

# Chromosomální sorting a jeho aplikace



Jaroslav Doležel

Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum  
Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Olomouc



# Dnešní menu

---

- Sekvenování složitých genomů rostlin
- Redukce komplexity a třídění chromosomů
- Vývoj metod u rostlin
- Chromosomová genomika
- Příklady aplikací

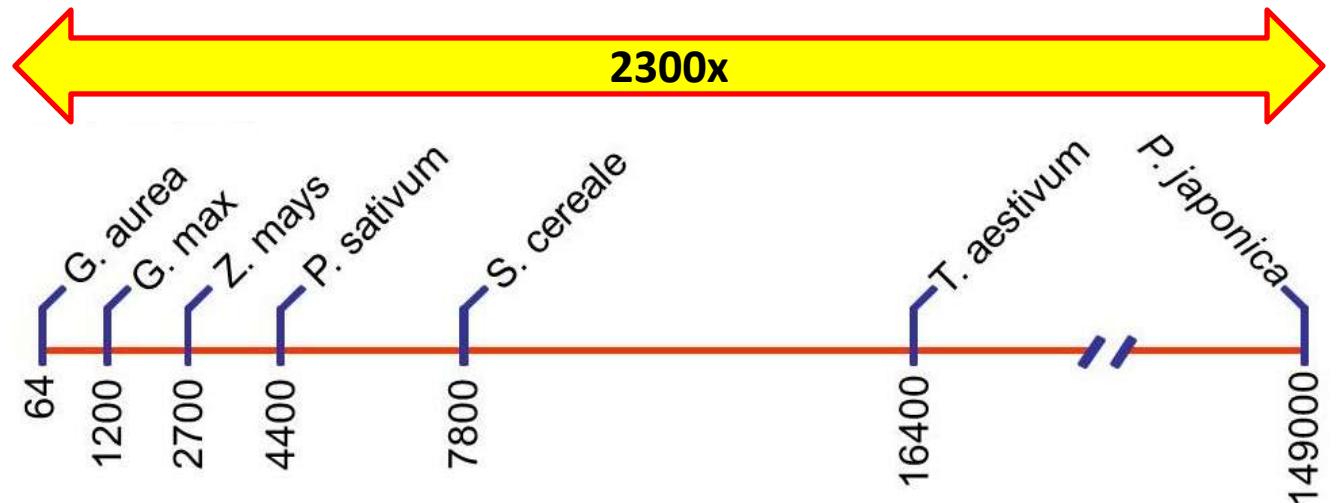
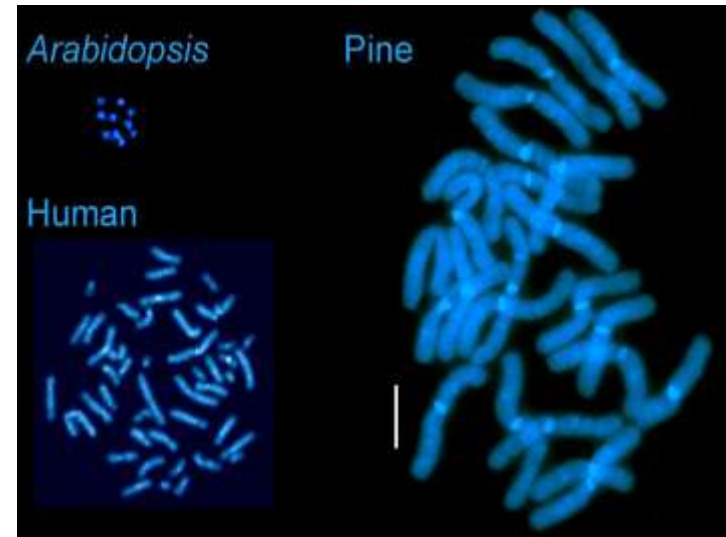
# Chceme znát úplné sekvence genomů

- **Struktura a funkce jaderného genomu**
  - Struktura genomu (strukturní genomika)
  - Porovnání různých genomů (komparativní genomika)
  - Funkce genomu (funkční genomika)
- **Odvozování DNA markerů a tvorba genetických map**
  - Identifikace markerů v těsné vazbě na určitý znak
  - Šlechtění pomocí markerů
- **Klonování genů**
  - Poziční klonování
  - Identifikace genů *in silico*



# Velikost genomu rostlin

- Paradox (záhada) C hodnoty
- Velikost genomu vykazuje slabou korelaci se složitostí organismu
- Morfologicky podobné organismy mohou mít velmi odlišnou velikost jaderného genomu



# Genomy rostlin a jejich sekvenování

- Některé rostliny mají obrovské genomy

■ Rýže (~400 Mbp)

■ Kukuřice (~2500 Mbp)

Člověk (~3000 Mbp)

Pšenice setá (~17,000 Mbp)

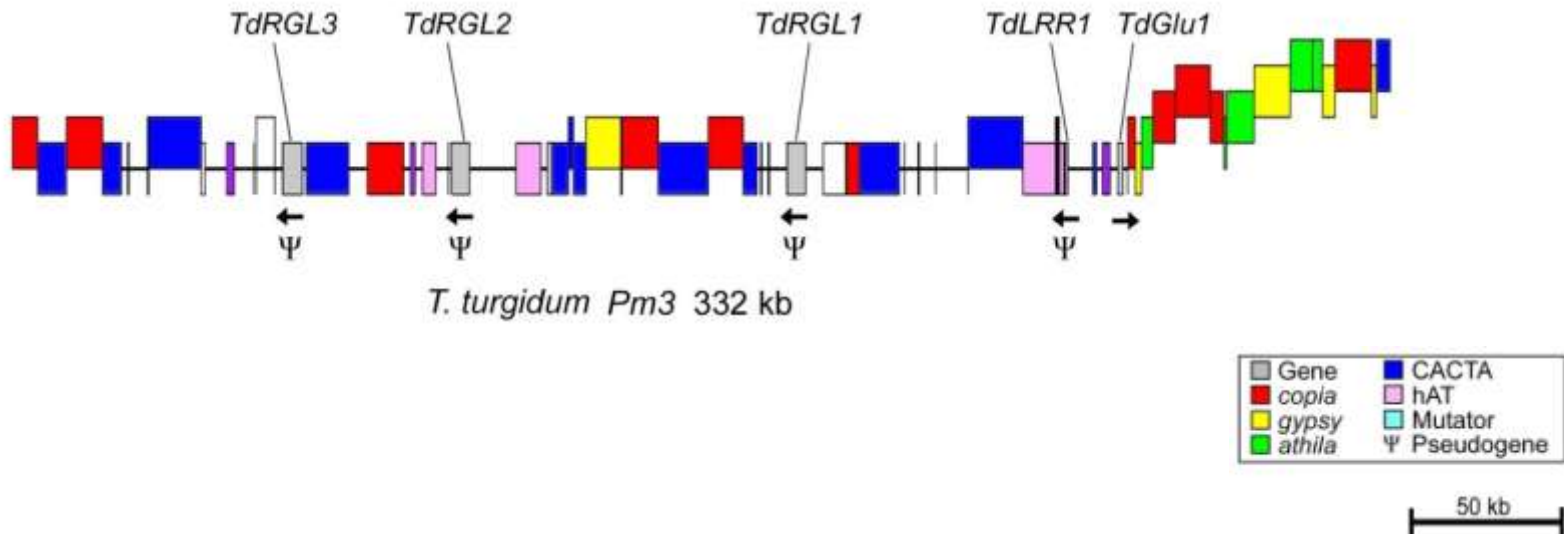


Genom pšenice obsahuje asi 3000x více znaků než celá knižní série o Harry Potterovi !!!



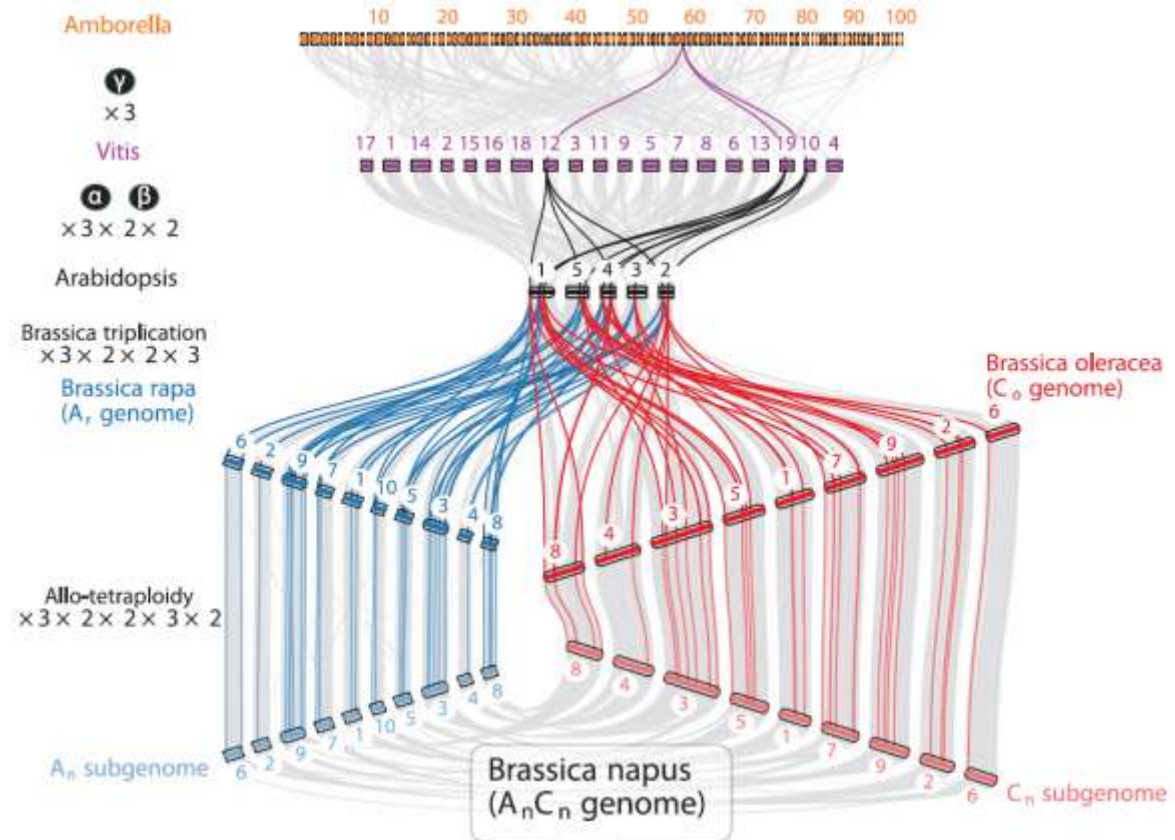
# Struktura genomů rostlin

- Většina genomu se skládá ze sekvencí DNA, které se mnohokrát opakují (repetitivní sekvence)
- Převažují mobilní genetické elementy a typické jsou inserce transpozónů do sekvencí jiných transpozónů
- Geny a nízkokopiové sekvence DNA obvykle tvoří jen několik procent genomu



# Polyploidizace a evoluce rostlin

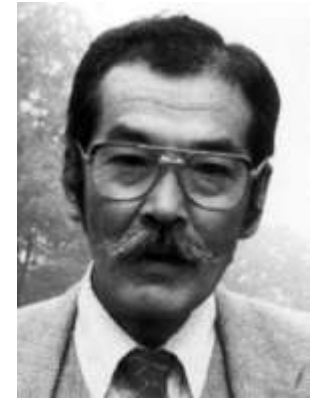
- Polyploidie je významným faktorem evoluce rostlin
- Vyšší adaptabilita a zvýšená tolerance polyploidů vůči nepříznivým podmínkám
- Některé vývojové linie rostlin navíc prodělaly epizody recentní polyploidizace



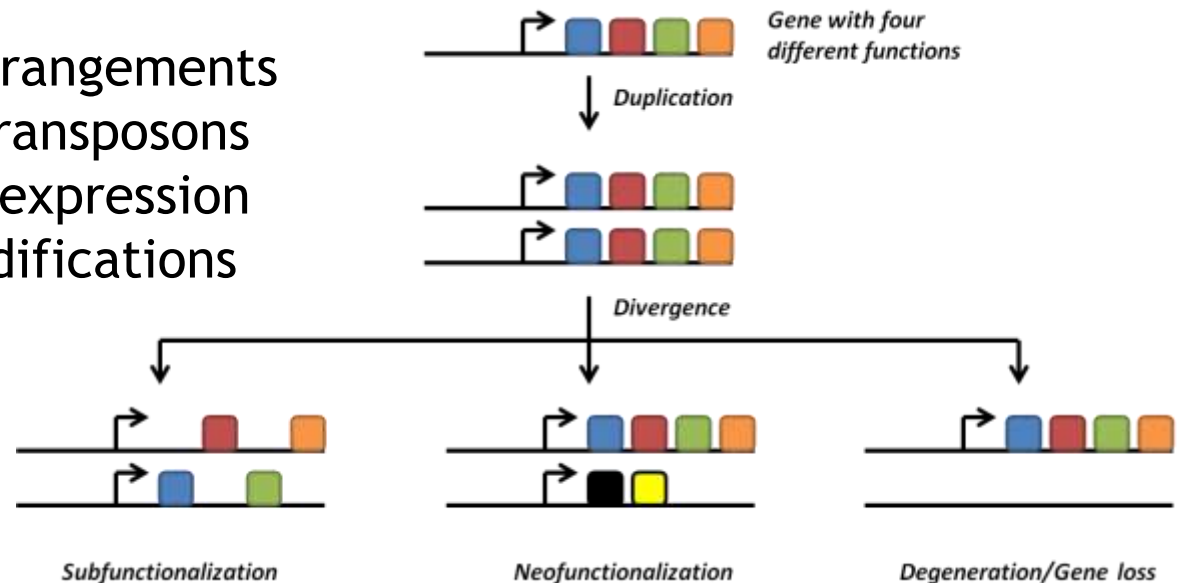
Typický ancestrální lokus genomu keře *Amborella trichopoda* (bazální dvouděložná) odpovídá až 72 lokusům *Brassica napus*

# Evolution by gene duplication

- **2R hypothesis (S. Ohno):** the genomes of the early vertebrate lineage underwent two complete genome duplications
- Relaxed selection of duplicated genes and accumulation of mutations:
  - Fixation of beneficial alleles
  - Loss of non-functional genes
- „Genomic shock“:
  - Structural rearrangements
  - Activation of transposons
  - Modified gene expression
  - Epigenetic modifications



