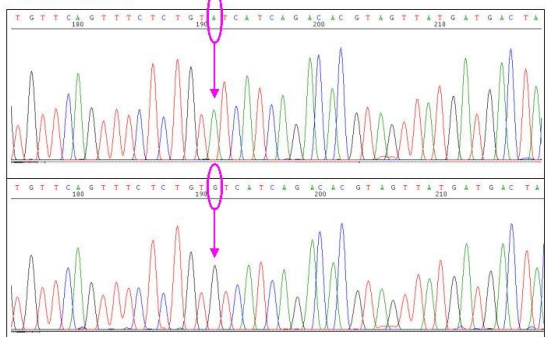
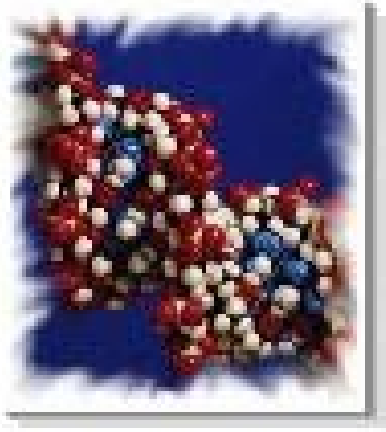
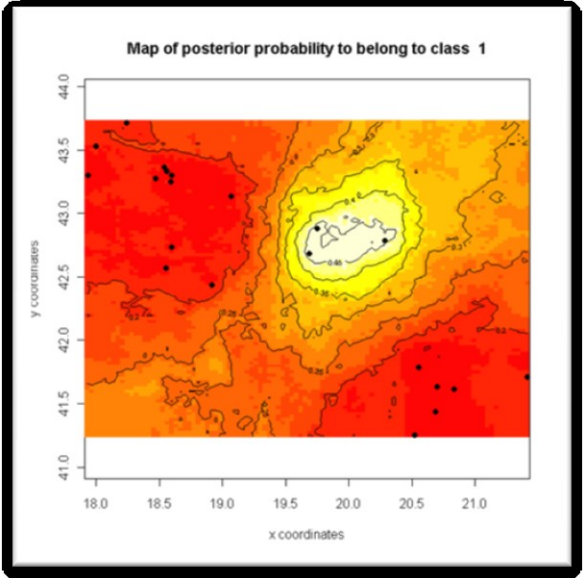
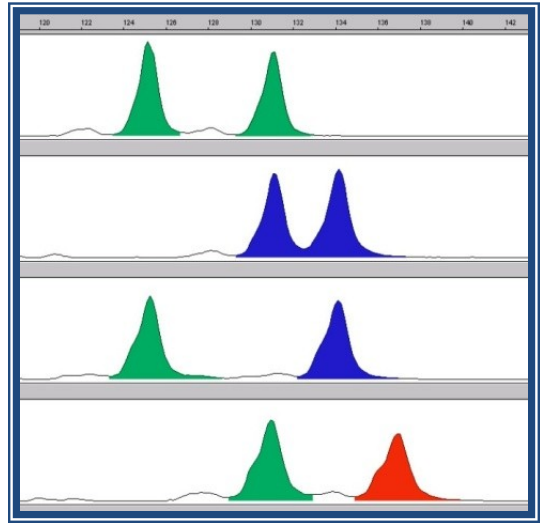




Mus musculus



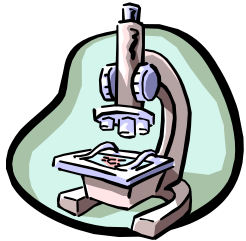
Mus domesticus



Molekulární ekologie (Molecular Ecology)

Co je molekulární ekologie?

