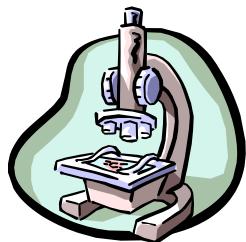


Molekulární ekologie

J. Bryja, M. Macholán, A. Konečný

Co je molekulární ekologie?

Uměle vytvořený obor vymezený technickým přístupem. Na ekologické a evoluční problémy hledá odpověď na základě molekulárně-genetických dat.



Klasické problémy
a metody evoluční
ekologie

+



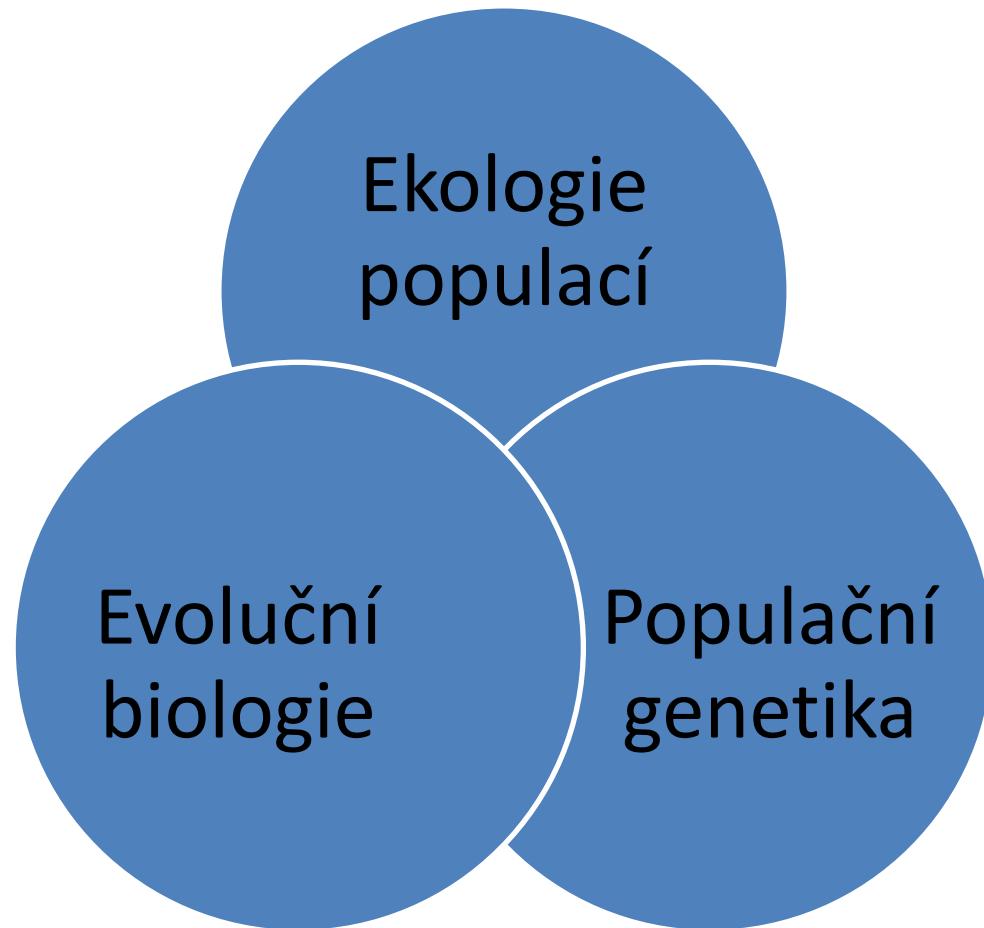
Molekulárně-genetická
data a populačně-
genetické analýzy

(Zoologové a botanici nakoupili cykler a sekvenátory, snažili se je využít i k něčemu jinému než je fylogenetická analýza => vznikla molekulární ekologie)

Pracuje na různých úrovních variability DNA (genom, jedinec, populace, skupina populací, max. skupina blízce příbuzných druhů)

*Je to vlastně aplikovaná populační genetika – **analyzuje a interpretuje** získaná molekulárně-genetická data*

Mezioborová disciplína

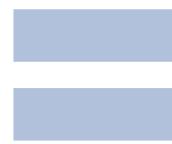


Molekulární ekologie

Mechanismy
mikroevoluce
(teorie)



Genetické
metody v
zoologii
(praxe – data)



**Molekulární
ekologie**
(praktické
postupy a
interpretace
výsledků)

Příbuzné přednášky, tj. co se zde objeví jen okrajově?

- M. Macholán - Evoluční biologie + Mechanismy mikroevoluce
- J. Bryja, M. Macholán - Genetické metody v zoologii
- J. Zukal – Behaviorální ekologie
- S. Pekár – Ekologie populací
- aj. (molekulární ekologie „prorůstá všude“)

Její význam vzrůstá ...

- Je populární – časopis Molecular Ecology (od 1992) – dnes 24 čísel za rok
- Vyšly i její učebnice
- Na řešení velmi odlišných problémů používá obdobné metody



Molecular Ecology

© John Wiley & Sons Ltd



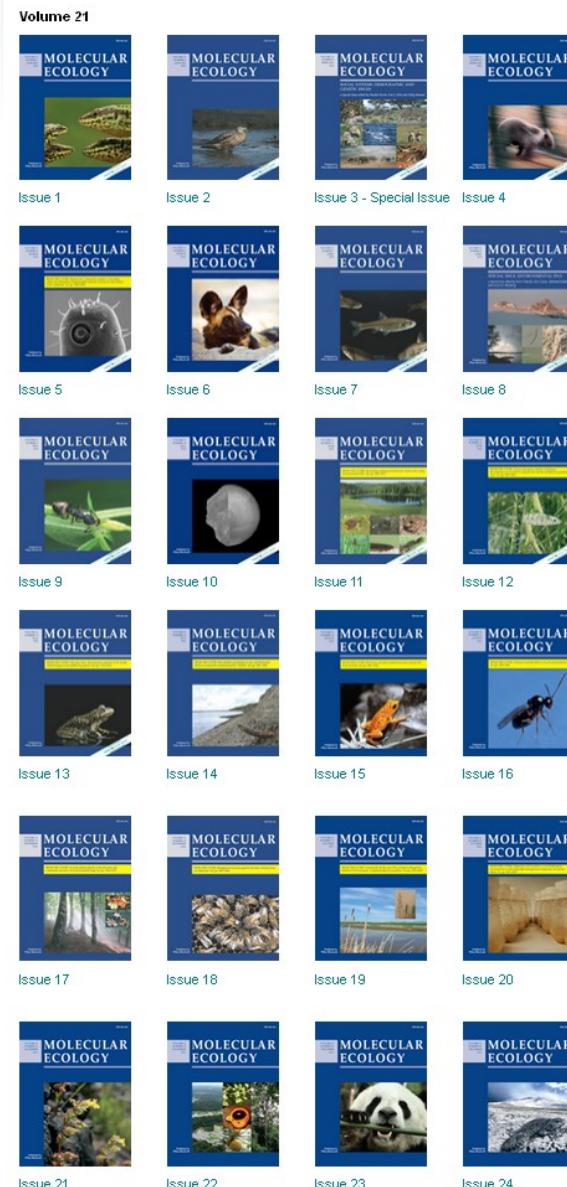
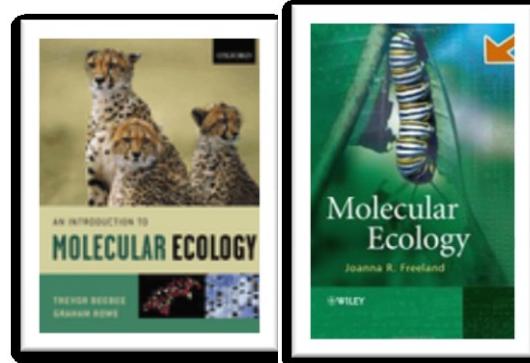
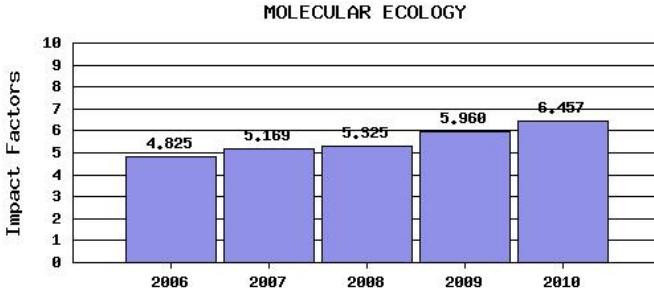
Edited By: Loren Rieseberg