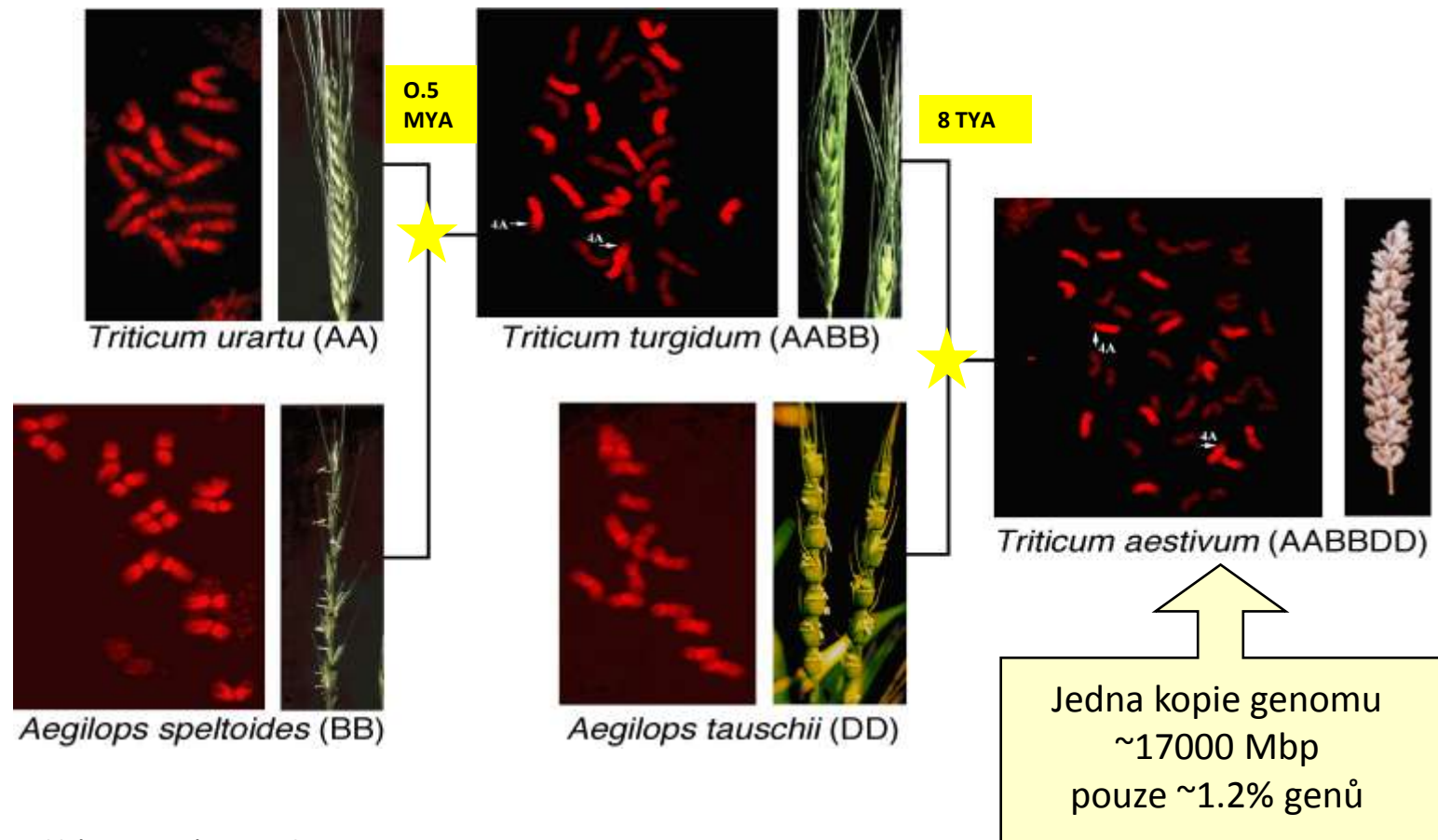
(Susumu Ohno, 1970)





# Pšenice setá je recentní polyploid

- Pšenice setá je alohexaploid ( $2n = 6x = 42$ ) s genomem AABBDD
- Výsledek dvou mezidruhových hybridizací (a polyploidizací)



# Problém se sekvenováním genomů rostlin

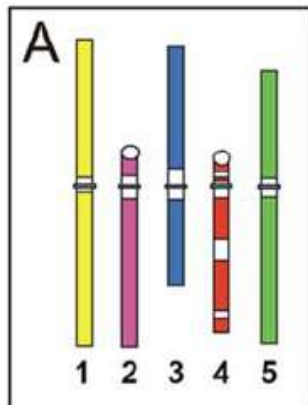
- NIKOLIV kapacita sekvenátorů
- ALE potíže se sestavováním mnoha krátkých sekvenačních čtení s převahou repetitivní DNA (... a polyploidie)
  - Délka čtení by musela přesahovat 200kb aby bylo možné sestavovat úseky genomů bohaté na repetitivní DNA
  - Současné metody „next generation sequencing“ takových hodnot zdaleka nedosahují



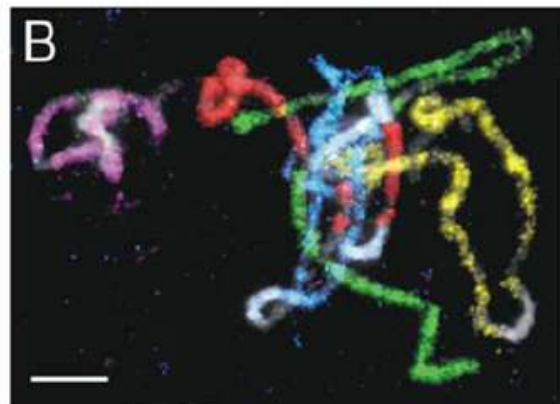
# Přehodnocení strategie

- Jaderný genom není tvořený jedinou molekulou DNA
- Je rozdělený na menší části - chromosomy
- Proč se snažíme sekvenovat směs všech chromosomů najednou?

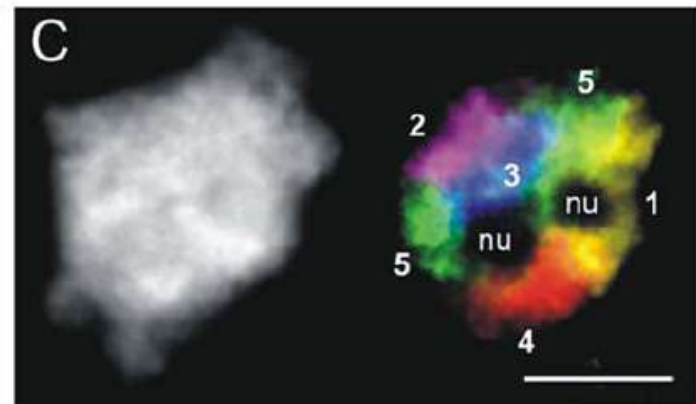
*Arabidopsis thaliana* ( $2n=2x=10$ )  
painting chromosomů



Idiogram



Pachytene

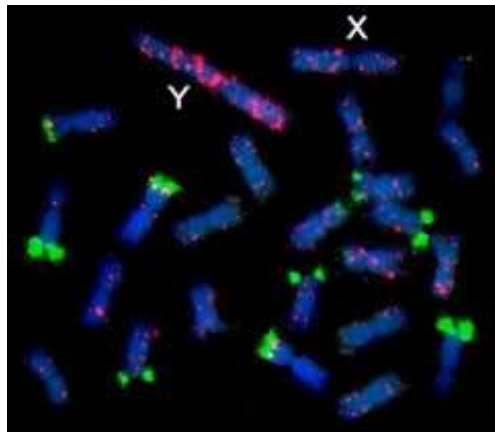


Interfázní jádro

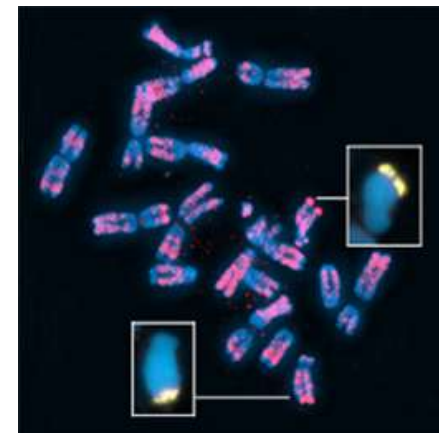
# Chromosomově-centrický přístup

Nabízí možnost analyzovat

- Pohlavní chromosomy
- Přídavné (B) chromosomy
- Specifické (aberrantní) chromosomy
- Allele phasing
- Strukturní chromosomovou heterozygotnost



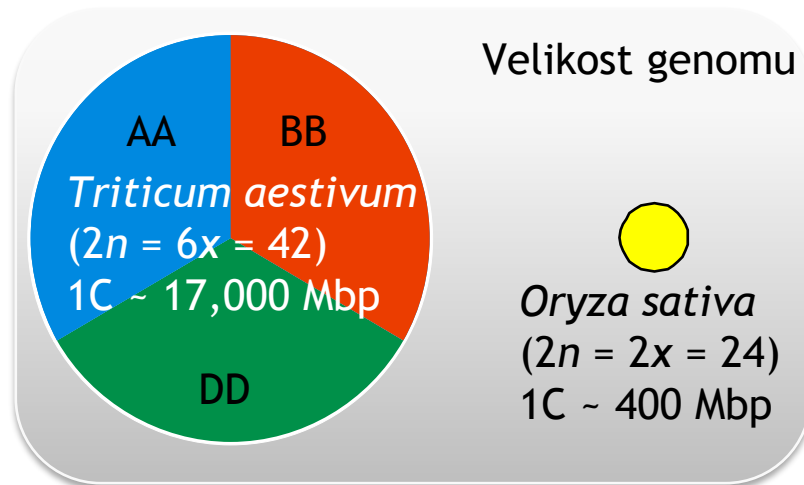
Pohlavní chromosomy u knotovky bílé



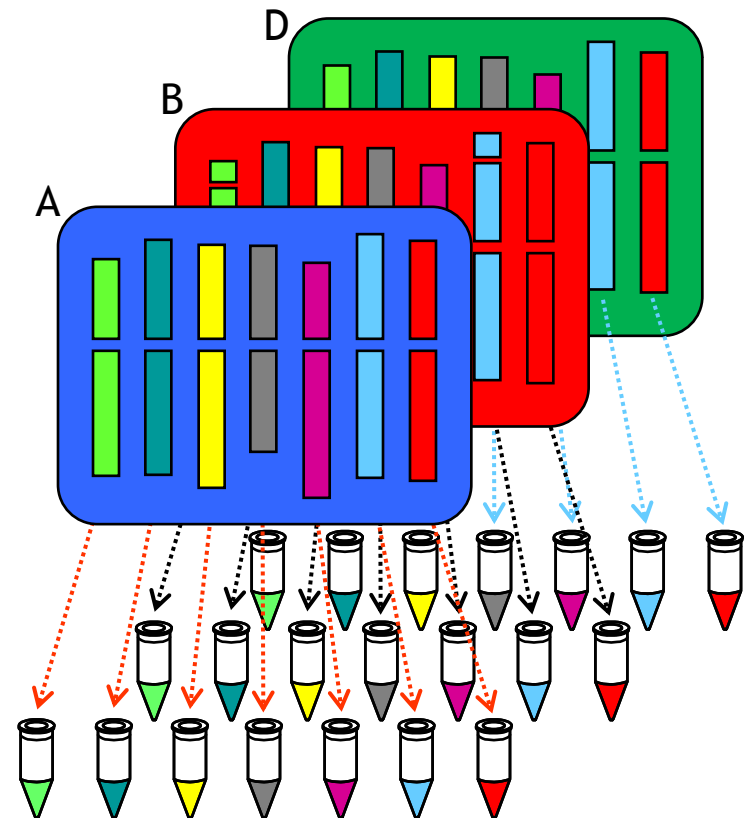
B chromosomy žita

# Chromosomová genomika

- Aplikace metod genomiky na izolované chromosomy



Rozdělení genomu pšenice na jednotlivé chromosomy

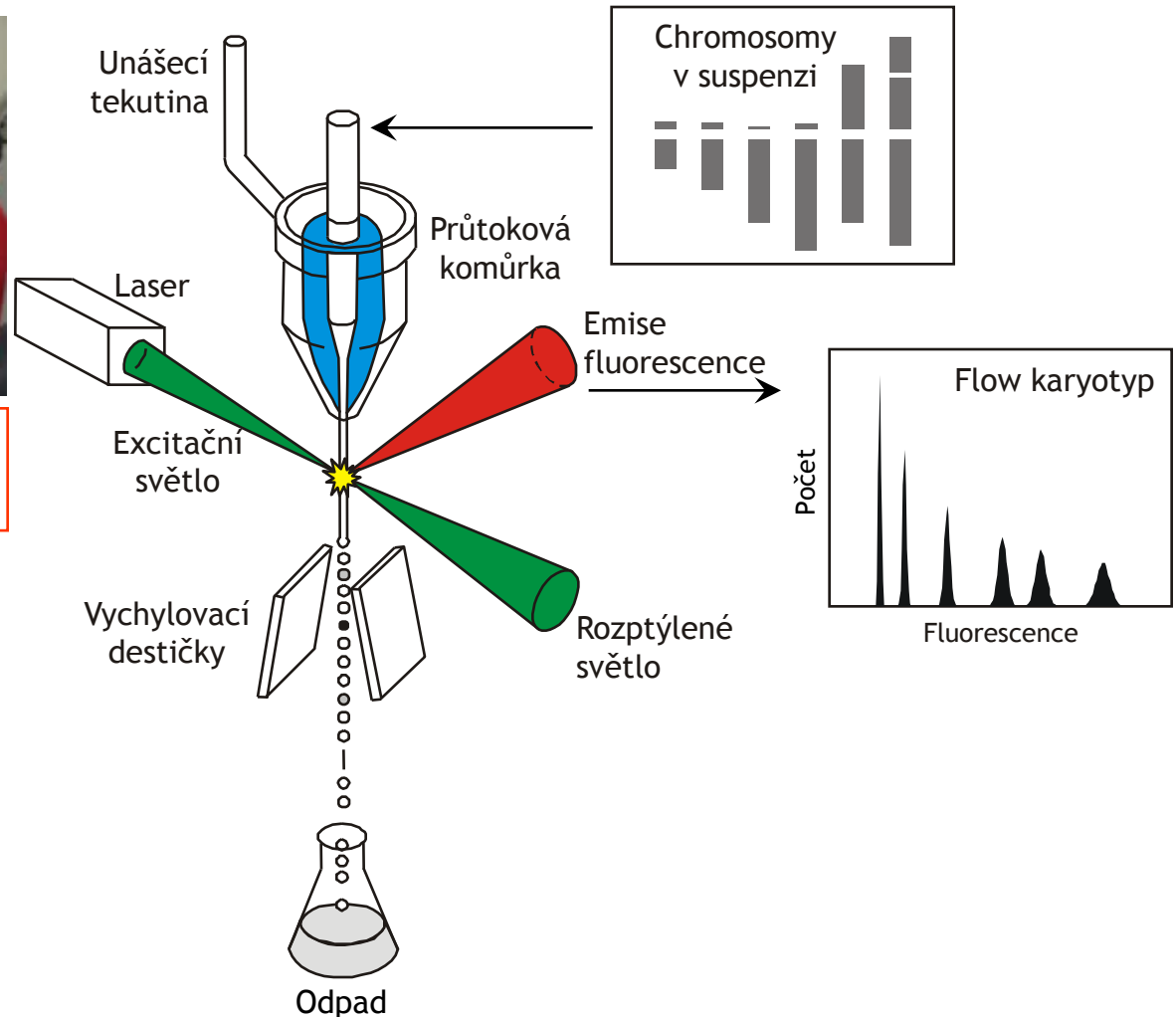


- Chromosomy: 605 - 995 Mbp  
(3.6 - 5.9% velikosti genomu)
- Ramena chromosomů: 225 - 585 Mbp  
(1.3 - 3.4% velikosti genomu)

