

# Molecular Ecology



ATGCCGATTACCACACAGCTAATGCC  
 GATTACCACACAGCTAATGCCGATTA  
 CCACACAGCTAATGCCGATTACCACA  
 CAGCTACTGATGGAAAGTCCTGCATC

# Co je molekulární ekologie?

Uměle vytvořený obor vymezený technickým přístupem. Na ekologické problémy hledá odpověď pomocí molekulárních metod.

*(Zoologové a botanici nakoupili cyklery a sekvenátory, snažili se je využít i k něčemu jinému než je taxonomie => vznikla molekulární ekologie)*

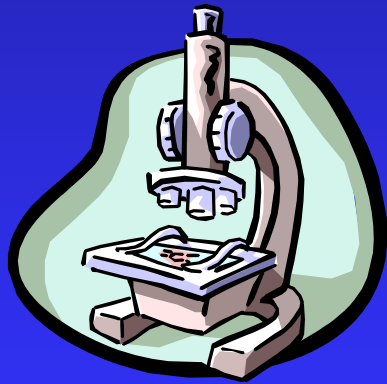
Pracuje na různých úrovních variability DNA (genom, jedinec, populace, skupina populací)

*Je to vlastně aplikovaná populační genetika*

# Proč?

**Problém:**  
zoologie, taxonomie  
ekologie, evoluce

**Molekulární metody:**  
analýza DNA



**klasické  
metody**  
morfologická,  
ekologická,  
bionomická  
data

**molekulárně  
-genetická  
data**



**Nový rozměr poznání**

# Proč používat molekulární metody v ekologii?

- Čast
- pater
- ident
- druh
- izola
- počer

Research areas of interest to *Molecular Ecology* include:

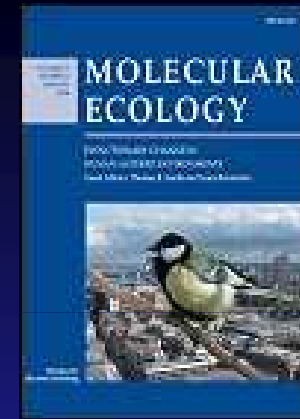
- population structure and phylogeography
- reproductive strategies
- relatedness and kin selection
- sex allocation
- population genetic theory
- analytical methods development
- conservation genetics
- speciation genetics
- microbial biodiversity
- evolutionary dynamics of QTLs
- ecological interactions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

vést k oplození

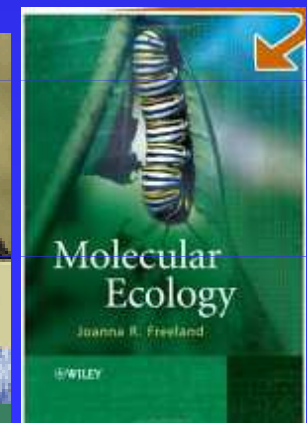
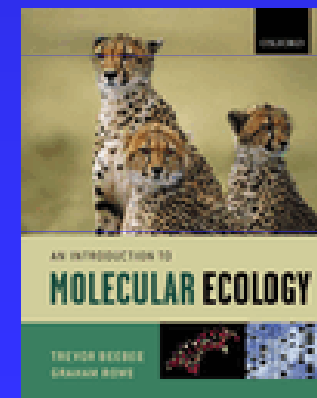
nců skrytě žijících

techny jedince

# Její význam vzrůstá ...

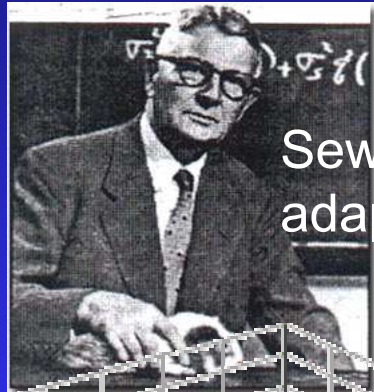


- Je překvapivě kompaktní
- Je populární - Molecular Ecology (od 1992) – dnes 24 čísel za rok
- ISI Journal Citation Reports® Ranking - 2006: 6/114 in Ecology; 5/34 in Evolutionary Biology; 55/262 in Biochemistry & Molecular Biology; Impact Factor: 4.825
- Vyšly i její učebnice
- Na řešení velmi odlišných problémů používá obdobné metody
- *Snad se dá tedy i přednášet ...*

