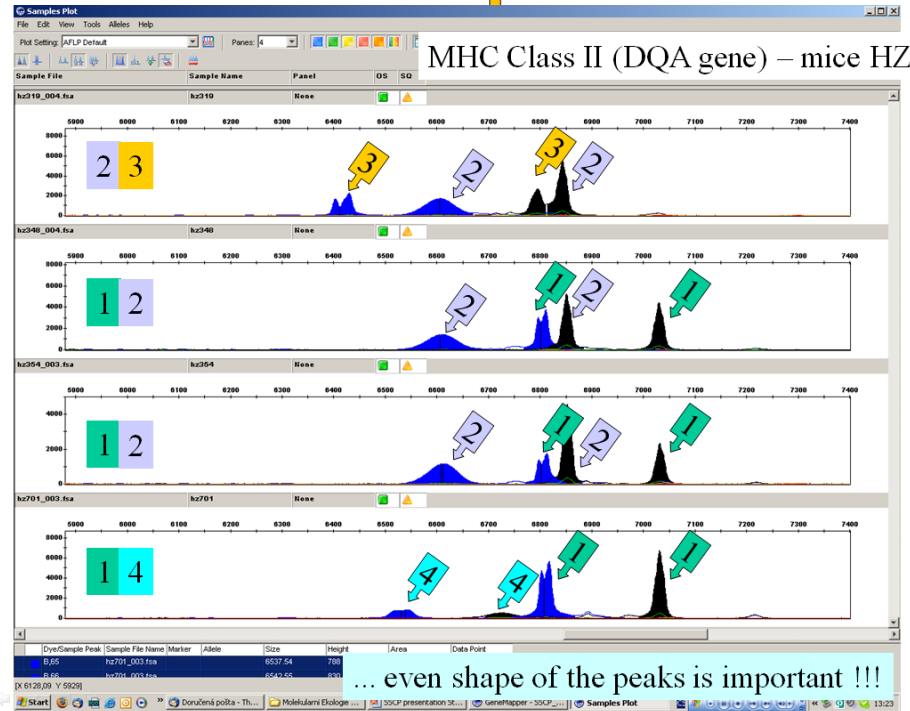
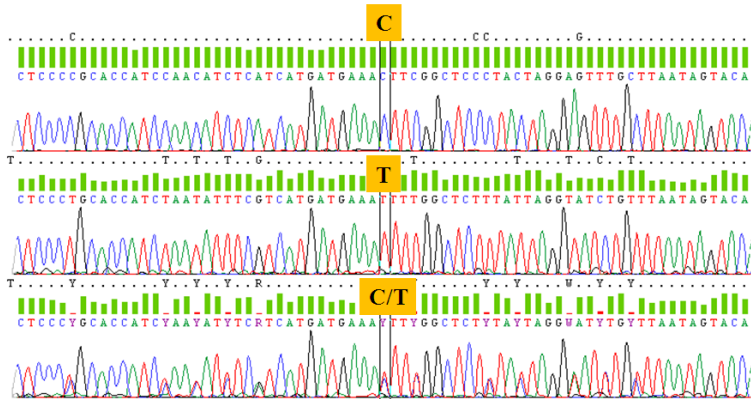


# SNPs genotyping - sekvenování? Je drahé a nejasné u heterozygotů



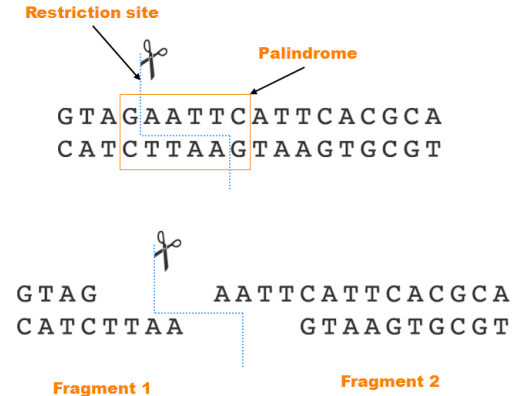
... even shape of the peaks is important !!!

# SNP genotyping - old standards

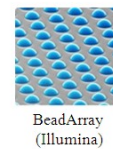
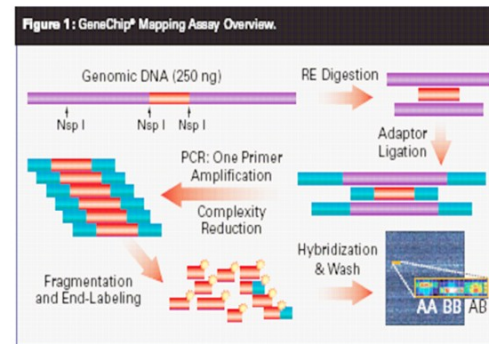
PCR-RFLP  
(restriction fragments length polymorphism)

Enzyme Site Recognition

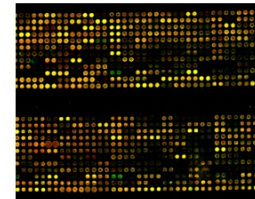
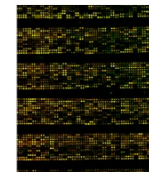
- Each enzyme digests (cuts) DNA at a specific sequence = restriction site
- Enzymes recognize 4- or 6- base pair, palindromic sequences (eg GAATTC)



# Detekce: Affymetrix, Illumina



BeadArray (Illumina)



10 – 500 tisíc SNP znaků najednou – „chip technology“

# Typy genetických markerů

|                    | Single locus | Codominant | PCR assay | Overall variability |
|--------------------|--------------|------------|-----------|---------------------|
| Nuclear multilocus |              |            |           |                     |

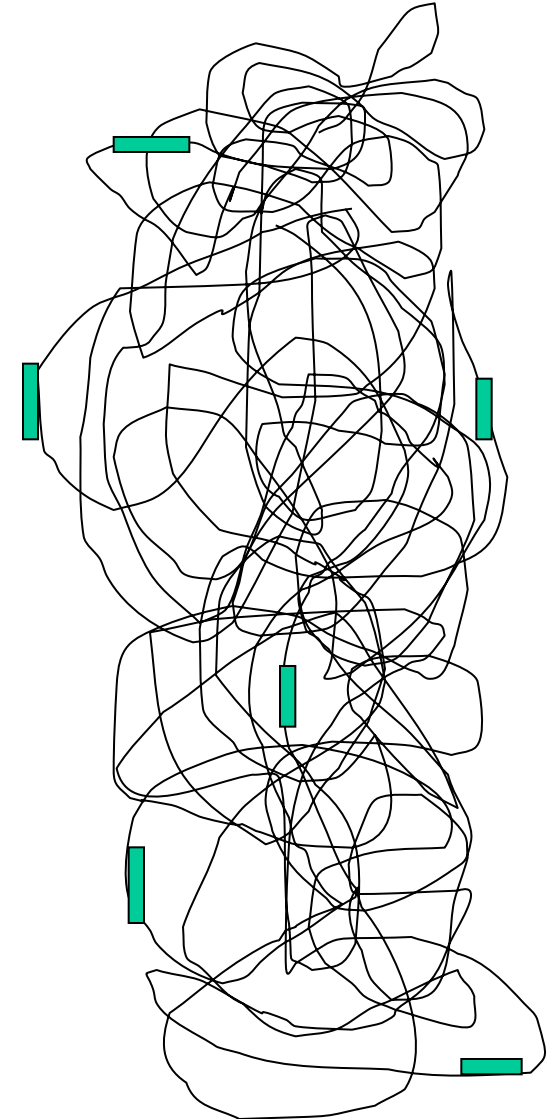


| Nuclear single locus |     |     |     |            |
|----------------------|-----|-----|-----|------------|
| Alozymy              | Yes | Yes | No  | Low-medium |
| Mikrosatelite        | Yes | Yes | Yes | High       |
| SINE (LINE)          | Yes | Yes | Yes | Low        |
| SNPs                 | Yes | Yes | Yes | Low-high   |

