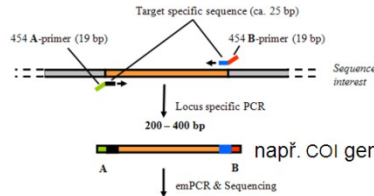
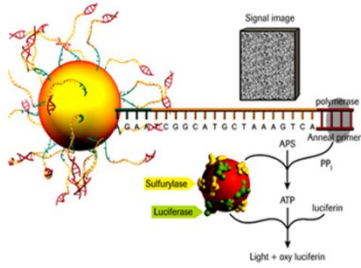


Sekvenování ampikonů (PCR produktů)

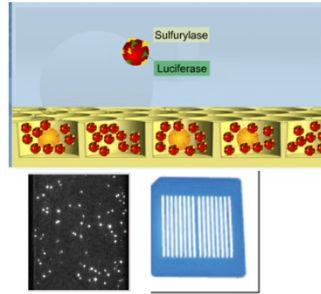
SMĚSNÉ VZORKY

Složení potravy, např. v trusu

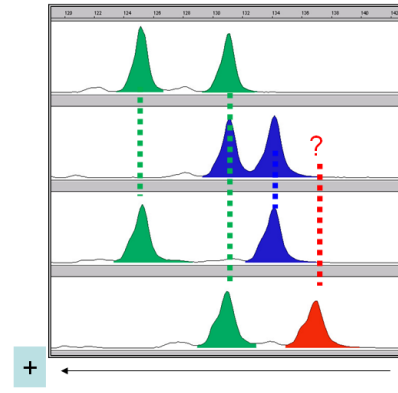
DNA - barcoding approach (např. COI gen)



paralelní sekvenování



Exclusion principle (= vyloučení rodičů)



Genotyp (bp)

Matka: 125/131

Otec: 131/134

Potomek 1: 125/134

Potomek 2: 131/137

Sledovaný otec mohl zplodit potomka 1, ale zcela jistě není otcem potomka 2



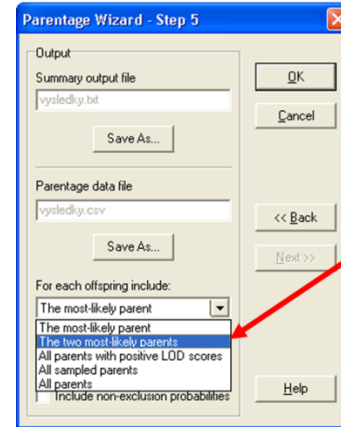
Uria lomvia



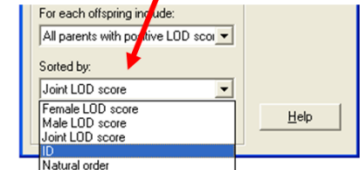
- **22%** mimopárová paternita bez korekce na mutace
- **7%** mimopárová paternita s korekcí soulad s jinou použitou technikou

Ibarguchi et al. 2004

Analýza dat



výběr zobrazení výsledků analýzy



Vzdálenější příbuznost jedinců

Sestry, bratři, sestřenice, bratřenci

Vnitropopulační genetická variabilita

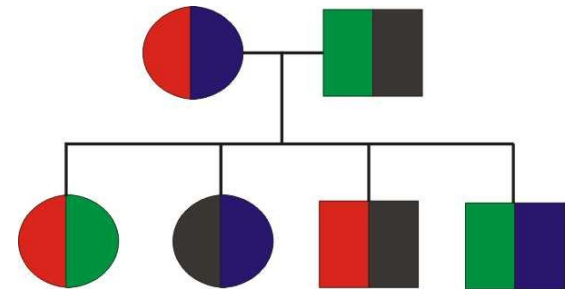
Efektivní velikost populace, genetický drift



Příbuzenský koeficient r

- Celková „identity by descent“
- Diploidní organismy

– Rodič – potomek	0,5
– Sourozenci	0,5
– Jednovaječná dvojčata	1
– Nevlastní sourozenci	0,25
– Bratraci a sestřenice	0,125
– Nepříbuzní	0



- RELATEDNESS, KINSHIP (Mac), ML-RELATE (WinXP) odhad pomocí ML např. z mikrosatelitů
- BAYES



Cynopterus sphinx

kaloň krátkonosý
Storz et al. 2001



- Kolonie složené z harémů, v harému samec a 1 až 37 samic
- Příbuzenská struktura kolonie a harémů (kin structure)?
- 10 mikrosatelitových lokusů, r , KINSHIP
- r blízké nule → jedinci v kolonii jsou nepříbuzní
- Zásadní role disperze (mláďata z kolonie se v dospělosti nedrží pospolu)

	Average pairwise r	95% confidence interval	No. pair- wise combin- ations
Mother–offspring pairs	0.494	0.478 to 0.511	185
Father–offspring pairs	0.508	0.485 to 0.530	118
Half-siblings	0.298	0.285 to 0.310	737
Pups (1997 cohort)	0.036	0.027 to 0.044	2211
Pups (1998 cohort)	−0.002	−0.006 to 0.003	6903
Adult females	−0.008	−0.010 to −0.006	21,736
Adult males	−0.001	−0.014 to 0.013	666

Cryptomys damarensis

Burland et al. 2004

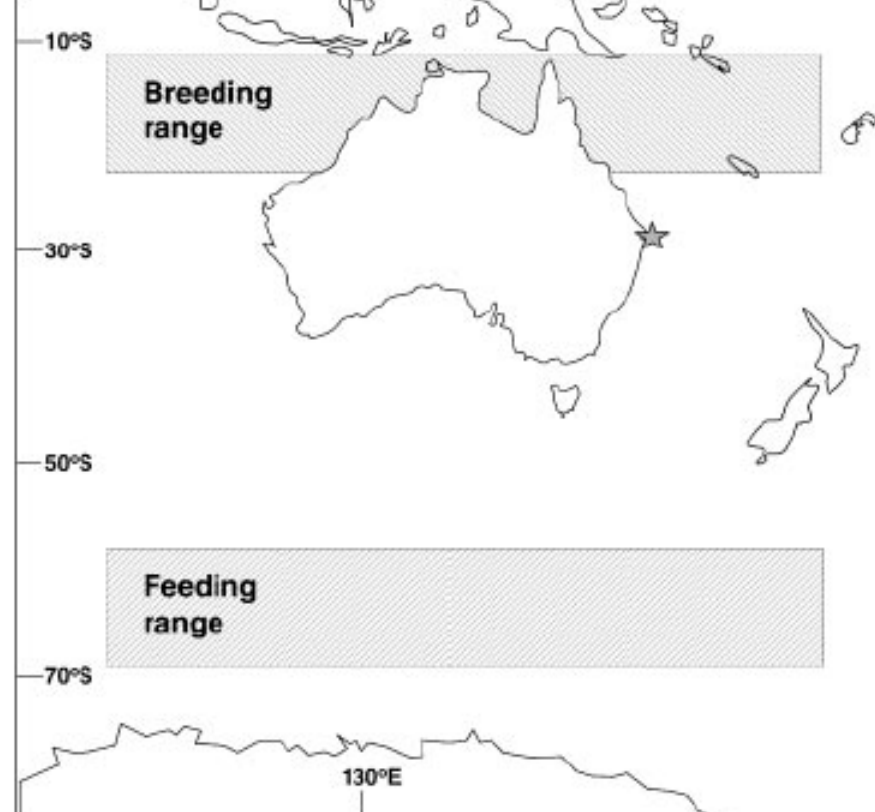
- Kolonie, i více než 40 jedinců
- Množí se jen 1 samice (královna) a 1 až 2 samci
- Mark-recapture → minimální disperze a výměna mezi koloniemi
- Laboratorní experimenty → inbreeding avoidance
- 11 kolonií, mikrosatelity, RELATEDNESS
- Královna má mláďata i se samci, kteří nejsou v kolonii
- V kolonii často nepříbuzní jedinci opačného pohlaví
- Inbreeding avoidance nestačí k vysvětlení sociality
- Dominance královny