Impact Factor: 6.494

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2014: 5/46 (Evolutionary Biology); 11/145 (Ecology); 31/290 (Biochemistry & Molecular Biology)

Online ISSN: 1365-294X

Associated Title(s): Molecular Ecology Resources



MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES

Molecular Ecology Resources

© John Wiley & Sons Ltd



Edited By: Shawn Narum

Impact Factor: 5.626

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2013: 7/46 (Evolutionary Biology);
13/141 (Ecology); 46/291 (Biochemistry & Molecular Biology)

Online ISSN: 1755-0998

Associated Title(s): [Molecular Ecology](#)



SEARCH

In this journal

[Advanced](#) > [Saved Searches](#) >

Molecular and Statistical Advances

These papers primarily present **new techniques for collecting and analysing data for molecular ecology** studies. These submissions can also describe meaningful comparisons of statistical, computational or molecular methods, or alternatively demonstrate the existence of important problems with current procedures.

Computer Programs

These articles typically present **new computer software or substantial updates of existing programs**. Authors should clearly describe the need for the program and the rationale behind its design, as well as a summary of functions, usage and output. When relevant, authors should present an evaluation of a program's performance compared to existing software based on real or simulated data. Programmers are urged to remember that 'user-friendly' programs are more likely to be used by the community, and that it is helpful if programs require standard input/output file formats (e.g., Genepop or Arlequin). Submissions should include a user manual or README file with adequate guidance for new users. Software and supporting documentation should be accessible from a long-term server (e.g., github), but can additionally be made available at academic websites.

Permanent Genetic Resources

These articles describe the development of **significant genetic resources for application to evolutionary or ecological questions**. For example, these papers could describe NGS projects in which **sequenced transcriptomes, genome fractions or whole genomes** have been analyzed such that a readily usable resource is presented to the molecular ecology community. These articles may also present data on novel applications of the **standard DNA barcoding loci to a hundred or more species**, where the paper presents a readily usable resource.

+ **Invited technical reviews, Opinions, etc.**

Proč používat molekulární metody v ekologii?

- Často nelze
- paternita
- identifikace
- izolace po
- počet migra
- adaptace

Research areas of interest to *Molecular Ecology* include:

- population structure and phylogeography
- reproductive strategies
- relatedness and kin selection
- sex allocation
- population genetic theory
- analytical methods development
- conservation genetics
- speciation genetics
- microbial biodiversity
- evolutionary dynamics of QTLs
- ecological interactions
- molecular adaptation and environmental genomics
- impact of genetically modified organisms

oplození
/tě žijících druhů
jedince
ř. imunitní geny)

Obsah přednášek

- 1. Úvod. Co je a co není molekulární ekologie? Vymezení oboru, překryv s jinými obory, stručná historie. Genetická variabilita v přírodních populacích, hlavní používané terénní a laboratorní metody. Sběr a uchování vzorků, metody zjišťování genetického polymorfismu u volně žijících živočichů, genetické markery. (JB) - 25.2.2016
- 2. Genetická identifikace. DNA barcoding a jeho problémy - species delimitation, kryptické druhy a hybridizace, identifikace jedince a pohlaví molekulárními metodami, genetický fingerprinting, genetické chiméry, CHD geny u ptáků, chromosom Y u savců. (JB) - 3.3.2016
- 3. Rekonstrukce fylogeneze - Základní fylogenetické principy a programy pro analýzu DNA sekvencí. Likelihood, Bayesiánské metody, koalescenční přístup. (MM) - 10.3.2016
- 4. Rekonstrukce fylogeneze - ekologické analýzy s využitím fylogenetické informace. Fylogenetické kontrasty a komparativní metody. (MM) - 17.3.2016

Obsah přednášek

- 5. Aplikace molekulárních metod v behaviorální ekologii. DNA barcoding při analýzách potravy. Analýzy příbuzenských vztahů a párovacích systémů, jednoduché vyloučení, categorical x fractional likelihood, přehled dostupných programů. Určení otce, matky nebo obou dvou. Minimální počet rodičů vrhu nebo snůšky. Vzdálenější příbuznost. Genetická identifikace disperze a migrace, sex-biased dispersal, assignment test. (JB) - 24.3.2016
- 6. Populační genetika: studium genetické diverzity. Důsledky Hardy-Weinbergova pravidla, změny alelických frekvencí (mutace, migrace, selekce, efektivní velikost populace, genetický drift). (AK) - 31.3.2016
- 7. Populační genetika: analýza populační struktury. Wahlundův princip, F-statistiky, AMOVA, Bayesiánské shlukování v programu STRUCTURE. (AK) - 7.4.2016
- 8. Prostorová genetika. Isolation by distance, Bayesiánské prostorové klastrování - příklady s využitím dostupných programů (Geneland, BAPs). Invazní genetika. (AK) - 14.4.2016

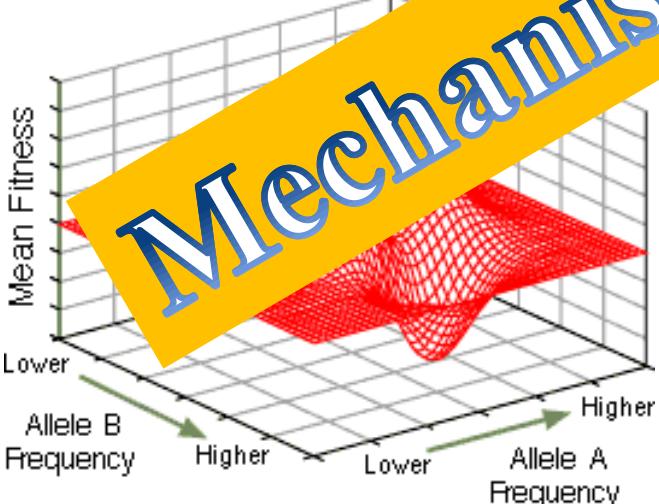
Obsah přednášek

- 9. Rekonstrukce populační historie - změny efektivní velikosti populace (bottleneck, expanze), detekce "admixture", atd. ABC přístup. (AK) - 21.4.2016
- 10. Fylogeografie: genetická historie rozšíření druhu. Výhody mitochondriální DNA a její alternativy (Y chromosom), refugia a kolonizační cesty, genetický drift vs. tok genů, fylogeografie a koevoluce. (MM) - 28.4.2016
- 11. Hybridizace v přírodě, hybridní zóny. Konstrukce klíny, selekce proti hybridům, rozdíly v introgresi různých částí genomu. (MM) - 5.5.2016
- 12. Ochranařská genetika. Neinvazivní genetické metody, probability of identity, bottleneck, důsledky fragmentace populací, evolučně-signifikantní jednotky, inbreeding, "genetic rescue", lokální adaptace, inbrední a outbrední deprese. (JB) - 12.5.2016
- 13. Geny a jejich biologická funkce - příklady funkčních genů a jejich význam v ekologii. Adaptivní variabilita, imunogenetika, geny a komunikace, detekce selekce na molekulární a populační úrovni, využití -omics metod v ekologii, "gene ontology". (JB) - 19.5.2016