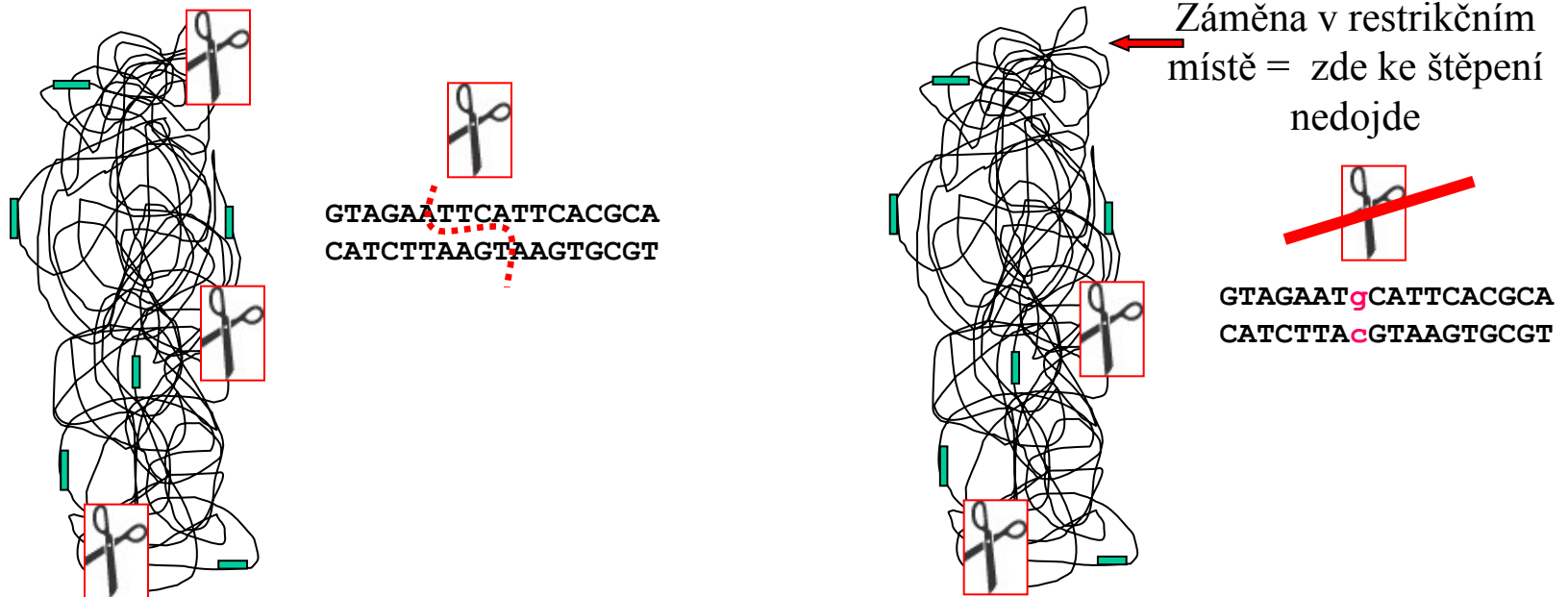
# Multi-locus genetic markers

- Mnoho znaků náhodně rozmístěných v genomu - celogenomový scan
- *minisatellite DNA fingerprinting*
- *RAPD* (randomly amplified polymorphic DNA)
- *AFLP* (amplified fragment length polymorphism)
- presence vs. absence **restrikčního místa** (AFLP) či **místa pro dosednutí primerů** (RAPD) = **dominantní znaky** (neodliší heterozygota - proužek na gelu buď je nebo není)
- není nutno znát předem genom studovaného druhu (tj. primery či sondy)

Př.: chromozóm 1



# Každý jedinec má jedinečný genom



1. Ztráta nebo nabytí restričního místa

# Enzyme Site Recognition

- Each enzyme digests (cuts) DNA at a specific sequence = restriction site
- Enzymes recognize 4- or 6- base pair, palindromic sequences (eg GAATTC)

**Restriction site**

**Palindrome**

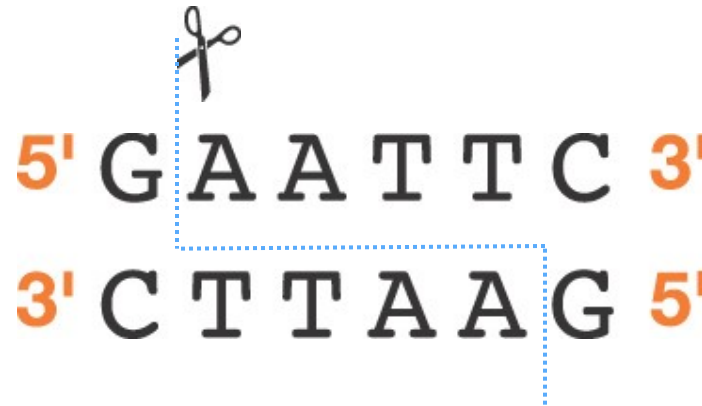
G T A G G A A T T C A T T T C A C G C A  
C A T C T T A A G T A A G T G C G T

G T A G                      A A T T C A T T T C A C G C A  
C A T C T T A A                      G T A A G T G C G T

**Fragment 1**

**Fragment 2**

# Common Restriction Enzymes



***EcoRI***

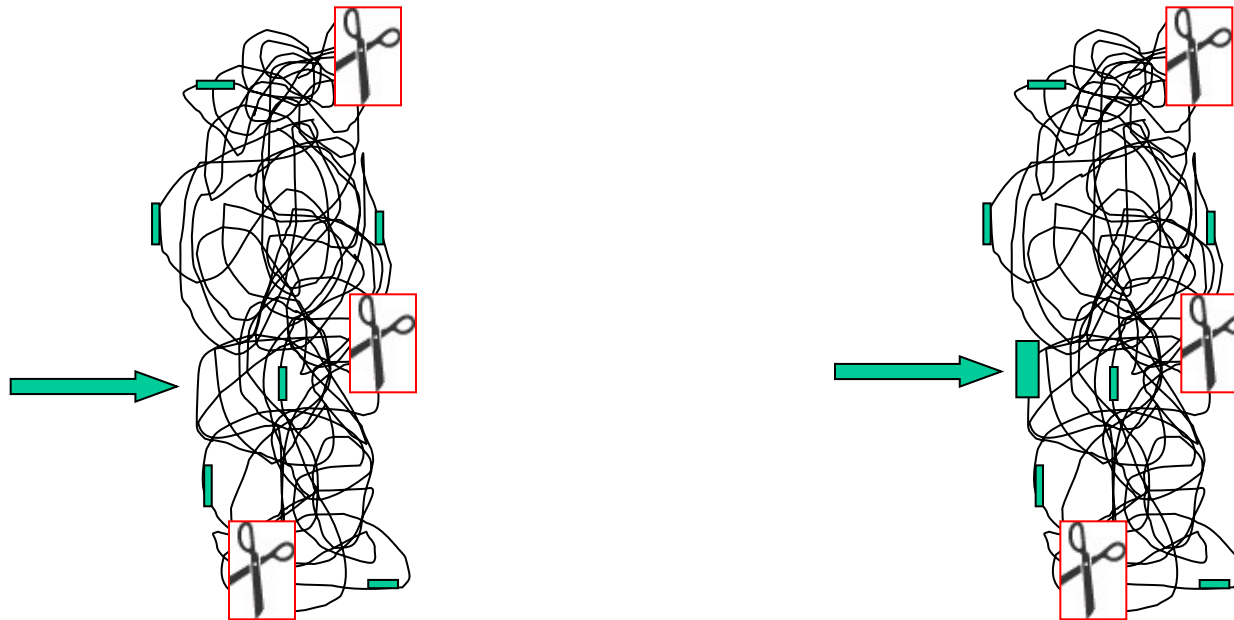
- *Escherichia coli*
- 5 prime overhang



***PstI***

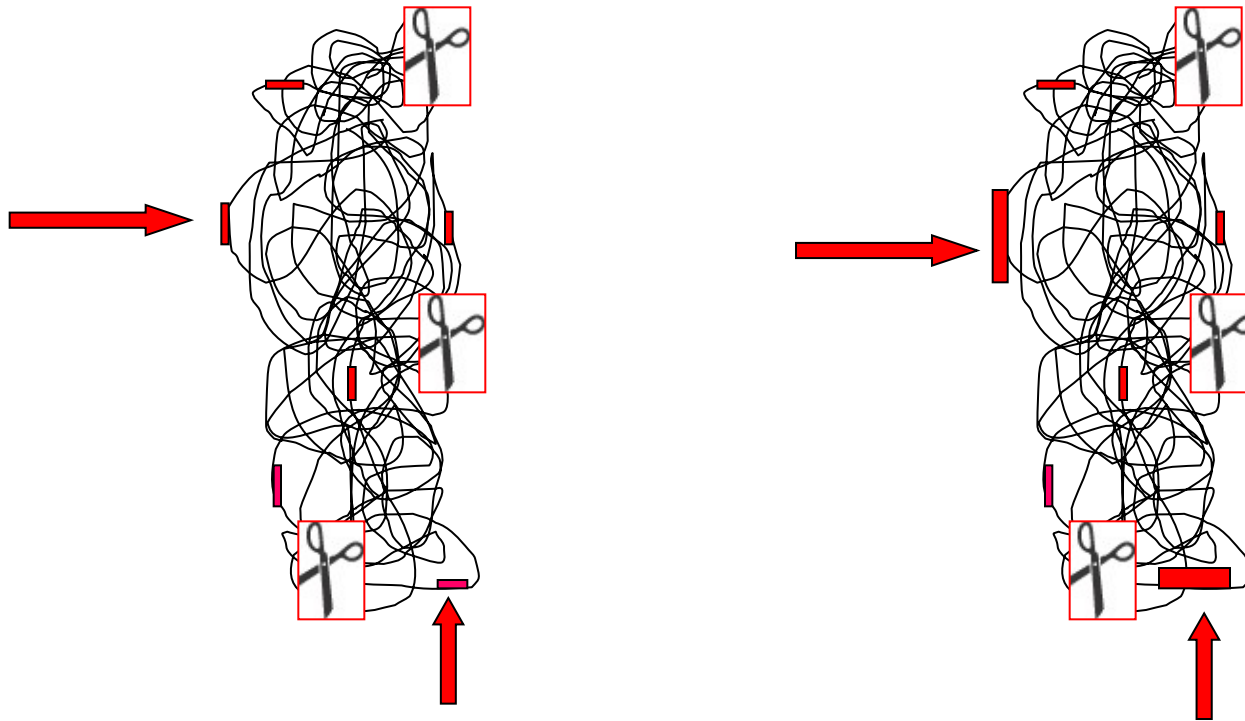
- *Providencia stuartii*
- 3 prime overhang

# Každý jedinec má jedinečný genom



2. Ztráta nebo nabytí SINE (např. **Alu** sekvence) nebo LINE

# Každý jedinec má jedinečný genom



3. Vysoká mutační rychlost **minisatelitů a mikrosatelitů** -  
rozdíly v počtu repeticí, tj. v délce daného úseku



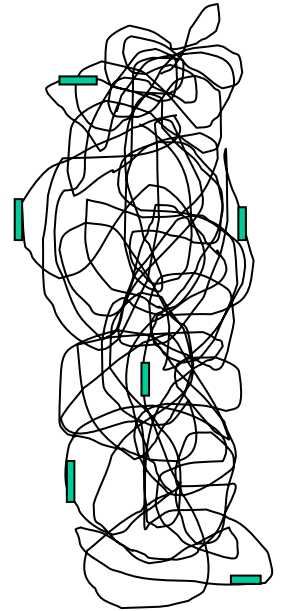
# Repetitivní DNA

| DNA                                    | Typical sequence length (bp) | Location  |
|--|------------------------------|---|
| Satellites ( $>10^6$ repeats/genome)   | 5-100                        | Tandem arrays, scattered throughout the genome                              |
| Minisatellites ( $>10^3$ loci/genome)  | 20-300                       | Tandem arrays up to 5 kb in length, scattered throughout the genome         |
| Microsatellites ( $>10^4$ loci/genome) | 1-6                          | Tandem arrays up to a few 100 bp in length, scattered throughout the genome |
| Telomeres                              | 4-8                          | Tandem arrays up to 1kb in length, at the ends of each chromosome           |
| SINEs ( $>10^5$ /genome)               | 50-500 (100-300)             | Interspersed throughout the genome  |
| LINEs ( $>10^3$ /genome)               | 1-5 k                        | Interspersed throughout the genome  |

