

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ (6 лекций, 12 акад. часов)

- **Лектор:** Константин Валерьевич Крутовский
- Профессор Гёттингенского университета, Германия (<http://www.uni-goettingen.de/en/414626.html>) и Техасского университета (<http://essm.tamu.edu/people/faculty/adjunct-faculty/krutovsky-konstantin>)
- Ведущий научный сотрудник Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва
- Зав. лабораторией лесной геномики и руководитель Научно-образовательного центра геномных исследований Сибирского федерального университета, Красноярск (<http://genome.sfu-kras.ru/en/krutovsky>)
- **Тел.:** +7 965 912 1959 (моб.)
- **E-mail:** kkrutovsky@gmail.com или kkrutov@gwdg.de
- **Office:** ЦЗЛ, Академгородок 50а, корп.2, ауд. 133
- **Office Hours:** You can contact by e-mail or phone to make an appointment.
- **Textbook (not required):** Freeland, J.R., H. Kirk, and S.D. Peterson 2011. Molecular Ecology. 2nd ed. John Wiley & Sons, Ltd. 449 pp.
- **Required e-mail:** You will need to send an e-mail to kkrutov@gwdg.de from your preferred address. This would allow me to distribute class announcements, lecture notes, readings, problem sets, etc. Please, provide me with:
 - your full name
 - name by which you prefer to be called
 - phone number(s) where you can be reached
 - e-mail address that you check daily
 - academic & career interests
 - what you hope to get from this course
- **Course web page:** <http://genome.sfu-kras.ru/node/200>
- **Lecture notes:** PowerPoint lecture notes for most of the class sessions will be available on the Web site prior to each class session. **I expect you to print out and bring the notes with you to class (bring also your laptop with you to class)**

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта. 2017. Вторник. #1



ТЕМЫ ЛЕКЦИЙ ПО КУРСУ «МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ»

№ п/п	Наименование лекций	Объем в акад. часах	Дата и время проведения
1	Введение в молекулярную экологию. Фенотипическая пластичность. Эпигенетика. Молекулярные маркеры в экологии.	2	Вт. 28.03 14.10-15.45
2	Эволюционные факторы, влияющие на генетическую изменчивость в популяциях (мутации, отбор, генетический дрейф и эффективный размер популяции, обмен генами и миграция, система скрещивания и т.д.).	2	15.55-17.30
3	Генетический анализ популяций.	2	Ср. 29.03 14.10-15.45
4	Измерение генетической изменчивости.	2	15.55-17.30
5	Молекулярная филогенетика и филогеография. Коалесценция.	2	Пят. 31.03 10.15-11.50
6	Природоохранная генетика.	2	12.00-13.35

2

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта. 2017. Вторник. #1



Задачи курсы – дать краткий обзор

- молекулярно-генетических методов в экологических исследованиях
- аналитических подходов для изучения молекулярно-генетической изменчивости в сложных системах
- практических приложений молекулярно-генетических и геномных методов в экологии

3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Краткая структура курса

- Историческая перспектива
- Ключевые эволюционно- и популяционно-генетические концепции
- Молекулярно-генетические методы
- Анализ изменчивости ДНК
- Анализ селективно-нейтральной и адаптивной изменчивости
- Основы экогеномики
- Студенческие проекты, семинары и презентации

4

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Основной учебник

ECOLOGICAL ENGINEERING 36 (2007) 292–298

available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoleng

Book review

Molecular Ecology, 18, Freeland, John Wiley & Sons, Ltd. (2005), 402 pp., Paperback, Price: US\$ 55.00, ISBN: 0-789-0-0902-6

Molecular ecology is still a relatively young discipline but it has changed significantly over the past 20 years. For what is molecular ecology? Janina E. Freeland's book helps to answer this question and defines it as a biological discipline that applies molecular population genetics, phylogenetics, and genetics to traditional ecological questions (e.g., species diagnosis, conservation and assessment of biodiversity, species-environment relationships, and many other questions in behavioral ecology). It overlaps with the field of ecological genetics, but a heavy emphasis on molecular genetics and population genetics tools makes it a distinctive discipline. It is the application of molecular genetic methods to ecological problems. This definition is probably too broad to be useful. However, the weakness in definition of this discipline is overcome by the increasing role that interdisciplinary approaches play now in modern research. Molecular ecology represents such an approach to a full understanding of interaction between genotypes, phenotypes, and environment, and is a truly integrative discipline that embraces many related disciplines, such as ecology, population and conservation genetics, molecular evolution, etc. Molecular ecology unites these fields in the attempt to study ecological problems and molecular genetic processes that underlie them, having matured now into a well-developed field of research with emphasis on using molecular genetic data to understand the interaction of organisms with their physical environment and their evolution as a result of adaptation to different ecological conditions.

The term was rarely used before 1980, but it can be traced back as far as 1980, and many earlier studies could reasonably be described as molecular ecology. The emergence of molecular ecology was finally documented in the establishment of a new scientific journal, *Molecular Ecology*, in 1992. A quick look at any issue will provide a glimpse into the breadth of the field. The journal publishes papers that utilize molecular genetic techniques to address questions in ecology, evolution, behavior and conservation.