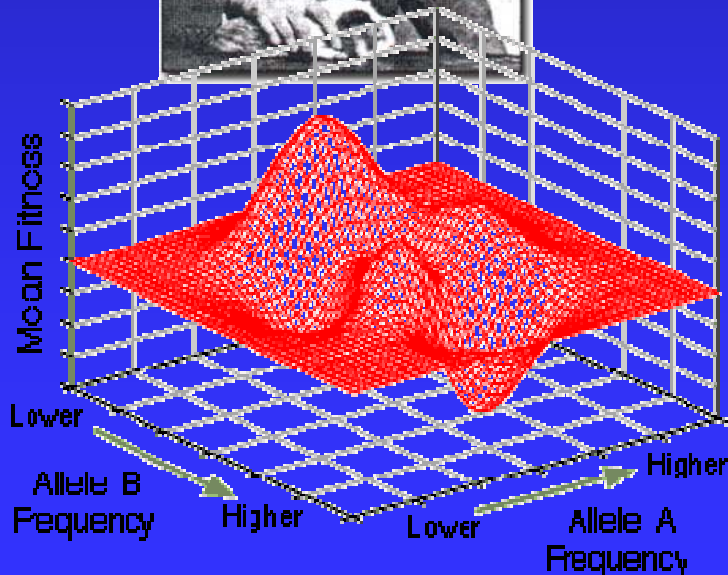


# Vychází z populační genetiky

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



Sewall Wright  
adaptivní krajina



Ronald  
Fisher



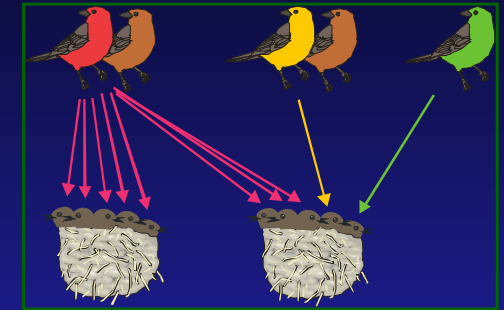
J. B. S. Haldane



# Obsah přednášky

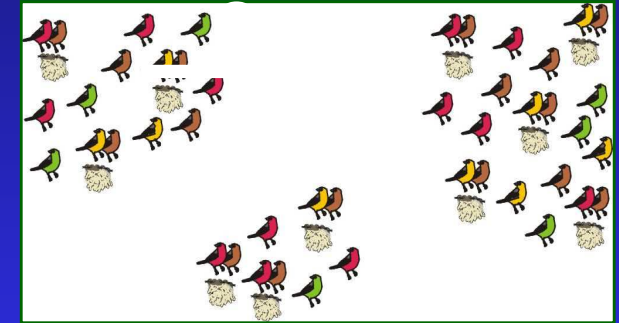
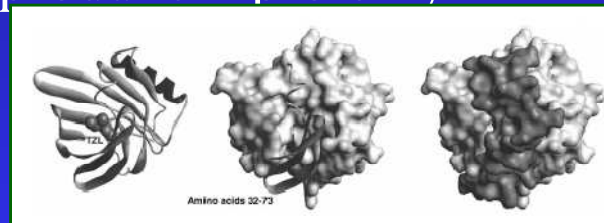
## ■ Příbuznost (neutrální znaky)

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

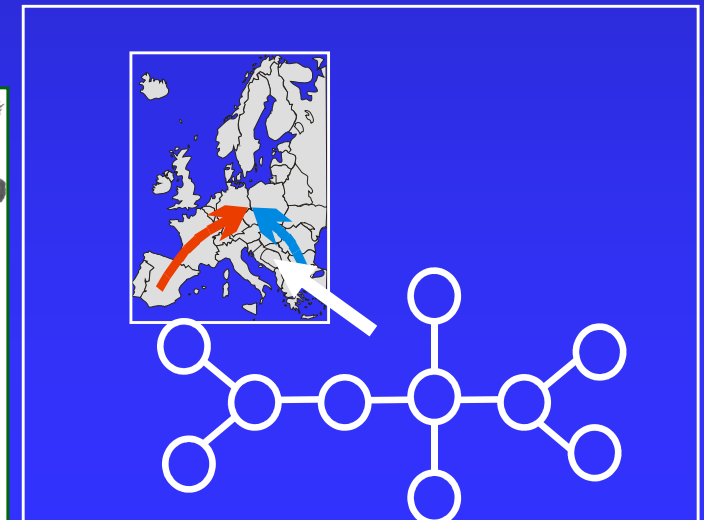
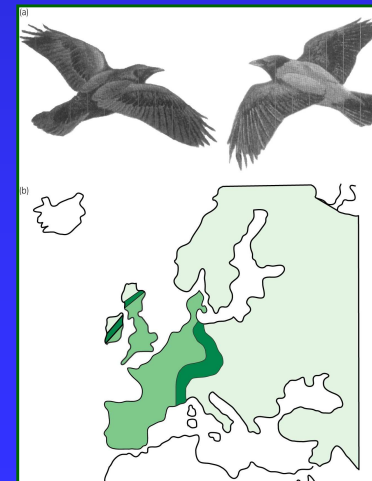
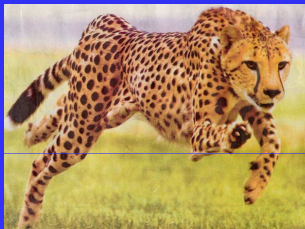


## ■ Geny pod selekcí

- ◆ MHC, MUP, ABP, reprodukční proteiny
- ◆ geny pro zbarvení

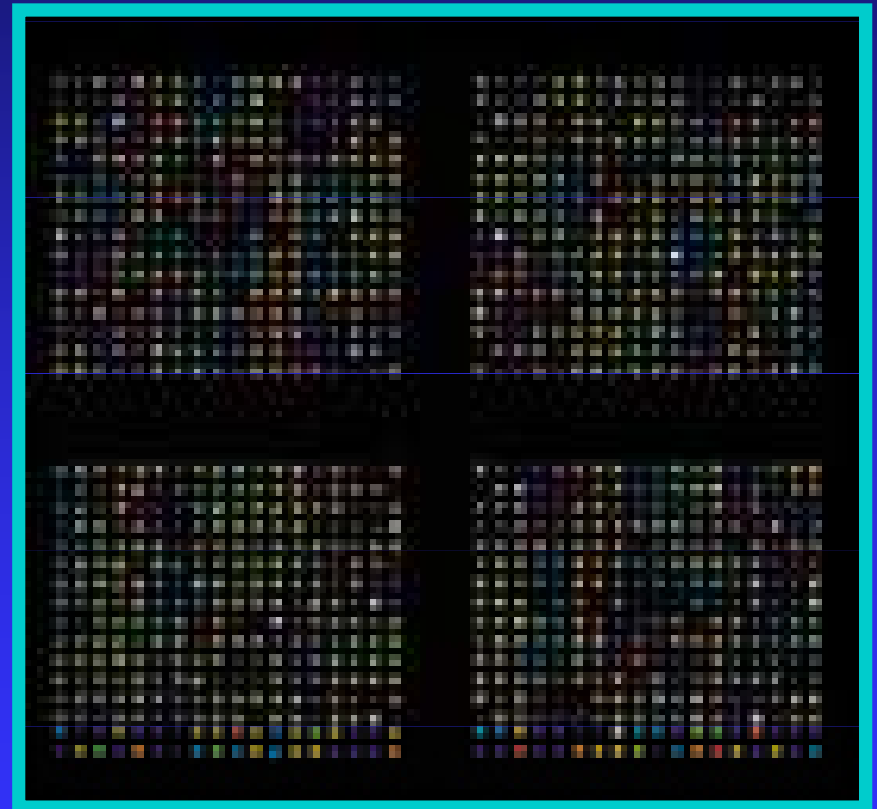


## ■ Ochranařská genetika



# Technické výlety

- PCR
- Mikrosatelity
- Mitochondriální DNA
- Transposony
- DNA arrays
- DHPLC
- Fylogenetické metody





# Organismy

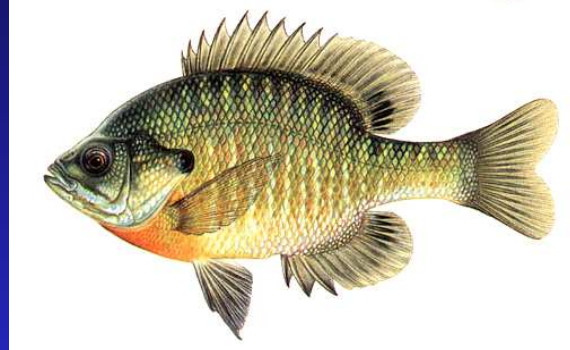


✓ Diploidní s pohlavním rozmnožováním

✓ Většinou obratlovci

✓ Budou ale i třeba motýli nebo slávky

✓ Rostliny fungují často jinak!  
Ale určitě i o nich bude řeč.