# (Minisatellite) DNA fingerprinting

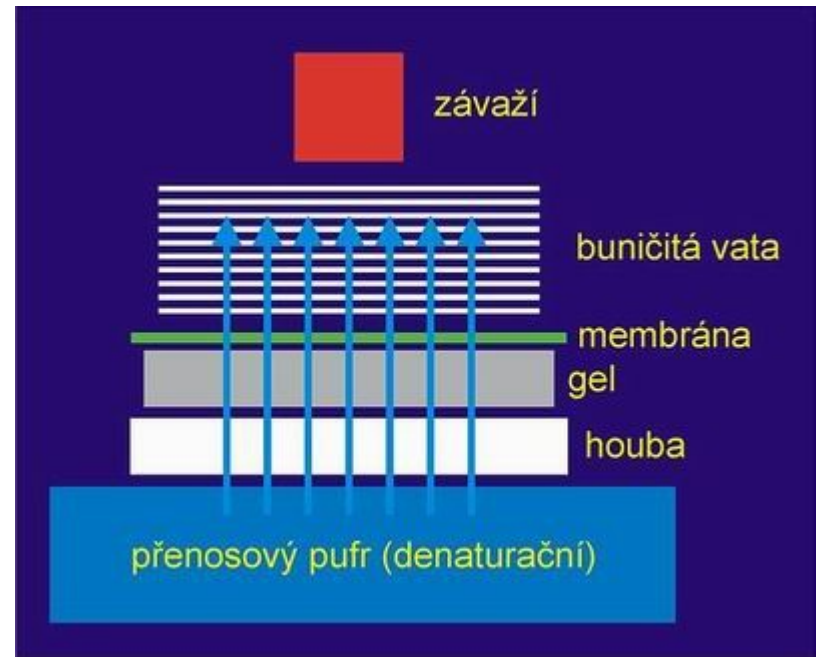
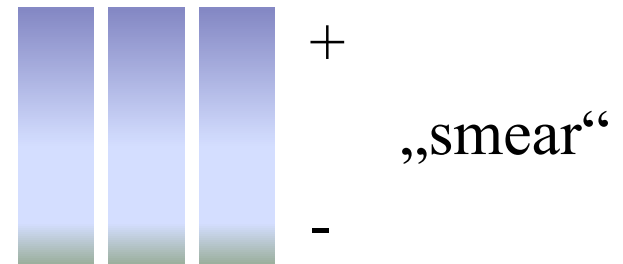
(Jeffreys et al. 1985)

- první celogenomový screening
- restriční štěpení kompletní DNA – sekvenčně specifické **restriční endonukleázy**



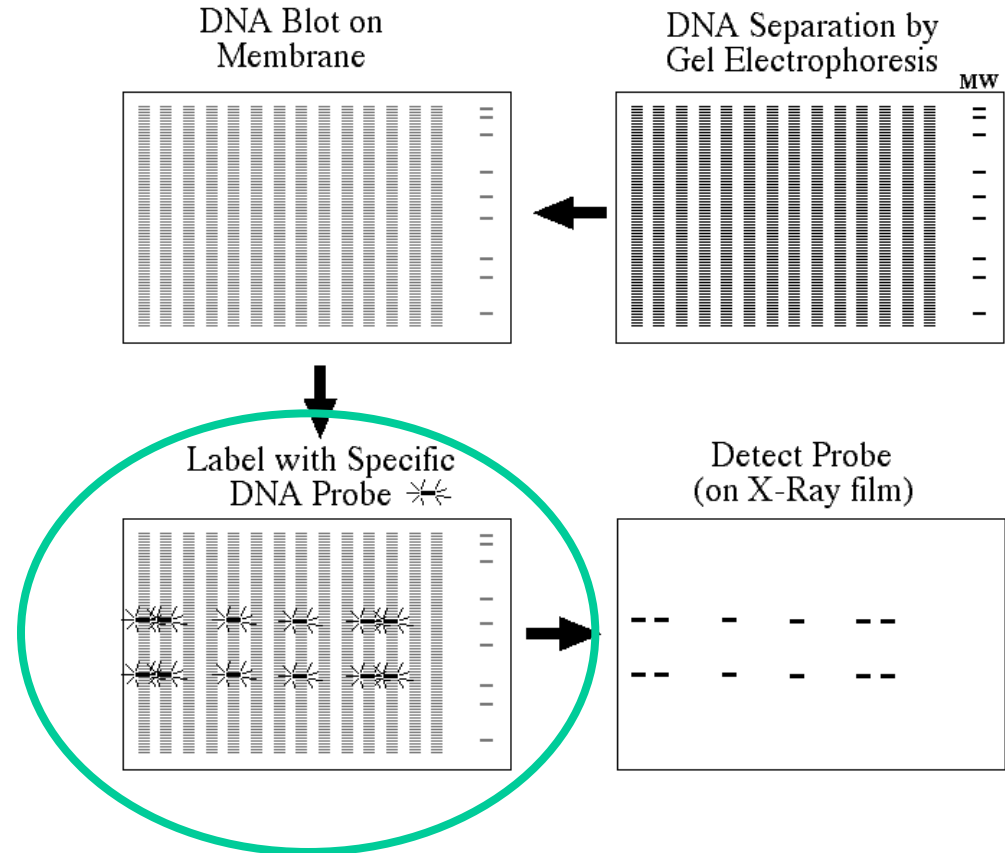
# Minisatellite DNA fingerprinting

- elektroforéza rozštěpené DNA
- Southern blotting – přenesení DNA na membránu



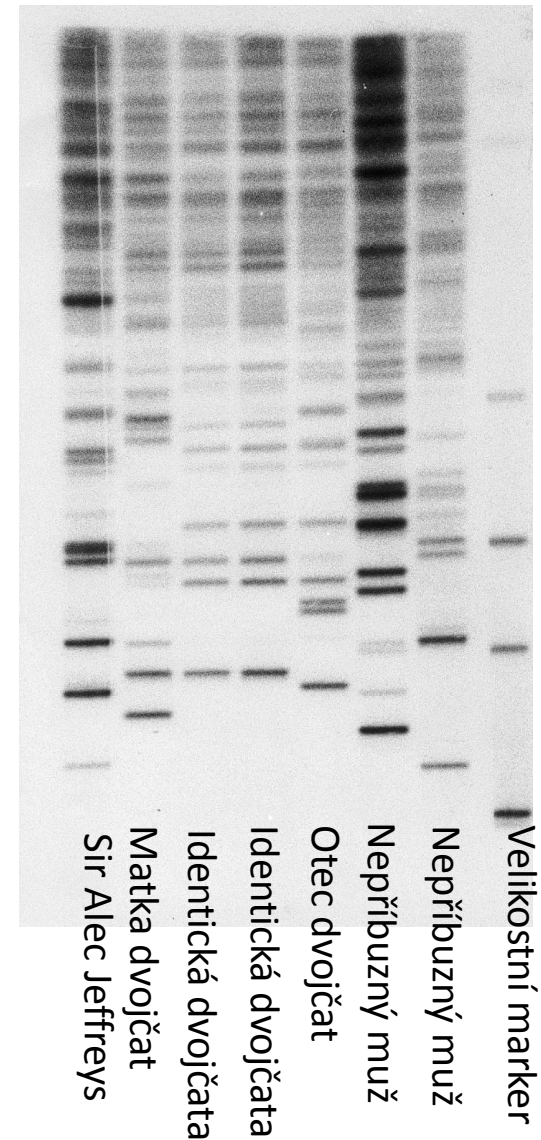
# Minisatellite DNA fingerprinting

- elektroforéza
- Southern blotting – přenesení DNA na membránu
- hybridizace se značenou sondou (nejčastěji radioaktivní značení), tj. specifickou sekvencí odpovídající danému minisatelitu (popř. SINE)



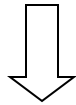
# Minisatellite DNA fingerprinting

- elektroforéza
- Southern blotting – přenesení DNA na membránu
- hybridizace se značenou sondou, tj. specifickou sekvencí odpovídající danému minisatelitu
- zásadní objevy např. EPC u ptáků
- v posledních 10-15 letech – přesun k PCR-based metodám



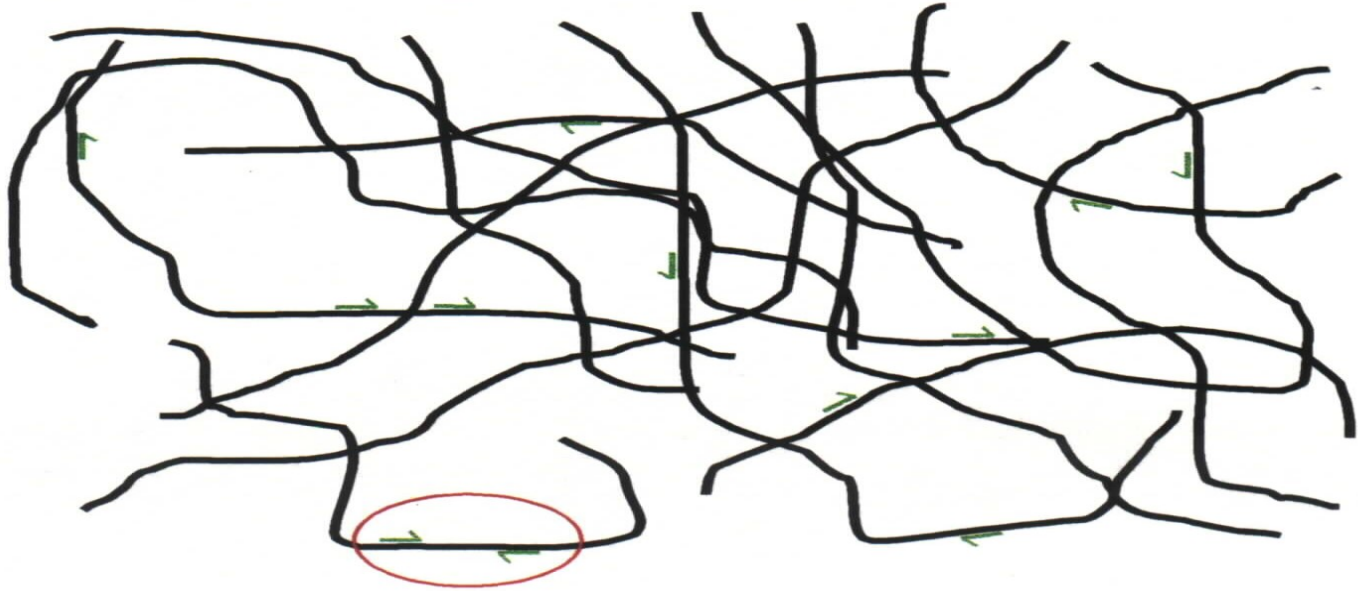
# RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)