# Analýza chromosomů průtokovou cytometrií



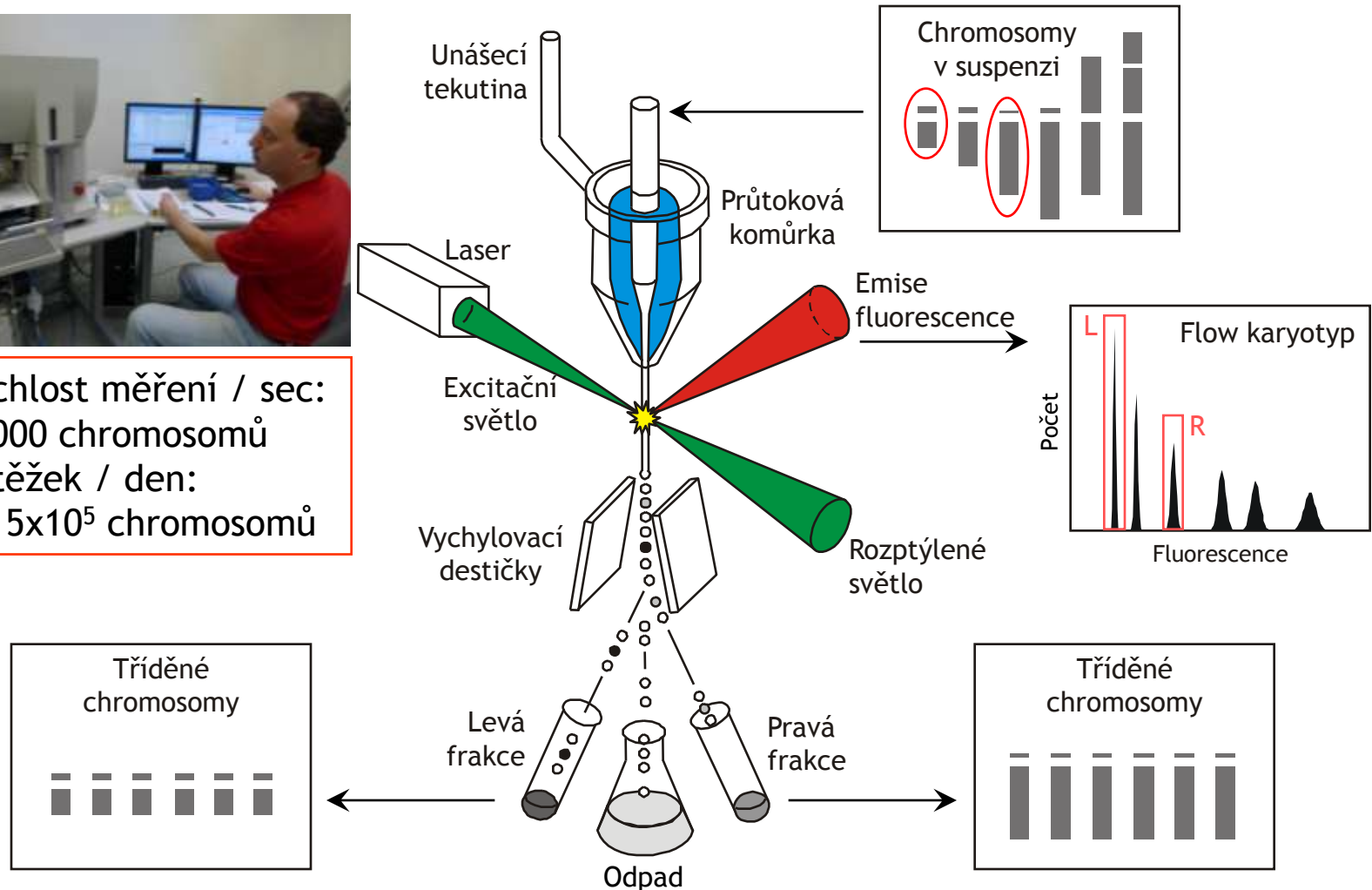
- Rychlost měření / sec:  
~1000 chromosomů



# Třídění chromosomů průtokovou cytometrií

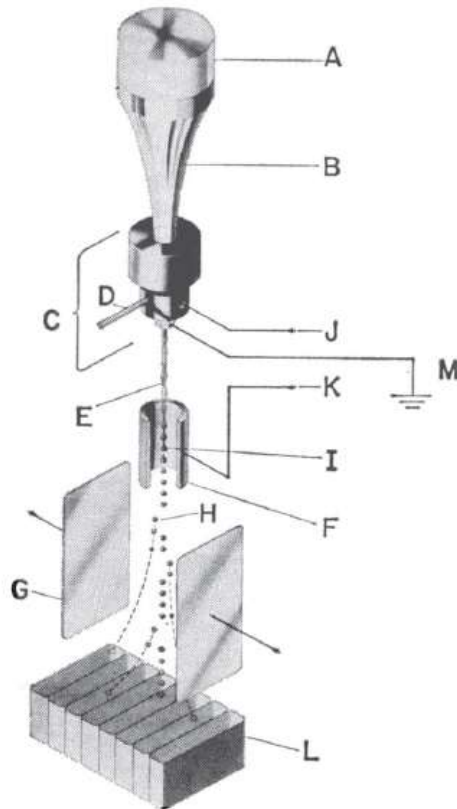


- Rychlost měření / sec:  
~1000 chromosomů
- Výtěžek / den:  
2 - 5x10<sup>5</sup> chromosomů



# Výročí průtokové cytometrie

- V listopadu 2015 slaví průtoková cytometrie 50. narozeniny



**The original flow.** M. Fulwyler described the first flow cytometer in 1965 (1), proposing that it might be possible to "measure simultaneously two (or more) characteristics of a cell and to make separation dependent on the ratio of such characteristics."

SCIENCE sciencemag.org

## HISTORY OF SCIENCE

### *Flow cytometry strikes gold*

Flow cytometry remains unparalleled as a high-throughput, high-content single-cell analysis technology

By J. Paul Robinson<sup>1</sup> and Mario Roederer<sup>2</sup>

**T**his month marks the 50th anniversary of the birth of flow cytometry. One would imagine that a technology invented so long ago would be radically different today—yet it has changed remarkably little in its fundamentals.

Göhde's demonstration of microscope-based flow cytometry to measure cell-associated fluorescence (3), the field of cell analysis transformed. Shortly thereafter, Herzenberg was on sabbatical in the laboratory of the biochemist César Milstein at Cambridge University, when Milstein and Georges Köhler invented the Nobel Prize-winning monoclonal

13 NOVEMBER 2015 • VOL 350 ISSUE 6262 739

Published by AAAS



# Sekvenování genomu člověka

© 1990 Wiley-Liss, Inc.

Cytometry 11:208–218 (1990)

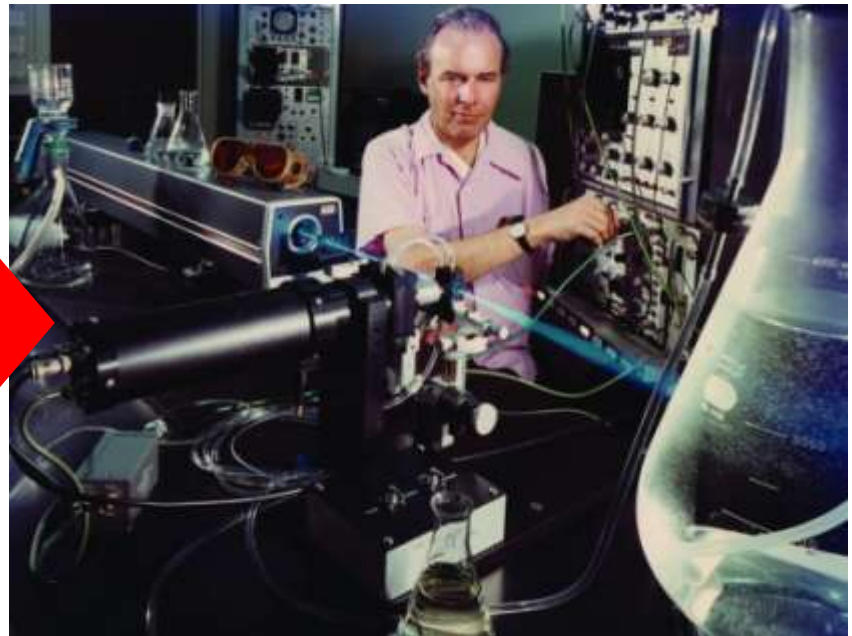
## Construction of Gene Libraries for Each Human Chromosome

**Marvin A. Van Dilla and Larry L. Deaven**

Biomedical Sciences Division, Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, California 94550 (M.A.V.D.);  
Life Sciences Division, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico 87545 (L.L.D.)

Received for publication July 6, 1989; accepted August 22, 1989

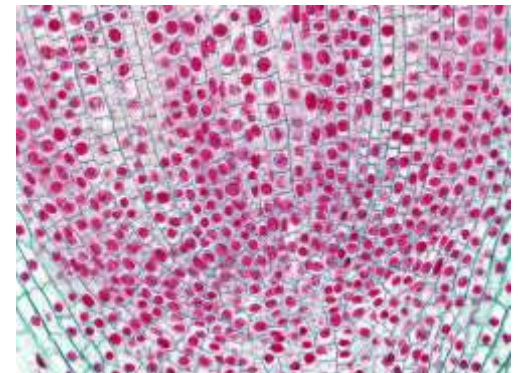
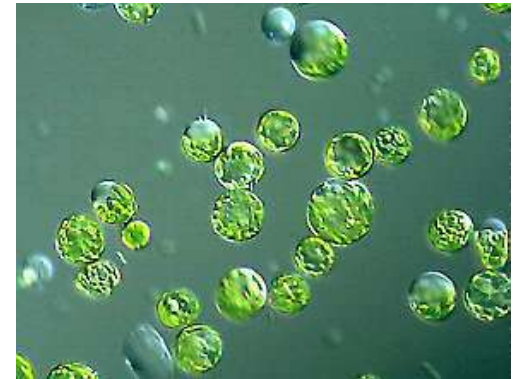
- Konstrukce knihoven DNA malých inzertů z tříděných chromosomů člověka



# A jak to bylo (a je) s rostlinami?

Vývoj metod pro analýzu a třídění chromosomů pomocí průtokové cytometrie komplikovaly

1. Problémy s přípravou suspenzí intaktních chromosomů
  - Ve většině rostlinných pletiv je mitotická aktivita nízká
  - Je obtížné izolovat intaktní chromosomy z buněk, které mají pevnou buněčnou stěnu
2. Problémy s diskriminací jednotlivých chromosomů v karyotypu



# Naše metoda

\* Planta (1992) 188:93–98

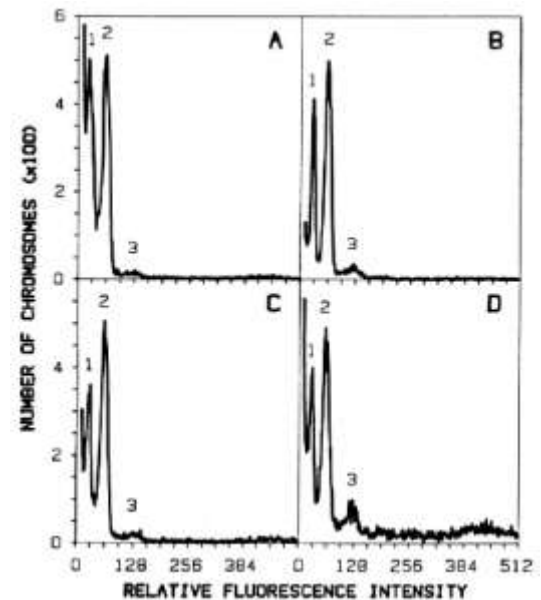
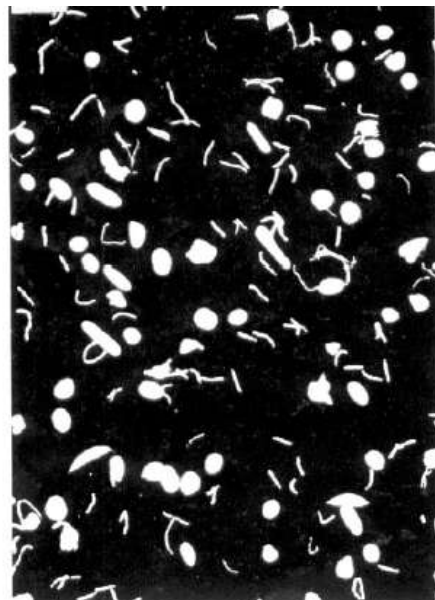
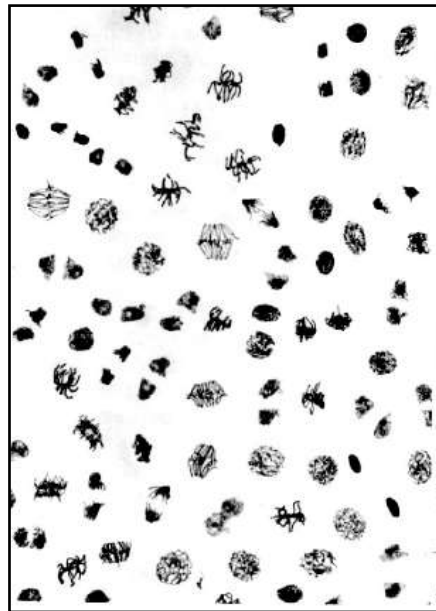
**Planta**  
© Springer-Verlag 1992