Megaptera novaeangliae

Valsecchi et al. 2002

- Cestují v malých skupinách
- Tvoří skupiny příbuzní?
Kin selection?
- Mikrosatelity (8 lokusů), KINSHIP, NEWPAT
- Jediní příbuzní ve skupinách byly matky a jejich potomci.
- Kromě nich hodnoty r stejné jako při sloučení skupin dohromady
- Kin selection skupiny nevysvětluje





Haplodiploidie

Hamilton (1972) - inkluzivní fitness

- haploidní, diploidní

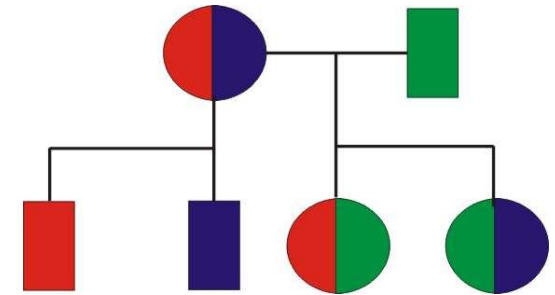
- Jeden otec

- **Sestry:**

0,75

- **Matka – dcera**

0,5



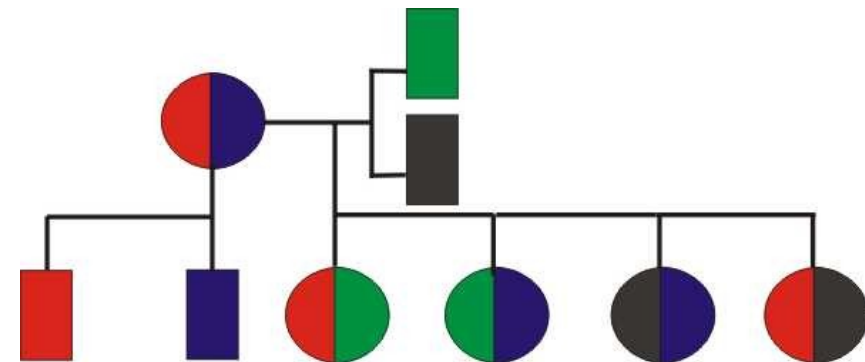
- Více otců

- **Sestry:**

0,25 - 0,75

- **Matka – dcera**

0,5



- Více matek i otců

r různé

Polistes dominulus

(dříve *P. gallicus*)

vosík francouzský *Queller et al. 2000*

- Hnízdo bez ochranného obalu
- Zakládá často více přezimovavších samic
- Dominantní samice klade vajíčka (>90%), subordinátní se starají o potravu
- Kin selection?
(Jsou si samice příbuzné?)
- Ve třetině případů jsou samice nepřibuzné
(ML 35% nepřibuzné
7% sestřence
56% sestry)
- Jediná výhoda – nahrazení dominantní samice, pokud zahyne
- **Výjimka u sociálního hmyzu!**

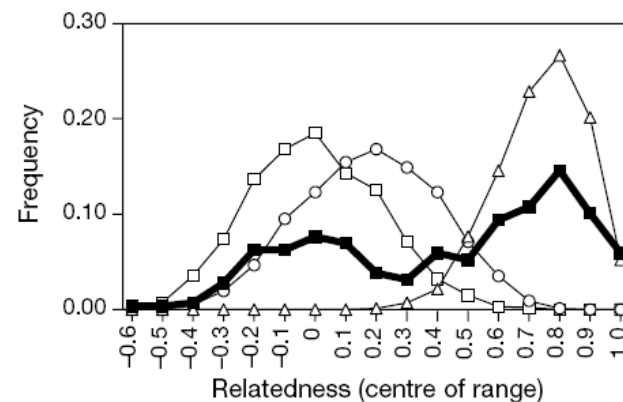
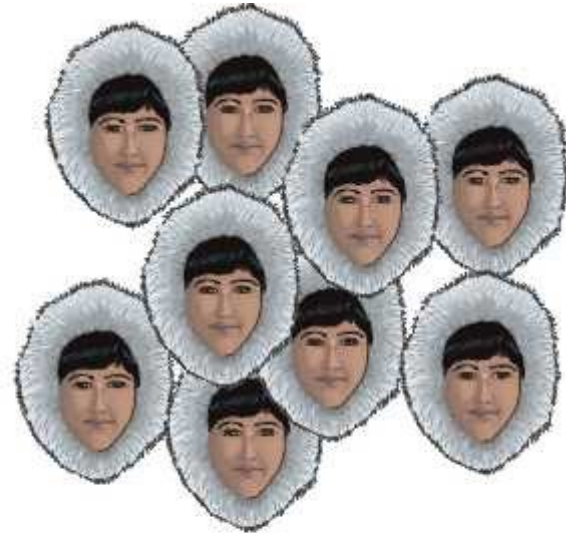


Figure 3 Observed relatedness distribution of *P. dominulus* foundresses (filled squares) and expected distributions for several relationships, grouped into intervals of width 0.1. The filled squares show the observed distribution for all relatedness estimates of foundress nestmate pairs, from the four foundress collections of Fig. 2. The other distributions, used in the likelihood analysis, show the distributions of relatedness estimates for simulated non-relatives (open squares, true $r = 0$), cousins (open circles, true $r = 3/16$) and full sisters (open triangles; true $r = 3/4$).

