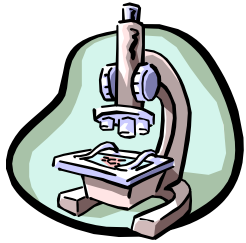


Molekulární ekologie

J. Bryja, M. Macholán, A. Konečný

Co je molekulární ekologie?

Uměle vytvořený obor vymezený technickým přístupem. Na ekologické a evoluční problémy hledá odpověď na základě molekulárně-genetických dat.



Klasické problémy
a metody evoluční
ekologie

+



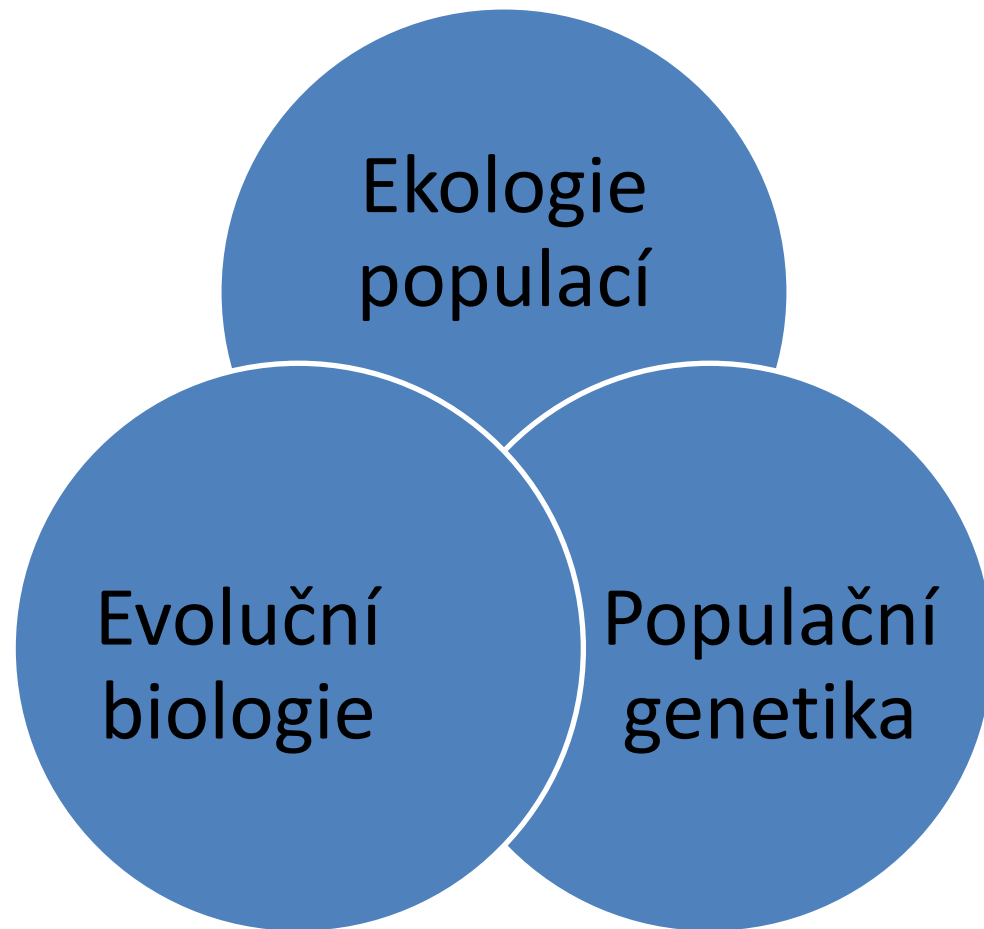
Molekulárně-genetická
data a populačně-
genetické analýzy

(Zoologové a botanici nakoupili cyklery a sekvenátory, snažili se je využít i k něčemu jinému než je fylogenetická analýza => 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*

Mezioborová disciplína



Molekulární ekologie



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

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

Její význam vzrůstá ...

- Je populární – časopis Molecular Ecology (od 1992) – dnes 24 čísel za rok
- Vyšly i její učebnice
- Na řešení velmi odlišných problémů používá obdobné metody

MOLECULAR ECOLOGY

Molecular Ecology

© John Wiley & Sons Ltd

Edited By: Loren Rieseberg
Impact Factor: 5.84

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2013: 6/46 (Evolutionary Biology); 11/141 (Ecology); 40/291 (Biochemistry & Molecular Biology)

Online ISSN: 1365-294X

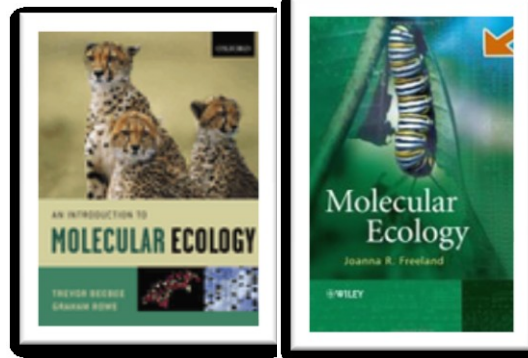
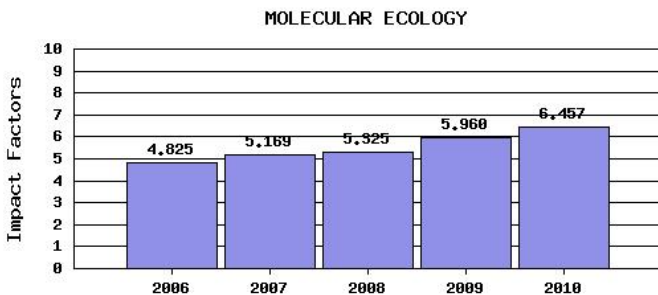
Associated Title(s): [Molecular Ecology Resources](#)

