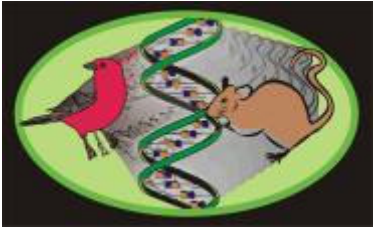


# Molekulární ekologie



# Co je molekulární ekologie?

**Uměle vytvořený obor vymezený technickým přístupem.**

**Na ekologické problémy hledá odpověď pomocí molekulárních metod.**

Pracuje na úrovni genom, jedinec, populace, skupina populací.

Je to vlastně aplikovaná populační genetika.

## **Proč používat molekulární metody v ekologii?**

### **Často nelze jinak**

paternita – páření často skryté a nemusí vést k oplození

identifikace z trusu, chlupů - pohyb jedinců skrytě žijících druhů

izolace populací – nemusí být zřejmá

počet migrantů – nelze sledovat naráz všechny jedince

# Nicméně

- Molekulární ekologie je překvapivě kompaktní

- Je populární



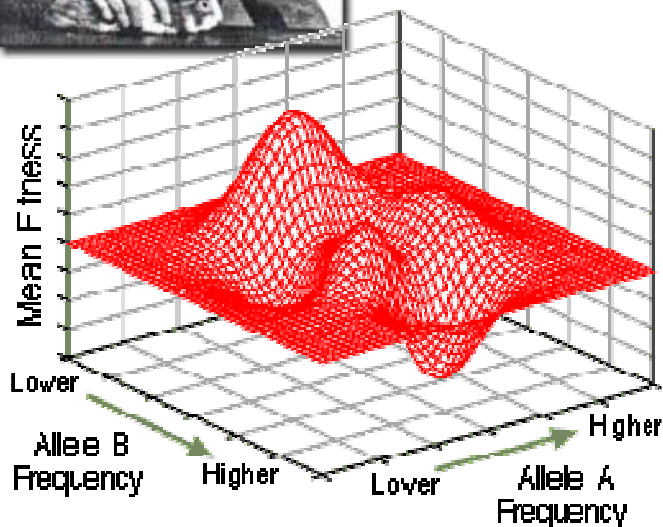
- Vyšly učebnice,  
již několik let vychází časopis *Molecular Ecology*
- Na řešení velmi odlišných problémů používá obdobné metody  
(často i obdobné alternativy – difuzní x koalescenční přístup)
- Snad se dá tedy i přednášet

# Vychází z populační genetiky

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



Sewall Wright  
adaptivní krajina



Ronald  
Fisher



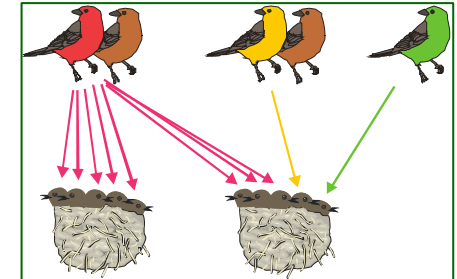
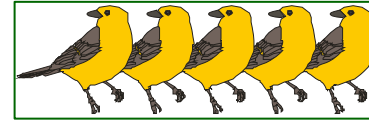
J. B. S. Haldane



# Konkrétní příklady

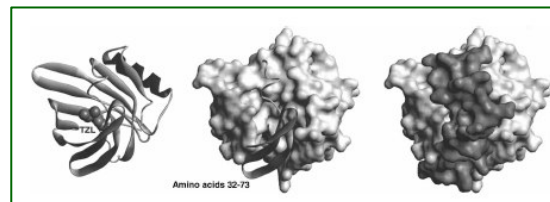
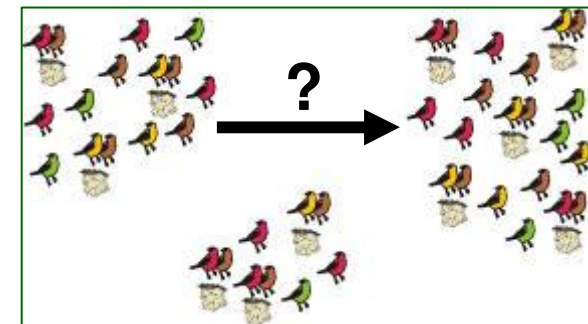
- Příbuznost (neutrální znaky)

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

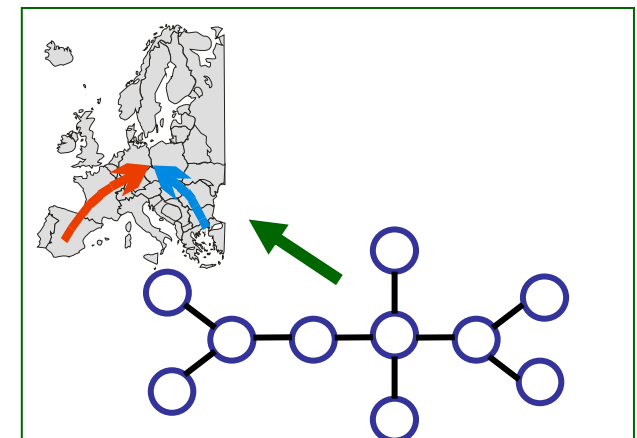
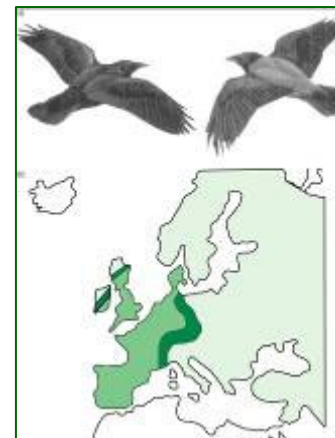


- Geny pod selekcí

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



- Genetická historie člověka, Ochranařská genetika



# Metody

- **historie:**

alozymy, RFLP, DNA fingerprinting

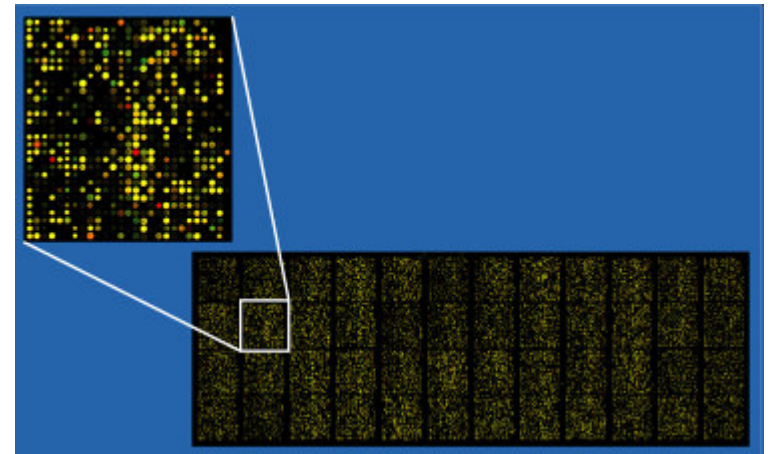
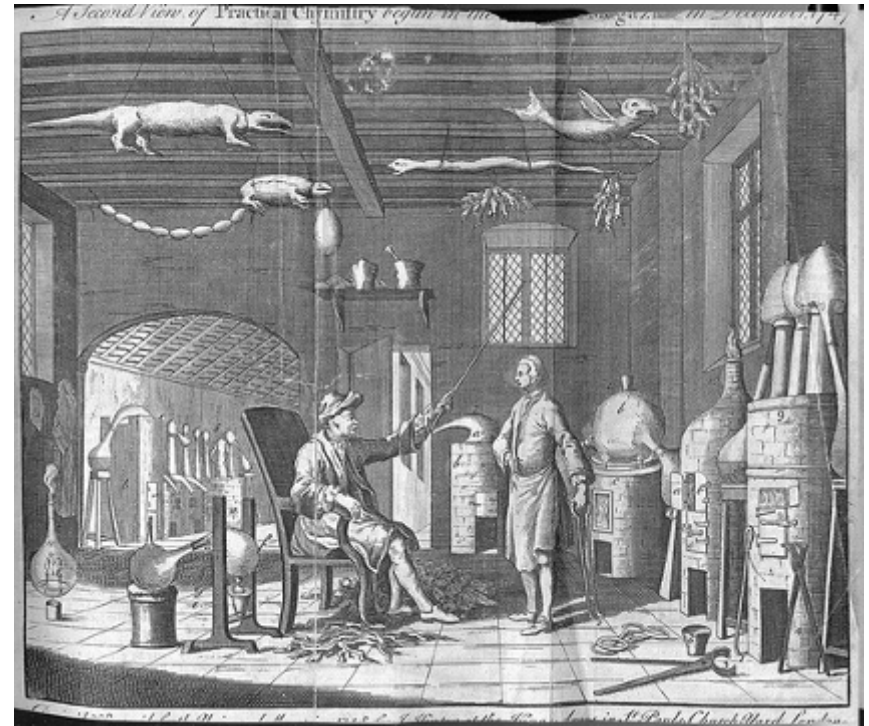
- **dnes převážně:**

sekvence, mikrosatelity, SNP

DNA → PCR → sekvenátor

- **Budoucnost, vlastně už přítomnost:**

mikrochipy? Celé genomy?



# PCR

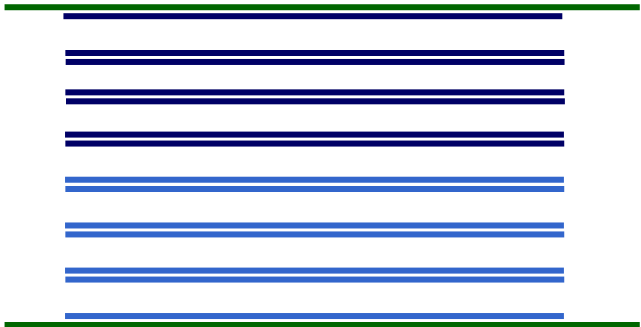
Polymerase chain reaction

(jak z málo DNA udělat hodně)

Ochlazení – nasednutí primerů



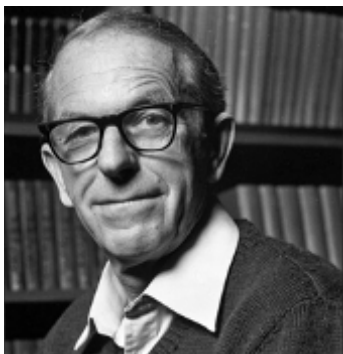
72 °C vznik nových fragmentů



95 °C denaturace

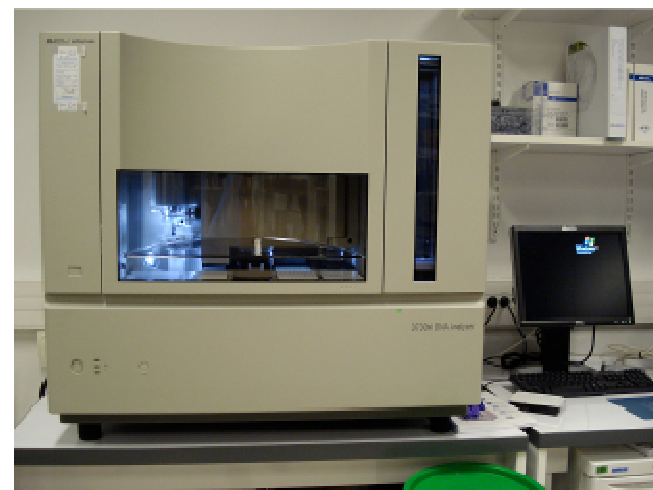
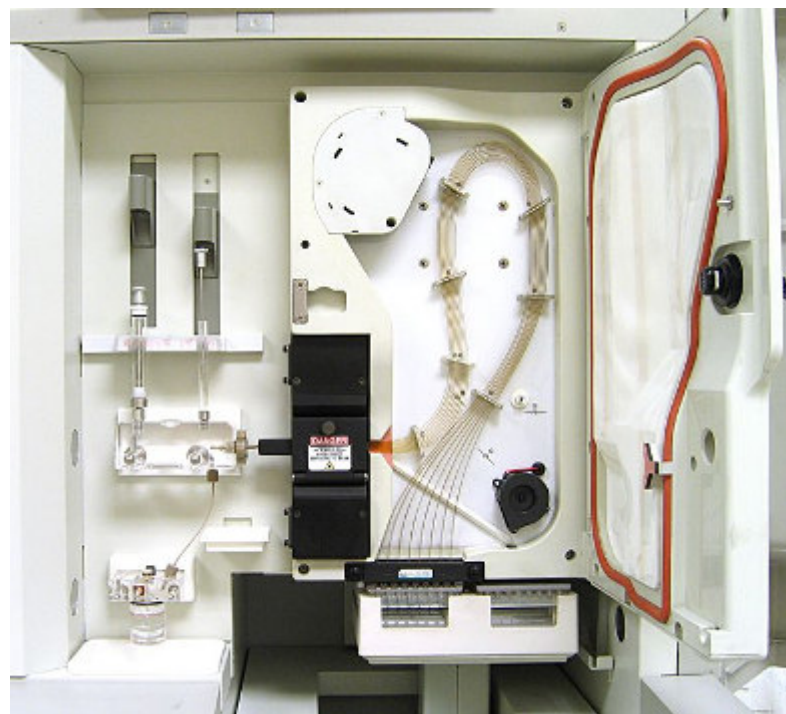