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



Klasické problémy
a metody evoluční
ekologie

+



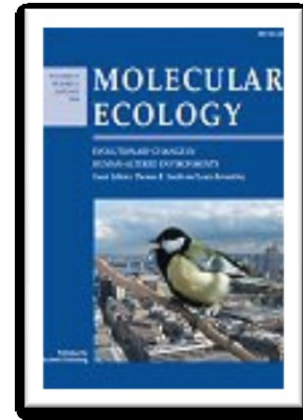
Molekulárně-genetická
data

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

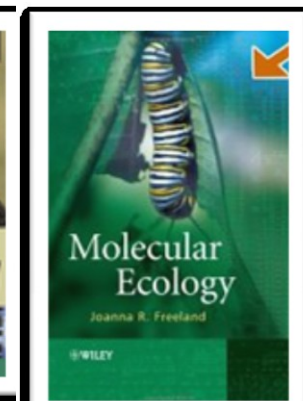
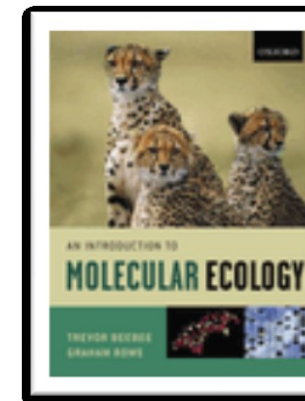
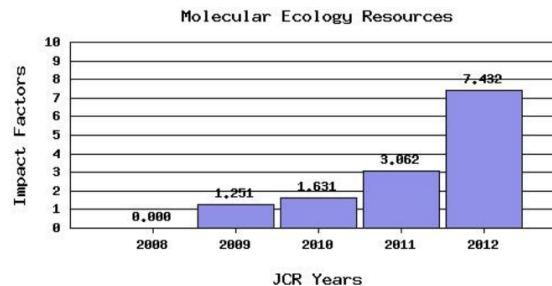
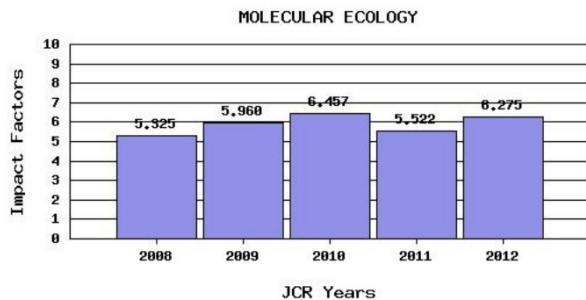
Pracuje na různých úrovních variability DNA (genom, jedinec, populace, skupina populací, max. skupina blízce příbuzných druhů)

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

Její význam vzrůstá ...



- Je překvapivě kompaktní
- Je populární - Molecular Ecology (od 1992) – dnes 24 čísel za rok
- další časopisy – Molecular Ecology Resources, Evolutionary Applications, aj.
- ISI Journal Citation Reports® Ranking - 2012: 10/136 in Ecology; 6/47 in Evolutionary Biology; 38/290 in Biochemistry & Molecular Biology; Impact Factor: 6.275
- Vyšly i její učebnice
- Na řešení velmi odlišných problémů používá obdobné metody
- *Snad se dá tedy i přednášet ...*



Proč používat molekulární metody v ekologii?

Research areas of interest to *Molecular Ecology* include:

- Často nelze odhadnout počet jedinců (často nelze odhadnout počet jedinců)
 - paternita (paternita)
 - identifikace (identifikace)
 - izolace populací (izolace populací)
 - počet migračních událostí (počet migračních událostí)
 - adaptace (adaptace)
- 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
většiny žijících druhů
jedince
ř. imunitní geny)



MOLECULAR ECOLOGY

Molecular Ecology (2013) 22, 2605–2626

doi: 10.1111/mec.12319

INVITED REVIEWS AND META-ANALYSES

A road map for molecular ecology

ROSE L. ANDREW,¹ LOUIS BERNATCHEZ,² AURÉLIE BONIN,³ C. ALEX. BUERKLE,⁴
BRYAN C. CARSTENS,⁵ BRENT C. EMERSON,⁶ DANY GARANT,⁷ TATIANA GIRAUD,⁸
NOLAN C. KANE,¹ SEAN M. ROGERS,⁹ JON SLATE,¹⁰ HARRY SMITH,¹¹ VICTORIA L. SORK,¹²
GRAHAM N. STONE,¹³ TIMOTHY H. VINES,¹⁴ LISETTE WAITS,¹⁵ ALEX WIDMER¹⁶ and
LOREN H. RIESEBERG^{1,17}

