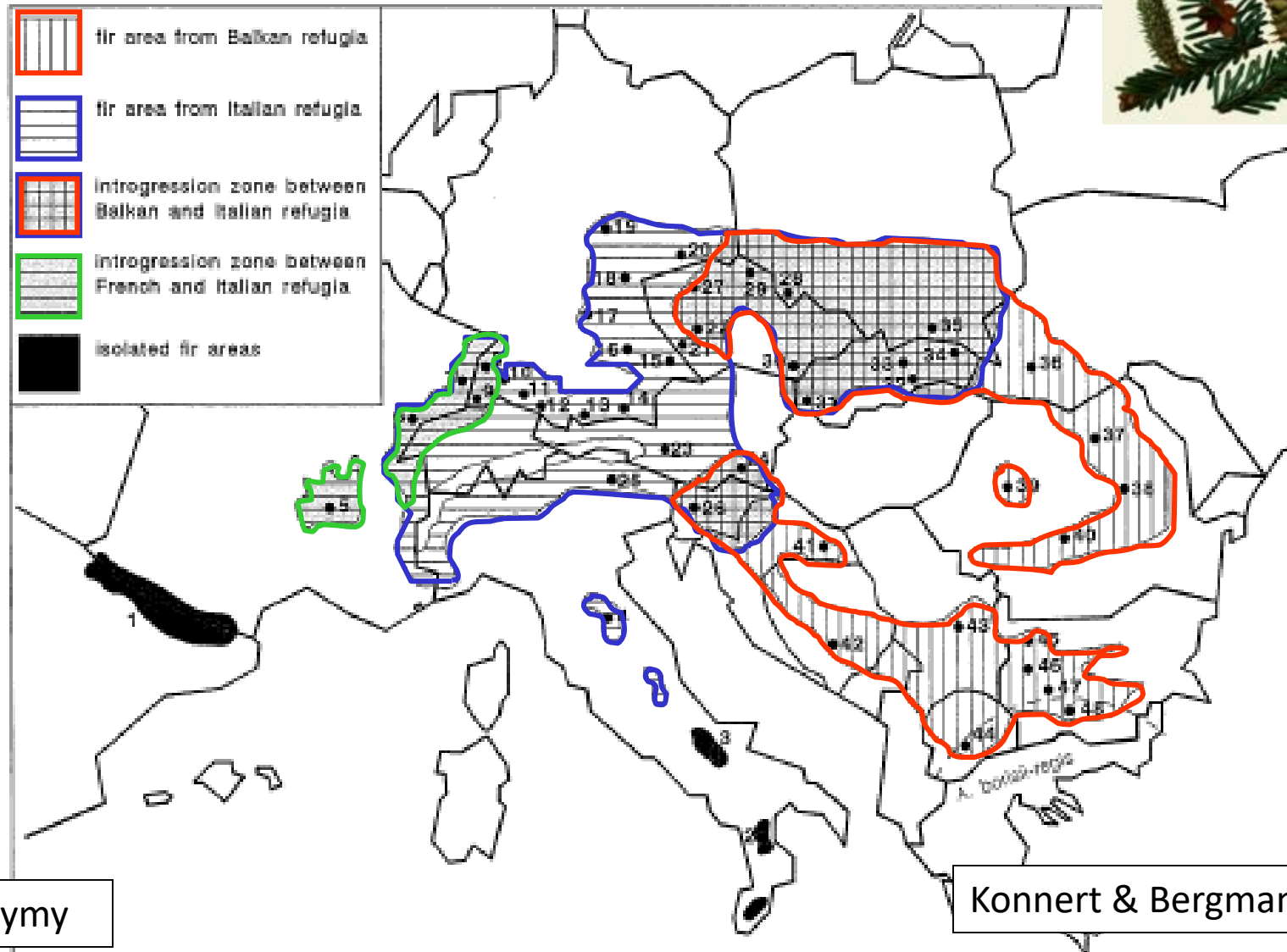
# *Rosa pendulina* – AFLP (DW)



AFLP

Daneck et al. (2016)