Although it is mostly so, molecular ecology is not solely an applied science. This book demonstrates that molecular ecology is based on both theoretical and practical developments that increasingly support the existence of it as a distinctive discipline. However, there is still a shortage of books that

would provide a comprehensive introduction to molecular ecology. The book by Janina Freeland is much needed and greatly compensates for this deficit. To help the reader understand this new science the author logically presents the developments in the biological sciences that have made molecular ecology possible. She starts with a brief history of molecular genetics and evolution in ecology (chapters 1 and 2) and continues with genetic analysis of populations (chapters 3 and 4), evolutionary theory (chapter 5), phylogeography (chapter 6), and behavioral ecology (chapter 7). Many of these chapters and especially the last two (chapters 7 and 8) demonstrate numerous practical applications of molecular genetic tools in molecular ecology studies, such as tracking migration, relationships, predation, foraging, hybridization, breeding, mating, diapause, colonization, invasion, measuring effective population size, inbreeding, wildlife forensics, spread of pests and pathogens, identification of species and varieties, and many others.

The book serves a wide audience, presenting concepts of molecular ecology, its objectives and tools in a logical and understandable manner using up-to-date examples and showing practical applications. It will be useful for both scientists working in this field and specialists in the neighboring disciplines, as well as for all those who would like to learn about something exciting and new outside their box. Most important, it can be used as an excellent textbook for a Molecular Ecology course or as additional reading for undergraduate and graduate courses on evolutionary, ecological, and population genetics. I am successfully using it in teaching a population genetics course for graduate students.

Most chapters are very well written, and compiled with great care. Molecular markers are major tools in molecular ecology and they are explained in great detail in the book. After each chapter there is a nice summary, review questions, additional reading, useful websites, software, and other useful related information. A simple glossary of terms provided in the book is a good asset and makes it more accessible for many non-molecular geneticists who would read it.

Although the book has neither serious nor conceptual faults, it is natural for the first edition to have a few glitches. This book is not an exception in this rule, and there are a few errors in the statements and definitions on pages 14, 44, 50, 52, 54, 67–69, 74, 95, 102, 236 and 232. All of them are rather minor and can be easily corrected in the next edition. The most notable of them is on p. 236 where a famous anecdotal phrase concerning kin selection – “he would lay down his life

for more than two siblings or eight cousins” – was attributed to W.D. Hamilton, although it is commonly accepted as belonging to another famous British scientist, J.B.S. Haldane, who being asked whether he would lay down his life for his brother, responded allegedly “No, but I would lay down my life for two brothers or eight cousins” (Kennedy and Marlowe, 1969), according to another interpretation: “No, but I would consider it for two brothers” (Hedrick, 2005).

In addition, as a personal recommendation to the next edition, I would like the author to show more explicitly how molecular ecology emerged and what makes it really different from ecological genetics and molecular population genetics, although I certainly understand that it is not very easy and it is an objective problem. Due to the synthetic, integrative nature of this discipline, many molecular ecology applications that are listed as “practical ecological questions” in the text also represent traditional problems of population and conservation genetics. I believe that many readers (including myself) would be happy to see the next editions of the book. It is a much needed book and an invaluable reference for all those who are doing study or research in molecular ecology, population genetics, evolutionary biology, conservation genetics, behavioral ecology, restoration ecology, landscape and community genetics as well as for all others who are working or interested in these or related fields.

REFERENCES

Kennedy, K., Marlowe, M., 1969. Psychobiologically Speaking: A book of Questions. “Vintage”, 190 books, p. 13.

Hedrick, P.W., 2005. Genetics of Populations, 3rd ed., p. 278.

Konstantin V. Krutovskiy
Department of Ecosystem Science and Management, Texas A&M University, College Station, TX 77843-2375, USA
E-mail address: k.krutovskiy@tamu.edu (VK).

<http://www.ecome.tamu.edu/ndp/agp/personal webpage.html>

0925-4574/\$ – see front matter
© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ecoleng.2007.02.003



5

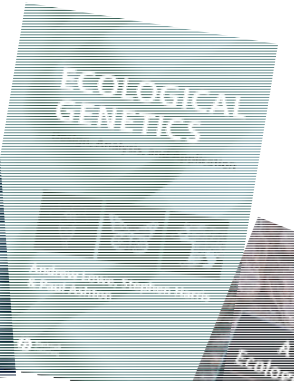
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1

www.sciencedirect.com

Дополнительные учебники



Ecological Genomics
Andrew Lowe, Stephen Harris, & Paul Ashton



A Primer of Ecological Genetics
Volodymyr K. Krutovskiy & Dmitriy V. Hovav



An Introduction to Molecular Ecology
Janina E. Freeland

6

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1

www.sciencedirect.com

1. Введение в молекулярную экологию

- **Ecology + Molecular Genetics => Molecular Ecology (Molecular Ecological Genetics):**
 - ✓ фокус на использование методов и подходов **молекулярной** популяционной генетики и геномики в **экологии**
 - ✓ относительно молодая междисциплинарная биологическая дисциплина (хотя, существенно изменившаяся за последние 20 лет)
 - ✓ отвечает на традиционные вопросы экологии (e.g., [species identification](#), migration, invasion and introgression, conservation and assessment of biodiversity, species–environment relationships, behavioral ecology, and many other questions), используя методы и подходы молекулярной популяционной генетики, филогеномики и геномики