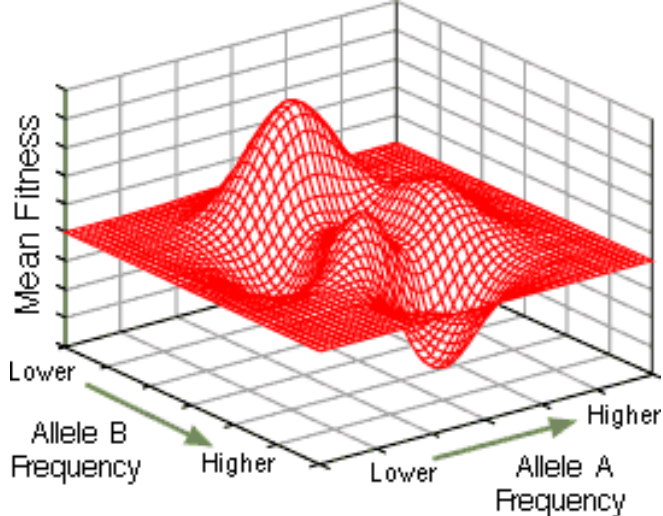
Definice předpokládaného vývoje molekulární ekologie

- DNA sequence-based trophic ecology
- microbial diversity within multicellular organisms
- model-based phylogeography
- community phylogeography
- landscape genomics
- ecological genomics and molecular adaptation
- experimental and genomic studies on speciation and hybridization
- multitool and multitrait analyses of kinship, parentage and behaviour

Vychází z populační genetiky

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

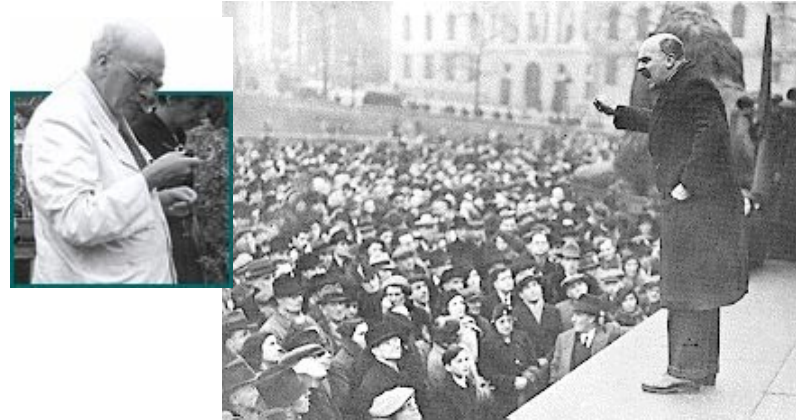
Sewall Wright
adaptivní krajina



Ronald
Fisher



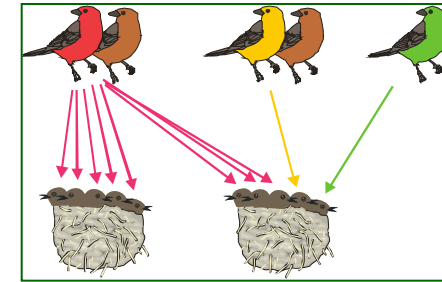
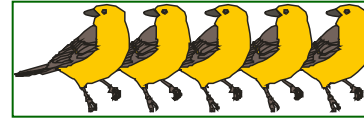
John B. S. Haldane