Krátké náhodné oligonukleotidy  
(~ 10 bp) jako primery

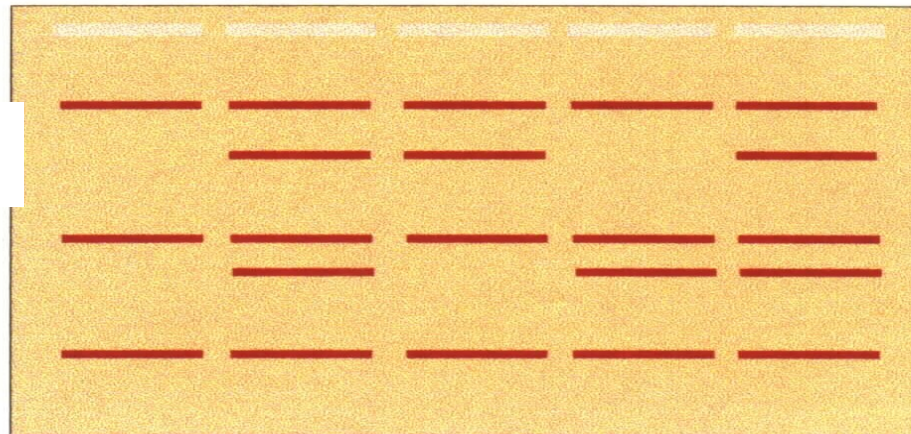


PCR za málo specifických podmínek

# genomic DNA



- 1) PCR
- 2) Separation by size on agarose gel



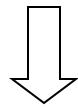
## Variabilní DNA detekovaná metodou RAPD:

- a) Změna sekvence v místě nasedání primeru
- b) Delece místa nasedání primeru
- c) Velká inzerce mezi dvěma místy nasedání primeru

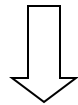


# RAPD

Krátké náhodné oligonukleotidy  
(~ 10 bp) jako primery

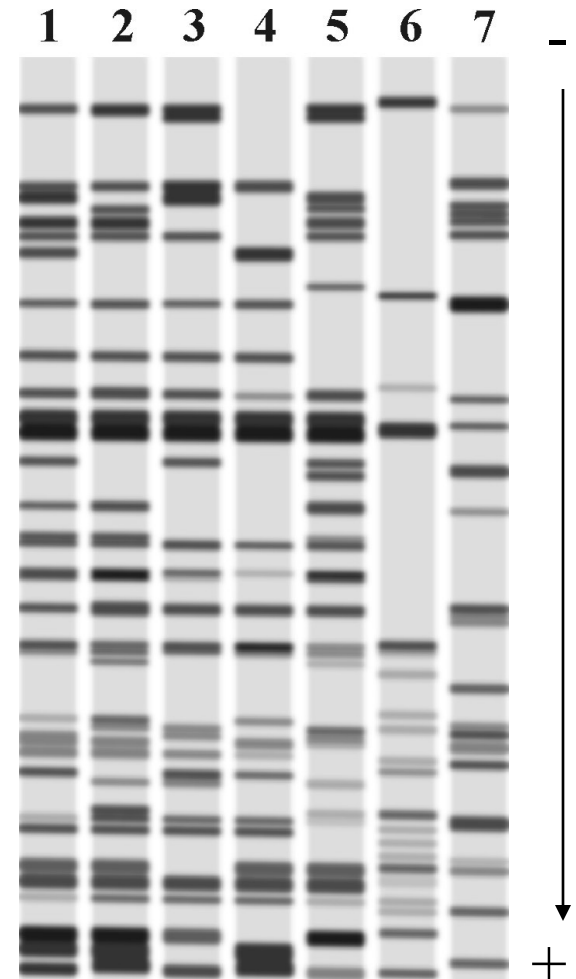


PCR za málo specifických podmínek



Detekce PCR produktů elektroforézou

Nízká opakovatelnost v důsledku mnoha faktorů  
ovlivňujících PCR – dnes již není akceptována  
jako metoda např. pro studium populační  
struktury (ale třeba vhodná jednoduchá metoda k  
odlišení příbuzných druhů)



# AFLP (amplified fragments length polymorphism)

- levná, jednoduchá, rychlá a spolehlivá metoda na generování stovek informativních genetických markerů
- současný screening mnoha různých DNA oblastí distribuovaných náhodně v genomu
- lépe reprodukovatelná než RAPD – obsahuje krok se specifickou PCR
- „genome scan“ – hledání asociací s fenotypovými znaky

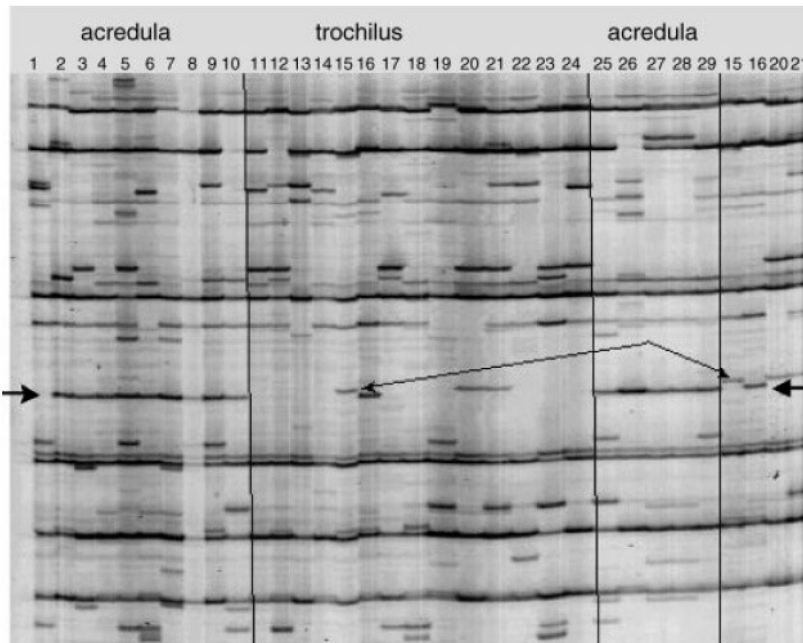
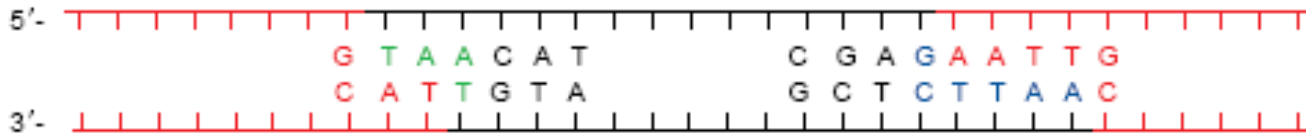


# Generating AFLP markers

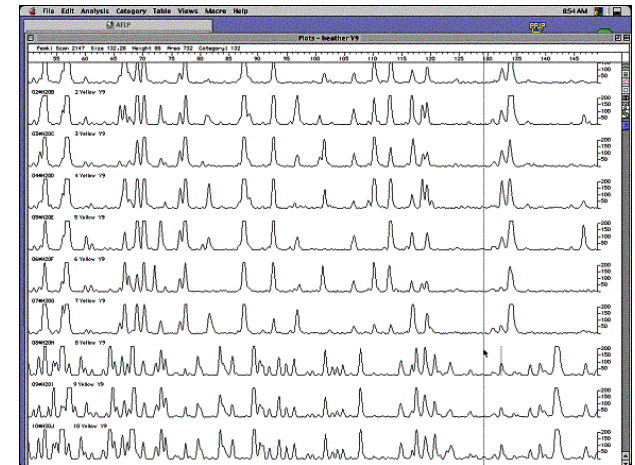
(c) Selective amplification (one of many primer combinations shown)



