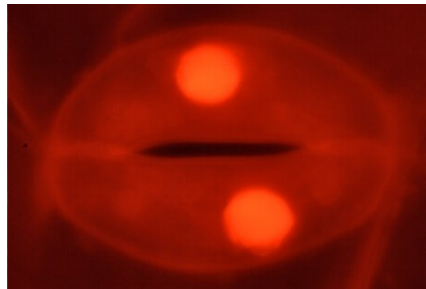


Velikosti rostlinného genomu

- První měření kolem roku 1950 (Swift PNAS 1950) – pro druh víceméně stálá hodnota
- Dnes údaje známé pro více než 12000 druhů cévnatých rostlin (C-value databáze v Kew)
- V poslední době se měří téměř výhradně pomocí průtokové cytometrie
- Vyjadřuje se v Mbp, Gbp (genomické studie) nebo v pg (cytometrické studie); přepočet $1\text{pg}=978\text{ Mbp}$ (Doležel et al.)
- 2C – velikost nereplikovaných zygotických jader, 1C (polovina 2C – hlavně v genomice), 1Cx – monoploidní velikost genomu (hlavně pro polyploidní komplexy)



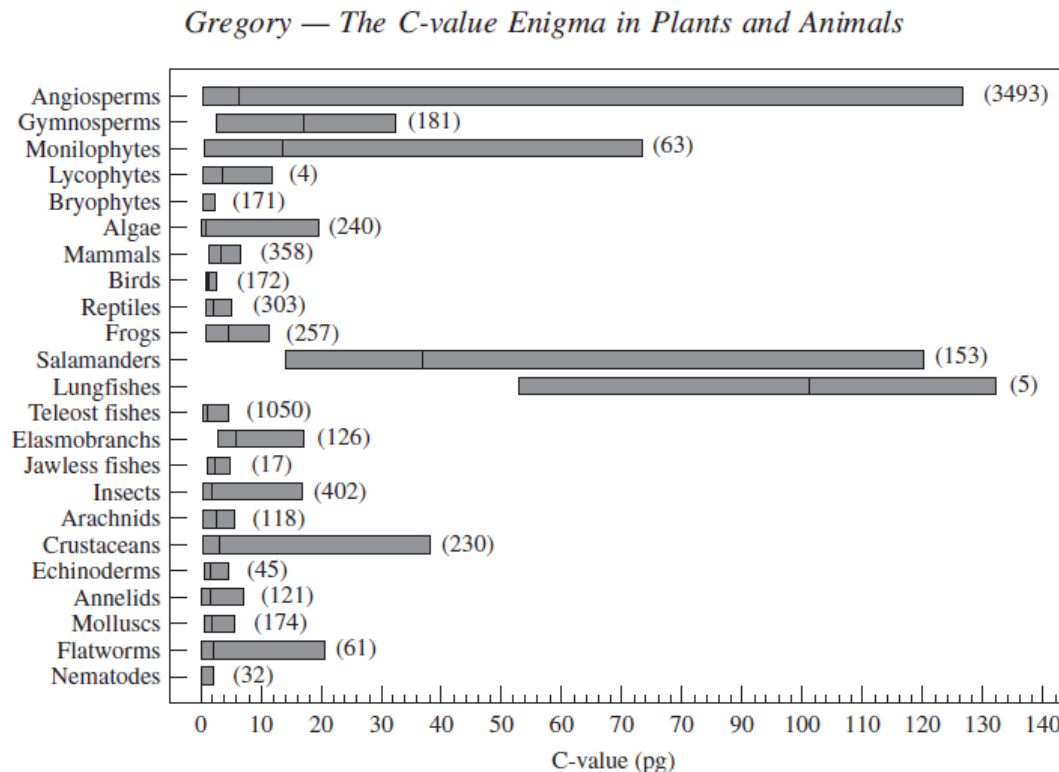
K čemu se to dá použít

- Identifikace druhu, hybridů
- Pro genomické studie – k čemu mají dojít
- Jednoduchá metoda na sledování změn v evoluci genomu a mapování modelových druhů (*Arabidopsis thaliana*, *Brachypodium distachyon*)
- Zajímavé ekologické souvislosti – to co nás v Brně hodně zajímá



Rostliny mají extrémně variabilní velikosti genomu

Cévnaté rostliny extrémně velká variabilita ve velikosti genomu >2300x
variabilita ve velikosti genomu (jader)



Extrémy ve velikosti genomu

Miniaturní genomy: *Lentibulariaceae*

Genlisea tuberosa 2C=**122** Mbp

Utricularia gibba 2C=**176** Mbp

Arabidopsis thaliana 2C=**314** Mbp

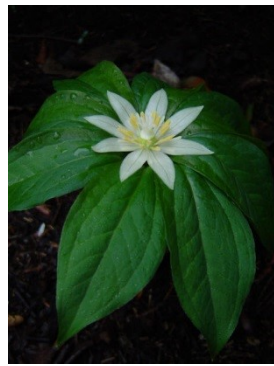
Bellis perennis 2C=**3 090** Mbp

člověk 2C=**6 153** Mbp

Gigantické genomy:

Viscum album 2C=**178 000** Mbp

Paris japonica 2C=**300 000** Mbp

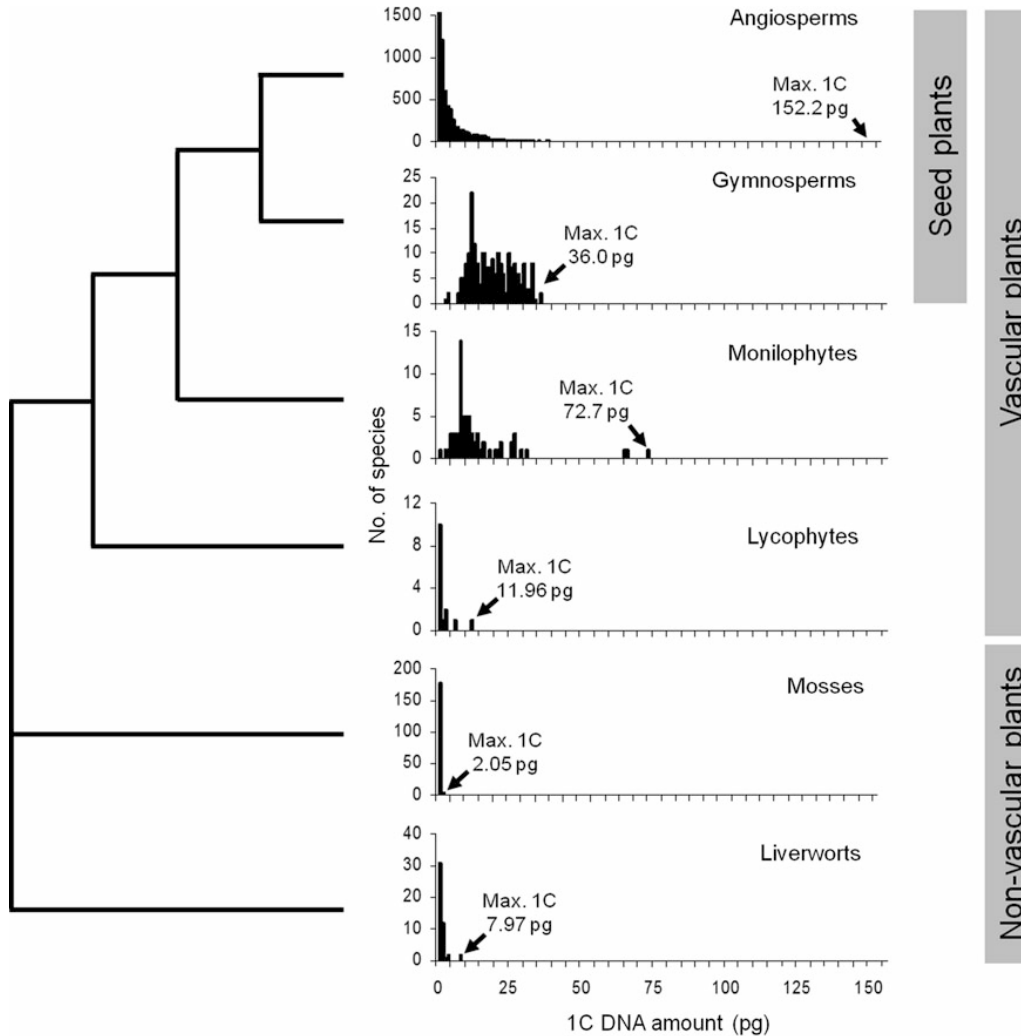


Velikost genomu – modelové organizmy

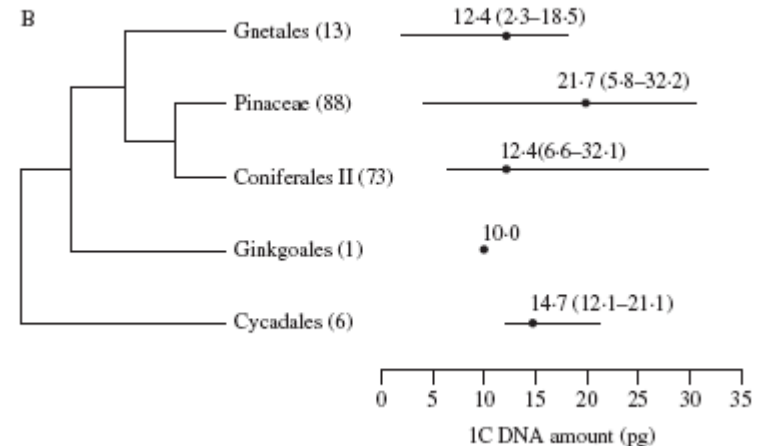
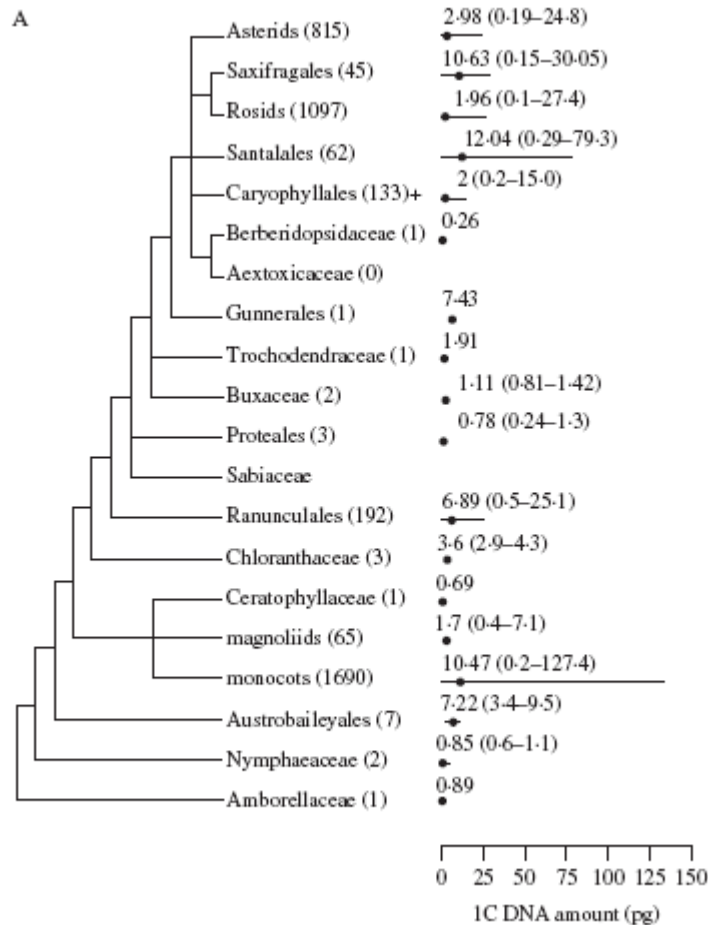
Table 16-1 Haploid Genome Sizes (in Nucleotide Pairs) of Model Genetic Organisms

Organism	Group	Genome Size
T4	bacteriophage	2.0×10^5
<i>E. coli</i>	bacterium	4.2×10^6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	yeast	1.8×10^7
<i>Neurospora crassa</i>	mold	2.7×10^7
<i>Dictyostelium discoideum</i>	slime mold	5.4×10^7
<i>Caenorhabditis elegans</i>	nematode	1.0×10^8
<i>Arabidopsis thaliana</i>	plant	1.0×10^8
<i>Drosophila melanogaster</i>	insect	1.4×10^8
<i>Mus musculus</i>	mammal	3.0×10^9
<i>Homo sapiens</i>	mammal	3.3×10^9
<i>Zea mays</i>	plant	5.4×10^9

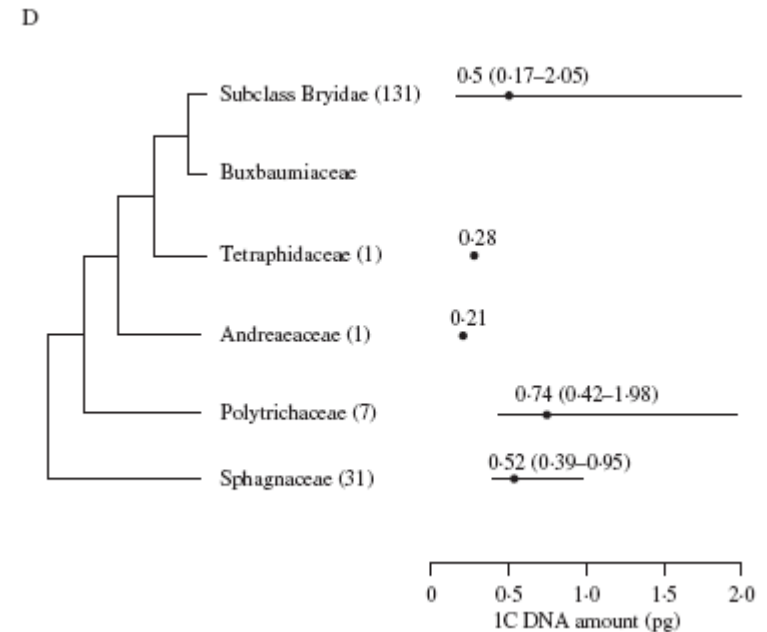
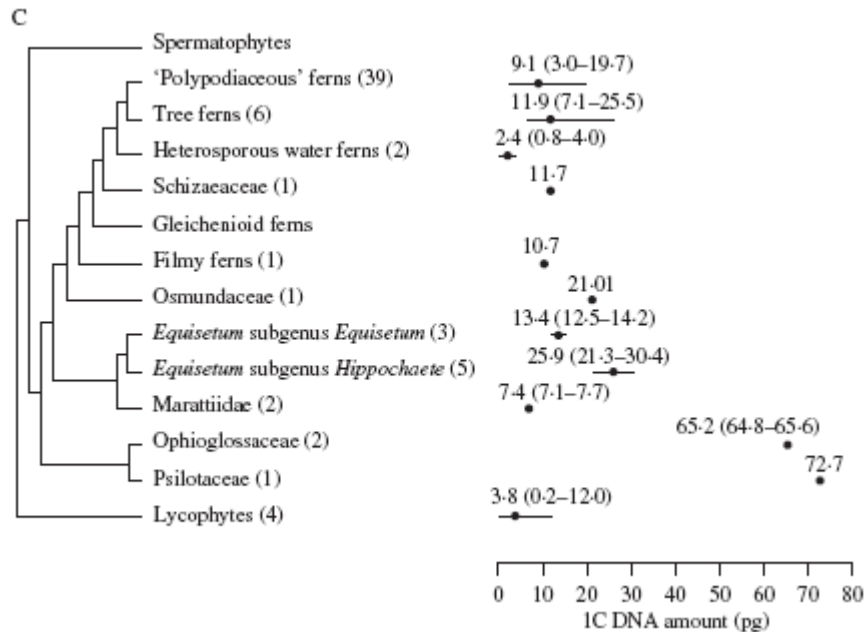
Velikosti genomu u vyšších rostlin



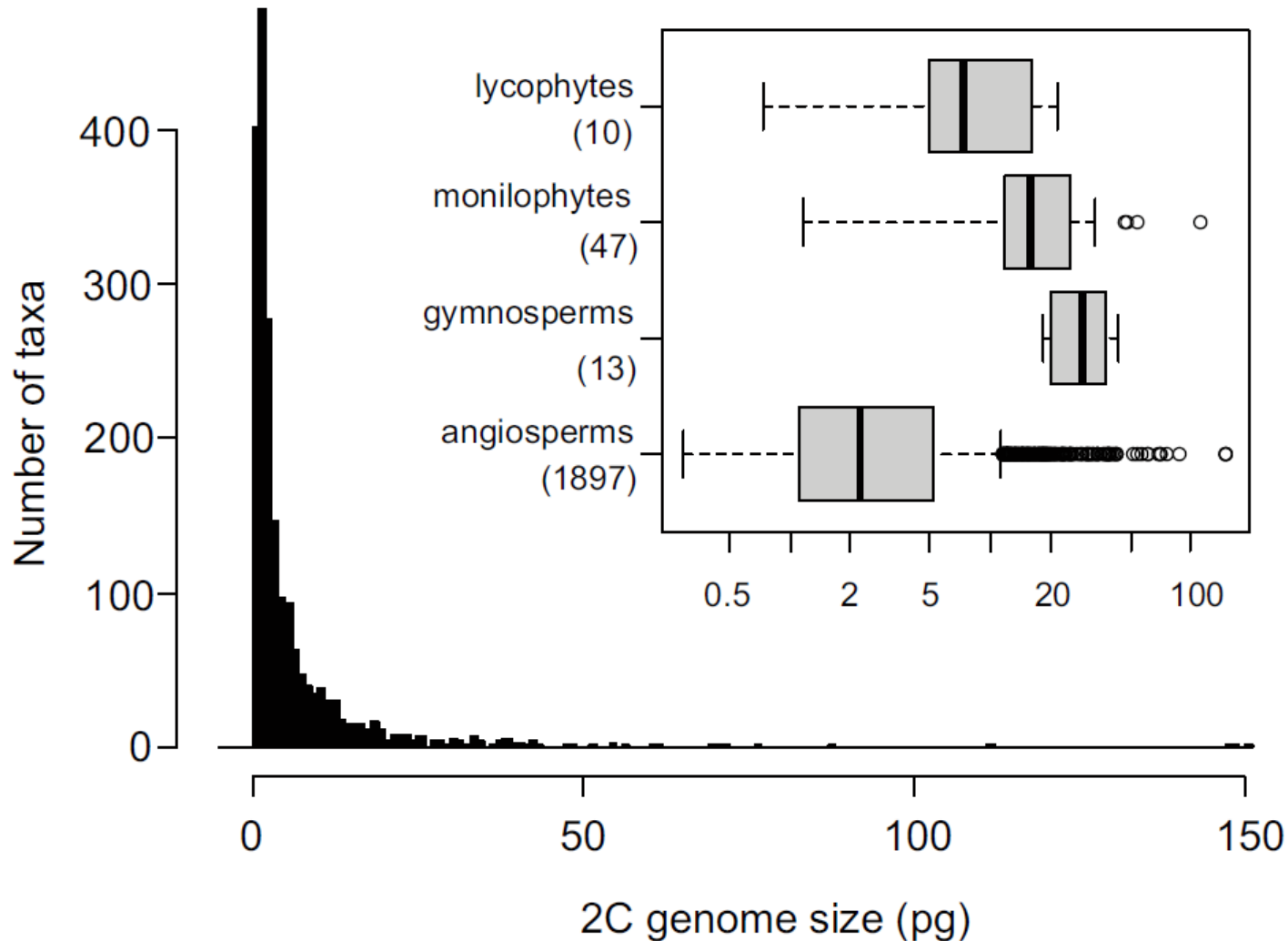
VG u nahosemenných a krytosemenných



VG u mechorostů a kapradin



Velikost genomu ČR



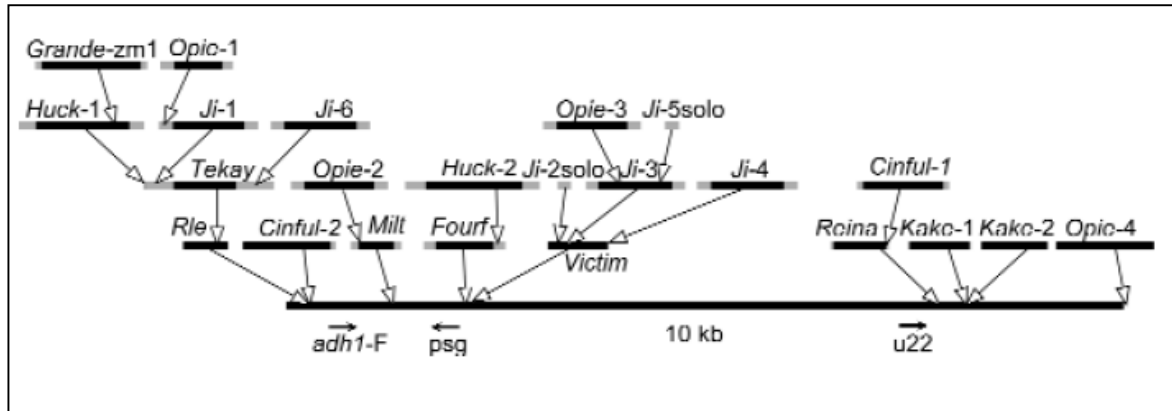
Důvody

- Chromozomální přestavby, B-chromozomy – prakticky zanedbatelné
- Současná nebo historická polyploidie (celogenomové duplikace) – důležité na menších evolučních škálách ale napříč rostlinami většinou nepodstatné (*Arabidopsis* je historicky asi 512-ploid, ale skoro úplně nejmenší rostlinný genom)
- Podstatné: amplifikace repetitivní DNA, zejména různých druhů retrotranspozonů; tvoří (3-)10-60(-80)% genomu
- C-value paradox – velikost genomu neodpovídá počtu genů ani komplexitě organismů (kukuřice ≈ člověk)

Genome	<i>Utricularia gibba</i>	<i>Triticum aestivum</i>
2C genome size (Mbp)	176	34 000
Retrotranspozony	< 3%	> 80%
Geny	> 66%	< 2%



Obsah repetitivních sekvencí – retrotranspozony

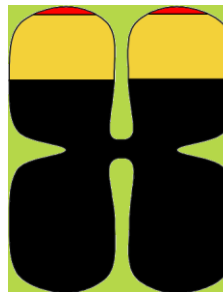


Oryza sativa

C/n= 0.04 pg

30.7 % retroelements

27.3 % (101 Mbp) genes



Triticum aestivum B genome

C/n= 0.83 pg

74.0 % retroelements

2.5 % (100 Mbp) genes



Složení repetice

Class, subclass, family	No. hits	No. bases, bp	% of chromosome 3B	% of wheat D-genome	% of maize genome	% of rice genome
Class I elements (retrotransposons)	16 167	7 427 147	68.7	48.0	63.4	18.8
LTR retrotransposons	15 762	7 284 358	67.4	47.0	51.2	12.6
<i>gypsy</i> -like	8971	4 183 925	38.7	24.4	30.5	8.9
<i>copla</i> -like	3473	1 517 721	14.0	13.7	20.7	3.7
<i>athila</i> -like	3297	1 577 450	14.6	8.8	<i>nd</i>	<i>nd</i>
TRIM	20	5262	0.0	0.1	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Non-LTR retrotransposons	405	142 789	1.3	1.1	0.1	0.5
LINE	390	139 475	1.3	1.1	0.1	0.1
SINE	15	3314	0.0	0.0	0.0	0.4
Class II elements (DNA transposons)	2025	610 236	5.6	11.6	1.3	10.4
CACTA	1567	529 672	4.9	10.8	0.3	2.8
Mutator	31	7443	0.1	0.1	0.0	0.5
MITE	338	50 530	0.5	0.4	0.3	4.0
LITE	89	22 591	0.2	0.3	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Unclassified elements	386	169 499	1.6	2.8	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Other known repeats	254	34 816	0.3	3.4	1.3	1.1
High-copy-number genes (ribosomal)	12	1571	0.0	1.1	0.0	0.1
Simple repeats	158	25 036	0.2	2.2	1.2	1.0
Tandem repeats	84	8209	0.1	0.2	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Unknown repeats	3595	1 036 509	9.6	8.2	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Total	22 427	9 278 207	85.9	74.0	66.0	30.7

LTR-retrotransposon

LTR-retrotransposon

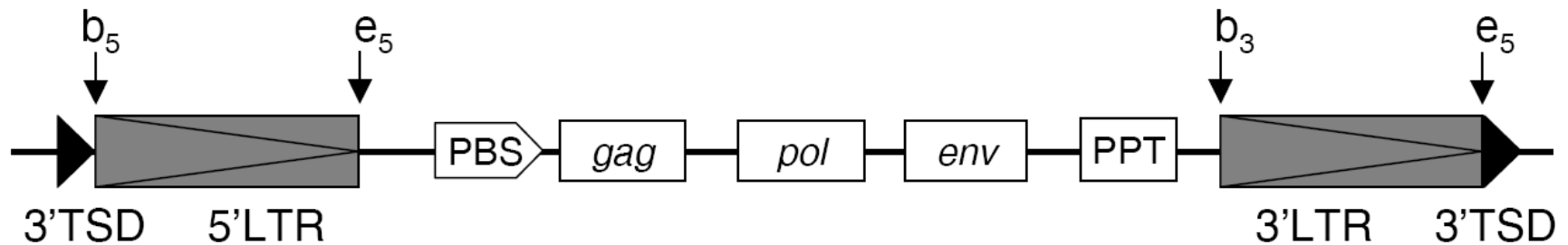
LTR = long terminal repeat

TSD = target site duplication

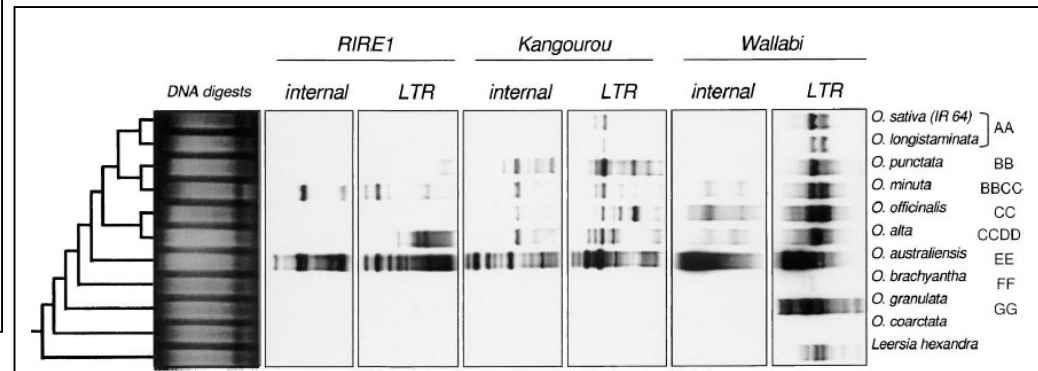
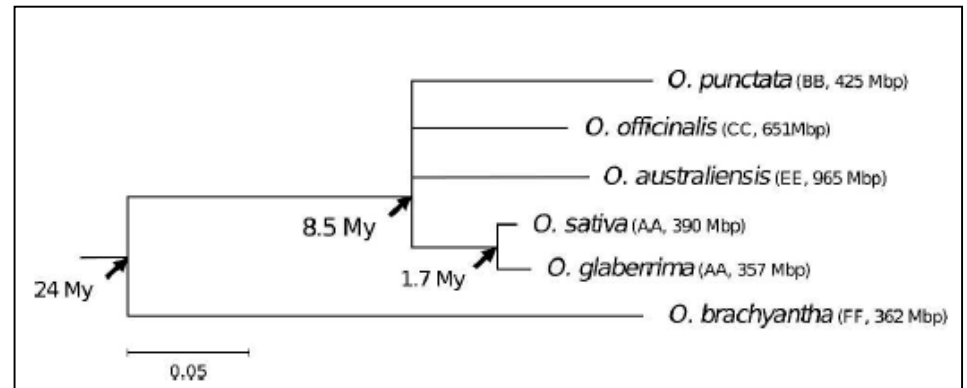
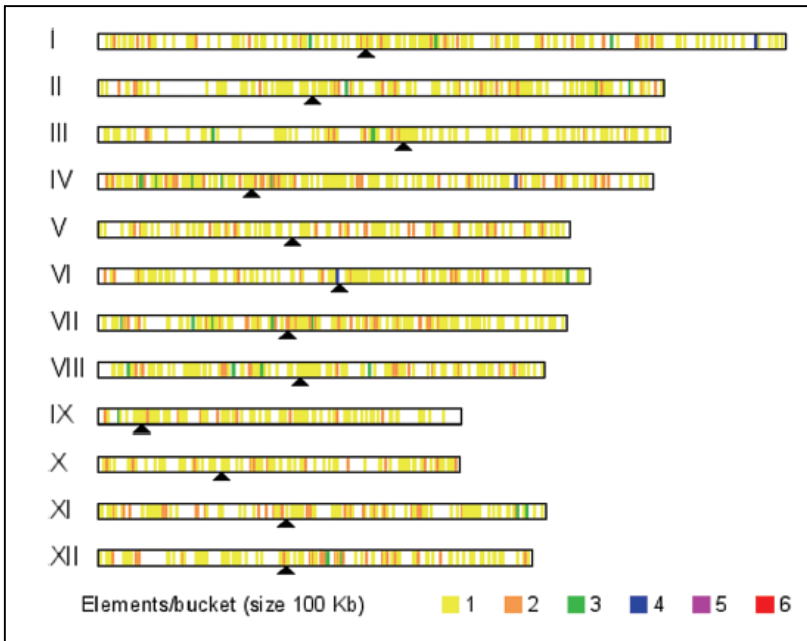
PBS = primer binding site