## A high-yield procedure for isolation of metaphase chromosomes from root tips of *Vicia faba* L.

J. Doležel<sup>1</sup>, J. Čihalíková<sup>1</sup>, and S. Lucretti<sup>2</sup>

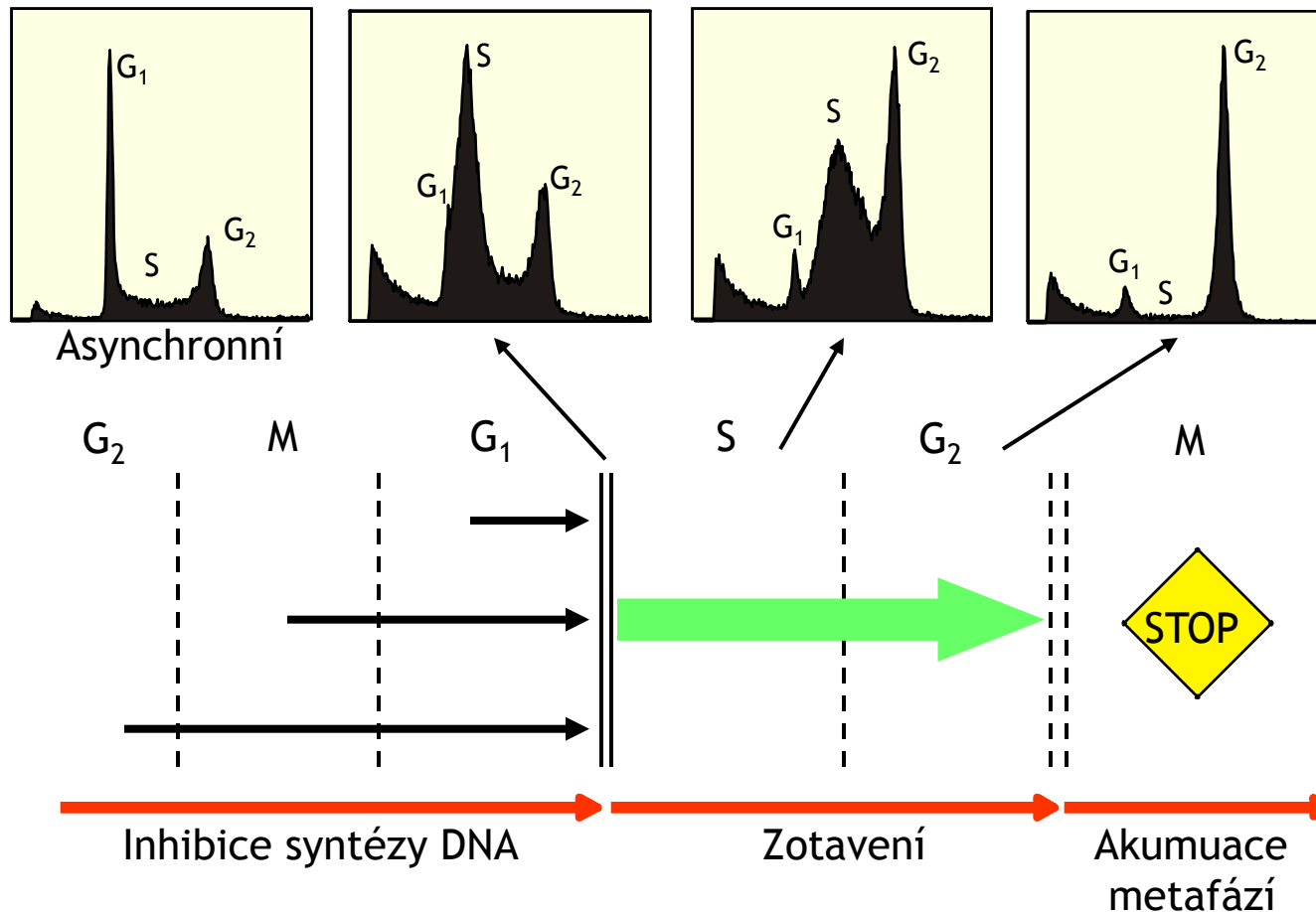
<sup>1</sup> Institute of Experimental Botany, Department of Plant Biotechnology, Sokolovská 6, CS-77200 Olomouc, Czechoslovakia

<sup>2</sup> ENEA, C.R.E. Casaccia, Genetic Engineering Division, C.P. 2400, I-00100 Rome, Italy



# Synchronizace buněčného cyklu

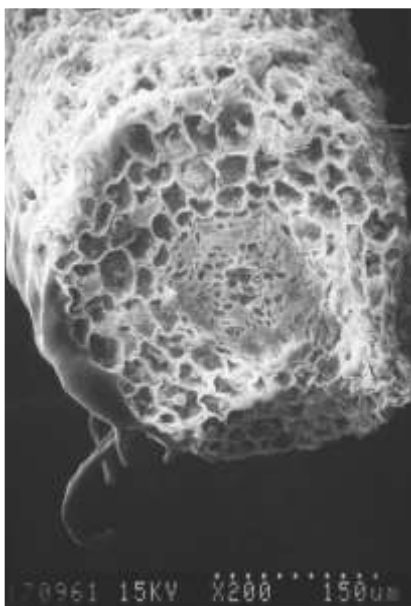
- Distribuce obsahu DNA v kořenovém meristému *Vicia faba*



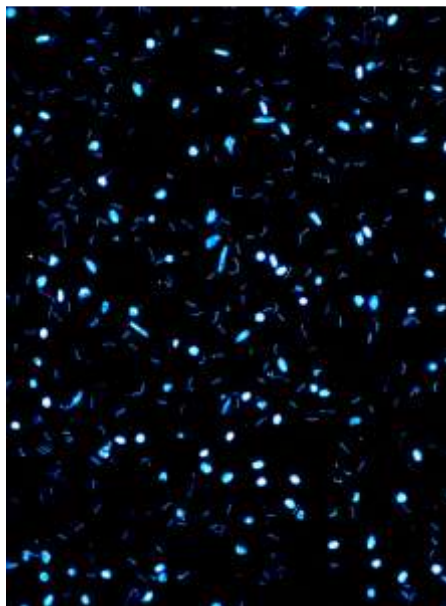
# Izolace intaktních chromosomů

- Slabá fixáž synchronizovaných kořenových špiček v roztoku formaldehydu
- Uvolnění chromosomů do roztoku mechanickou homogenizací
- Odstranění velkých fragmentů pletiva a buněk filtrací

Kořenová špička



Výsledná suspenze



Chromozóm



# Příprava vzorku pro průtokovou cytometrii

## Protokol

Synchronizace buněčného cyklu v kořenovém meristému



Akumulace dělících se buněk v metafázi



Izolace chromosomů



Barvení chromosomů pomocí DNA fluorochromu



Analýza pomocí průtokové cytometrie



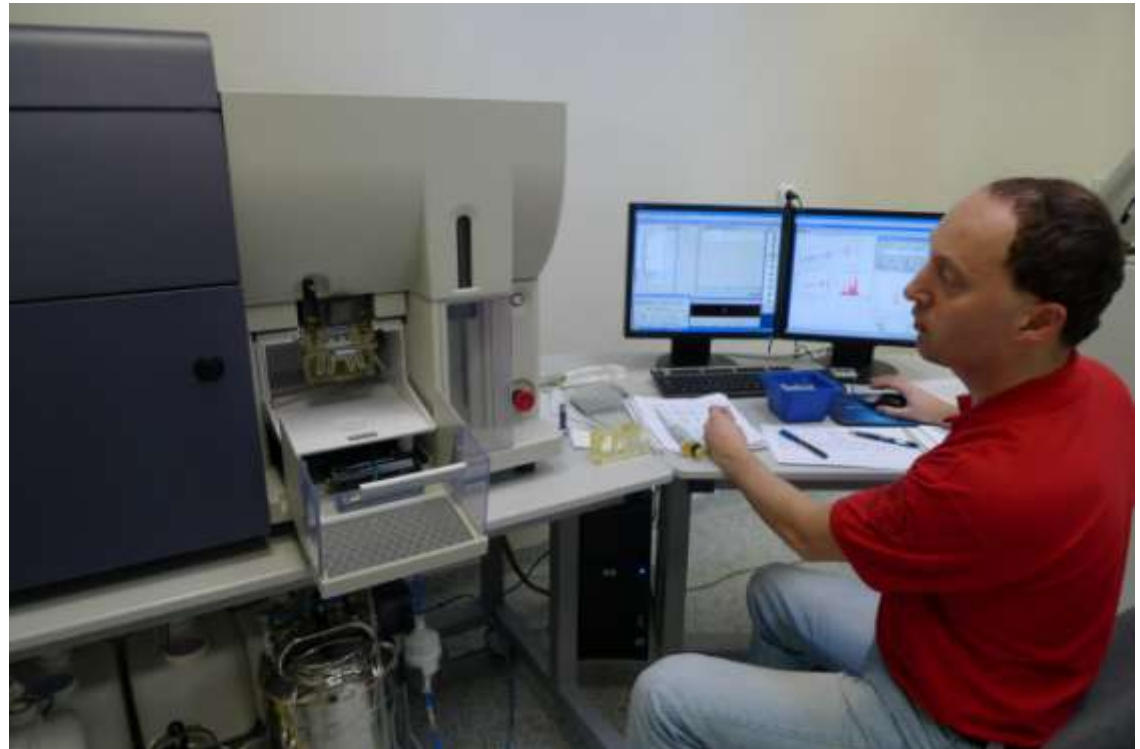
Třídění chromosomů



# Modifikace metody pro jiné druhy rostlin

Naši metodu jsme modifikovali pro více než 20 druhů rostlin

- Bob koňský
- Hrách setý
- Cizrna beraní
- Ječmen setý
- Pšenice setá
- Žito seté
- Oves setý
- *Aegilops* spp.
- Smrk ztepilý
- Knotovka bílá
- Chřest

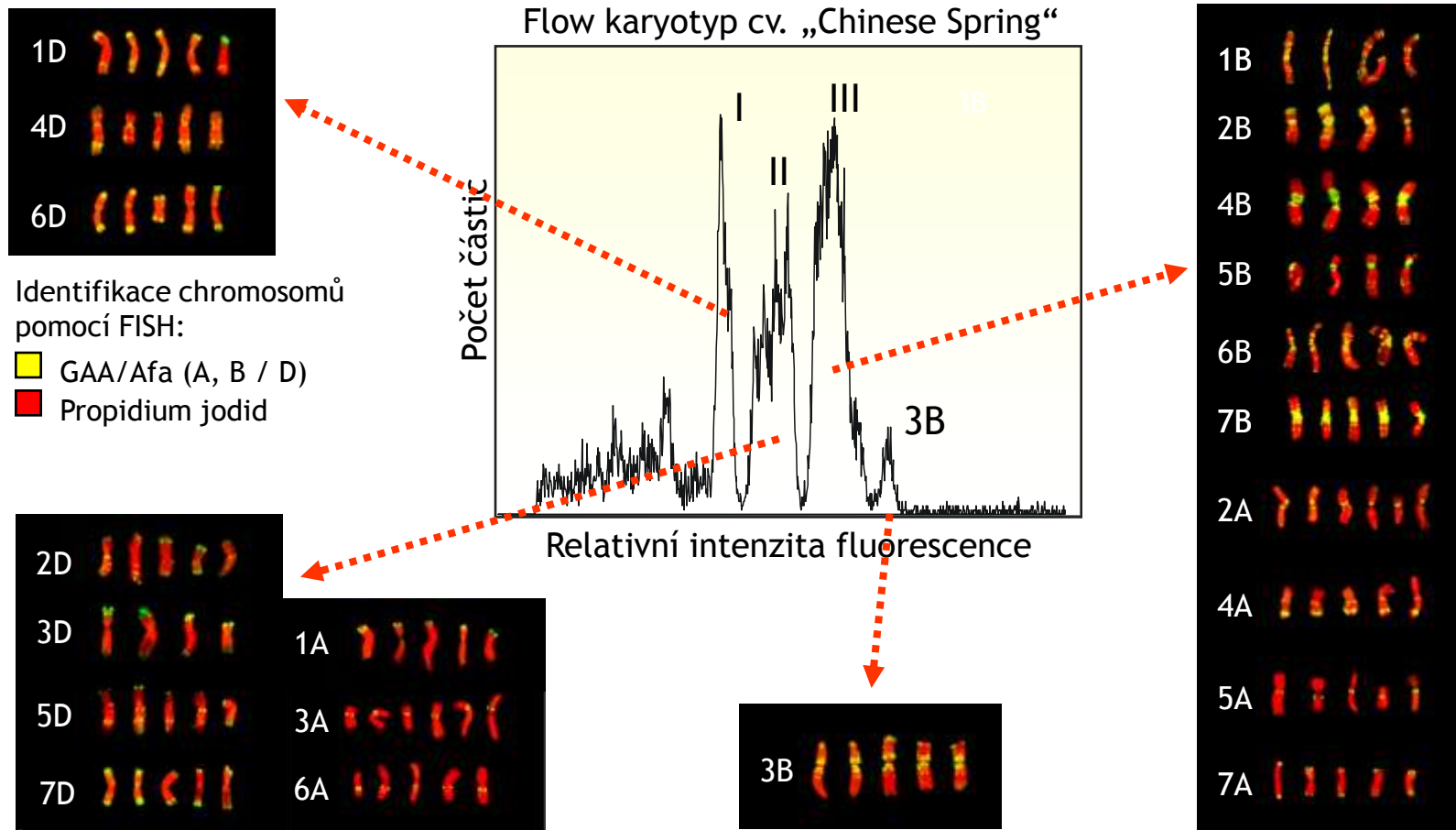


BD FACS Aria SORP high-speed flow sorter:

- Sample rate: >1000 chromosomes / sec
- Simultaneous sorting of four different subpopulations
- Sort rate: 15 - 30 chromosomes / sec
- Sort yield: 2 - 5 x10<sup>5</sup> chromosomes / day

# Třídění chromosomů pšenice

- U hexaploidní pšenice ( $2n = 6x = 42$ ) se standardním karyotypem je možné třídit pouze chromosom 3 z jejího B genomu (3B)

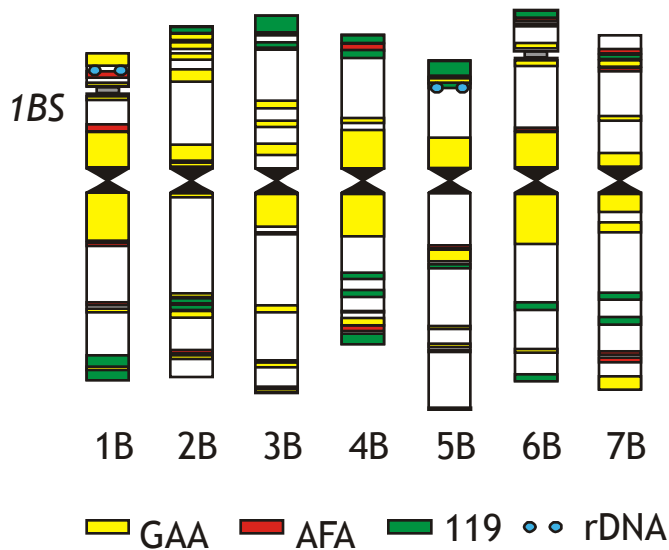




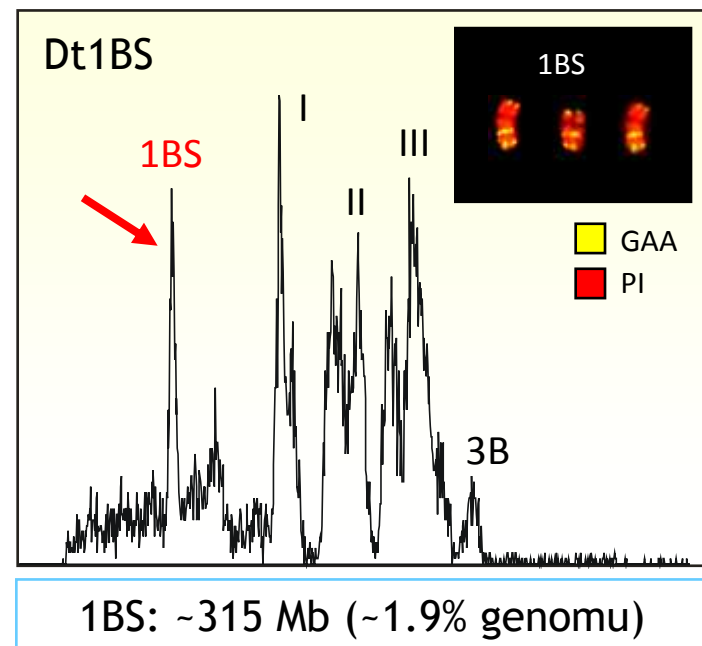
# Řešení: linie s modifikovaným karyotypem