7

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Молекулярная экология как наука

- **Integrative science:** integrates the two main components of ecosystems – environmental variation and genetic variation
- **Interdisciplinary science:** exists at the interface of ecology and genetics and applies an interdisciplinary approach to a full understanding of interaction between genotypes, phenotypes, and environment; it embraces also many other related disciplines, such as evolution, phylogenetics, population and conservation genetics, etc.
- **Applied science:** the theoretical and applied aspects of genetics are used to address practical questions and problems in ecology including conservation, management, and genetic improvement of species.

8

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Важнейшие составные компоненты молекулярной экологии

- **Экосистема** – совокупность организмов, популяций и сообществ, динамически взаимодействующих между собой и неживыми (абиотическими) компонентами их среды.
- **Экология** (от греч. οἶκος, означающего «дом», и λογία, озн. «учение») – научная дисциплина о жизни, изучающая взаимодействия между организмами и их биотической и абиотической средой.
- **Генетика** (от греч. Greek γενετικός *genetikos*, "genitive" или γένεσις *genesis*, «происхождение»), биологическая дисциплина, изучающая гены, наследственность и изменчивость в организмах.

9

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Важность изучения молекулярной экологии

- Экология и генетика вместе объясняют механизмы эволюционной изменчивости и биоразнообразия.
- Экологические взаимоотношения организмов с биотической и абиотической средой суть естественного отбора. Эти взаимоотношения определяют приспособленность фенотипов и лежащих в их основе генотипов к данной среде.
- С одной стороны, экологическая структура популяций (размер, степень подразделённости и т.д.) влияет на генетическую изменчивость популяций.
- С другой стороны, генетическая изменчивость популяции по экологически важным признакам влияет на скорость и направление ответа популяции на отбор в результате экологических взаимоотношений.

10

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Важность изучения молекулярной экологии

- Обе, и генетическая, и экологическая изменчивость должны учитываться для понимания потенциала и ограничений для адаптации и эволюции популяций.
- Т.о., молекулярная экология – это научная дисциплина, которая учитывает генетическую изменчивость при изучении всякого рода экологических взаимоотношения организмов - как биотических, так и абиотических.
- Ключевые экологические параметры (т.е., скорость популяционного роста, конкурентноспособность, частота атак вредителей, экологически важное поведение) – не являются фиксированные свойствами популяций или вида, а они эволюционируют в постоянном взаимодействии между экологией и генетикой.

11

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Важность изучения молекулярной экологии

- Экология изучает как организмы взаимодействуют друг с другом и со средой на феноменологическом или фенотипическом уровне, но фенотипические данные могут быть обманчивы или недостаточно информативны из-за фенотипической пластичности и требуются генетические данные, которые можно получить с помощью молекулярно-генетических маркеров.
- Экологические процессы - двигатель адаптивной эволюции, но эволюция основана на наследуемых (генетических) изменениях
- Относительная приспособленность зависит не только от генотипа, но и от среды, с которой он взаимодействует
- Индивидуумы и их генотипы взаимодействуют с абиотической средой (температура, влажность, тип почвы, и т.д.) и биотическими факторами (межвидовая конкуренция, хищники, паразиты, и т.д.).
- Временная и пространственная изменчивость средовых факторов может порождать изменчивость приспособленности во времени и пространстве.
- Экологические факторы влияют на популяционно-генетическую структуру.

12

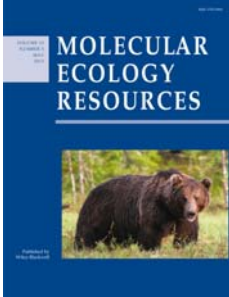
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Зарождение молекулярной экологии

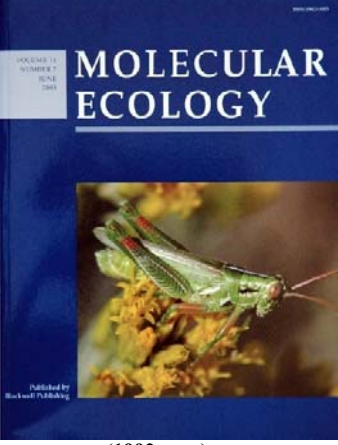


(2001-2007)



(2008-now)

- The term was rarely used before 1990, but it can be tracked back as far as 1980
- The emergence of Molecular Ecology was finally documented in the establishment of a new scientific journal, *Molecular Ecology*, in 1992 (although it has changed significantly over the past 20 years)
- The journal publishes papers that use molecular genetic techniques to address questions in ecology, evolution, behavior and conservation