Různé otázky – různé přístupy

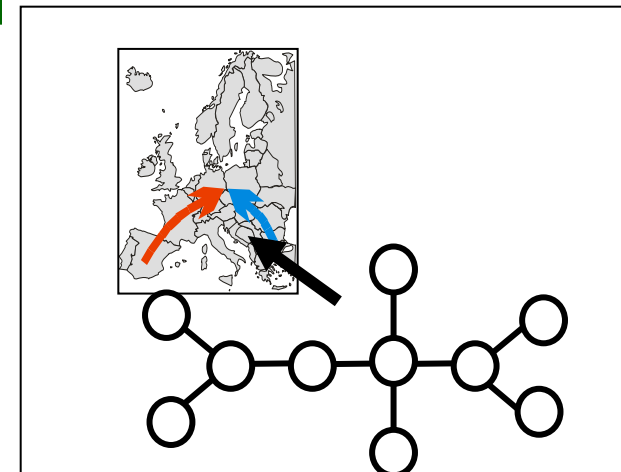
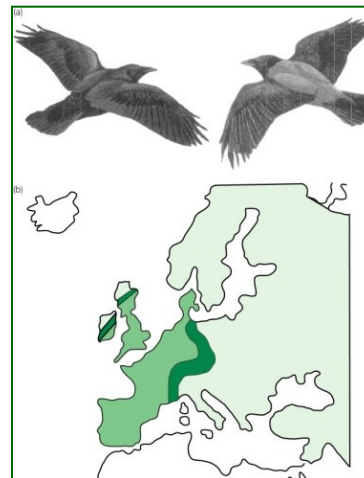
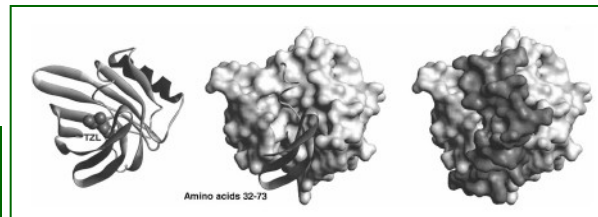
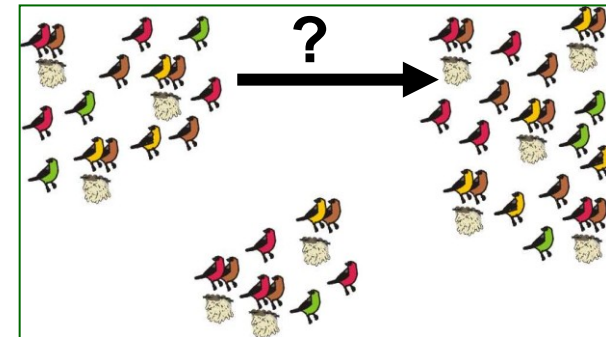
• Příbuznost (neutrální znaky)

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

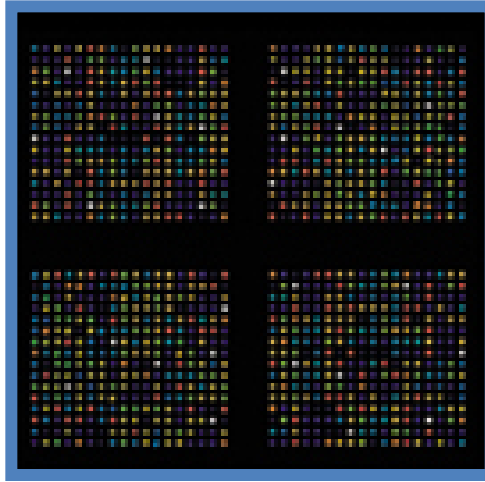
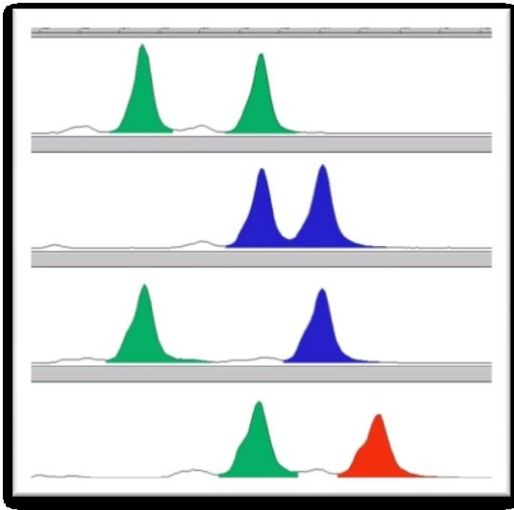