Analýza populační variability a struktury



Hierarchická populační struktura

Druh → populace → subpopulace (demy)

Hlavní otázky populačně-genetické analýzy:

- Jak je variabilní daná populace a jaká je její efektivní velikost (neutrální genetická teorie: $H_e = 4N_e\mu / [4N_e\mu + 1]$)
- 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)?

Velké množství populačně-genetických programů

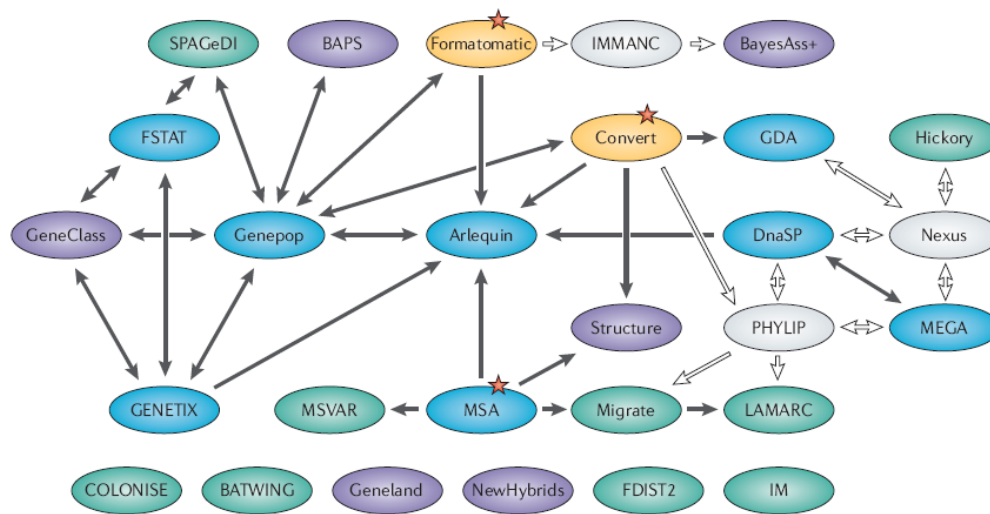
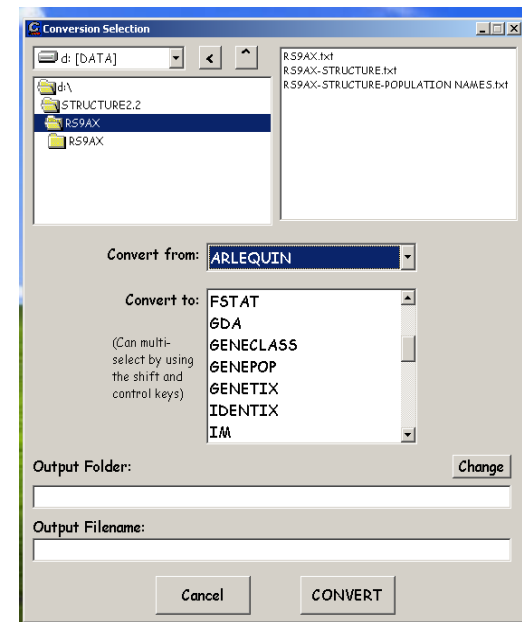
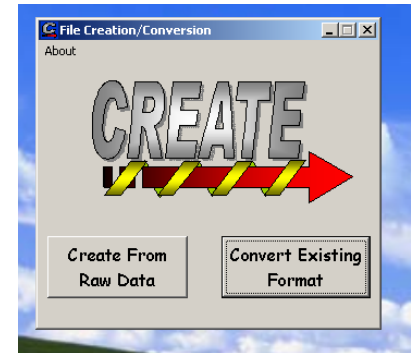


Figure 1 | **Flow chart of possible data exchange between different population genetics programs.** Although many programs have their own input-file specification, data files can still be exchanged between most programs (black arrows), avoiding tedious reformatting processes. The red stars are recommended 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

Účel populačně-genetické analýzy

Table 5 | List of computer programs suited for a given analysis and genetic marker

	Multi-allelic markers*	STR	Dominant markers (AFLP)	SNP	DNA sequences
Descriptive statistics			SPAGeDi		Arlequin, DnaSP, MEGA
Linkage disequilibrium					
Analysis of population subdivision			Hickory		Arlequin, DnaSP, MEGA
Detection of new immigrants: known populations					
Detection of new immigrants: inferred populations					
Demographic expansion or decline					Arlequin, DnaSP, IM, LAMARC, Migrate
Population size					IM, LAMARC, Migrate
Divergence time					DnaSP, IM, LAMARC, Migrate
Migration rates					DnaSP, IM, LAMARC, Migrate
Neutrality tests					Arlequin, DnaSP, MEGA
Spatially explicit analyses					

*By multi-allelic markers, we mean loci for which no specific mutation model is assumed. Computations are based on allele frequencies only, as well as nucleotide frequencies. Some software packages are assumed to be independent of the marker type.

ed. In the latter case, computations are based on a sequence, STR and SNP allele frequencies, and to detect new

frekvence alel

frekvence alel + mutační model

1. Vnitropopulační variabilita (popis získaných dat)

Polymorfismus

- podíl polymorfních lokusů (znaků) – 95 % nebo 99 % (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)

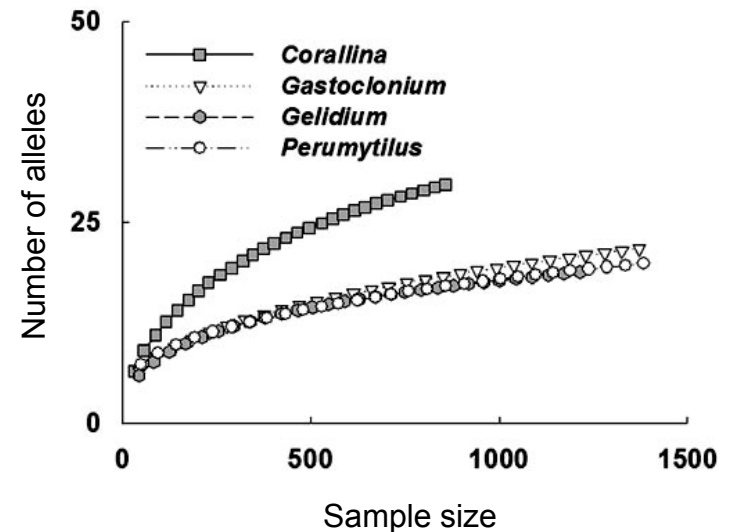
- počet alel na lokus

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)

Př. Jeden lokus se 2 alelami

Alela	Četnost alely
A	p
a	q

$$p + q = 1$$

p, q - zjistíme analýzou svých vzorků

Genotyp	Očekávaná četnost genotypu
AA	p^2
Aa	$2pq$
aa	q^2

= Hardy-Weinbergova rovnováha

- četnosti genotypů zjistíme analýzou svých vzorků
- odchylky od očekávaných četností \Rightarrow např. χ^2 test

