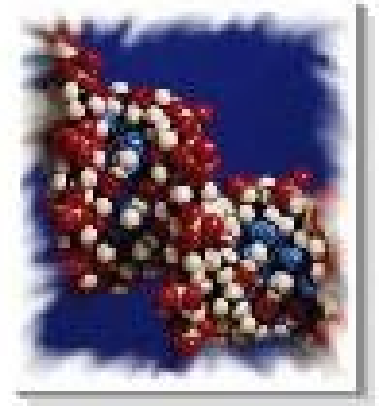


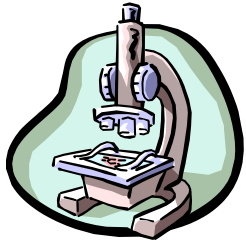
# Molecular Ecology



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Co je molekulární ekologie?

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



Klasické ekologické problémy a metody

+



Molekulárně-genetické metody

*(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 používat molekulární metody v ekologii?

- Často nelze
- paternita
- identifikace
- izolace po
- počet mig

Research areas of interest to *Molecular Ecology* include:

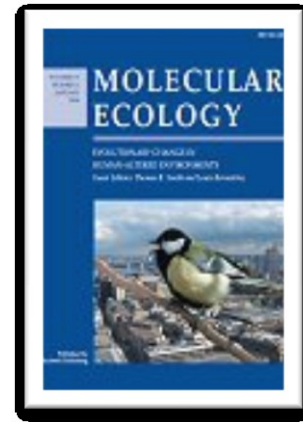
- population structure and phylogeography
- reproductive strategies
- relatedness and kin selection
- sex allocation
- population genetic theory
- analytical methods development
- conservation genetics
- speciation genetics
- microbial biodiversity
- evolutionary dynamics of QTLs
- ecological interactions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

oplození

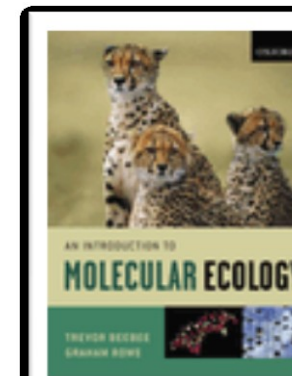
rtě žijících druhů

jedince

# Její význam vzrůstá ...



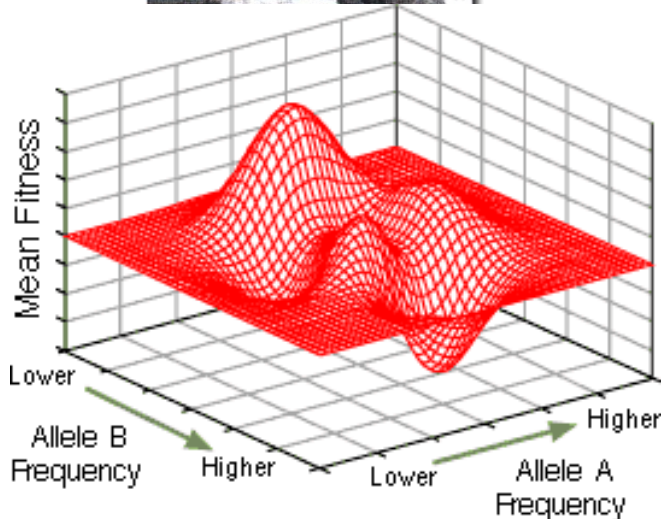
- Je překvapivě kompaktní
- Je populární - Molecular Ecology (od 1992) – dnes 24 čísel za rok
- ISI Journal Citation Reports® Ranking - 2008: 6/124 in Ecology; 5/39 in Evolutionary Biology; 46/276 in Biochemistry & Molecular Biology; Impact Factor: 5.325
- Vyšly i její učebnice
- Na řešení velmi odlišných 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

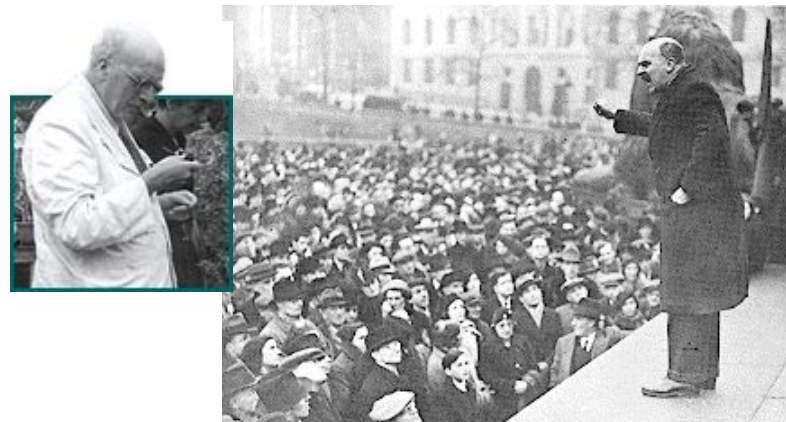
Sewall Wright  
adaptivní krajina



Ronald  
Fisher



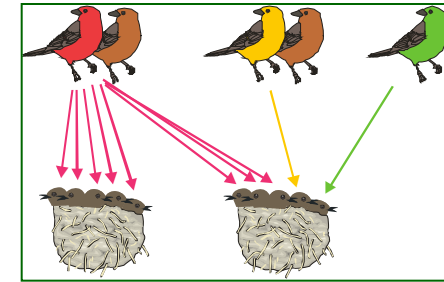
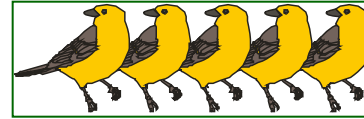
J. B. S. Haldane