SEARCH

In this journal

Advanced > Saved Searches >

Online Open
Open Access
Option



**MOLECULAR ECOLOGY
RESOURCES**

Molecular Ecology Resources

© John Wiley & Sons Ltd

Edited By: Shawn Narum
Impact Factor: 5.626
ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2013: 7/46 (Evolutionary Biology);
13/141 (Ecology); 46/291 (Biochemistry & Molecular Biology)
Online ISSN: 1755-0998
Associated Title(s): [Molecular Ecology](#)

SEARCH

In this journal

Advanced > Saved Searches >

Molecular and Statistical Advances

These papers primarily present **new techniques for collecting and analysing data for molecular ecology** studies. These submissions can also describe meaningful comparisons of statistical, computational or molecular methods, or alternatively demonstrate the existence of important problems with current procedures.

Computer Programs

These articles typically present **new computer software or substantial updates of existing programs**. Authors should clearly describe the need for the program and the rationale behind its design, as well as a summary of functions, usage and output. When relevant, authors should present an evaluation of a program's performance compared to existing software based on real or simulated data. Programmers are urged to remember that 'user-friendly' programs are more likely to be used by the community, and that it is helpful if programs require standard input/output file formats (e.g., Genepop or Arlequin). Submissions should include a user manual or README file with adequate guidance for new users. Software and supporting documentation should be accessible from a long-term server (e.g., github), but can additionally be made available at academic websites.

Permanent Genetic Resources

These articles describe the development of **significant genetic resources for application to evolutionary or ecological questions**. For example, these papers could describe NGS projects in which **sequenced transcriptomes, genome fractions or whole genomes** have been analyzed such that a readily usable resource is presented to the molecular ecology community. These articles may also present data on novel applications of the **standard DNA barcoding loci to a hundred or more species**, where the paper presents a readily usable resource.

+ **Invited technical reviews, Opinions, etc.**

Proč používat molekulární metody v ekologii?

Research areas of interest to *Molecular Ecology* include:

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

větš žijících druhů

jedince

ř. imunitní geny)

Obsah přednášek

- 1. Úvod. Co je a co není molekulární ekologie? Vymezení oboru, překryv s jinými obory, stručná historie. Genetická variabilita v přírodních populacích, hlavní používané terénní a laboratorní metody. Sběr a uchování vzorků, metody zjišťování genetického polymorfismu u volně žijících živočichů, genetické markery. (JB) - 19.2.2015
- 2. Genetická identifikace. DNA barcoding a jeho problémy - kryptické druhy a hybridizace, identifikace jedince a pohlaví molekulárními metodami, genetický fingerprinting, genetické chiméry, CHD geny u ptáků, chromosom Y u savců. (JB) - 26.2.2015
- 3. Aplikace molekulárních metod v behaviorální ekologii. DNA barcoding při analýzách potravy. Analýzy příbuzenských vztahů a párovacích systémů, jednoduché vyloučení, categorical x fractional likelihood, přehled dostupných programů. Určení otce, matky nebo obou dvou. Minimální počet rodičů vrhu nebo snůšky. Vzdálenější příbuznost. Genetická identifikace disperze a migrace, sex-biased dispersal, assignment test. (JB) - 5.3.2015

Obsah přednášek

- 4. Rekonstrukce fylogeneze - Základní fylogenetické principy a programy pro analýzu DNA sekvencí. Likelihood, Bayesiánské metody, koalescenční přístup. (MM) - 12.3.2015
- 5. Rekonstrukce fylogeneze - ekologické analýzy s využitím fylogenetické informace. Fylogenetické kontrasty a komparativní metody. (MM) - 19.3.2015
- 6. Populační genetika: studium genetické diverzity. Důsledky Hardy-Weinbergova pravidla, změny alelických frekvencí (mutace, migrace, selekce, efektivní velikost populace, genetický drift). (AK) - 26.3.2015
- 7. Populační genetika: analýza populační struktury. Wahlundův princip, F-statistiky, AMOVA, Bayesiánské shlukování v programu STRUCTURE. (AK) - 2.4.2015
- 8. Prostorová genetika. Isolation by distance, Bayesiánské prostorové klastrování - příklady s využitím dostupných programů (Geneland, BAPs). Invazní genetika. (AK) - 9.4.2015