PCR with primers on adaptors



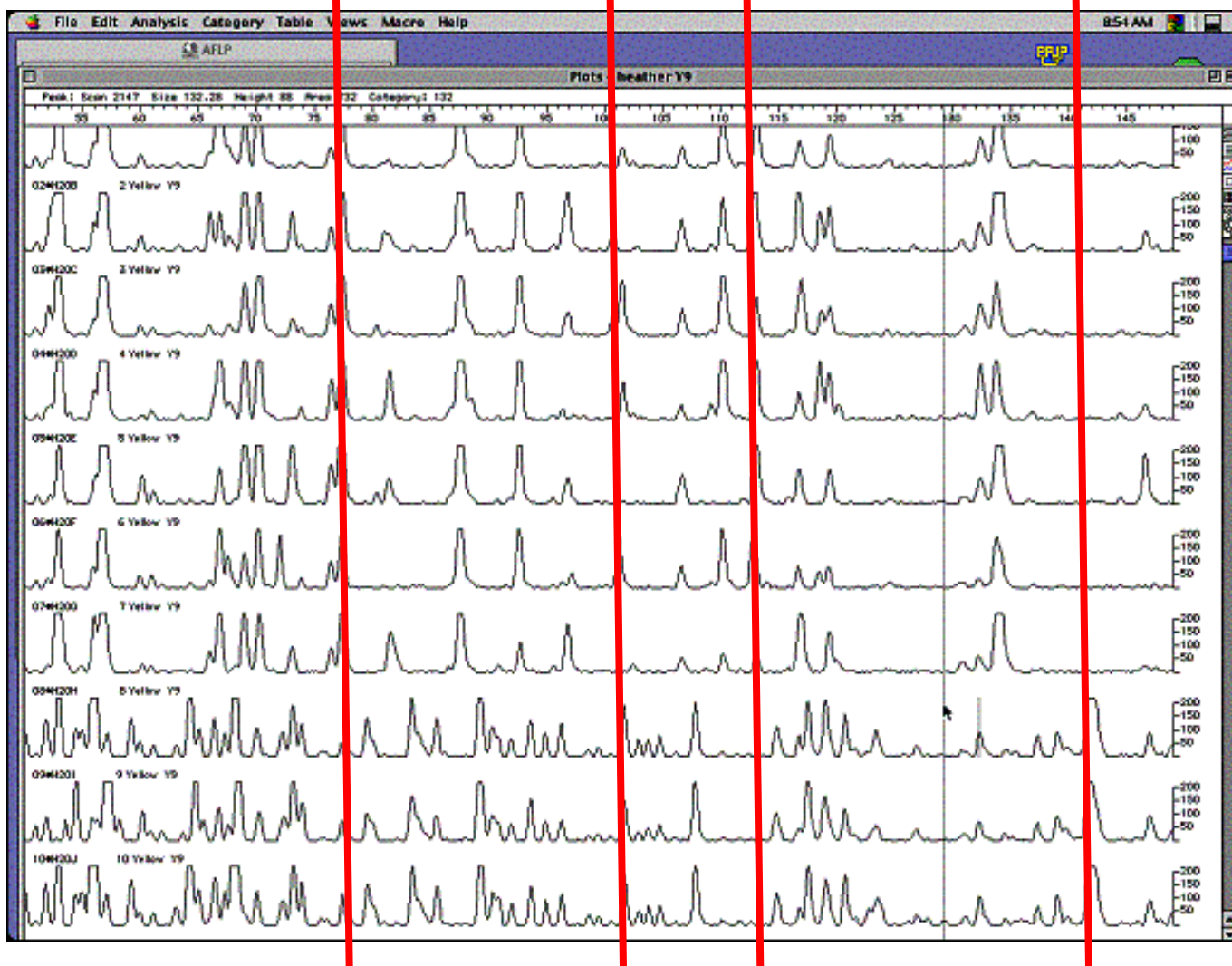
multi-locus genotype



„capillary version“

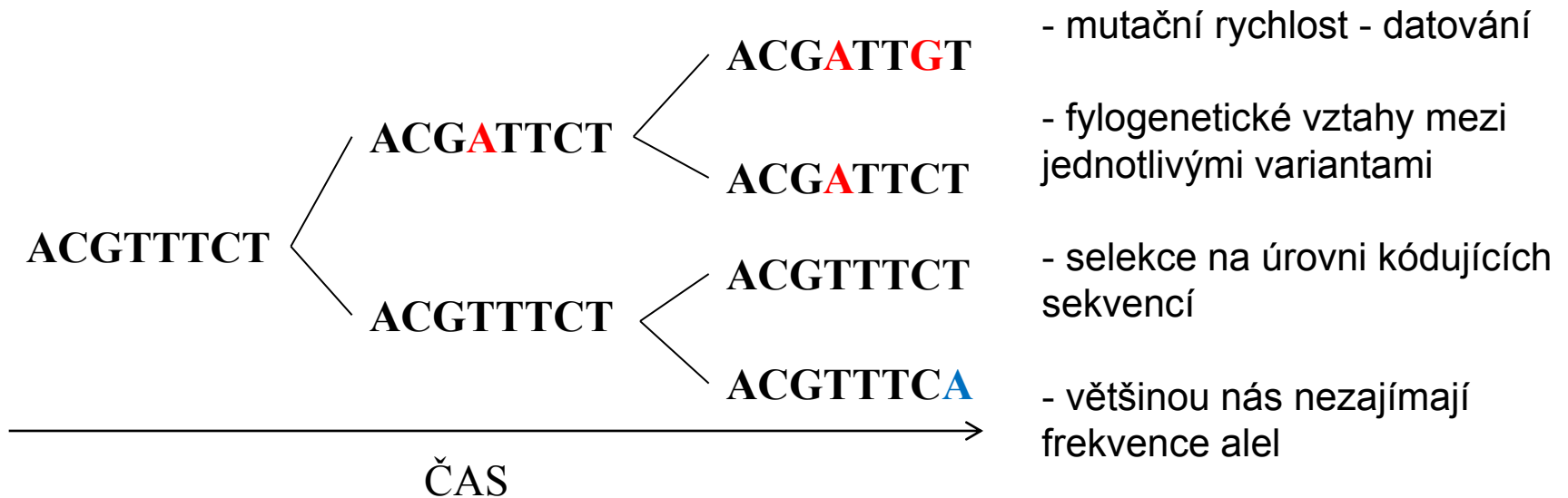
Ex.:  
Combination  
MseI + EcoRI

Automatizované čtení elektroforetogramu podle  
zadaných kritérií (např. pozice a minimální výška píku)



# Typy populačně-genetických dat a jejich základní analýza

# Fylogenetika vs. populační genetika



ACGATTGT ACGATTGT  
ACGATTGT

- založená na frekvencích alel

ACGATTGT  
ACGATTCT ACGATTCT

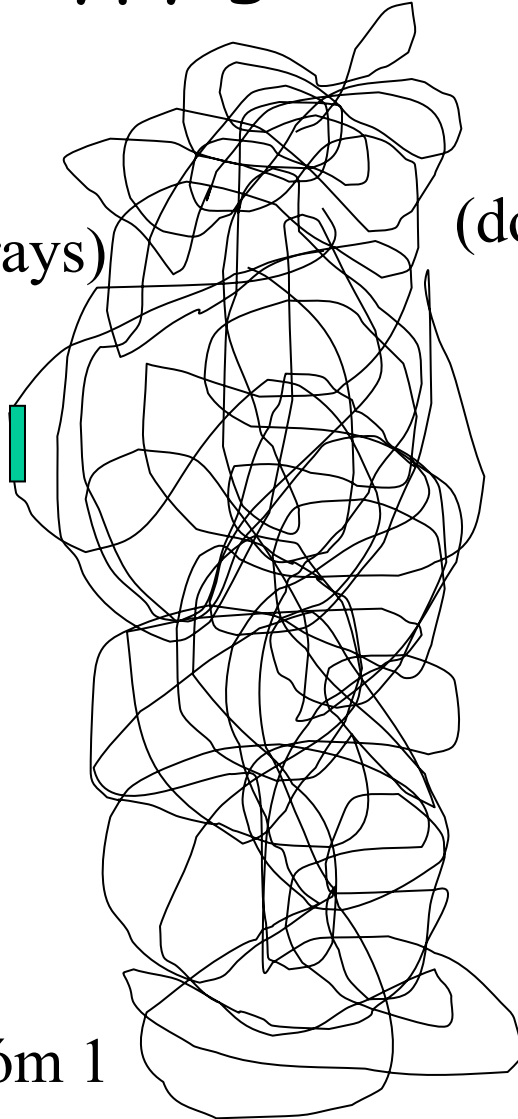
- relativně recentní procesy: genetický drift, populační struktura, tok genů, efektivní velikost populace

ACGTTTCT  
ACGTTTCA  
ACGTTTCT ACGTTTCT  
ACGTTTCA ACGTTTCT

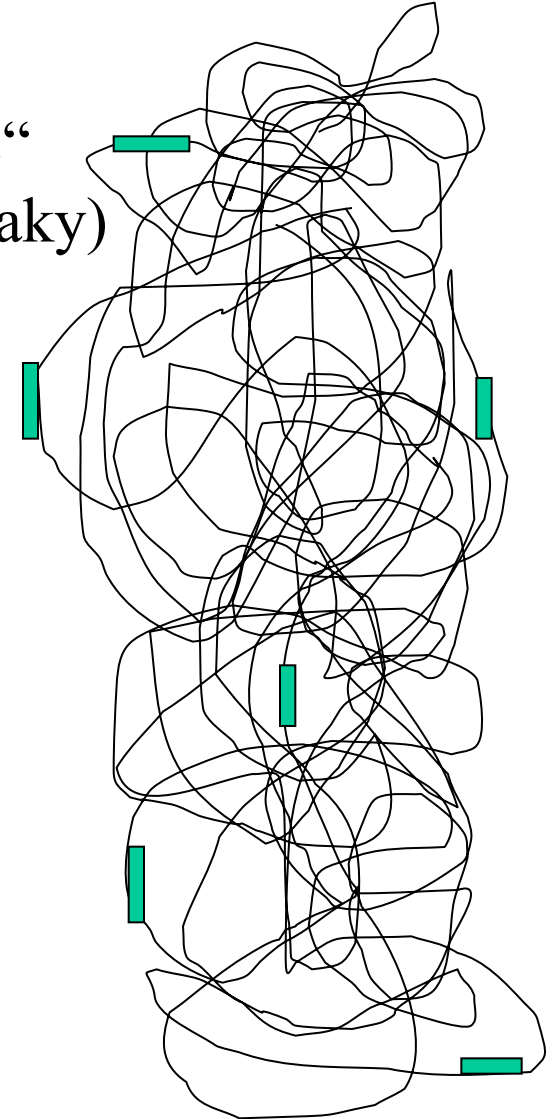
- selekce – srovnání populační struktury na kódujících a nekódujících znacích