Vychází z populační genetiky

- Slavní zakladatelé moderní syntézy, třicátá léta
- Matematické modely spojující genetiku a evoluční teorii

Sewall Wright
adaptivní krajina

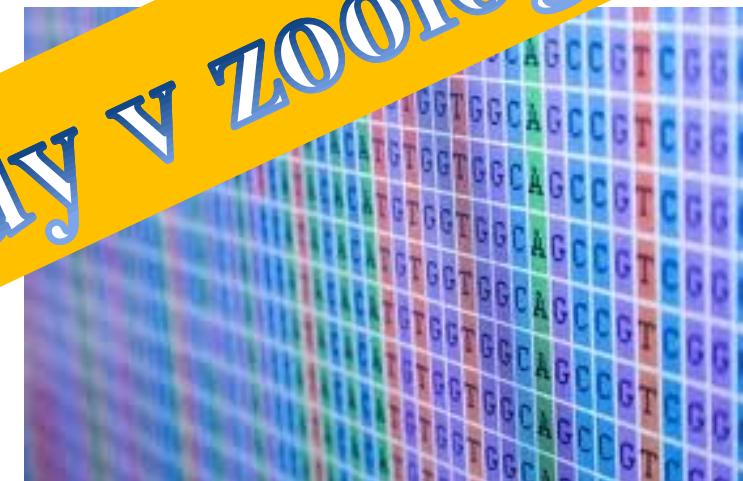
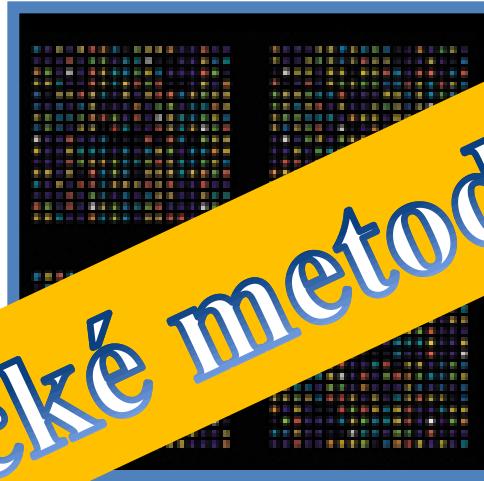
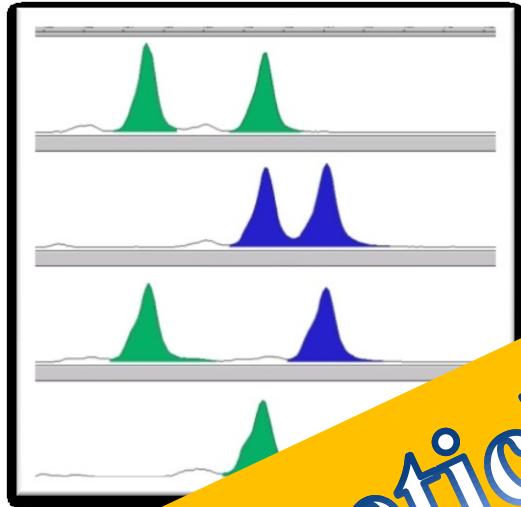


John B. S. Haldane

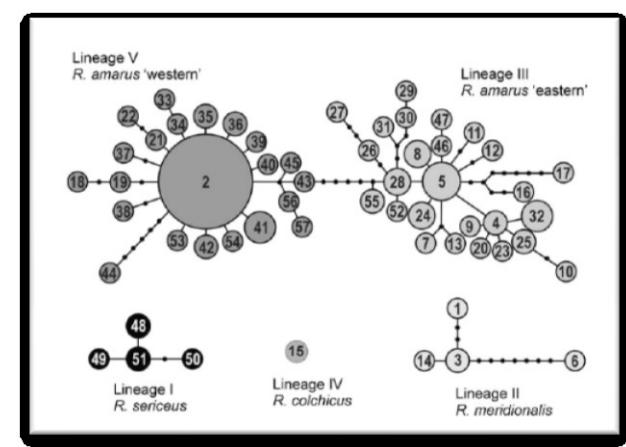
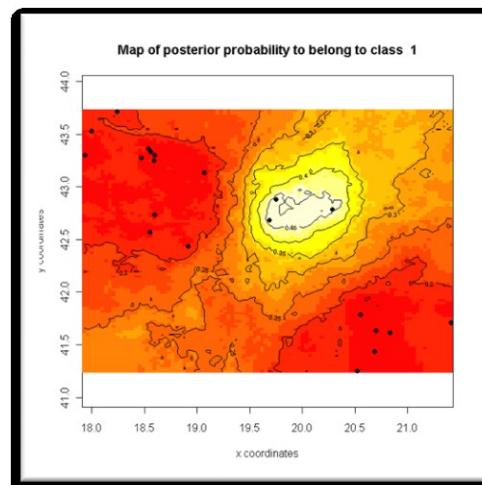
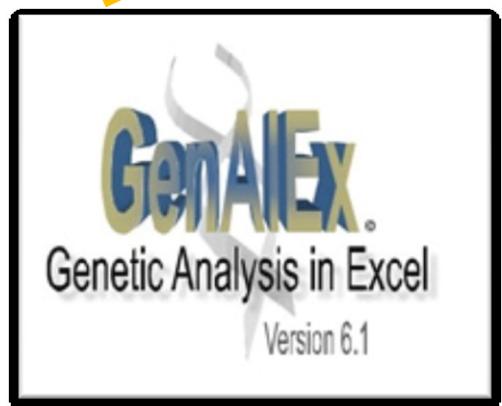


Mechanismy mikroevoluce

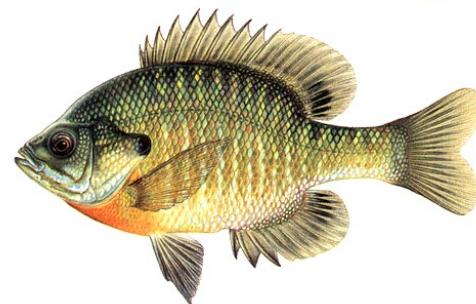
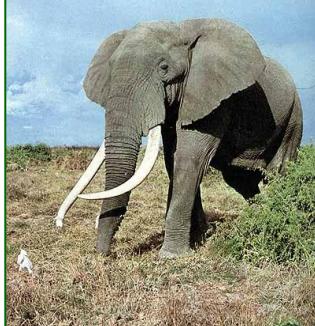
Technické výlety (omezené)



Analýza dat



- ✓ Diploidní s pohlavním rozmnožováním
- ✓ Většinou obratlovci
- ✓ Budou ale i některí bezobratlí
- ✓ Rostliny fungují často jinak!
Ale občas i o nich bude řeč.