# Fylogeografie *Abies alba*

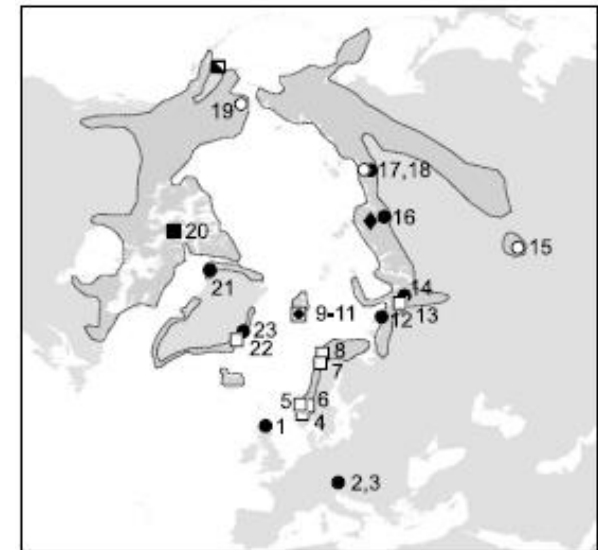
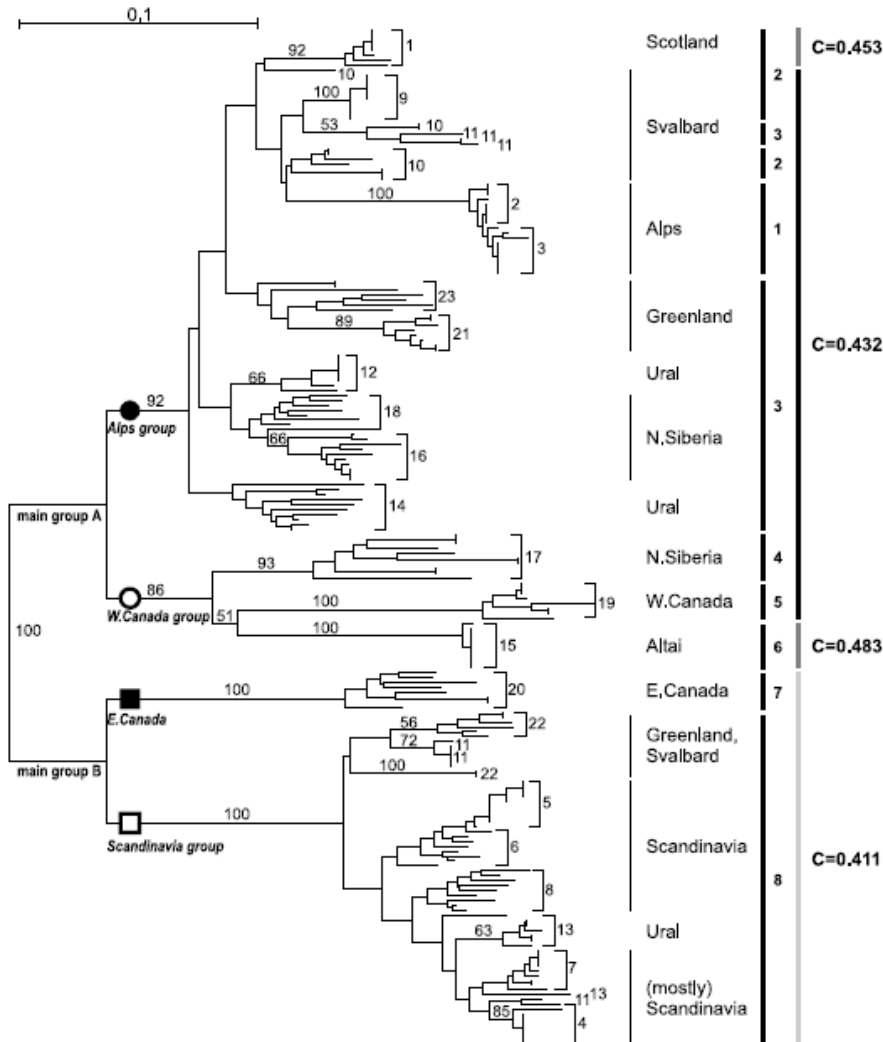