# Laboratorní techniky (= typy genetických markerů)

„single-locus“  
(PCR, microarrays)



„multi-locus“  
(dominantní znaky)



Př.: chromozóm 1



# Typy populačně-genetických dat

## mikrosatelity

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

## SNPs

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

## SINE

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

## AFLP

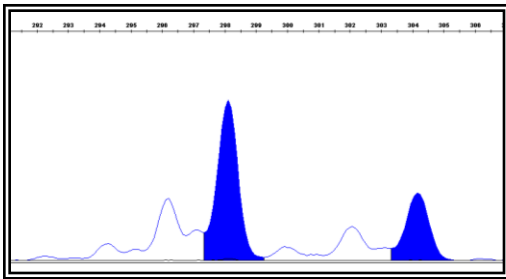
| Jedinec | Marker 1 | Marker 2 |
|---------|----------|----------|
| Ind_1   | +        | -        |
| Ind_2   | +        | +        |
| Ind_3   | -        | -        |

# Populačně-genetická analýza

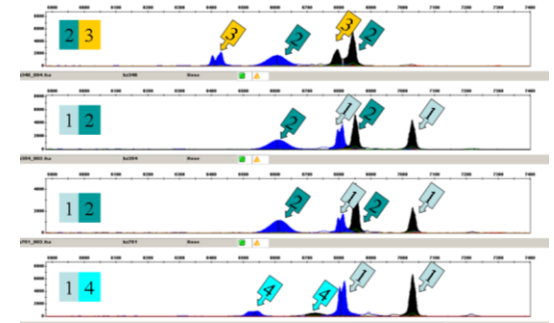
- Jak je variabilní daná populace a jaká je její efektivní velikost
- Nachází se daná populace v období demografické expanze nebo poklesu?
- Existuje mezi dvěma subpopulacemi bariéra toku genů a jak je silná? Jaká je prostorová genetická struktura?
- Vyskytují se v populacích imigranti nebo jejich potomci (hybridi)?

# Populačně-genetická data

- v tomto kurzu omezena na diploidní kodominantní znaky (Mendelovská dědičnost)



mikrosatelity



jaderné sekvence  
(např. SSCP)

\_\_\_\_\_ **T**  
CCGATCA**A**TGCGGCAA

\_\_\_\_\_ **G**  
CCGATCA**C**TGCGGCAA

SNPs

# Velké množství populačně-genetických programů

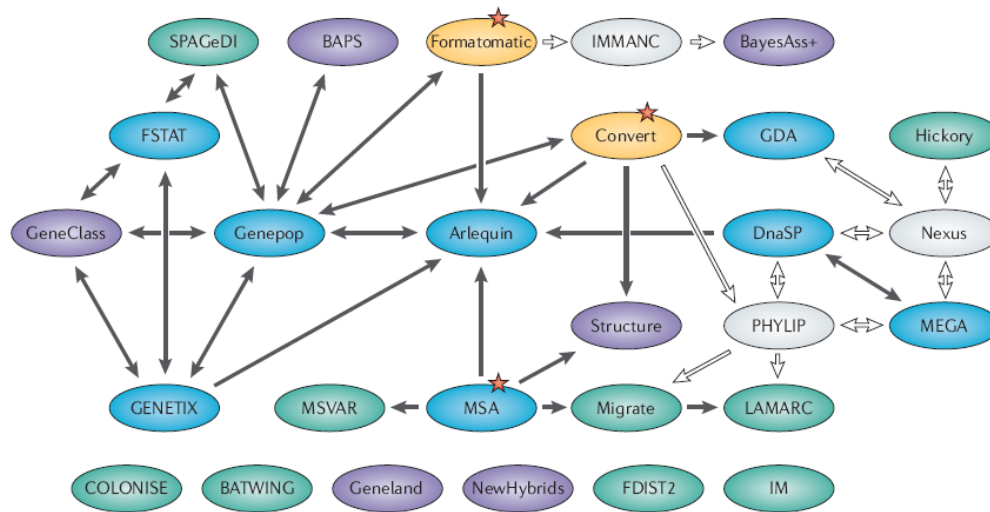
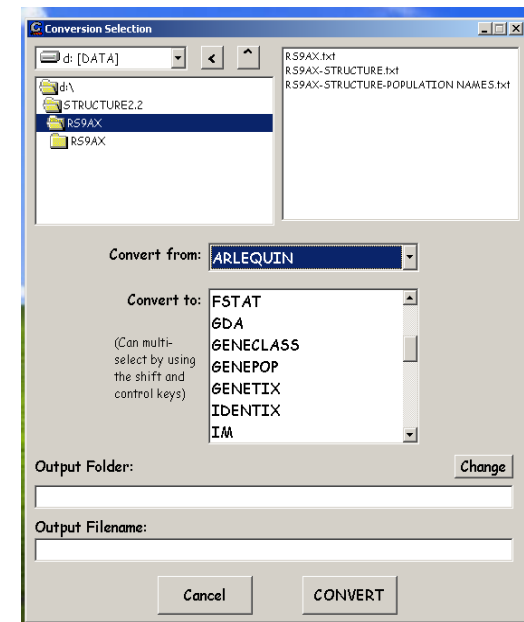
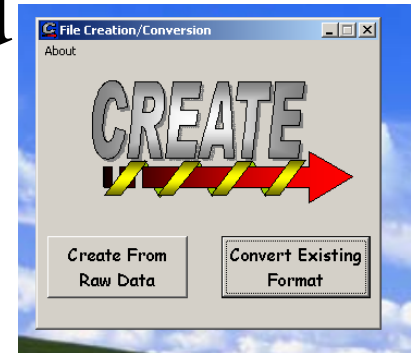


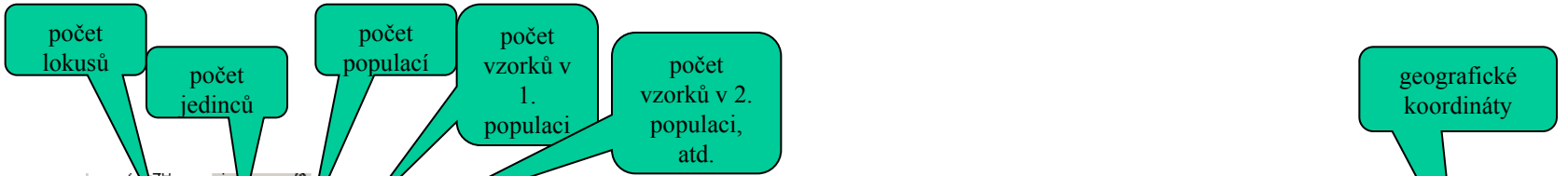
Figure 1 | **Flow chart of possible data exchange between different population genetics programs.** Although many programs have their own input-file specification, data files can still be exchanged between most programs (black arrows), avoiding tedious reformatting processes. The red stars are recommended starting points to format an initial data set. Blue ellipses represent multi-purpose packages, whereas individual-centred programs are shown in violet. The two conversion programs are shown in yellow. Specialized programs are shown in green, and light grey ellipses represent programs that are not reviewed here, but the data formats of which are used by other programs allowing indirect data exchange (white arrows). The data files associated with the programs listed on the bottom row cannot be exchanged directly with the other programs.



## Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide

Laurent Excoffier and Gerald Heckel

# Kodominantní znaky (např. mikrosatelity) – GenAlEx formát



|    | 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       | AA       |  |
|----|------------------|-----|--------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|--------|------|--------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|----------|----------|----------|--|
| 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 | Paur05 | 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      | 184 | 190 | 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    |        |        |        |     |     |     |        |      |        |        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |          | 00       | 17.00750 |  |
| 17 | TYN14            | TYN | 162    |        |        |        |     |     |     |        |      |        |        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |          | 00       | 17.00750 |  |
| 18 | TYN15            | TYN | 156    |        |        |        |     |     |     |        |      |        |        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |          | 00       | 17.00750 |  |
| 19 | TYN16            | TYN | 168    | 178    | 128    | 128    | 215 | 215 | 132 | 134    | 173  | 175    | 243    | 243 | 178 | 178 | 247 | 249 | 289 | 289 | 205 | 209 | 162 | 170 |   | 48.76500 | 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 | 249 | 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    | 178    | 126    | 130    | 209 | 215 | 128 | 134    | 166  | 173    | 0      | 0   | 184 | 184 | 245 | 245 | 287 | 287 | 205 | 213 | 162 | 166 |   | 48.83320 | 16.50610 |          |  |