• Geny pod selekcí

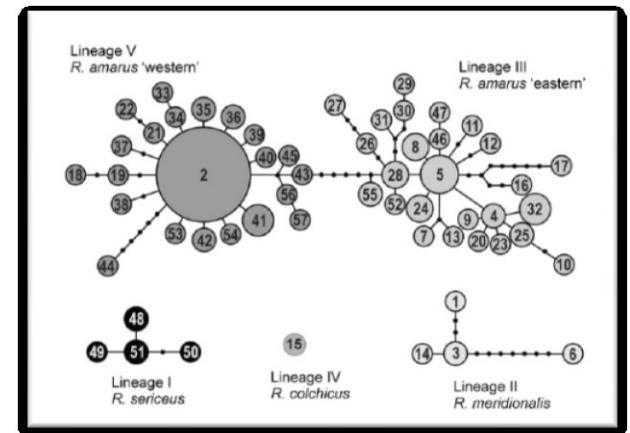
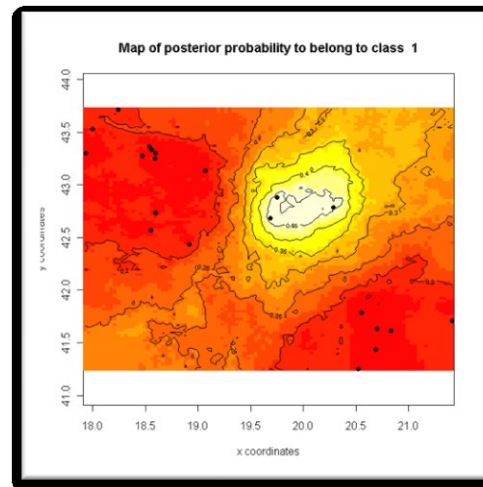
- MHC, MUP, ABP, reprodukční proteiny
- geny pro zbarvení
- detekce selekce

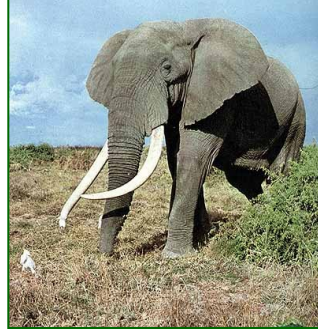


Technické výlety (omezeně)



Analýza dat





✓ Diploidní s pohlavním rozmnožováním

✓ Většinou obratlovci

✓ Budou ale i někteří bezobratlí

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



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

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

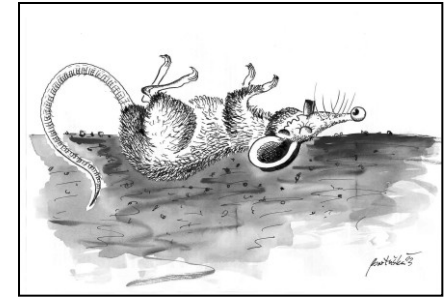
Získání genetických dat – viz Genetické metody v zoologii

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

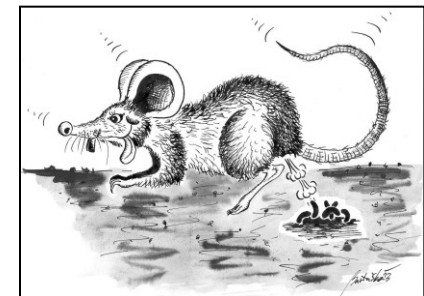
1. **destrukční** – živočich je usmrcen kvůli získání tkání potřebných na genetické analýzy



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 odchyty, manipulace či dokonce pozorování



Izolace DNA

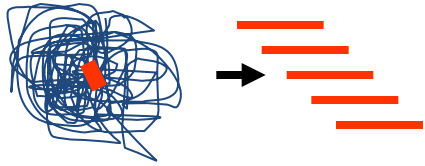
- rozmanitý biologický materiál – musí obsahovat buněčná **jádra nebo mitochondrie** s nedegradovanou DNA
- dnes většinou komerční kity
- velký vliv **fixace** vzorků