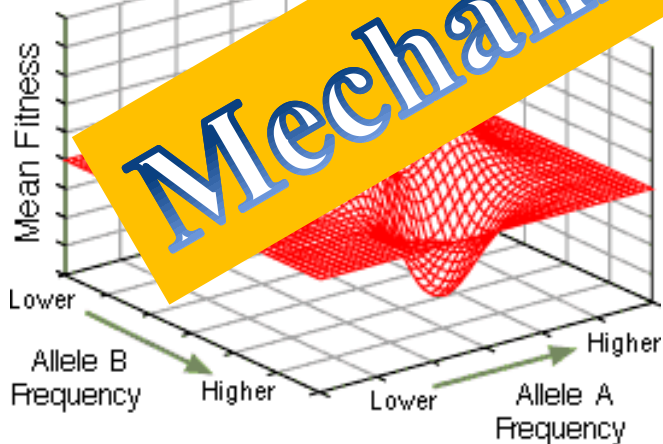
Obsah přednášek

- 9. Rekonstrukce populační historie - změny efektivní velikosti populace (bottleneck, expanze), detekce "admixture", atd. ABC přístup. (AK) - 16.4.2015
- 10. Fylogeografie: genetická historie rozšíření druhu. Výhody mitochondriální DNA a její alternativy (Y chromosom), refugia a kolonizační cesty, genetický drift vs. tok genů, fylogeografie a koevoluce. (MM) - 23.4.2015
- 11. Hybridizace v přírodě, hybridní zóny. Konstrukce klíny, selekce proti hybridům, rozdíly v introgresi různých částí genomu. (MM) - 30.4.2015
- 12. Ochranařská genetika. Neinvazivní genetické metody, probability of identity, bottleneck, důsledky fragmentace populací, evolučně-signifikantní jednotky, inbreeding, "genetic rescue", lokální adaptace, inbrední a outbrední deprese. (JB) - 7.5.2015
- 13. Geny a jejich biologická funkce - příklady funkčních genů a jejich význam v ekologii. Adaptivní variabilita, imunogenetika, geny a komunikace, detekce selekce na molekulární a populační úrovni, využití -omics metod v ekologii, "gene ontology". (JB) - 14.5.2015

Vychází z populační genetiky

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

Sewall Wright
adaptivní krajina

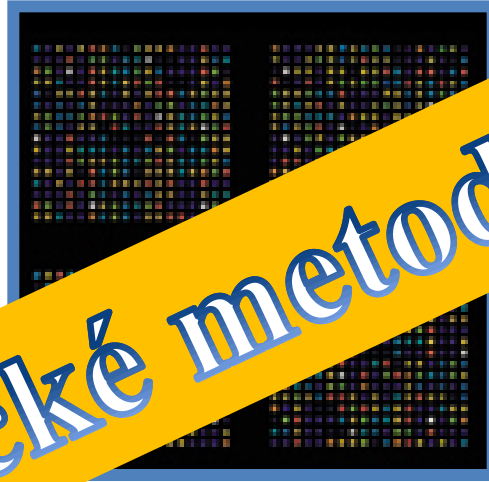
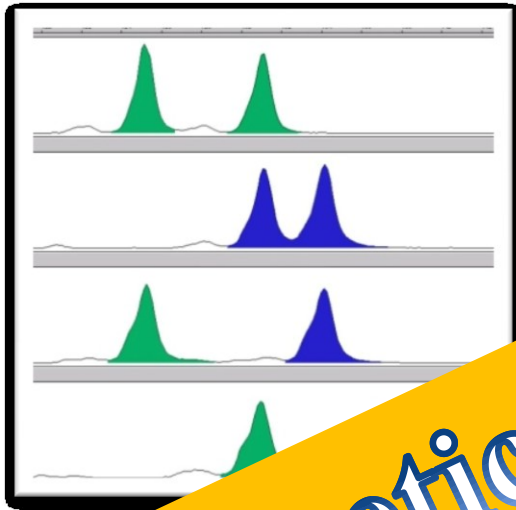


Mechanismy mikroevoluce

John B. S. Haldane

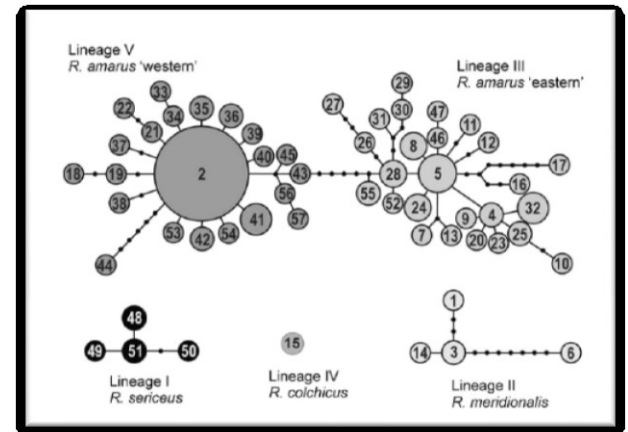
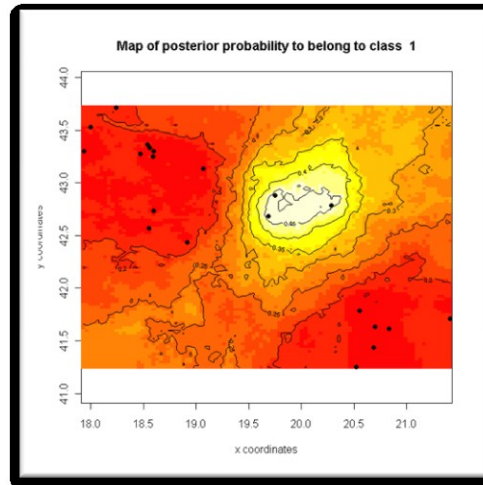


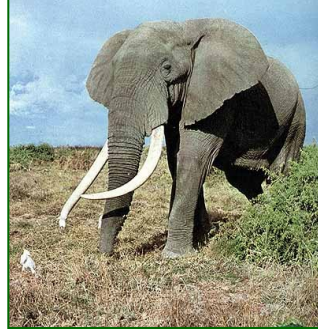
Technické výlety (omezeně)