pop1  
 genotypy, tj. velikosti fragmentů u jednotlivých jedinců  
 pop2

```

PYG - Poznámkový blok
Soubor Úpravy Formát Zobrazení Nápvěda
Title line:"Genotype file for Pipistrellus data"
Ppip01
Ppip02
Ppip04
Ppip06
EF1
EF4
EF6
Paur05
NN18
NnP217
NnP219
Pop
  Pop1, 1820 0505 0809 0511 0308 1321 0209 0506 0608 1214 0513
  Pop1, 1111 0707 0505 1013 0508 0920 0609 0405 0606 1219 1212
  Pop1, 2022 0505 0505 1010 0505 0000 0710 0505 0409 1416 1213
  Pop1, 2424 0607 0505 0407 0607 0419 0710 0405 0405 1417 0512
  Pop1, 1818 0505 0505 0914 1011 1717 0609 0407 0000 1214 1011
  Pop1, 2426 0506 0606 1313 0708 1719 0708 0707 1014 1416 1113
  Pop1, 1824 0506 0909 1010 0707 1717 1010 0505 0514 1416 1011
  Pop1, 1819 0508 0512 0914 0609 0416 0408 0505 0609 1616 1112
  Pop1, 0222 0406 0606 0919 0909 0409 0709 0508 0606 1819 1012
  Pop1, 1122 0506 0606 1112 0608 1920 0708 0304 0506 1219 1014
  Pop1, 1418 0606 1010 1014 0708 0000 0610 0609 0708 1616 1213
  Pop1, 1820 0607 0000 1212 0809 0404 0808 0506 0911 1414 1011
  Pop1, 1020 0407 0910 0621 0505 0419 0408 0506 0606 1416 1113
  Pop1, 0722 0505 1111 0919 0709 0404 0406 0707 0505 0212 1212
  Pop1, 0220 0507 0606 0409 0910 0404 0406 0506 0514 1616 1214
  Pop1, 1222 0505 0910 1112 0708 1919 0404 0405 0707 1214 1113
  Pop1, 2222 0406 0507 1111 0608 0414 0305 0508 0707 0214 1112
  Pop1, 0618 0606 0808 1111 0709 2020 0404 0205 0707 1214 1118
  Pop1, 1824 0507 0808 1212 0505 0404 0206 0505 0505 1416 0101
  Pop1, 2020 0606 0000 1420 0606 2121 0809 0508 0606 1414 0112
  Pop1, 2222 0508 0808 1112 0607 2020 0509 0405 0506 1414 0609
  Pop1, 0219 0507 1010 0711 0909 0404 0506 0607 0611 1418 1313
  Pop1, 1220 0505 0808 0521 0707 0413 0405 0307 0506 1416 0911
  Pop1, 2020 0606 1111 1119 0808 0220 0607 0808 0411 1214 0114
  Pop1, 2123 0506 0608 0808 0207 1717 0909 0508 0711 0916 1012
  Pop1, 2123 0406 0202 0407 0610 0320 0207 0508 1010 1212 1012
  Pop1, 2020 0405 0505 0521 0507 0404 0609 0508 0808 1214 0411
  Pop1, 1216 0507 1111 1010 0508 2222 0809 0307 0507 1416 0213
  Pop1, 1424 0506 1111 1010 0606 1919 0707 0508 0507 1416 1216
  Pop1, 1421 0306 0909 1414 0609 1113 0708 0507 0508 1414 1114
Pop
  Pop2, 1620 0508 0611 0505 0508 2323 0607 0608 0710 0214 1112
  Pop2, 2222 0606 0606 0911 0707 1419 0607 0506 0506 1214 0413
  Pop2, 0809 0404 0508 0607 0708 0420 0408 0404 0505 1216 0317
  Pop2, 1122 0508 0404 0407 0709 0404 0809 0708 0607 1216 1112
  Pop2, 2022 0506 0202 1010 0709 1920 0207 0405 0609 1014 1113
  Pop2, 2022 0406 0609 0912 0307 0000 0707 0303 0606 1216 1112
  Pop2, 1414 0506 0000 1111 0709 2020 0206 0307 0606 1012 1212
  Pop2, 1818 0505 0710 1111 0708 2020 0709 0305 0606 1516 1213
  Pop2, 2020 0405 0208 1021 0606 0412 0607 0305 0606 1212 1012
  Pop2, 1820 0505 0808 0809 0709 0319 0710 0407 0000 1212 0212
  Pop2, 0220 0406 0707 0909 0909 0304 0808 0208 1617 1112 0213
  Pop2, 2020 0206 0505 0509 0307 0517 0308 0105 0914 1014 0213
  Pop2, 2024 0607 1010 1212 0307 1920 0809 0407 0505 1414 1213
  Pop2, 2024 0509 0202 1515 0206 0420 0307 0508 0707 1414 1112
  Pop2, 1624 0507 0205 1115 0208 0420 0709 0205 0707 1214 1215
  Pop2, 1621 0607 1010 0921 0609 2222 0708 0707 1415 1416 1113
  Pop2, 1616 0506 0508 1010 0607 0517 0306 0509 0608 1117 1215
  Pop2, 1420 0507 0909 1010 0708 0416 0710 0506 0506 1214 0912
  Pop2, 2024 0405 1111 0910 0507 1921 0709 0105 0607 1014 0912
  Pop2, 1620 0508 0611 0406 0511 0319 0610 0506 0610 0212 0211
  Pop2, 1220 0505 0609 0909 0809 1717 0208 0708 0606 1416 0412
  Pop2, 2222 0506 0808 1010 0608 1919 0708 0307 0506 1114 0210
Pop
  Pop3, 2125 0407 0000 0606 0606 0000 0409 0708 0406 1616 0513
  Pop3, 1620 0405 0609 1414 0708 1418 0203 0405 0505 1015 1011
  Pop3, 1818 0205 0910 1010 0307 0505 0609 0411 0410 1115 1112
  Pop3, 1823 0406 1010 0306 0810 1420 0208 0303 0809 1212 0712

```

# Genepop file format – jednoduchý ASCII kód (.txt)

- jednotlivé alely pro daný lokus jsou seřazeny podle velikosti a očíslovány
- tj. např. 128/130 je převedeno na 10/11

# Vnitropopulační variabilita

## Polymorfismus

- podíl polymorfních lokusů (znaků) – např. 0,8 = 4 z pěti zkoumaných mikrosatelitů mají v populaci alespoň 2 alely, z nichž ta vzácnější dosahuje frekvence alespoň 1% nebo 5%

## Počet alel (number of alleles)

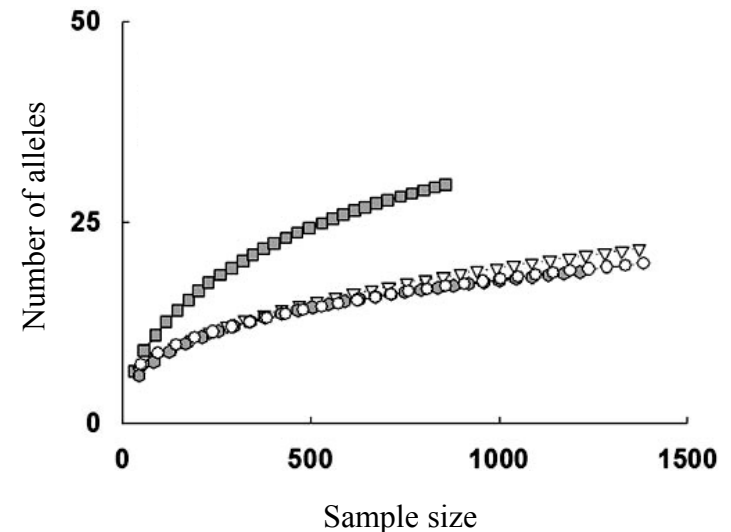
- počet alel na lokus

## Alelická bohatost (allelic richness)

- počet alel na lokus vztažený k velikosti vzorku (metodou „rarefaction“) - **FSTAT**

## Pozorovaná heterozygotnost (observed heterozygosity)

- průměrná četnost heterozygotů v jednotlivých lokusech



# Hardy-Weinbergova rovnováha (HWE)

= rozmístění alel do genotypů v rovnovážné populaci

| Alela | Četnost alely |
|-------|---------------|
| 170   | $p$           |
| 172   | $q$           |

Př. Jeden lokus se 2 alelami

$$p + q = 1$$

$p, q$  - zjistíme analýzou svých vzorků

| Genotyp | Očekávaná četnost genotypu |
|---------|----------------------------|
| 170/170 | $p^2$                      |
| 170/172 | $2pq$                      |
| 172/172 | $q^2$                      |

= Hardy-Weinbergova rovnováha  
( $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ )

- četnosti genotypů zjistíme analýzou svých vzorků
- odchylky od očekávaných četností  
⇒ **test HWE** (např.  $\chi^2$  test nebo exact probability test v Genepop)

Očekávaná heterozygotnost (expected heterozygosity,  $H_e$ ) při HWE  
 $H_e = 1 - (p^2 + q^2)$  ..... pro 1 lokus se 2 alelami s četností  $p$  a  $q$



# Předpoklady HWE

- náhodné párování (panmixia)
- zanedbatelný efekt mutací a migrací („closed populations“)
- nekonečně velká populace
- Mendelovská dědičnost použitých markerů
- neutrální znaky – žádná selekce
  
- znaky nejsou ve vazbě – kontrola na „linkage disequilibrium“ (vazebná nerovnováha; speciální test např. v **Genepop**)



2 lokusy ve fyzické blízkosti  
(snížená pravděpodobnost rekombinace  
linkage disequilibrium)

VS.



nebo



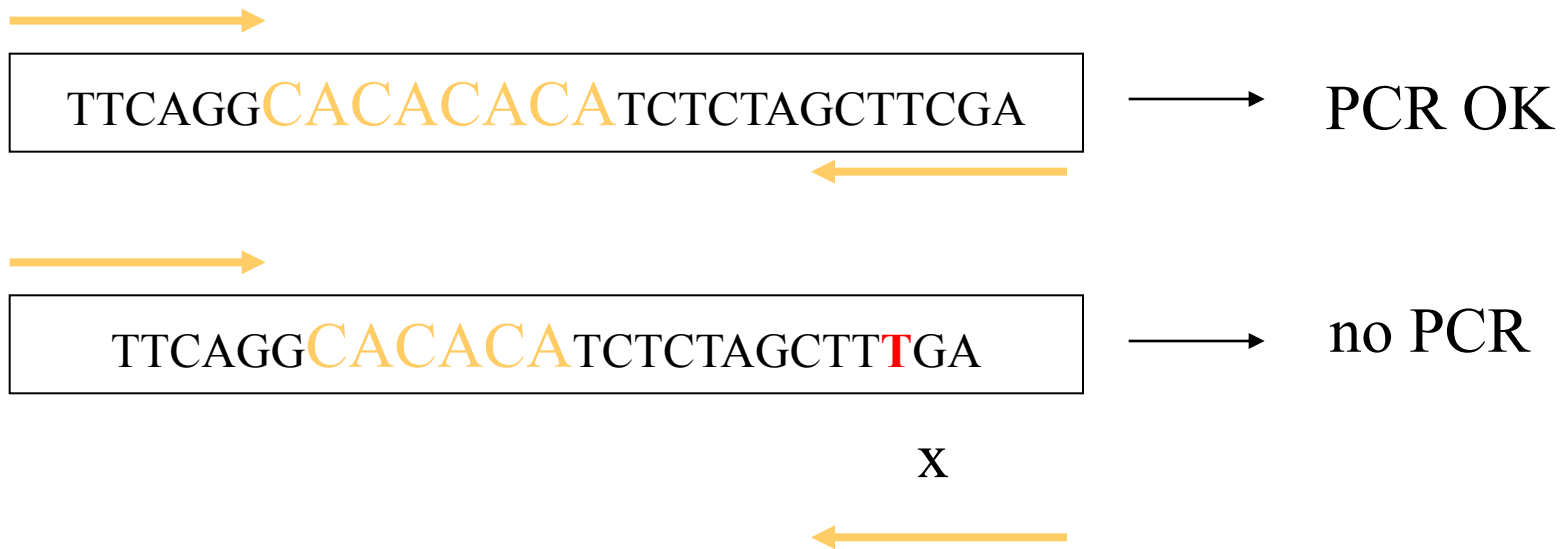
2 lokusy fyzicky vzdálené  
(pravděpodobnost rekombinace není ovlivněna  
linkage equilibrium)