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)



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** – nejlépe 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)
 - nulové alely (jen na některých lokusech bude deficit heterozygotů)

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	2
Ho	0,5	1,00	0	0	0,375
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	0,375

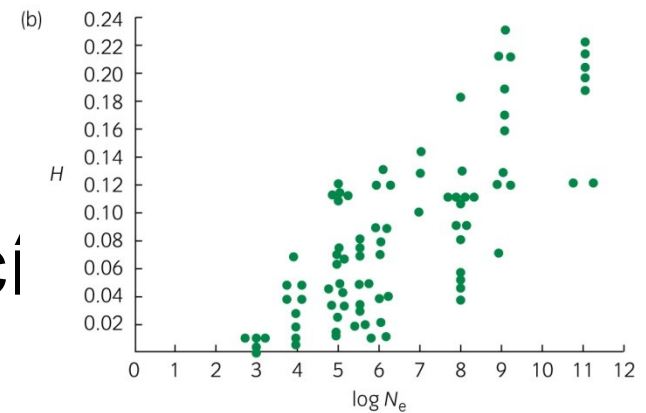
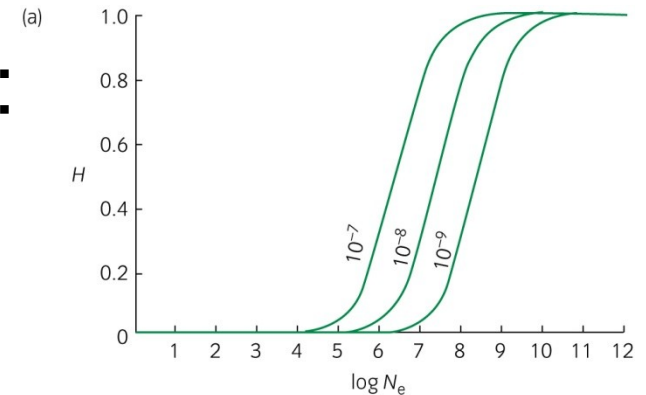
$$H_e = 1 - (p^2 + q^2)$$

Polymorfismus = 0,75

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

Použití údajů o genetické variabilitě

- neutrální genetická teorie:
 $H_e = 4N_e\mu / [4N_e\mu + 1]$
- mutation-drift equilibrium
- srovnání různých populací
a jejich N_e (H_e , AR atd.)



$N \sim H_e$... nemusí to být pravda

- vliv historického vývoje populací („bottlenecks“)
- Northern elephant seals *Mirounga angustirostris* – 120 000 jedinců – 50 allozymových lokusů – žádná variabilita

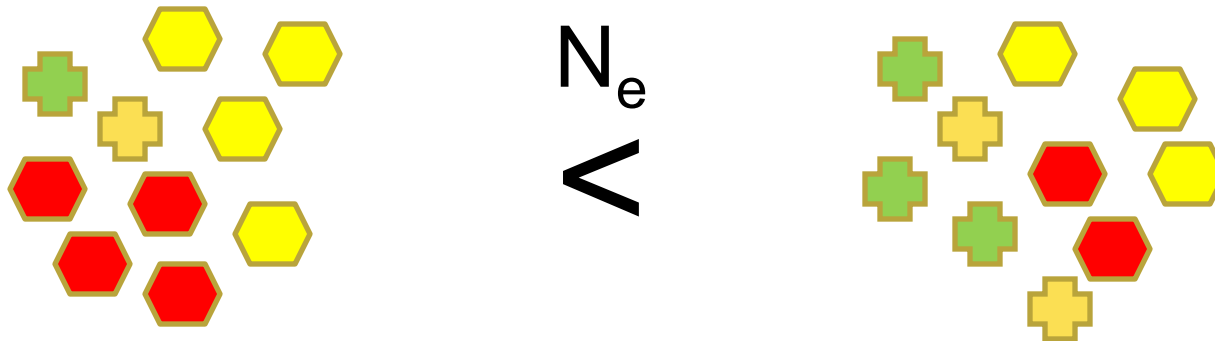


rypouš severní



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 náhodného driftu)
- ovlivněna genetickou a věkovou strukturou, poměrem pohlaví, intenzitou inbreedingu atd.

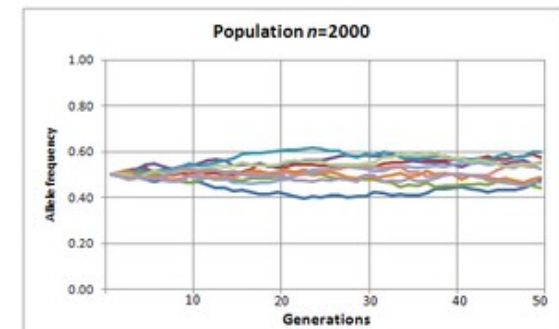
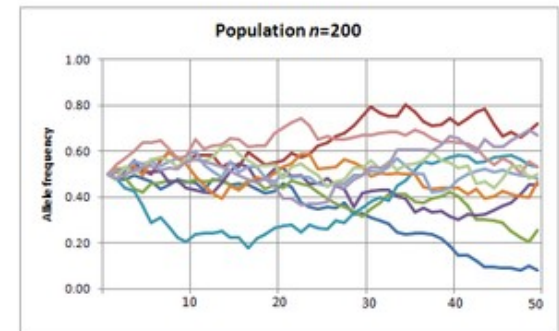
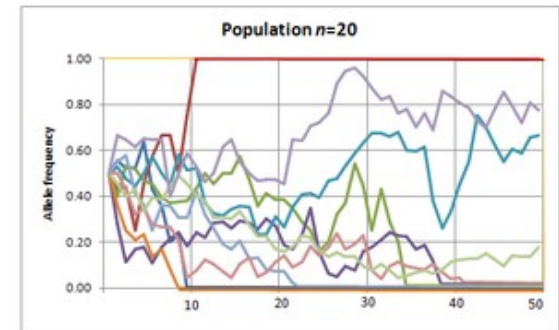