(1992-now)

RAPD markers of mitochondrial origin exhibit lower population diversity and higher differentiation than RAPDs of nuclear origin in Douglas fir

J. R. ALCANTARA, K. V. KRUTCHIK and S. D. STRAUSS
Department of Forest Science, Oregon State University, 303 020 Corvallis, OR 97331-7000, USA; and the Department of Population Genetics, U.S. Forest Service, Forest Sciences Laboratory, 3200 SW Jefferson Way, Corvallis, OR 97331, USA

Abstract

We developed a method of screening RAPD markers for the presence of organelle DNA. We used these markers to compare the structure of nuclear and mitochondrial RAPD diversity in Douglas fir (P. D. 197) across 20 populations. RAPD markers were identified as originating in the mitochondrial genome and 1% to 10% of the RAPD markers. The mitochondrial DNA markers consistently distinguished populations with known natural substructure (which is in evidence for the mitochondrial genome in the Pacific Northwest) and markers of the organelle genome identified by heterozygously identified fragments. Mitochondrial RAPD markers exhibited low diversity within populations compared to nuclear RAPD markers. RAPD markers of mitochondrial origin (RAPD-mt) had lower within-population diversity than nuclear RAPD markers (RAPD-nu) and were more highly differentiated than were fragments of nuclear origin of both the population (F_{ST} = 0.04 and 0.01, respectively) and total (D_{ST} = 0.12 and 0.25, respectively). Both nuclear and mitochondrial DNA based phylogenetic analyses identified the variation as nonreproducible groups. The nuclear RAPD markers further separated the north and south interbreeds.

Keywords: Douglas fir, genetic variation, mitochondrial DNA, molecular markers, RAPD

Received 22 September 1997; accepted 10 January 1998; accepted 17 January 1998

Introduction

Markers that utilize both cytoplasmic and nuclear DNA markers are common in phylogeographic studies of animals (e.g., 1994). Douglas fir (P. D. 197) is a widely distributed conifer in the Pacific Northwest. However, there have been few studies that have compared genetic diversity in nuclear and cytoplasmic markers (e.g., 1994). This is in contrast to the use of nuclear markers in both the phylogeographic and conservation studies of plants and the cytoplasmic markers of the plant mitochondrial genome (reviewed by 1994). However, the increasing utilization of genetic markers in the study of plant phylogeography now allows direct comparison of cytoplasmic and nuclear markers (e.g., 1994). This has prompted recent studies comparing these markers in nuclear markers (e.g., 1994; 1995; 1996) and have led to new insights on gene flow and the structure of genetic diversity.

Results from comparisons between cytoplasmic and nuclear markers have generally confirmed well to expectations from population genetic theory. The small effective population size and limited dispersal of many coniferous species (e.g., 1994) have led to low levels of genetic diversity in nuclear markers (e.g., 1994). In some cases, nuclear markers have been found to be more informative than cytoplasmic markers (e.g., 1994). However, in some cases, nuclear markers have been found to be more informative than cytoplasmic markers (e.g., 1994). This is in contrast to the use of nuclear markers in both the phylogeographic and conservation studies of plants and the cytoplasmic markers of the plant mitochondrial genome (reviewed by 1994). However, the increasing utilization of genetic markers in the study of plant phylogeography now allows direct comparison of cytoplasmic and nuclear markers (e.g., 1994). This has prompted recent studies comparing these markers in nuclear markers (e.g., 1994; 1995; 1996) and have led to new insights on gene flow and the structure of genetic diversity.

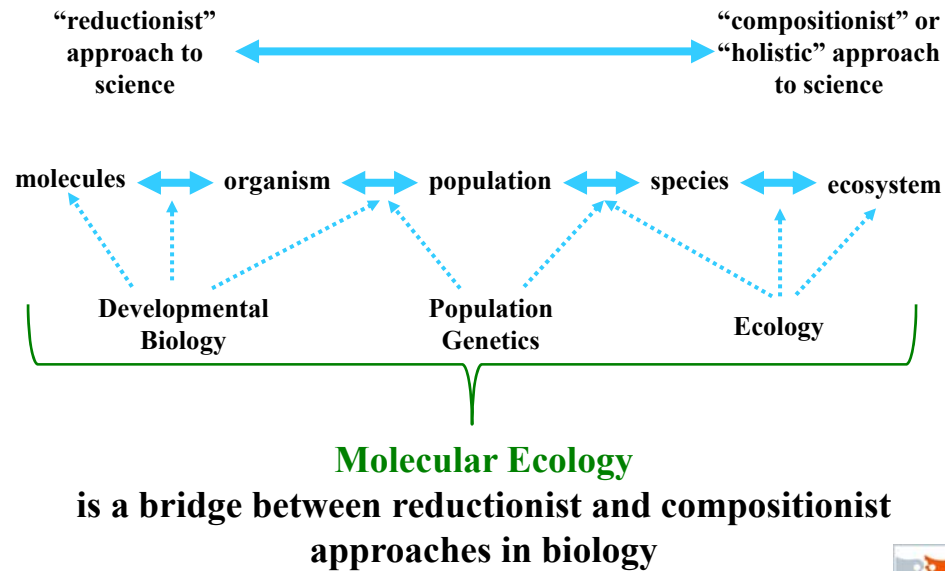
Keywords: Douglas fir, genetic variation, mitochondrial DNA, molecular markers, RAPD