PPT = poly purine tract

gag, *pol*, *env* = open reading frames for genes

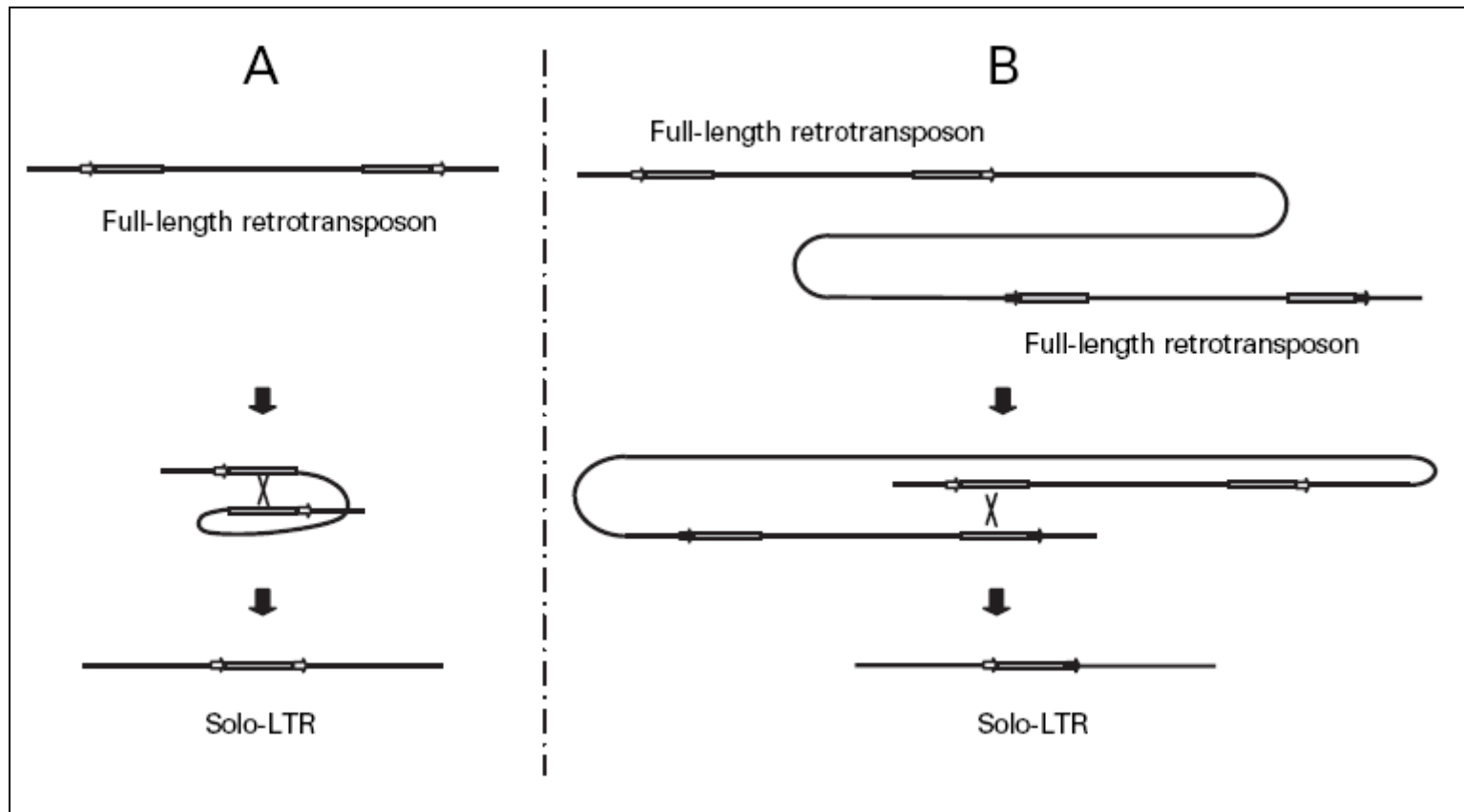


Retrotranspozony – *Oryza*



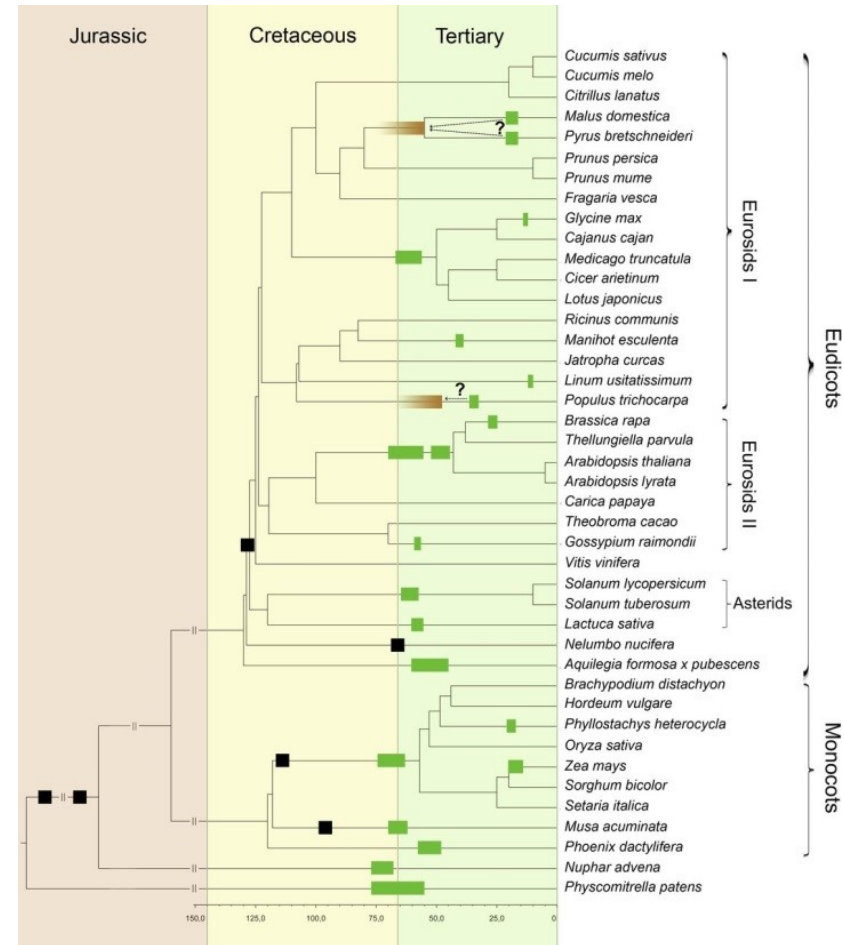
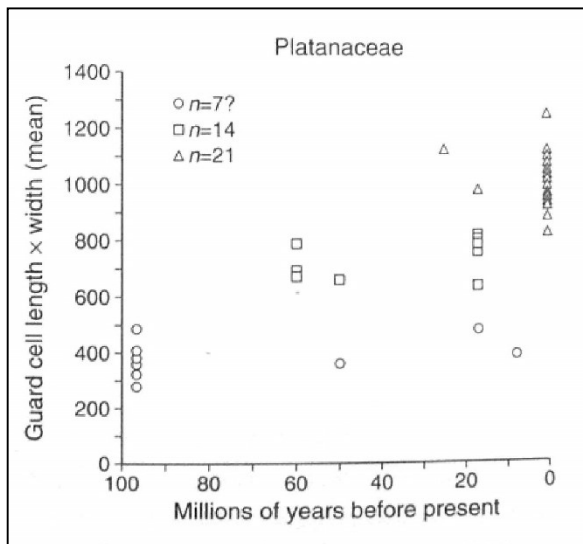
Eliminace retrotranspozonů

Hlavní mechanismus snižování VG – možná že schopnost eliminace dokonce určuje velikost genomu (Petrov 2002).



Polyploidie

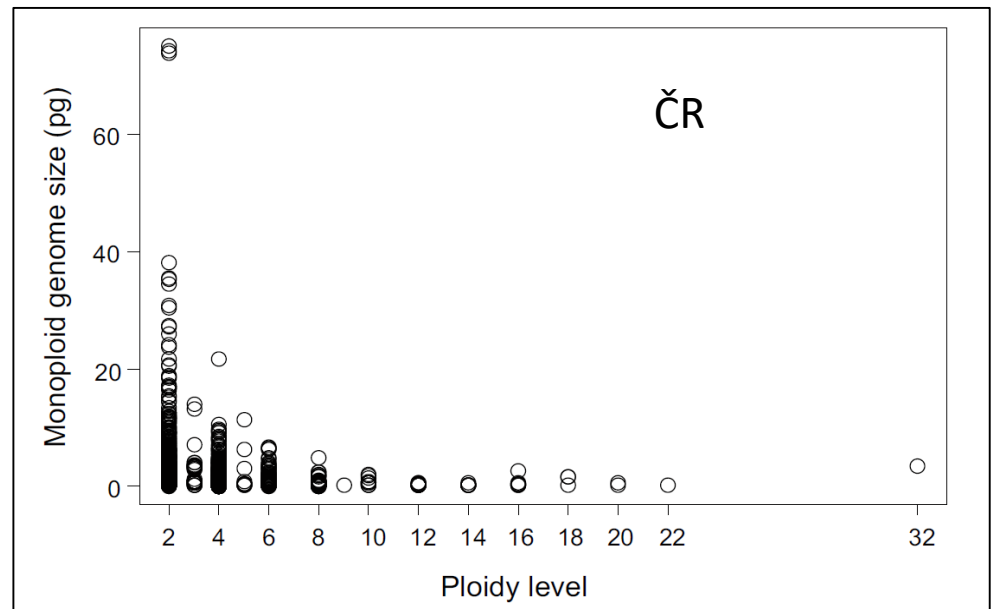
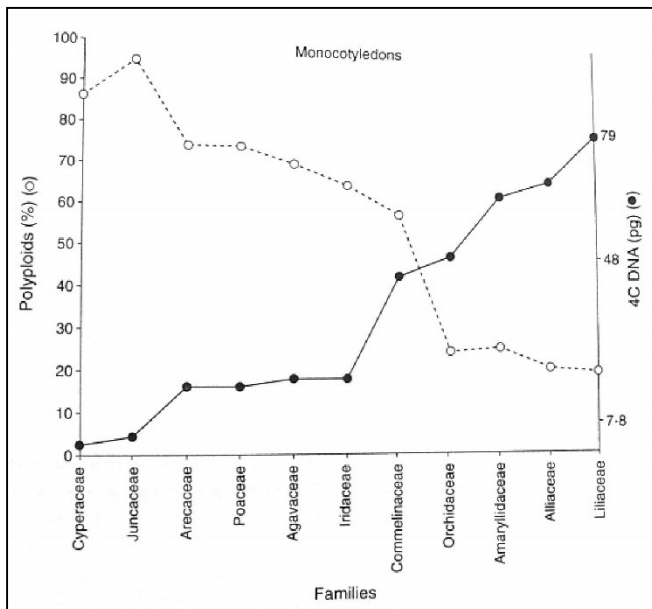
- Celá eukaryota paleopolyploidní (člověk je asi paleohexaploid) – v průběhu evoluce běžná diploidizace genomů
- Dvojděložné jsou paleohexaploidi
- V praxi detekujeme ale jen polyploidii starou několik milionů let - neopolyploidie



Vanneste et al. *Genome Res.* 2014

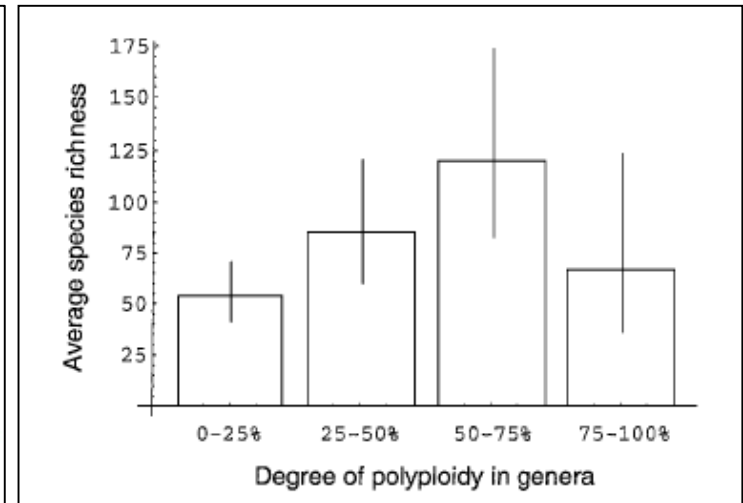
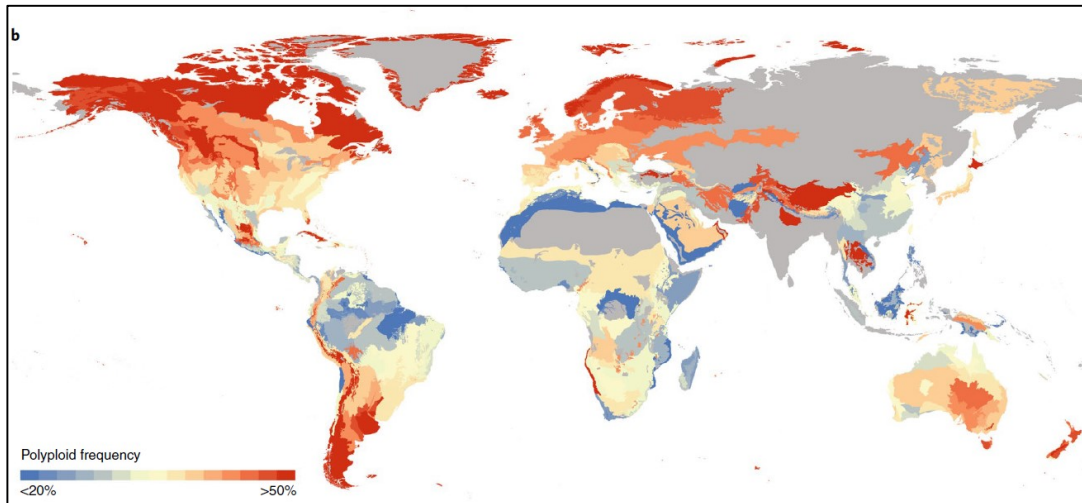
Recentní polyploidie - neopolyploidie

- Historické odhady od 30–70(80) %; 34% (Rice et al. 2019)
- Některé skupiny málo polyploidní – *Apiaceae*, *Arecaceae*
- Hodně polyploidizují např. *Poaceae*, *Violaceae*
- Málo polyploidů u rostlin s velkým genomem



Recentní polyploidie - neopolyploidie

- Polyploidie častější ve vyšších zeměpisných šířkách (Rice et al. 2019), na horách
- Polyploidi jsou častěji vytrvalé byliny, „selfři“, jen vzácně ale stromy
- Polyploidní rody jsou druhově bohatší avšak polyploidi mají méně často speciují (viz Mayrose et al. 2011)



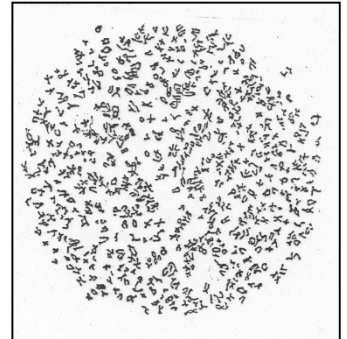
Recentní polyploidie – extrémní



Haplopappus gracilis
 $2n = 4$



Ophioglossum reticulatum
 $2n = 96x = 1440$



Viola modesta
 $2n = 4$



Sedum suaveolens
 $2n = 80x = 640$



Voaniola gerardii - $2n = 50x = 596$

Extrémní polyploidie – pletiva

Somatická polyploidie

- endopolyploidie
- *Scilla*, *Beta* (70-80 % buněk)
- často u malých genomů, zásobních pletiv



Pisum sativum
dělohy - 64 n



Scilla bifolia
antipody - 1 024 n
elaiosom - 4 096 n



Arum alpinum
endosperm - 24 576 n

Phaseolus coccineus
suspensor - 8 192 n

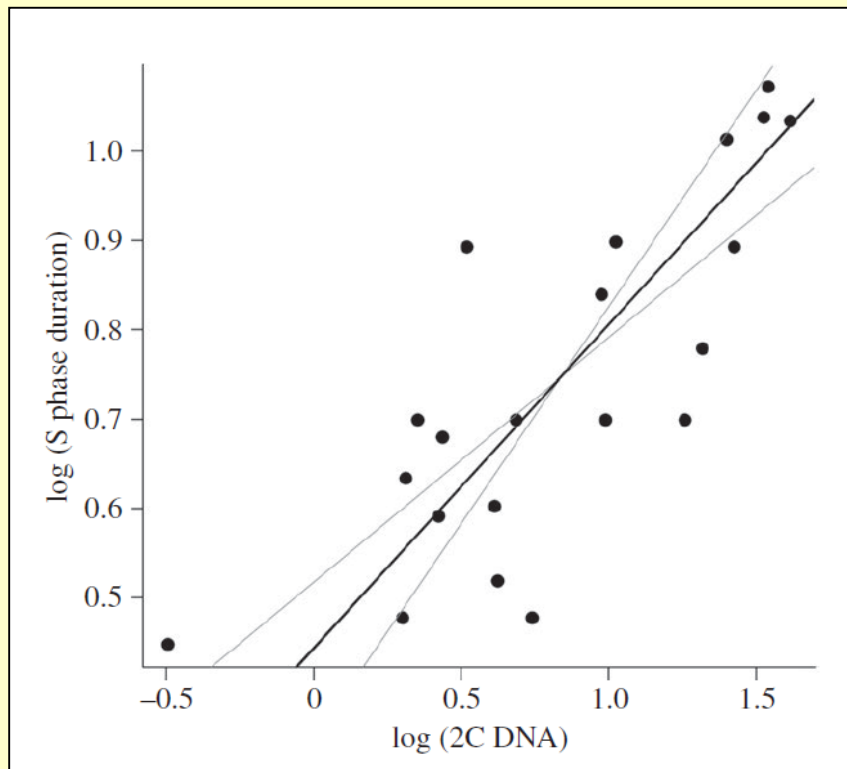


Důsledky – nucleotype effect

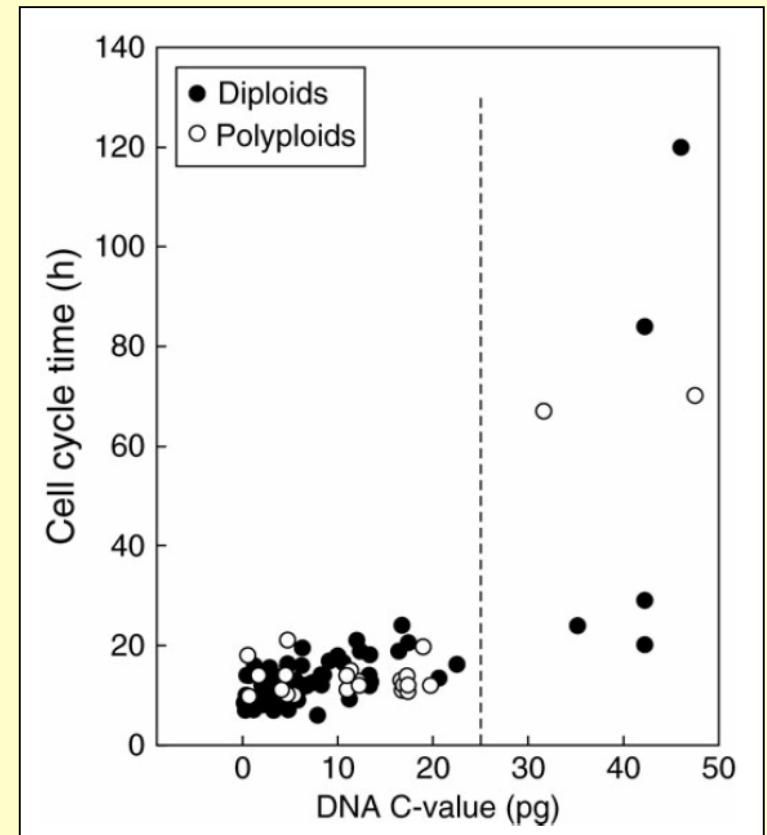
- Vložení retrotranspozonu do/v okolí genu může změnit jeho expresi a funkci; proč ale rostliny tolerují/potřebují tak moc transpozonů v genomu ale není jasné (možná používány k diverzifikaci genomu za stresu/v nouzi?; transpozony asi nemají nějakou významnou strukturní funkci jak se předpokládalo – viz genom *Utricularia gibba* fungující i se 3% transpozonů)
- Duplikované geny polyploidů dovolují různé mutační/evoluční experimenty s „redundantními“ kopiemi genů -> může za vyšší adaptivní potenciál polyploidů a jejich vyšší šanci na úspěšný „útěk“ z daného genomického nastavení (stáze)
- Nicméně i sám obsah **DNA má pasivních, okamžitých a stálých efektů (nucleotypic effects; „genome size syndrome“)**, které mohou podstatně ovlivňovat dostupné životní a ekologické strategie rostlin:
 - Trvání buněčného cyklu (mitóza, meióza)
 - Velikost buňky
 - Nutriční (fosfor) nároky

Větší genom = pomalejší buněčné dělení

Existuje pozitivní korelace mezi velikostí genomu a trváním DNA replikace (S fáze buněčného cyklu), trváním meiózy, mitózy a následně i celého buněčného dělení



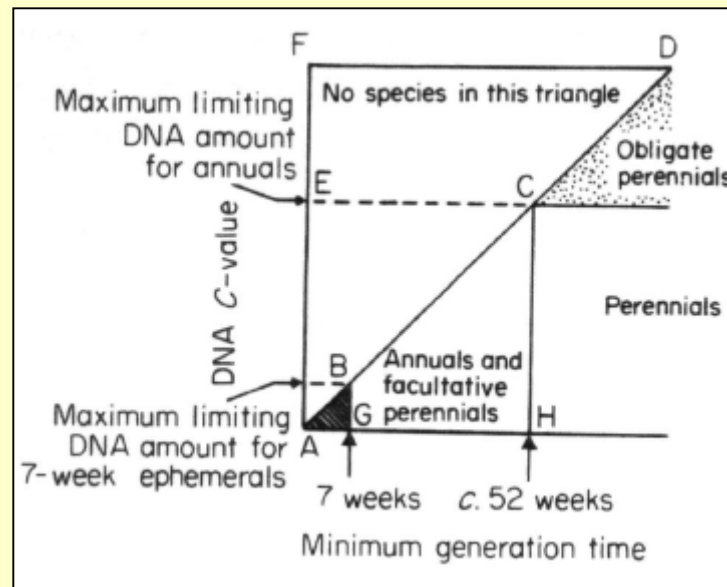
Šímová & Herben *Proc. Roy. Soc. London B* 2012



Francis et al. *Ann. Bot.* 2008

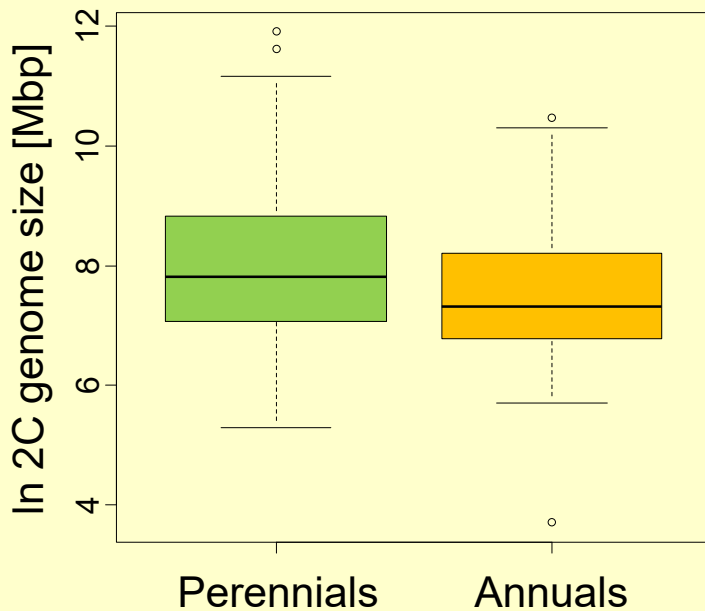
Důsledky pomalého buněčného dělení

- Rostliny s velkým genomem nemohou růst dostatečně rychle na to, aby stihly dokončit svůj životní cyklus v rámci jedné sezóny, a musí být proto vytrvalé
- Velmi malé genomy jsou proto typické pro efemérní druhy (*Arabidopsis*, *Erophila*, *Veronica*...) a jednoletky

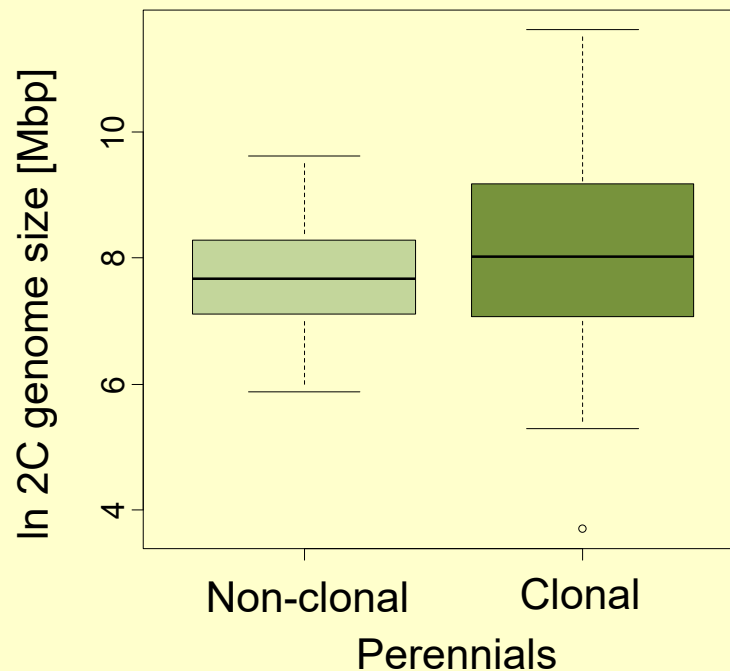


Funguje i u českých kytek

- Velikosti genomu pro >1600 druhů, pglS analýza z trait daty v databázi CLOPLA (reprezentativní pro české kytky)