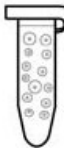


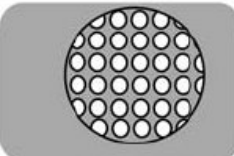
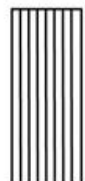
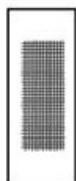
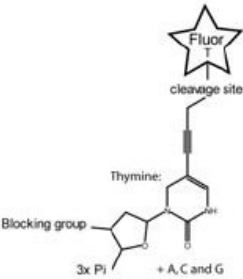
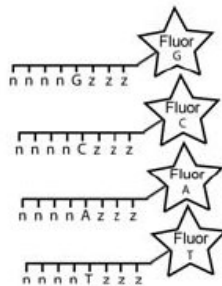
## Sekvenování

- **Sangrova dideoxy metoda**
- Sekvence délky 500 – 1000 bp
- 4 kapiláry - destička s 96 vzorky za noc
- Jsou i sekvenátory s 96 kapilárami



# „Next generation“ sequencing



	454 pyrosequencing	Solexa SBS sequencing	Agencourt / ABI SOLiD polony sequencing
All methods ligate single, randomly sheared DNA molecules to support			
DNA support	 25–36 μm bead	surface of flow cell 	 ~1 μm bead
Amplification	 emulsion-phase PCR	 <i>in situ</i> PCR on solid surface	 emulsion-phase PCR
Sequencing surface	 1 600 000 well plate one bead per well	 8-channel flow cell clusters of DNA randomly located	 Single slide imaged in panels beads random
Sequencing chemistry	<p>Nucleotide incorporation</p> <p>↓</p> <p>PPI</p> <p>ADP + Sulfurylase</p> <p>ATP</p> <p>Luciferin Luciferase → light</p> <p>pyrosequencing</p>	<p></p> <p>Thymine: Blocking group 3x Pi + A, C and G</p> <p>reversible-terminator sequencing by synthesis</p>	<p></p> <p>Fluor G Fluor C Fluor A Fluor T</p> <p>Ligation of sequence-specific labeled oligos</p>
Sequence detection	Chemiluminescence (one channel)	Fluorescence (four channel)	Fluorescence (four channel)
Read length and number	100–400 bp > 2 x 10 <sup>5</sup> reads	35 bp ~ 4 x 10 <sup>7</sup> reads	25 bp (paired) > 10 <sup>7</sup> reads

# Co může být zdrojem DNA?

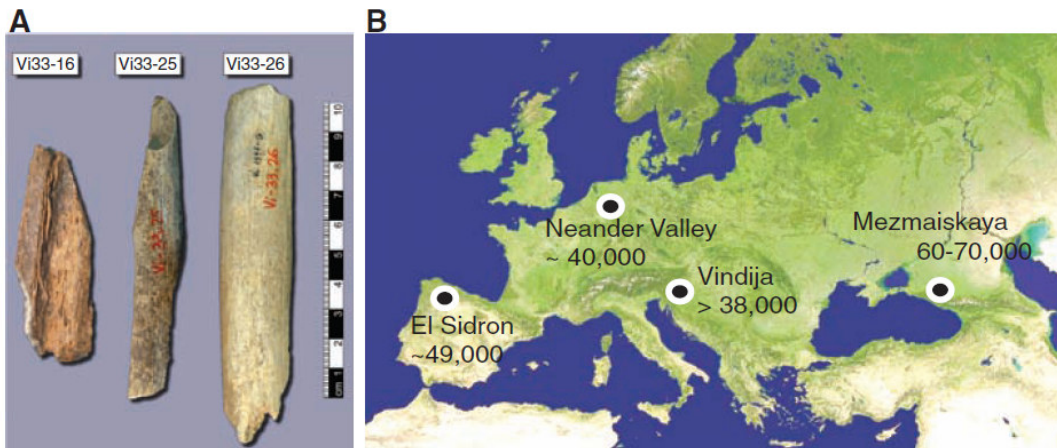
- Obecně jakékoliv živé a často i vysušené nebo zmrzlé buňky s jádrem
- Kromě tkání (optimální je slezina) lze použít např. krev, bukalní stěry, trus, vytržené peří nebo chlupy, zbytky blan z vajíček, svlečky, obsah žaludku...
- S klesající kvalitou a kvantitou však roste riziko kontaminace!

# Fosilní DNA

- Neandrtálci, mamuti, hmyz v jantaru
- Stáří až desítky tisíc let
- Výhodou je nízká teplota (zmrzlá půda)
- Vyžaduje to speciální přístup (specielně vybavenou laboratoř)
- Vysoké riziko kontaminace
- DNA poškozená → většinou jen krátké sekvence mitochondriální DNA



- Dnes projekty na celé genomy
- Neandrtálec
- 5 kompletních mtDNA genomů 2009
- První verze celého genomu 2010
- <http://www.eva.mpg.de/neandertal/index.html>
- Zřejmě občasné křížení

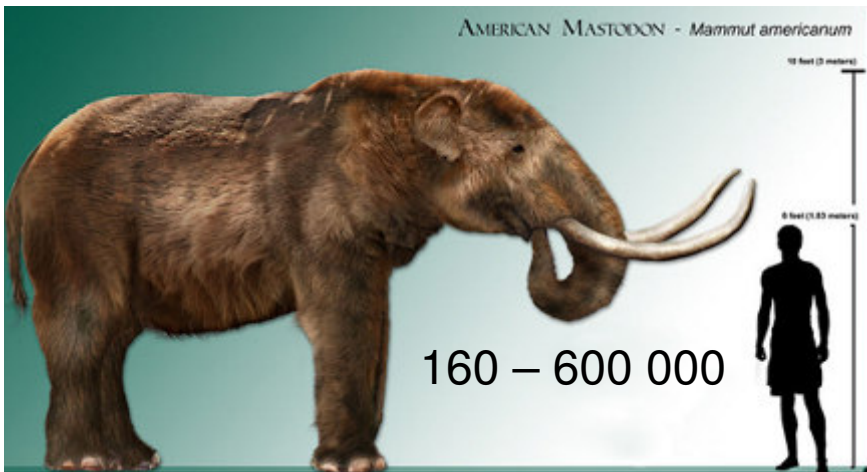


**Fig. 1.** Samples and sites from which DNA was retrieved. **(A)** The three bones from Vindija from which Neandertal DNA was sequenced. **(B)** Map showing the four archaeological sites from which bones were used and their approximate dates (years B.P.).