- Polyploidní pšenice toleruje aneuploidii
- Chromosom jednoho (sub)genomu může kompenzovat ztrátu homeologního chromozómu nebo jeho ramene z jiného (sub)genomu

Chromosomy B genomu pšenice:

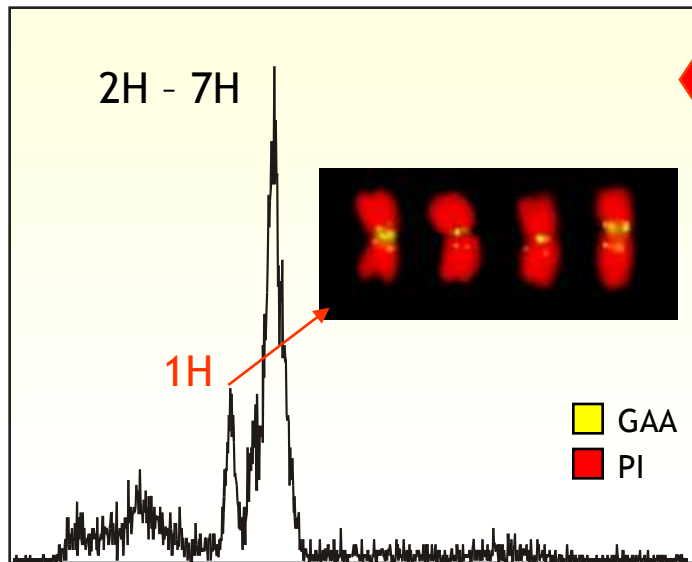


Ditelosomická linie 1BS



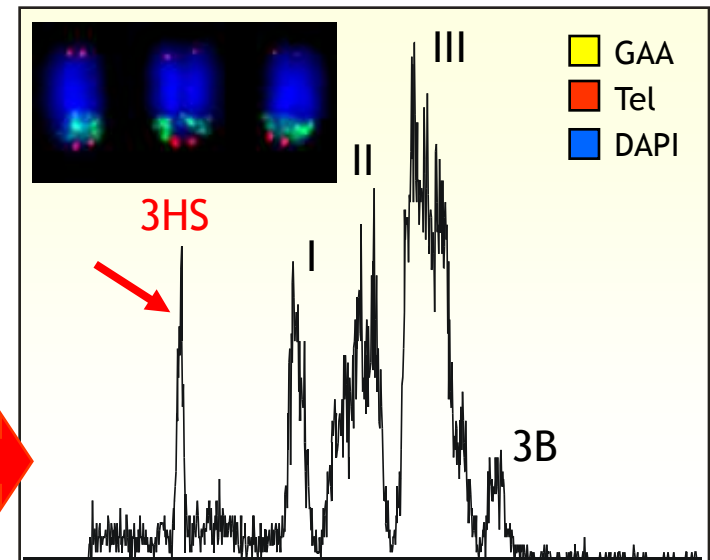
# Třídění chromosomů diploidních Triticeae

- Polyploidní pšenice toleruje přítomnost chromosomů a ramen chromosomů jiných druhů tribu Triticeae



Flow karyotyp ječmene ( $2n = 14$ )

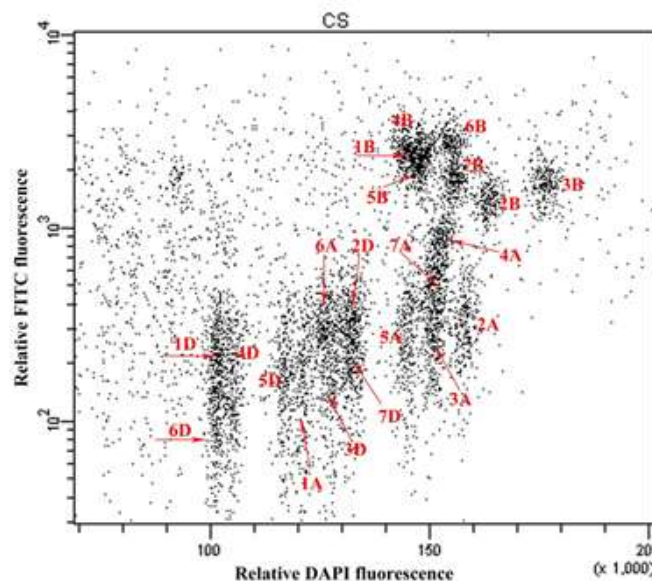
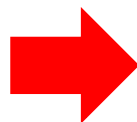
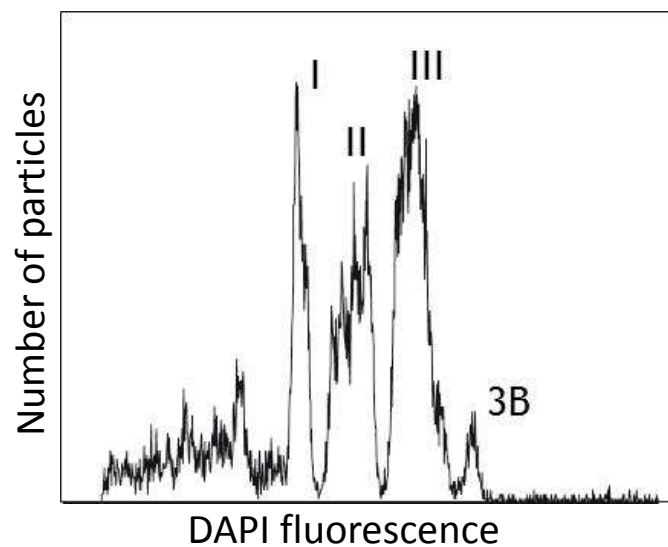
*Triticum aestivum* ( $21'' + 1''$  3HS)



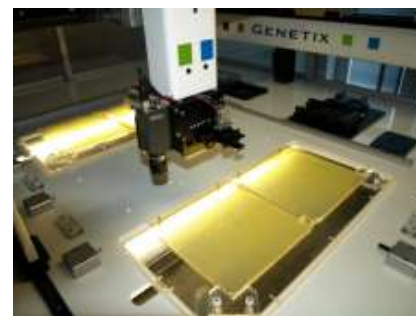
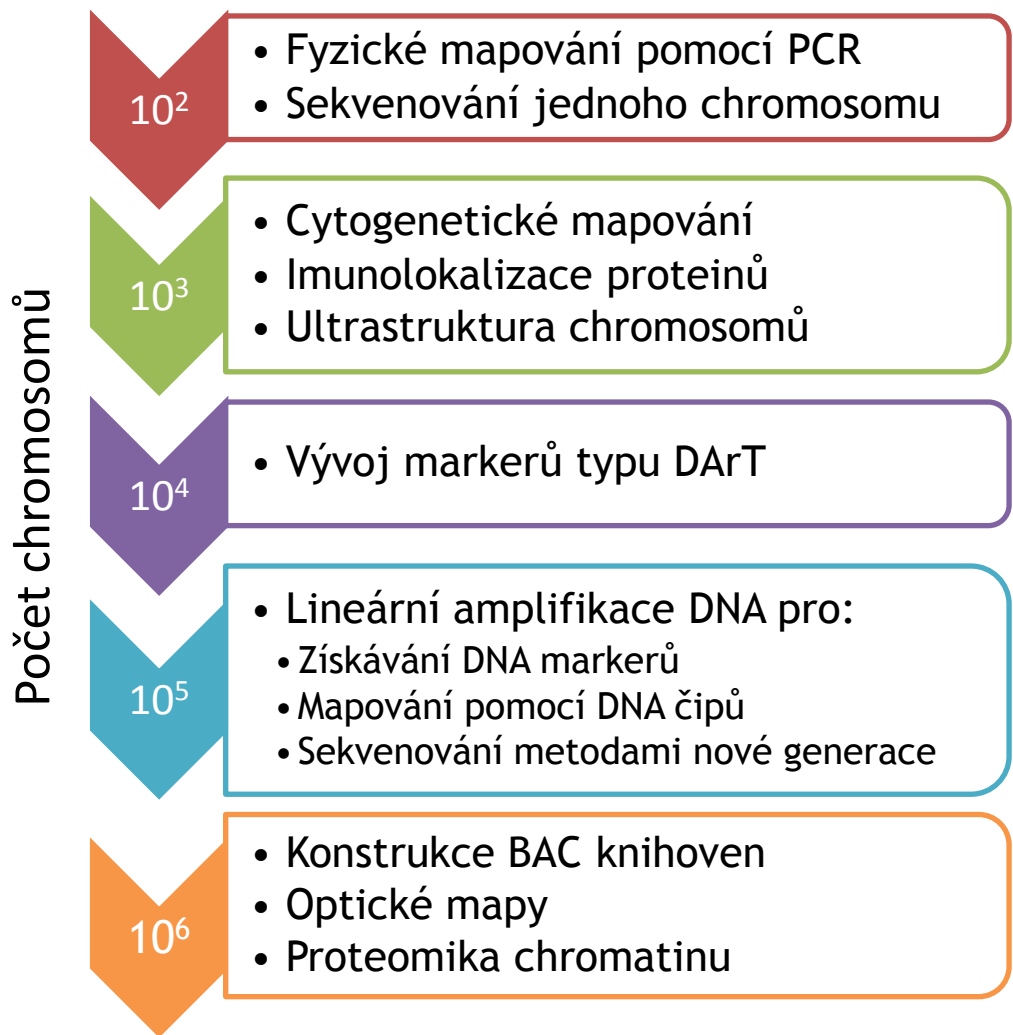
Adiční telosomické linie pšenice - ječmen umožňují třídění ramen chromosomů ječmene

# Jak rozlišit více chromosomů?

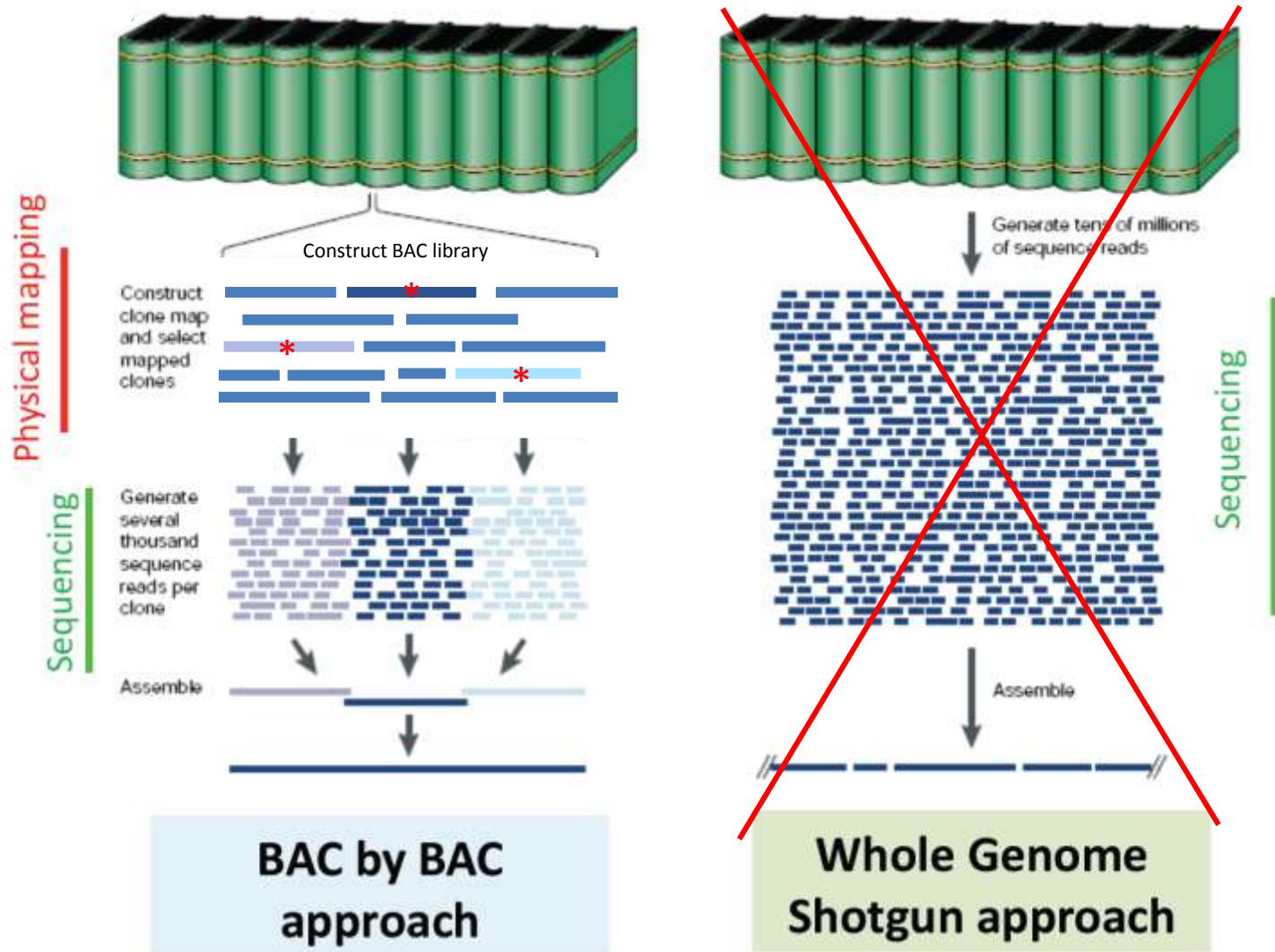
- Fluorescenční hybridizace *in situ* v suspenzi (FISHIS, Giorgi et al., PLoS ONE 8:e57994, 2013)
- U hexaploidní pšenice umožňuje biparametrická analýza DNA vs. FISHIS se sondou pro GAA mikrosatelity identifikovat všechny chromosomy B genomu, čtyři chromosomy A genomu dva chromosomy D genomu



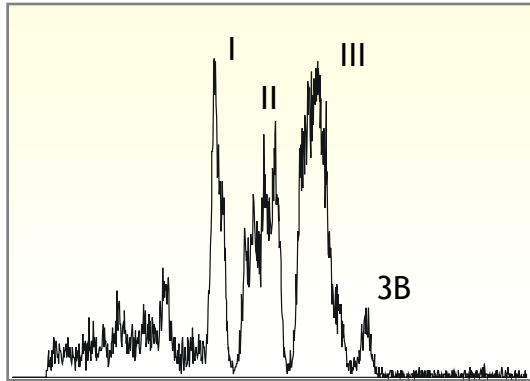
# Portfolio aplikací tříděných chromosomů



# Strategie sekvenování



# Knihovny DNA klonované ve vektoru BAC



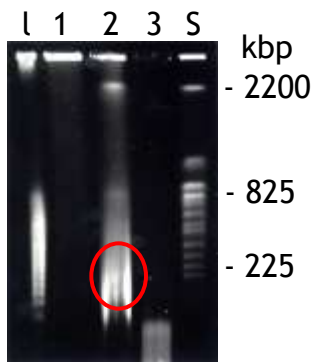
Třídění chromosomů

5 x 10<sup>6</sup> tříděných chromosomů (asi 6 týdnů třídění)



Částečné štěpení

Velikostní selekce (PFGE)



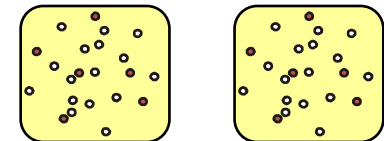
Konstrukce BAC knihoven:

- Kvantita DNA (1 - 5  $\mu$  DNA)
- Kvalita DNA (HMW)
- Účinnost klonování
- Velikost inzertů

Transformace *Escherichia coli*

Ligace do defosforylovaného BAC vektoru

Kolonie bakterií

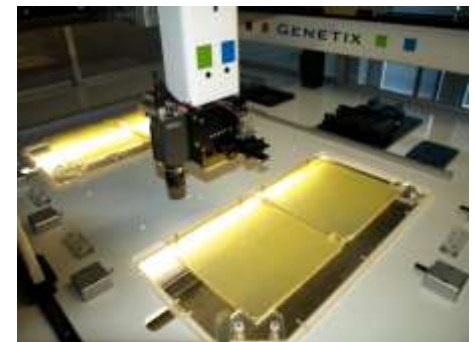


Uspořádání klonů do 384-jamkových misek

Šafař et al., Plant J. 39: 968, 2004

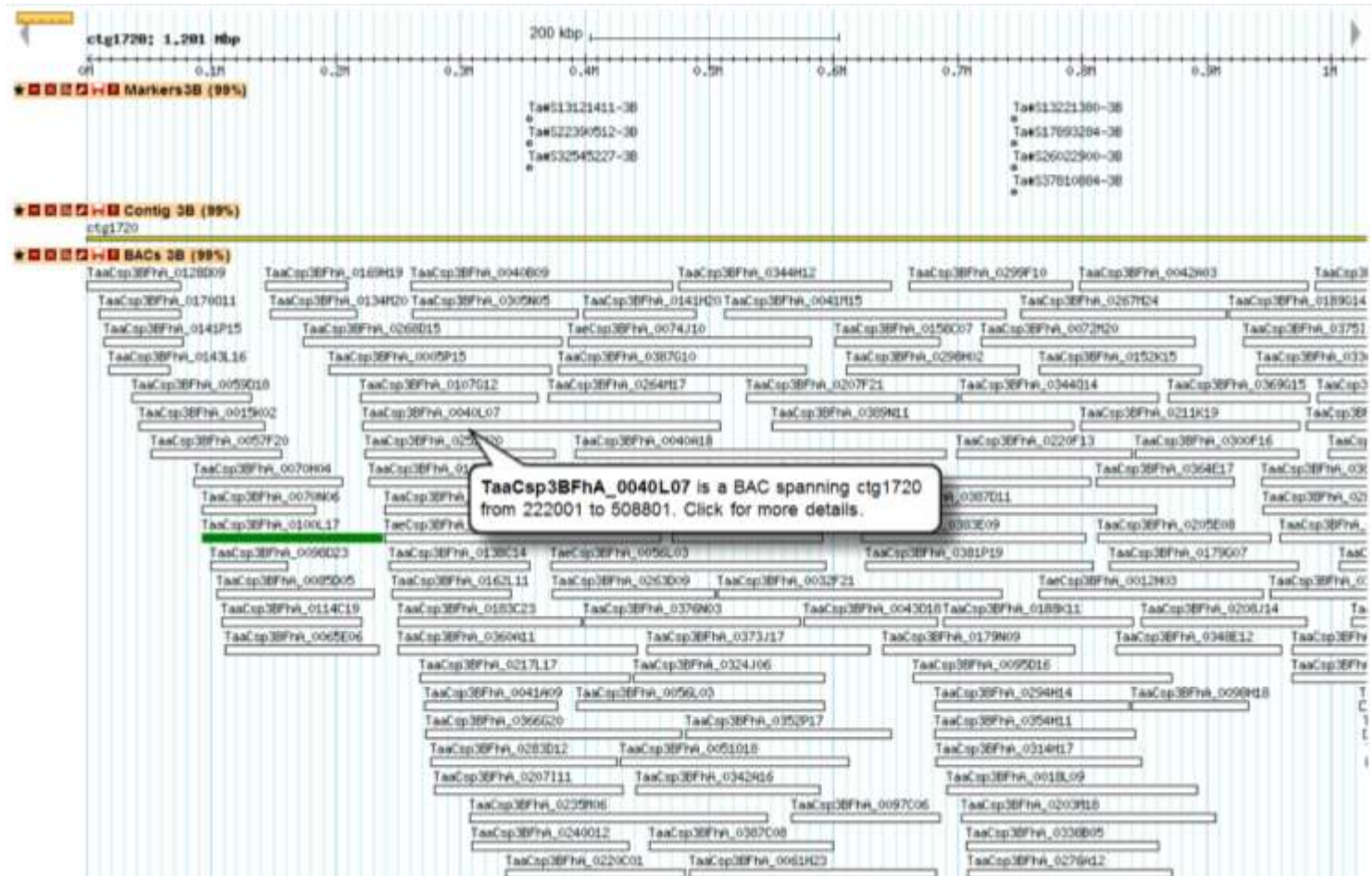
# Subgenomové BAC knihovny jsou užitečné

- Hlavní výhody
  - Specifita (redukce komplexity vzorku)
  - Malý počet klonů  
(u pšenice  $\sim 5 \times 10^4$  vs.  $>1 \times 10^6$ )
- Subgenomové knihovny usnadňují
  - Vývoj markerů ze specifických oblastí genomu (např. „BAC end sequencing“)
  - Poziční klonování genů
  - Sestavování fyzických map vhodných pro sekvenování (BAC fingerprinting, Whole Genome Profiling)



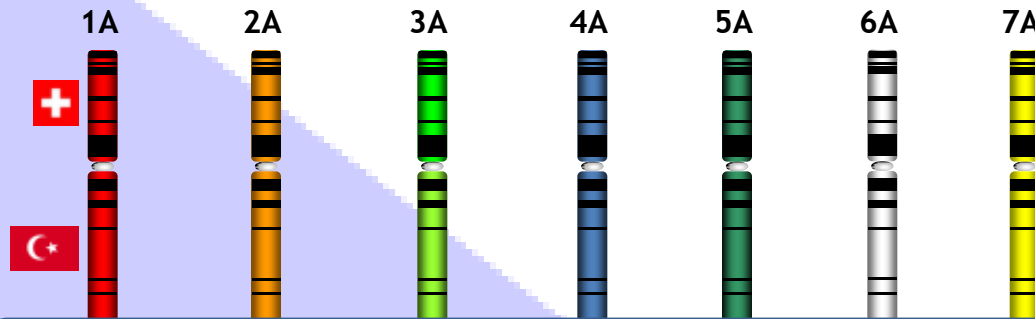
# Fyzická mapa hexaploidní pšenice

- Chromosom 3B (995 Mbp): 1205 BAC contigů, 9314 klonů v MTP



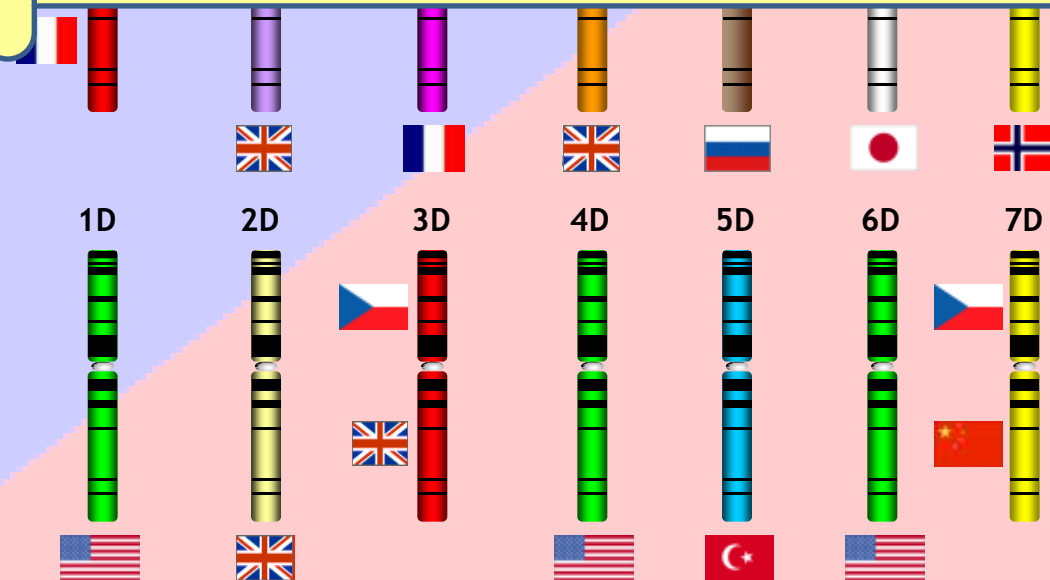


# Mezinárodní projekt



21 chromosomů  
pšenice seté

Chromosomově-centrická strategie je  
základem nejambicióznějšího projektu  
sekvenování rostlinného genomu



International  
Wheat  
Genome  
Sequencing  
Consortium



HOME»

STAFF AND CONTACT»

RESEARCH»

GENOMIC RESOURCES»

TEACHING & SUPERVISING»

SERVICES»

Home » GENOMIC RESOURCES » Cereals

- Bananas
- Cereals**
- Grasses
- Others..
- Pricing Information

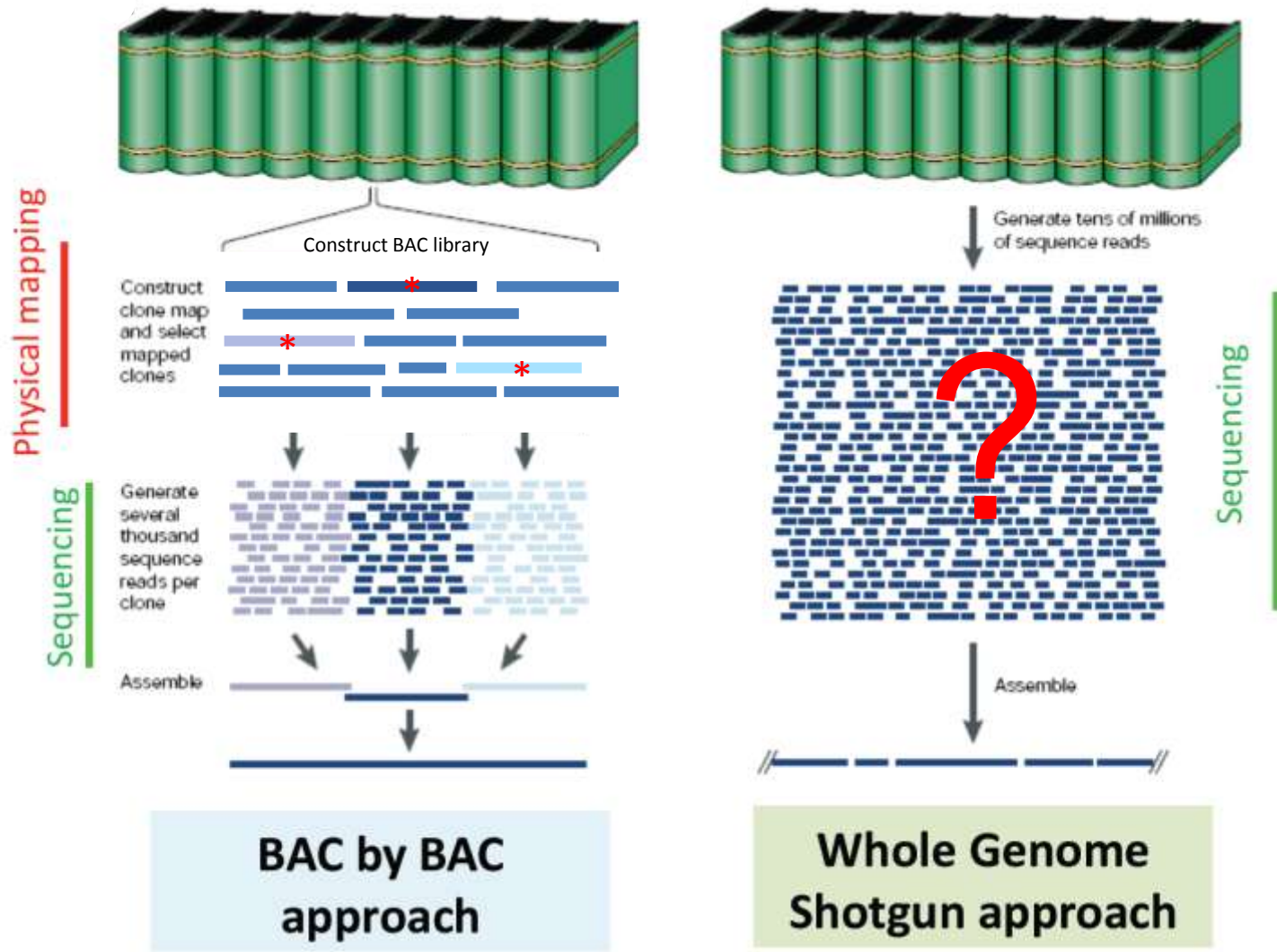
## Cereals

Chromosome-specific and genomic BAC resources of cereals.