# Obsah přednášky

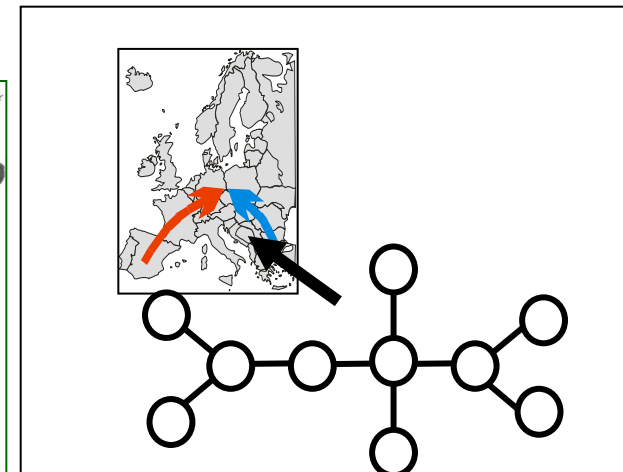
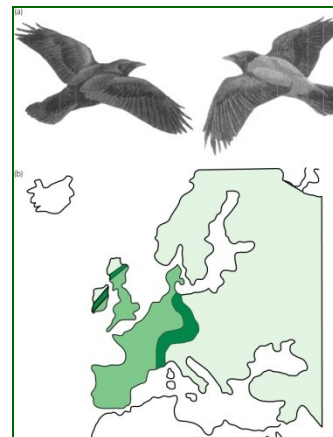
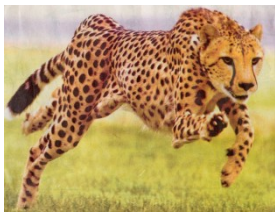
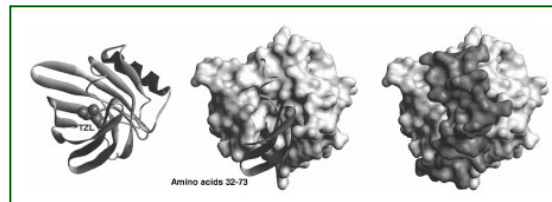
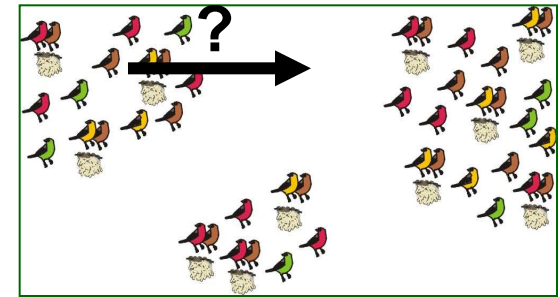
## Příbuznost (neutrální znaky)

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

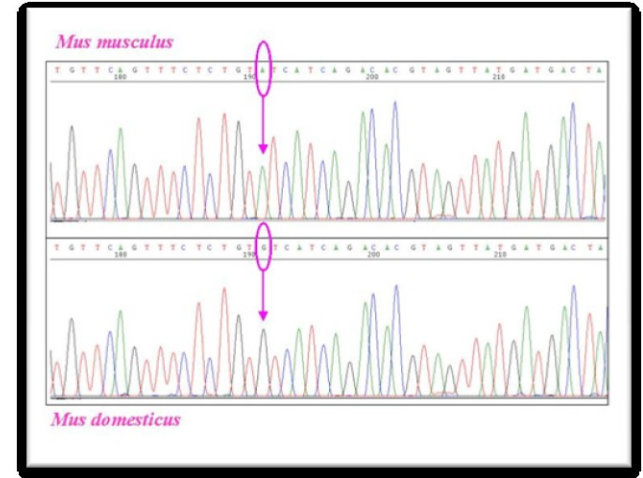
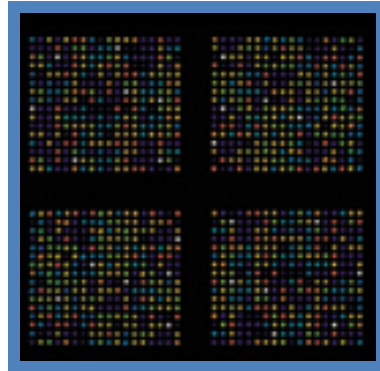
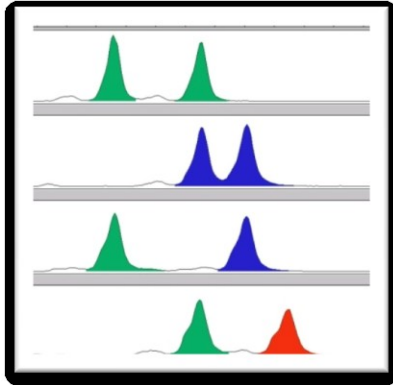