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

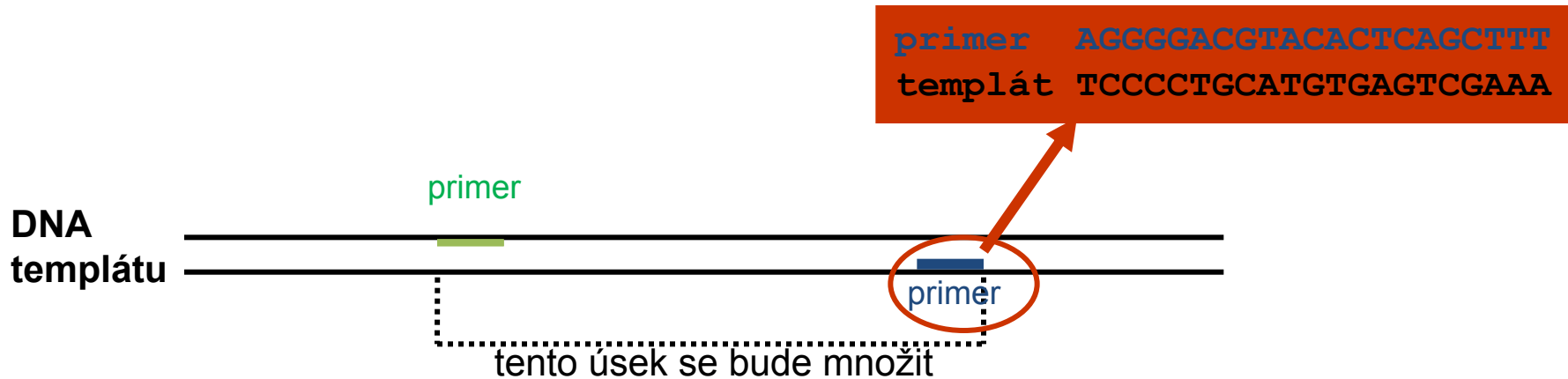
Typy genetických markerů

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



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



„Molekulárně-genetické“ metody

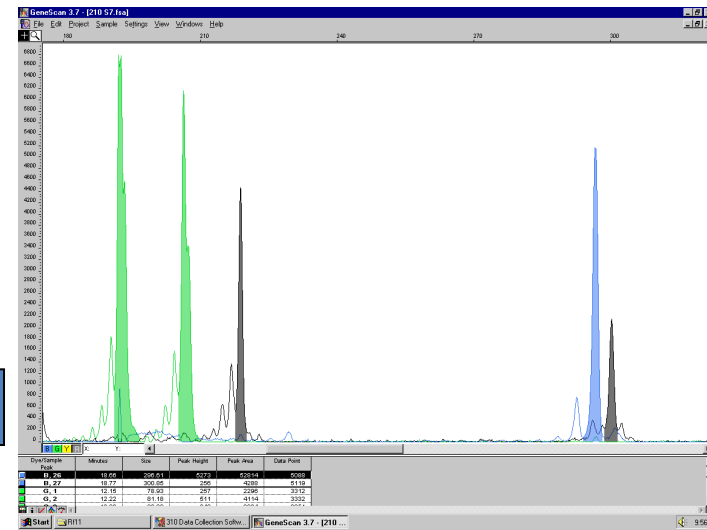
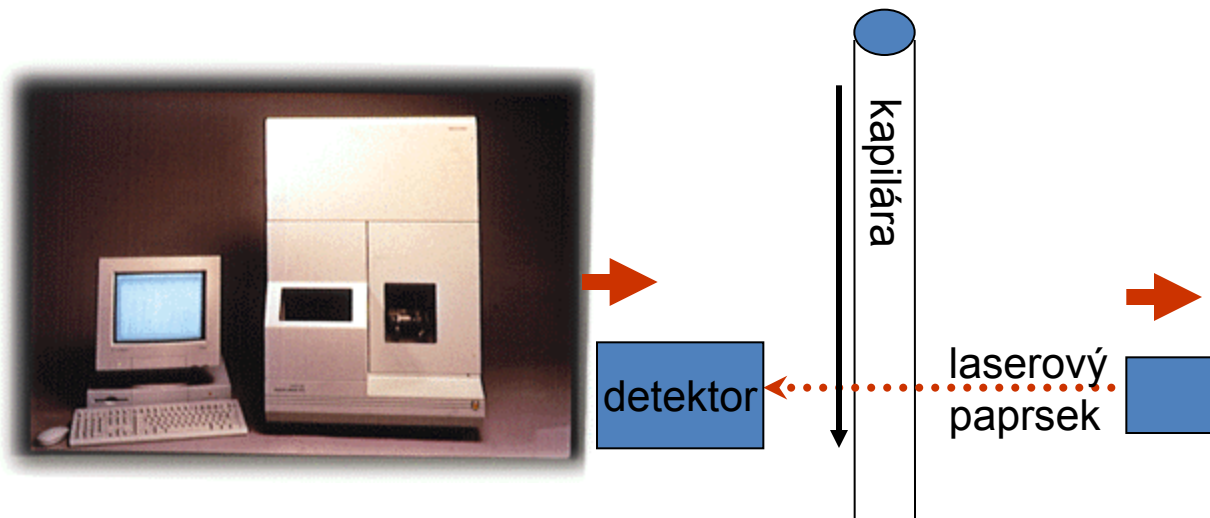
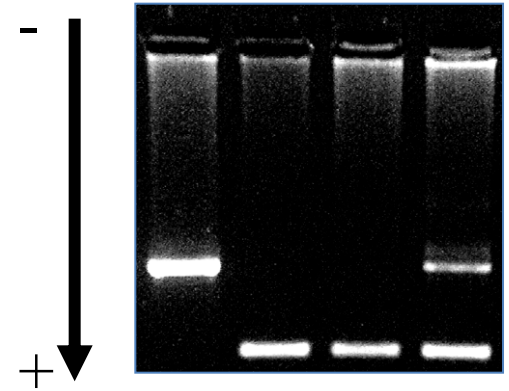
- analýza polymorfismu DNA
- délkový polymorfismus (princip mikrosatelitů)