© 1998 Blackwell Science Ltd

Практические приложения молекулярно-генетических методов в молекулярной экологии

- слежение за миграцией, гибридизацией, скрещиванием, распространением, колонизацией, инвазией вредителей и патогенов
- измерение генетического сходства, родства, изменчивости, эффективного размера популяций, инбридинга (напр., для выделения популяции, которой угрожает риск исчезновения), динамики популяций
- природоохранной судебной экспертизы и мониторинга популяций редких видов, незаконной торговли, браконьерства и т.д.
- идентификации видов и разновидностей, состава сложных сообществ
- изучения взаимоотношений организмов с их средой и их эволюции как результата адаптации к разным экологическим условиям

Место молекулярной экологии в биологии



15

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1

Естественная стратификация на взаимозависимые уровни – фундаментальное свойство жизни (и биологические дисциплины в основном следуют этой стратификации)

Level	Biological discipline	Genetic discipline
Macromolecules	Biochemistry and molecular biology	<u>Molecular genetics</u>
Cell, organelle	Cytology	Cytogenetics
Tissue, organ	Anatomy, histology, embryology	Embryogenetics, ontogenetics
Organism	Anatomy, physiology	Physiological genetics
Population	<u>Population biology</u>	<u>Population genetics</u>
Species	Evolutionary biology	Evolutionary genetics
Ecosystem	<u>Ecology</u>	<u>Ecological genetics</u>

Molecular Ecology

16

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1

Фенотипическая пластичность и эпигенетика (временные обратимые изменения в ДНК и гистонах, влияющие на экспрессию генов)		
Примеры как средовые факторы могут влиять на фенотипические признаки		
Traits	Environmental influence	Example
Gender	Temperature during embryonic development	Eggs of the American snapping turtle <i>Chelydra serpentina</i> develop primarily into females at cool temperatures, primarily into males at moderate temperatures, and exclusively into females at warm temperatures (Ewert <i>et al.</i> 2005)
Growth patterns in plants	Soil nutrients and water availability	Southern coastal violet (<i>Viola septemloba</i>) allocated a greater proportion of biomass to roots and rhizomes in poor-quality environments (Moriuchi & Winn 2005)
Leaf size	Light intensity	Dandelions (<i>Taraxacum officinale</i>) produce larger leaves under conditions of relatively strong light intensity (Brock <i>et al.</i> 2005)
Migration between host plants	Age and nutritional quality of host plants	Diamond-back moths (<i>Plutella xylostella</i>) are most likely to migrate as adults, if the juvenile stage feed on mature plants (Campos <i>et al.</i> 2004)
Feeding-related morphology	Food availability	Sea-urchin larvae (<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> and <i>S. franciscanus</i>) produce longer food-gathering arms and smaller stomachs when food is scarce (Miner 2005)
Plumage coloration	Carotenoids in diet	The plumage of male house finches (<i>Carpodacus mexicanus</i>) shows varying degrees of red, orange and yellow depending on the carotenoids in each bird's diet (Hill <i>et al.</i> 2002)

17

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта. 2017. Вторник. #1

Фенотипическая пластичность и эпигенетика (временные обратимые изменения в ДНК и гистонах, влияющие на экспрессию генов)		
Traits	Environmental influence	Example
Feeding-related morphology	Food source	Oak caterpillars <i>Nemoria arizonaria</i> that eat catkins (inflorescences) camouflage themselves by developing into catkins-mimics, whereas those feeding on leaves develop into twig mimics (Greene 1996)
		• генетический анализ нужен для определения видовой принадлежности • эпигенетический анализ нужен для изучения как средовые факторы влияют на фенотипические признаки
гусеница, питающаяся соцветиями (из потомства одних и тех же родителей)		гусеница, питающаяся листьями

18

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта. 2017. Вторник. #1

«История научной дисциплины - это история изменения парадигмы» Thomas Kuhn, 1962

- Самым большим изменением парадигмы в биологии в начале 20 века было **обнаружение сложной структуры популяции** у большинства видов и ее биологической роли как формы существования и эволюции видов
- **Синтез генетики и теория естественного отбора** был еще одним изменением парадигмы в сер. 20 века, который сыграл очень важную роль в создании популяционной генетики:
 - случайная генетическая мутация стала рассматриваться как источник изменчивости
 - популяция, а не индивидуум, стала рассматриваться как элементарная единица эволюции
- **Синтез молекулярной генетики и экологии стал новым изменением парадигмы, который привёл к возникновению молекулярной экологии**