## Geny pod selekcí

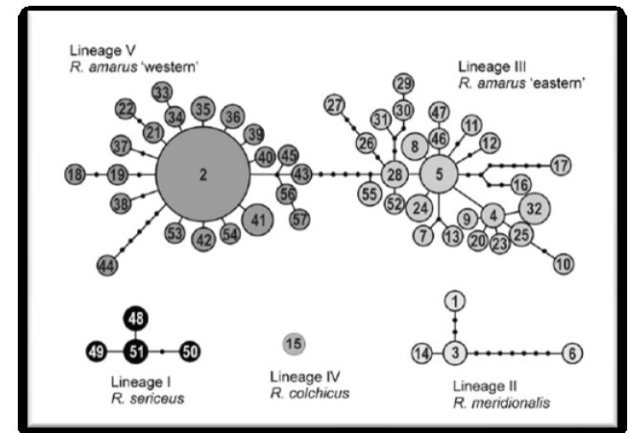
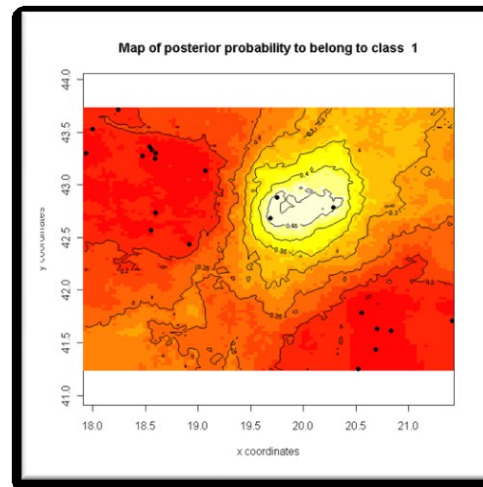
- MHC, MUP, ABP, reprodukční proteiny
- geny pro zbarvení

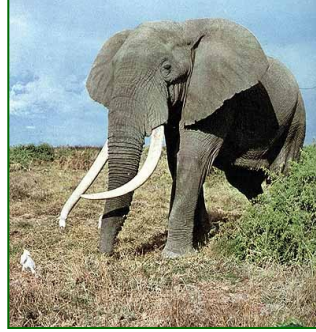


# Technické výlety (omezeně)



## Analýza dat





✓ 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?

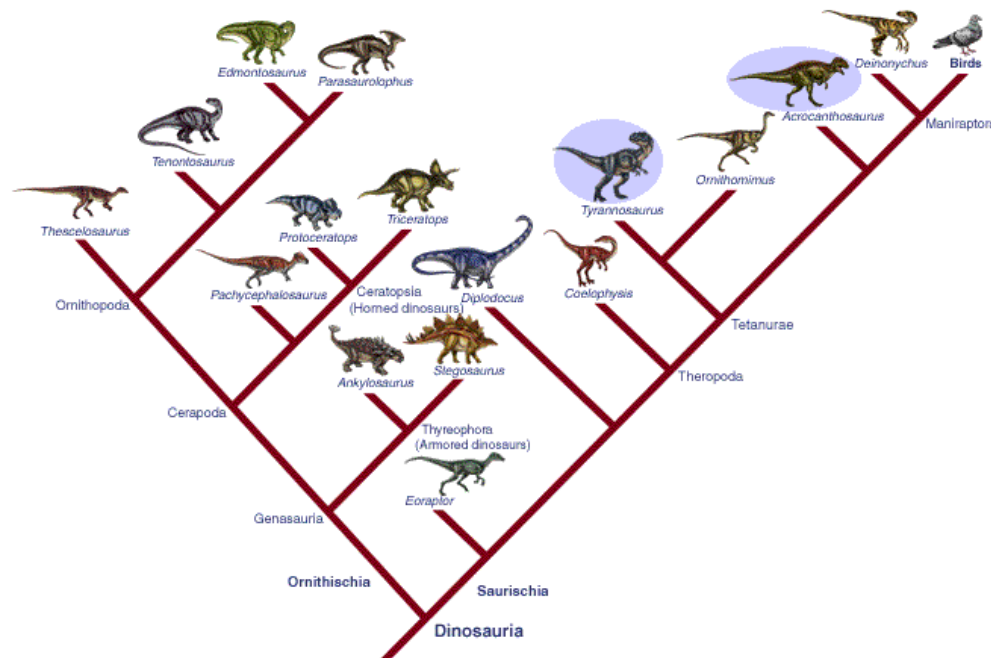
- M. Macholán, J. Bryja - Genetické metody v zoologii
- M. Macholán - Evoluční biologie
- J. Zukal – Behaviorální ekologie
- S. Pekár – Ekologie populací
- aj. (molekulární ekologie „prorůstá všude“)