CGCACATCTCTAGCTTCGATTCAGGAA

CGCATCTCTAGCTTTGATTCAGGAA

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)



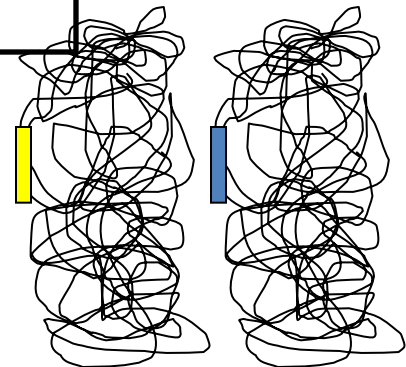
„Molekulárně-genetické“ metody

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

CGCATCTCTAGCTT**C**GATTCAGGAA

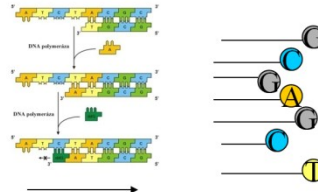
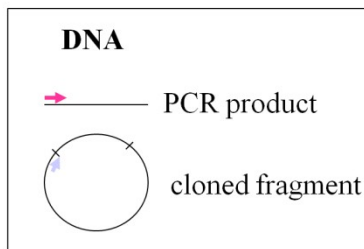
CGCATCTCTAGCTT**T**GATTCAGGAA

genotyp diploidního jedince: C/T



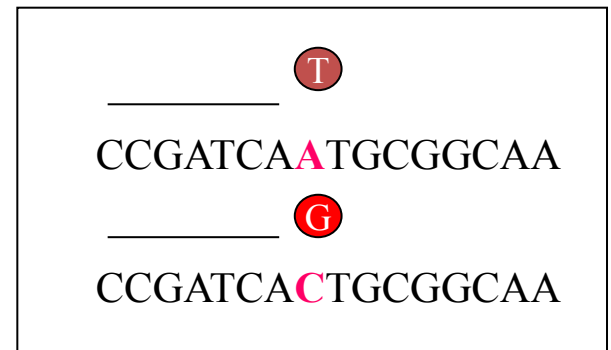
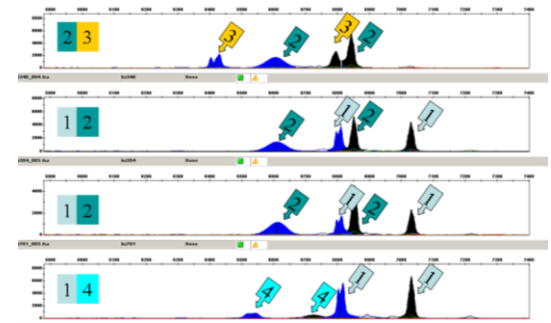
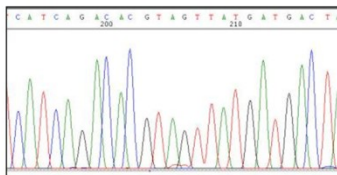
Studium variability nasyntetizovaného úseku