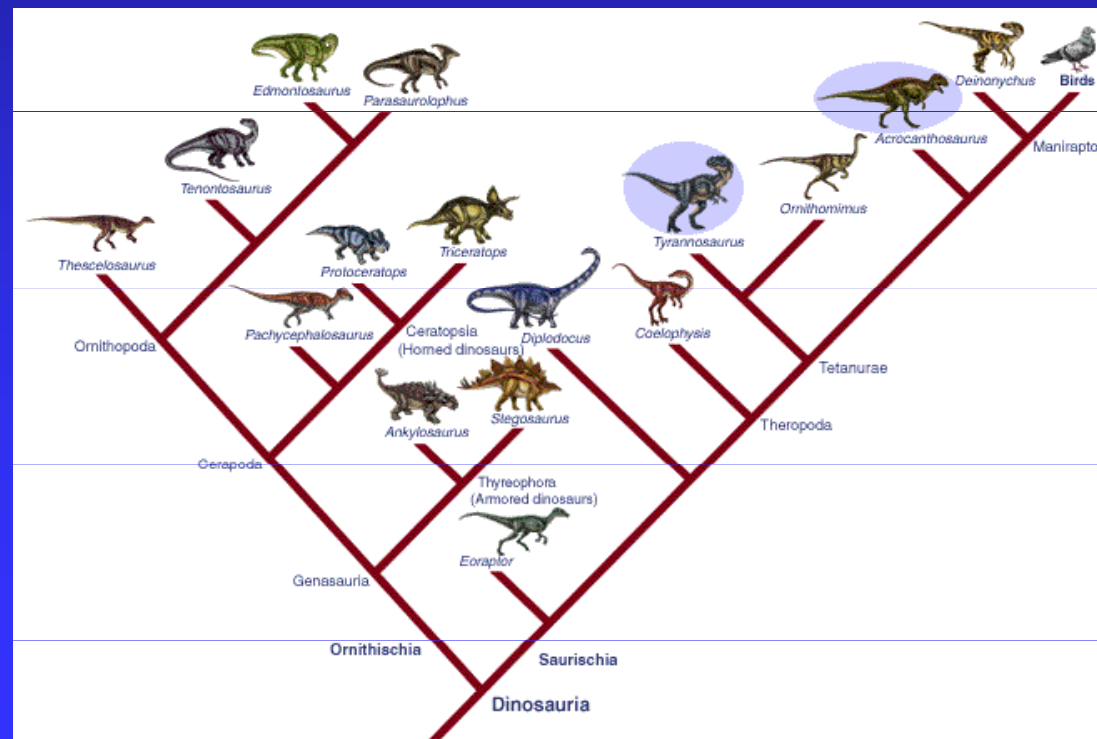


# Příbuzné přednášky, tj. co se zde objeví jen okrajově?

- M. Macholán a kol. - Genetické metody v zoologii
- M. Macholán - Evoluční biologie
- J. Zukal – Behaviorální ekologie
- S. Pekár – Ekologie populací
- aj. (molekulární ekologie „prorůstá všude“)

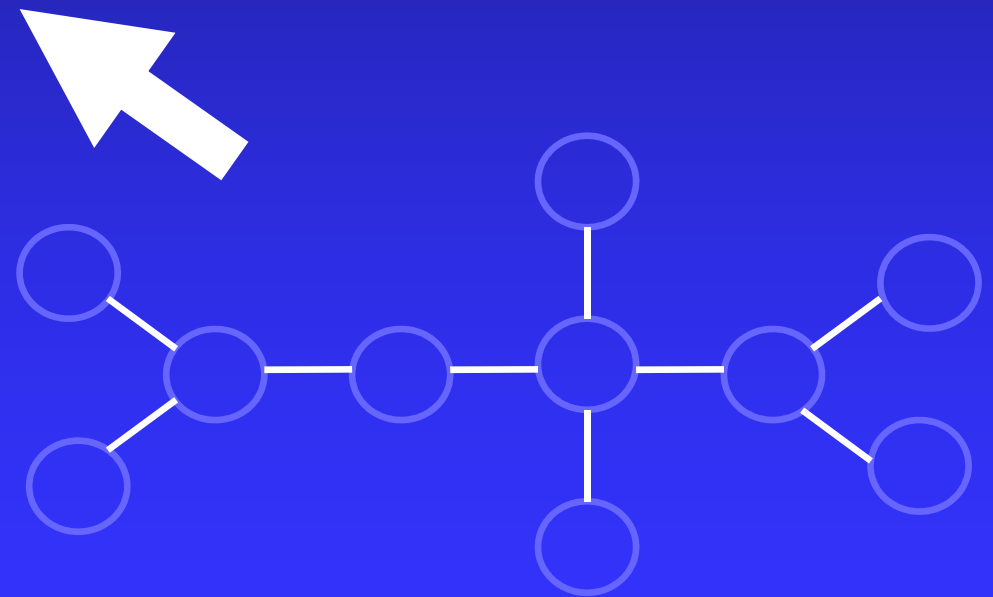
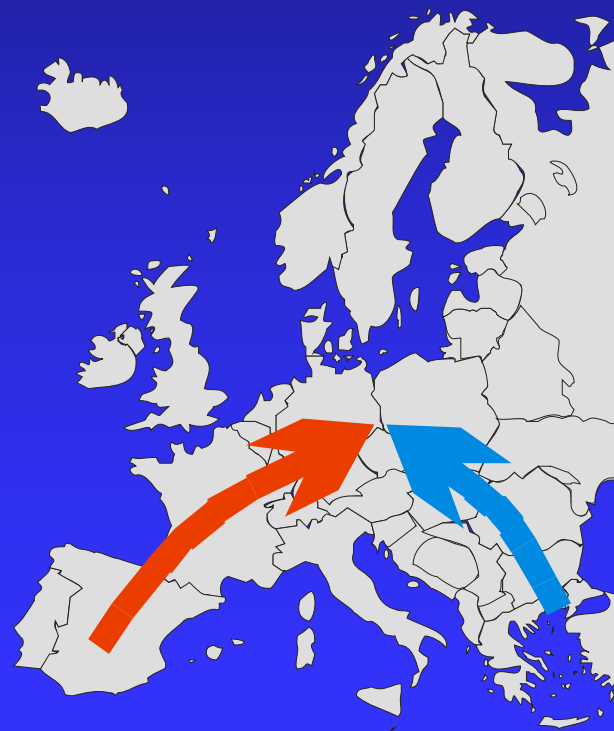
# Úrovně variability DNA