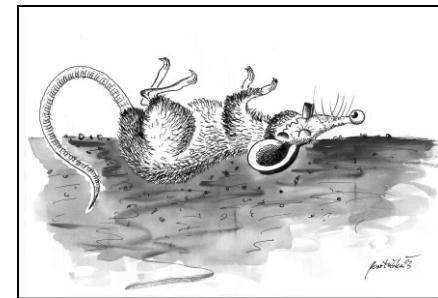
Získání genetických dat – viz Genetické metody v zoologii

Genotypizace – analýza genotypu

- stanovení formy určitého úseku DNA (alely, haplotypu) - výběr daného znaku (= markeru) souvisí s úrovní genetické variability
- 1) izolace celkové DNA z tkání
 - 2) amplifikace požadovaného úseku DNA (u PCR-based metod)
 - 3) studium variability daného úseku (lokus)

Způsoby získání DNA z volně žijících živočichů

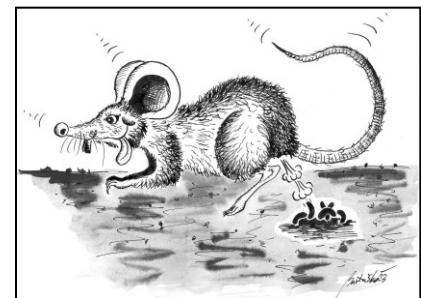
1. **destrukční** – živočich je usmrcen kvůli získání tkání potřebných na genetické analýzy



2. **nedestrukční (invazivní)** – živočich je odchycen a je mu odebrán vzorek tkáně nebo krve



3. **neinvazivní** – zdroj DNA je „zanechán za živočichem“ a je získán bez potřeby odchytu, manipulace či dokonce pozorování



Izolace DNA

- rozmanitý biologický materiál – musí obsahovat buněčná **jádra nebo mitochondrie** s nedegradovanou DNA
- dnes většinou komerční kity
- velký vliv **fixace** vzorků

Genetické markery

- Kódující DNA (geny)
- Přepisované sekvence
- Genetický kód
- Ovlivňují fenotyp
- Podléhají přírodnímu výběru
- Narůstající význam v molekulární ekologii (transkriptomika)
- Nekódující DNA
 - Nefunkční (neznámá funkce)
 - Neutrální k přírodnímu výběru – větší variabilita
 - Většina DNA u eukaryot
 - Pseudogeny
 - Repetitivní DNA

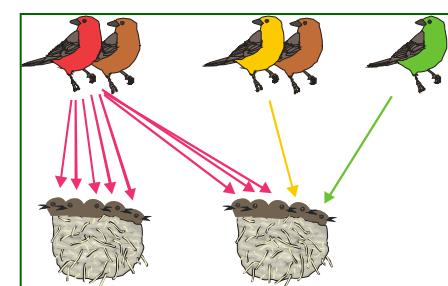
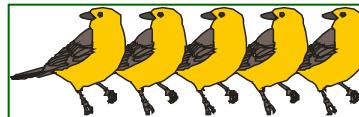
Typy genetických markerů

- *sekvence jaderné nebo organelové (mt, cp) DNA* – **Sangerovo sekvenování** nebo „**next-generation sequencing**“
- *jaderné znaky*
 - **dominantní** (AFLP) – multi-locus markery
 - **kodominantní** (mikrosateli, SNPs) – single locus markery

Různé otázky – různé přístupy

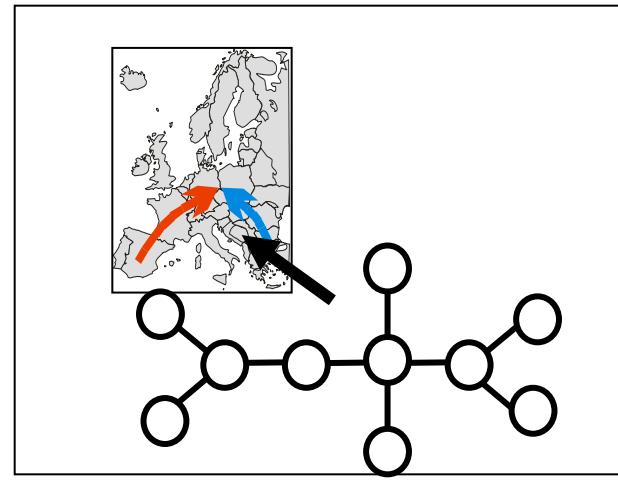
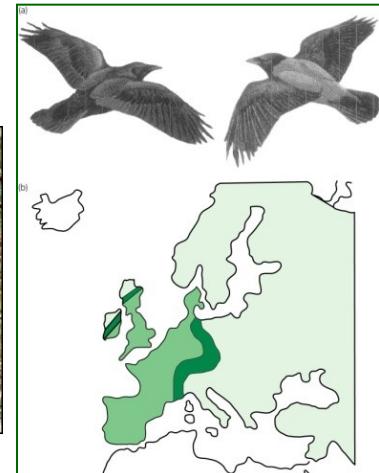
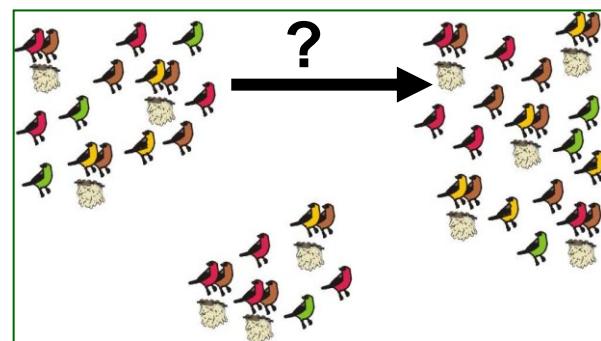
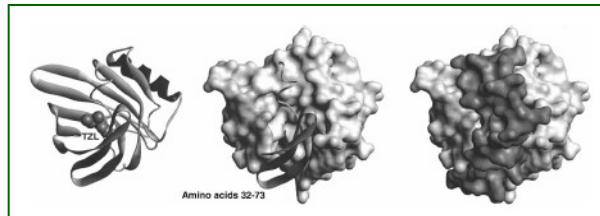
- **Příbuznost (neutrální znaky)**

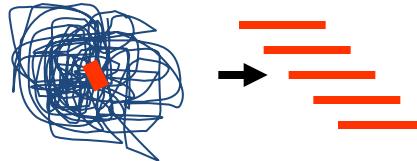
- identita (stopy stejného jedince, klony)
- paternita, vzdálenější příbuzní
- vztah populací (izolovanost, výměna migrantů)
- fylogeografie (historie šíření)
- hybridizace, hybridní zóny



- **Geny pod selekcí**

- MHC, MUP, ABP, reprodukční proteiny
- geny pro zbarvení
- detekce selekce





PCR

- Z celkové DNA si namnožíme jen úsek, který nás zajímá.
- Co se bude množit? To určí **primery**.
- **Primery** – krátké oligonukleotidy komplementární k úsekům ohraničujícím místo našeho zájmu.