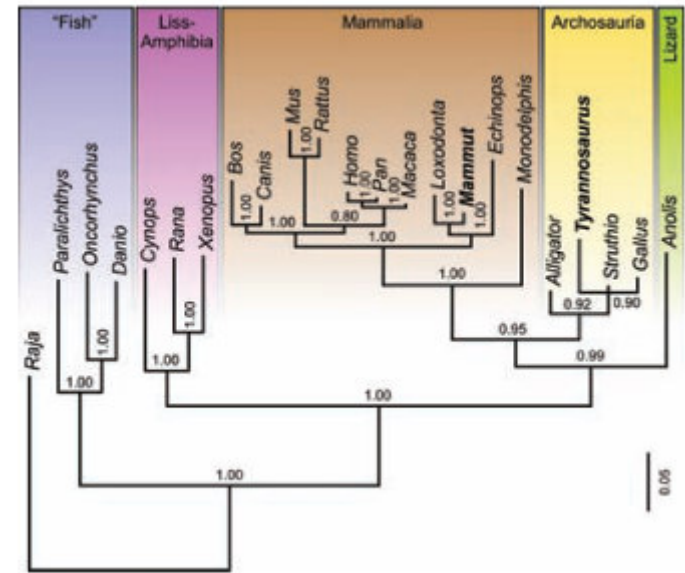
68 milionů let



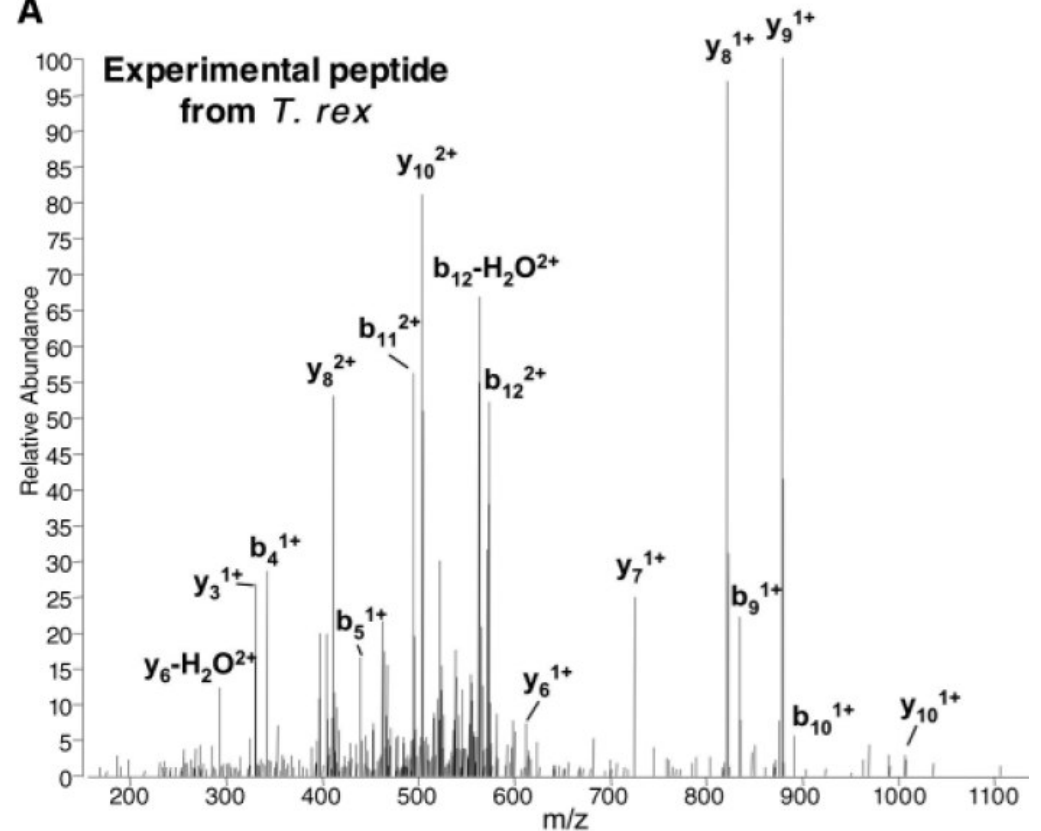
*Mastodon and T. rex*



- Hmotnostní spektrometrie
- Přímá sekvence proteinů

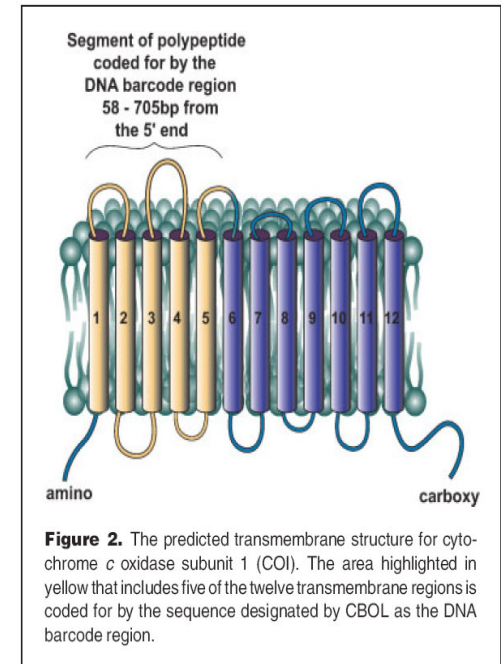
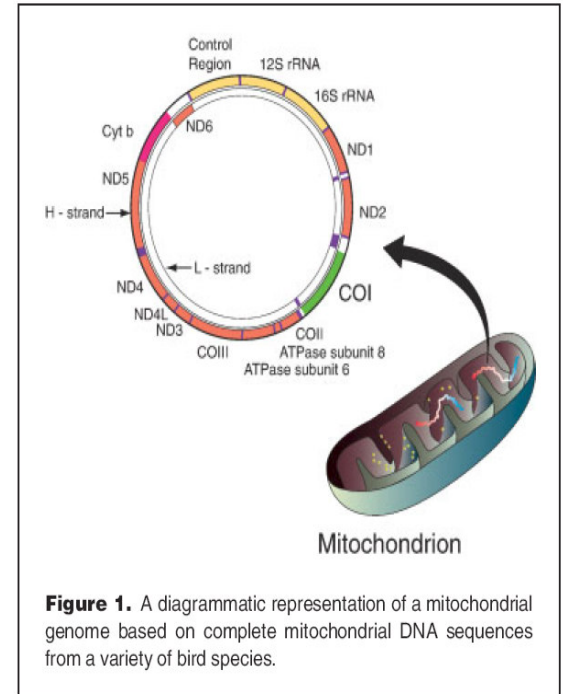
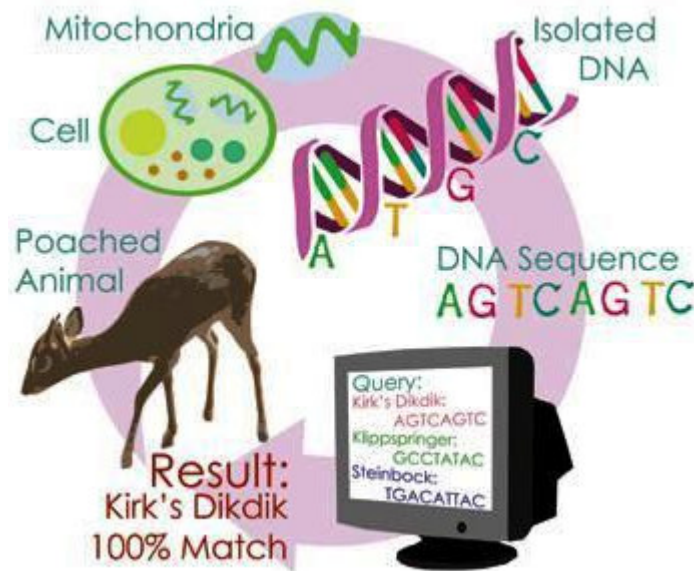


A



# Identifikace druhu

- **DNA barcoding**
  - taxon identification using a standardized DNA region
- **COI**
- (rostliny – jiné geny)





*Janzen et al 2009*



- Costa Rica
- 3 500 druhů morfologicky determinovaného hmyzu
- 100 000 jedinců
- COI
- Jen 1% druhů nelze rozlišit dle sekvencí
- Chyba v zařazení do druhu - nulová







- Kryptické druhy
- Liší se ekologickými nároky

Soumračníci *Hesperiidae* z jednoho mimetického okruhu určeni jako samostatné druhy pomocí barcodingu.



# Jejich housenky

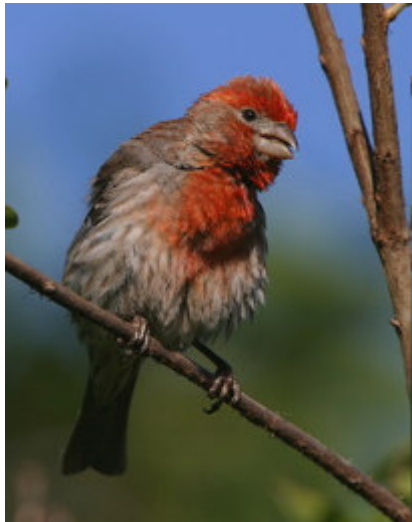


Morfologicky podobní oligofágní lumčiči rodu *Apanteles* rozdělení do druhů dle barcodingu a jejich hostitelé



## DNA barcoding – další využití

Určení druhu, potravy, parazitů...

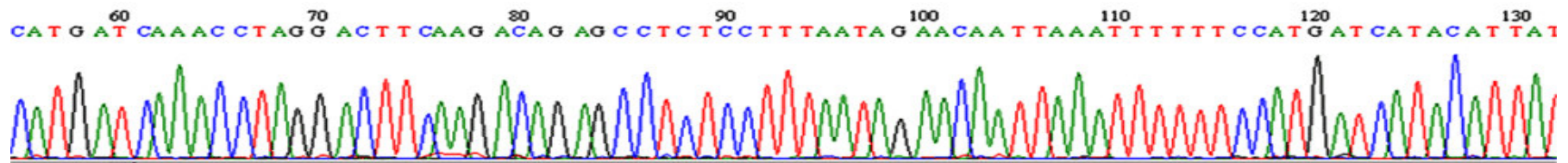
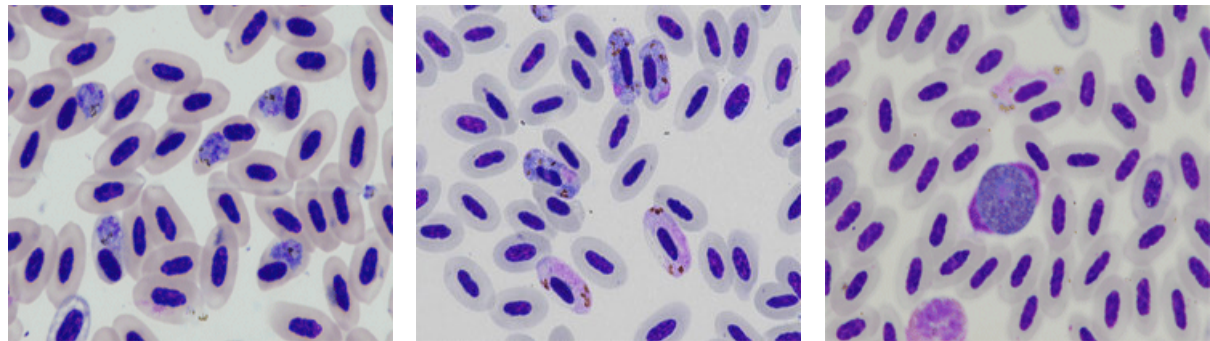


Ptačí „malárie“

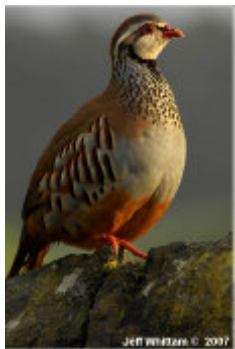
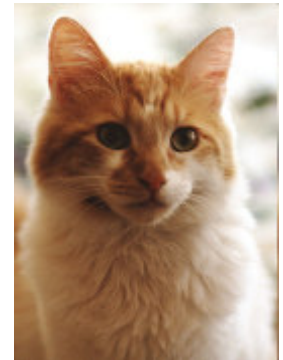
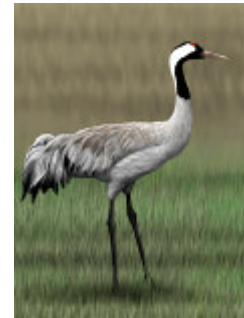
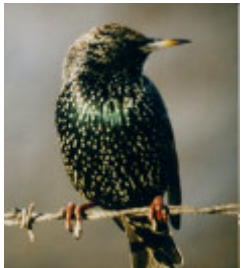
*Haemoproteus, Plasmodium, Leucocytozoon*

DNA z ptačí krve, primery specifické pro parazity

→ sekvenování a určení linií (druhů) parazitů



Alcaide et al. 2009  
Arthropod bloodmeal



Komár pisklavý  
*Culex pipiens*



# Určení potravy z trusu



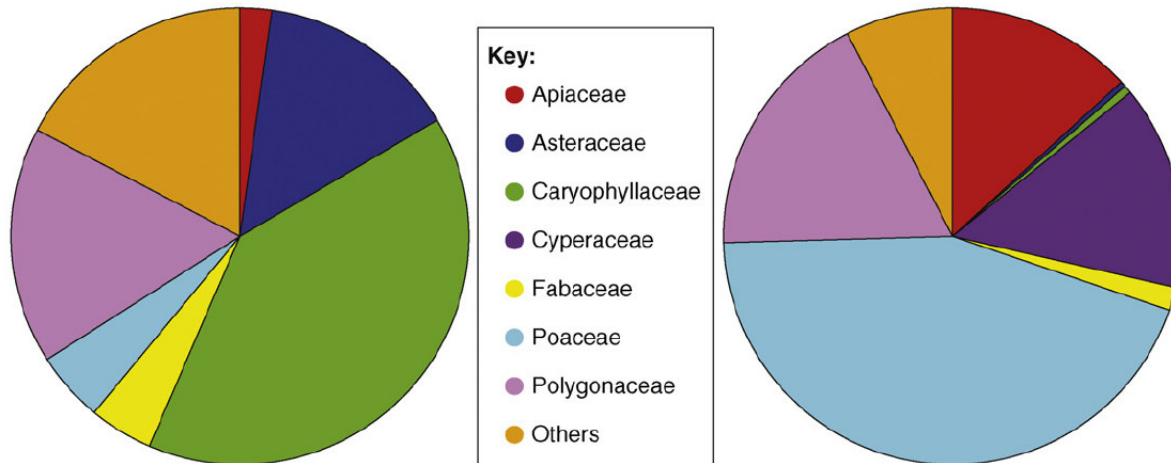
Deosai National Park, Pakistan



Golden marmot



Brown bear

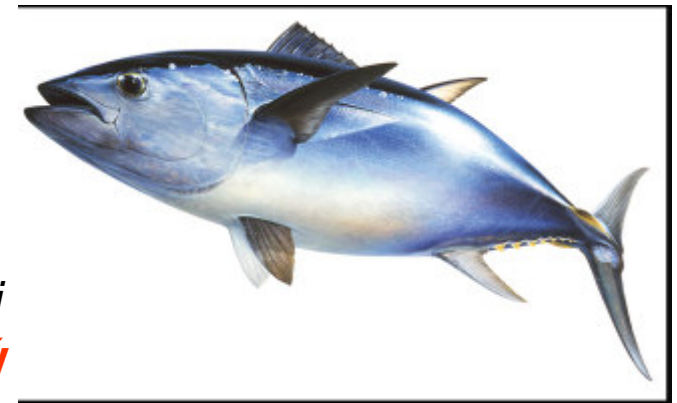


*Valentini et al.*

Lowenstein et al. 2009  
Sushi a tuňáci



Tuňák bílý  
*Thunnus alalunga*



Tuňák australský  
*Thunnus maccoyii*  
**kriticky ohrožený**



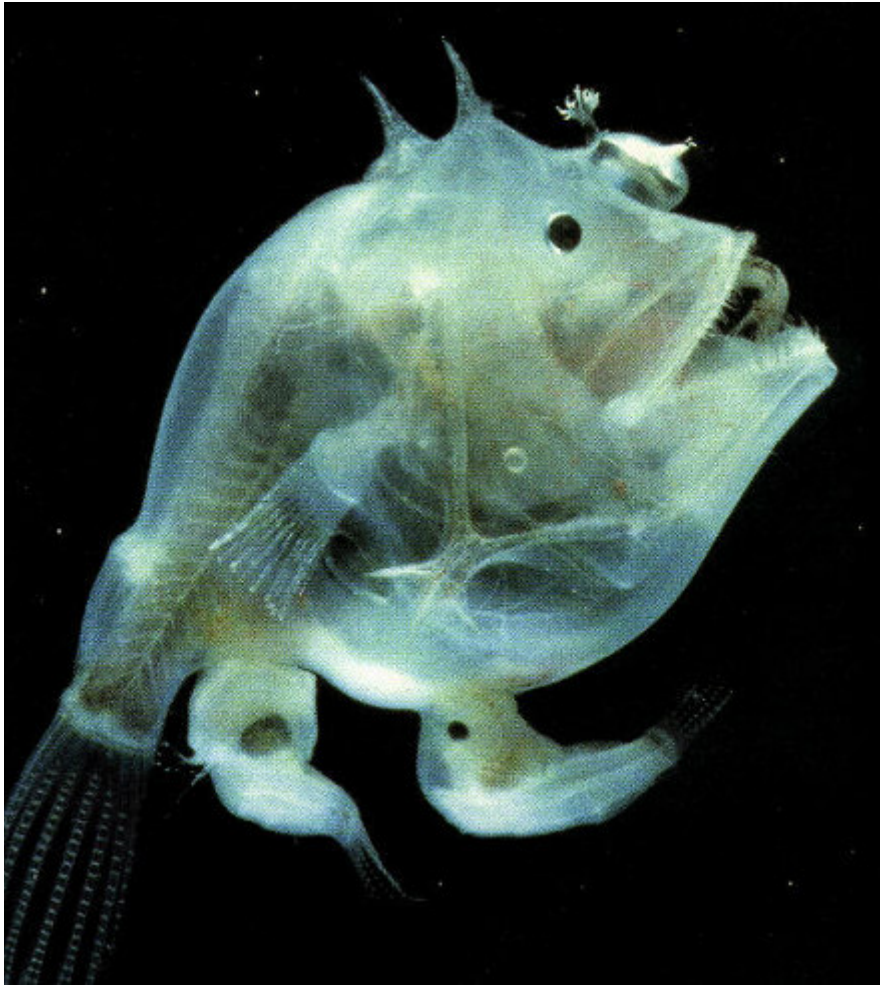
Pamakrela temná  
*Lepidocybium flavobrunneum*  
**při požití za syrova možné zdravotní problémy**