- **druh** – fylogenetické analýzy  
(fylogenetická systematika, identifikace druhů)



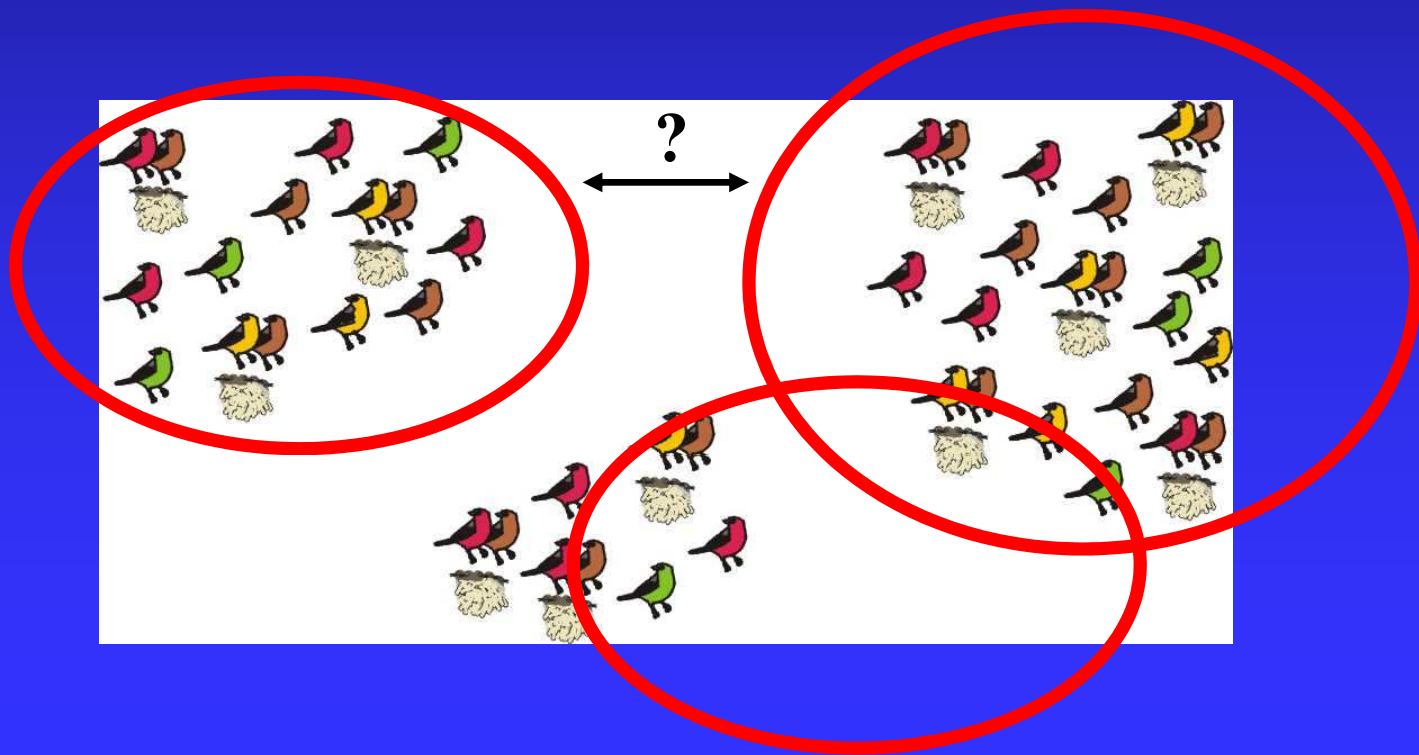
# Úrovně variability DNA

- **populace** – studium speciace, fylogeografie



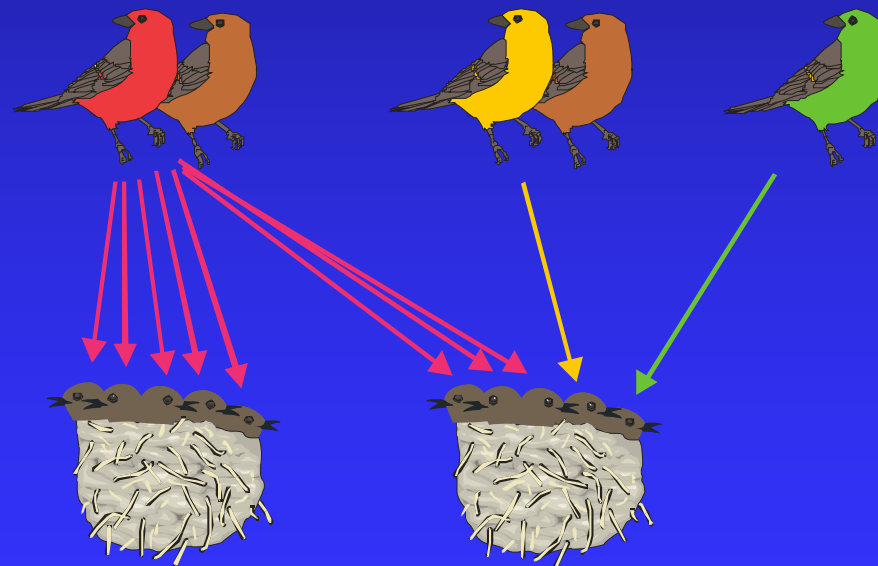
# Úrovně variability DNA

- **populace** – populační biologie, ochranářská genetika)



# Úrovně variability DNA

- **jedinec** – analýzy příbuznosti  
(behaviorální ekologie, např. analýzy paternity)



# Genetické markery

## ■ Coding DNA (genes)

- transcribed sequences
- genetic code
- phenotype
- natural selection
- increasing importance in molecular ecology

## ■ Non-coding DNA

- not functional (not known function)
- neutral to natural selection
- majority of DNA in eukaryotes
- pseudogenes
- repetitive DNA