Filter

Library code	Species	Cultivar	Specificity	Number of clones	Insert size	Coverage
TaaCsp146eA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	1D, 4D, 6D	26 112	110kb	1.3x
TaaCsp146hA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	1D, 4D, 6D	87 168	85kb	3.4x
TaaCsp146hB	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	1D, 4D, 6D	148 224	102kb	6.9x
TaaCsp146hC	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	1D, 4D, 6D	138 240	116kb	7.4x
TaaCsp1ALhA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	1AL	49 536	103kb	8.0x
TaaCsp1ALhB	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	1AL	43 008	109kb	7.7x
TaaCsp1AShA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	1AS	31 104	111kb	11.8x
TaaCsp1BLhA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	1BL	92 160	114kb	15.4x
TaaCsp1BShA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	1BS	55 296	113kb	15.7x
TaaCsp2ALhA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	2AL	76 800	120kb	15.8x
TaaCsp2AShA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	2AS	56 832	123kb	15.4x
TaaCsp3ALhA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	3AL	55 296	106kb	10.2x
TaaCsp3ALhB	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	3AL	24 576	114kb	5.2x
TaaCsp3AShA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	3AS	55 296	80kb	10.9x
TaaCsp3AShB	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	3AS	55 296	115kb	15.9x
TaaCsp3BFeA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	3B	21 120	107kb	1.9x
TaaCsp3BFhA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	3B	67 968	103kb	6.2x
TaaCsp3BFhB	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	3B	82 176	126kb	9.1x
TaaCsp3DLhA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	3DL	64 512	105kb	12.2x
TaaCsp3DShA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	3DS	36 864	110kb	11.0x
TaaCsp4ALhA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	4AL	92160	126kb	17.3x
TaaCsp4AShA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	4AS	49152	131kb	16.6x
TaaCsp5ALhA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	5AL	90 240	123kb	18.3x
TaaCsp5AShA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	5AS	46 080	120kb	16.5x
TaaCsp5BShA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	5BS	43 776	122kb	15.8x
TaaCsp7DLhA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	7DL	50 304	115kb	14.8x
TaaCsp7DShA	<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	7DS	49 152	114kb	12.2x
TaaHop3BFhA	<i>Triticum aestivum</i>	Hope	3B	92 160	78kb	6.0x
TaaPav1BShA	<i>Triticum aestivum</i>	Pavon	1BS	65 280	82kb	14.5x

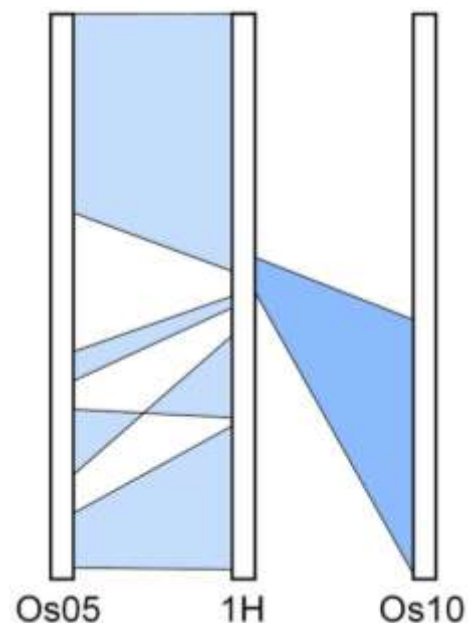
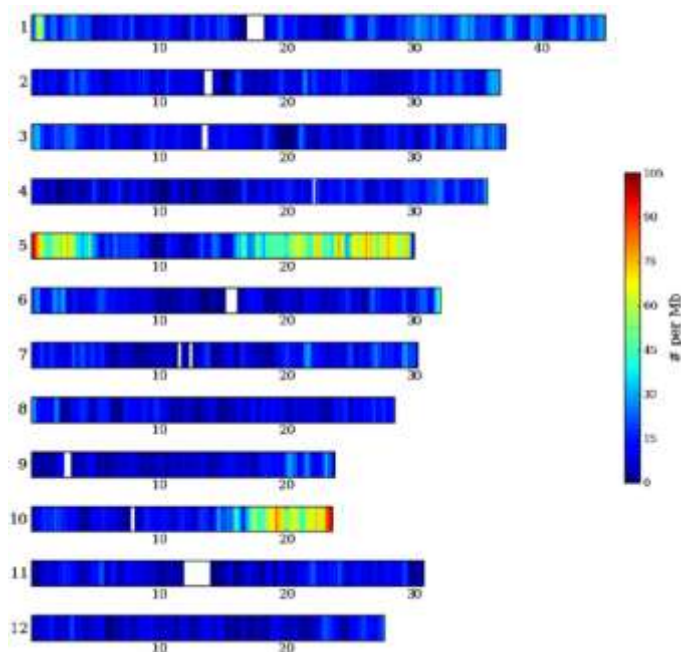
# A co strategie whole genome shotgun?



# Sekvenování DNA tříděných chromosomů

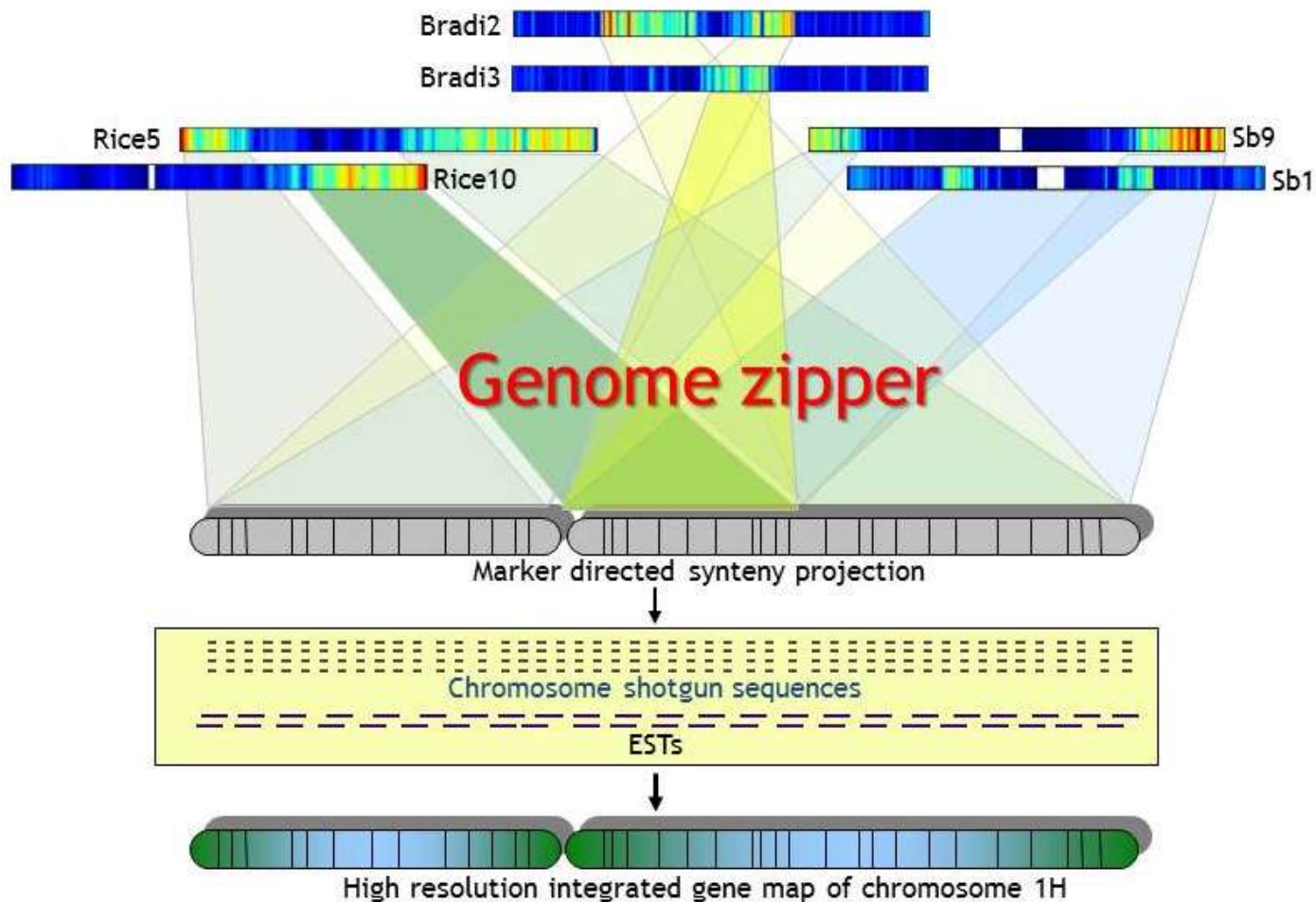
- Sekvenování DNA amplifikované z chromosomu 1H ječmene metodou 454 (800 Mbp sekvence, 1.29x pokrytí chromosomu)
- Identifikace 4125 homologních genů rýže
- Porovnání struktury chromosomu 1H a genomu rýže

Chromosomy rýže (Os1 – Os12)



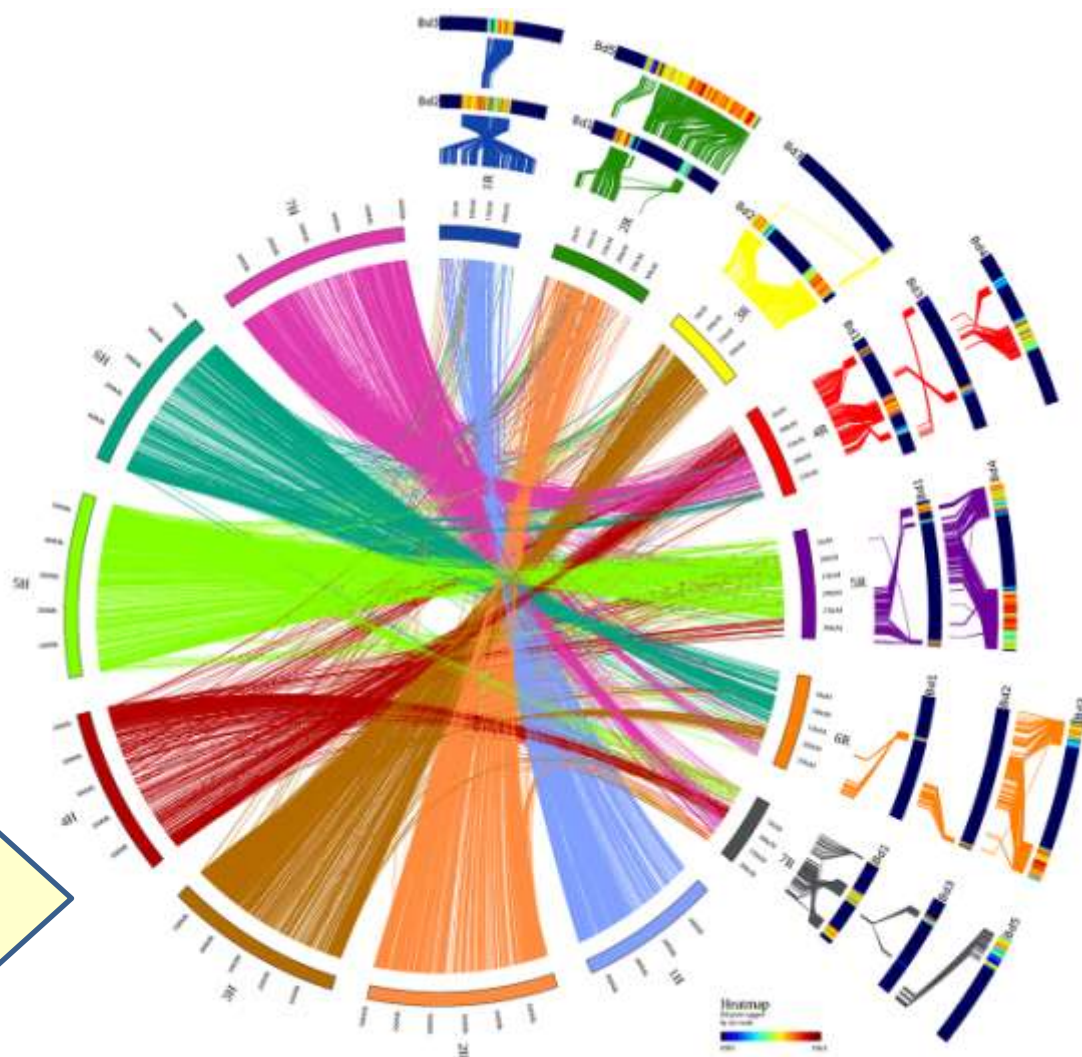
# Virtuální genová mapa (GenomeZipper)

- Chromosom 1H ječmene:



# Sekvenování chromosomů žita

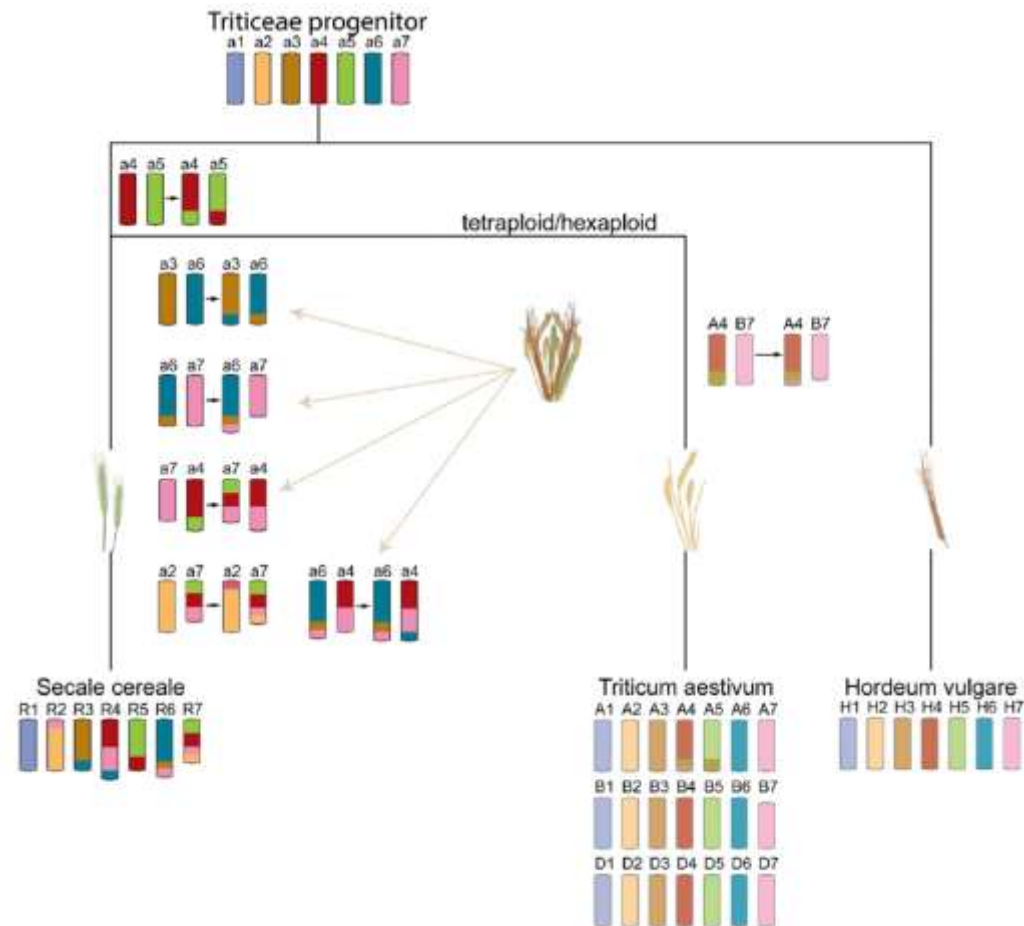
- Sekvenování DNA tříděných chromosomů umožnilo identifikaci 22426 genů
- Komparativní analýzy identifikovaly šest hlavních translokací, které daly vznik současnému genomu žita



Syntenie mezi chromosomy žita, (1R - 7R), ječmene (1H - 7H) a brachypodia (Bd1 - Bd5)

# Složité evoluce genomu žita

- Dissimilar conserved syntenic gene content, gene sequence diversity signatures, and phylogenetic networks were found for individual rye syntenic blocks
- Did hybrid speciation and/or whole-genome or chromosome duplications played a role in rye speciation and genome evolution?