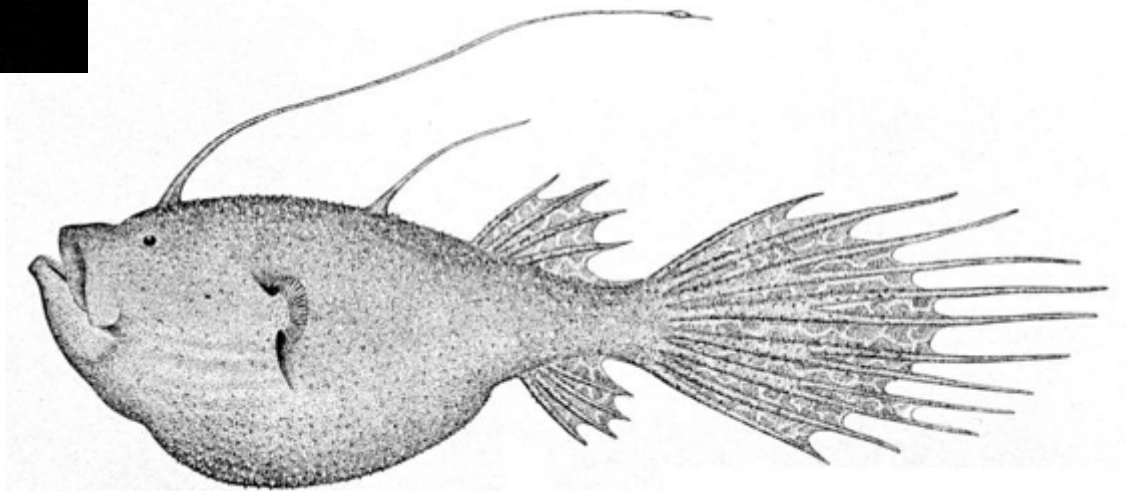
# Genetické chiméry

- organismy složené z buněk s různými genotypy





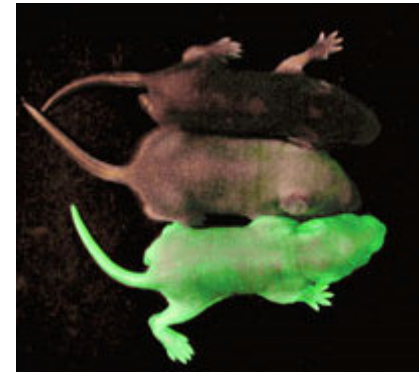
Přiostlí samci  
hlubokomořských ryb  
napojení na krevní  
oběh samice





# Lidé

- Matka a ještě nenarozené dítě:
- Průnik embryonálních erytroblastů a volné DNA přes placentu u člověka
- (pohlaví dítěte před narozením lze určit i pomocí PCR sekvencí typických pro Chr Y, jako templát periferní krev matky)
- Potkani – buňky embrya až v mozku





*Lydia Fairchild*



*Nik*



*Chang a Eng  
(šňní Thajsko)  
arozeni 1811  
spoustu dětí*

Fúze embryí u člověka  
– zřejmě celkem běžná věc

(heteropaternal superfecundation 2.4%)

→ jiný genotyp vaječníků či spermií a somatických tkání



**Blaschko's lines**

# Lydia Fairchild





# Určení rodičů

(analýza paternity)

# kachny

- Neinvazivně
- Genotyp matky z peří v hnízdě
- Genotypy mláďat z blan z vylíhlých vajec
- Zjištění vnitrodruhového hnízdního parazitismu
- Dohledání hnízd parazitických samic
- Opakované hnízdění
- Rekonstrukce genotypů otců
- Zjištění extrapárových paternit





# *Ambystoma maculatum* axolotl skvrnitý

Myers & Zamudio 2004

- **Jde to i bez matek**
- Vnitřní oplození
- Spermatofony
  - Samec klade 20 – 40
  - Samice sebere 15 - 20
- 30 – 200 vajec ve snůšce
- 2 – 8 samců na snůšku



# *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
- Vysvětluje to, proč se množí jen královna?
- 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

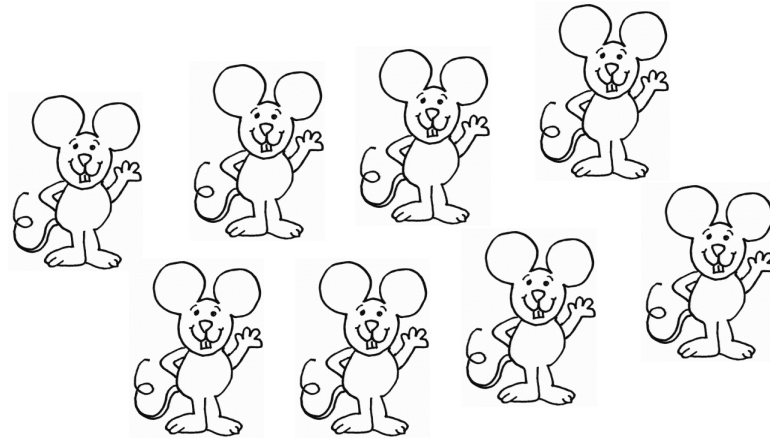


# Analýza populační struktury

# Jak vznikají rozdíly?

- **Ideální panmiktická populace**

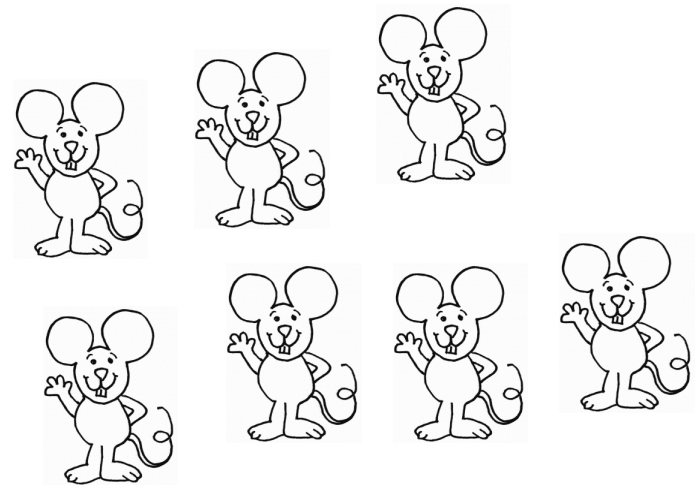
- Jedinci se mohou navzájem křížit se stejnou pravděpodobností

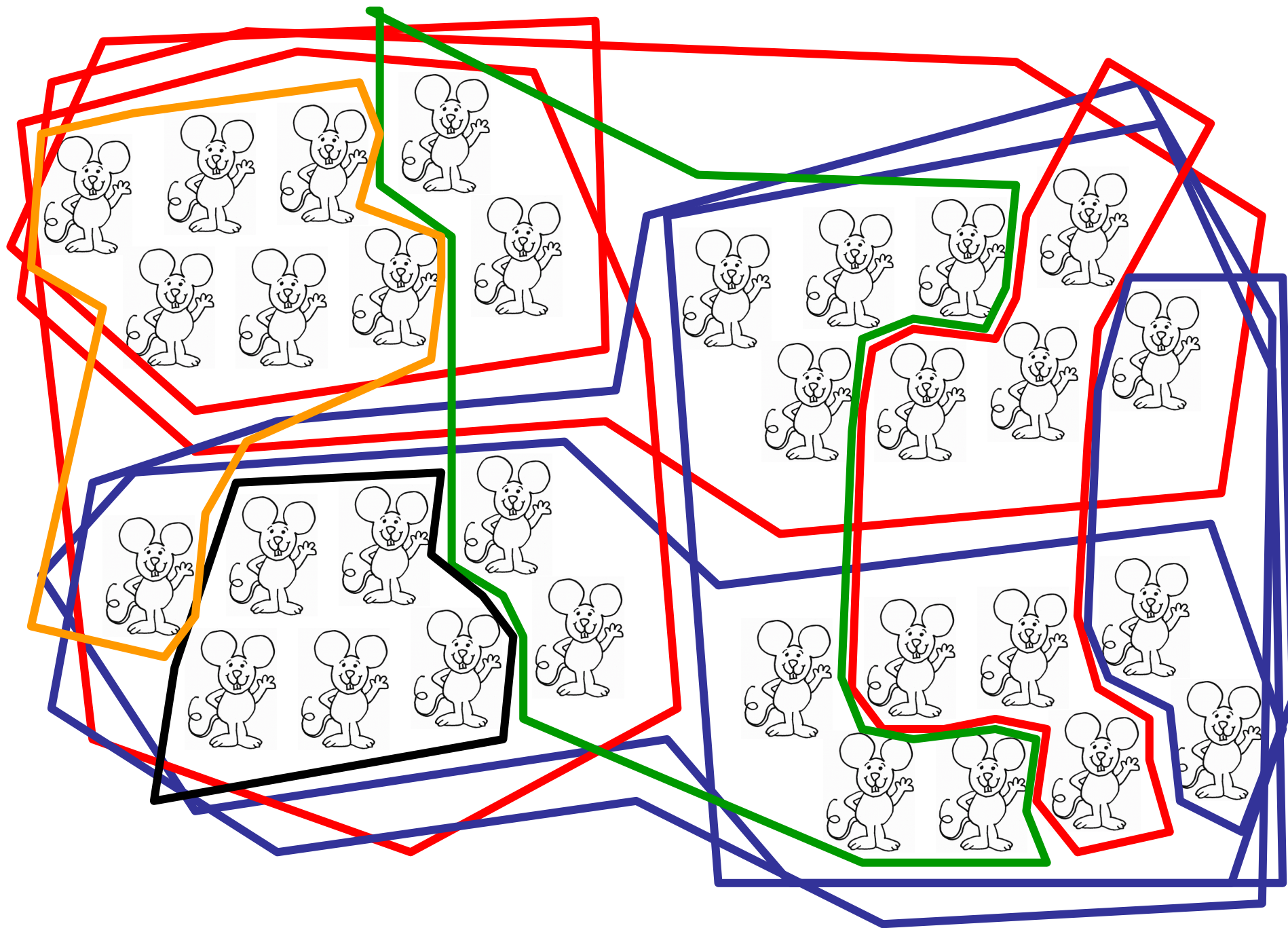


- **Realita**

- Pravděpodobnost závisí na vzdálenosti, bariérách...
- Extrémně i nulová pravděpodobnost

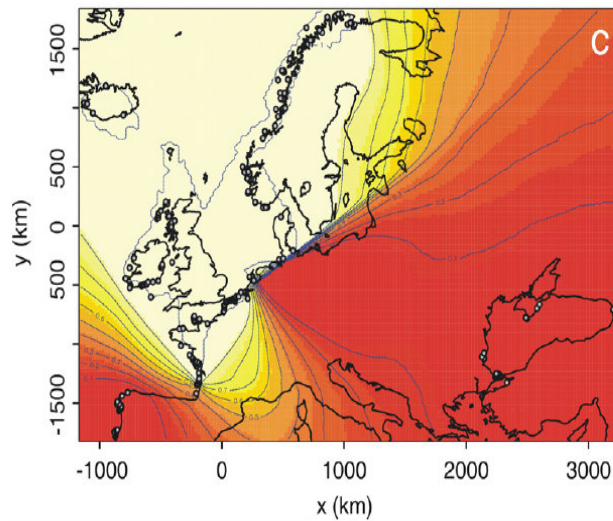
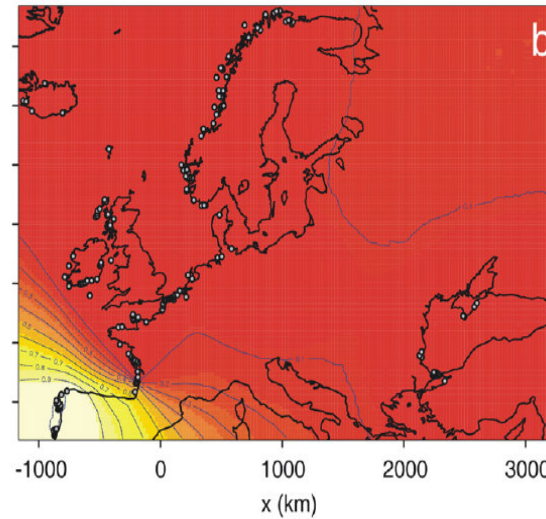
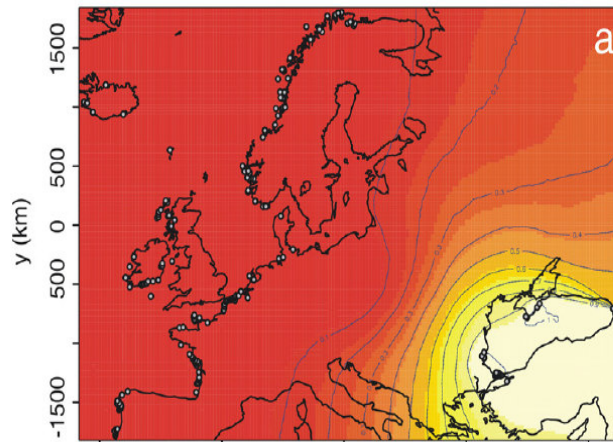
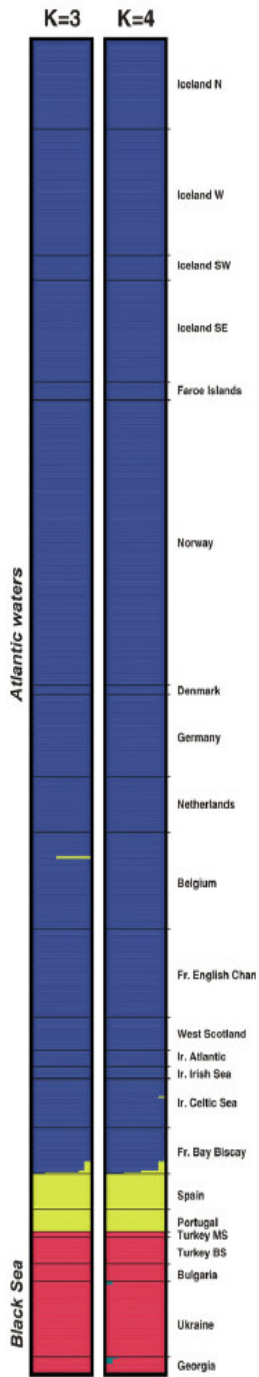
- → omezený tok genů
- → rozrůznění populací