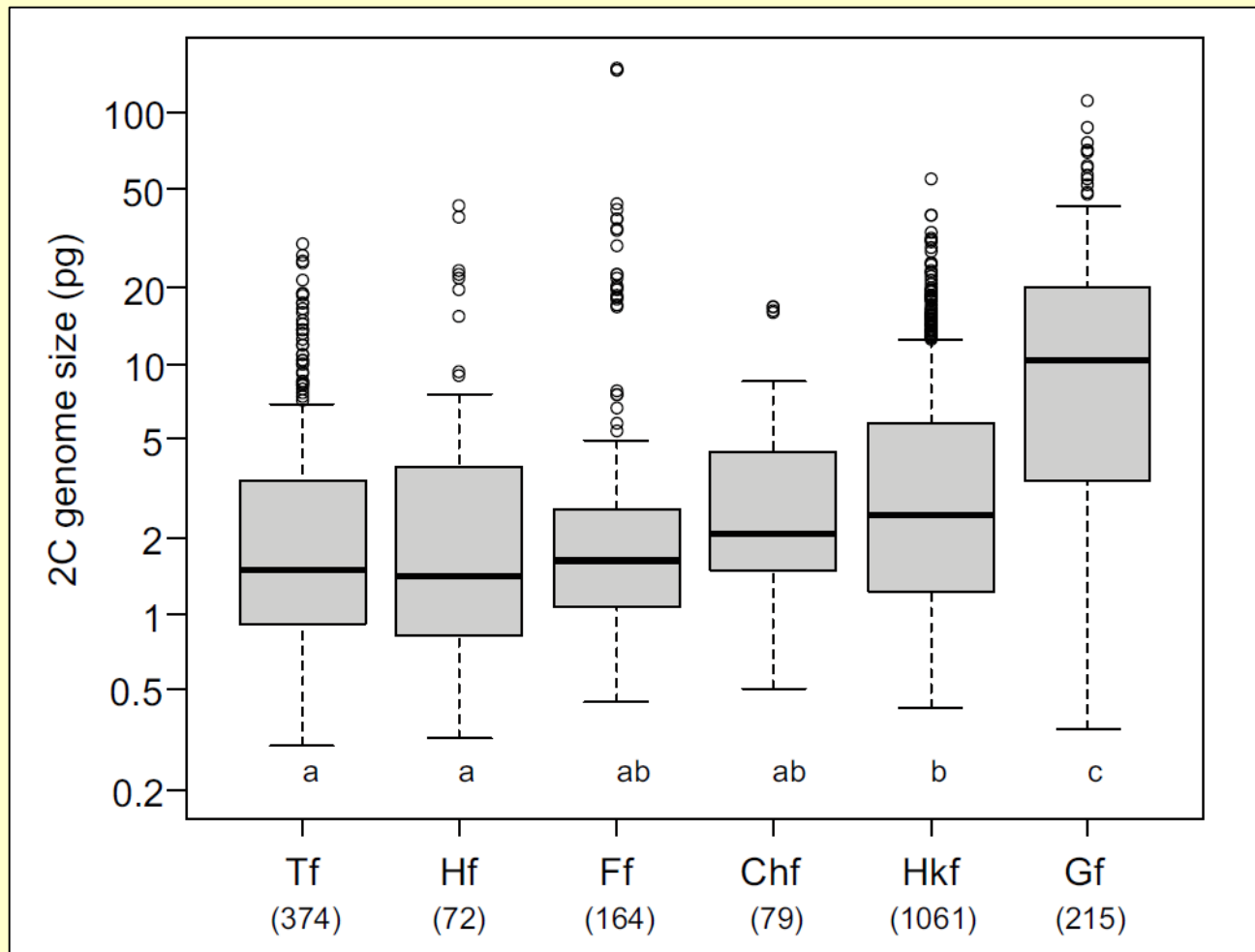
$p < 10^{-15}$; $R^2 = 0.06$; $N = 1220$



$p < 0.03$; $R^2 = 0.004$; $N = 917$

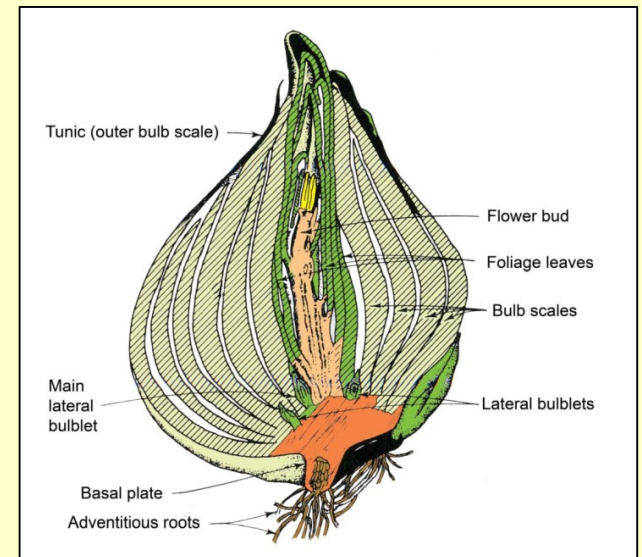
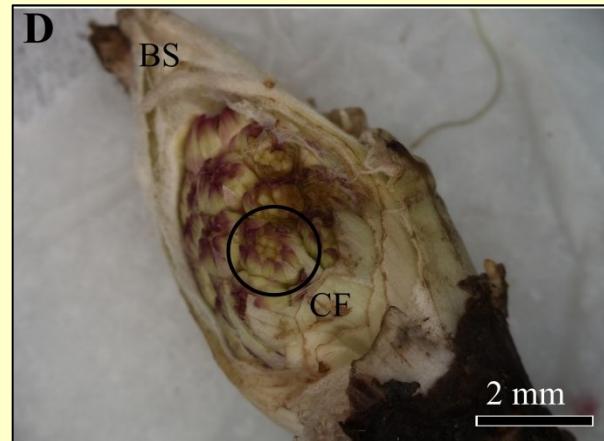
Funguje i u českých kytek

- Velikosti genomu pro >1900 druhů



Velký genom ale nemusí překvapivě znamenat pomalý růst

- Temperátní jarní geofytní druhy mají nápadně větší genomy než jejich příbuzní; i přes to jsou ale na jaře schopni vyrůst velmi rychle, aby stihly vývoj před zápojem stromového patra (zastínění)
- Tady je rychlý „růst“ zajištěn předdělením buněk v hlízách, které probíhá v „dormatním“ stavu, kdy jsou hlízy pod zemí (může trvat i několik měsíců). Na jaře se předdělené buňky naplní vodou, což zajistí rychlý nárůst objem a „růst“ – výsledkem je dužnatost
- Podobně to možná funguje obecně i u pupenů a vypadá to, že byliny s větším genomem rostou paradoxně rychleji! (Herben et al.)



Zásobní orgán = větší genom

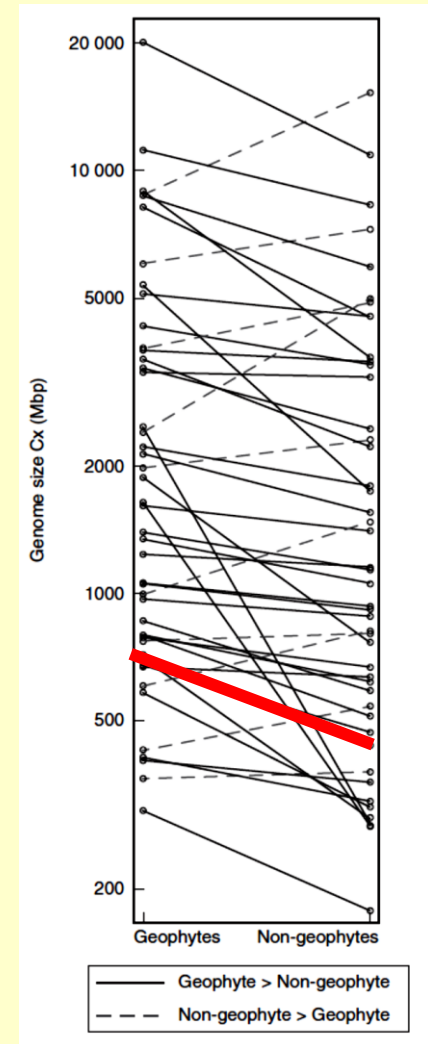
- Energetické/materiální zásoby u rostlin se zásobními orgány pravděpodobně dovolují nerušenou DNA replikaci a buněčné dělení – geofytní rostliny proto asi mohou tolerovat větší genomy



Cx=470 Mbp

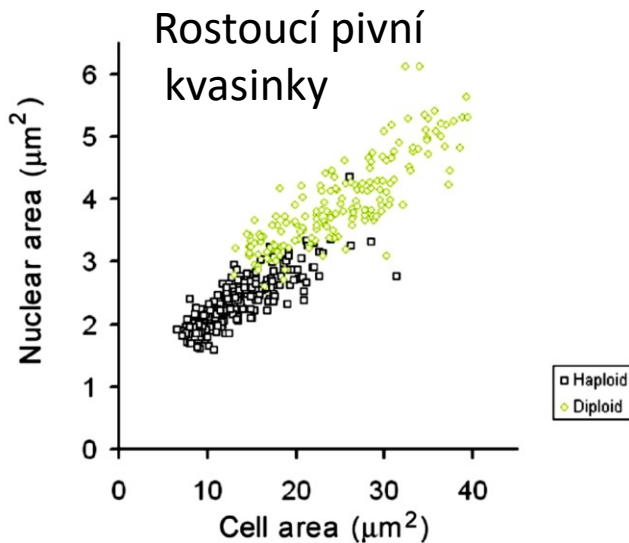


Cx=676 Mbp

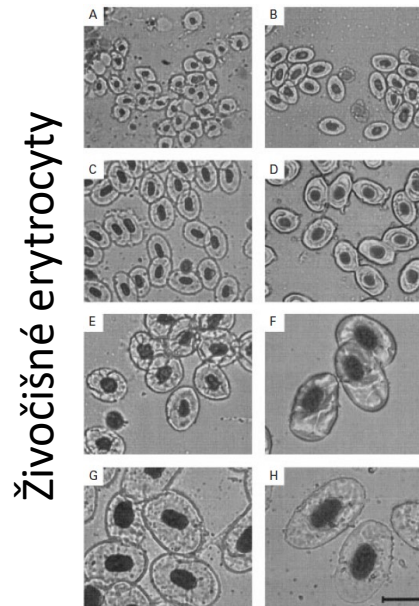


Větší genom = větší buňka

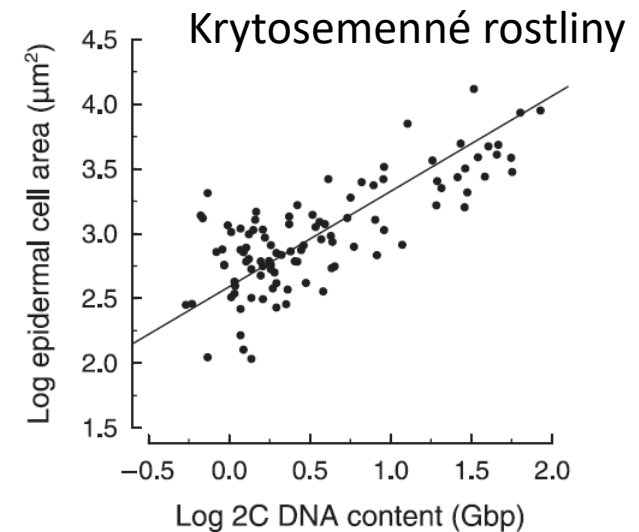
- Existuje úzká korelace mezi velikostí jádra (genomu) a množstvím cytoplazmy v buňce (důvody jsou nejasné – možná optimalizace metabolické efektivity)
- Velikost genomu a obsah cytoplazmy proto napříč různými organizmy určují minimální velikost buňky; buňka se ale může dále zvětšovat vakuolami téměř do nekonečna
- Nejtěsnější korelace velikosti genomu u meristematických buněk a průduchů – mají minimum vakuol a je zde silná selekce na metabolickou efektivitu; nebo u pylových zrn – velká velikost by omezovala pohyblivost (dolet; třeba u kukuřice)
- Relativně dobrá korelace u rostlin také s velikostí epidermálních buněk



Jorgensen et al. *Mol. Biol. Cell* 2007



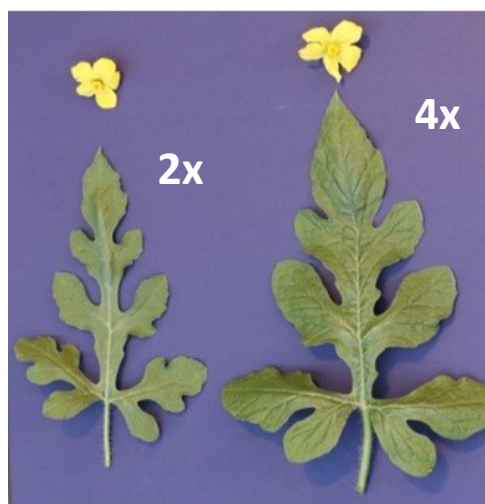
Gregory *Biol. Rev.* 2001



Beaulieu et al. *New Phytol.* 2008

Větší genom (=) větší rostlina

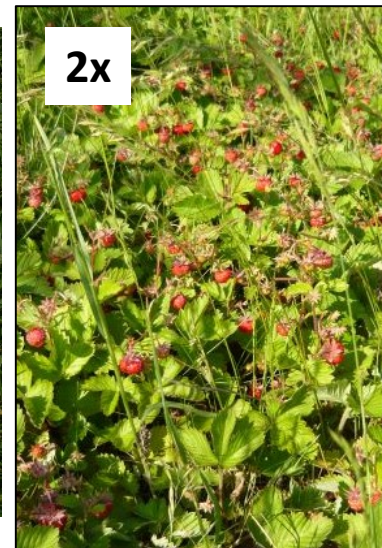
- Korelace s velikostí genomu slábne při porovnání velikosti orgánů a téměř zmizí při porovnání s celkovou velikostí rostliny – se vzrůstající komplexitou roste důležitost počtu a tvaru buněk
- Velikostní trendy ale patrné při porovnání příbuzných druhů (polyploidní agregáty, diploidní a polyploidní plodiny = gigas efekt)



Citrus lanatus



Leucanthemum album
L. xsuperbum



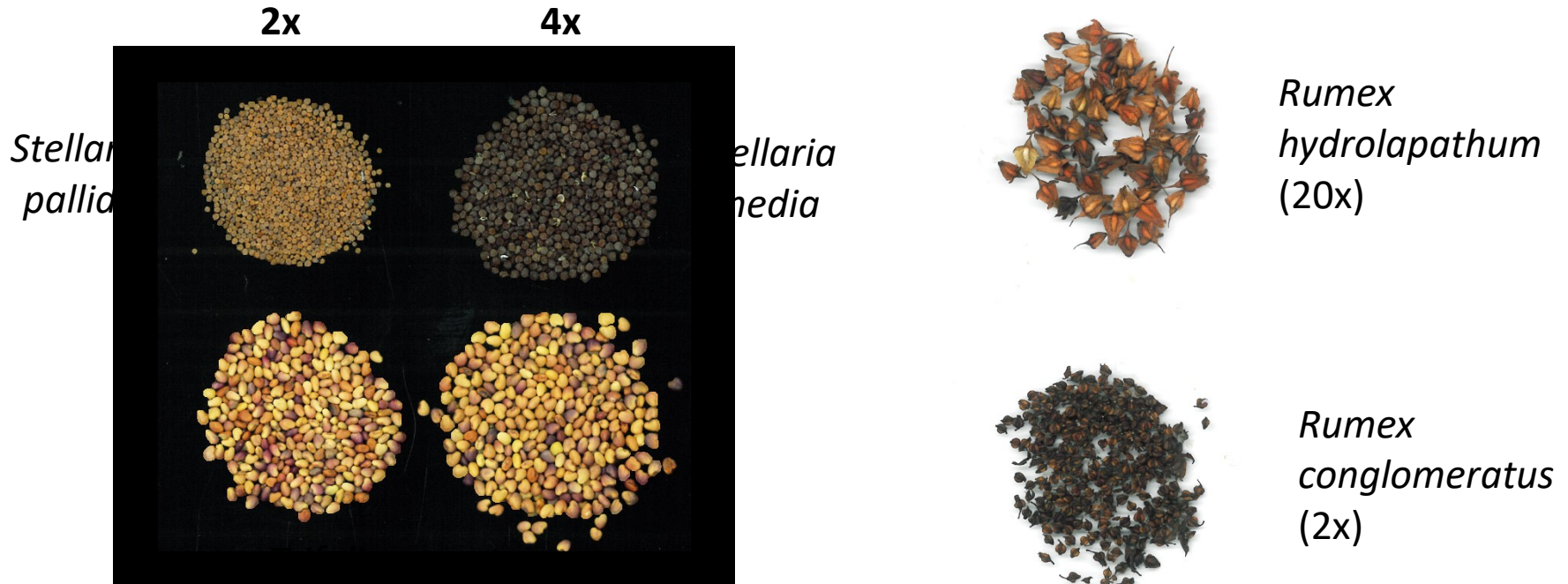
Fragaria vesca



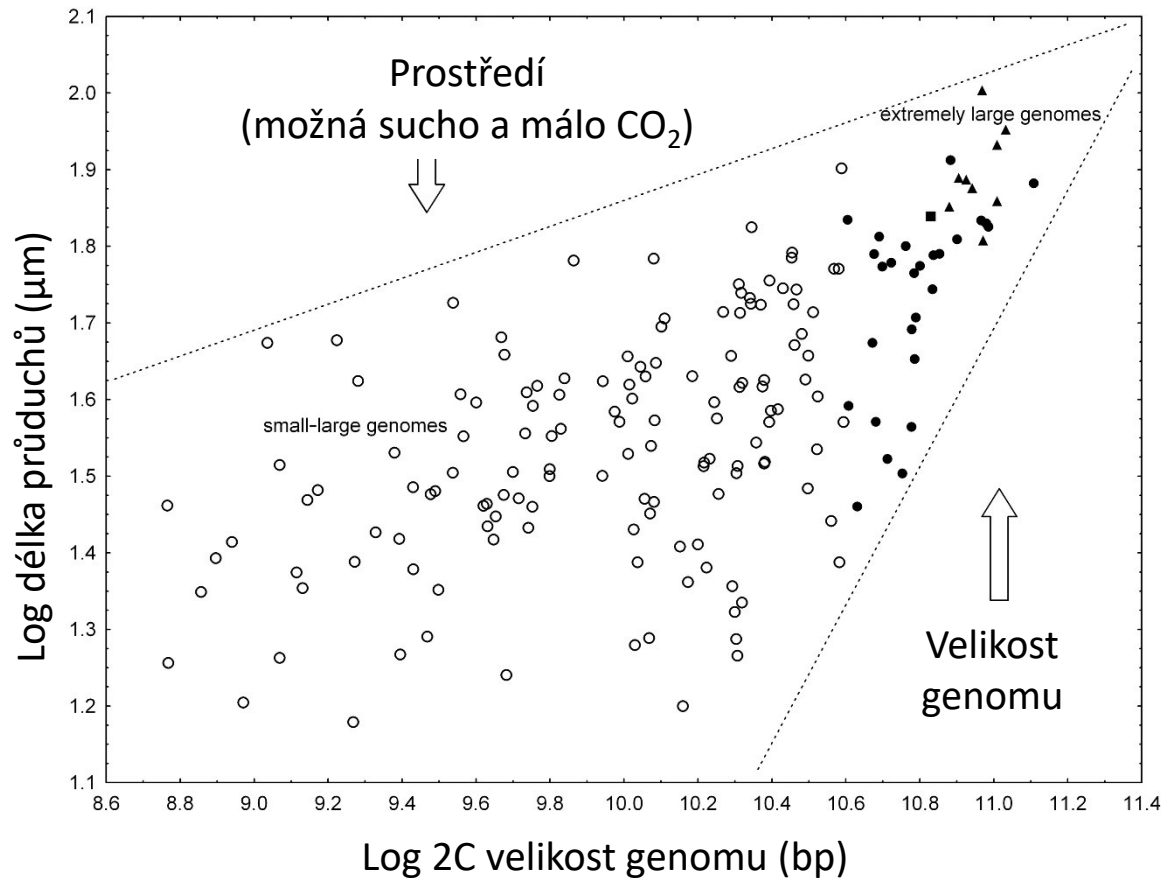
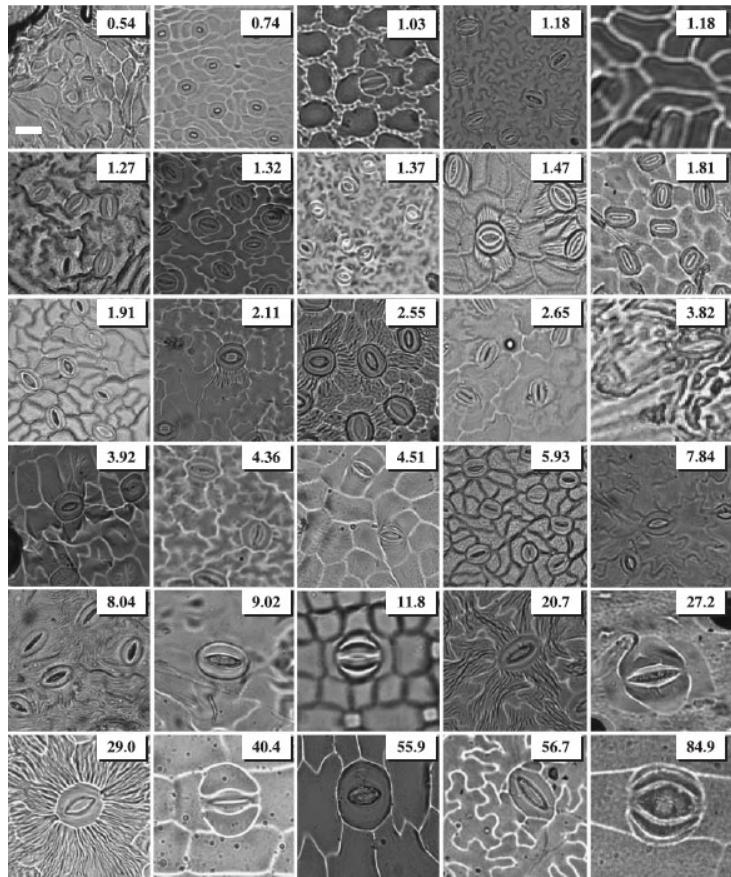
Fragaria xananassa

Větší genom (=) větší semeno

- V absolutním měřítku velikost semena samozřejmě závisí hlavně na jeho designu a počtu buněk, ze kterého je tvořeno
- Vztah se velikost genomu pozorovatelná zejména u blízce příbuzných druhů, např. v polyploidních agregátech
- Rozdíly můžou hrát roli v úspěšnosti šíření, uchycení,....