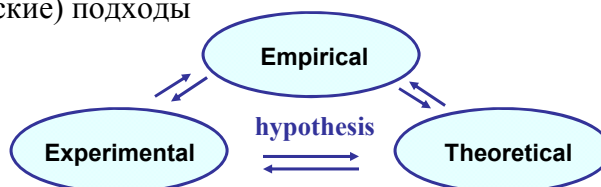
19

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Парадигмы молекулярной экологии встроены в парадигмы эволюционной и популяционной генетики

- **Как и чем различаются популяции и виды?** (по каким аллелям, генотипам, фенотипам, генетической структуре, системе скрещивания и **распространению** они отличаются)
- **Почему они отличаются?** (из-за фенотипической пластичности, мутаций, отбора, **ограниченной миграции и потока генов**, генетического дрейфа, **изоляции, адаптации к различным средам**, случайных факторов и т.д.)
- **Что это означает для популяции, вида или экосистемы?** (обеднение, угроза, упадок, исчезновение, рост, экспансия и т.д.)
- **Эмпирические** (естественные популяции), **Экспериментальные** (манипулируемые популяции), **Теоретические** (прогностические, математические) подходы



20

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Ключевая проблема молекулярной экологии – это генетическая стабильность популяций

- Естественная популяция – это не только единица микроэволюции, но также часто и объект хозяйственной деятельности человека.
- При этом вид обычно представлен не одной популяцией, а системой взаимодействующих популяций.
- Т.о., успешное сохранение, защита и управление биологическими ресурсами и экологическая ресторация зависят в основном от стабильного и устойчивого воспроизводства популяций.

21

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Parameters and parameter estimates in Molecular Ecology

- **Parameter** – a variable or constant appearing in a mathematical expression; a value (usually unknown) used to represent a certain characteristic; any factor that defines a system and determines or limits its performance (e.g., p_A – allele frequency of A allele in a population; m_A – migration rate of A allele in a population)
- **Estimate** – an indication of the value of an unknown quantity based on observed data; an approximation of a true score, parameter, or value; a statistical estimate of the value of a parameter (e.g., $\hat{p}_A$ – estimate of allele frequency of A allele in a population)

22

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Индуктивное и дедуктивное мышление в молекулярной экологии

- **Индуктивное мышление** – от частного к общему
- **Дедуктивное мышление** – от общего к частному

23

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Познание в молекулярной экологии

- **Теория** - это система идей или утверждений, объясняющих или описывающих группу фактов или явлений; общие законы, принципы или причины чего-либо известного или наблюдаемого
- **Предположение** - теоретическое предсказание
- **Вывод** - логическое умозаключение на основе фактов
- **Моделирование** - исследование объектов познания на их моделях; построение и изучение моделей реально существующих объектов, процессов или явлений с целью получения объяснений этих явлений, а также для предсказания явлений, интересующих исследователя.

24

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Разработка и проведение эксперимента в молекулярной экологии

- Адекватное число независимых повторов
- Одновременный и подходящий контроль
- Размер выборки, достаточный для минимизации стохастических эффектов
- Статистическая мощность
- Осторожность с обобщением на другие ситуации и виды

25

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Synthesis of Ecology and Molecular Population Genetics: How it all began?

The era of empirical Molecular Population Genetics based on sequence data began ~ 25 years ago from the study of nucleotide polymorphism in *Adh* locus in *Drosophila* (Martin Kreitman 1983, *Nature* **304**, 412 - 417)



- This study can be also considered as one of the first Molecular Ecology study that provided insights into the nature and importance of natural selection and also identified genes targeted by adaptive events: this study demonstrated genetic basis for the alcohol tolerance in different *Drosophila* populations that rear in the fermented substrate



26

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



402
ARTICLES
NATURE VOL. 354 4 AUGUST 1991

Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*

Martin Kreitman
 Museum of Comparative Zoology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138, USA

The sequencing of eleven cloned Drosophila melanogaster alcohol dehydrogenase (Adh) genes from five natural populations has revealed a large number of previously hidden polymorphisms. Only one of the 43 polymorphisms results in an amino acid change, the one responsible for the two electrophoretic variants (fast, Adh^F, and slow, Adh^S) found in nearly all natural populations. The implication is that most amino acid changes in Adh would be selectively deleterious.

MANY issues in population genetics require, for proper evaluation, measurements of genetic variation in natural populations. In recent years, this measurement has been made primarily by gel electrophoresis^{1,2}, which detects differences in amino acid sequence of proteins. Such studies have uncovered a remarkable amount of genetic polymorphism at loci coding for soluble enzymes³. However, because bands on electrophoretic gels are phenotypes, not genotypes, the total extent of genetic variation at structural loci remains unknown.