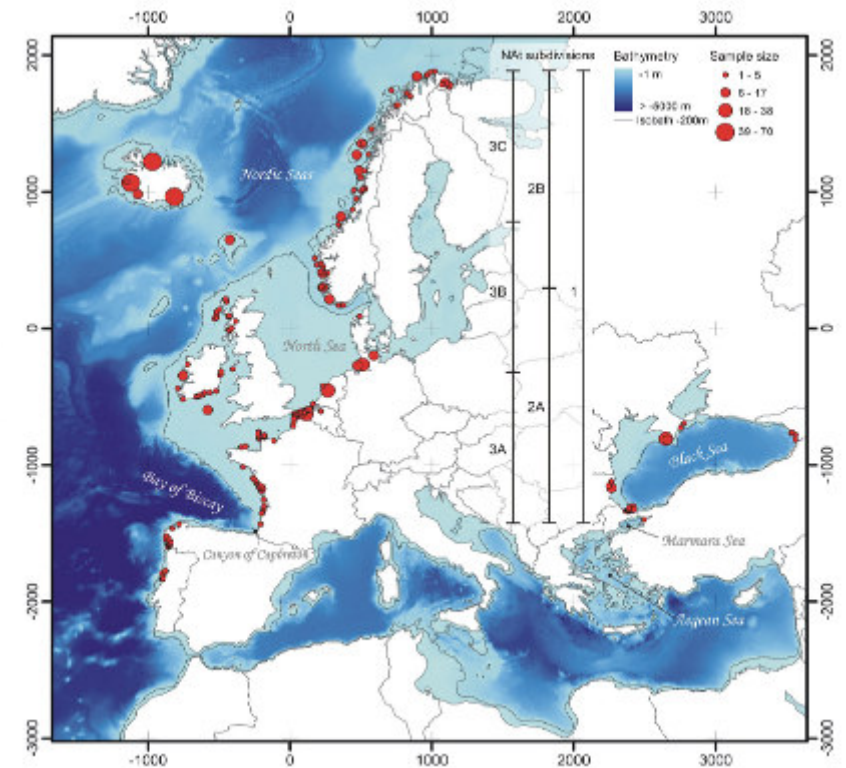


# Spatial population genetics

Fontaine et al. 2007



*Phocoena phocoena*

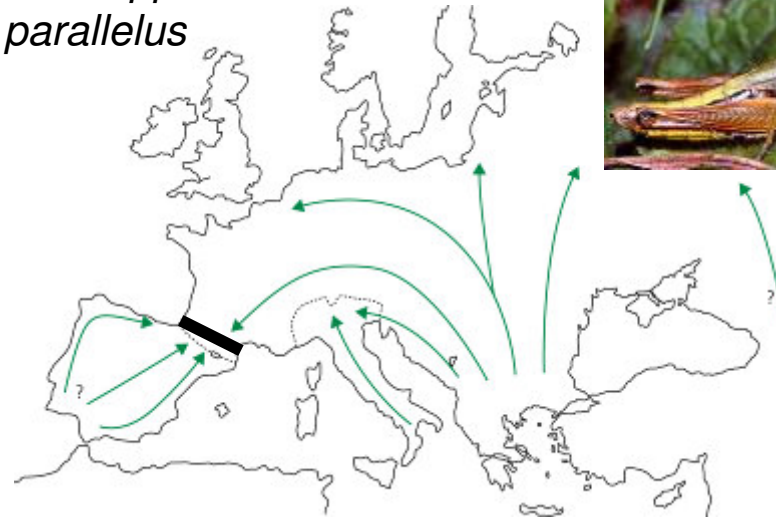


Hybridizace

# Sekundární kontakt dříve oddělených populací

- Změny areálu (šíření z refugií)
- Vliv člověka
  - Záměrné vysazení (kachny divoké do Ameriky)
  - Neplánovaný transfer
  - Změna prostředí (kanály, Suezský průplav)

*Chorthippus parallelus*



*A. fasciatus*

*Aphanius dispar*





# Hybridní zóny

- Místa, kde se geneticky odlišné populace stýkají a tvoří hybridy (klasická ale přehnaně široká definice)  
Zóna je geograficky lokalizována a hybridizace neomezuje integritu rodičovských populací.
- Vyskytují se u řady organismů
- Některé zjevné a dlouho známé (vrány, kuňky), jiné skryté (chromosomální hybridní zóny)

„Asexuals“

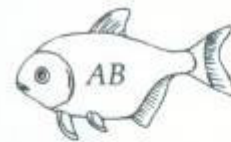
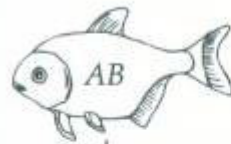
Geneticky totožné

hemiklonální

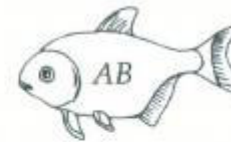
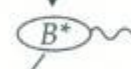


Sekavci:  
často gynogenetické linie

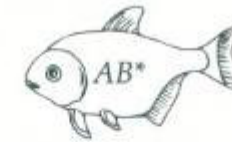
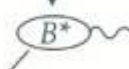
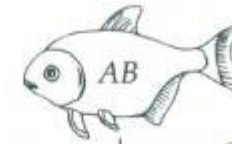
Parthenogenesis



Gynogenesis



Hybridogenesis



**Figure 5.4 Three modes of unisexual reproduction in vertebrates.** In parthenogenesis, the female's nuclear genome is transmitted intact to the egg, which then develops into an offspring genetically identical to the mother. In gynogenesis, the process is similar, except that heterospecific sperm (indicated by an asterisk) from a related sexual species is required to stimulate egg development. In hybridogenesis, an ancestral genome from the maternal line is transmitted to the egg without recombination, whereas paternally derived chromosomes are discarded pre-meiotically, only to be replaced each generation via fertilization by heterospecific sperm (indicated by asterisk) from a related sexual species. (After Avise et al. 1992c.)

Hybridogeneze:  
vodní skokani rodu *Pelophylax*  
(dříve v rodu *Rana*)