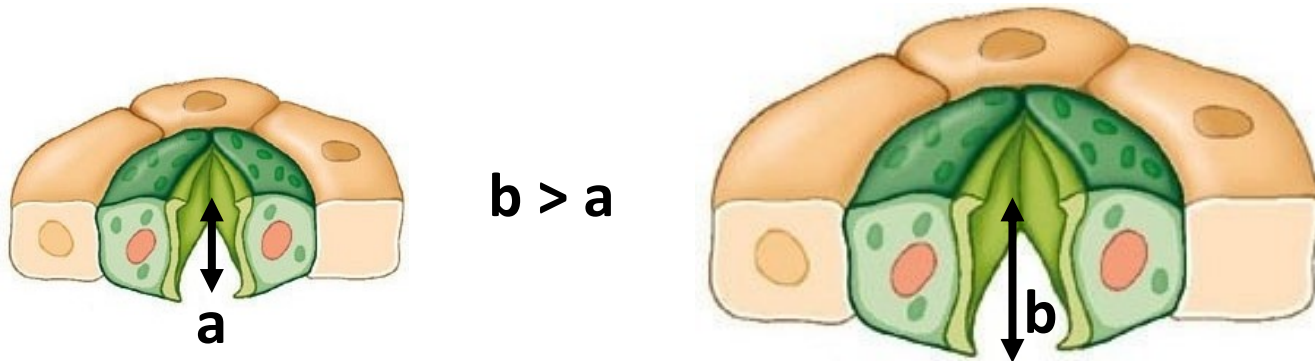


Větší genom = větší průduchy



Větší průduch = méně efektivní průduch

- Možná nejdůležitější efekt velikosti genomu s přímou návazností na fyziologii a ekologii rostlin; zatím skoro neprobádané
- Čím je větší (širší) svěrací buňka, tím je hlubší průduchová štěrbin a tím je delší i cesta pro difúzi/výměnu plynů (CO_2 , vodní pára)
- Větší průduch je proto méně efektivní při příjmu CO_2 (základní strava rostlin a složka biomasy) – k získání stejného množství CO_2 musí větší průduch zůstat otevřený déle – to je bezpečné pouze ve stabilně vlhkém prostředí
- Z většího tepla se kytka hůř chladí (menší transpirace)

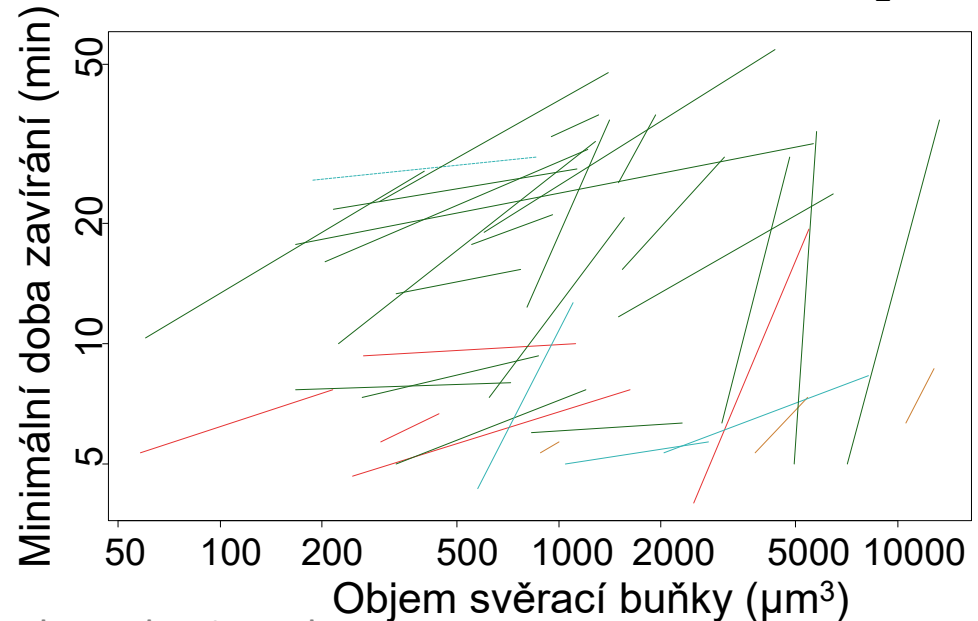
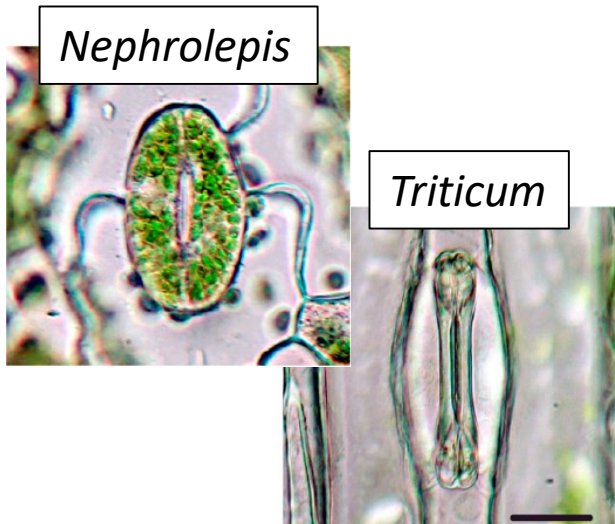


Hypotetické důsledky

- Úspěšnost kytek v glaciálu za velmi nízkého CO₂ vesrsus současnost – mohlo by souviset s expanzivností jednotlivých druhů
- Jarní geofyty (velké genomy a průduchy) – můžou fungovat jen za dostatku vláhy na jaře + stabilní podmínky uvnitř lesa +nemusí tolik chladit
- Potenciálně horší chlazení listů možná důsledek toho, proč jsou polyploidní zejména v arktických oblastech a ne v tropech a subtropích (krom jiných teorií) a proč jsou v tropech kytky jen s malými genomama.
- parazitické rostliny mají větší genomy (např. *Viscum*, *Melampyrum*) – o vodu a efektivitu průduchů se nestarají – vodu si berou z hostitele (asociované houby)
- pokud rostliny s velkým genomem a velkými průduchy chtějí růst v suchém prostředí, vyžaduje to řadu xerofytních adaptací (např. jehličnany s univerzálně velkými genomy a průduchy)
- udržení transpiračního proudu (bránění kavitaci) možná může za malé, ne-polyploidní genomy u krytosemenných stromů)
- Efektivní průduchy nutné pro fotosyntézu a produkci biomasy – možná vztah velikosti genomu a produktivity prostředí (např. malé genomy v tropech)

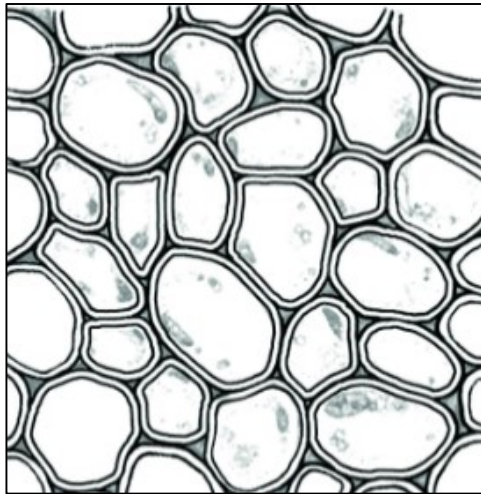
Větší průduch = pomalejší průduch

- Rychlé zavírání umožňuje lepší hospodaření s vodou, hodí se jako reakce na náhlé změny prostředí – např. zvýšená transpirace v důsledku větru
- Mechanismus komplexní, ale přispívá k tomu asi i rozdíl v poměru povrch/objem u různě velkých svěracích buněk (zmenšuje se s velikostí buňky) a dobu, za jakou jde tato buňka naplnit vodou
- Nejrychlejší průduchy u trav - může souviset s jejich extrémním evolučním úspěchem na otevřených stanovištích v posledních ≈ 30 Myr.
- Asi budou i další konsekvence – odpověď na změnu klimatu a rostoucí CO_2 ?

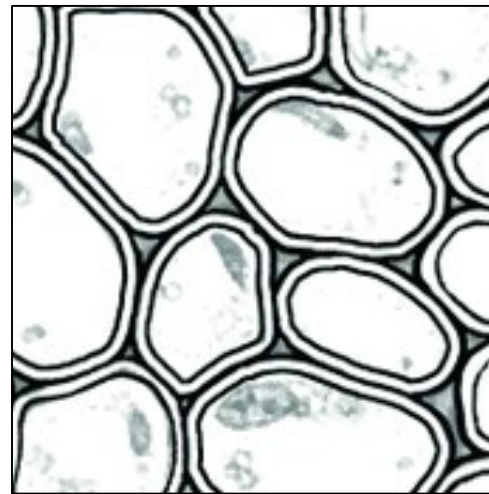


Větší buňka = levnější buňka

- Pokud bude rostlina pletivo z velkých buněk, na stejný objem spotřebuje méně uhlíku (fotosyntézy), zejména pokud buňku vyplní vakuolou s vodou – rostliny asi používají větší buňky když je potřeba zajistit „růst“ s minimálními fotosyntetickými náklady (za C/světelné limitace)
- Zvětšení buněk často zprostředkováno endopolyploidií (ačkoli replikace DNA také něco stojí – viz dále); klasický příklad je endopolyploidie u hypokotylu



Malé buňky = větší množství buněčných stěn v daném objemu



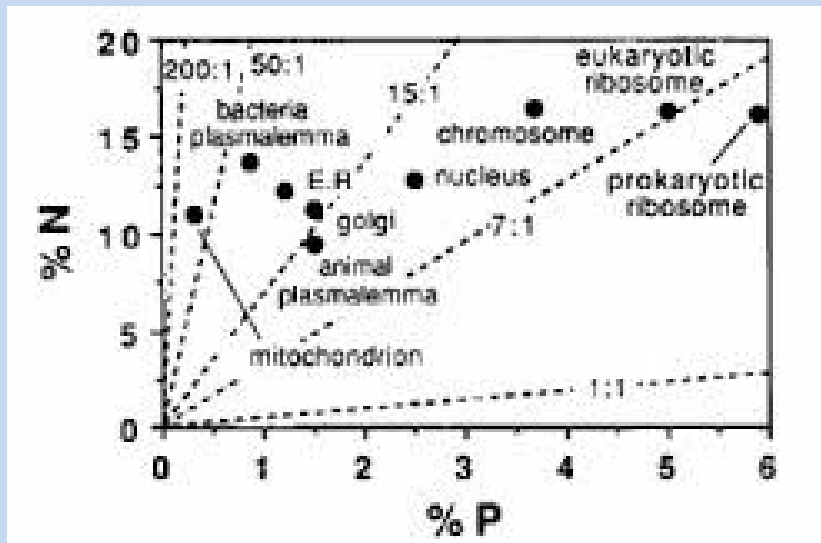
Velké buňky = menší množství buněčných stěn v daném objemu

Hypotetické důsledky

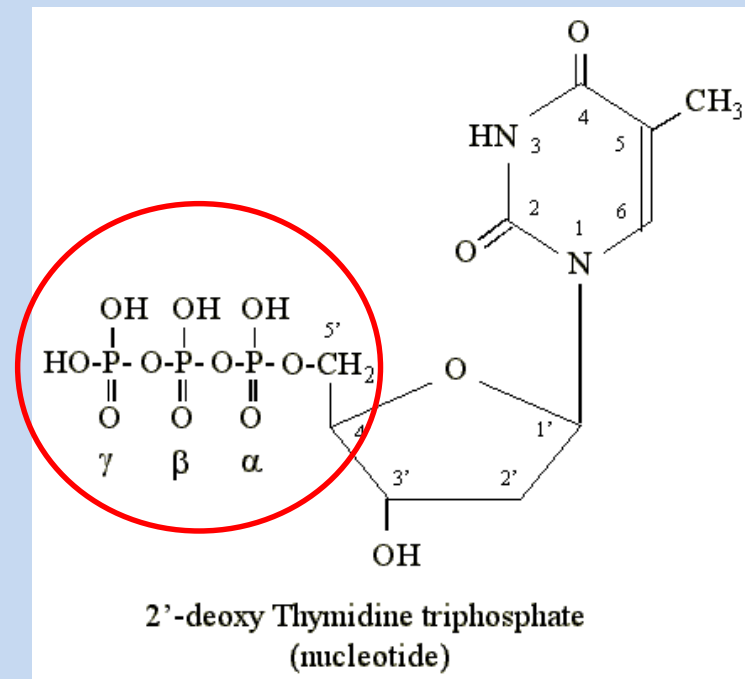
- Lepší (rychlejší) růst kořenů u sucho-tolerantních rostlin – používá se v současnosti k selekci plodin pro suché oblasti (např. kukuřice)
- Jarní geofyty možná potřebují velké genomy a buňky k tomu, aby šetřili materiálem na stavbu těla, které stejně dlouho neposlouží
- Určitě řada dalších vztahů v souvislosti s „levnou“ tvorbou živé biomasy – např. rychlý růst a kompetice o světlo; diploidi vs. polyploidi

Větší genom =? zvýšené nároky na živiny (fosfor)

- DNA a RNA jsou na fosfor jedny z nejbohatších molekul v buňce
- Leitch & Leitch (Science 2008) se domnívají, že polyploidní buňky mohou být náročnější na P – to by mohlo ovlivnit rozšíření polyploidů a rostlin s velkými genomy, stejně jako je to známo u řasových společenstev nebo u některých plžů
- Grantový projekt 2011–2014 (pokusy Rengen, Svalbard, Cape, Ruzyně)



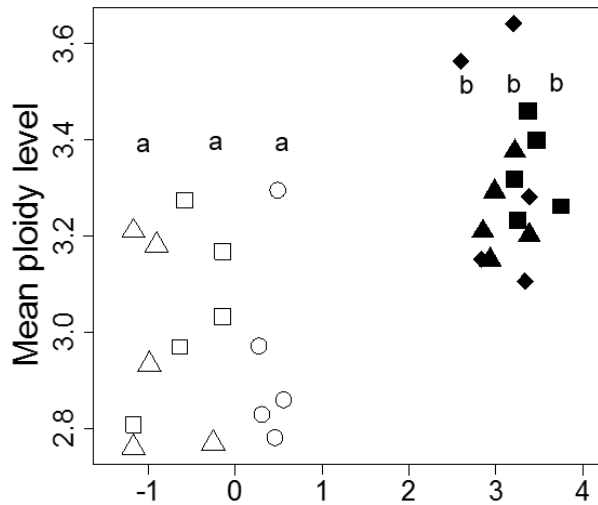
Elser et al. *BioSciences* 1996



Rengen Grassland Experiment - důkaz?

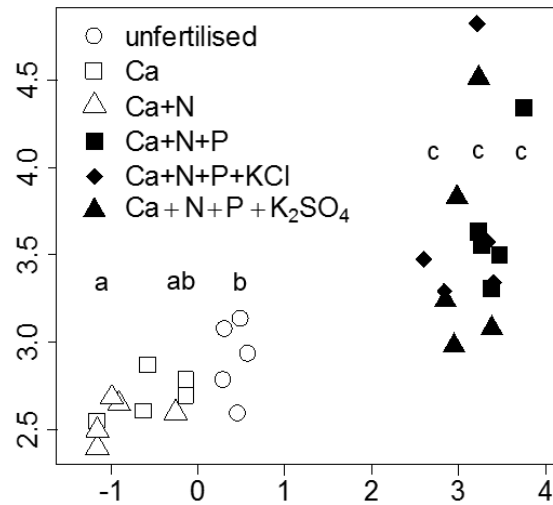
- Založen 1941 a od té doby pravidelně udržován; oligotrofní trávník na začátku zorán a oset směsí produkčních trav a pícein; hnojeno ročně, blokový design zásahů
- Rostliny s většími genomy jsou úspěšnější na P hnojených plochách – hlavně kompetitivní polyploidní trávy; produkce biomasy vzrůstá na úkor druhové bohatosti
- Kompetitivní vlastnosti polyploidů podmíněny dostatkem P
- Podobné výsledky také teď v Park Grass Experiment

Prezenčně absenční data

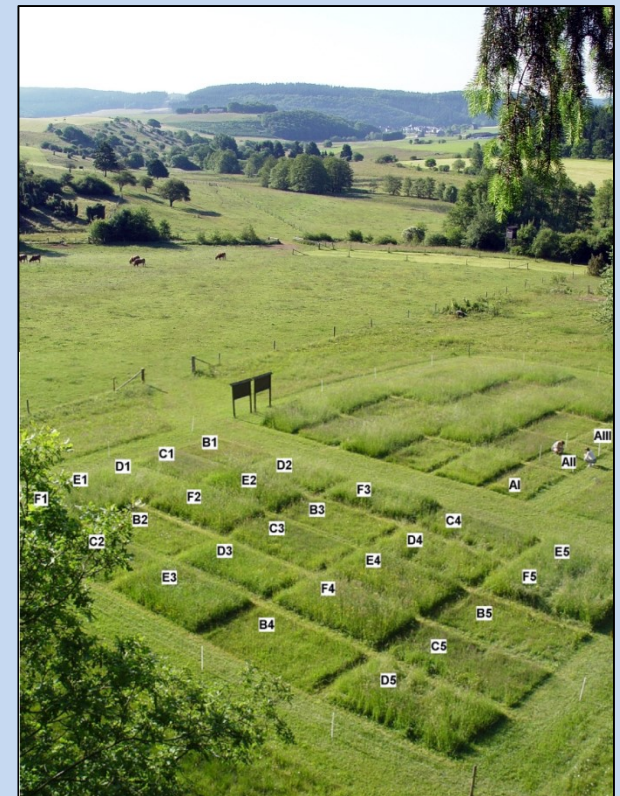


In půdní P (mg/100 g)

Sušinou vážená data

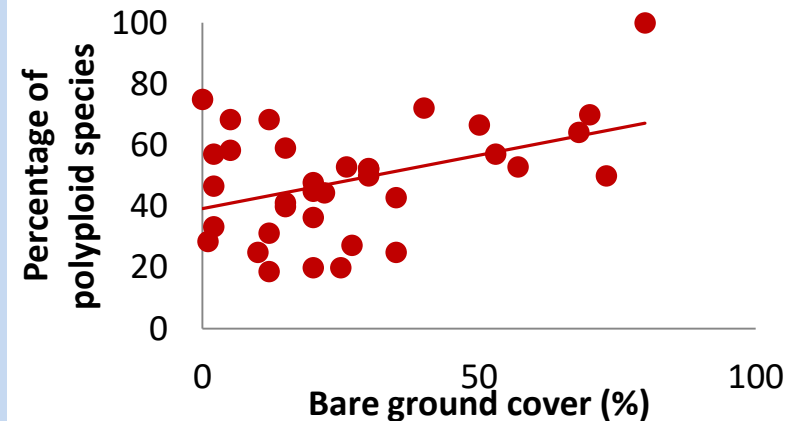
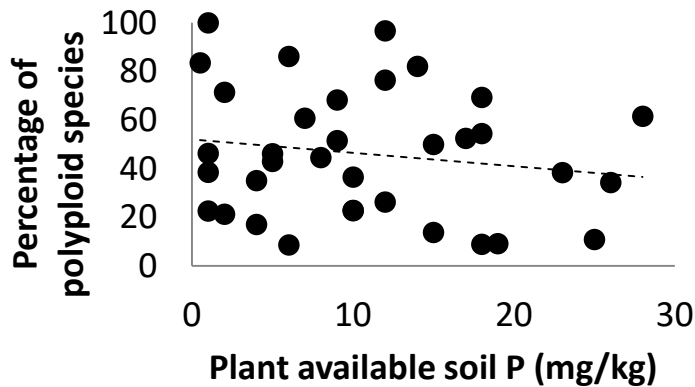
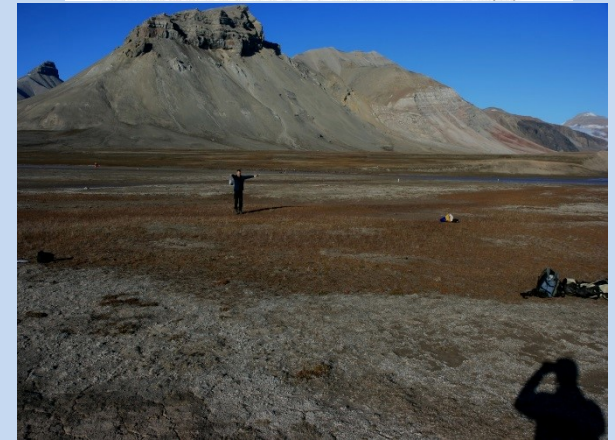
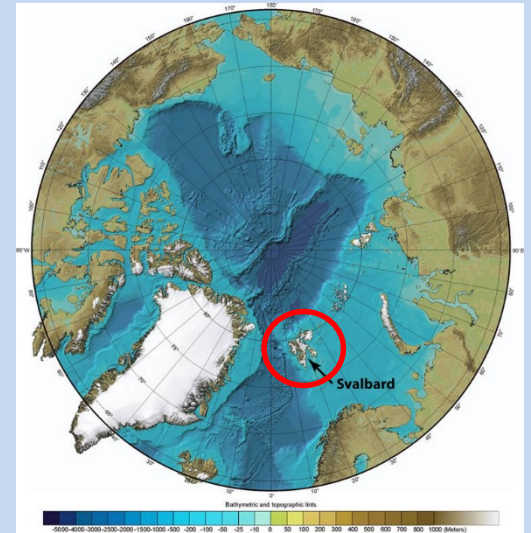


In půdní P (mg/100 g)



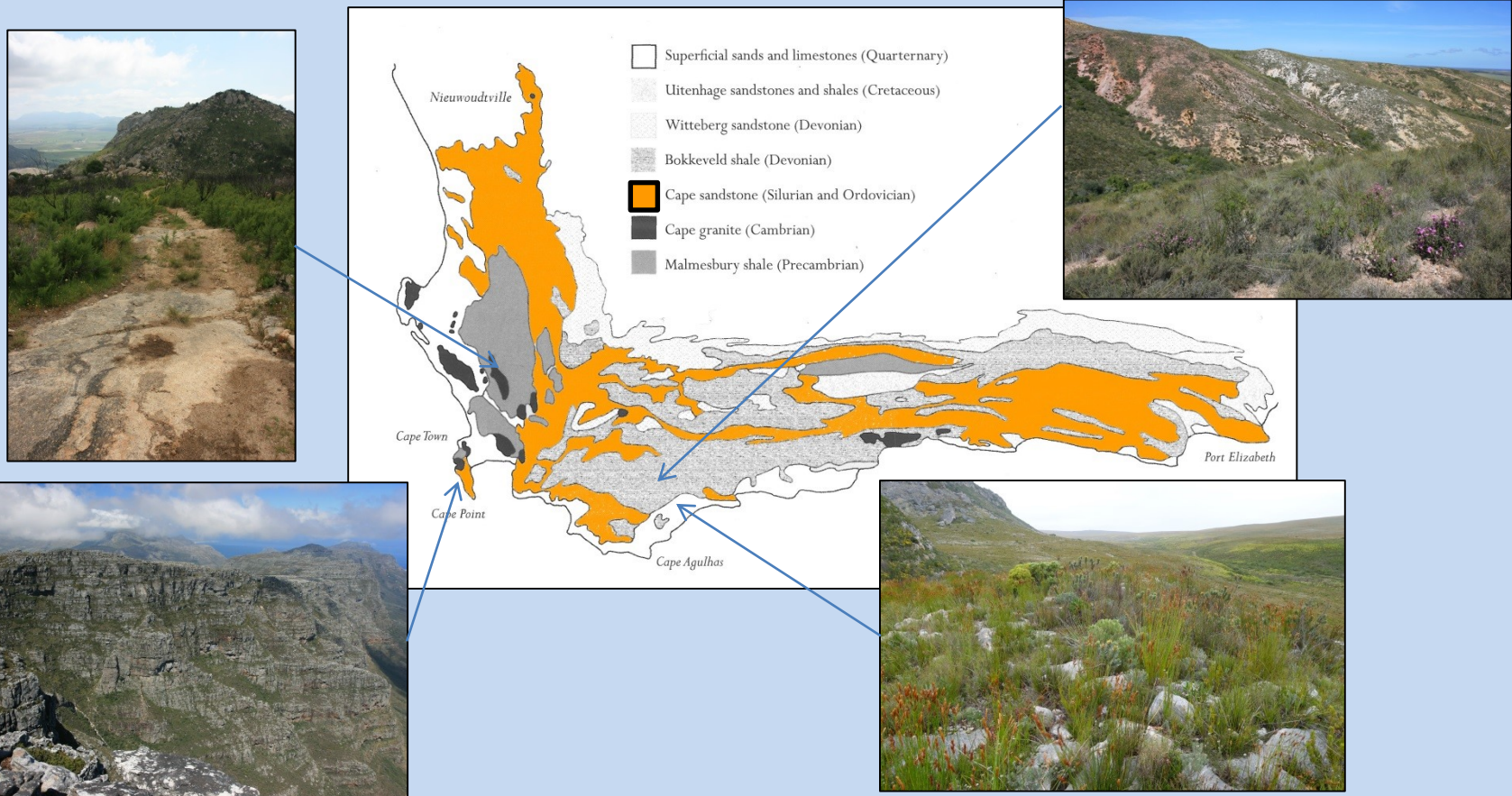
Svalbard

- Arktické souostroví, kompletně zaledněno, 162 původních druhů, více než 80% polyploidních (nejvyšší na světě)
- Nasbíráno 125 druhů (77%) ve dvou oblastech, cytofloristika, fytoecenologické snímky + vzorky půd
- Žádný rozumný vztah s P, ale s bare ground a nadmořskou výškou (=teplotou)
- Vyšší zastoupení polyploidů dáno asi jen jejich vyšší schopností přežívat než dostupností P



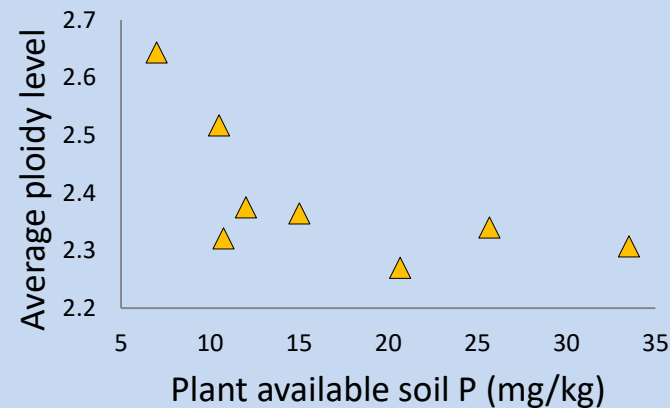
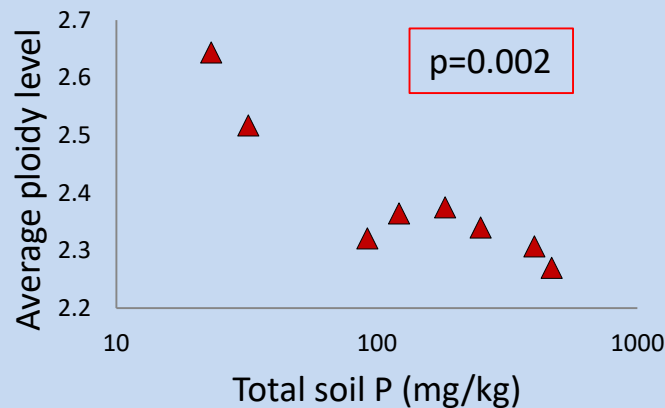
Flóra Kapska (jižní Afrika)

- ≈9 000 druhů na území 90 000 km²; 67% endemismus; radiace asi 30 linií v průběhu posledních 14 Mya, kdy se vysušil jih Afriky
- Kontrastní podloží a půdy s řadou specialistů (endemitů)



Kapsko výsledky

- Cytofloristika: sbírány všechny druhy 8 rodů v 8 územích (± 500 druhů)+FCM; analýza živin v půdě a biomase
- Polyploidi paradoxně nejčastější na P chudých substrátech - ?důkaz větší adaptivity polyploidů (na P chudý substrát)?
- Polyploidi zde také téměř chybí u dřevin – asi globální trend.



Jak je to tedy s P limitací polyploidů?

- Praktické pokusy na Svalbardu a v Kapsku neukázaly žádnou závislost frekvence polyploidie a P, stejně tak kultivační experimenty s páry diploid a polyploid v Ruzyni (Šmarda et al., to be published)
- Výsledky z Rengenu i z Parkgrass mohou být stejně dobře dané tím, že polyploidi jsou zde zároveň největší kytky + to může být dáno jejich vyselektovanou schopností být kompetitivně zdatnější
- Větší jádro znamená větší buňku a víc P, ale větší buňka zároveň znamená méně fosfolipidových membrán na jednotku objemu – chtělo by to model
- Rostliny na zvětšení buňek používají často endopolyploidii – proč by to dělaly, kdyby to bylo nějak živinově náročné
- **U rostlin se P nároky musí chápat jako nároky celé rostliny**, ne jen jednotlivé buňky – to je asi důvod, proč teorie P limitace a genomu funguje dobře u řas a ne u rostlin, kde jsou celkové nároky dány do značné míry počtem buněk (velikostí těla)
- V současnosti dva pokusy – endopolyploidie (Ondra a Lucka - nevychází) a obsah P na buňku u diploidů a polyploidů – vychází!
- Možná interakce s herbivory (preferují P bohatou stravu) – viz výsledky v Anglii kde to vychází

Konec pohádky o fosforu a co ke
zkoušce

Co „převážně“ řídí evoluci velikosti genomu

Mutační teorie – řeší, jak genom roste; předpokládají, že velké a pomaleji se dělící buňky jen tolerují větší genom

- Driftem – **junk DNA teorie**
- Selfish množení transpozonů (jak můžou, tak se množí) – **selfish DNA theory**

Optimální teorie – řeší, jaká je optimální velikost genomu

- Velikost genomu koevolvuje s velikostí buňek (velikost DNA jako důležitý strukturní buněčný komponent) – **nucleocyoskeletal theory** (velikost genomu selektována ke správnému fungování buňky)
- Genom si žije vlastním životem a jeho změny se jen „pasivně“ projevují na velikosti buňek – **nucleotype theory**

Dají se najít argumenty pro i proti každé z nich – nic nefunguje univerzálně

Varibilita velikosti genomu uvnitř druhu?