# Kolokvium

- Zpracování review a prezentace na určité téma
- Proč (problém) – Jak (metody) – Příklad
- Např. Analýzy paternity: EPC – mikrosatelity (CERVUS) – posun v náhledu na párovací systém u pěvců

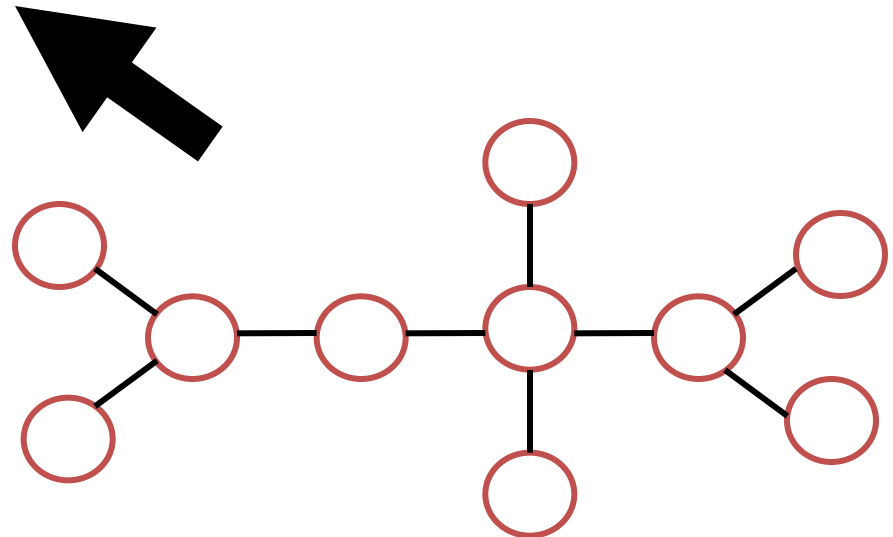
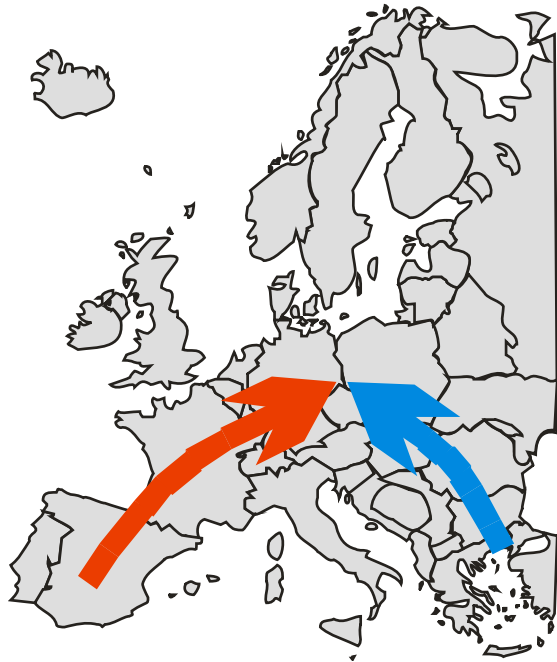
# Úrovně variability DNA