*P. lessonae* LL



*P. esculentus* LR



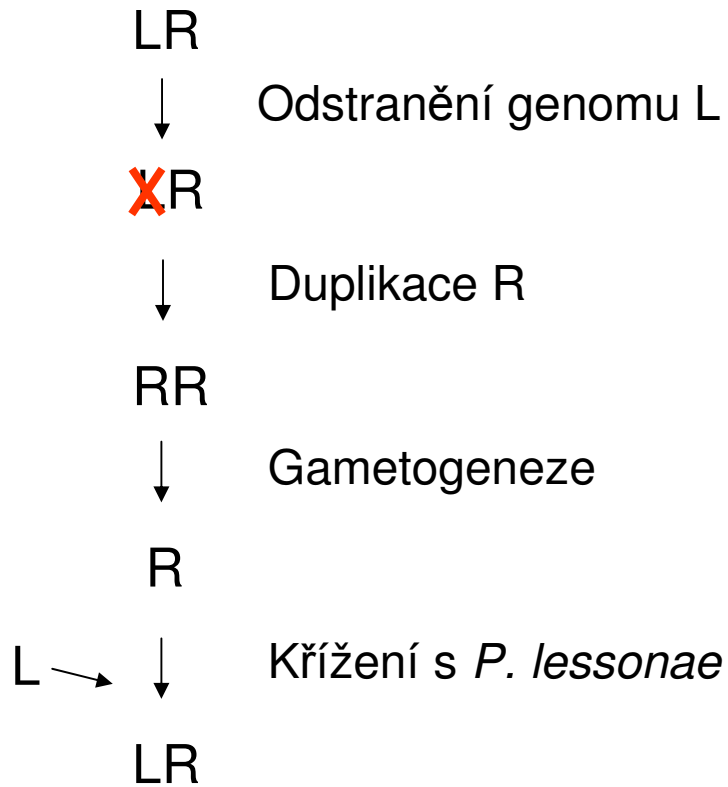
*P. ridibundus* RR



# *P. esculentus* LR



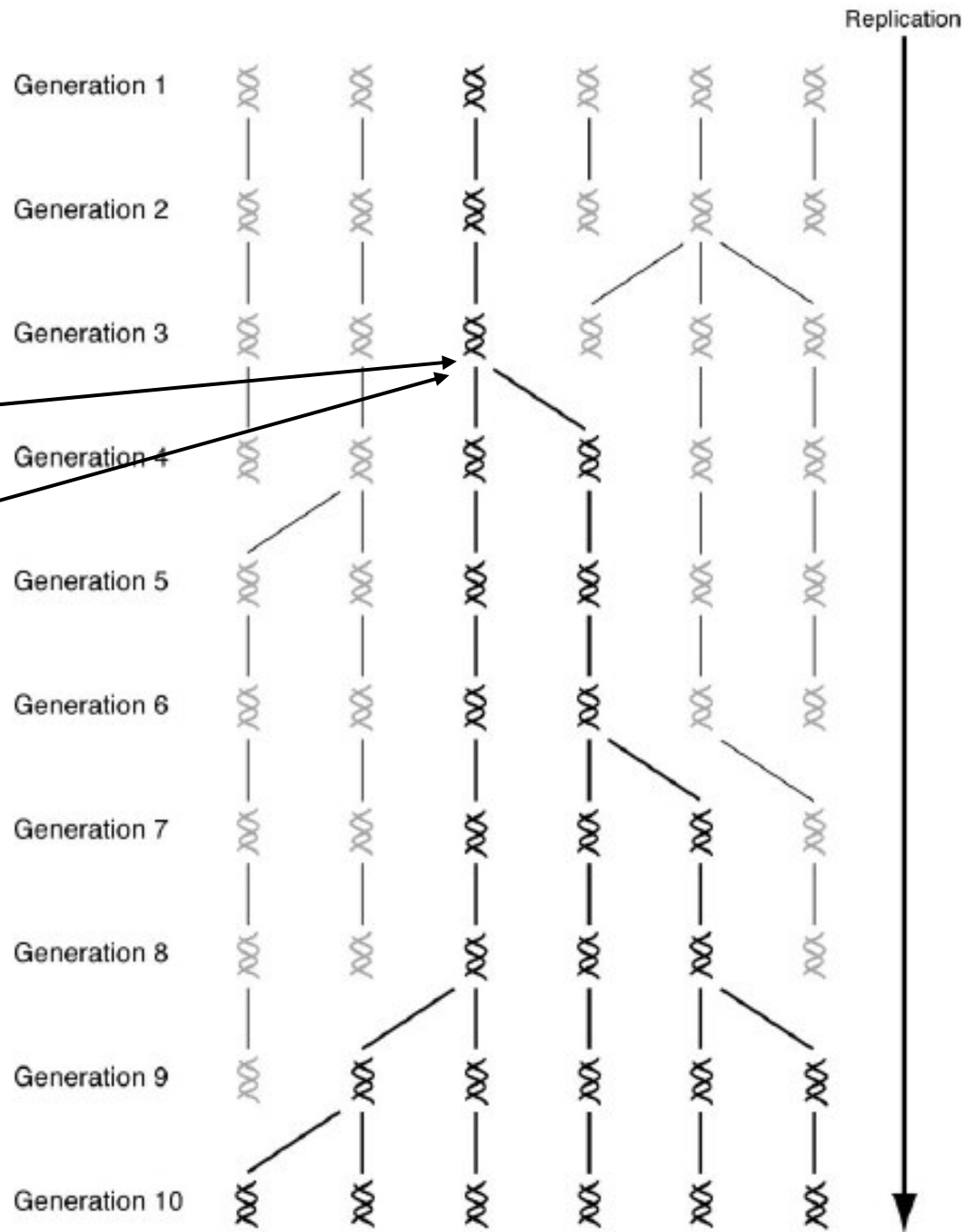
*Sympatrie s P. lessonae* LL

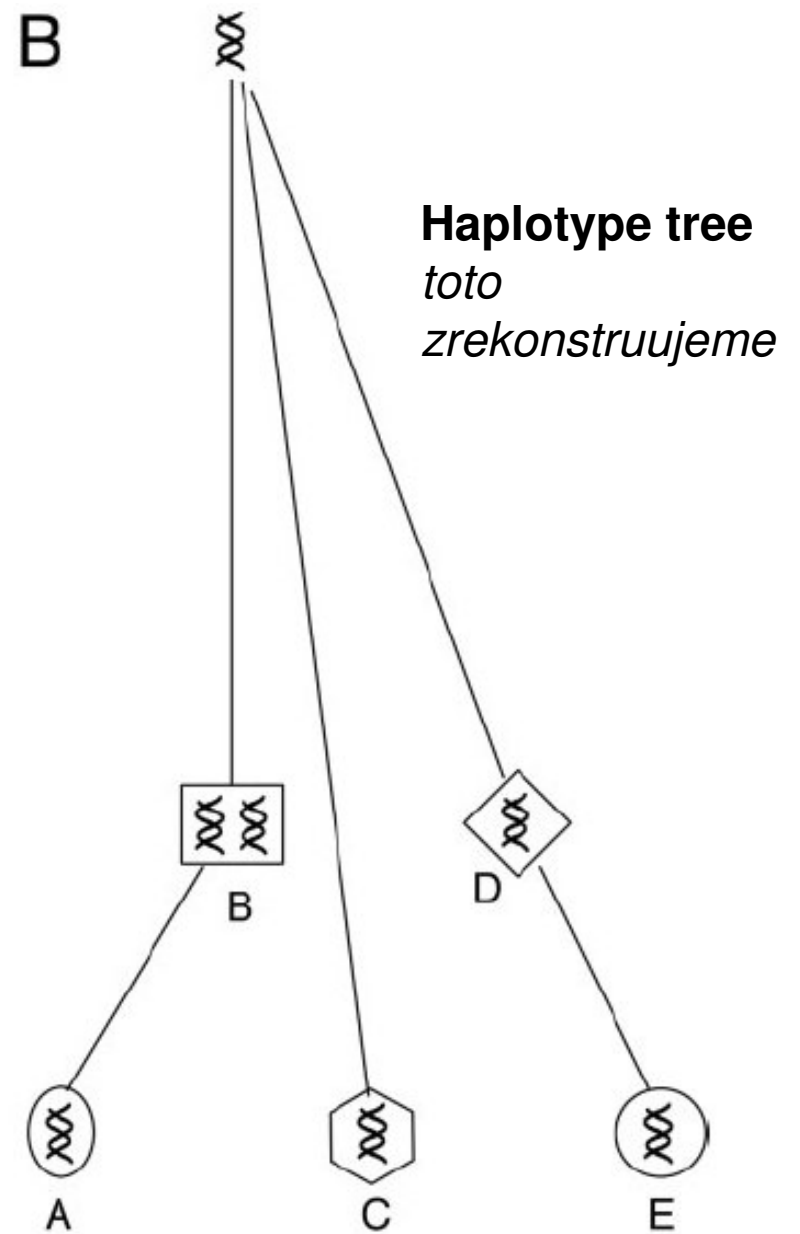
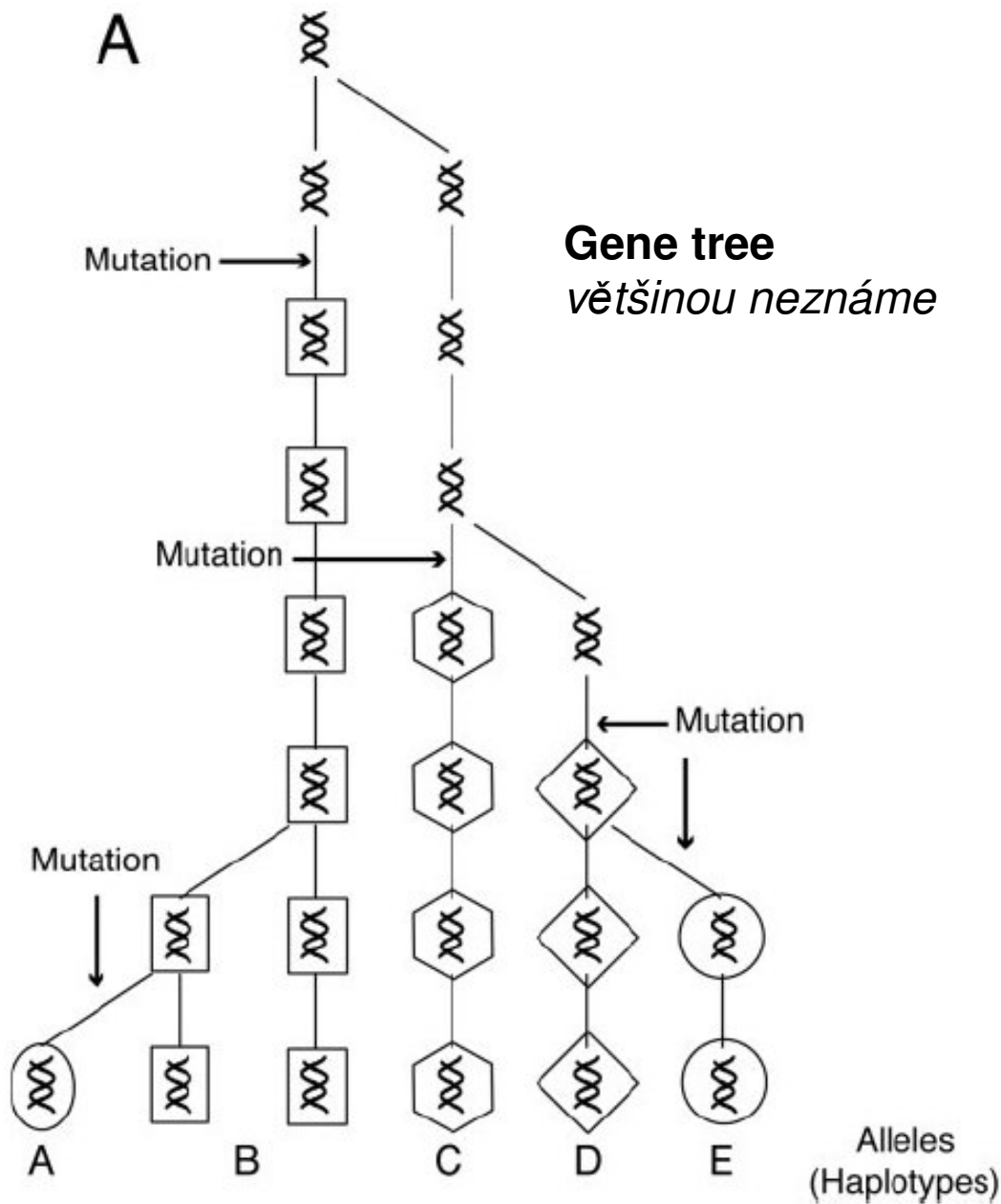


# Koalescence

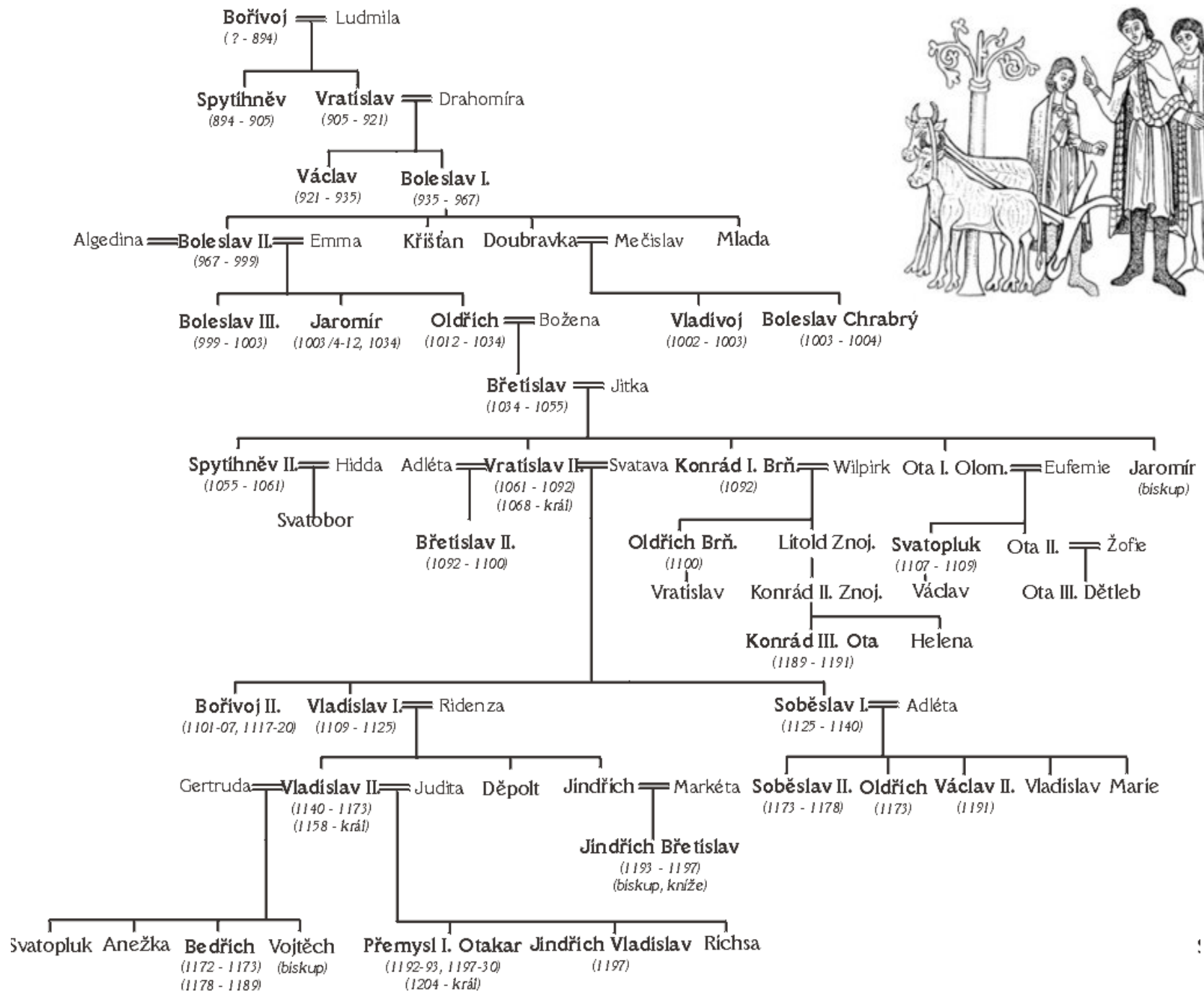
**Coalescence**  
= splynutí linií

**MRCA**  
Most  
Recent  
Common  
Ancestor





Haplotypy (ač mají společného předka) se liší mutacemi

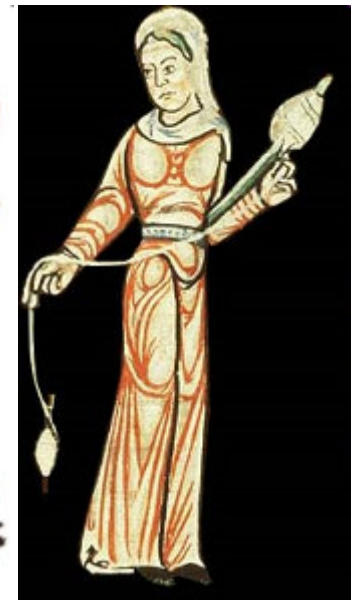
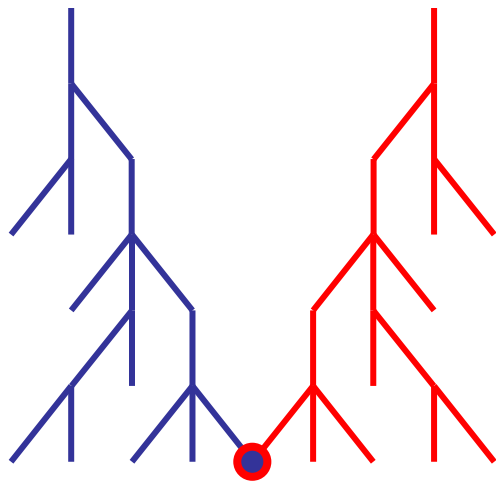