- Variabilita - nutný předpoklad evoluce každého znaku
- Variabilita uvnitř druhu – možný vhled do raných stádií evoluce velikosti genomu
- Od 60. let první práce u *Linum*, *Lolium*
- Velký boom kolem 80. a začátkem 90. let
- Greilhuber 1995–1998 a skepse k měření
- Greilhuber 2005 a dvojpíky
- V současnosti více než 200 prací; více než 50 zpochybněno nebo zamítnuto

Nesmýslná variabilita

Metabolity:

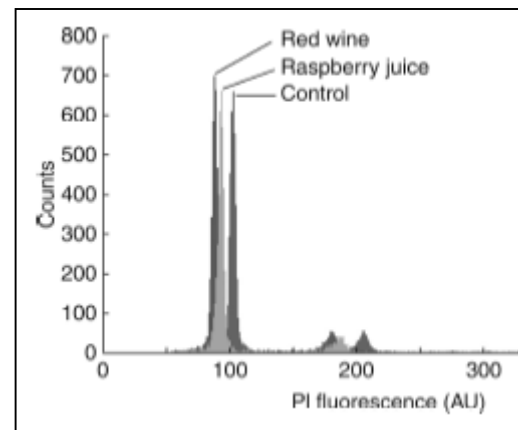
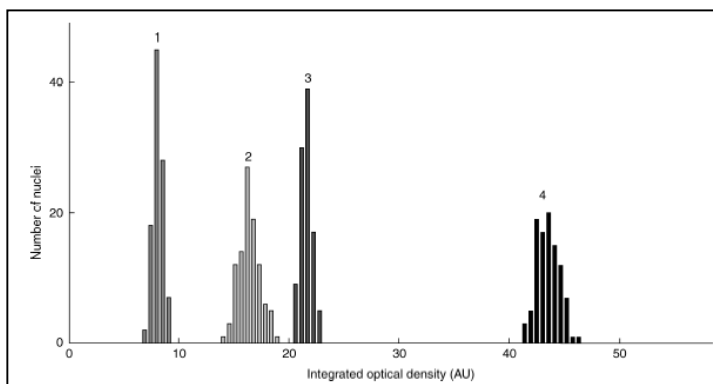
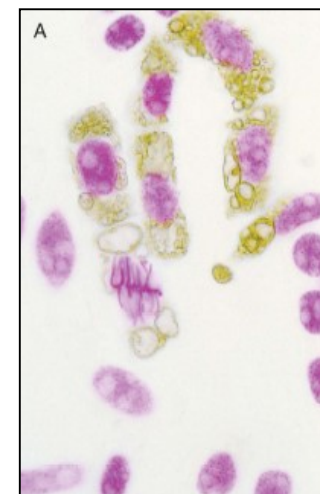
- *Helianthus annuus* – různě osluněné listy
- *Euphorbia pulcherrima* – různě barevné listy

Absence interní standardizace:

- *Glycine max*

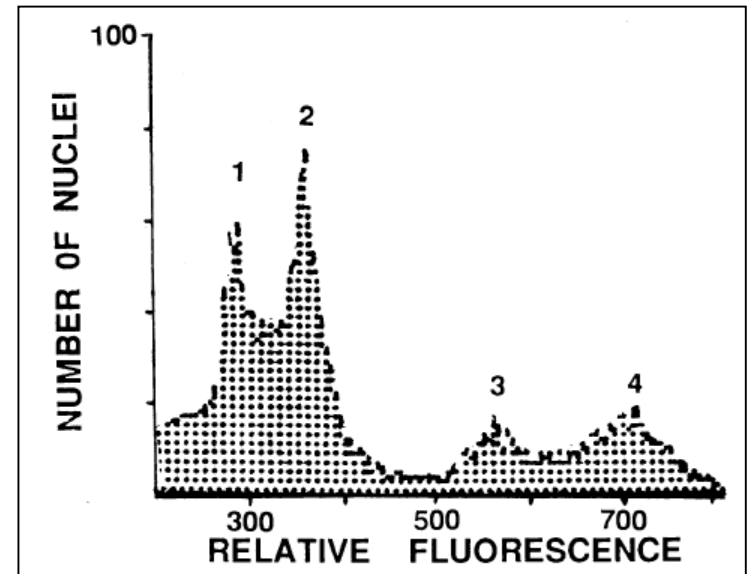
Horká hydrolýza u Feulgenovy reakce:

- *Hedera helix* – rozdíl mezi starými a mladými listy



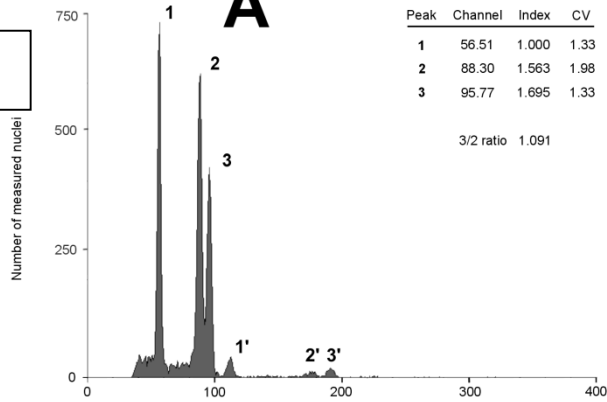
Některé příklady ze současnosti

- *Microseris douglasii*
- *Zea mays* (zde objeveny transpozony – B. McClintock, Nobelova cena 1983)
- *Hordeum spontaneum*
- *Silene latifolia* (pohlavní chromozomy)

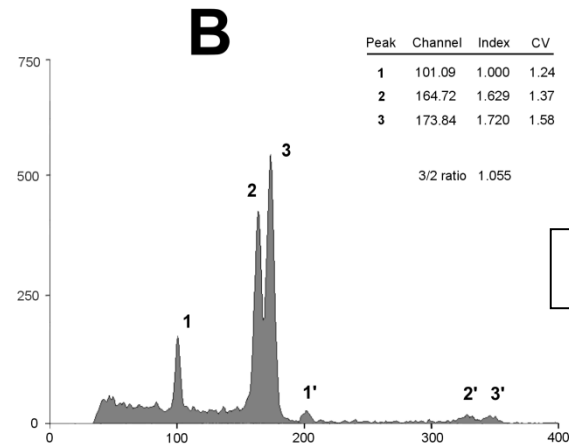


Rumunské kostřavy a vnitrodruhová variabilita v obsahu DNA

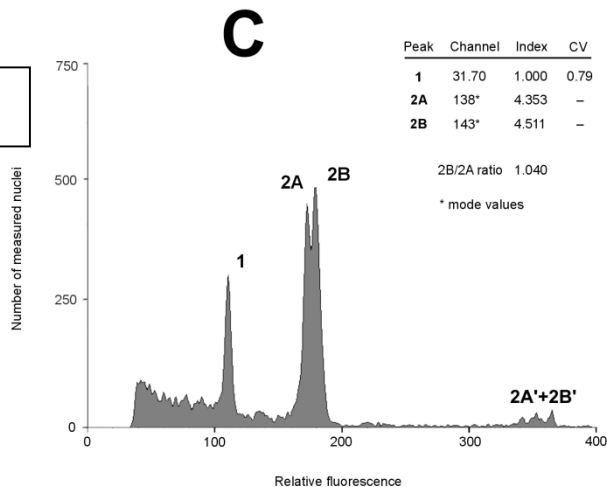
F. pallens



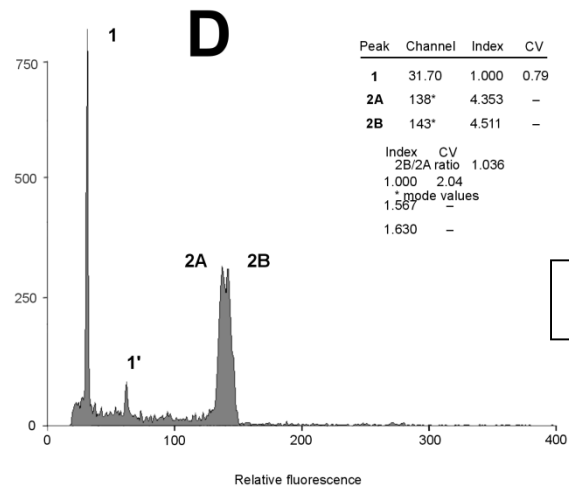
F. polesica



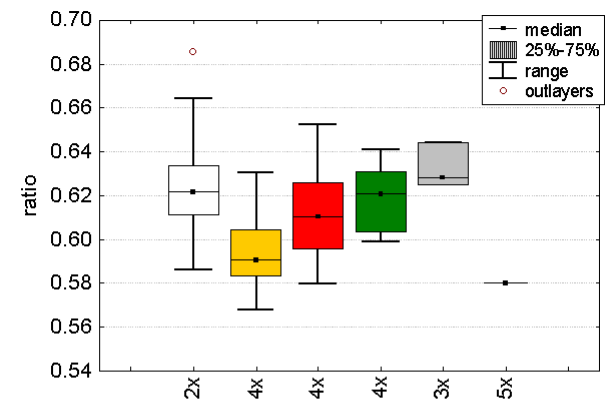
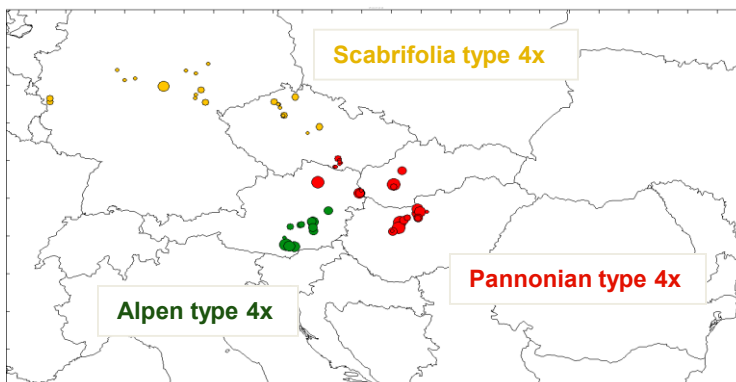
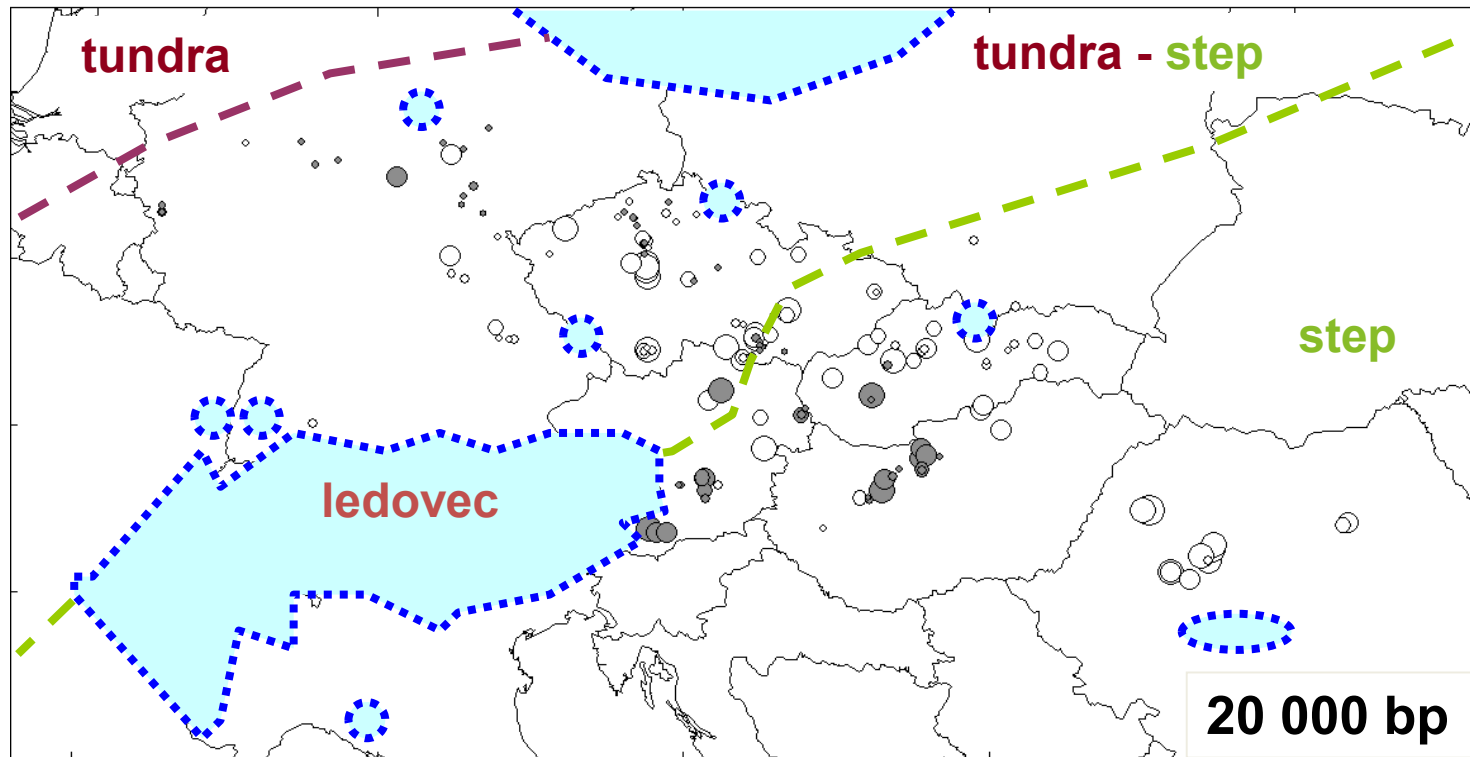
F. vaginata



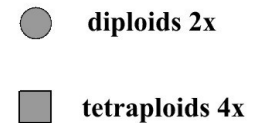
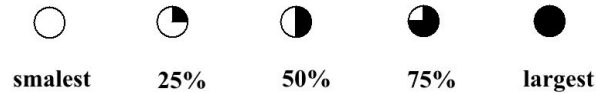
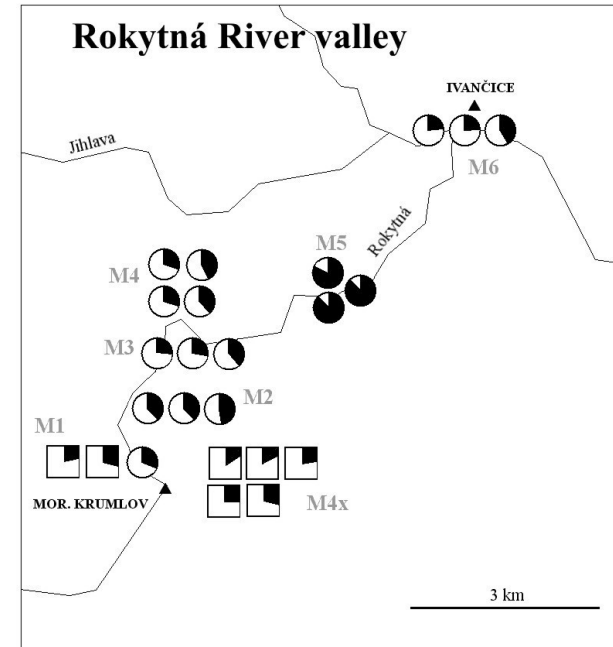
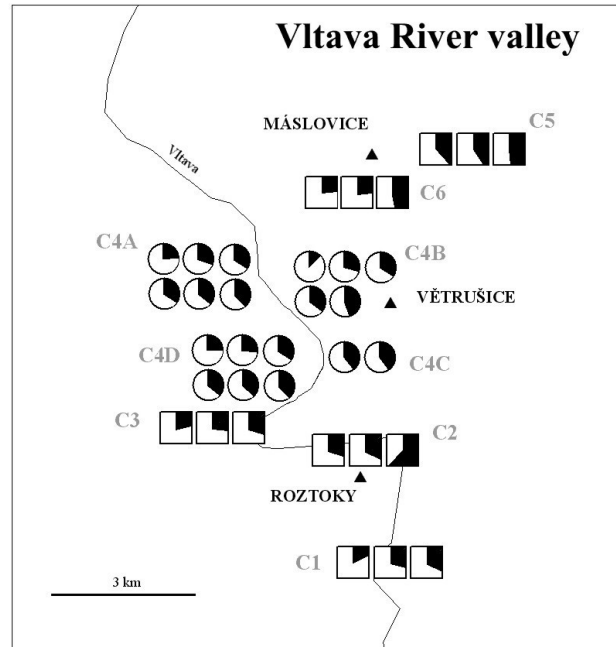
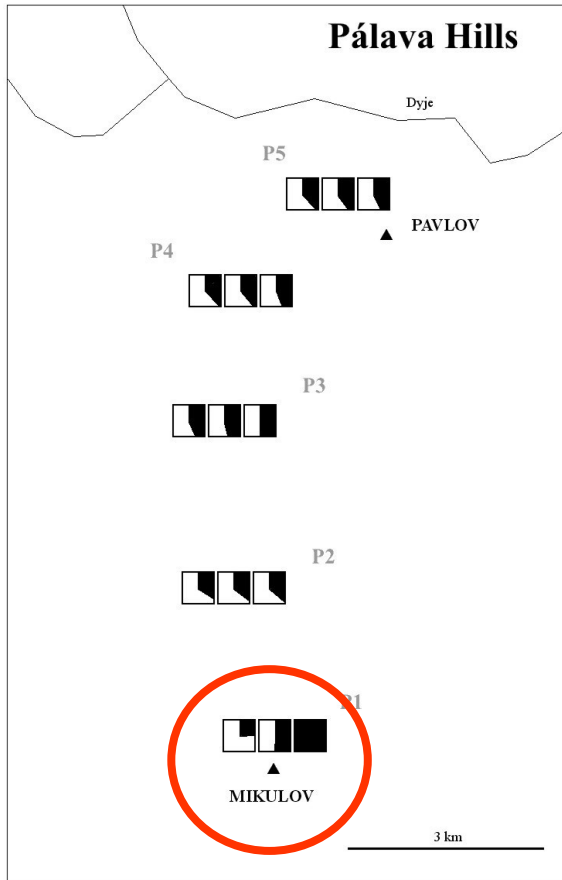
F. rupicola



Variabilita v obsahu DNA *Festuca pallens* – areál



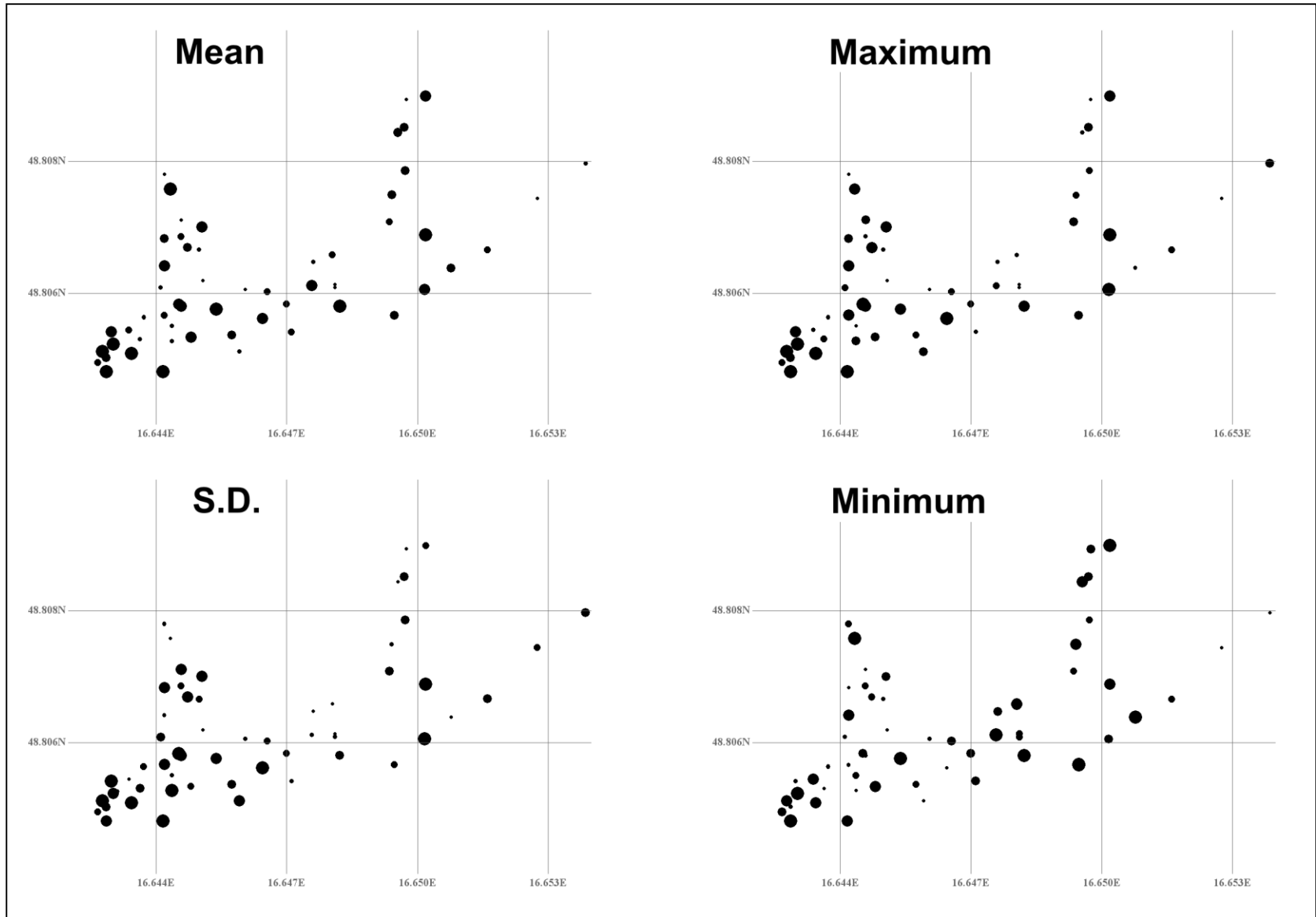
Variabilita v obsahu DNA *F. pallens*



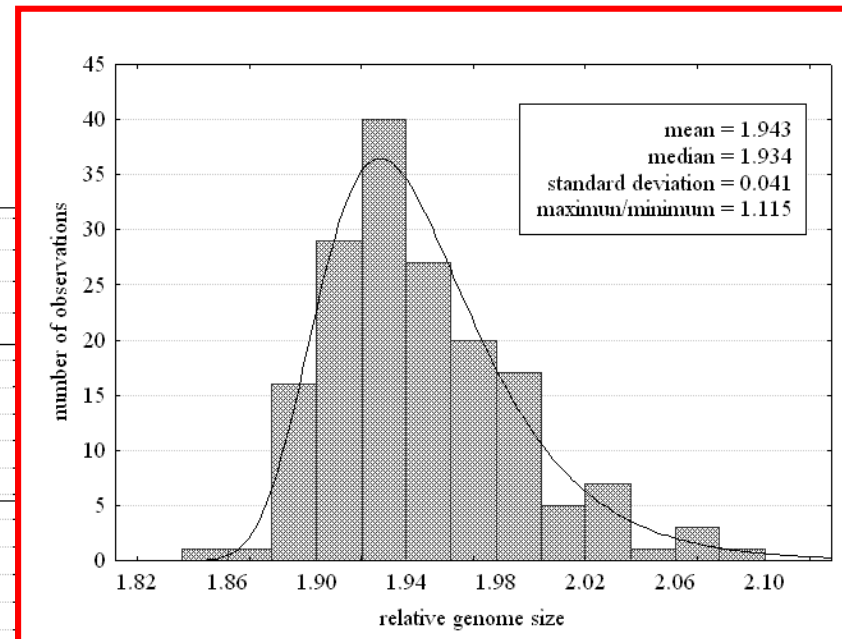
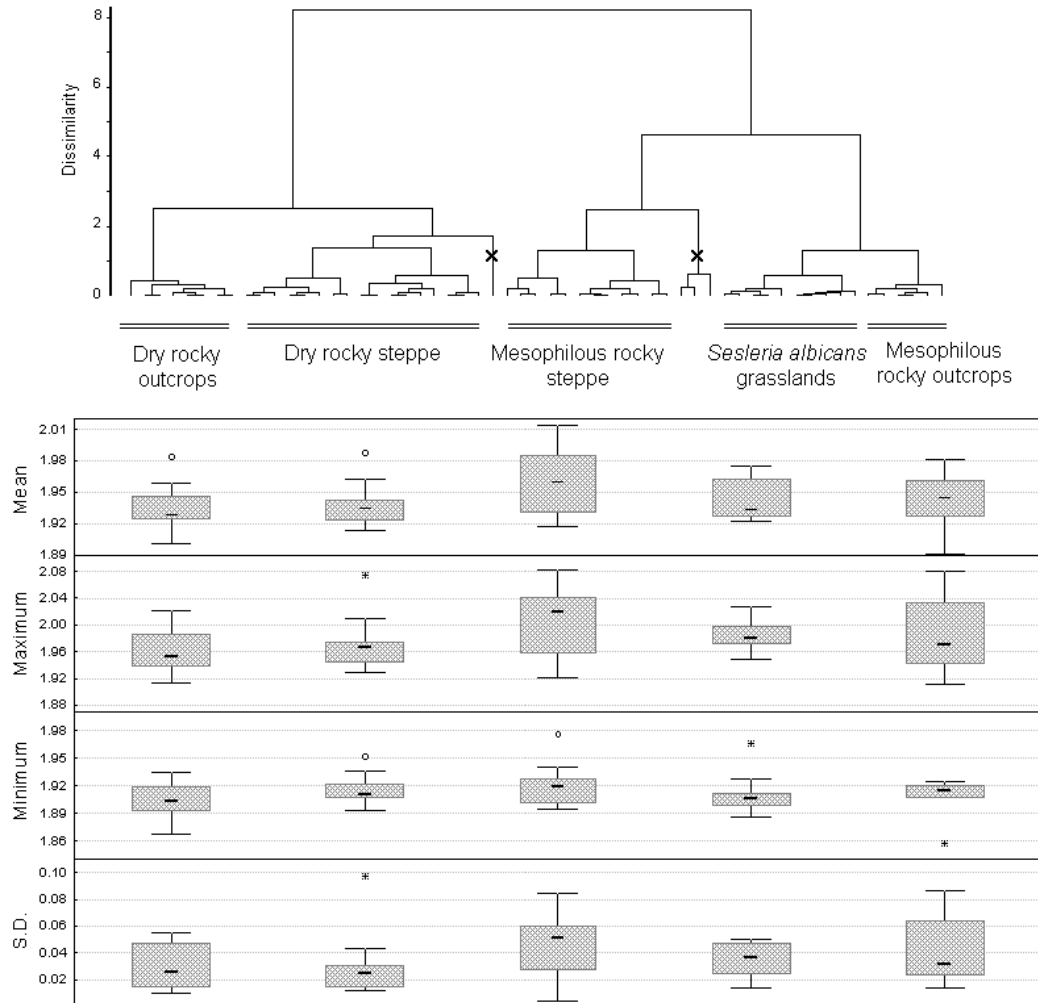
Vnitropopulační variabilita obsahu DNA



Vnitropopulační variabilita obsahu DNA



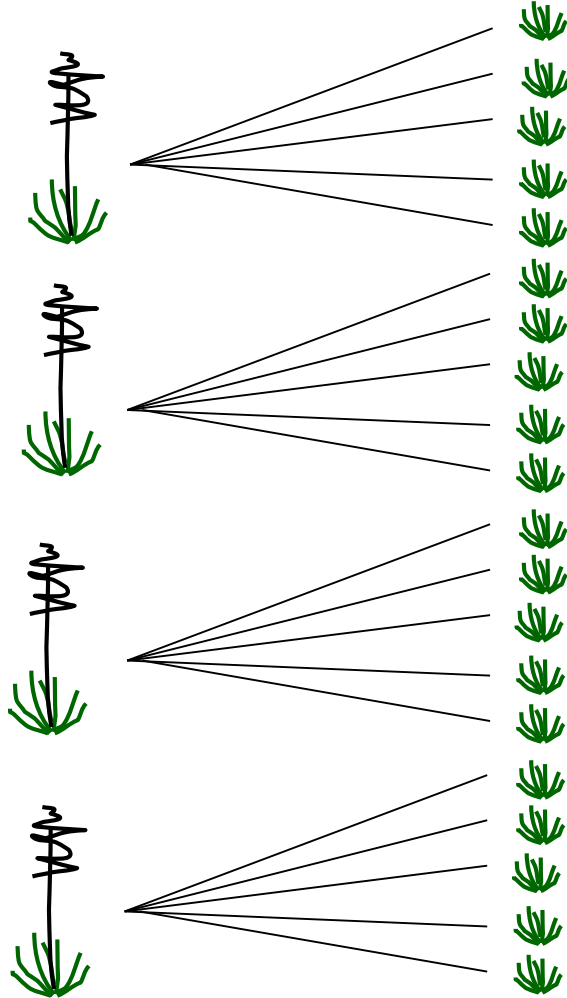
Vnitropopulační variabilita obsahu DNA



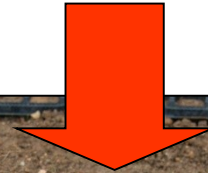
Velikost genomu – matka versus potomek?