Genetické metody v zoologii

Analýza dat





✓ Diploidní s pohlavním rozmnožováním

✓ Většinou obratlovci

✓ Budou ale i někteří bezobratlí

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



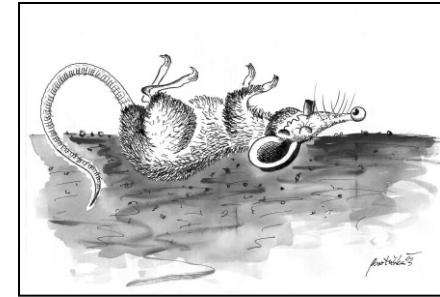
Získání genetických dat – viz Genetické metody v zoologii

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

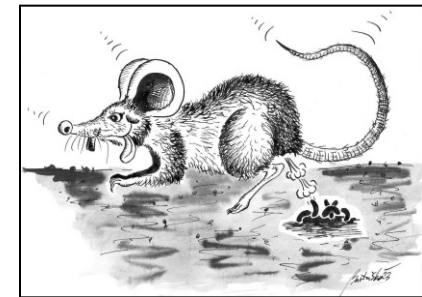
1. **destrukční** – živočich je usmrcen kvůli získání tkání potřebných na genetické analýzy



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

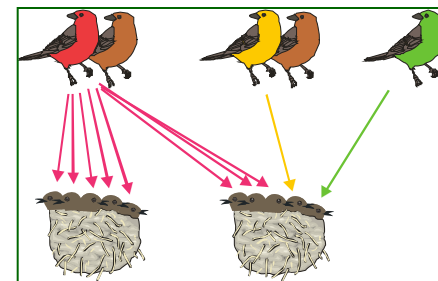
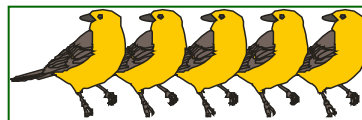
Typy genetických markerů

- *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

Různé otázky – různé přístupy

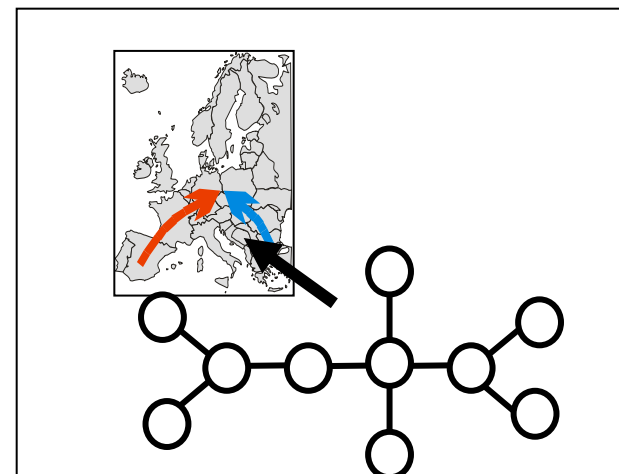
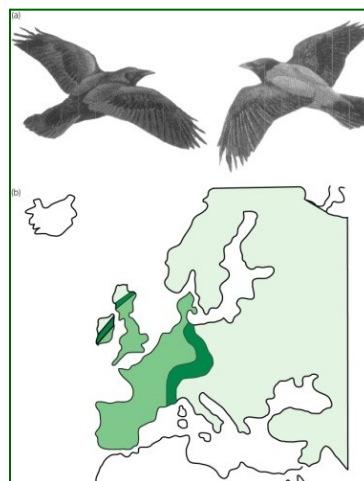
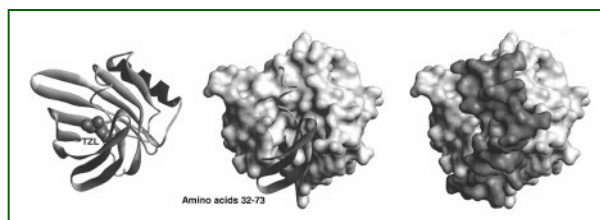
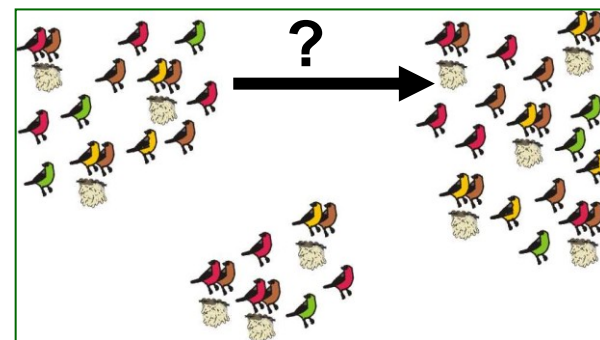
• Příbuznost (neutrální znaky)

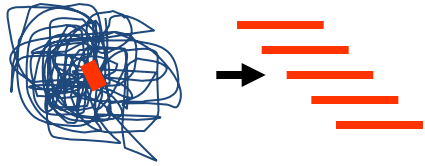
- identita (stopy stejného jedince, klony)
- paternita, vzdálenější příbuzní
- vztah populací (izolovanost, výměna migrantů)
- fylogeografie (historie šíření)
- hybridizace, hybridní zóny