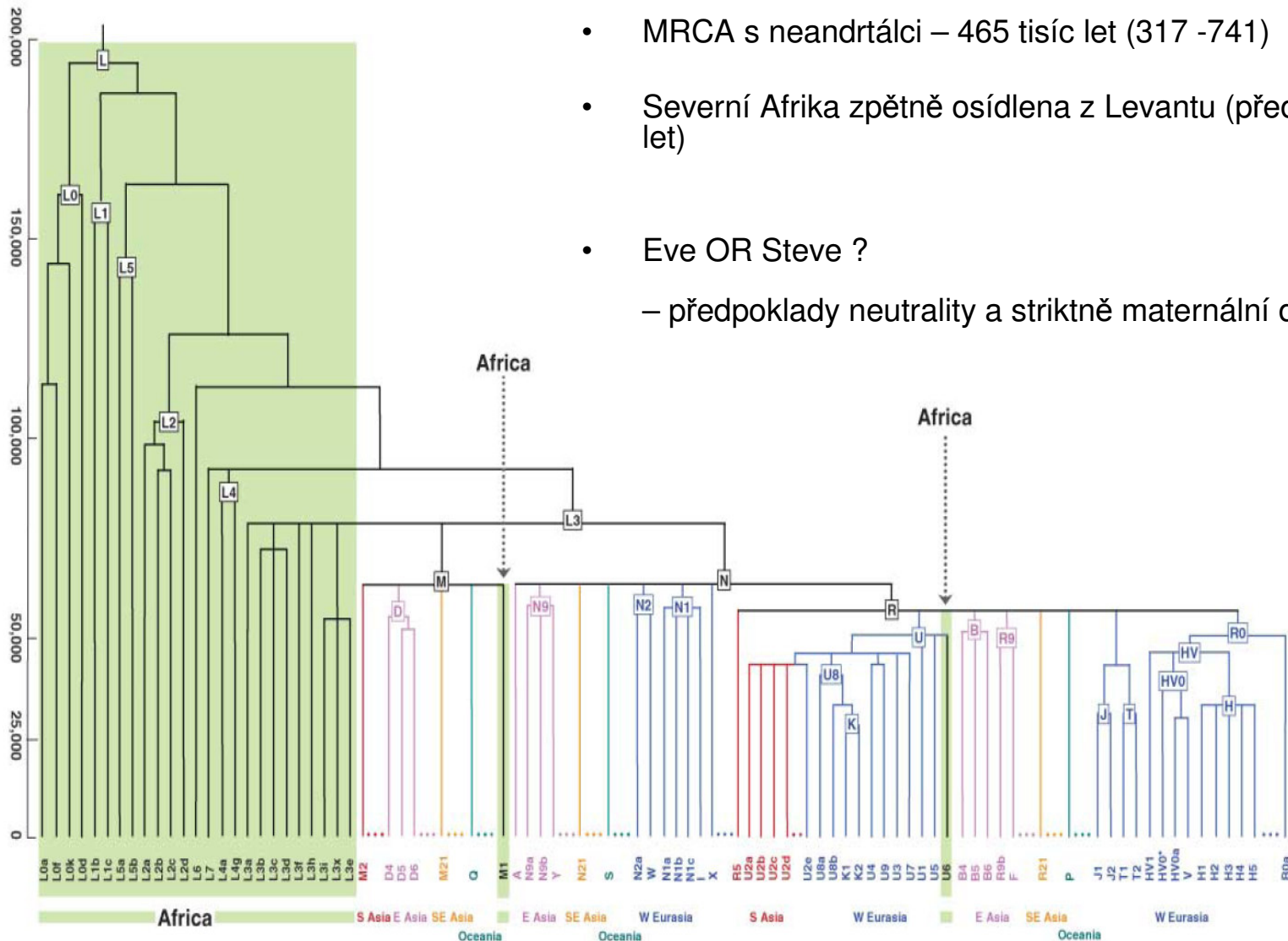
# Meč a přeslice

- Rodokmen odpovídá historii chromosomu Y (pokud ovšem ženy nebyly nevěrné)
- Rodokmen přes matky (a pro mtDNA) by byl úplně jiný!
- A jiný bude pro jiné geny



# mtDNA a Mitochondriální Eva

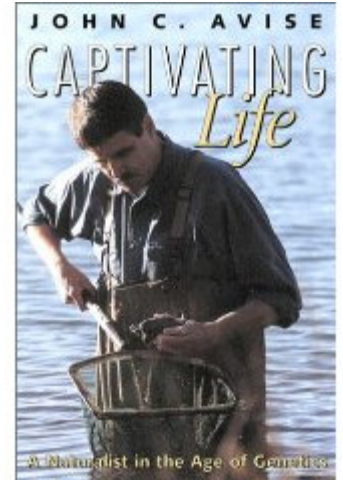
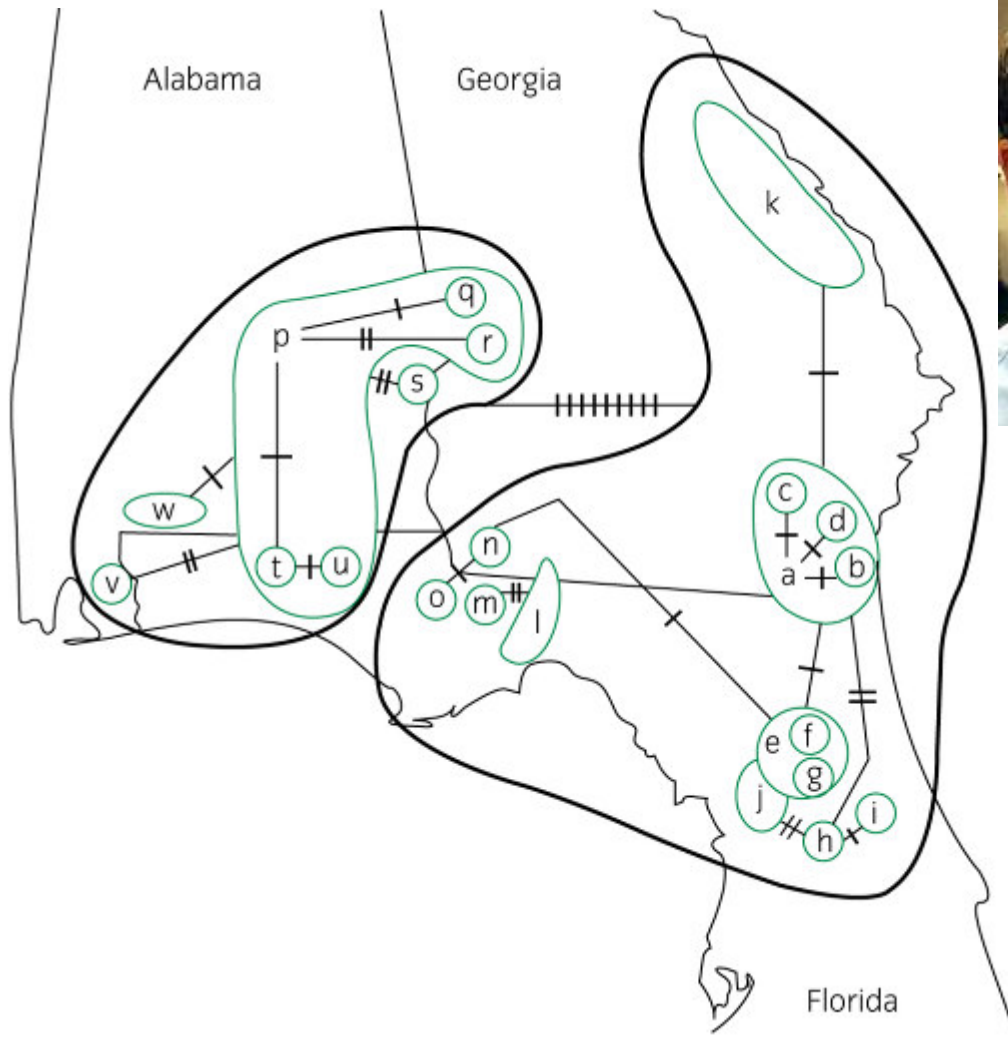
- Větve stromu
  - Afrika
  - jedna z afrických větví - zbytek světa
- MRCA pro mtDNA - 100 až 250 tisíc let
- MRCA s neandrtálci – 465 tisíc let (317 -741)
- Severní Afrika zpětně osídlena z Levantu (před 40-45 tisíci let)
- Eve OR Steve ?
  - předpoklady neutrality a striktně maternální dědičnosti



# Phylogeography

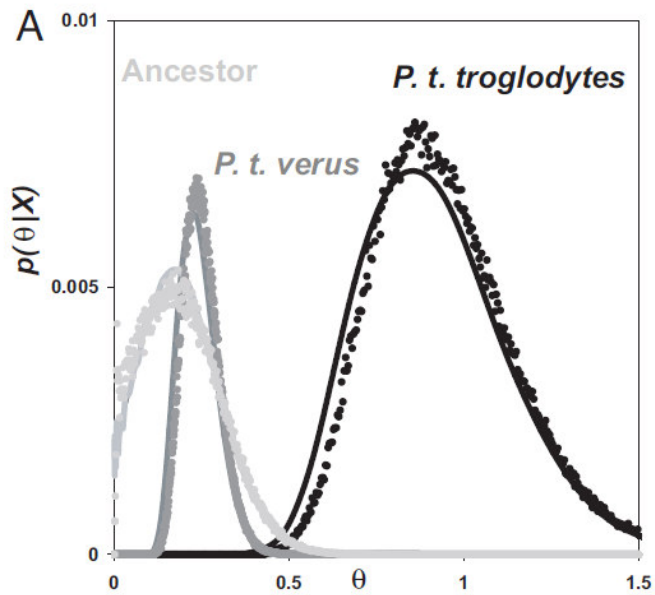
*Geomys pinetis* (pytlonoš) Avise et al. 1979