# Repetitive DNA

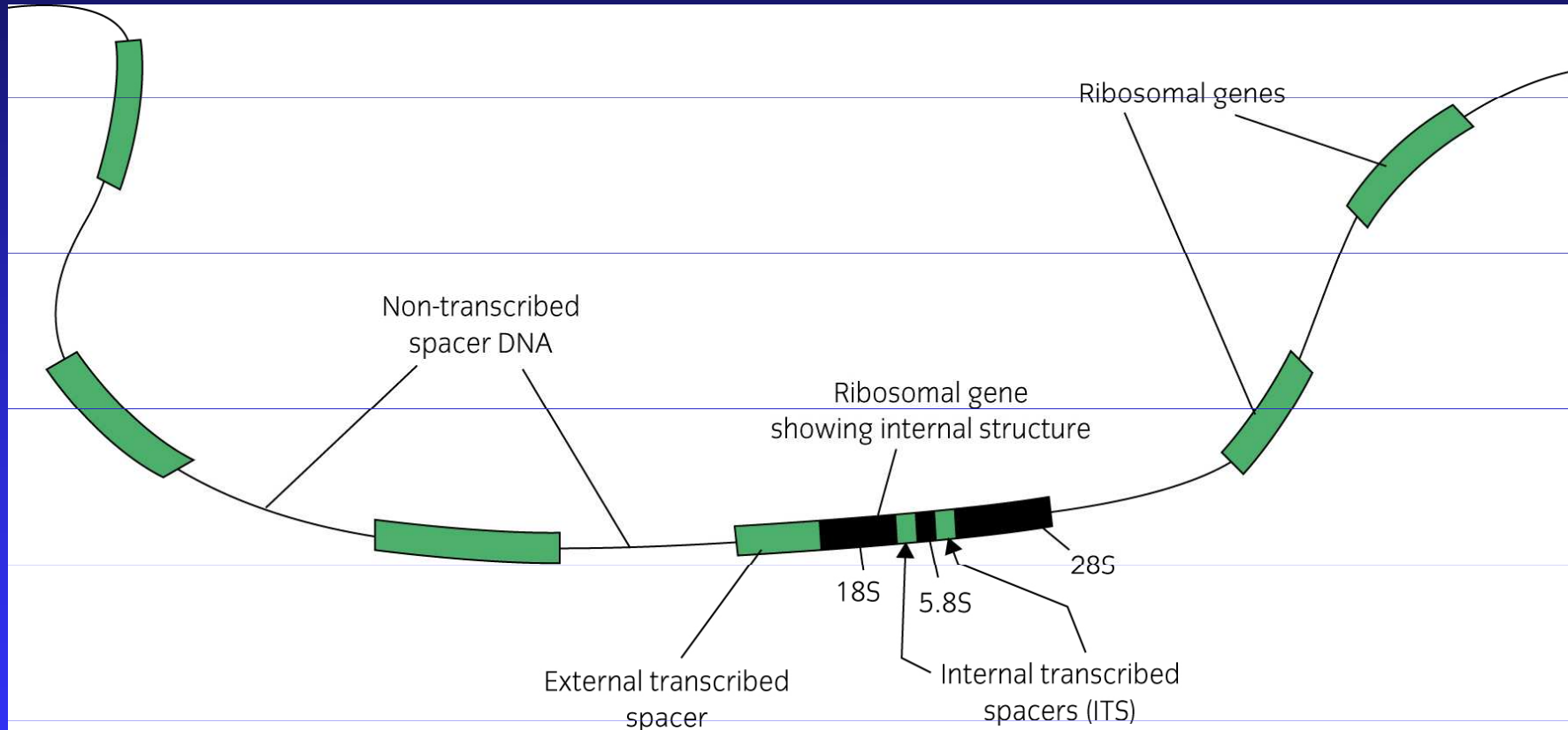
DNA	Typical sequence length (bp)	Location
Satellites (>10 <sup>6</sup> repeats/genome)	5-100	Tandem arrays, scattered throughout the genome
Minisatellites (>10 <sup>3</sup> loci/genome)	20-300	Tandem arrays up to 5 kb in length, scattered throughout the genome
Microsatellites (>10 <sup>4</sup> loci/genome)	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 <sup>5</sup> /genome)	50-500 (100-300)	Interspersed throughout the genome
LINEs (>10 <sup>3</sup> /genome)	1-5 k	Interspersed throughout the genome



# Coding (functional) DNA

- study of selection
  - codon third position is highly redundant and is not under selection
- 1) ribosomal DNA
  - 2) nuclear structural (protein coding) genes
  - 3) mitochondrial DNA