# Odchylky od HW rovnováhy

- Test HWE – např. **Genepop** („exact probability tests“) – pokud jsou odchylky, tak některý předpoklad HWE nebyl splněn
- **nadbytek heterozygotů** = negativní asortativní páření (tj. cílené rozmnožování nepodobných jedinců) – použité lokusy mohou být výhodné v heterozygotním stavu (např. geny MHC)
- **nedostatek heterozygotů**
  - **inbreeding** (postihuje všechny lokusy stejně)
  - **vnitřní struktura** („Wahlundův efekt“)
  - **nulové alely** (jen na některých lokusech bude deficit heterozygotů) - FreeNA

# Null alleles

- nulové alely (mutace v primerových sekvencích) → vyšší proporce „homozygotů“



# Příklad - stanovení variability populace

| Jedinec    | Locus 1 | Locus 2           | Locus 3 | Locus 4 | Průměr       |
|------------|---------|-------------------|---------|---------|--------------|
| Ind 1      | 170/170 | 223/227           | 116/116 | 316/316 |              |
| Ind 2      | 170/172 | 223/225           | 112/112 | 316/316 |              |
| Ind 3      | 172/172 | 223/225           | 112/112 | 316/316 |              |
| Ind 4      | 170/172 | 223/227           | 112/112 | 316/316 |              |
| Počet alel | 2       | 3                 | 2       | 1       | <b>2</b>     |
| Ho         | 0,5     | 1,00              | 0       | 0       | <b>0,375</b> |
| p          | 0,5     | p = 0,5           | 0,75    | 1,00    |              |
| q          | 0,5     | q = 0,25 r = 0,25 | 0,25    | 0       |              |
| He         | 0,5     | 0,625             | 0,375   | 0       | <b>0,375</b> |

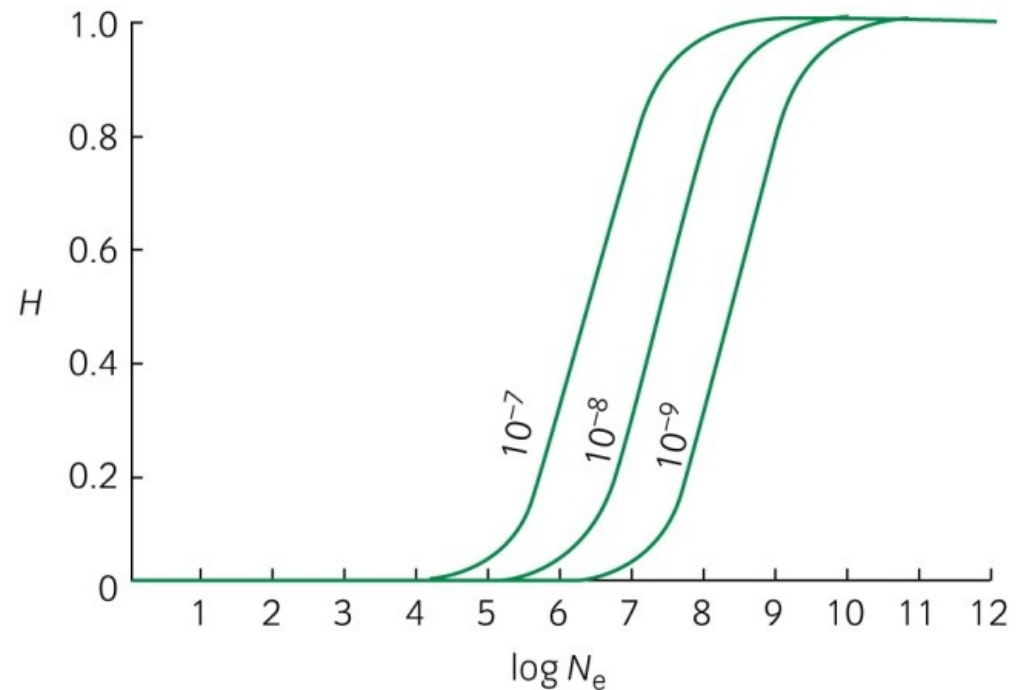
$$H_e = 1 - (p^2 + q^2)$$

Polymorfismus = 0,75

$$H_e = 1 - (p^2 + q^2 + r^2)$$

# Genetická variabilita ( $H_e$ ) jako ukazatel efektivní velikosti populace ( $N_e$ )

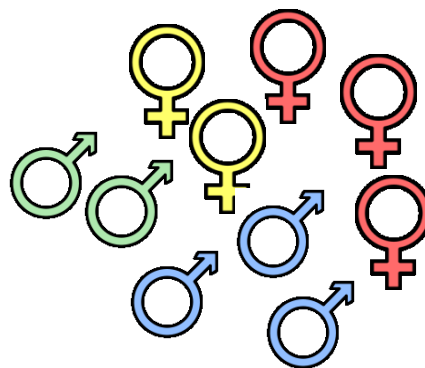
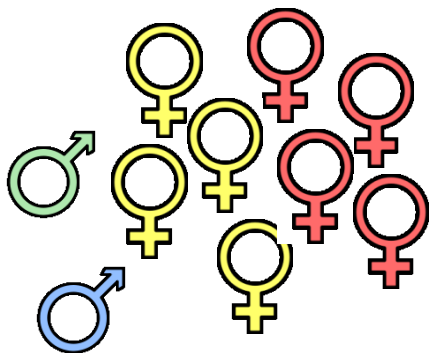
- neutrální genetická teorie:  
$$H_e = 4N_e\mu / [4N_e\mu + 1]$$
- mutation-drift equilibrium



Čím je populace větší, tím má vyšší genetickou variabilitu

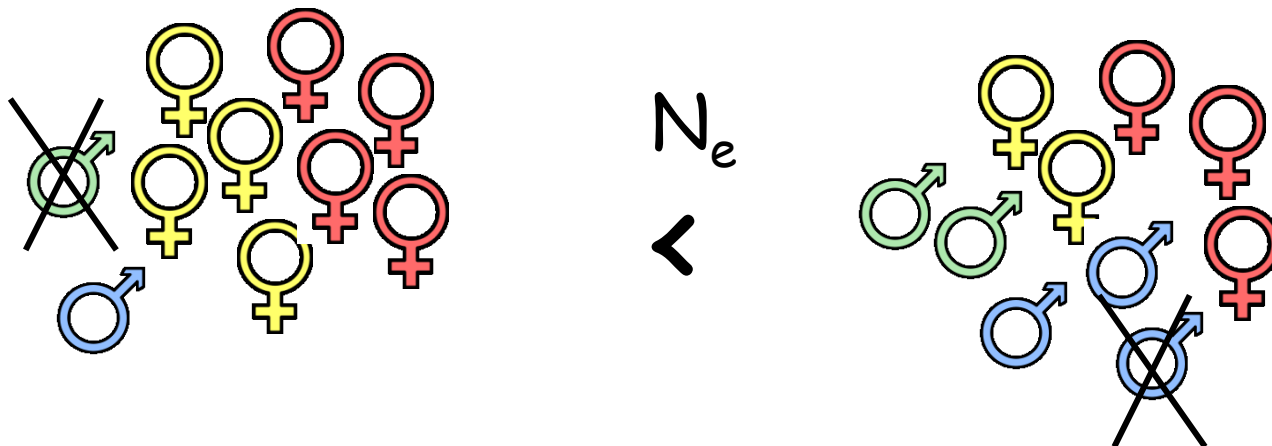
# Efektivní velikost populace ( $N_e$ )

- $N_e$  = velikost ideální populace (náhodné páření, rovnoměrný poměr pohlaví), která ztrácí genetickou diverzitu stejnou rychlostí jako aktuální populace (vlivem náhody)
- ovlivněna genetickou a věkovou strukturou, poměrem pohlaví, intenzitou příbuzenského křížení atd.



# Efektivní velikost populace ( $N_e$ )

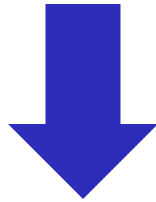
- $N_e$  = velikost ideální populace (náhodné páření, rovnoměrný poměr pohlaví), která ztrácí genetickou diverzitu stejnou rychlostí jako aktuální populace (vlivem náhody)
- ovlivněna genetickou a věkovou strukturou, poměrem pohlaví, intenzitou příbuzenského křížení atd.



- vývoj genetické variability v malých populacích závisí na  $N_e$  více než na  $N$

# Důsledky poklesu $N_e$

Pokles pozorované variability ( $H_e$  - odhadnuta z tzv. genetických znaků) = pokles  $N_e$



$$H_e = 4N_e\mu / [4N_e\mu + 1]$$

**Pokles adaptivní variability**



# „Budoucnost je v genech ...“

- Změny prostředí (např. klima, patogeny, aj.) → přizpůsob se nebo zmiz!
- Vysoká genetická variabilita znamená, že je zde více genetických variant, z nichž některé mohou být vhodné pro nové podmínky
- Populace s vyšší genetickou variabilitou mají „více losů v loterii“ (= **adaptivní potenciál**)

*Dryas octopetala* v Alpách,  
Německo. Photo: Steve Smith