• Geny pod selekcí

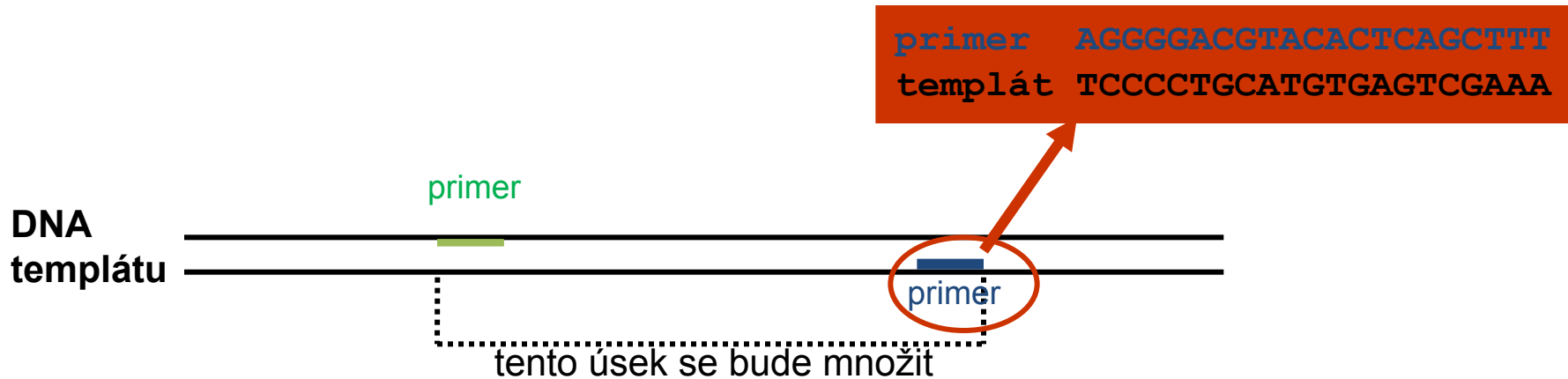
- MHC, MUP, ABP, reprodukční proteiny
- geny pro zbarvení
- detekce selekce





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

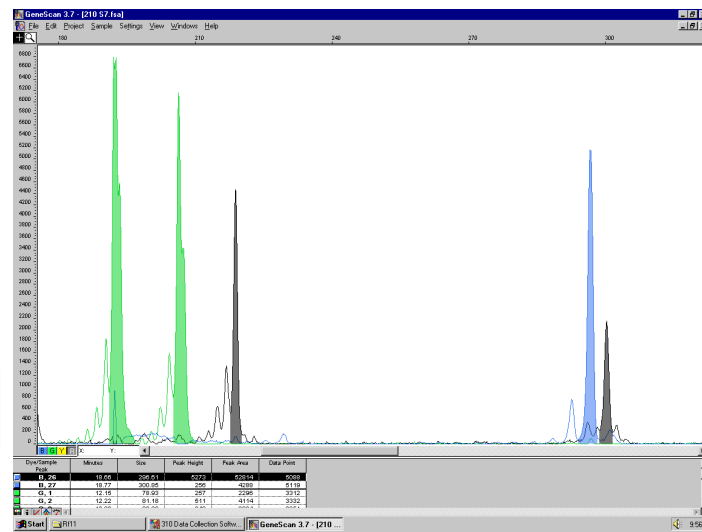
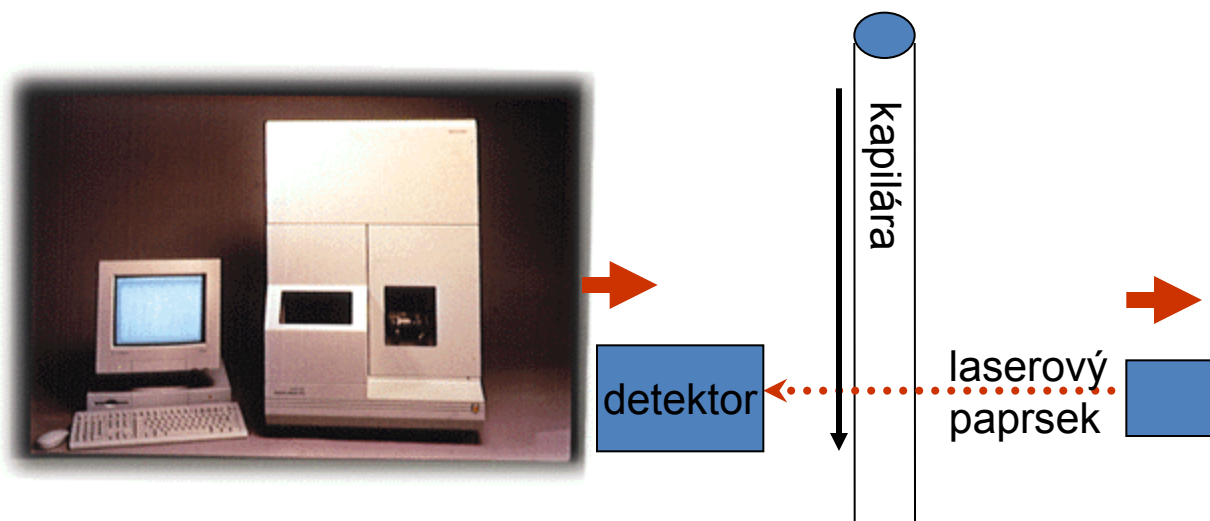
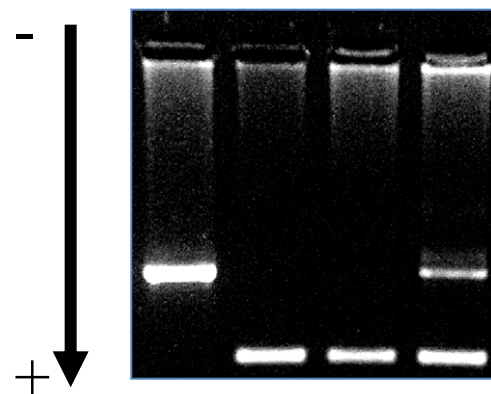
- analýza polymorfismu DNA
- délkový polymorfismus (princip mikrosatelitů)