PCR

Cycler MJ Research



Cycler Eppendorf



RoboCycler Stratagene



Cykly (obvykle 20-40):
denaturace (95°C)
nasednutí primerů (50-65°C)
elongace=polymerizace (72°C)

Nejprve však často prodlužená denaturace celkové DNA

Nakonec prodloužená elongace

Příklad
programu

95 C 3 min

95 C 30 s

60 C 30 s

72 C 1 min

35x zpět



72 C 10 min

„Molekulárne-genetické“ metody

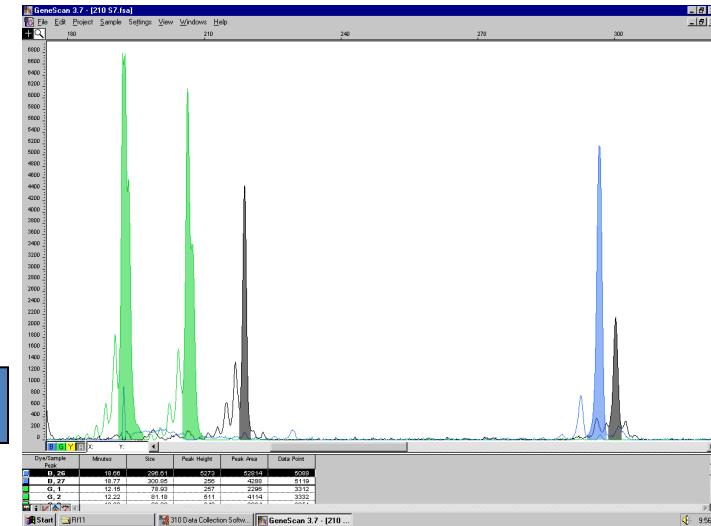
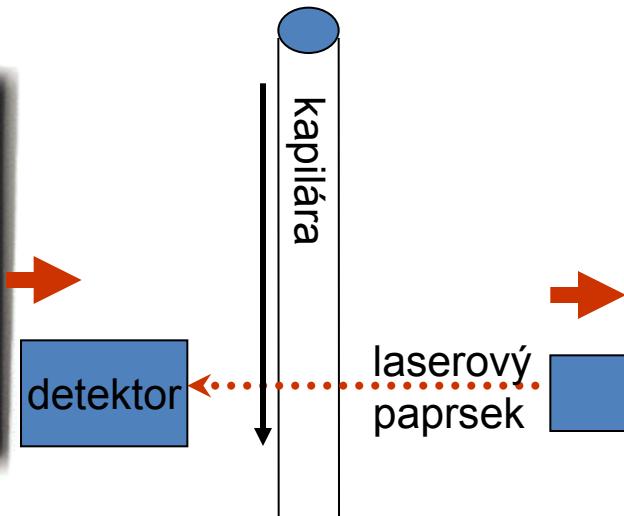
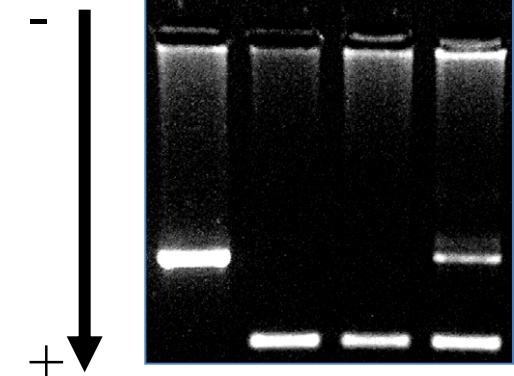
- analýza polymorfismu DNA
- délkový polymorfismus (princip mikrosatelitů)

CG**CAC**A TCTCTAGCTTCGATTCA~~GGAA~~

CG**CA**TCTCTAGCTTGATTCA~~GGAA~~

Rozdělení fragmentů DNA podle velikosti

- Agarosa - Hrubé rozdělení (do rozdílu 15 bp)
- Polyakrylamid – Přesnější rozdělení (4 bp)
- Sekvenátor, fragmentační analýza – nejpřesnější (fluorescenčně značené PCR fragmenty, např. značené primery)



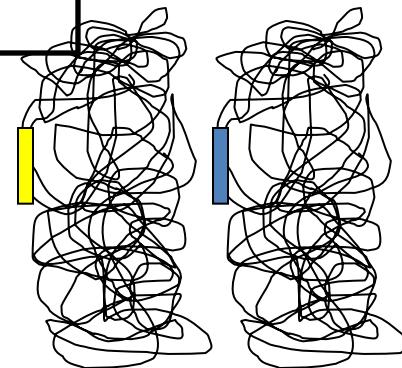
„Molekulárne-genetické“ metody

- analýza polymorfismu DNA
- sekvenční polymorfismus (princip SNPs):

CGCATCTCTAGCTT**C**GATTCAAGGAA

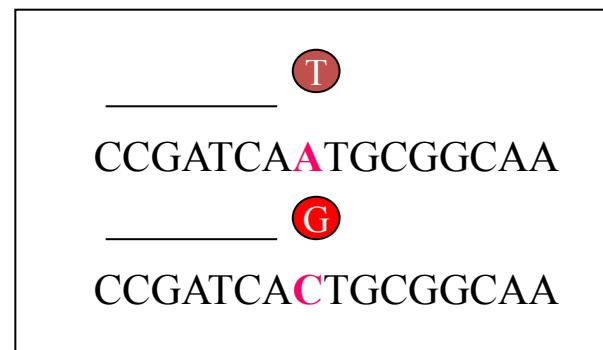
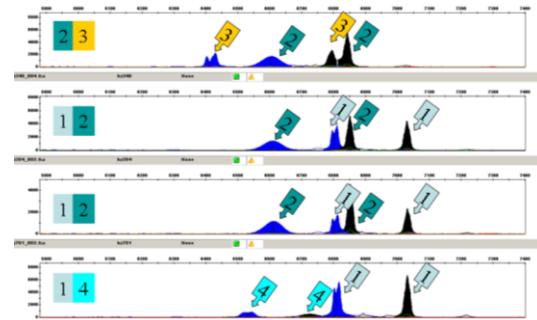
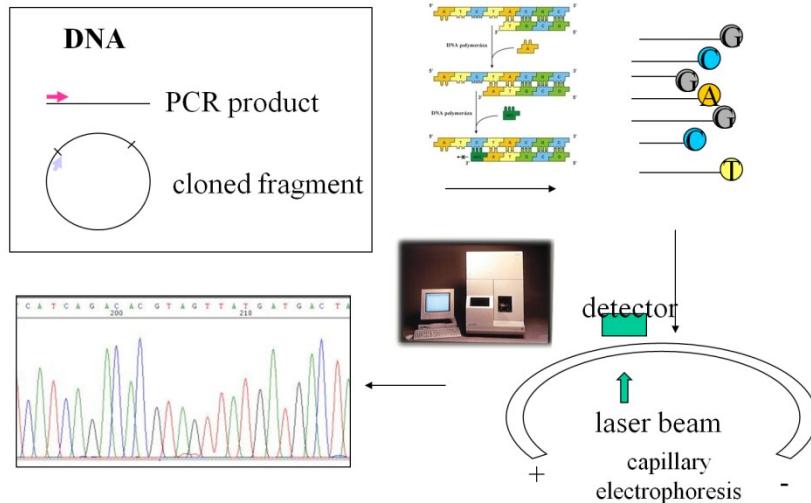
CGCATCTCTAGCTT**T**GATTCAAGGAA

genotyp diploidního jedince: C/T



Studium variability DNA fragmentů, které se neliší délkou

- sekvencování (velmi dobré pro mtDNA, u nDNA problém s odlišením alel u heterozygotů)
- SNP („single nucleotide polymorphism“) analýza – např. RFLP, SSCP, microarrays – chips, atd.