Recent advances in recombinant DNA technology, including rapid sequencing techniques^{4,5}, now allow allelic differences between individual genes to be identified directly at the nucleotide level. The complete resolution of genetic variation afforded by DNA sequence comparisons not only solves the problem of detecting all amino acid substitutions between proteins, it also identifies nucleotide variations that are not translated into protein differences. Sequence variation in noncoding regions such as introns, or between synonymous codons, which is presumably not subject to natural selection acting through the phenotype of the encoded protein, is the best available source for estimating the frequency of polymorphism due to neutral gene substitution. This estimate, which can only be made from direct DNA sequence comparisons, is crucial for understanding the role of natural selection and genetic drift in the maintenance of genetic variation.

I report here a DNA sequence comparison of 11 independently cloned Adh genes from five geographically distinct populations of the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. Virtually all natural populations in this species are polymorphic for two electrophoretically distinguishable alleles^{6,7}, Adh^F and Adh^S, which differ by a single amino acid (Thr versus Iys at codon 192)⁸. However, several other variants have been identified, some of which are electrophoretically indistinguishable from the Adh^F or Adh^S electrophore. The most common one, a heat-resistant variant of Adh^F, has been reported at frequencies as high as 10% in some populations^{9,10}. Therefore, I was particularly interested in whether a DNA sequence analysis could detect genetic heterogeneity among proteins with identical electrophoretic mobilities. This comparative DNA sequence study of five Adh^F and six Adh^S alleles, shows the presence of many silent polymorphisms in exons and introns but no amino acid replacement polymorphisms within the two electrophores. This distribution of nucleotide polymorphism is a strong indication that virtually all amino acid replacement mutations have been selectively deleterious. This study also reports extensive sequence conservation in the 3' flanking region of the Adh gene.

Physical organization

Figure 1 shows the structure of the Adh gene, the protein-encoding sequence of which is split into three sections (of

lengths 96 base pairs (bp), 405 bp and 264 bp) separated by two small introns (65 bp and 70 bp). Two transcripts are produced, a larval and an adult form, differing only in their 5' noncoding leader sequences. The larval mRNA leader sequence, 70 nucleotides in length, is contiguous with the first coding sequence in exon 2 and therefore is unspliced to the mature message. The adult mRNA contains an 87 nucleotide leader sequence that is transcribed from a segment located 690 bp upstream from the first coding sequence. This leader sequence (positions 1-87) is spliced to a site 36 nucleotides 5' to the AUG initiation codon in the mature mRNA (positions 741/742). Therefore, in addition to the two small introns dividing the coding regions, the adult primary transcript contains an additional intron of 654 bp at the 3' end of the gene. A larval consensus promoter sequence 'TATAATA' as well as part of the larval leader sequence is included in the 3' end of the adult intron.

Sequence polymorphism

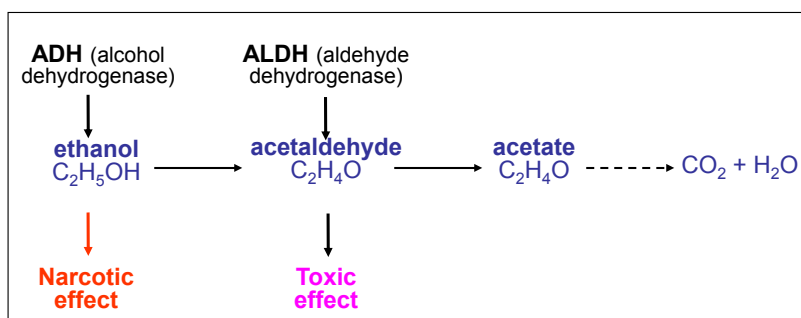
A consensus DNA sequence based on the six Adh^F genes is shown in Fig. 2. It contains the complete structural gene, and also flanking 5' (63 bp) and 3' (800 bp) sequence. Table 1 shows a summary of DNA sequence variation among the 11 genes over this 2,721 bp region. Forty-three nucleotide positions are polymorphic overall, 14 in the three coding regions (750 bp), 11 in the adult intron (654 bp), 7 in introns 2 and 3 (135 bp), 3 in the 5' and 3' nontranscribed sequences (132 bp) and 8 in the 5' and 3' flanking regions (363 bp). Thirteen of the 43 sites

Fig. 1 Structure of the Adh gene of *D. melanogaster*. Two different transcripts have been identified in adult and larval tissues which differ only in their 5' noncoding sequences. The larval 5' leader is contiguous with the first coding region whereas 67 bp of the adult 5' leader is transcribed from a region located 690 bp further upstream and is spliced to a site located 36 bp upstream from the translation initiation. The two leader sequences overlap, therefore, by 36 bp.