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)



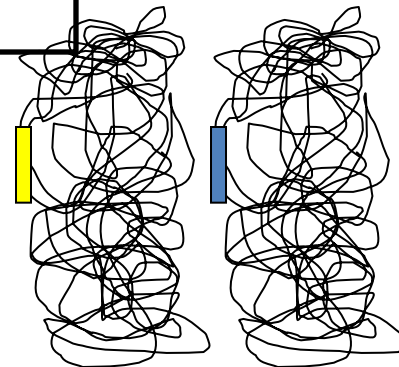
„Molekulárně-genetické“ metody

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

CGCATCTCTAGCTT**C**GATTCAGGAA

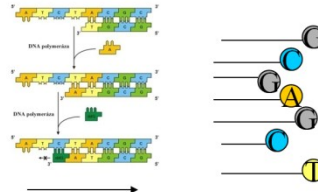
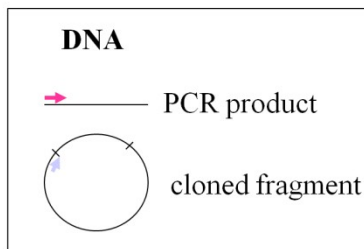
CGCATCTCTAGCTT**T**GATTCAGGAA

genotyp diploidního jedince: C/T



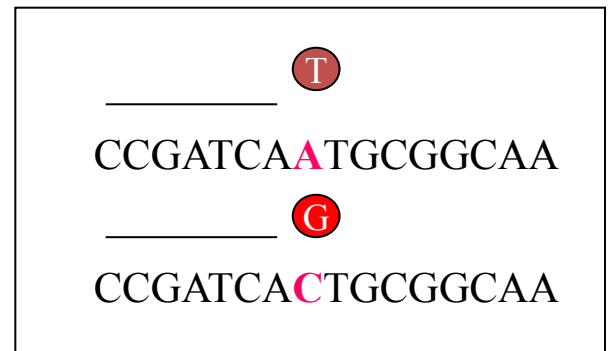
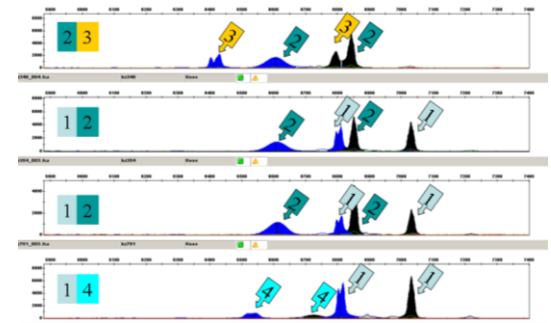
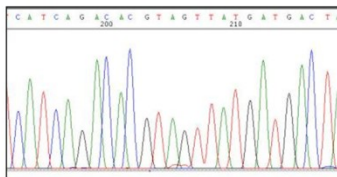
Studium variability DNA fragmentů, které se neliší délkou

- 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



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	-	-

Typy získaných dat – kodominantní znaky

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	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	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	genotypy, tj. velikosti fragmentů v populaci																							76500	17.00750											
17	TYN14	TYN	162	genotypy, tj. velikosti fragmentů v populaci																							76500	17.00750											
18	TYN15	TYN	156	genotypy, tj. velikosti fragmentů v populaci																							76500	17.00750											
19	TYN16	TYN	168	genotypy, tj. velikosti fragmentů v populaci																							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													