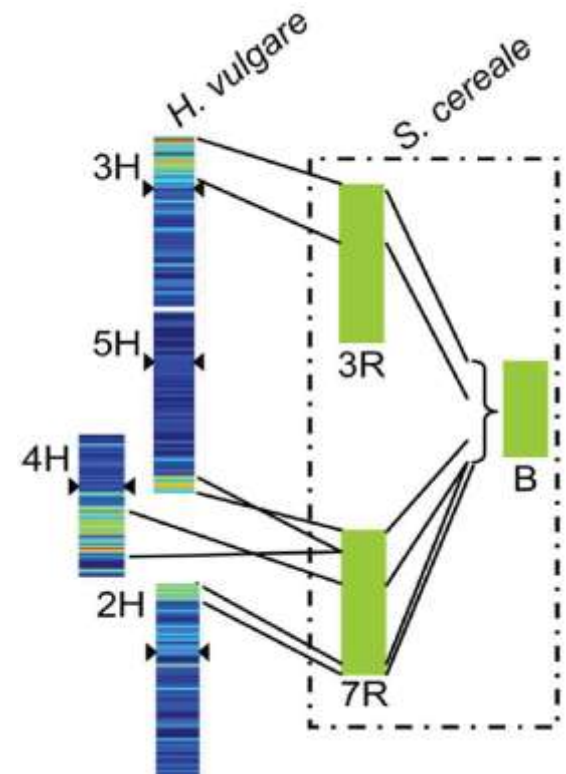
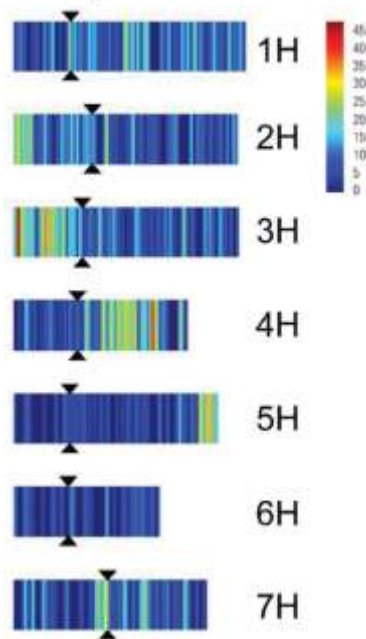
# Záhada původu B chromosomů

- Nadpočetné (přidatné, parazitické) chromozómy
- Sekvenování izolovaných B chromosomů žita metodou Roche 454
- Identifikováno 4946 předpokládaných genových sekvencí
- Původ B chromosomu žita: 1.1 - 1.3 MYA

Mitotické chromozómy žita  
(*Secale cereale*)



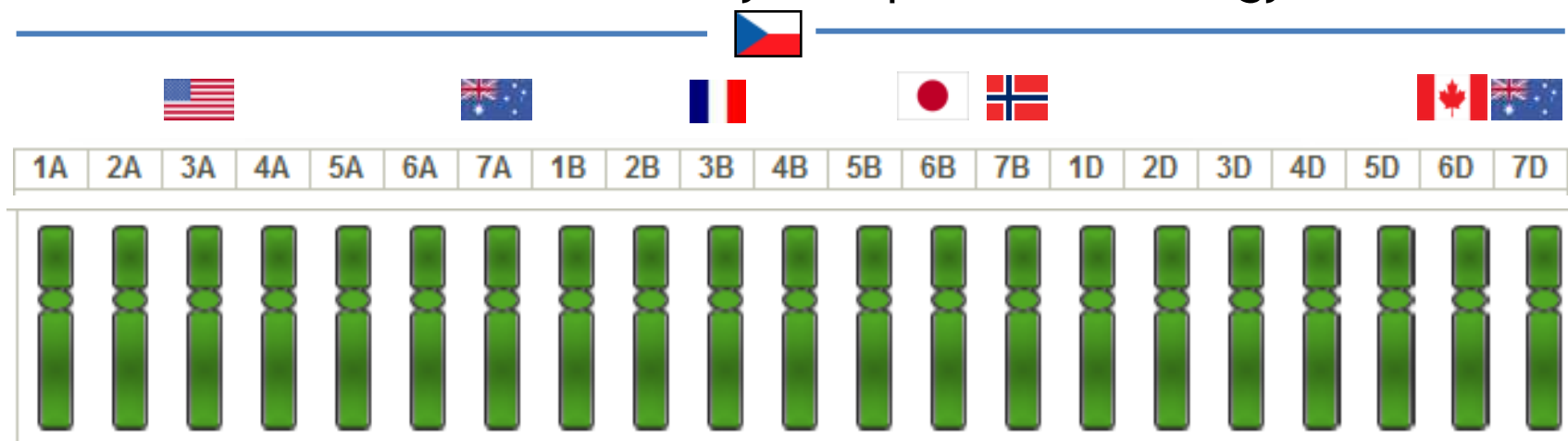
rye B reads versus  
barley chromosomes





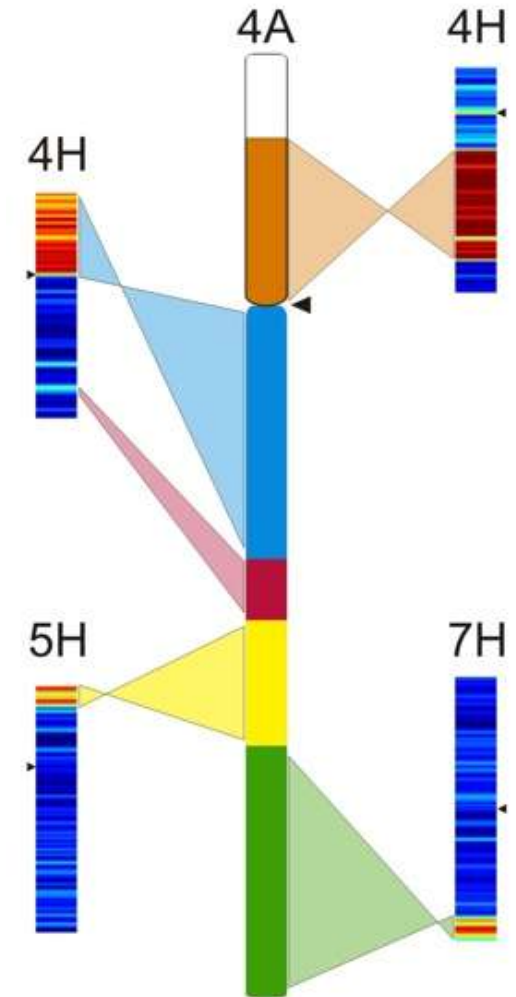
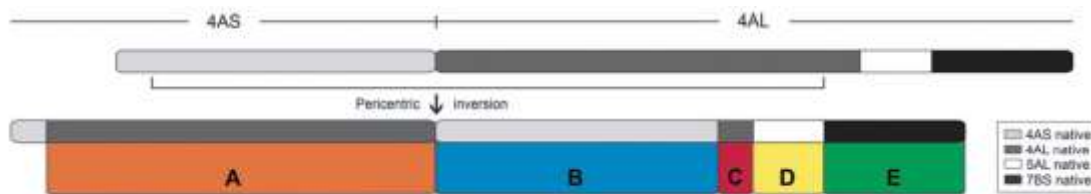
# Sekvenování chromosomů pšenice

- Všechny chromosomy pšenice (jejich ramena) byly tříděny průtokovou cytometrií, jejich DNA byla amplifikována a sekvenována metodou illumina
  - Téměř všechny geny pšenice byly identifikovány a byla určena jejich poloha na chromosomech
  - Přes 50% genů bylo uspořádáno do virtuálních genových map chromosomů
  - Přes 3.5 miliónu markerů bylo mapováno na kontigy sekvencí

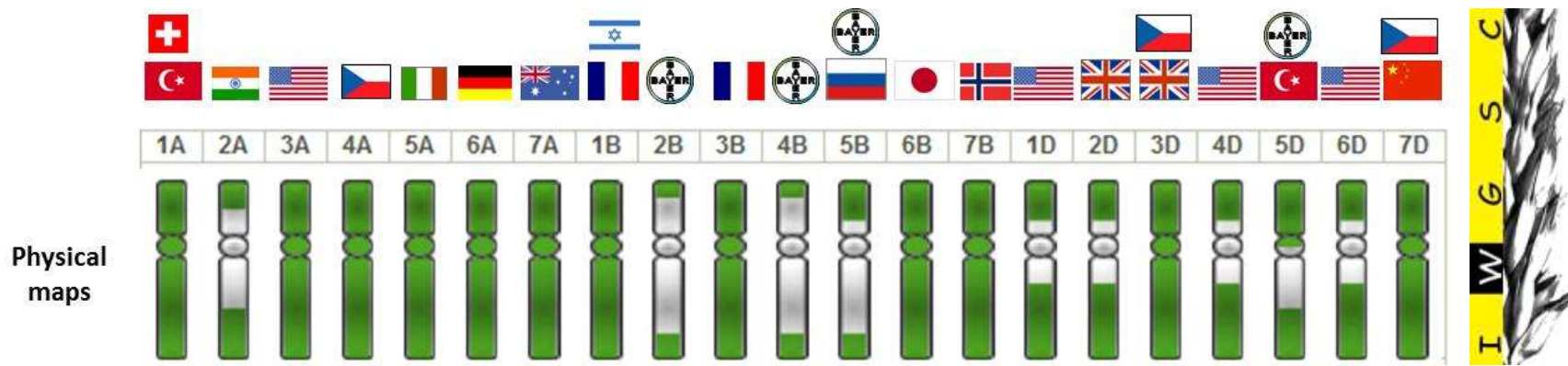


# Analýza struktury chromosomů pšenice

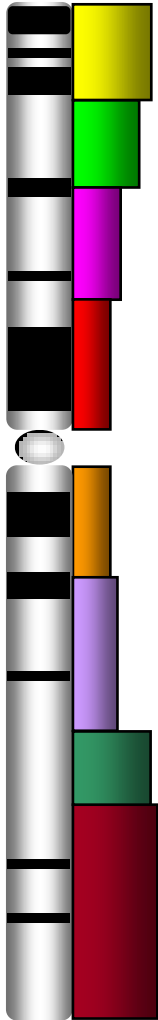
- Sekvenování ramen chromosomu 4A metodou Roche 454 (pokrytí chromosomu: 2x)
- Získána mapa zahrnující asi 85% všech genů chromozómu 4A
- S velkou přesností určena místa zlomů podílejících se na inverzi a translokacích, které odlišují chromosom 4A od chromosomu 4 diploidních planých druhů



# Získání referenční sekvenve genomu pšenice

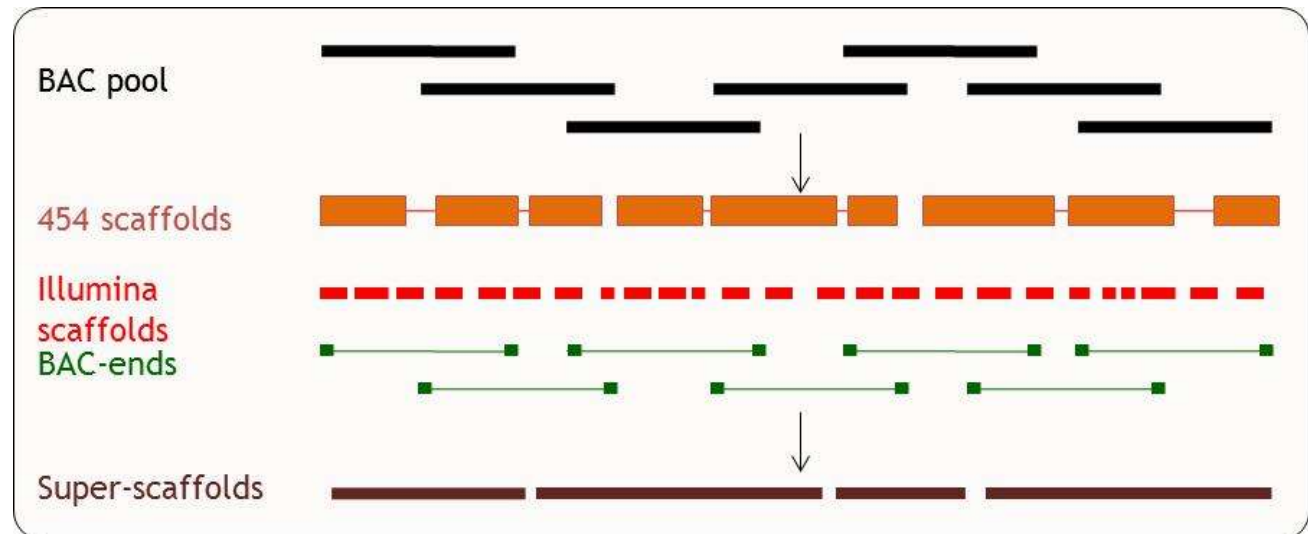


# Referenční sekvence chromosomu 3B pšenice



Chromosom 3B (~900Mb) byl zvolen pro pilotní studii

1. Fyzická mapa vhodná pro sekvenování
2. Sekvenování kombinací více metod (42551 BES, sekvenování 8452 MTP BAC klonů v poolech metodou 454, a sekvenování chromosomové DNA metodou Illumina)



# „Krájení“ genomu pšenice

- Sekvenováním izolovaných chromosomů byla získána pracovní verze genomu pšenice seté
- Byla popsána strukturní a funkční diference chromosomu 3B
- Bylo zjištěno dávné křížení mezi ancestrálními genomy rodičovských druhů pšenice
- Byla analyzována „spolupráce“ mezi rodičovskými genomy pšenice při vývoji obilky

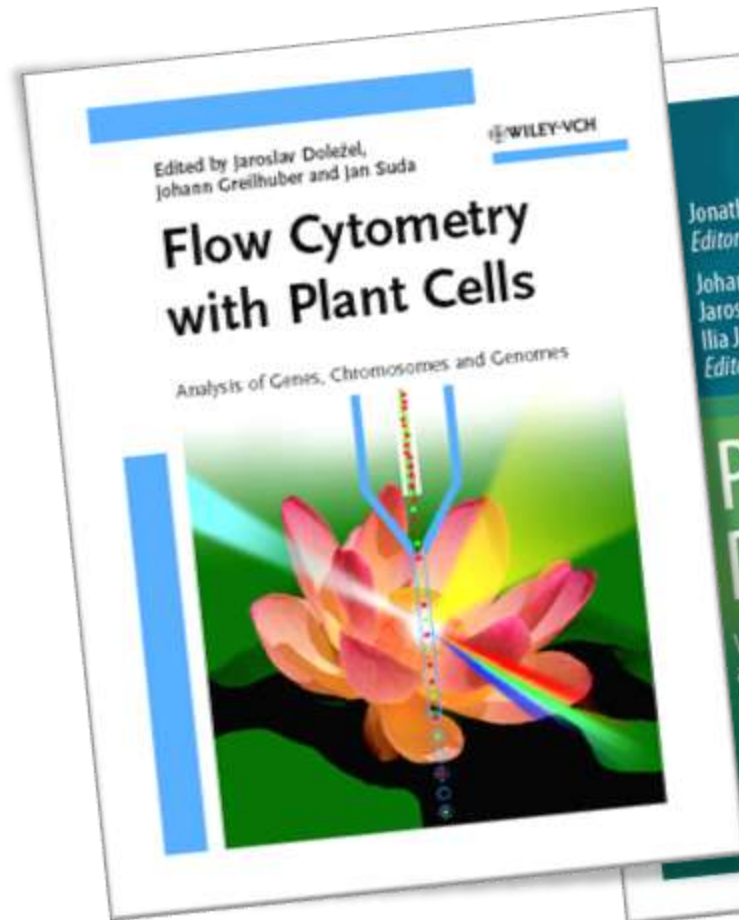


# Závěr

---

- Chromosomová genomika využívá multidisciplinární přístup, který kombinuje metody cytogenetiky, průtokové cytometrie a genomiky
- Chromosomová genomika přispívá k získávání nových poznatků o struktuře a evoluci složitých genomů rostlin, zejména obilovin z tribu Triticeae
- Díky chromosomové genomice se pšenice stává modelem pro studium evoluce velkých a polyploidních genomů rostlin





**Děkuji vám za pozornost**