- vývoj genetické variability v malých populacích závisí na N_e více než na N

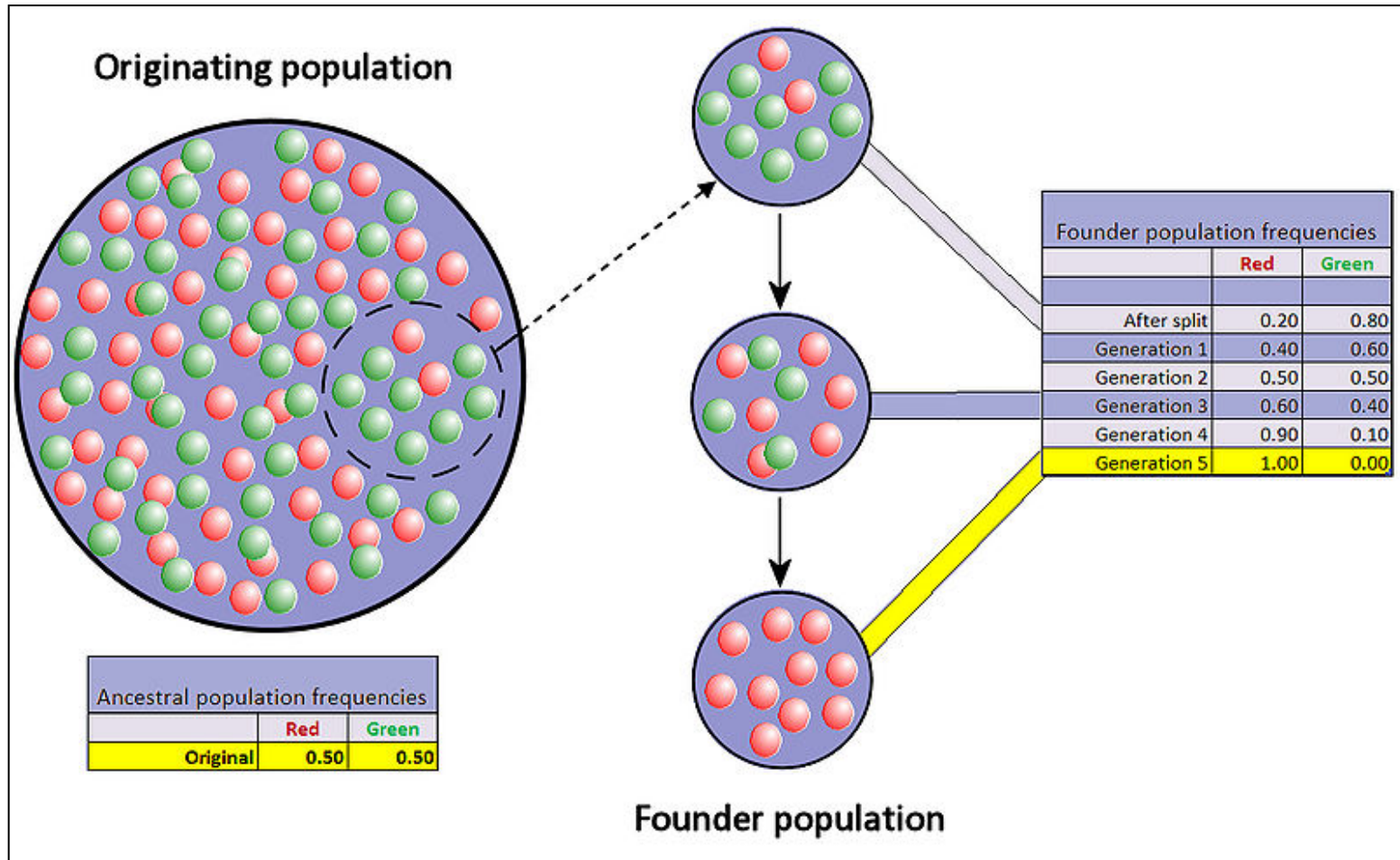
Genetický drift



- Náhodné změny ve frekvencích alel
- Intenzita driftu závisí na velikosti populace (viz ochranářská genetika)
- Specifické případy – founder effect, bottleneck

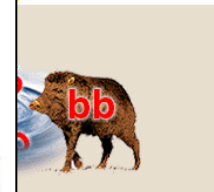
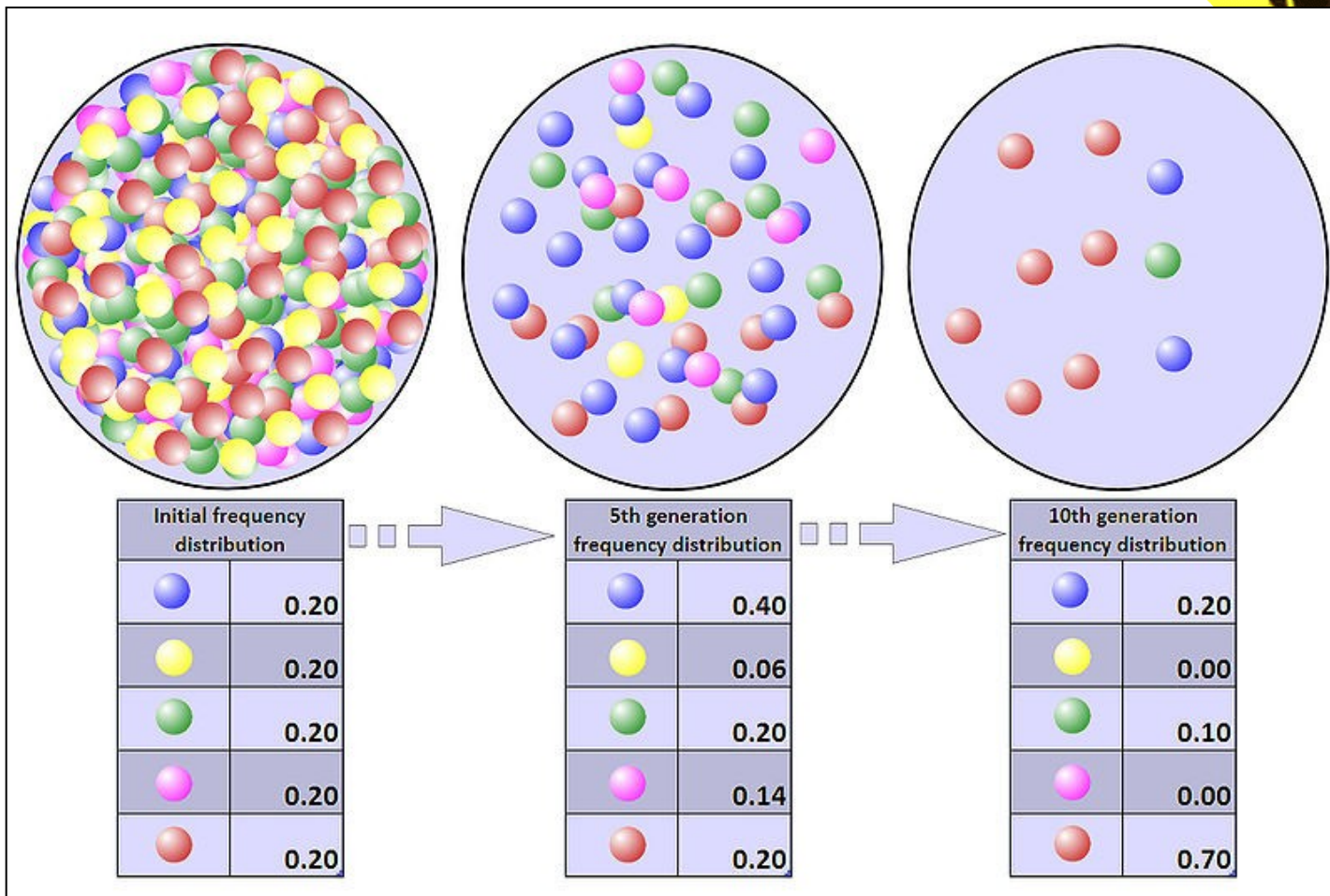