allozomy

Konnert & Bergmann 1995

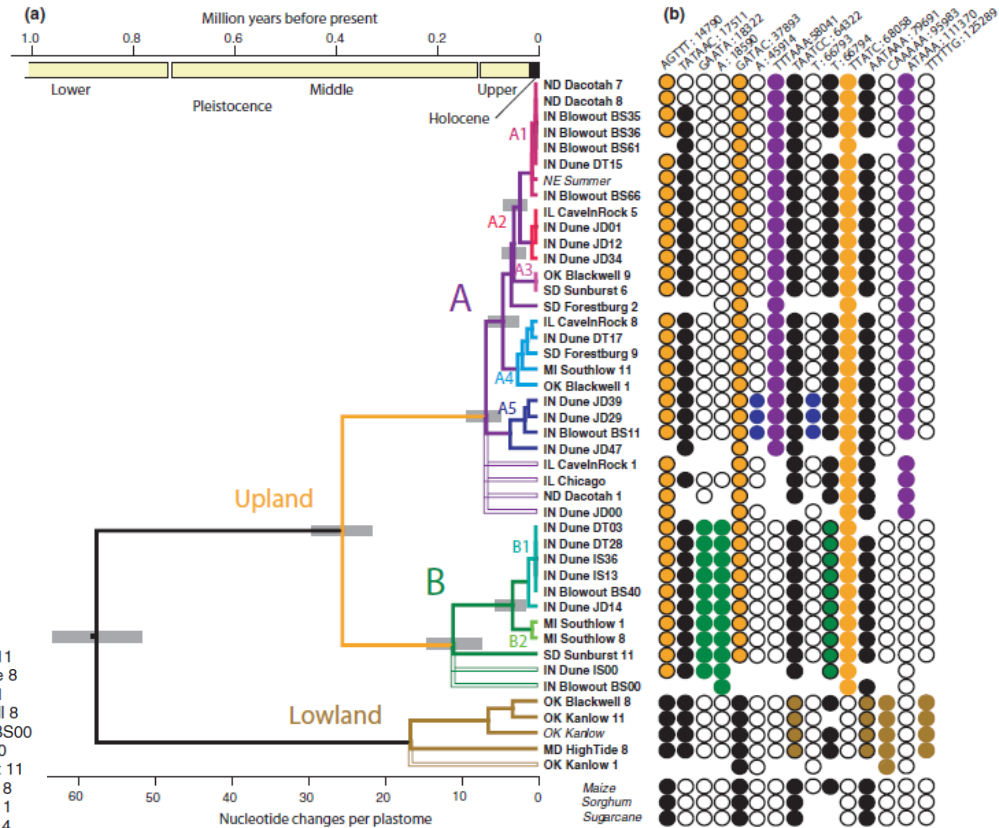
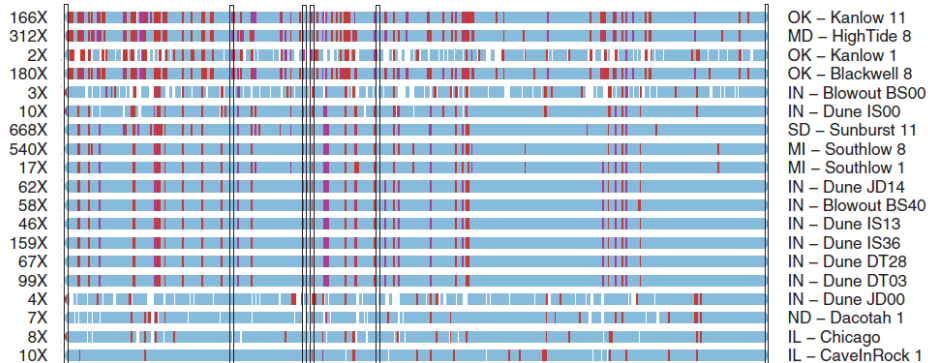
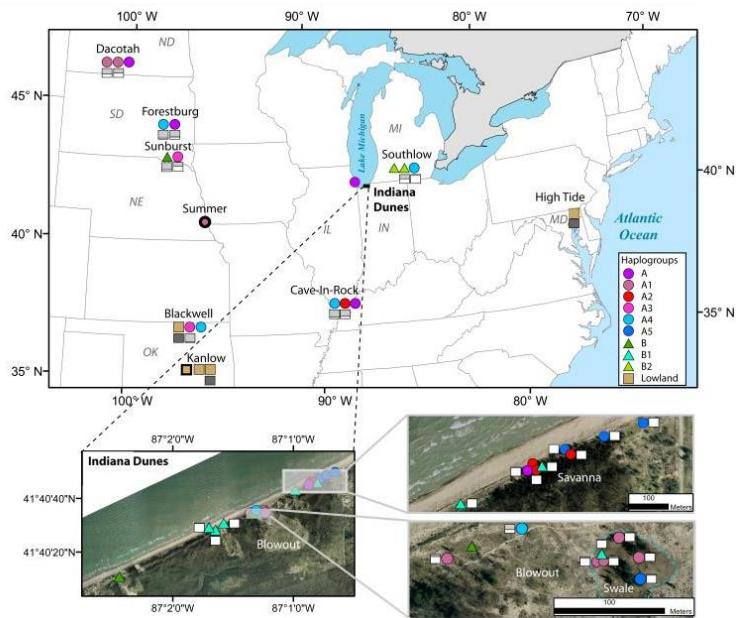


# Fylogeografie – AFLP



*Juncus biglumis*  
 cirkumpolárně, kryptické druhy  
 Schönswetter et al. 2007

# Fylogeografie – cpDNA



*Panicum virgatum*  
celý chloroplast  
203 variabilních SNP

Morris et al. (2011): Genomic diversity in switchgrass (*Panicum virgatum*): from the continental scale to a dune landscape. *Molecular Ecology* 20: 4938–4952