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



detector

laser beam
capillary
electrophoresis



formát GenAlex



Microsoft Excel - PYG_GenAlex.xls

Soubor Úpravy Zobrazit Vložit Formát Nástroje Data Okno GenALEX Nápověda

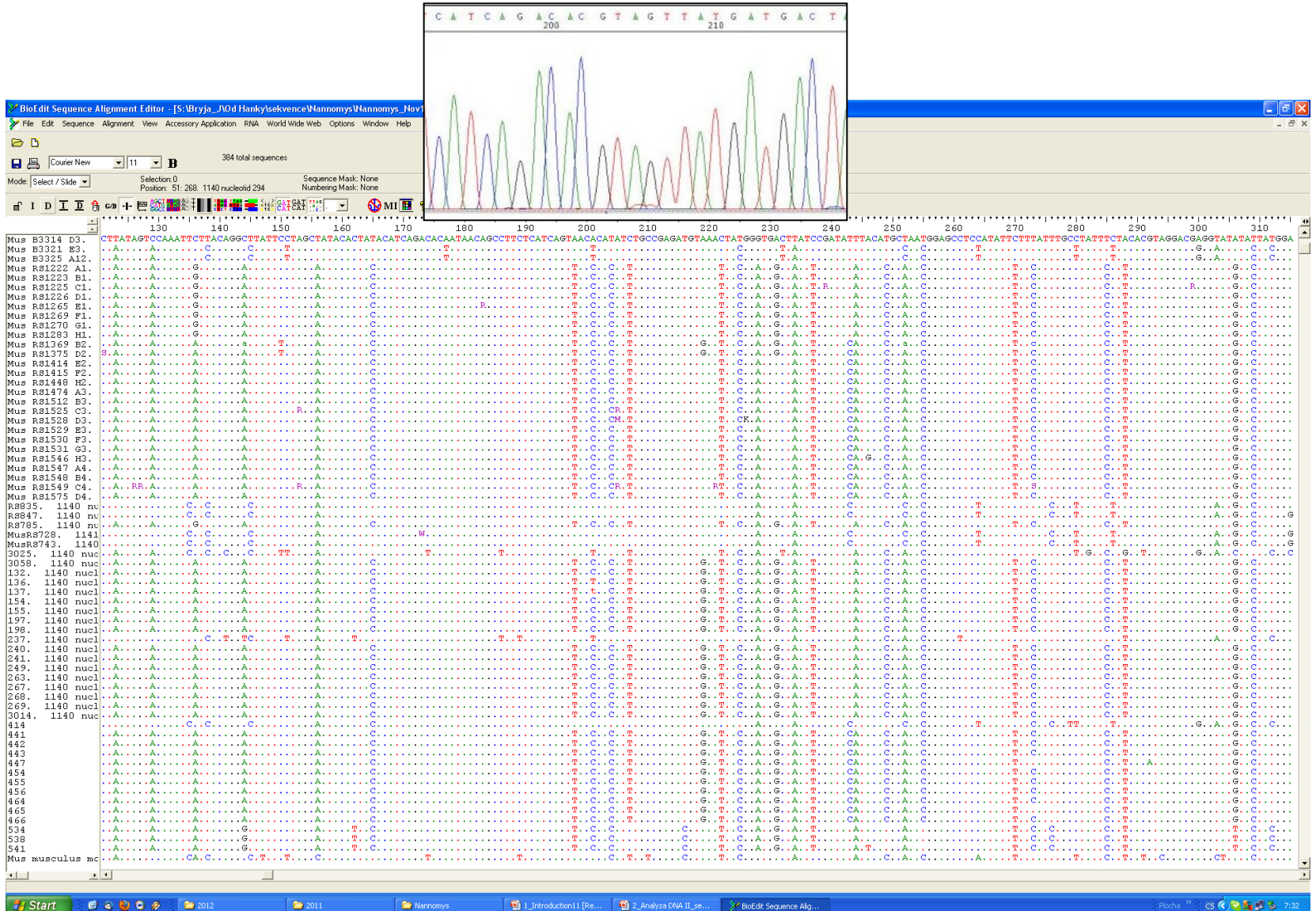
A1 f 11

	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

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
- Multilocus
 - 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

Typy získaných dat - sekvence



Tak, a co teď s těmi daty ...