# 1. Ribosomal DNA

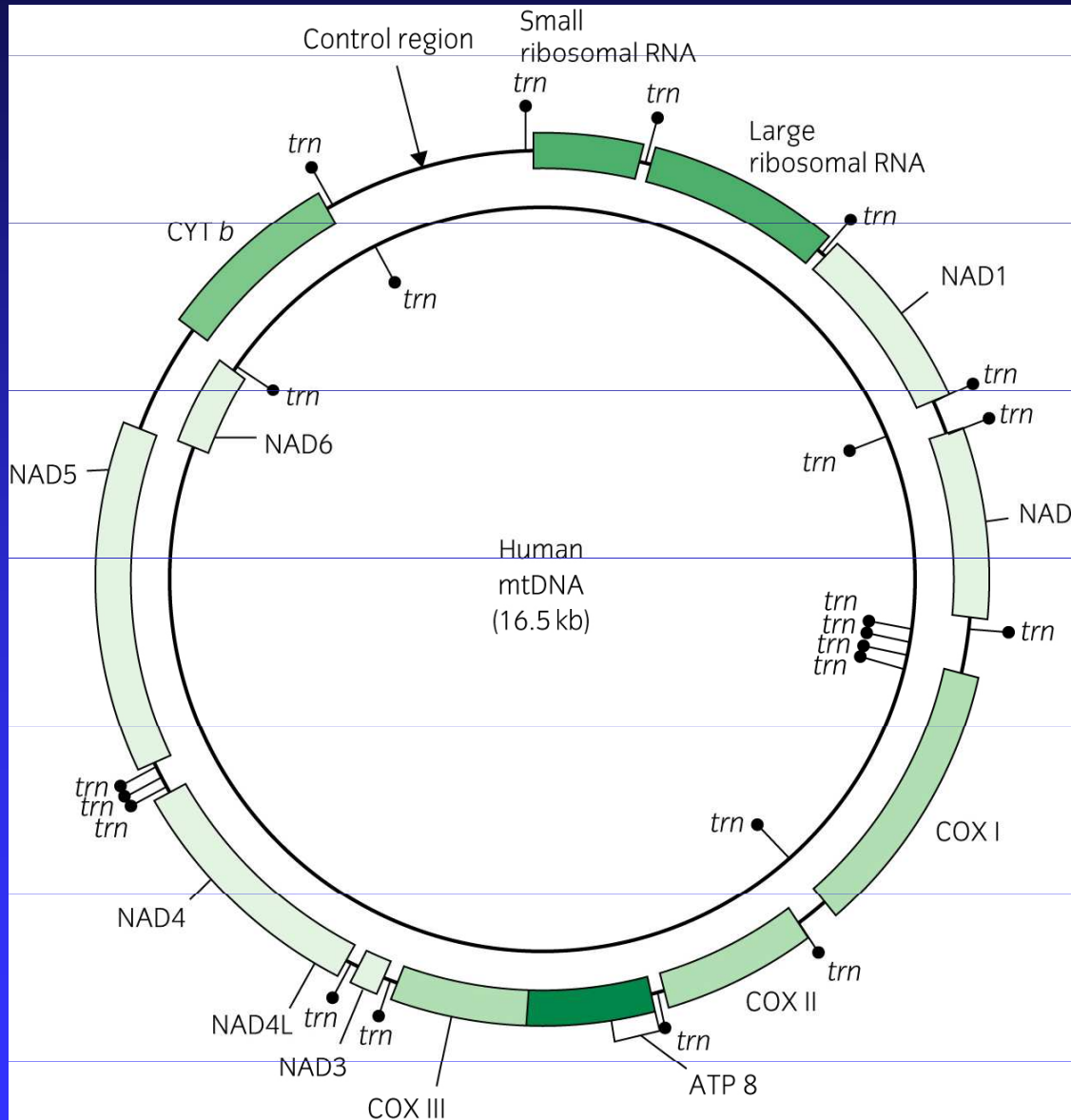


- genes for ribosomal RNA – repeated clusters in eukaryotes
- 16S, 23S, and 5S – single copy cluster in prokaryotes
- rDNAs – phylogeny, ITS – population structure

## 2. Nuclear structural genes

- low individual variation – important function (not very often used in molecular ecology) – allozymes
- MHC variation
- SNPs – renewed interest in nuclear structural genes

# 3. Mitochondrial DNA



14 kbp (*Caenorhabditis*)  
42 kbp (*Placopecten*)

- maternally inherited (?)
- no recombination (?)
- phylogeography
- « numts » nuclear copies of mtDNA
- multiple copies

Saccone et al. 2001

# „Molekulárně-genetické“ metody

- analýza polymorfismu DNA
- konzervativní vs. variabilní úseky (« loci »)
- sekvenční polymorfismus:

CGCATCTCTAGCTT**C**GATTCAGGAA

CGCATCTCTAGCTT**T**GATTCAGGAA

# „Molekulárně-genetické“ metody

- analýza polymorfismu DNA
- konzervativní vs. variabilní úseky (« loci »)
- sekvenční polymorfismus
- délkový polymorfismus

CG**CACA**TCTCTAGCTTCGATTCAGGAA

CG**C**ATCTCTAGCTTTGATTCAGGAA

# Vznik DNA polymorfismu

- mutace (transice, transverze, inzerce, delece)
- rekombinace (kombinace změn vzniklých mutacemi, duplikace a delece při rekombinačních chybách)
- transpozice
- $\Rightarrow$  general molecular biology

# Genotypizace – stanovení genotypu

- stanovení formy určitého úseku DNA (alely, haplotypu)
  - 1) izolace celkové DNA z tkání
  - 2) amplifikace požadovaného úseku DNA (PCR)
  - 3) studium variability daného úseku (lokus)

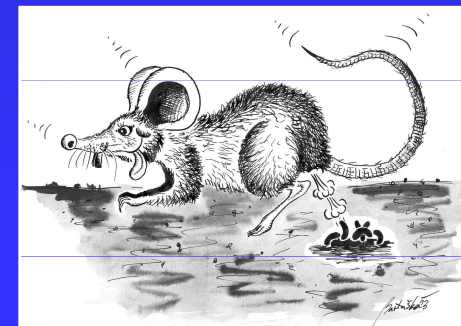
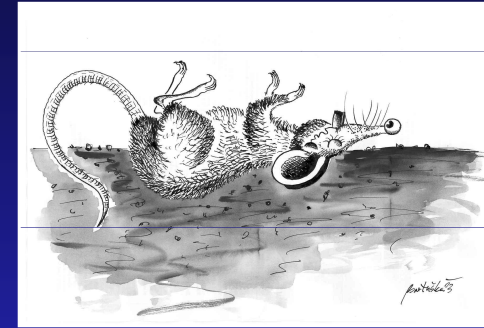


# Izolace DNA

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

# 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 odchyty, manipulace či dokonce pozorování



# Fixace materiálu

+

- čerstvá tkáň
- čistý EtOH
- rychlé vysušení
- speciální extrakční pufry
- zamražení

-

- formaldehyd
- opakované zamražování
- rozvlhčování sušeného materiálu
- další fixační média

■ speciální metody pro izolaci ze subrecentního materiálu (mamuti, hmyz v jantaru, neandrtálci apod.)

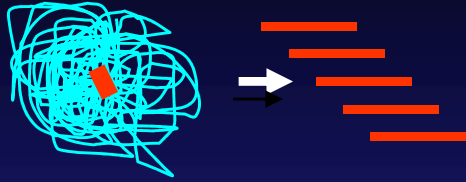
# PCR

Polymerase chain reaction

(jak z málo DNA udělat hodně)

# Amplifikace DNA – PCR

Druh	Velikost genomu (bp)	Počet chromozómů (1n)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	$8,0 \times 10^7$	4
<i>Drosophila melanogaster</i>	$1,65 \times 10^8$	4
<i>Xenopus laevis</i>	$3,0 \times 10^9$	18
<i>Mus musculus</i>	$3,0 \times 10^9$	20
<i>Homo sapiens</i>	$3,0 \times 10^9$	23