Founder effect („jev zakladatele“)

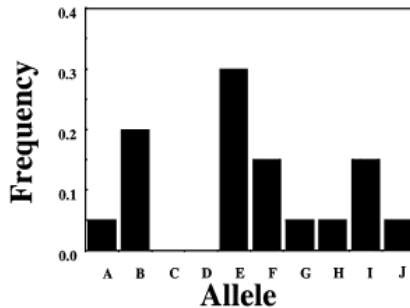




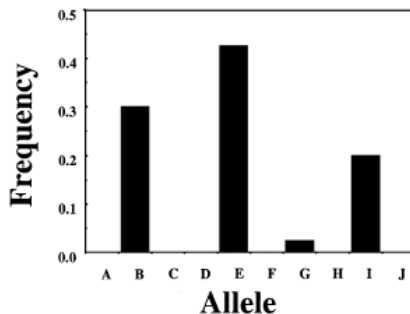
Bottleneck



Detekce bottlenecku



Reduction in population size



50% reduction in no. of alleles
20% reduction in size range

Při bottlenecku vymizí nejdříve vzácné alely, rychleji než se sníží rozsah alel nebo heterozygotnost

Nutno znát (předpokládat) mutační model – pak se nasimuluje „mutation-drift“ rovnováha a srovnává se se skutečným stavem

Program M Ratio: počet alel vs. rozsah alel

Program BOTTLENECK: počet alel vs. heterozygotnost

Předpoklad testů: Populace v HW rovnováze

Bottleneck

- Při bottlenecku
 - redukce počtu alel
 - ovlivnění heterozygotnosti není tak rychlé
 - více heterozygotů než by vyplývalo z populačního modelu (IAM, TPM, SMM)
- Nutno definovat mutační model, předpokladem je HW rovnováha, testuje se mutation-drift equilibrium
- Program BOTTLENECK

- Záleží na zvoleném modelu
- Ale SMM asi neplatí stoprocentně

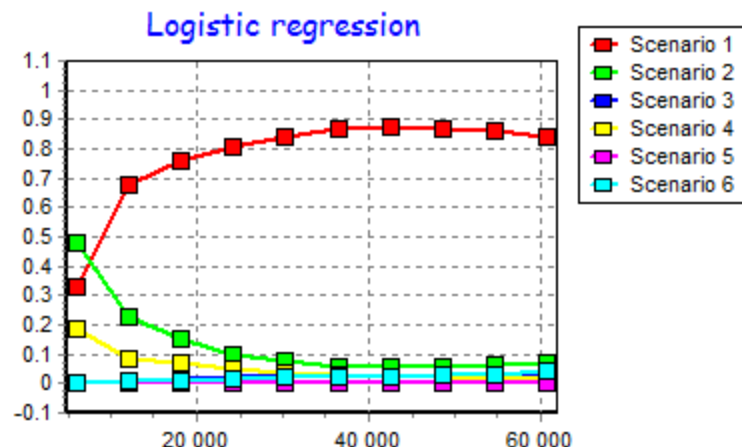
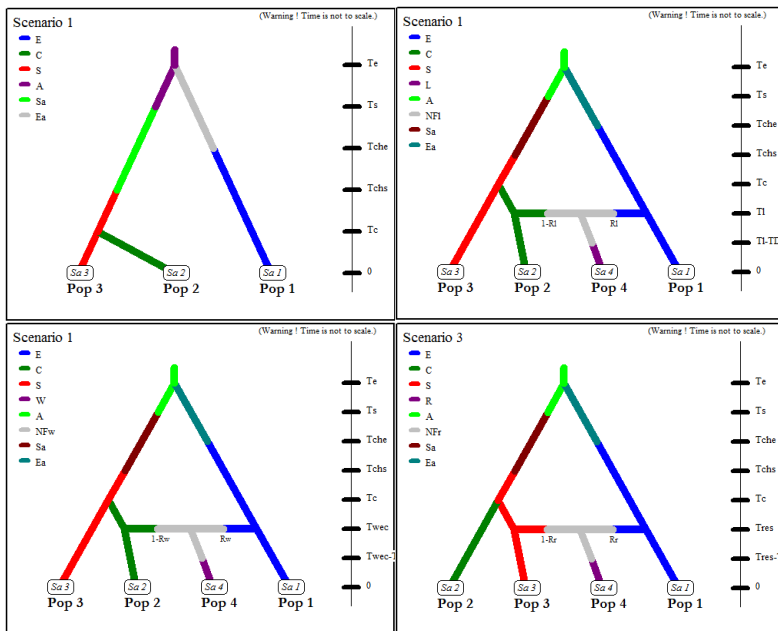


Table 4 Departures from mutation-drift equilibrium in yellowhammer samples

Sampling sites	IAM	TPM	SMM
DEV	0.0039**	0.0078**	0.3438
GWE	0.0039**	0.0391*	0.7656
CUM	0.0039**	0.0391*	0.8125
OXO	0.0039**	0.0117*	0.3438
YOR	0.0039**	0.0117*	0.7656
T & W	0.0078**	0.1875	0.8125
LEI	0.0195*	0.2891	0.6563
SUF	0.0039**	0.0195*	0.6563

Detekce bottlenecku nebo expanze – Bayesiánský přístup

- **Komplexní Bayesiánský přístup** (založen na koalescenční teorii)
 - Detekce bottlenecku i expanze
 - Vhodné při dlouhodobějších změnách
 - Markov chain Monte Carlo simulations
 - Beaumont M. – např. program MSVAR nebo DIY ABC



Testování alternativních scénářů vývoje populací v programu DIY ABC

Otters in central Europe

- strong decline of population numbers in last century
- fragmentation of distribution area