17 matek

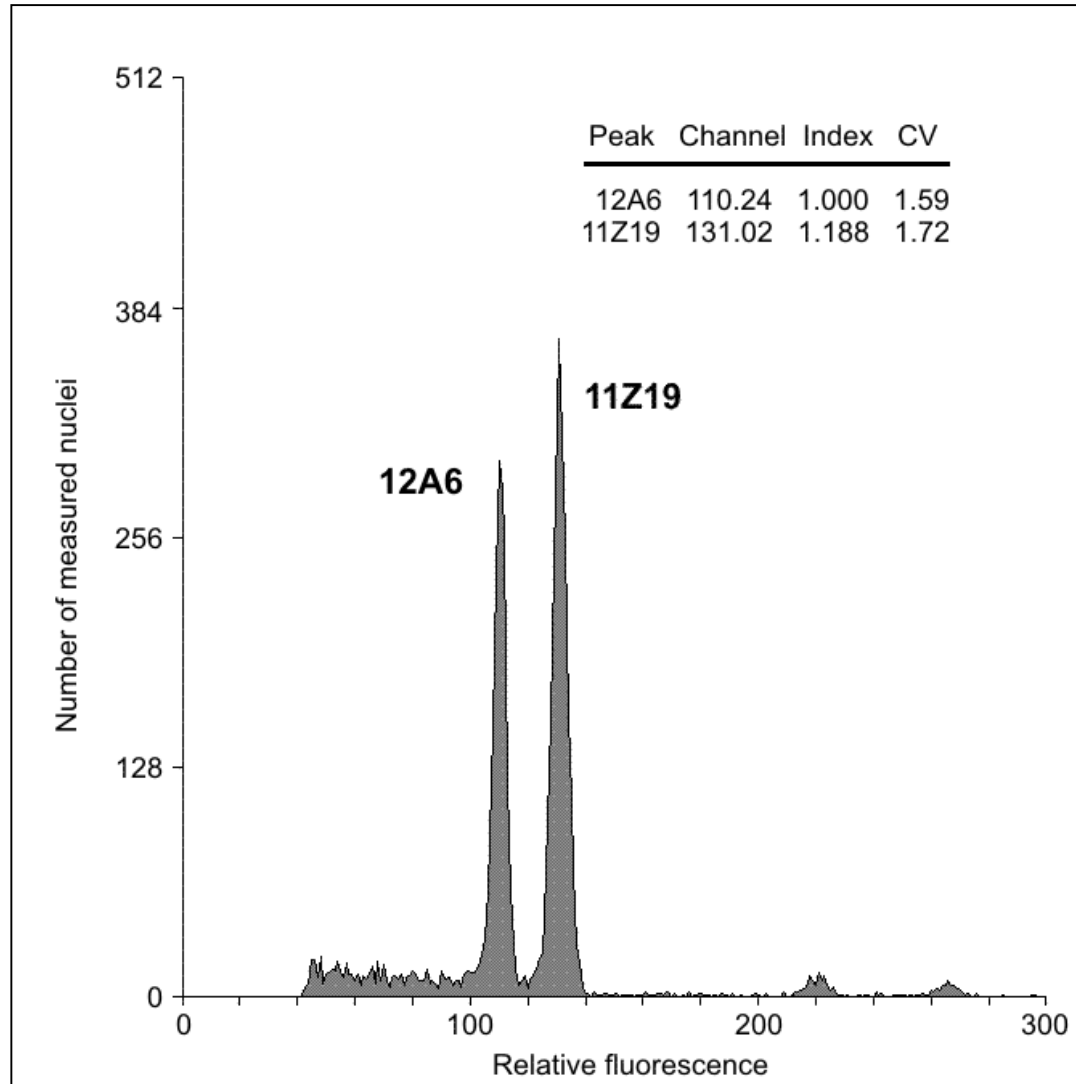
565 semenáčků



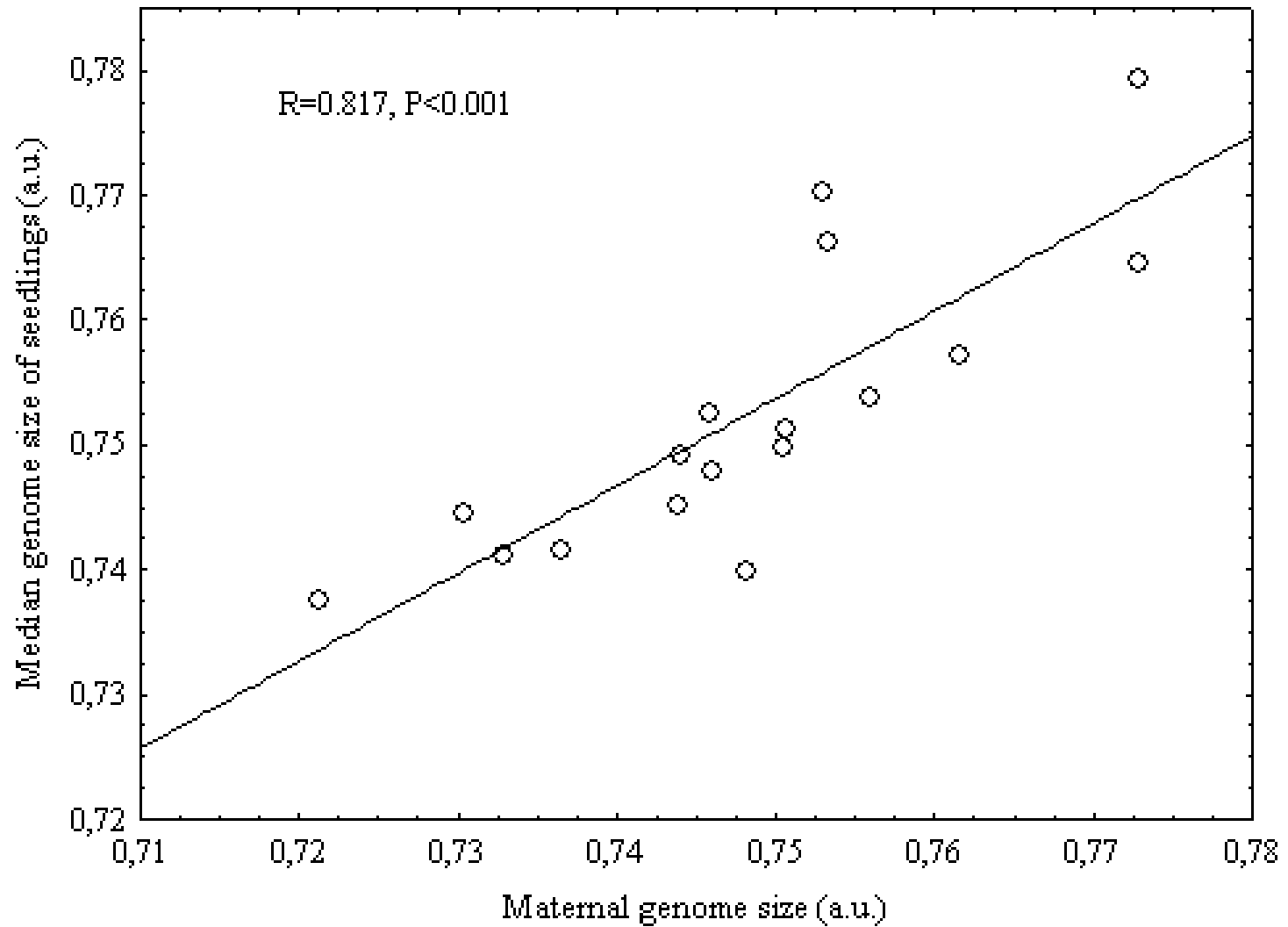
56	4x
2	
2	5x
1	6x



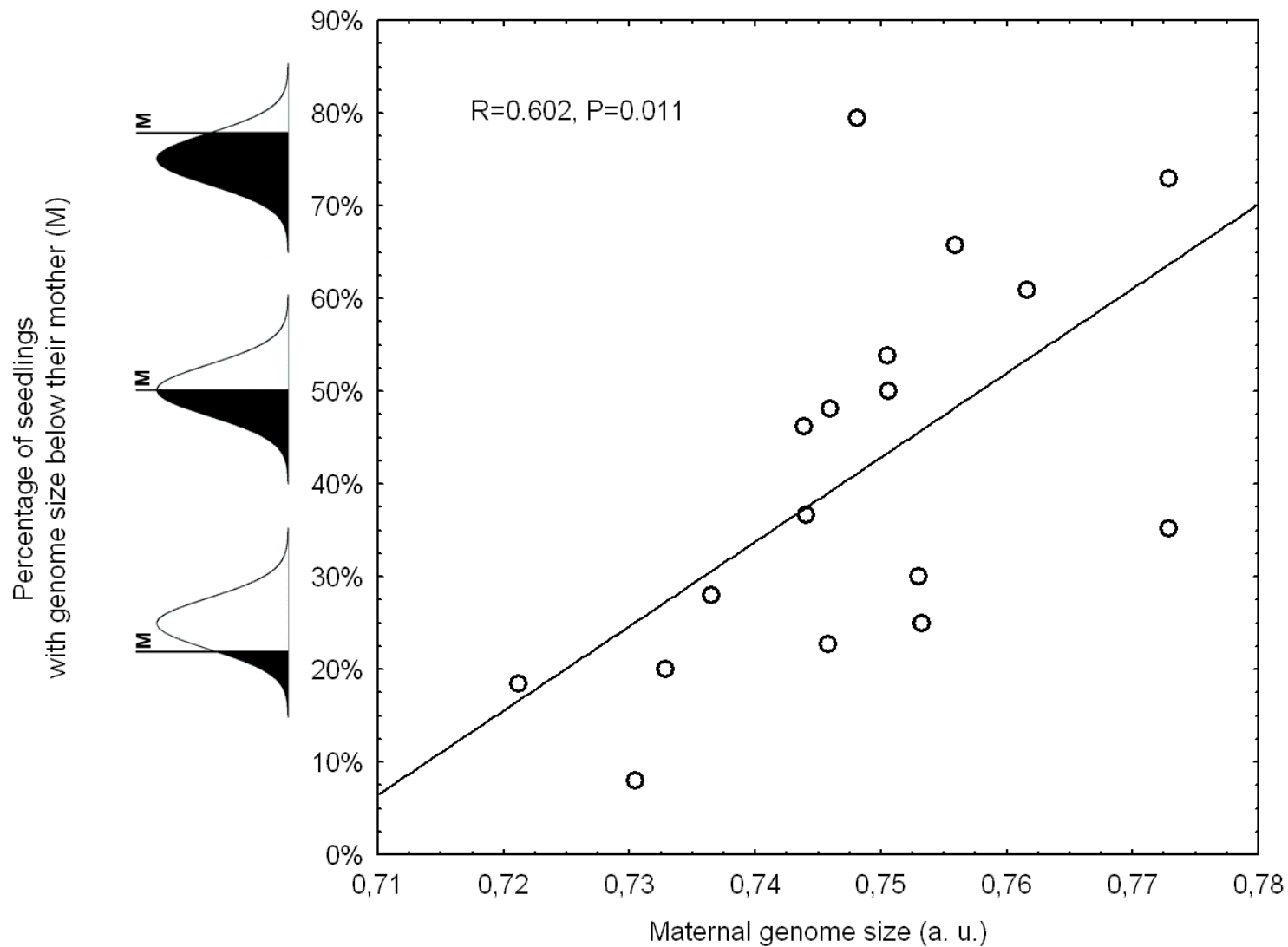
Velká variabilita mezi potomstvem jedné matky



Čím větší VG matky, tím větší VG potomků



Vliv otce na VG semenáčků?!

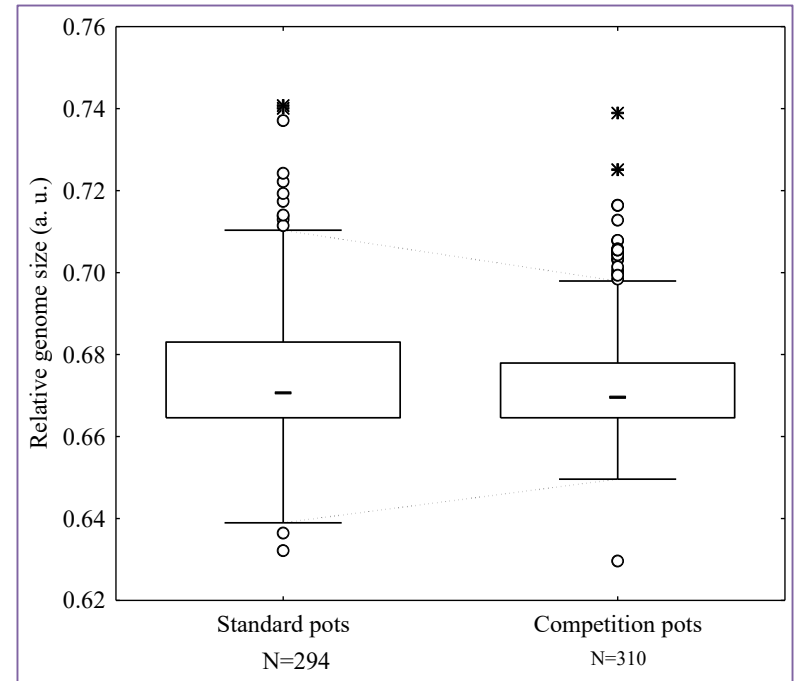
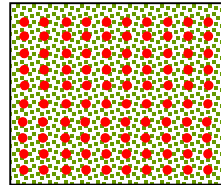
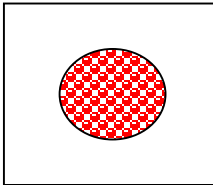
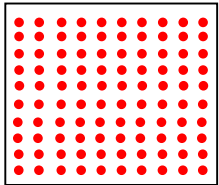


Stablizující selekce na VG

kontrola

intraspec.

interspec.

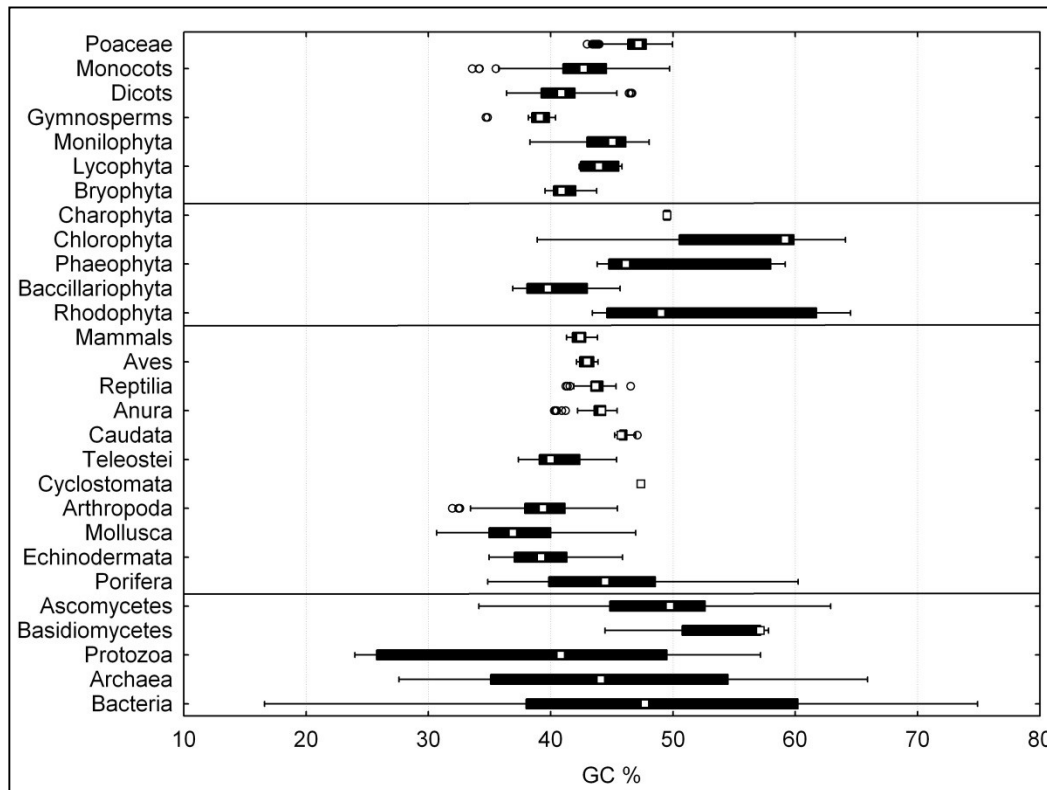


Co to znamená?

- Různá velikost genomu se může generovat rychle už u jedné kytky.
- Co za to u *Festuca pallens* může se neví (?třeba rekombinace různě velkých chromozomů?) a není jasné, nakolik je to univerzální i v jiných skupinách rostlin – je potřeba další výzkum.
- Nově generovaná variability nemusí být nutně adaptivní, jen ty extrémně malé nebo velké genomy trpí nějakými nedostatky (něco asi chybí nebo přebývá) a mají menší šanci se etablovat.
- O velikosti genomu nového druhu tak bude spíš rozhodovat náhoda než nějaká selekce prostředím – aspoň u *Festuca pallens*.

Genomický GC obsah

- Zatoupení ATGC bází v genomu není stejné; vyjádřením obsahu jakékoliv báze můžeme spočítat koncentraci zbývajících; nejčastěji se používá GC obsah
- Může se měnit různými strukturálními změnami nebo selekčními tlaky



GC extrémny



16,6% – nejmenší bakteriální genom
endosymbiotické *Candidatus Carsonella ruddii*



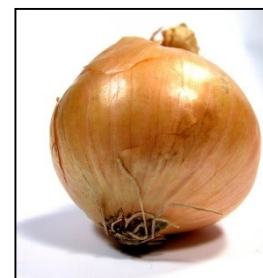
74,9% – anaerobní *Anaeromyxobacter dehalogenans*

29% – pavouk *Stegodyphus lineatus*



47,4% – mihule říční *Lampetra
fluviatilis*

23,9 % – *Calypso bulbosa*



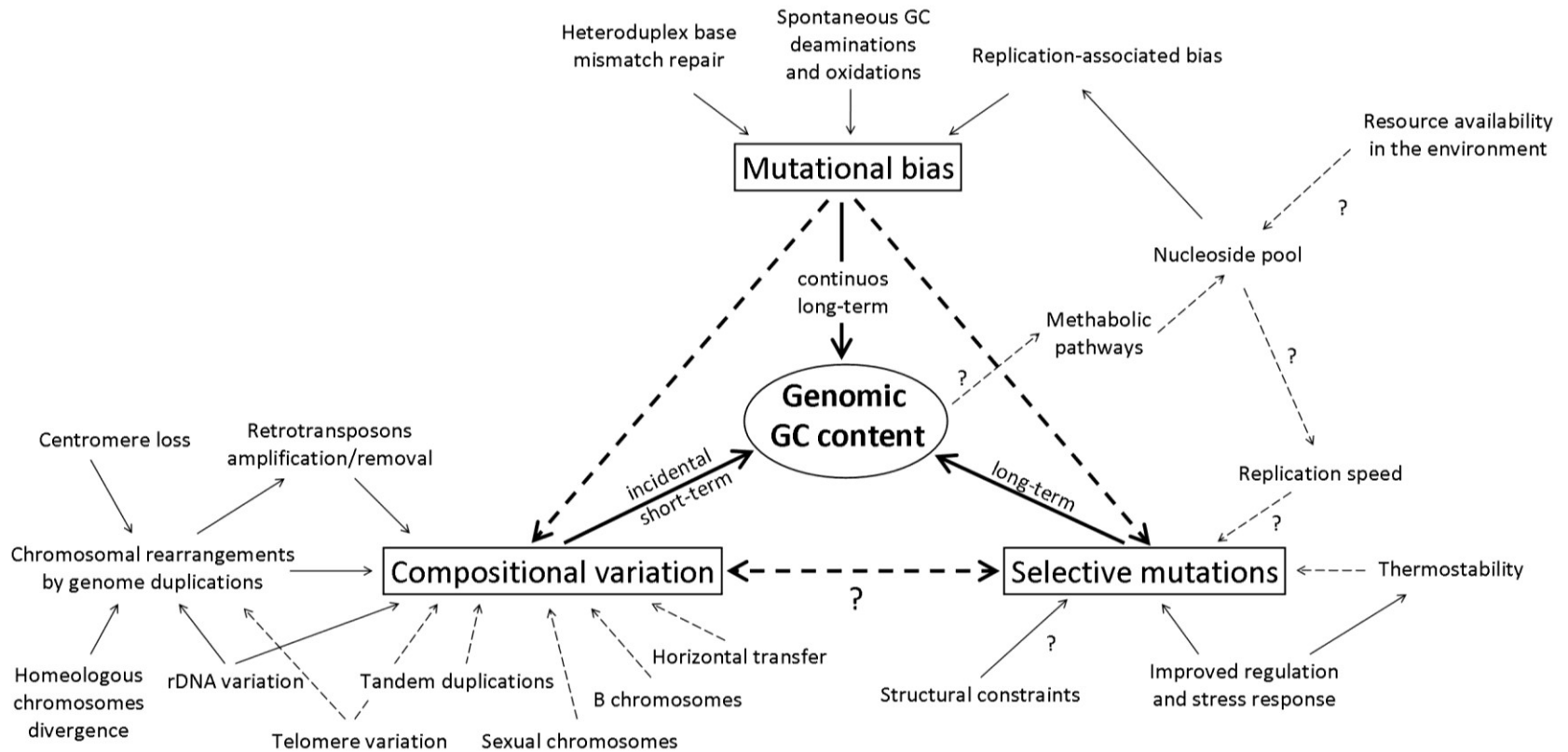
34,7% – *Ginkgo biloba*, *Allium cepa*



49,7% – *Sesleria caerulea*



Co určuje GC obsah?



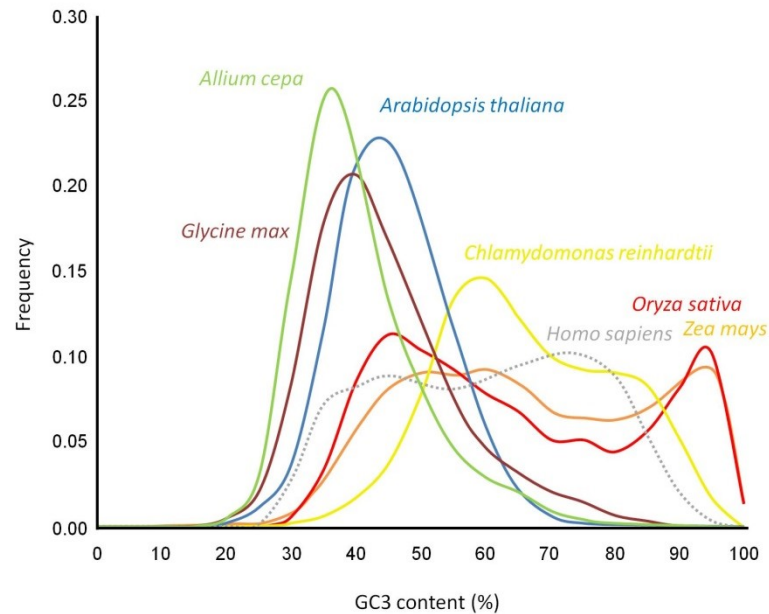
Strukturální změny

	Coding DNA	Non-coding DNA
<i>Arabidopsis</i>	44.1 %	32.7 %
<i>Zea mays</i>	52.0 %	47.0 %
<i>Oryza sativa</i>	45.3 %	42.9 %

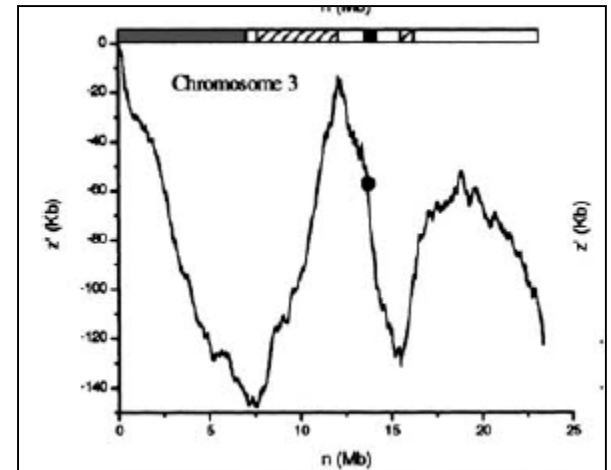
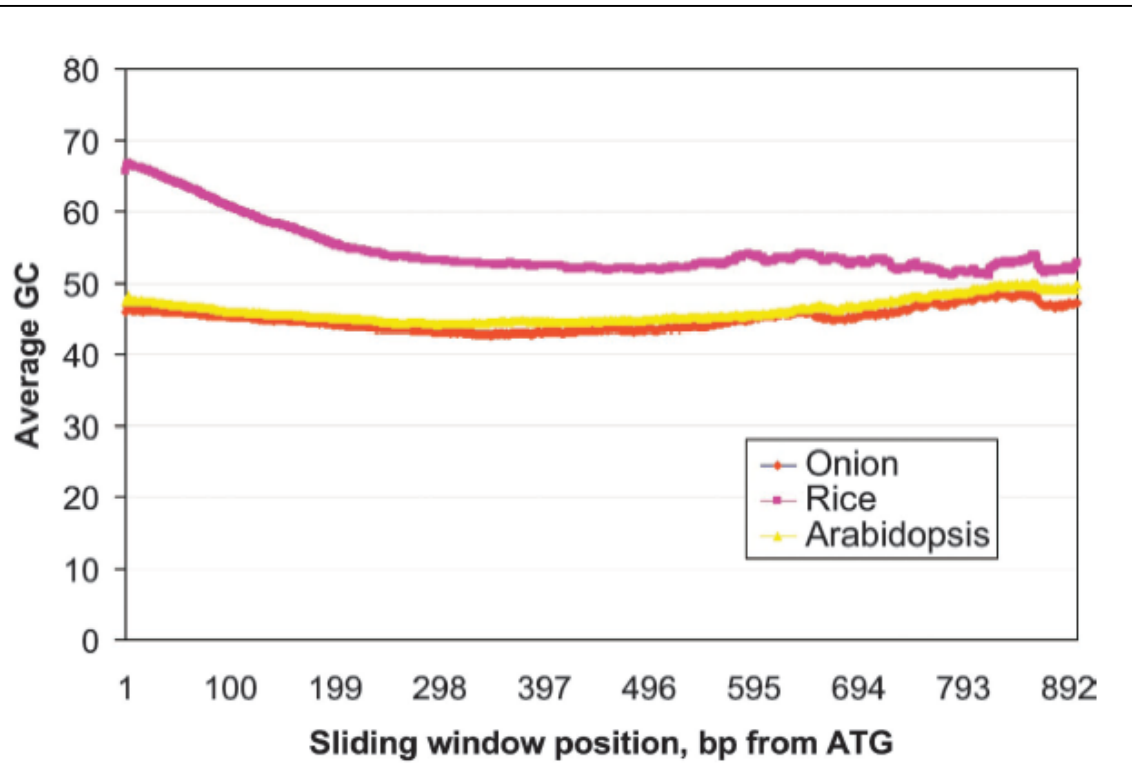
Introns (<i>Oryza</i>)	38.3 %
Exons (<i>Oryza</i>)	54.2 %
Huck retrotransposons (<i>Zea mays</i>)	≈ 60 %
Wallabi retrotransposons (<i>Oryza</i>)	50.9 %
MITE retrotransposons (<i>Oryza</i>)	28-34 %
Ribosomal DNA	≈ 70 %