# 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.



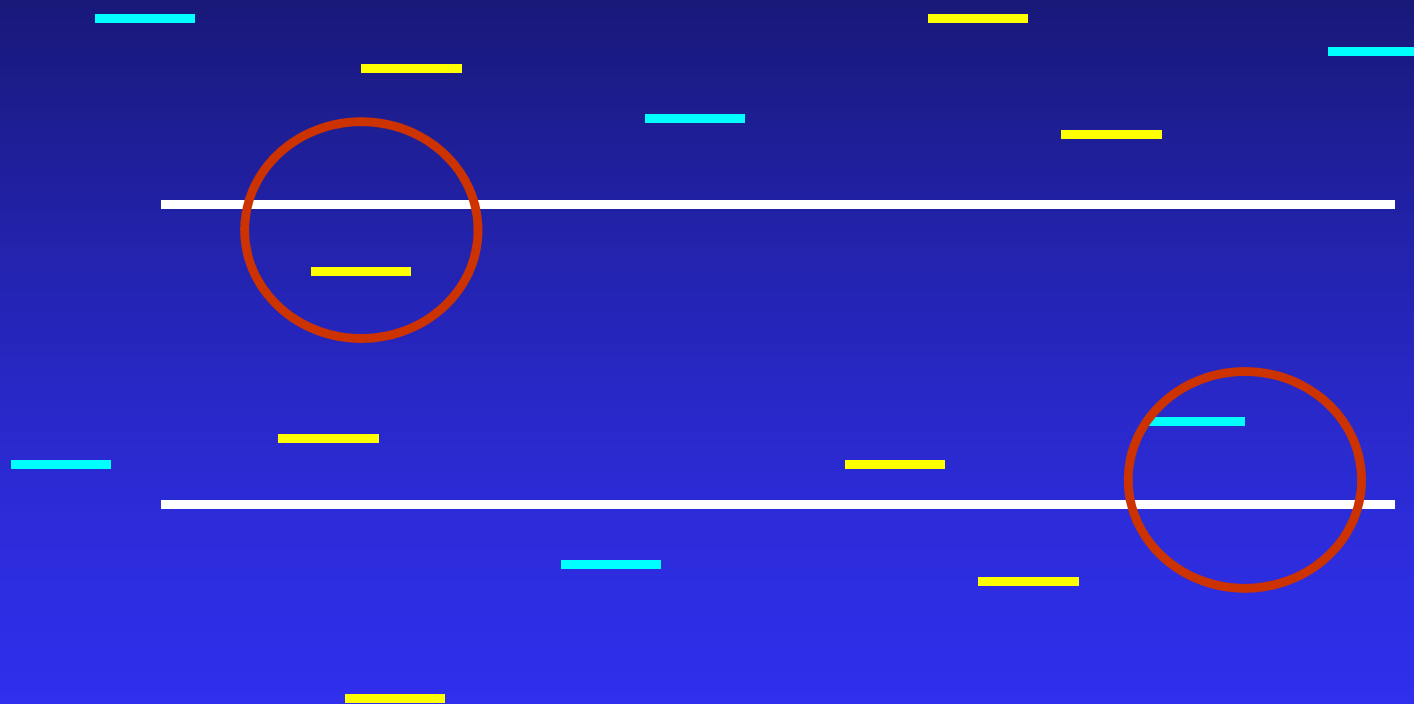
# Denaturace (obvykle 95°C)

při zvýšení teploty se oddělí komplementární vlákna DNA



Při ochlazení dojde k reasociaci

Primery přidané v nadbytku kmitají díky Brownově pohybu



Některé se dostanou do blízkosti komplementárních míst

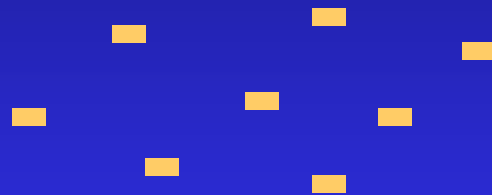


Při ochlazení primery přisednou rychleji než dojde k vzájemné reasociaci dlouhých vláken DNA (obvykle 50 - 65°C) – „annealing“



V úseku mezi primery zůstanou vlákna DNA oddělena

**Primery jsou prodlužovány** přidáváním nukleotidů  
podle sekvence templátu (obvykle 72°C – optimum pro *Taq* polymerázu)



Při dalším zahřátí dojde k oddělení templátu a nově vzniklých vláken



Po ochlazení primery přisednou na templát i nově vzniklé fragmenty („annealing“)



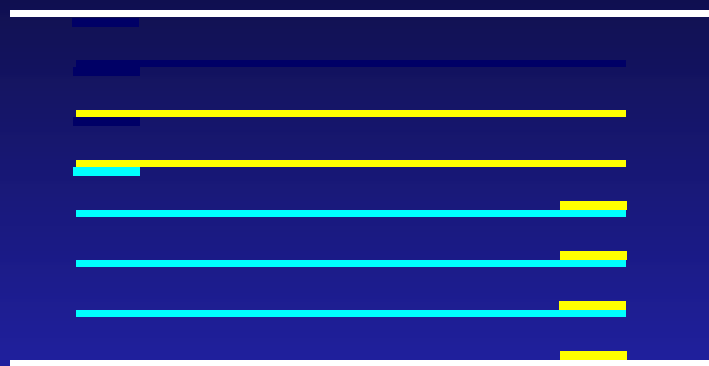
Při 72°C dojde opět k prodlužování primerů a vzniku nových kopií



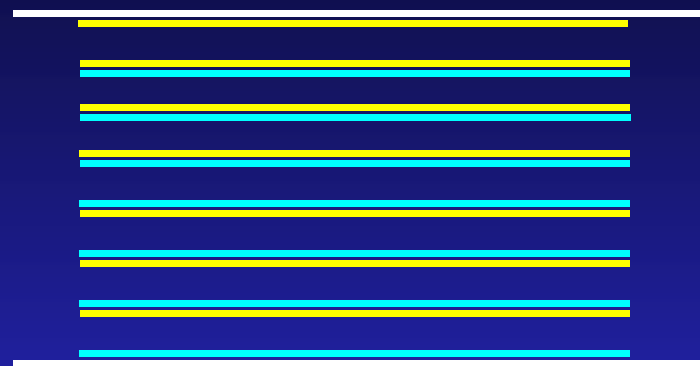
Při dalším zahřátí...