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



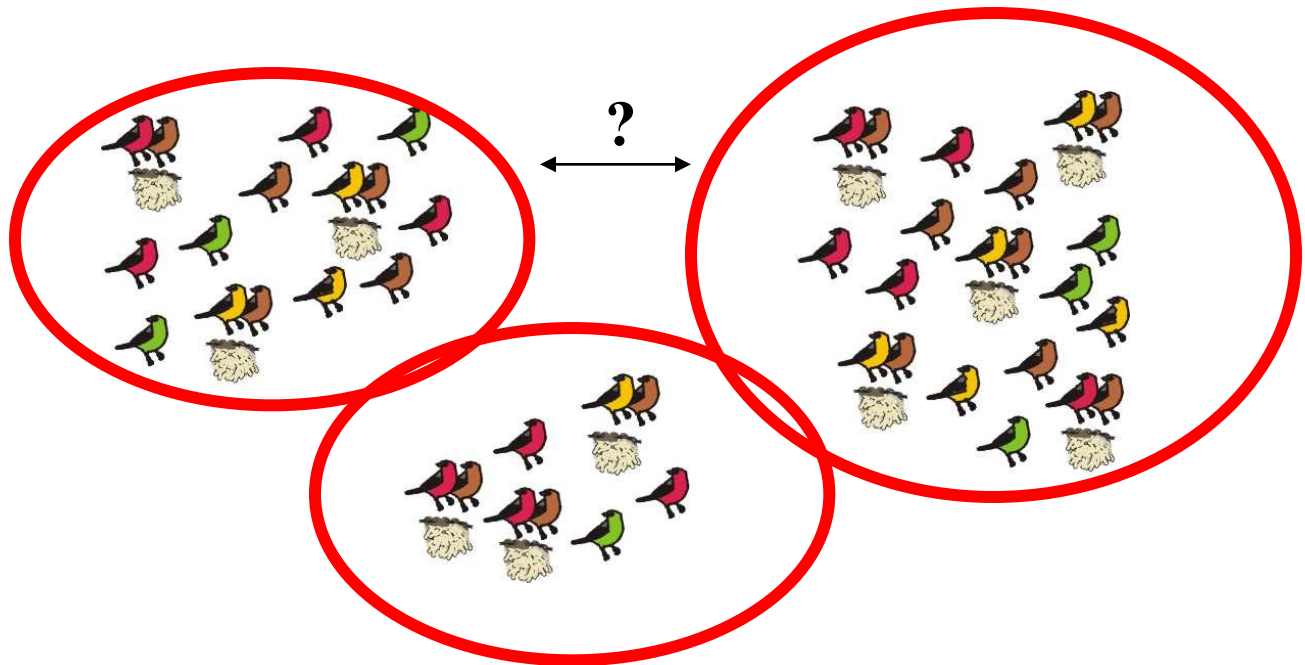
# Úrovně variability DNA

- **populace** – studium speciace, fylogeografie



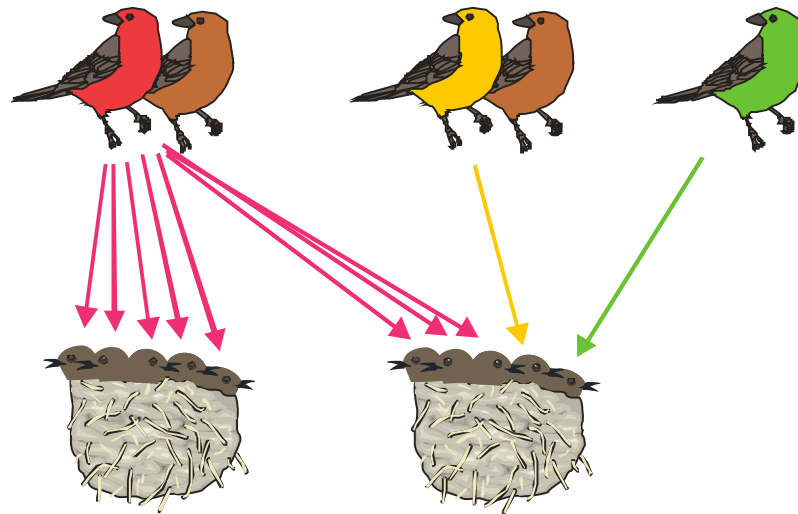
# Úrovně variability DNA

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



# Úrovně variability DNA

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

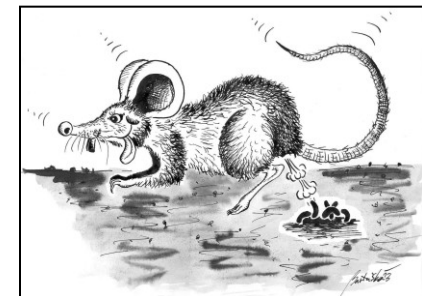
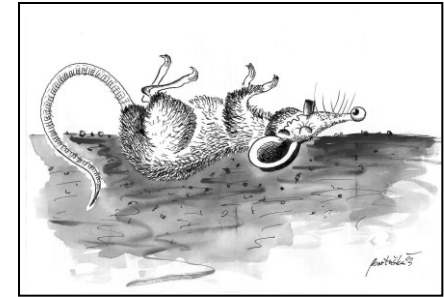


# Genotypizace – analýza genotypu

- 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)