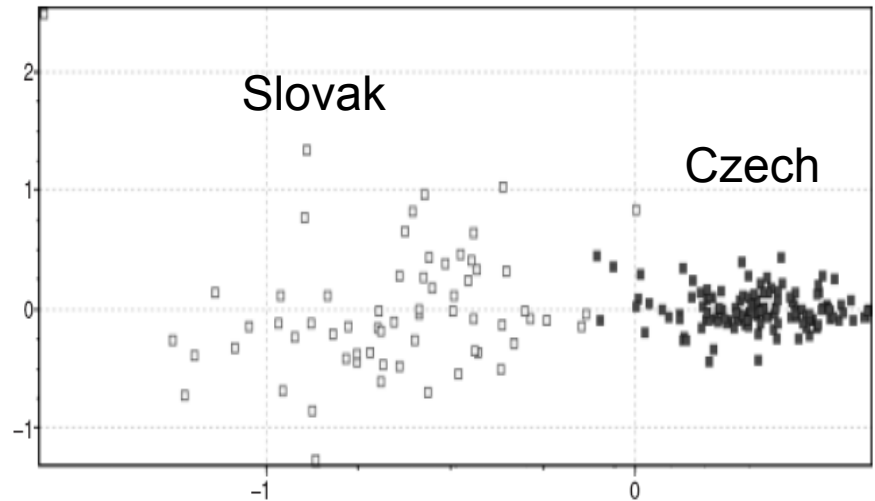


Table 3 Simulated data from five replicate runs of the MSVAR programme

Population	Model	n_0	n_1	μ	Xa (generations)	Xa (years)
CZE	EXP	66.1 (1.7; 245 470.9)	257.0 (12.6; 7079.5)	1.6×10^{-3} (5.6×10^{-5} ; 4.2×10^{-2})	5.9 (0.2; 549.5)	17.7
	LIN	28.2 (0.4; 93 325.4)	281.8 (13.5; 7413.1)	1.3×10^{-3} (4.3×10^{-5} ; 3.7×10^{-2})	7.2 (0.2; 660.7)	21.6
SVK	EXP	147.9 (2.6; 323 593.6)	588.8 (26.9; 14 791.1)	1.1×10^{-3} (4.4×10^{-5} ; 2.3×10^{-2})	4.3 (0.1; 162.2)	12.9
	LIN	123.0 (0.5; 363 078.1)	575.4 (29.5; 16 218.1)	1.0×10^{-3} (4.1×10^{-5} ; 2.1×10^{-2})	4.7 (0.1; 173.8)	14.1

n_0 , estimated mode (and limits) of current effective population size; n_1 , estimated mode (and limits) of past effective population size; μ , estimated mode (and limits) of mutation rate; Xa, estimated mode (and limits) of time between current and past population size in generations and years; CZE, Czech population; SVK, Slovak population; EXP, exponential model; LIN, linear model.

2. Analysis of population subdivision (mezipopulační variabilita)



Hierarchická populační struktura

Druh → populace → subpopulace (demy)

Předpoklady studia populačně-genetické struktury

- lokusy používané pro analýzu populační struktury jsou neutrální vůči selekci
- **klasický populačně-genetický přístup** = jednotlivé populace jsou předem známy (např. chceme zjistit úroveň genetických rozdílů mezi dvěma lokalitami = populacemi)

Genetická struktura populací

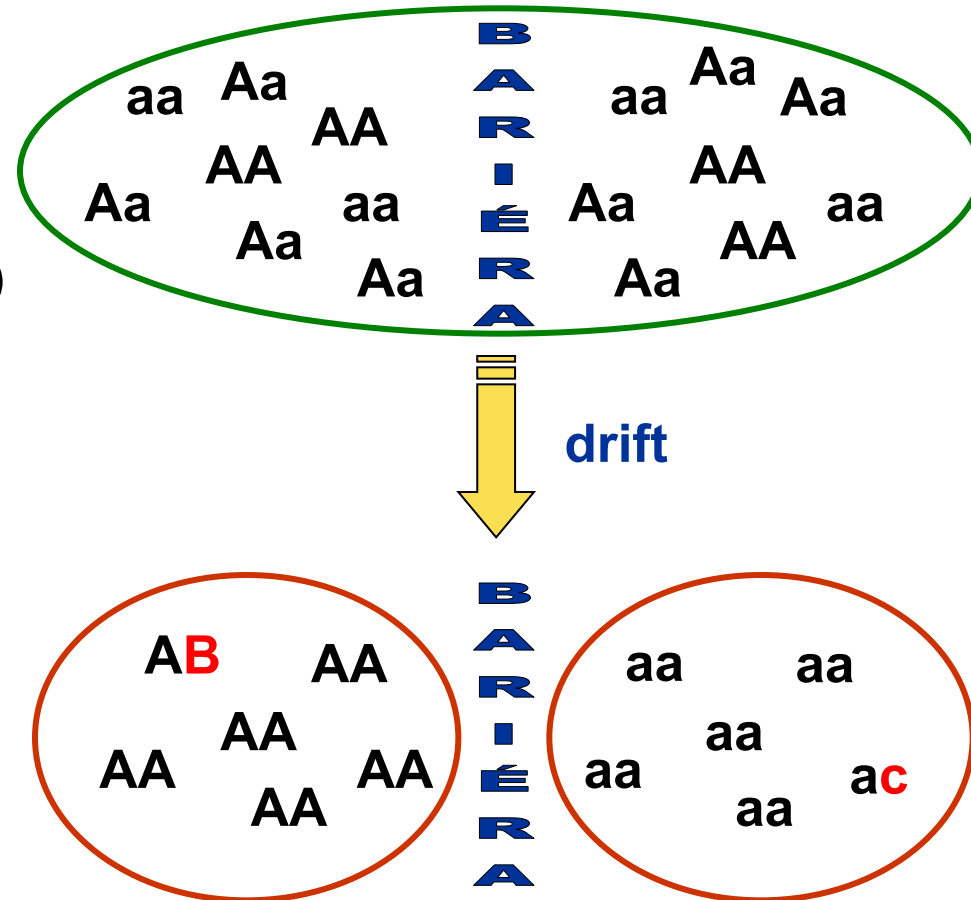
drift, mutace

- **Drift**

→ diferenciaci subpopulací díky změnám frekvencí (až fixaci) alternativních alel

- **Mutace**

mohou zvýšit diferenciaci (nebo ne – homoplázií)