Selection drive I

	genes	1st codon	2nd codon	3rd codon
<i>Oryza sativa</i>	54.2 %	57.5 %	32.7 %	61.8 %
<i>Arabidopsis</i>	44.6 %	44.6 %	47.0%	41.7 %
<i>Allium cepa</i>	45.3 %	43.5 %	42.9 %	40.9 %

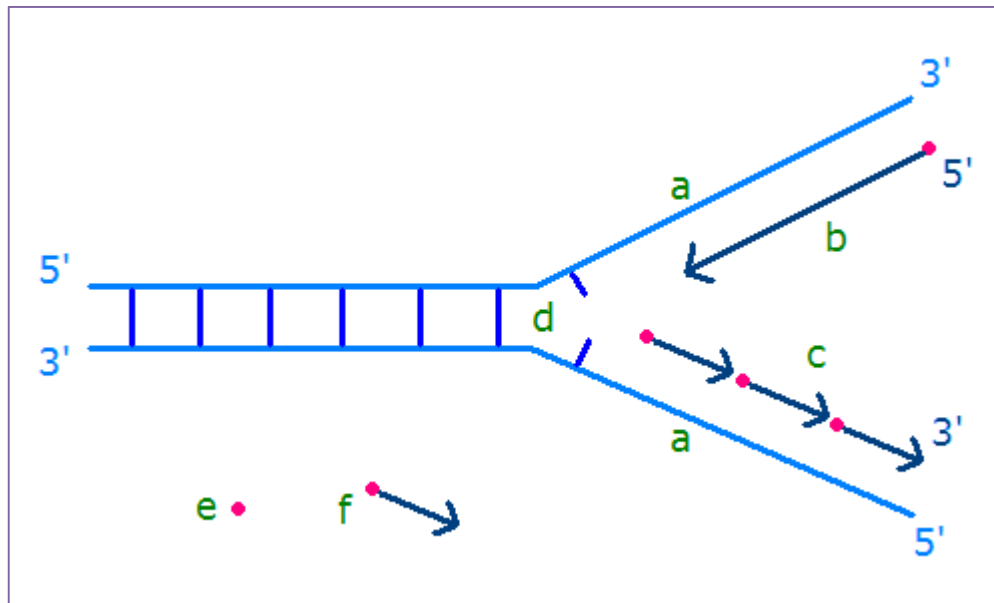


Selection drive II



Mutační bias

- Evoluční význam vždy jen ten, co se dědí
- Biased gene conversion/Heteroduplex base mismatch repair -
- Replication associated bias – různá expozice řetězců při replikaci, může být ovlivněno také dostupností jednotlivých nukleosidů

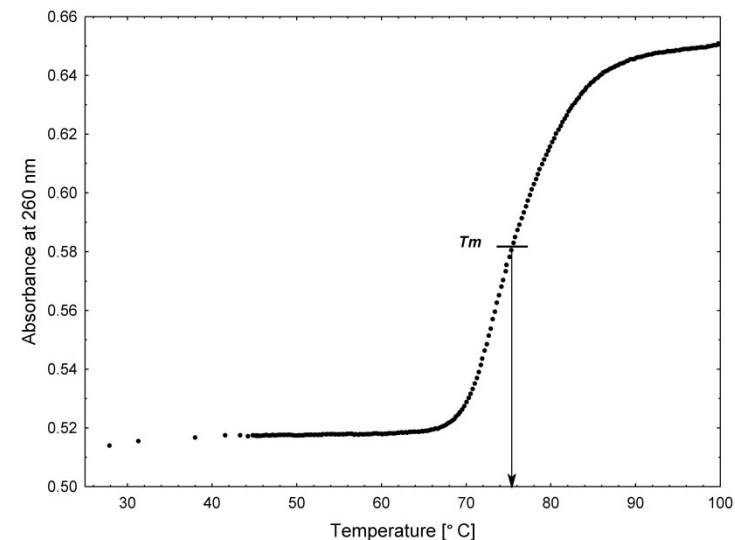


Měření GC obsahu

- Nejlépe kompletní genomová sekvence (přes 1200 je jich známo u bakterií, u eukaryot snad ani jedna)
- Různé biochemické metody
- DNA melting
- Flow cytometrie

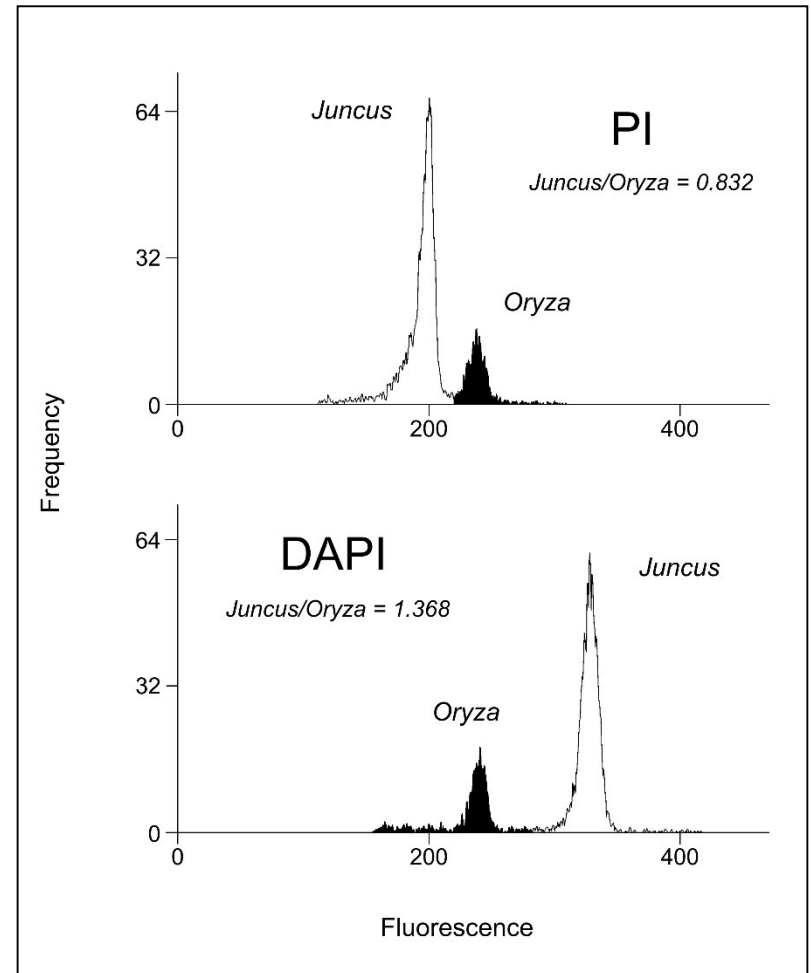
DNA melting

- GC báze se vážou pevněji než AT páry – obecně se myslí, že je to tím, že se vážou trojnou vazbou, ale je to spíš díky struktuře aromatických vazeb v molekule
- Při metlingu se DNA naseká na menší kousky, postupně se zahřívá a denaturuje – z dvořetězce se stávají jednořetězce
- Zaznamenává se absorbance a množství rozvolněné DNA (dvoušroubovice a jednořetězce se liší); může se nechat renaturovat
- Zjišťuje se teplota, kdy je denaturováno 50% DNA. Z této hodnoty se potom spočítá GC obsah.



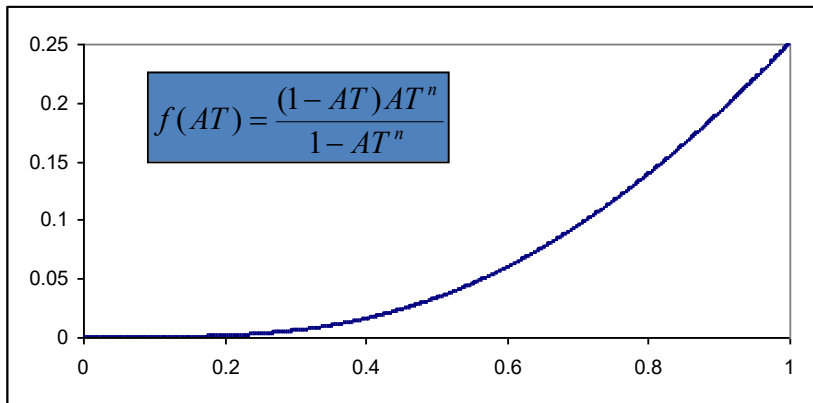
Flow cytometrie I

- Z měření se dvěma barvičkami – jedna barví celkovou DNA (např. PI), druhá je specifická na některé báze (např. DAPI)
- PI se váže interkalárně do dvoušroubovice
- AT/GC specifické barvičky se váží interkalárně (ale tam málo svítí) a potom na povrch na určitý počet bazí (tam svítí několikařádově intenzivněji)



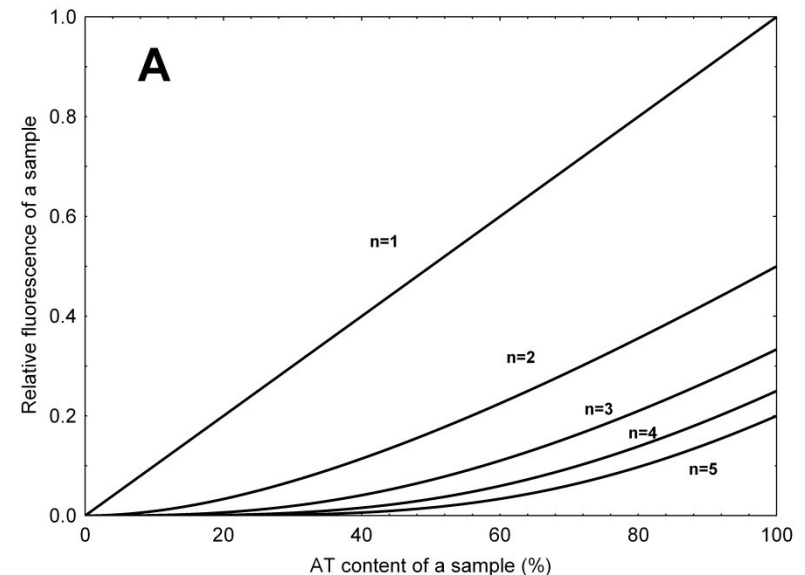
Flow cytometrie II

- Vztah mezi fluorescencí a obsahem AT/GC není lineární ale podle níže uvedeného vztahu
- Řešení vyžaduje vyřešit složitou rovnici – k tomu je na webu excelovský soubor: <http://www.sci.muni.cz/botany/systemgr/download/Festuca/ATGCFlow.xls>



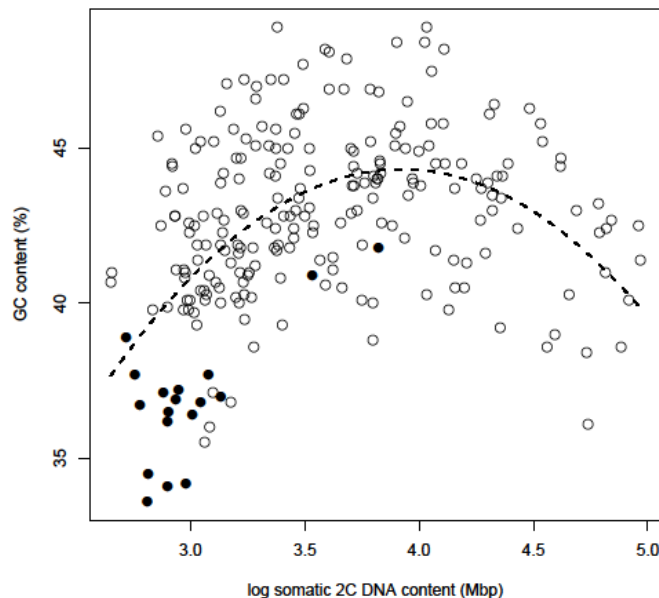
$$f(AT_{sample}) - DF_{sample} \times f(AT_{reference}) = 0 \Rightarrow$$

$$\frac{(1-AT_{sample})AT_{sample}^n}{1-AT_{sample}^n} - DF_{sample} \times \frac{(1-AT_{reference})AT_{reference}^n}{1-AT_{reference}^n} = 0$$



Co GC znamená

- Termostability hypothesis – na základě větší stability GC bazí – hlavně u bakterií; u rostlin možná funguje při stabilizaci DNA za sucha (Šmarda et al. 2014)
- Náročnost syntézy (Rocha & Danchin 2002)
- Funkčnost genomu – Vinogradov 2001, 2003, 2005 – korelace GC s bendabilitou DNA, schopností B-Z tranzice, DNA curvature, tvoření nukleosomu – důležité při regulaci transkripce a kondenzace chromatinu

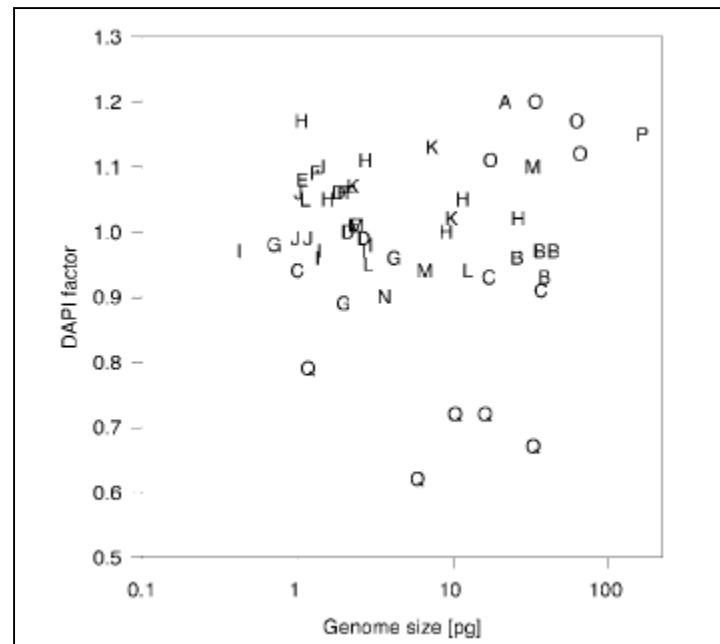


Příkladové studie

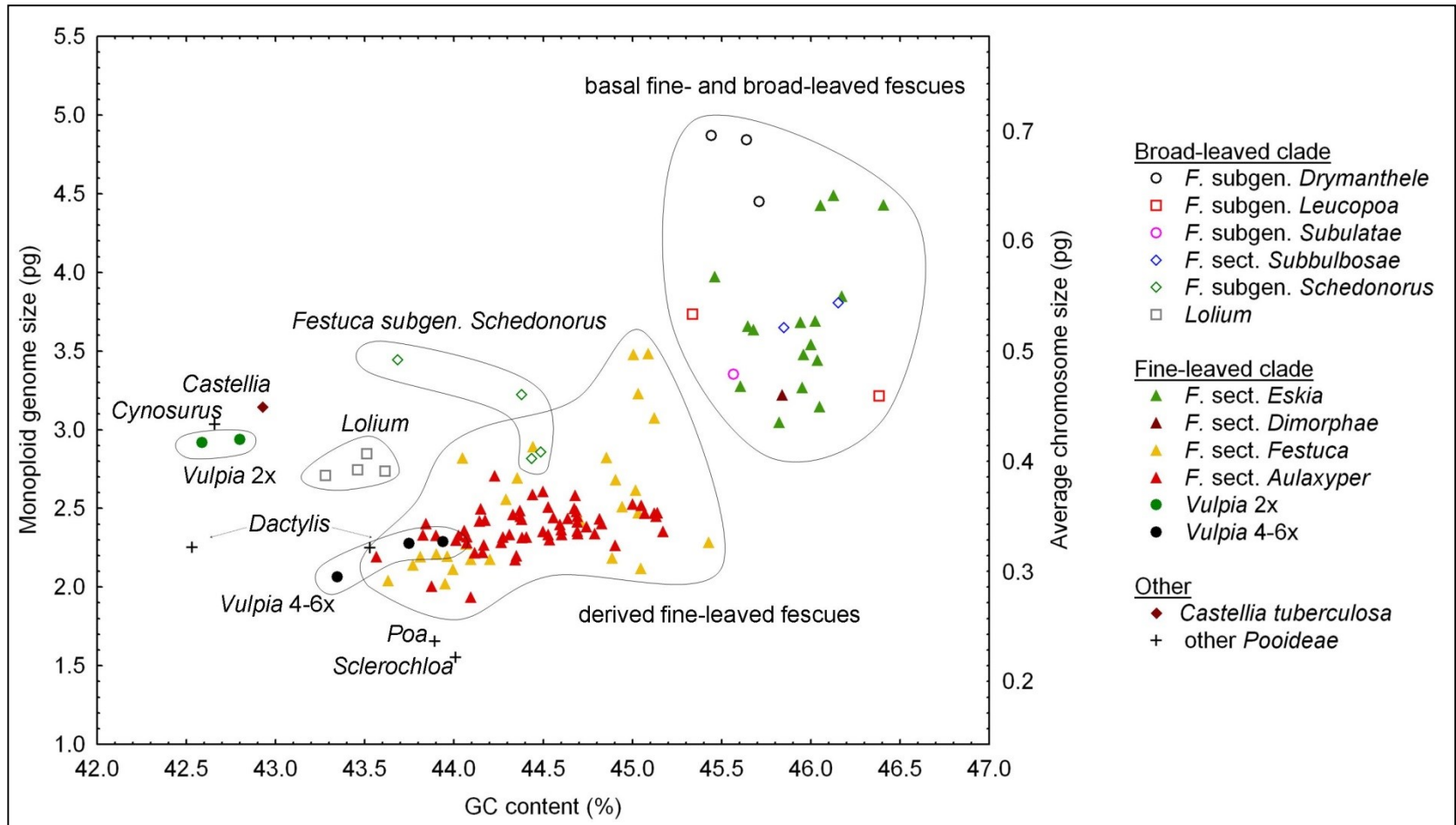
Barow a Meister 2002

Table 2
*Differences Between the DAPI DFs
of the Investigated Families**

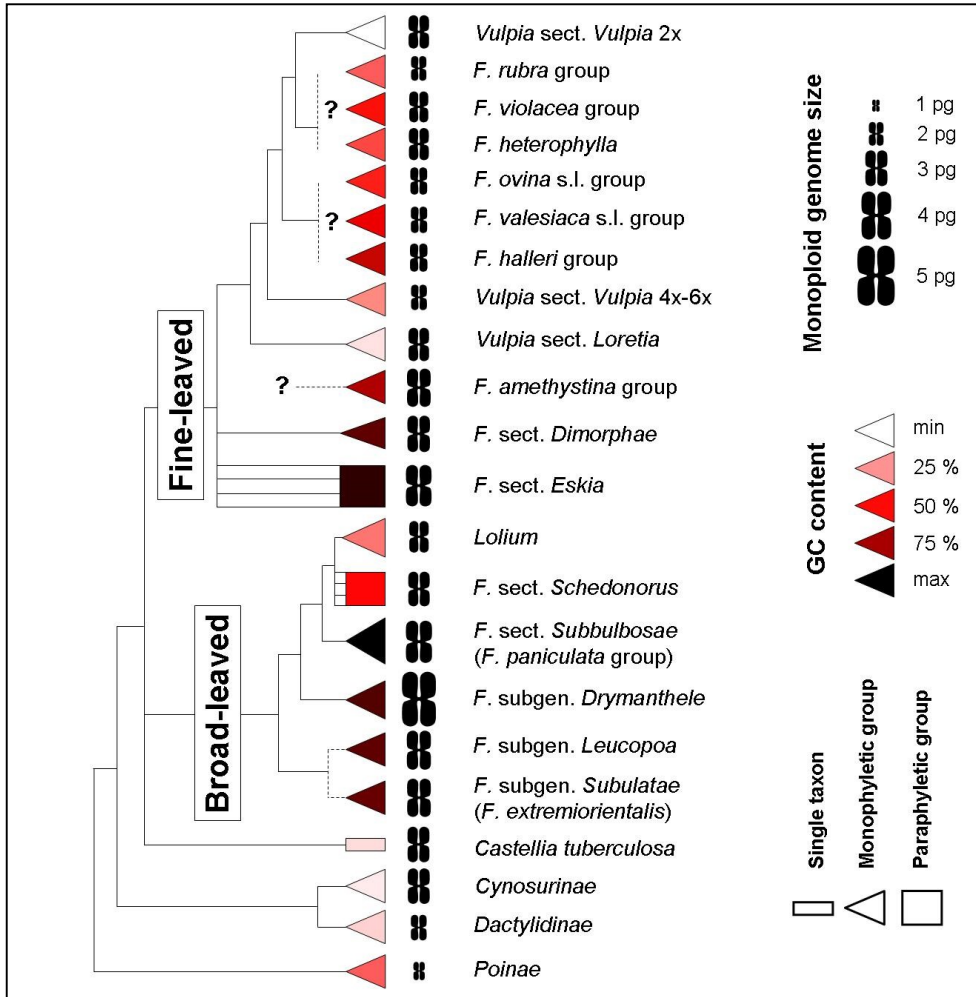
Family	Average DAPI factor with SD	Significance code ^b
Poaceae	0.70 ± 0.06	a
Asparagaceae	0.90 ± 0 ^a	b
Ranunculaceae	0.93 ± 0.02	bc
Rosaceae	0.94 ± 0.05	bc
Pinaceae	0.96 ± 0.02	bc
Brassicaceae	0.97 ± 0.01	bc
Lamiaceae	0.98 ± 0.06	bc
Chenopodiaceae	1.02 ± 0.04	bcd
Asteraceae	1.02 ± 0.08	bcd
Cucurbitaceae	1.04 ± 0.05	bcd
Urticaceae	1.05 ± 0.05	bcd
Solanaceae	1.07 ± 0.06	cd
Fagaceae	1.07 ± 0.02	cde
Fabaceae	1.07 ± 0.06	cde
Liliaceae	1.15 ± 0 ^a	de
Alliaceae	1.15 ± 0.04	de
Ginkgoaceae	1.20 ± 0 ^a	e