Typy populačně-genetických dat

mikrosatety

Jedinec	Marker 1	Marker 2
Ind_1	170/172	133/136
Ind_2	168/172	133/139
Ind_3	168/168	136/139

SINE

Jedinec	Marker 1	Marker 2
Ind_1	+/-	-/-
Ind_2	+/+	+/+
Ind_3	-/-	+/-

SNPs

Jedinec	Marker 1	Marker 2
Ind_1	A/T	C/T
Ind_2	A/T	T/T
Ind_3	T/T	C/T

AFLP

Jedinec	Marker 1	Marker 2
Ind_1	+	-
Ind_2	+	+
Ind_3	-	-

Typy získaných dat – kodominantní znaky

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	A
1	11	233	10	30	22	25	22	18	23	12	27	25	29															
2	Allele frequency																											
3	ID	Pop	Ppip01	Ppip02	Ppip04	Ppip06	EF1		EF4		EF6			Pau05	NN18		NnP217	NnP219		X		Y						
4	TYN1	TYN	174	176	128	128	213	215	120	132	166	175	236	247	174	188	249	251	287	291	205	209	140	170		48.76500	17.00750	
5	TYN2	TYN	167	167	132	132	207	207	130	136	169	175	230	245	182	188	247	249	287	287	205	218	166	166		48.76500	17.00750	
6	TYN3	TYN	176	178	128	128	207	207	130	130	169	169	0	0	184	190	249	249	283	293	209	213	166	170		48.76500	17.00750	
7	TYN4	TYN	180	180	130	132	207	207	118	124	171	173	220	243	184	190	247	249	283	285	209	214	140	166		48.76500	17.00750	
8	TYN5	TYN	174	174	128	128	207	207	128	138	179	181	241	241	182	188	247	253	0	0	205	209	158	162		48.76500	17.00750	
9	TYN6	TYN	180	182	128	130	209	209	136	136	173	175	241	243	184	186	253	253	295	325	209	213	162	170		48.76500	17.00750	
10	TYN7	TYN	174	180	128	130	215	215	130	130	173	173	241	241	190	190	249	249	285	325	209	213	158	162		48.76500	17.00750	
11	TYN8	TYN	174	175	128	134	207	221	128	138	171	177	220	240	178	186	249	249	287	293	213	213	162	166		48.76500	17.00750	
12	TYN9	TYN	156	178	126	130	209	209	128	149	177	177	220	230	184	188	249	255	287	287	217	218	158	166		48.76500	17.00750	
13	TYN10	TYN	167	178	128	130	209	209	132	134	171	175	243	245	184	186	245	247	285	287	205	218	158	174		48.76500	17.00750	
14	TYN11	TYN	170	174	130	130	217	217	130	138	173	175	0	0	182	190	251	257	289	291	213	213	166	170		48.76500	17.00750	
15	TYN12	TYN	174	176	130	132	0	0	134	134	175	177	220	220	186	186	249	251	293	297	209	209	158	162		48.76500	17.00750	
16	TYN13	TYN	166																							76500	17.00750	
17	TYN14	TYN	162																							76500	17.00750	
18	TYN15	TYN	156																							76500	17.00750	
19	TYN16	TYN	168																							76500	17.00750	
20	TYN17	TYN	178	178	126	130	207	211	132	132	171	175	220	238	176	180	249	255	289	289	178	209	162	166		48.76500	17.00750	
21	TYN18	TYN	161	174	130	130	213	213	132	132	173	177	245	245	178	178	243	249	289	289	205	209	162	182		48.76500	17.00750	
22	TYN19	TYN	174	180	128	132	213	213	134	134	169	169	220	220	174	182	249	249	285	285	209	213	131	131		48.76500	17.00750	
23	TYN20	TYN	176	176	130	130	0	0	138	151	171	171	247	247	186	188	249	255	287	287	209	209	131	166		48.76500	17.00750	
24	TYN21	TYN	178	178	128	134	213	213	132	134	171	173	245	245	180	188	247	249	285	287	209	209	144	154		48.76500	17.00750	
25	TYN22	TYN	156	175	128	132	217	217	124	132	177	177	220	220	180	182	251	253	287	297	209	217	170	170		48.76500	17.00750	
26	TYN23	TYN	168	176	128	128	213	213	120	153	173	173	220	236	178	180	245	253	285	287	209	213	154	162		48.76500	17.00750	
27	TYN24	TYN	176	176	130	130	219	219	132	149	175	175	216	245	182	184	255	255	283	297	205	209	131	174		48.76500	17.00750	
28	TYN25	TYN	177	179	128	130	209	213	126	126	156	173	241	241	188	188	249	255	289	297	198	213	158	166		48.76500	17.00750	
29	TYN26	TYN	177	179	126	130	201	201	118	124	171	179	218	245	174	184	249	255	295	295	205	205	158	166		48.76500	17.00750	
30	TYN27	TYN	176	176	126	128	207	207	120	153	169	173	220	220	182	188	249	255	291	291	205	209	136	162		48.76500	17.00750	
31	TYN28	TYN	168	172	128	132	219	219	130	130	169	175	249	249	186	188	245	253	285	289	209	213	132	170		48.76500	17.00750	
32	TYN29	TYN	170	180	128	130	219	219	130	130	171	171	243	243	184	184	249	255	285	289	209	213	166	178		48.76500	17.00750	
33	TYN30	TYN	170	177	124	130	215	215	138	138	171	177	232	236	184	186	249	253	285	291	209	209	162	174		48.76500	17.00750	
34	NOV1	NOV	172	176	128	134	209	219	120	120	169	175	253	253	182	184	251	255	289	295	178	209	162	166		48.83320	16.50610	
35	NOV2	NOV	178	178	130	130	209	209	128	132	173	173	238	243	182	184	251	285	287	205	209	136	170		48.83320	16.50610		
36	NOV3	NOV	163	165	126	126	207	213	122	124	173	175	220	245	178	186	247	247	285	285	205	213	133	179		48.83320	16.50610	
37	NOV4	NOV	167	178	128	134	205	205	118	124	173	177	220	220	186	188	253	255	287	289	205	213	162	166		48.83320	16.50610	
38	NOV5	NOV	176	178	128	130	201	201	130	130	173	177	243	245	174	184	247	249	287	293	201	209	162	170		48.83320	16.50610	
39	NOV6	NOV	176	179	126	130	200	215	124	124	166	173	210	214	180	184	245	245	287	297	207	213	162	166		48.83320	16.50610	