pop1

pop2

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

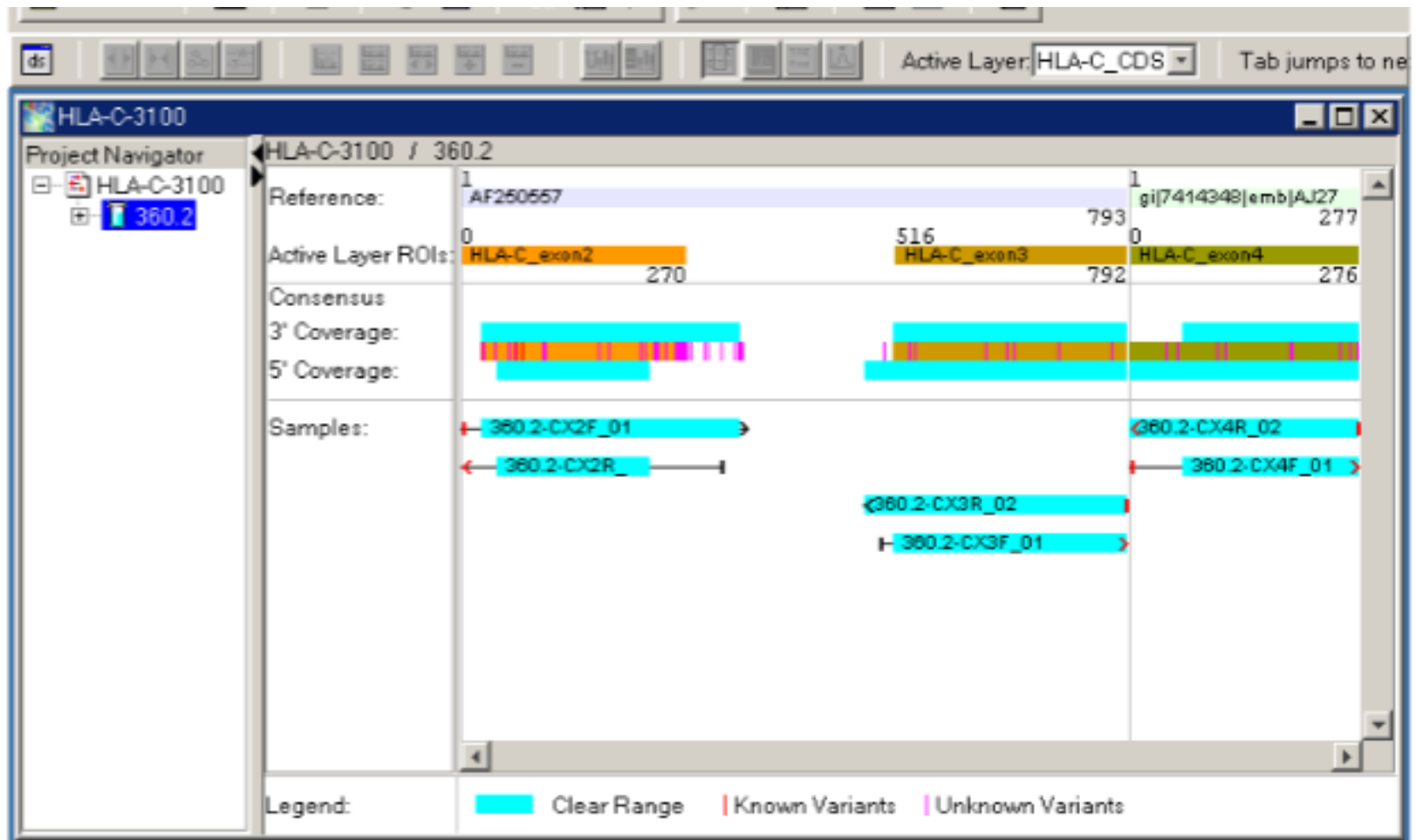
Frequency...
HWE...
Distance
AMOVA...
Mantel...
PCA...
Assignment
Spatial
Relatedness
Multilocus
Template
Create
Parameters
Data
Import Data
Raw Data
Edit Raw Data
Export Data
Graph
Stats
Options

EF6 Paur05 NN18

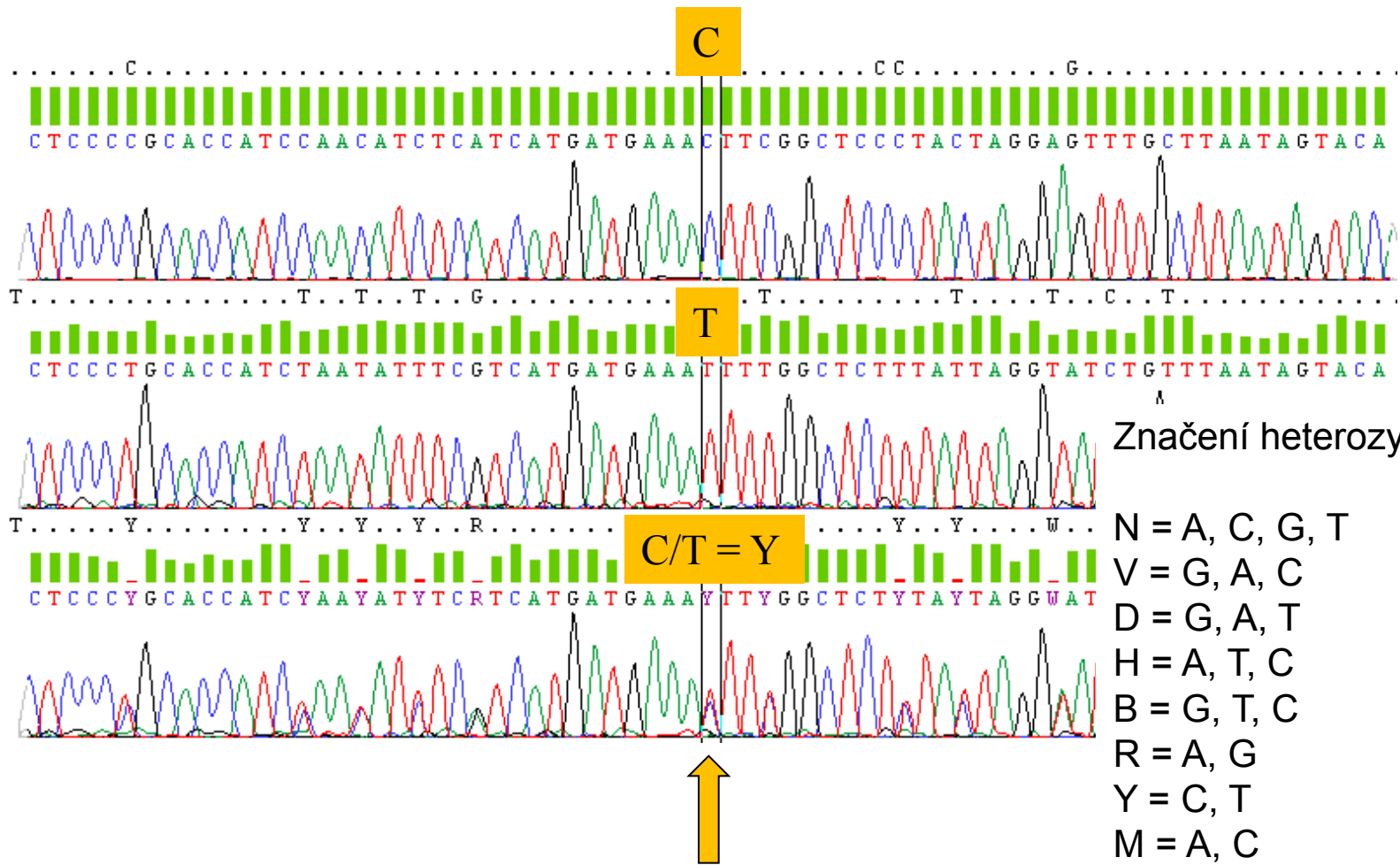
247 174 188 249 251 287
245 182 188 247 249 287
0 184 190 249 249 283
243 184 190 247 249 283
241 182 188 247 253 0
243 184 186 253 253 295
241 190 190 249 249 285
240 178 186 249 249 287
230 184 188 249 255 287
245 184 186 245 247 285
0 182 190 251 257 289
220 186 186 249 251 293
243 178 186 249 251 287
220 178 182 253 253 285
220 178 182 249 251 285
249 289
255 289
249 289
249 285
255 287
249 285
253 287
253 285
255 283
255 289
255 295
255 291
253 285
255 285
253 285
255 289
251 285
247 285
255 287
249 287
245 287