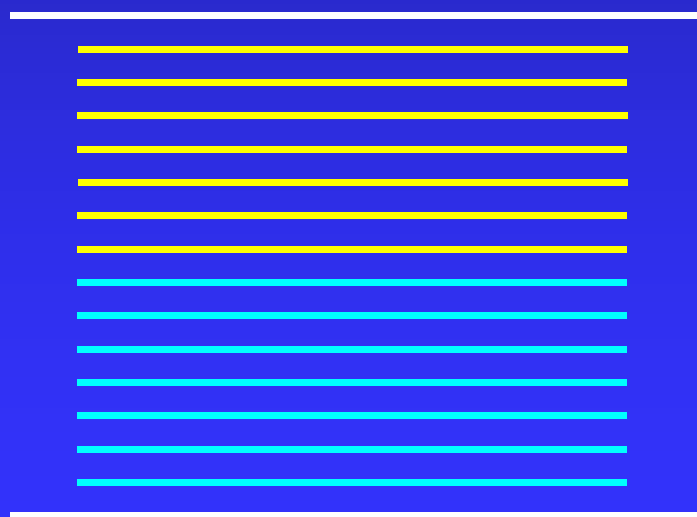
Ochlazení – nasednutí primerů



72°C vznik nových fragmentů



95°C denaturace



# 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 prodloužená 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

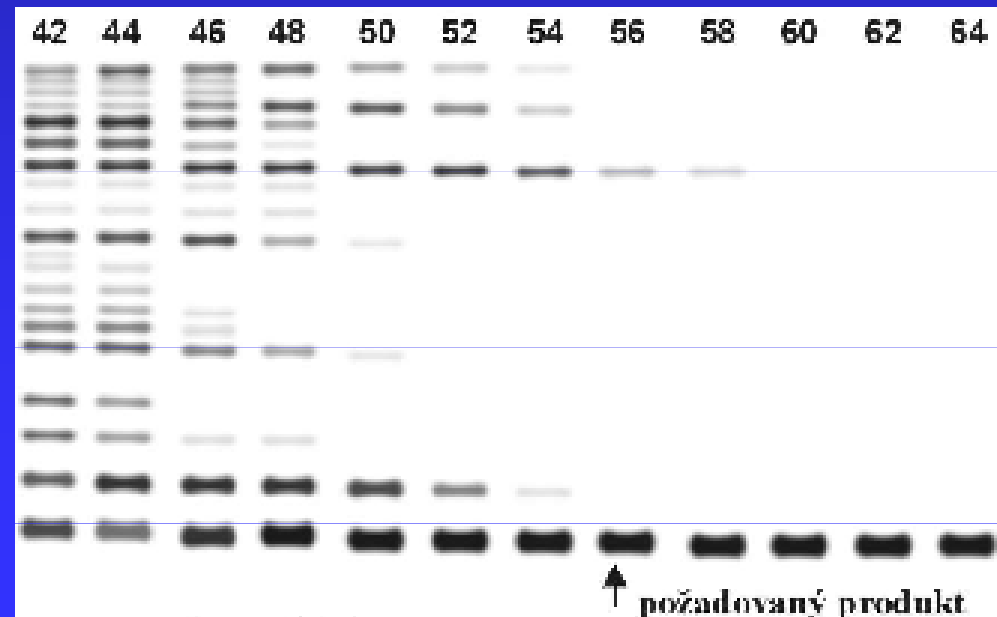
72°C 10 min





# Co když PCR nefunguje?

- Měníme teplotu „annealingu“ (nejlépe použijeme gradient teplot, pokud to náš cykler umí)  
Vyšší teplota=vyšší specifita
- Měníme koncentraci  $Mg^{2+}$  iontů
- Navrhujeme nové primery



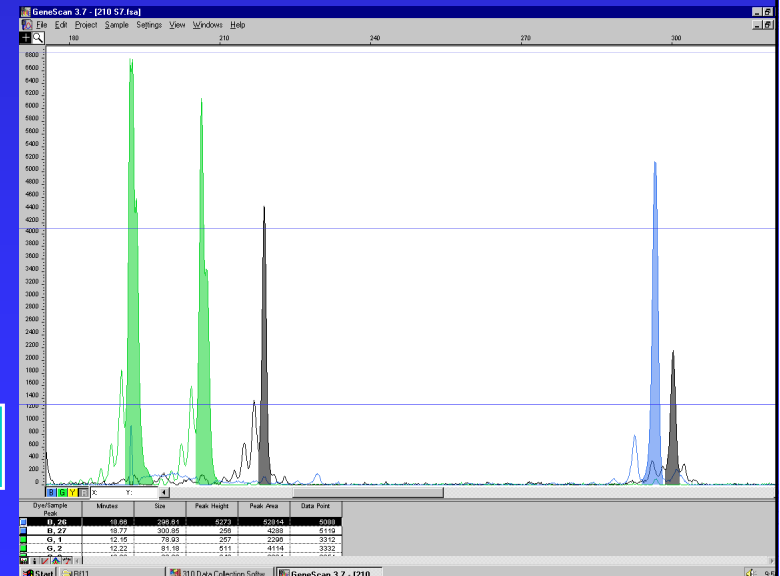
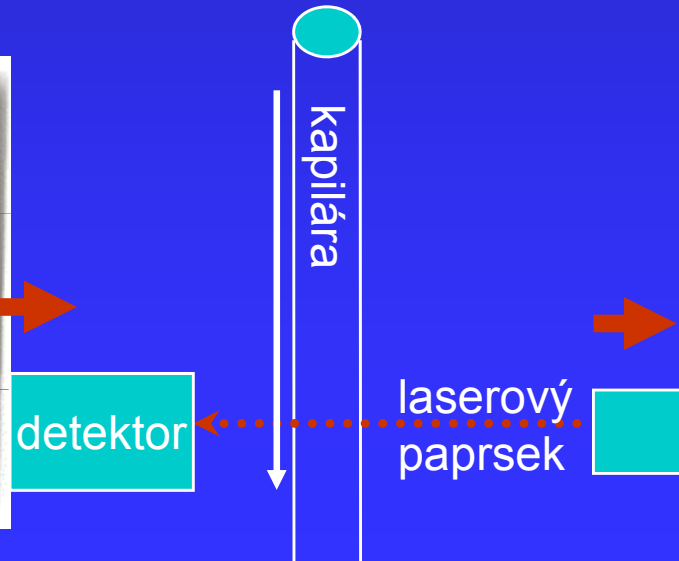
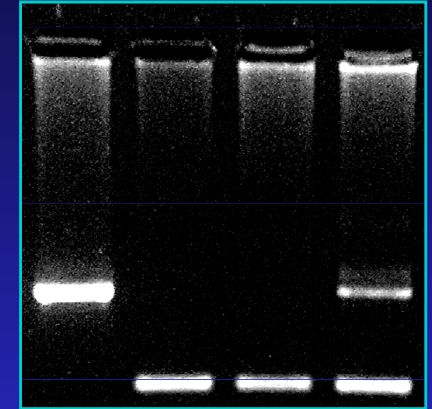
# Studium variability nasyntetizovaného úseku

## 1) **délkový polymorfismus**

- elektroforéza

# 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)



# Studium variability nasyntetizovaného úseku

## 2) sekvenční polymorfismus

- +/- analýza (elektroforéza)
- sekvencování
- SNP („single nucleotide polymorphism“) analýza

- použitá metoda analýzy PCR produktu závisí na typu markeru