# 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





# Izolace DNA

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

# Fixace materiálu

+

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

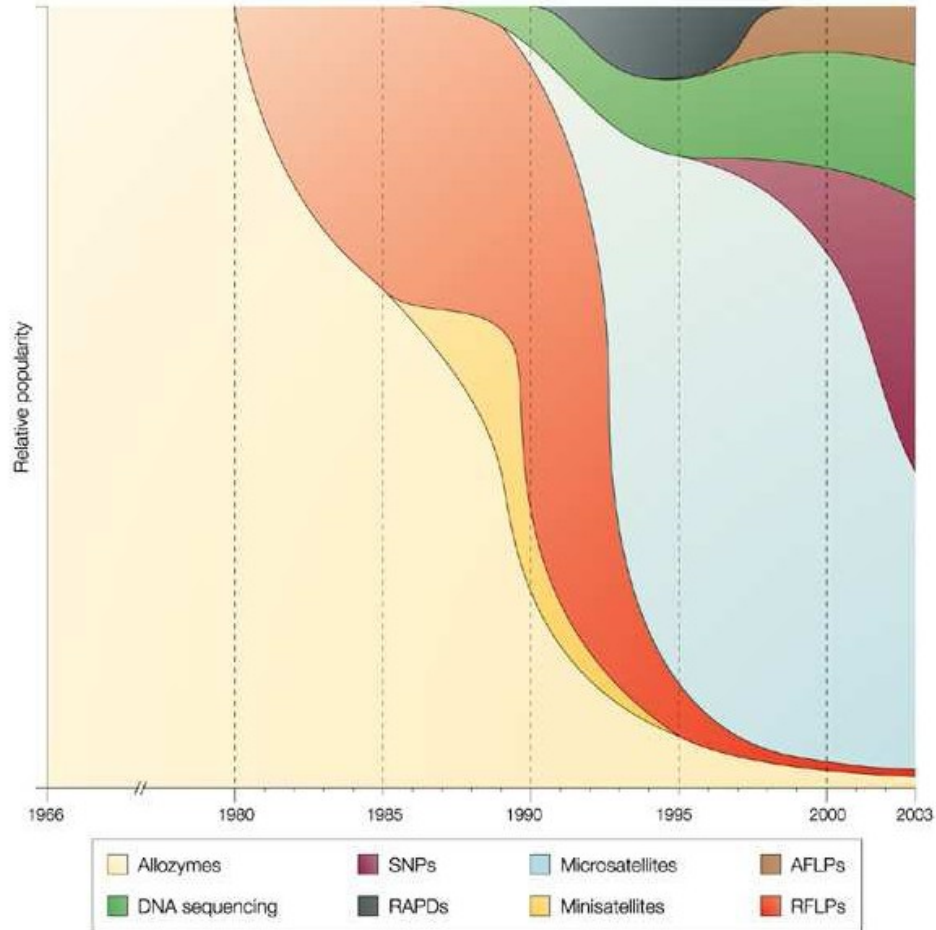
-

- formaldehyd
  - opakované zamrazování
  - rozvlhčování sušeného materiálu
  - další fixační média
- 
- speciální metody pro izolaci ze subrecentního materiálu (mamuti, hmyz v jantaru, neandrtálci apod.)

# Genetické markery

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

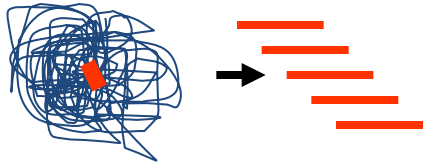
# Nejčastěji používané genetické markery



Sekvence DNA

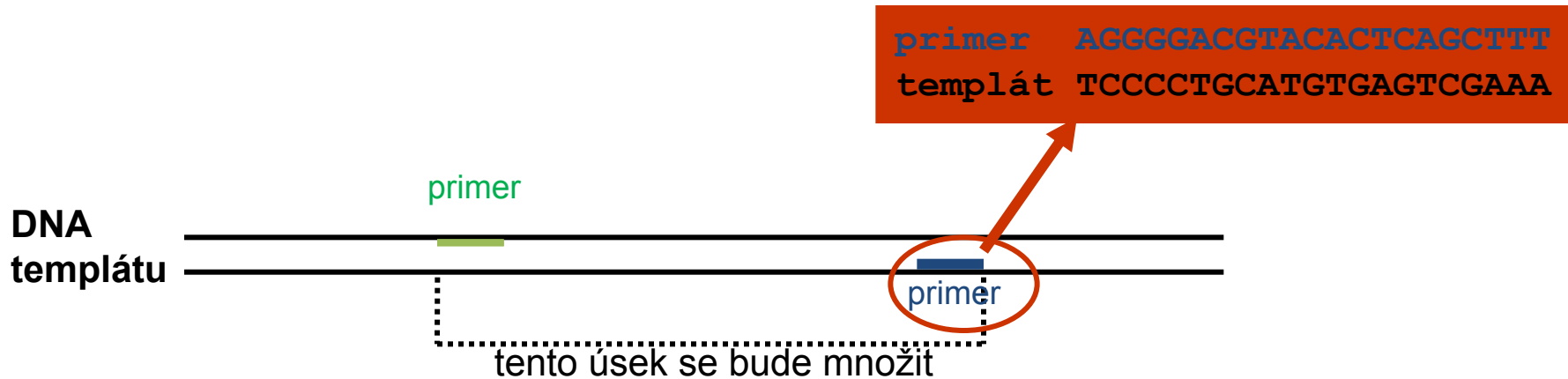
SNPs

Mikrosatelity



# 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.



*Cycler MJ Research*



PC

*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



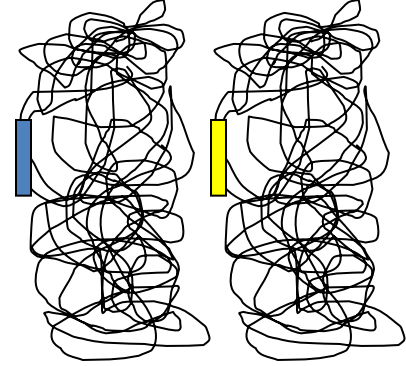
# „Molekulárně-genetické“ metody

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

**CGCACATCTCTAGCTTCGATTCAGGAA**

**CGCATCTCTAGCTTTGATTCAGGAA**

# Mikrosatelity



- VNTR („variable number of tandem repetitions“), SSR („simple sequence repeats“)
- jednotlivé alely se liší délkou