Typy získaných dat – sekvence DNA

„Alignment“ → contig (ze stejného jedince)



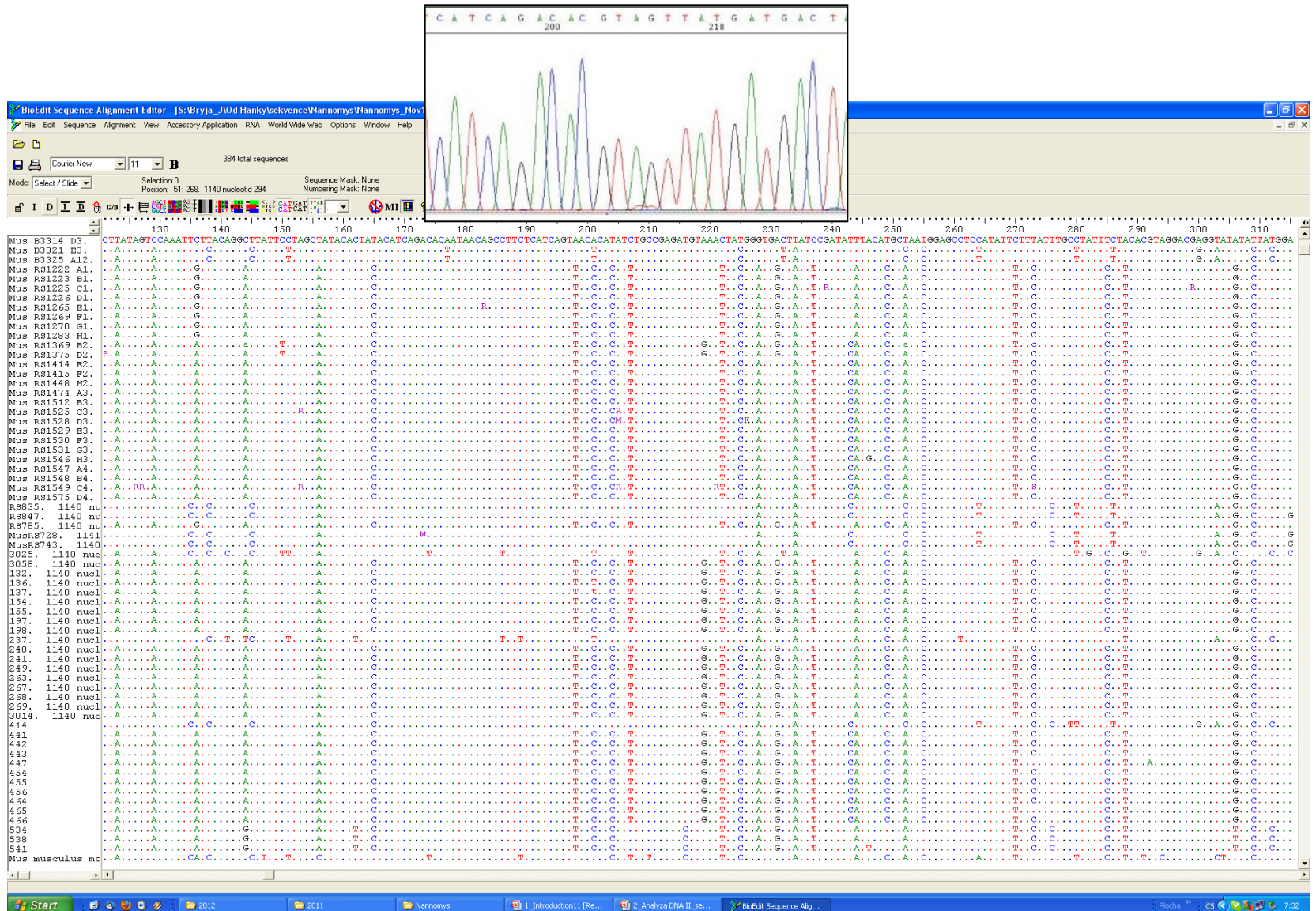
Alignment sekvencí z různých jedinců – analýza polymorfismu



Značení heterozygotů

- N = A, C, G, T
- V = G, A, C
- D = G, A, T
- H = A, T, C
- B = G, T, C
- R = A, G
- Y = C, T
- M = A, C
- K = G, T
- S = G, C
- W = A, T

Typy získaných dat - sekvence



Tak, a co teď s těmi daty ...