formát GenAlex

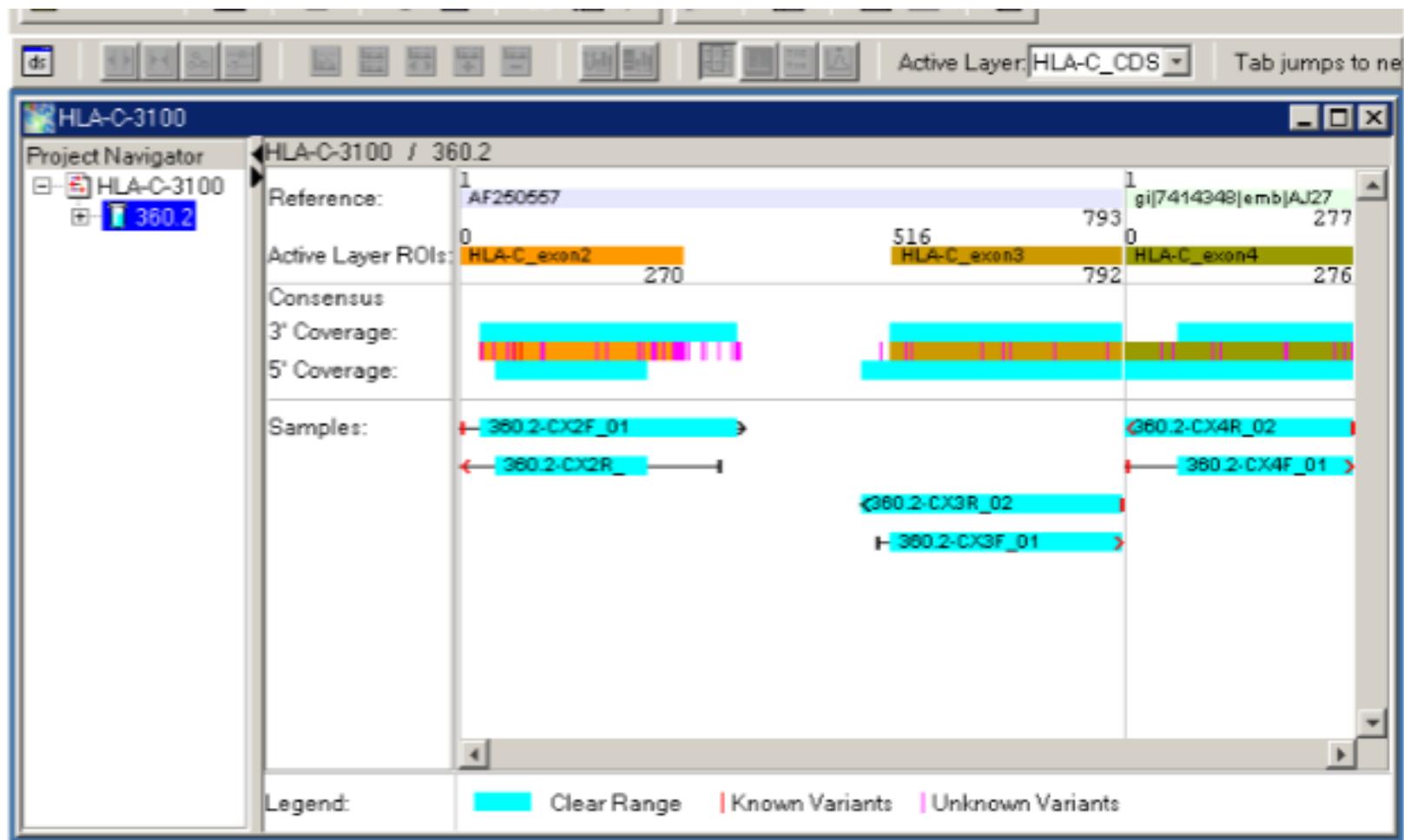


Screenshot of Microsoft Excel showing a GenAlex data file (PYG_GenAlex.xls) with a menu open under the "GenAlex" tab. The menu includes options like Frequency..., HWE..., Distance, AMOVA..., Mantel..., PCA..., Assignment, Spatial, Relatedness, Multilocus, Template, Create, Parameters, Data, Import Data, Raw Data, Edit Raw Data, Export Data, and various export formats (Arlequin..., Cervus..., Famoz..., Fdist2..., GeneClass..., GenePop..., Kinggroup..., MEGA..., MSA..., MsVar..., Nexus..., Phylip..., PopGene..., SPAGeDI..., Structure...).

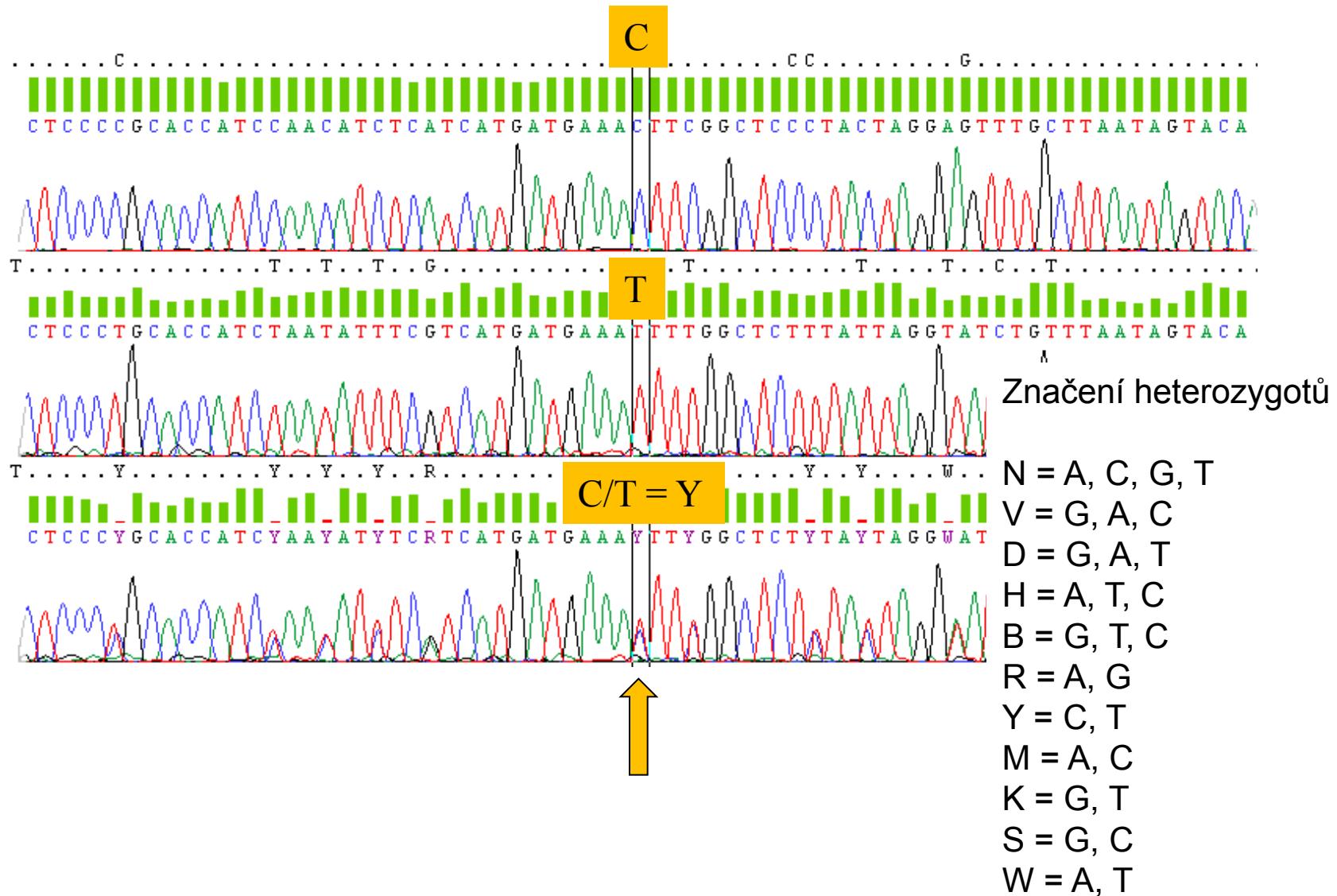
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
1	11	233	10	30	22	25	22	18	23	12	
2	Allele frequency										
3	ID	Pop	Ppip01	Ppip02	Ppip04	Ppip06					
4	TYN1	TYN	174	176	128	128	213	215	120	13	
5	TYN2	TYN	167	167	132	132	207	207	130	13	
6	TYN3	TYN	176	178	128	128	207	207	130	13	
7	TYN4	TYN	180	180	130	132	207	207	118	12	
8	TYN5	TYN	174	174	128	128	207	207	128	13	
9	TYN6	TYN	180	182	128	130	209	209	136	13	
10	TYN7	TYN	174	180	128	130	215	215	130	13	
11	TYN8	TYN	174	175	128	134	207	221	128	13	
12	TYN9	TYN	156	178	126	130	209	209	128	14	
13	TYN10	TYN	167	178	128	130	209	209	132	13	
14	TYN11	TYN	170	174	130	130	217	217	130	13	
15	TYN12	TYN	174	176	130	132	0	0	134	13	
16	TYN13	TYN	166	176	126	132	215	217	122	15	
17	TYN14	TYN	162	178	128	128	219	219	128	14	
18	TYN15	TYN	156	176	128	132	209	209	118	12	
19	TYN16	TYN	168	178	128	128	215	217	132	13	
20	TYN17	TYN	178	178	126	130	207	211	132	13	
21	TYN18	TYN	161	174	130	130	213	213	132	13	
22	TYN19	TYN	174	180	128	132	213	213	134	13	
23	TYN20	TYN	176	176	130	130	0	0	138	15	
24	TYN21	TYN	178	178	128	134	213	213	132	13	
25	TYN22	TYN	156	175	128	132	217	217	124	132	
26	TYN23	TYN	168	176	128	128	213	213	120	153	
27	TYN24	TYN	176	176	130	130	219	219	132	149	
28	TYN25	TYN	177	179	128	130	209	213	126	126	
29	TYN26	TYN	177	179	126	130	201	201	118	124	
30	TYN27	TYN	176	176	126	128	207	207	120	153	
31	TYN28	TYN	168	172	128	132	219	219	130	130	
32	TYN29	TYN	170	180	128	130	219	219	130	130	
33	TYN30	TYN	170	177	124	130	215	215	138	138	
34	NOV1	NOV	172	176	128	134	209	219	120	120	
35	NOV2	NOV	178	178	130	130	209	209	128	132	
36	NOV3	NOV	163	165	126	126	207	213	122	124	
37	NOV4	NOV	167	178	128	134	205	205	118	124	
38	NOV5	NOV	176	178	128	130	201	201	130	130	
39	NOV6	NOV	176	178	126	130	209	215	128	134	
										166	
										173	