**TTCAGG**CACACACA**ATCTCTAGCTTCGA**

**27 bp**

**TTCAGG**CACACA**ATCTCTAGCTTTGA**

**25 bp**

genotyp diploidního jedince: **25/27**



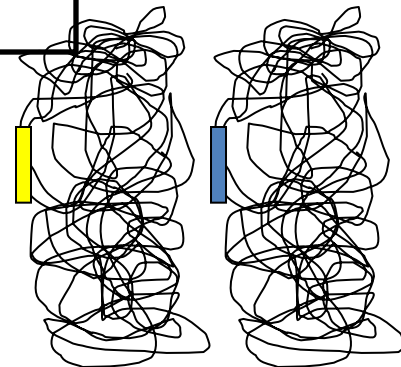
# „Molekulárně-genetické“ metody

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

CGCATCTCTAGCTT**C**GATTCAGGAA

CGCATCTCTAGCTT**T**GATTCAGGAA

genotyp diploidního jedince: C/T



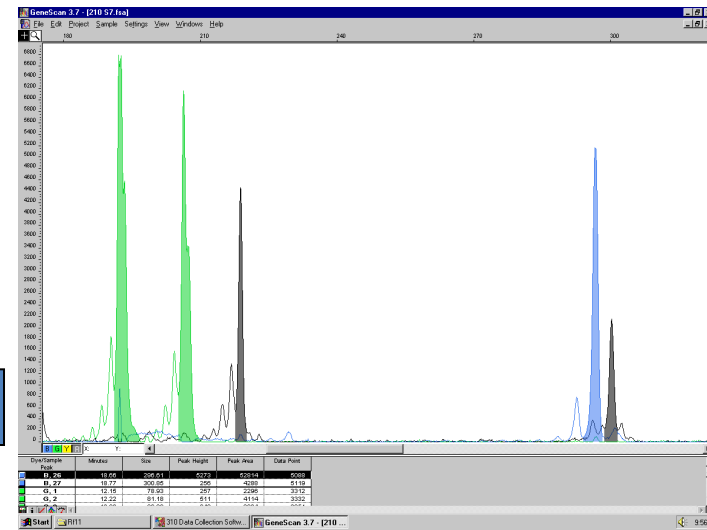
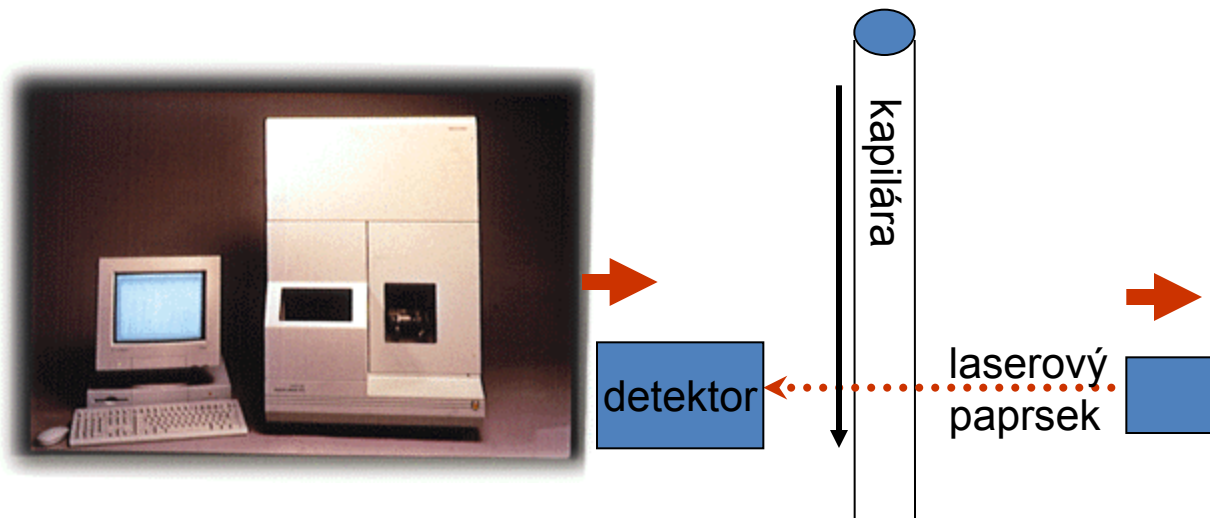
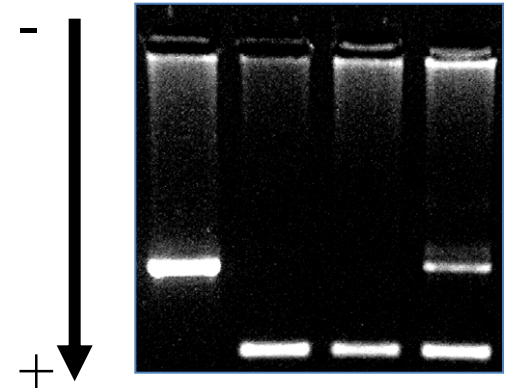
# Studium variability nasyntetizovaného úseku