maximum parsimony network

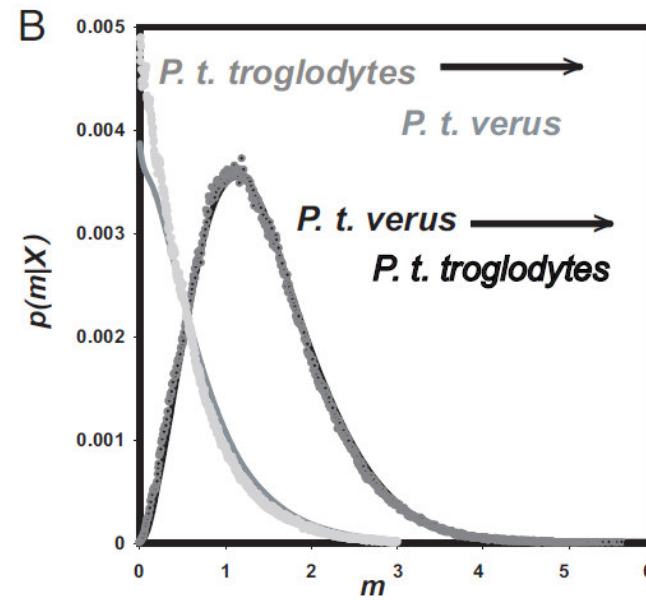




Zbadáno 48 genů



Population size



Migration

# Opět přes modely

- Bayesian Skyline Plot
- Změny velikostí populací

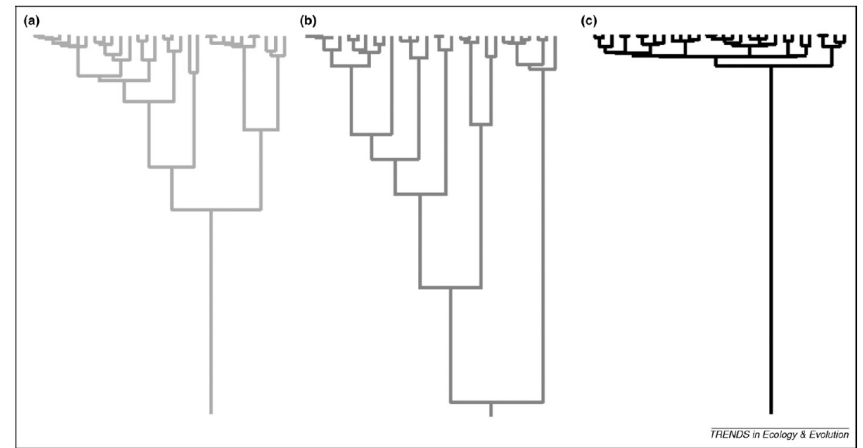
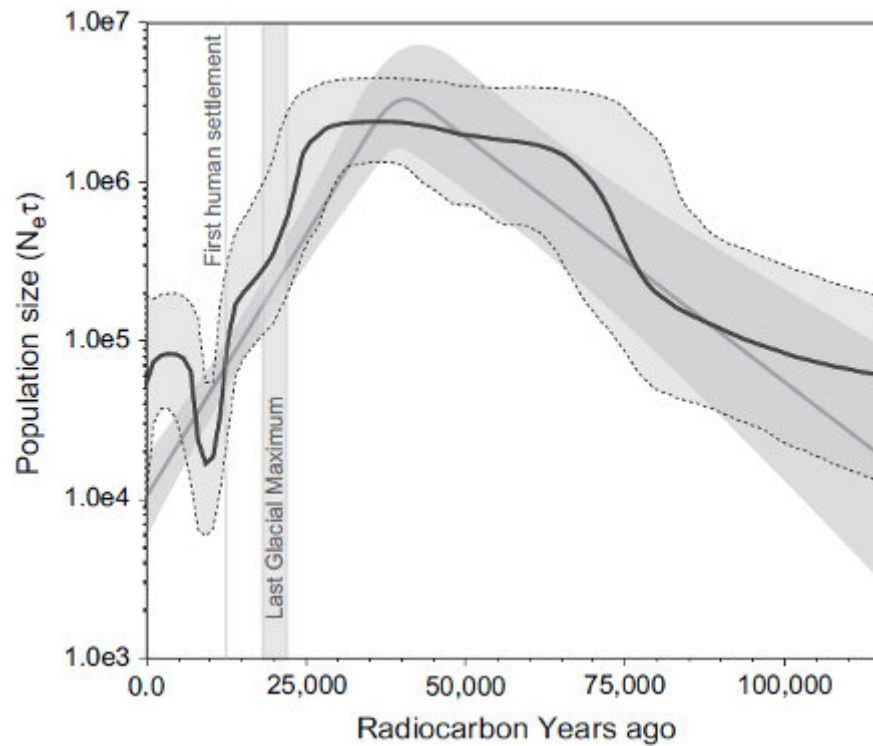


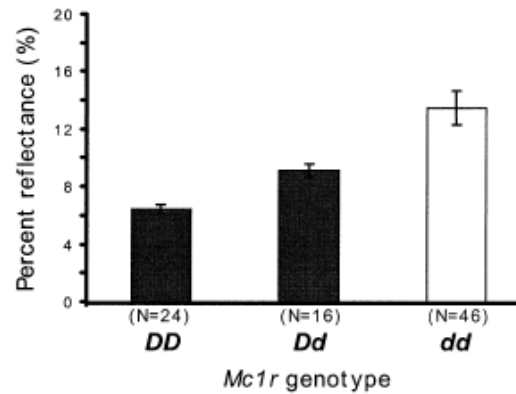
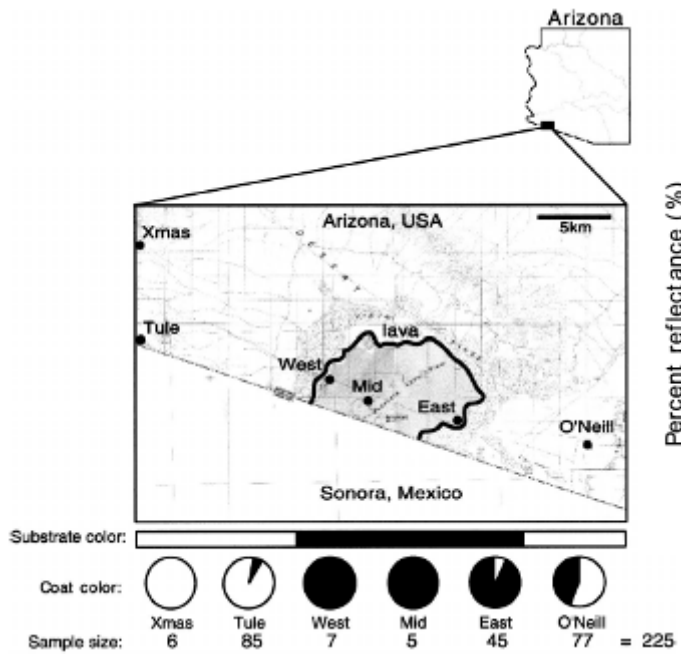
Figure 2. Growth signature in genealogies. Genealogies sampled from (a) constant-size, (b) exponentially shrinking and (c) exponentially growing populations.



*Bison priscus*

Selekcce

pytlouš  
*Chaetodipus intermedius*

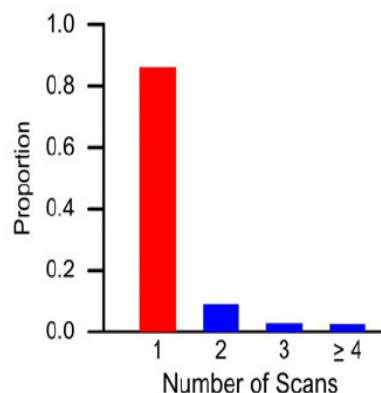
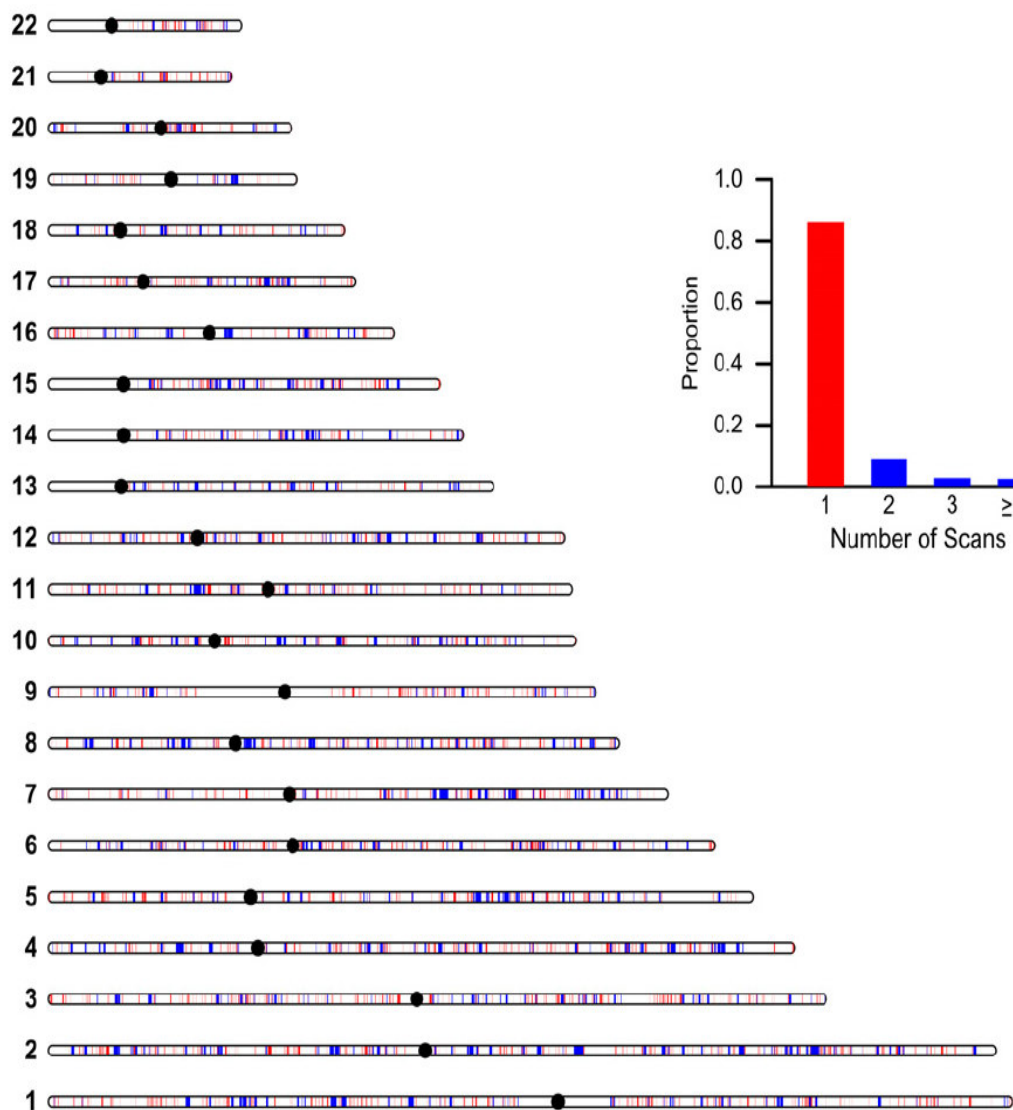


Korelace prostředí – fenotyp – genotyp

Spíše výjimka



# Shoda (nepříliš velká) prací detekujících recentní selekci u člověka



**Table 2.** Enriched PANTHER biological process terms

Biological process	P-value <sup>a</sup>
Protein modification	$9.12 \times 10^{-15}$
Signal transduction	$1.93 \times 10^{-11}$
Protein phosphorylation	$4.83 \times 10^{-11}$
Protein metabolism and modification	$7.19 \times 10^{-11}$
Developmental processes	$2.66 \times 10^{-8}$
Olfaction	$4.46 \times 10^{-6}$
Chemosensory perception	$1.53 \times 10^{-6}$
Cell adhesion-mediated signaling	$3.3 \times 10^{-5}$
Nucleoside, nucleotide, and nucleic acid metabolism	$1.42 \times 10^{-4}$
Cell cycle	$1.95 \times 10^{-4}$
Cell adhesion	$2.61 \times 10^{-4}$
Mesoderm development	$4.00 \times 10^{-4}$
Other metabolism	$6.81 \times 10^{-4}$
Cell communication	$1.06 \times 10^{-3}$
Intracellular protein traffic	$1.11 \times 10^{-3}$
Other intracellular signaling cascade	$1.64 \times 10^{-3}$
Cation transport	$2.17 \times 10^{-3}$
Proteolysis	$2.41 \times 10^{-3}$
Ion transport	$2.61 \times 10^{-3}$
Neuronal activities	$3.72 \times 10^{-3}$
Synaptic transmission	$6.35 \times 10^{-3}$
Transport	$6.44 \times 10^{-3}$
Carbohydrate metabolism	$8.34 \times 10^{-3}$
Cell cycle control	$9.29 \times 10^{-3}$
Other carbohydrate metabolism	$9.79 \times 10^{-3}$
Protein acetylation	$1.21 \times 10^{-2}$
Cell surface receptor mediated signal transduction	$1.73 \times 10^{-2}$
Cell proliferation and differentiation	$2.81 \times 10^{-2}$
Phosphate metabolism	$3.12 \times 10^{-2}$

<sup>a</sup>P-values were adjusted for multiple testing by Bonferroni corrections.

Nejrůznější funkce, často metabolismus  
Často regulační funkce (minimálně 14 %)

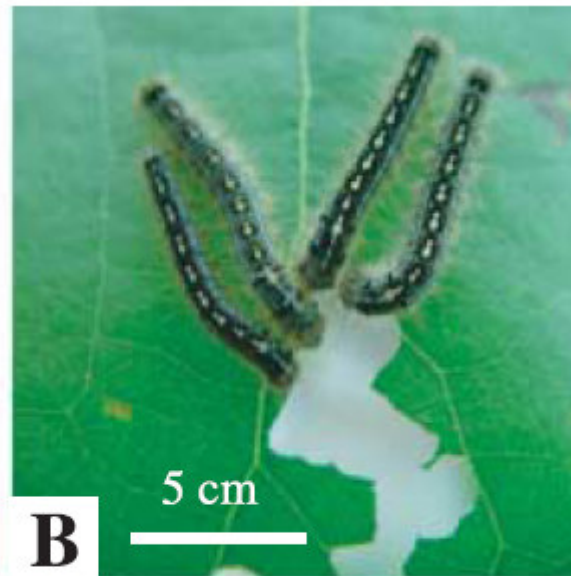
Jaké geny jsou zapnuté?



*Populus  
trichocarpa x deltoides*  
a *Malacosoma disstria*

bourovec

Ralph et al. 2006



- cDNA microarray
- 15496 genů > 3/4 genomu
- Po 24 hodinách  
1191 genů up-regulated  
537 down-regulated
- Obrana: endochitinázy, inhibitory proteáz
- Signální funkce
- Transport, metabolismus, regulace transkripce

# Transkriptom štěnice

*Bai et al. 2011*



- Rezistence k insekticidům potvrzení přes Real Time PCR
- Wolbachia