Typy získaných dat – sekvence DNA

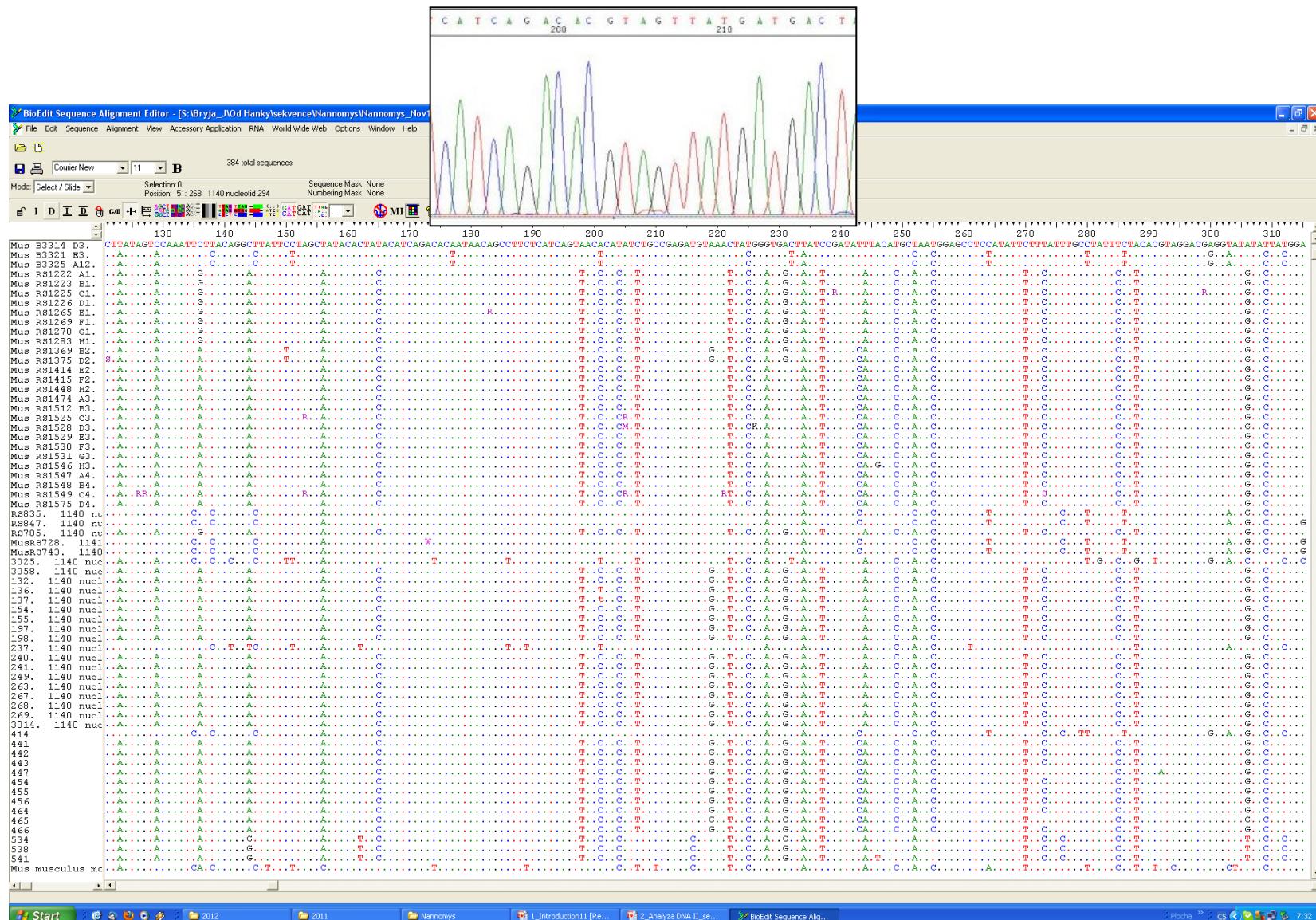
„Alignment“ → contig (ze stejného jedince)



Alignment sekvencí z různých jedinců – analýza polymorfismu



Typy získaných dat - sekvence



Tak, a co ted' s těmi daty ...