## 1) délkový polymorfismus

- elektroforéza

# Rozdělení fragmentů DNA podle velikosti

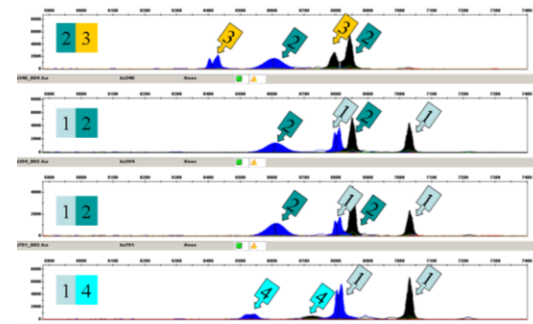
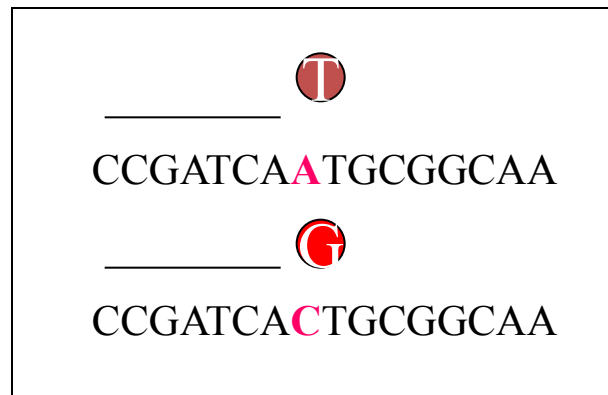
- Agarosa - Hrubé rozdělení (do rozdílu 15 bp)
- Polyakrylamid – Přesnější rozdělení (4 bp)
- Sekvenátor, fragmentační analýza – nejpřesnější (fluorescenčně značené PCR fragmenty, např. značené primery)



# Studium variability nasyntetizovaného úseku

## 2) sekvenční polymorfismus

- sekvencování
- SNP („single nucleotide polymorphism“) analýza – např. RFLP, SSCP aj.



# Typ získaných dat

počet lokusů

počet jedinců

počet populací

počet vzorků v 1. populaci

počet vzorků v 2. populaci, atd.

geografické koordináty

	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	AB											
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	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	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	138	134	166	173	0	0	184	184	245	245	287	287	205	213	162	166		48.83320	16.50610												

genotypy, tj. velikosti fragmentů v populaci

pop1

pop2

# formát GenAlex



Microsoft Excel - PYG\_GenAlex.xls

Soubor Úpravy Zobrazit Vložit Formát Nástroje Data Okno GenALEX Nápověda

A1 f11

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

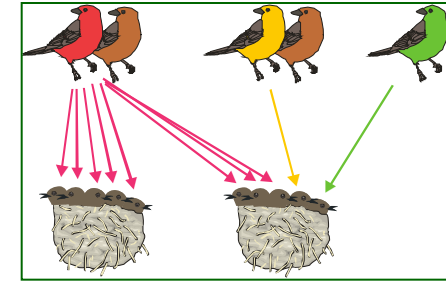
GenALEX Nápověda

- Frequency...
- HWE...
- Distance
- AMOVA...
- Mantel...
- PCA...
  - EF6
  - Paur05
  - NN18
- Assignment
  - 247 174 188 249 251 287
  - 245 182 188 247 249 287
  - 0 184 190 249 249 283
- Spatial
- Relatedness
  - 243 184 190 247 249 283
  - 241 182 188 247 253 0
  - 243 184 186 253 253 295
- Template
  - 241 190 190 249 249 285
- Create
  - 240 178 186 249 249 287
- Parameters
  - 230 184 188 249 255 287
  - 245 184 186 245 247 285
- Data
  - 0 182 190 251 257 289
- Import Data
  - 220 186 186 249 251 293
  - 243 178 186 249 251 287
- Raw Data
  - 220 178 182 253 253 285
- Edit Raw Data
  - 220 178 182 249 251 285
- Export Data
  - Arlequin... 249 289
  - Cervus... 255 289
  - Famos... 249 289
  - Fdist2... 255 287
  - GeneClass... 249 285
  - GenePop... 253 287
  - Kingroup... 253 285
  - MEGA... 255 283
  - MSA... 255 289
  - MsVar... 255 295
  - Nexus... 255 291
  - Phylip... 253 285
  - PopGene... 253 285
  - SPAGeDI... 255 285
  - Structure... 253 285
- Graph
- Stats
- Options

# 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