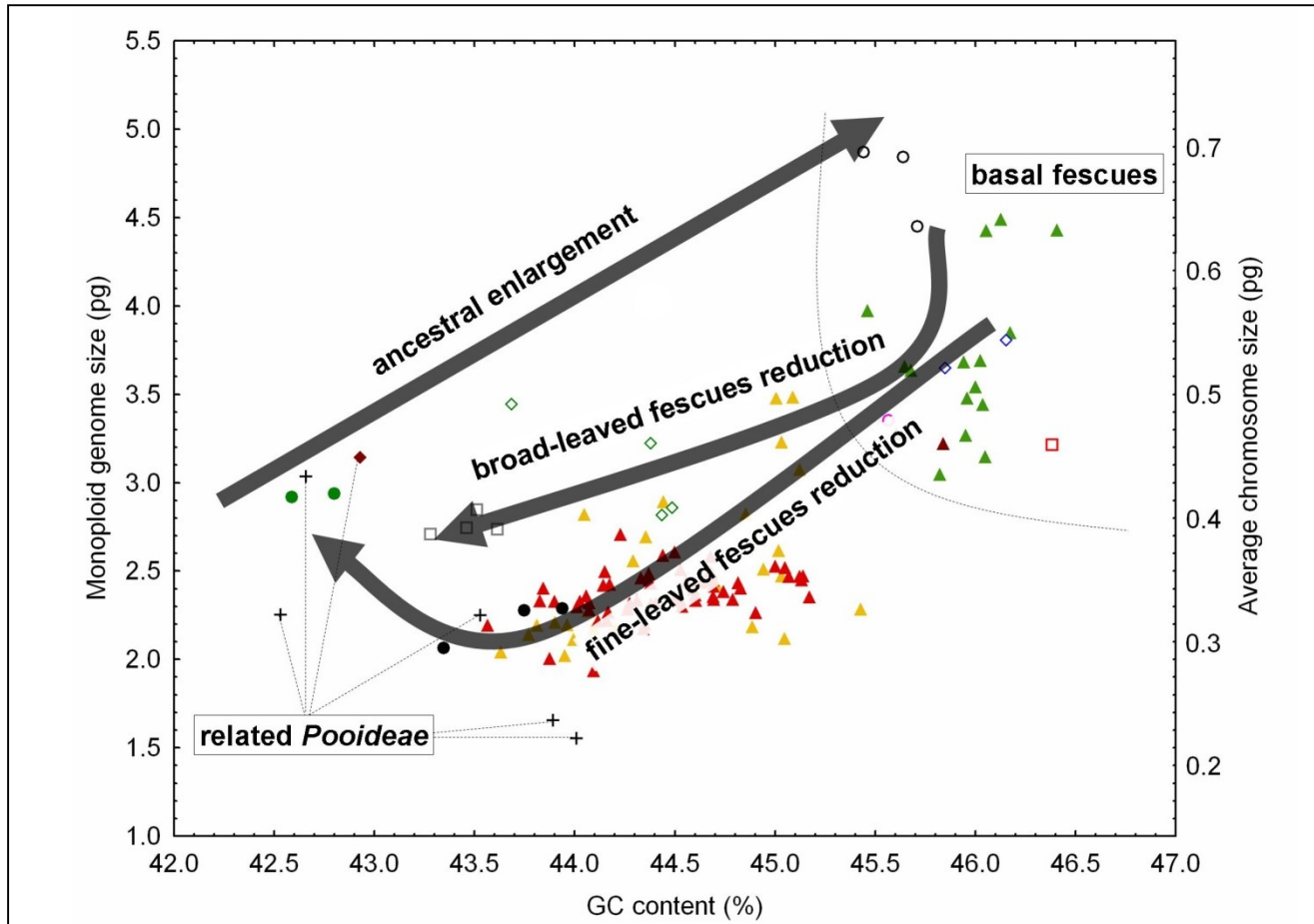
Festuca



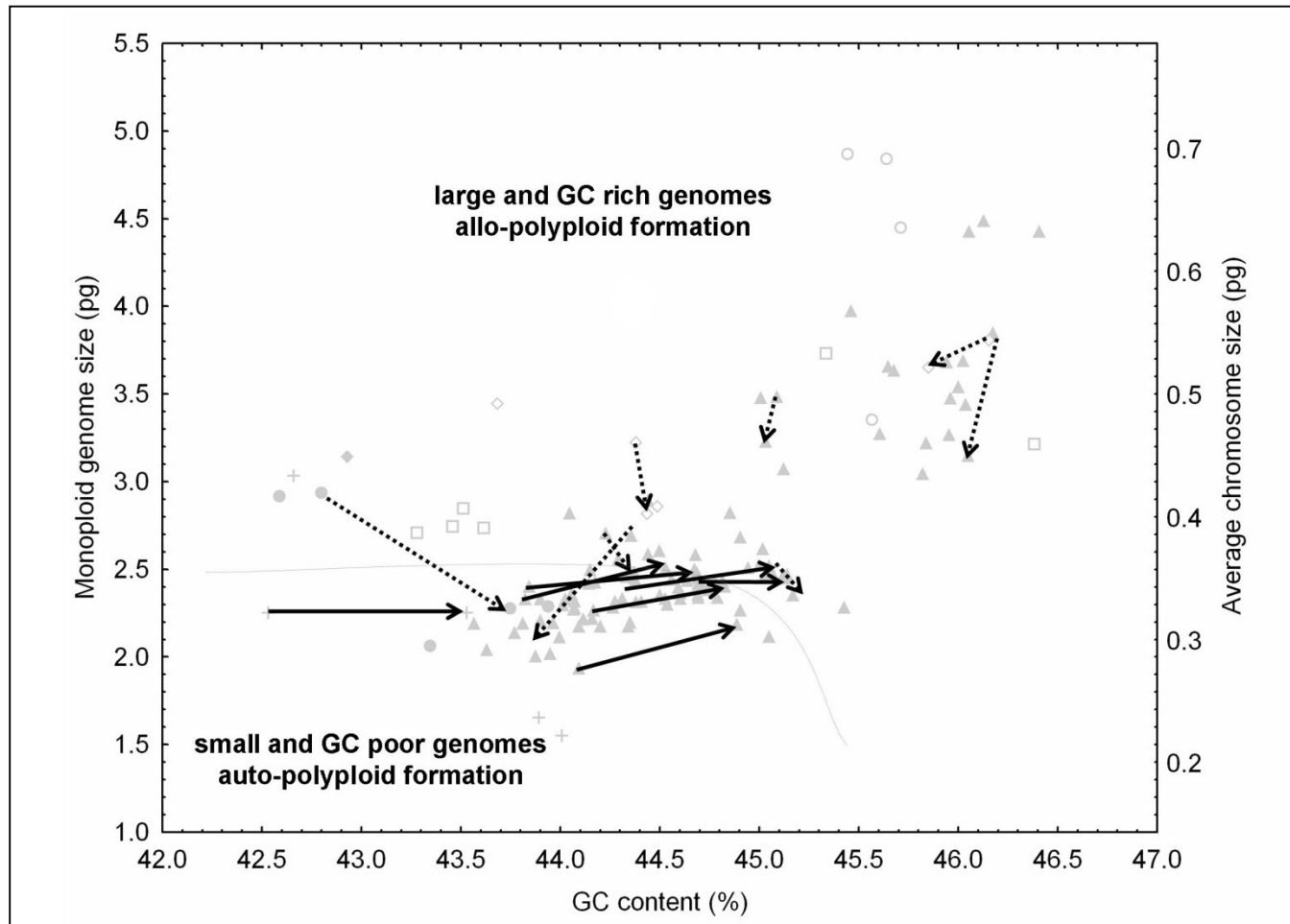
Festuca II



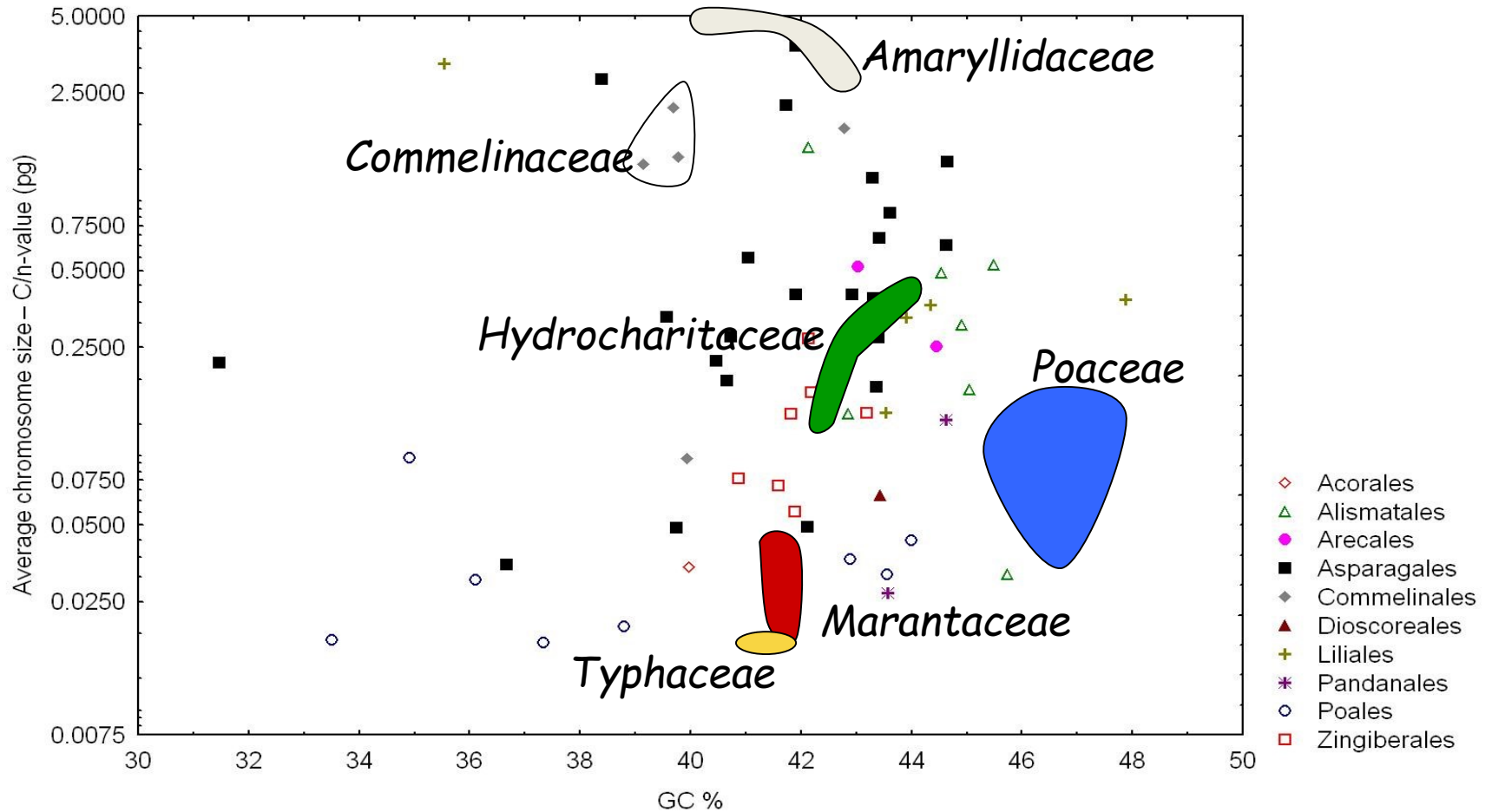
Festuca III



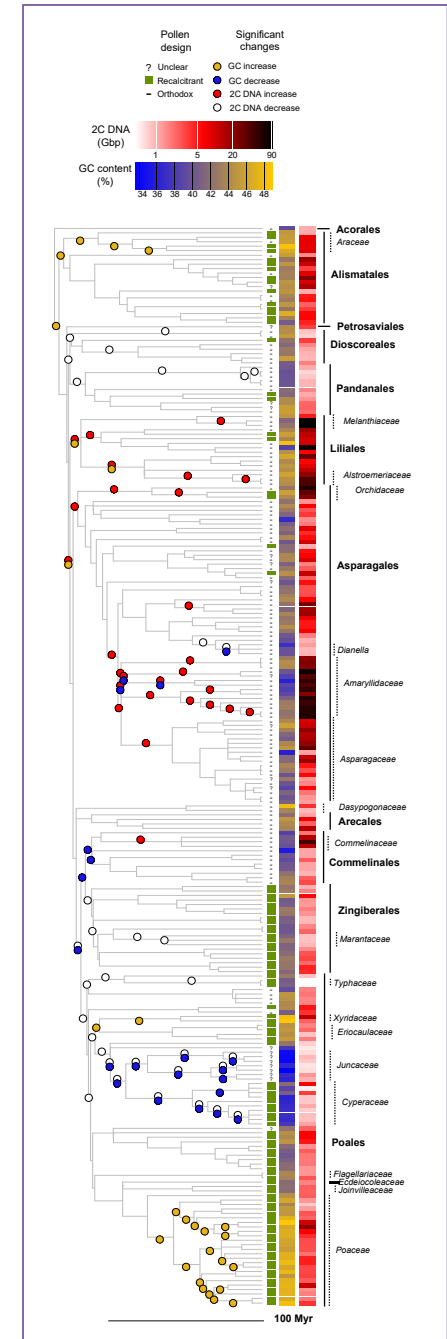
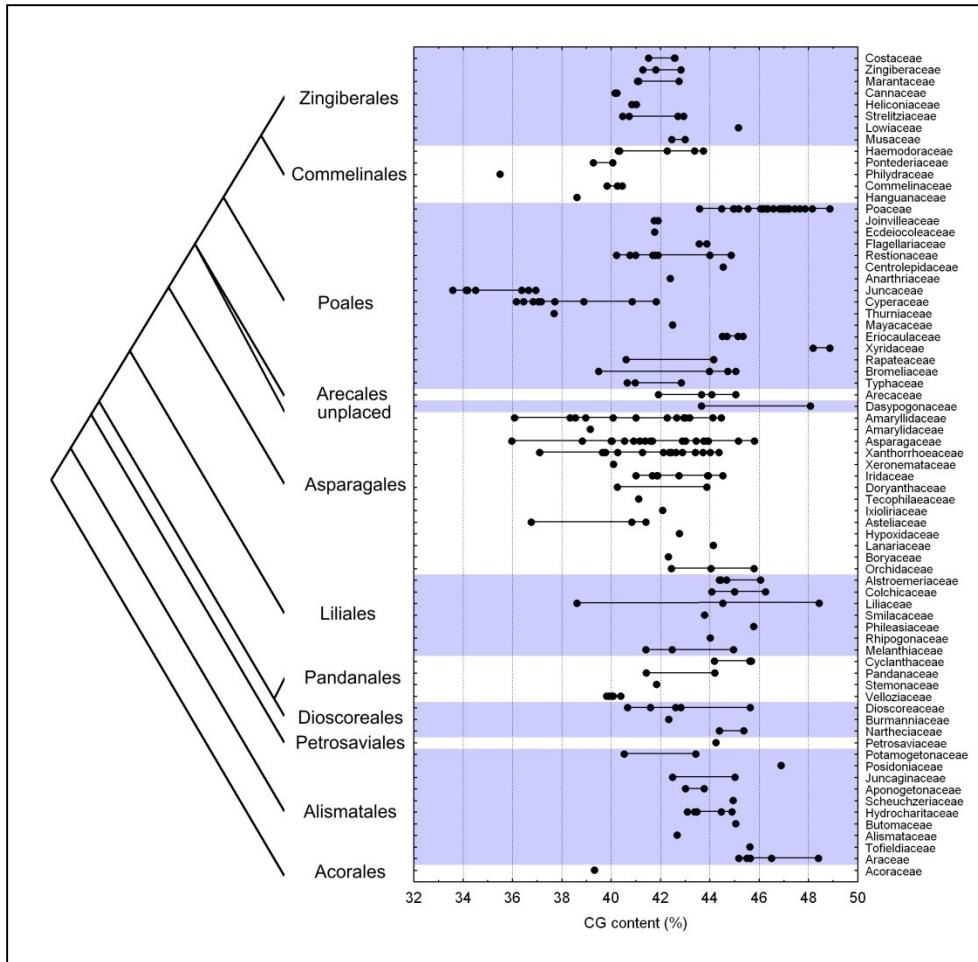
Festuca IV



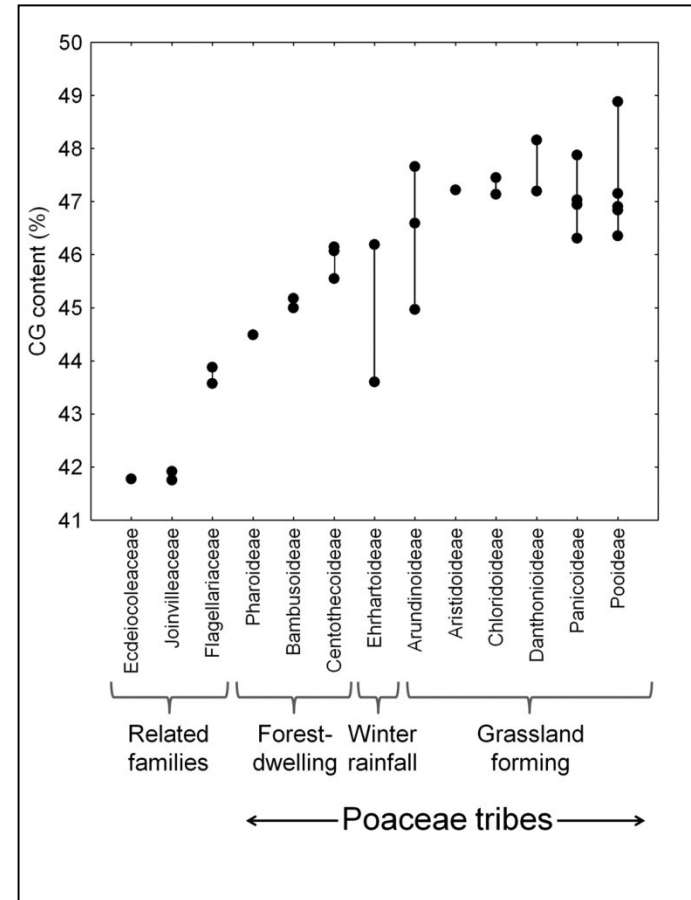
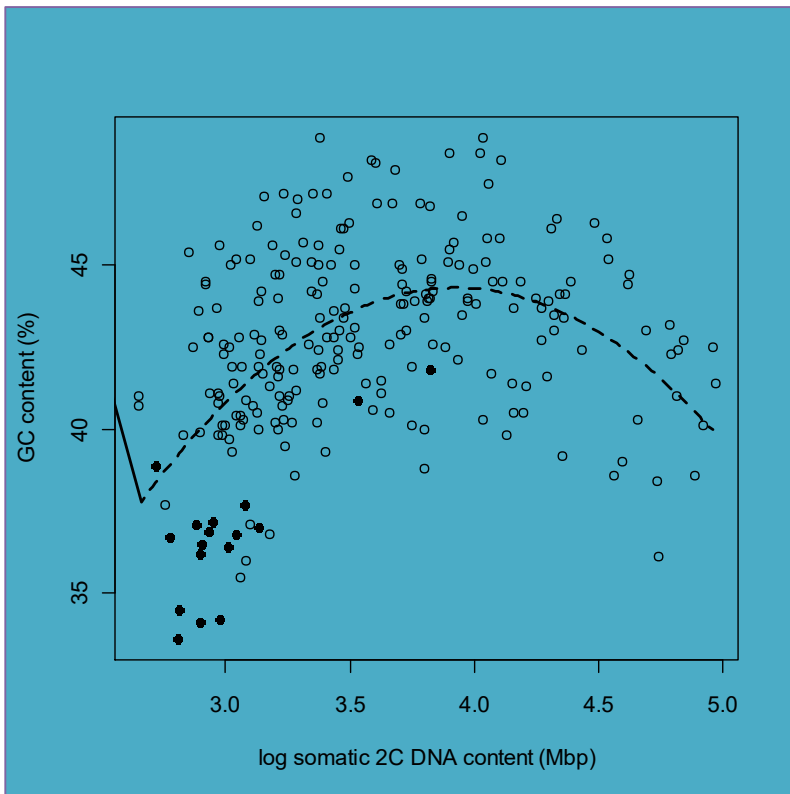
Monocots I



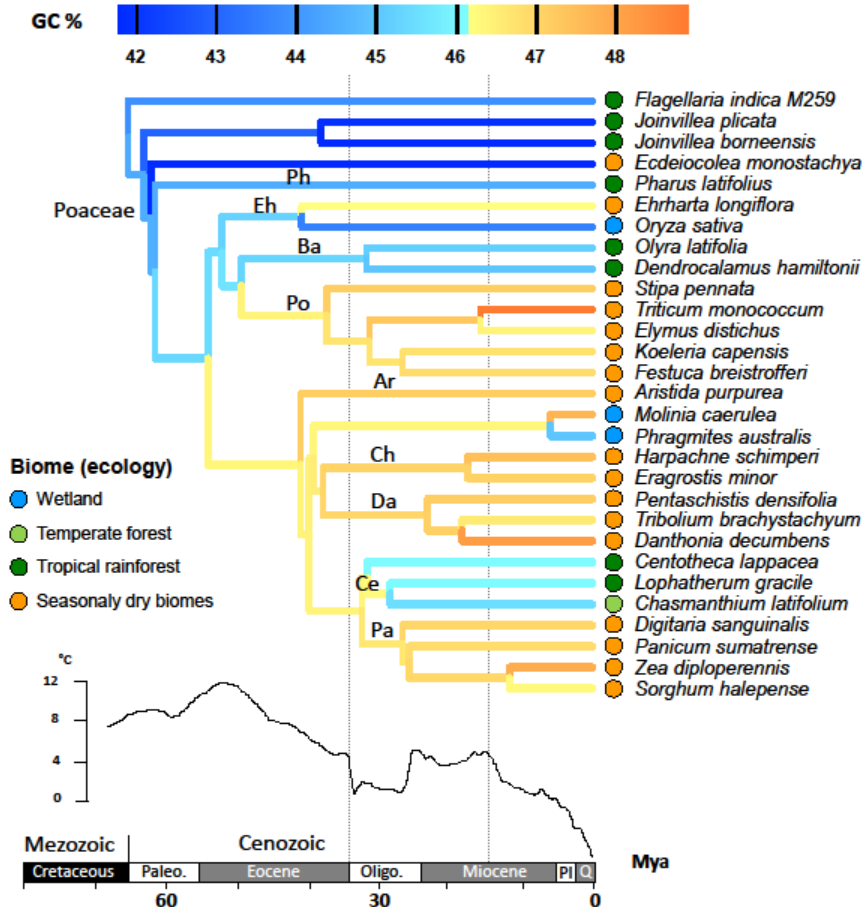
Monocots II



Monocots II



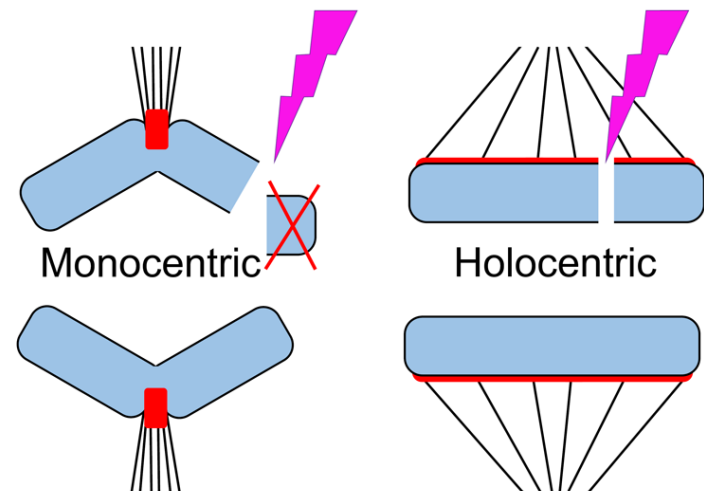
High GC grasses



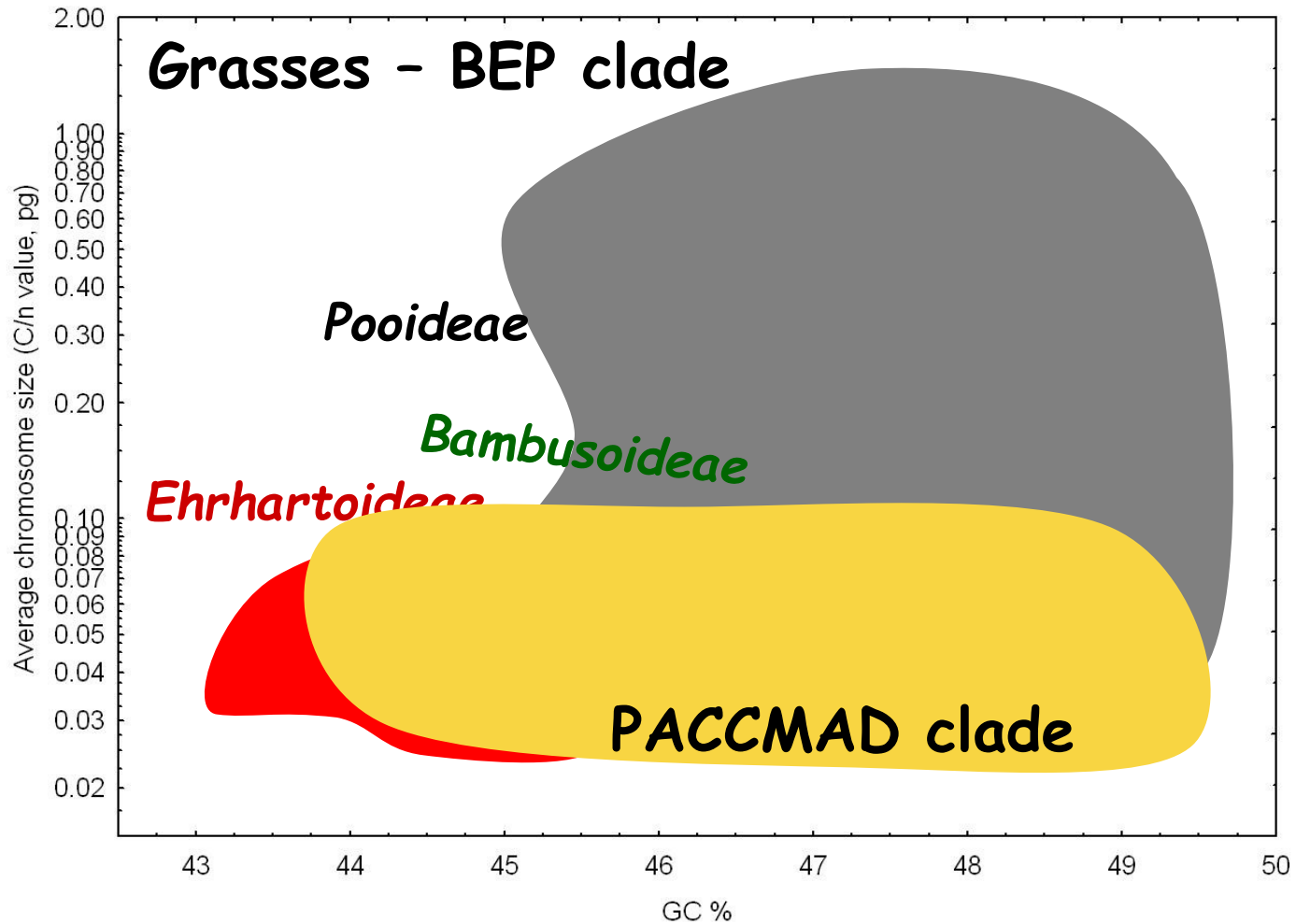
- Correlates with the extreme evolutionary success of grasses in open and drought stressed habitats and Tertiary expansion of grass biome (Šmarda et al. PNAS 2014)
- High GC correlates with presence of GC rich genes' orthologs of unknown function (? is this the same in GC-rich Xyridaceae and algae)

Low GC in holokinetics?

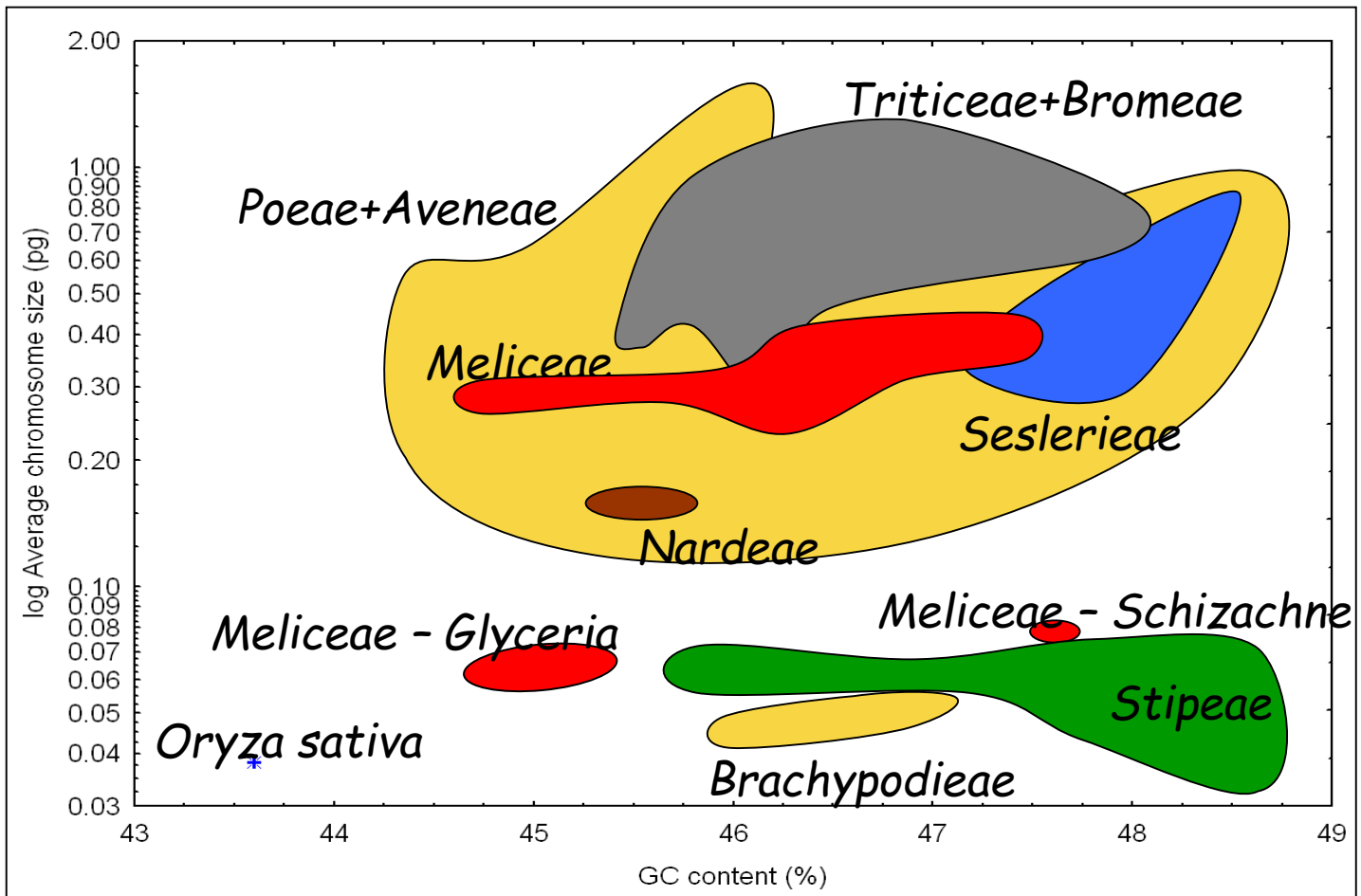
- Unknown molecular reasons
- Single example - holokinetics rare in vascular plants but common in various groups of arthropods (Odonata, Trichoptera, Nematodanthognata,
- Stiff holokinetic chromosomes tolerate breaks – known in many ancient lineages - might allow terrestrialization (Zedek & Bureš submitted) (for plants e.g. holokinetic Zygnemataceae – GC content unfortunately not known)



BEP clade *Poales*



Pooideae



Co příště doplnit

- Endopolyploidi
- Genome size downsizing u polyploidů
- Genome size u fosilních rostlin