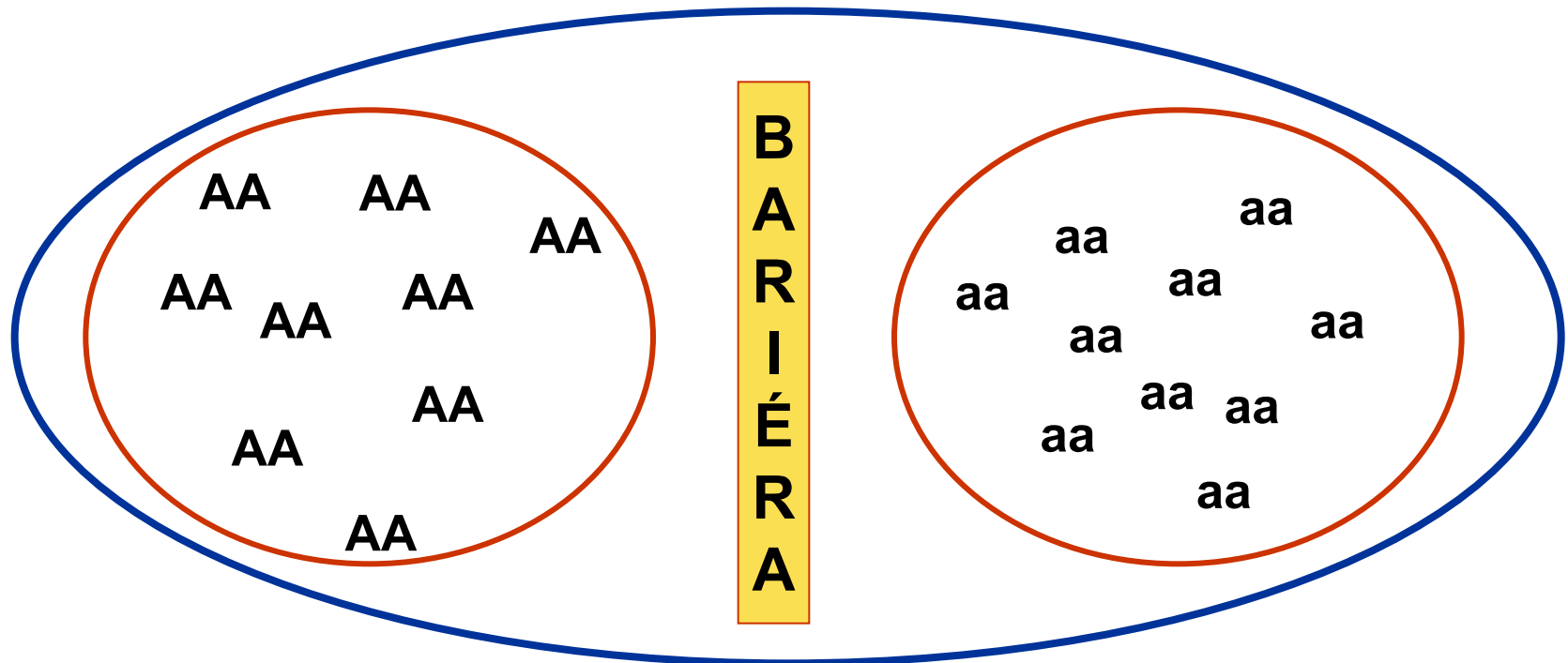


Migrace (genový tok)

- působí proti diferenciaci subpopulací

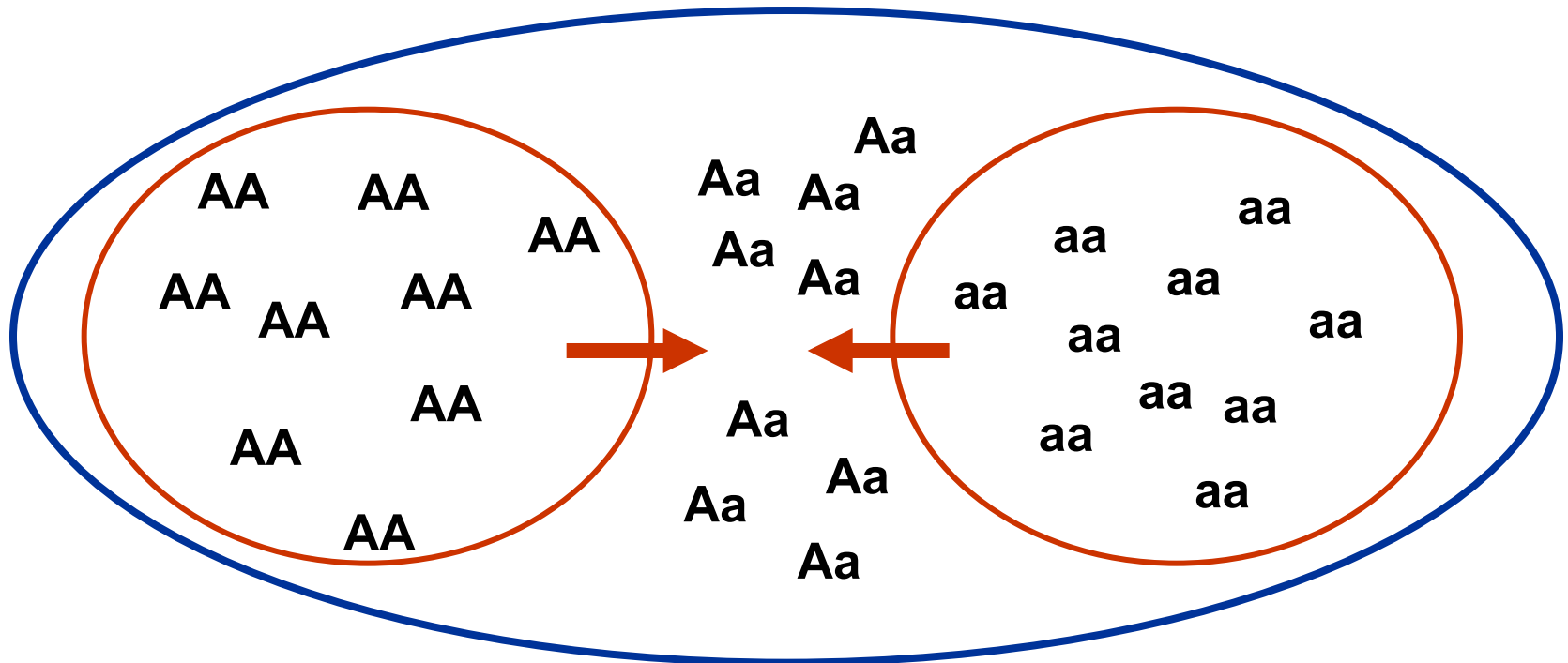
Vliv populační struktury na heterozygotnost

- Wahlundův princip
- Dvě izolované subpopulace s fixovanými alelami
- Subpopulace v HW, celkově v populaci však nedostatek heterozygotů



Wahlundův princip (isolate breaking)

- Pokles homozygotnosti při sloučení subpopulací



Wahlundův princip - příklad

- Jezero Bunnarsjöarna (severní Švédsko) – brown trout
- 2 alely na alozymovém markeru

	A/A	A/B	B/B	Total	p	2pq
Přítok	50	0	0	50	1.000	0.000
Odtok	1	13	36	50	0.150	0.255
Celé jezero (expected)	51 (33.1)	13 (48.9)	36 (18.1)	100	0.575	0.489



Jak zjišťovat strukturovanost populací?



Factorial correspondence analysis
(Genetix)