27

Molecular Ecology: A case study of ethanol tolerance in human populations – interaction of genotype and environment

- The study of alcohol dependence in human populations is also an example of **Molecular Ecology**:



28

Molecular Ecology: A case study of ethanol tolerance in human populations – interaction of genotype and environment

- Alcohol tolerance in human populations:

“strong” ADH + “strong” ALDH = can consume much booze with little “fun”, but without bad side effects
 ↓ weak narcotic effect ↓ weak toxic effect
 indifferent to alcohol and less prone to alcohol dependence

“weak” ADH + “strong” ALDH = have “fun” even from a small dose, stay “high” for a longer period and can consume much without bad side effects
 ↓ strong & prolonged narcotic effect ↓ weak toxic effect
 prone to alcohol dependence
 (populations that were less exposed to the fermented food such as those that live in cold climate are less tolerant to alcohol)

“strong” ADH + “weak” ALDH = no “fun” and severe bad side effects
 ↓ weak narcotic effect ↓ strong toxic effect
 immune to alcohol dependence
 (populations living in warm climate that developed more tolerance to highly fermented products)

29

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Выпуск. #1



Molecular Ecology: A case study of ethanol tolerance in human populations – interaction of genotype and environment

- The problem with alcohol tolerance and dependence as phenotypic traits is very complex in human populations
- There are many genes that are involved in ethanol metabolism and receptivity in humans (alcohol dehydrogenases, aldehyde dehydrogenases, cytochrome P4502E1, catalase/peroxidase, aminobutyric acid (GABA) receptor genes, etc.; see [Danielle D.M., Foroud T. 2003](#) Candidate Genes for Alcohol Dependence: A Review of Genetic Evidence From Human Studies. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research* 27(5):868-879)
- Ecological and Population genomics & association mapping
- Epigenetic, social, ethnic & economic issues

30

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Выпуск. #1



Заключение

- С появлением молекулярной популяционной генетики появилась возможность получить генетические данные о природных популяциях необходимые экологам
- Генетические данные позволяют понять отношения между фенотипом и генотипом, которые часто очень сложны из-за фенотипической пластичности и могут сильно зависеть от среды
- Одно из первых исследований, связывающих молекулярную генетику и экологию, было основано на аллозимах алкогольдегидрогеназы (ADH) и вариации в нуклеотидной последовательности, которая её контролирует

31

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Key definitions

- **Gene:** a hereditary unit consisting of a sequence of DNA (or RNA in some viruses) that occupies a specific location on a chromosome (**locus**) and determines a particular characteristic in an organism.
- **Genotype:**
 - (1) the entire set of genes in an organism;
 - (2) the genetic makeup of an individual or taxon;
 - (3) a set of alleles that determines the expression of a particular characteristic or trait (phenotype).
- **Allele:** a different form of the same gene. A gene for a particular character or trait may have **multiple alleles** (exists in multiple **allelic forms**).
- Alleles could be **dominant, codominant and recessive:**
 - (1) for dominant A and recessive a alleles there could be three possible diploid genotypes for a particular character: AA (homozygous dominant), Aa (heterozygous), and aa (homozygous recessive), but only two phenotypes – $AA+Aa$ and aa .
 - (2) for codominant alleles A_1 and A_2 there could be three possible diploid genotypes for a particular character: A_1A_1 (first homozygote), A_1A_2 (heterozygote), and A_2A_2 (second homozygote), and three phenotypes, respectively.
- **Phenotype:**
 - (1) the physical appearance or biochemical characteristic of an organism as a result of the interaction of its genotype and the environment.
 - (2) the expression of a particular trait, for example, skin color, height, behavior, etc., according to the individual's genetic makeup and environment.
- **Phenotypic plasticity** – the potential for a single genotype to develop into multiple alternative phenotypes under different environmental conditions

32

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Key definitions

- **an isolated population** is a randomly breeding group of individuals that share a common **gene pool**, occupy the same area and mate mostly or solely among themselves, usually as a result of physical isolation from other groups, although biologically they could breed with any members of the same species
- **gene pool**: all the genes in a population at a particular time
- **metapopulation** is a group of sub-populations in a given area, where the individuals of the various sub-populations are able to migrate and exchange genes across the area

33

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



- **Из предыдущей части лекции:**

- возникновение молекулярной экологии, парадигмы, сфера приложения и подходы

- **Молекулярно-генетические маркеры:**

- Взаимодействие генотипа с окружающей средой
- Закономерности и типы генетической изменчивости и генетических маркеров
- Частота генотипов и аллелей (в популяции)
- Визуализация полиморфизмов (наблюдение за мутантами, электрофорез, секвенирование и т.д.)

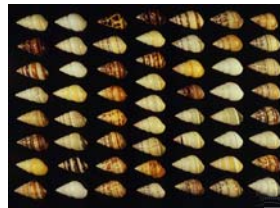
34

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Генетическая изменчивость - универсальное природное явление Большинство природных популяций являются полиморфными

Darwin finches on Galapagos



Lazuli bunting



Astrophytum myriostigma



Swallowtail butterfly



Какая часть этой изменчивости является генетической?

35

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1

Основная проблема молекулярной экологии - связать фенотипы и среду с генотипами



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1

Различные типы изменчивости

- Видимая (фенотипическая, морфологическая) или скрытая (физиологическая, биохимическая)
- Генетическая (наследуемая) или соматическая (ненаследуемая) или эпигенетическая (может быть и наследуемой и ненаследуемой)
- Генетическая (необратимая) или эпигенетическая (обратимая)
- Доминантная или рецессивная или кодоминантная
- Количественная или качественная
- Нейтральная или селективная
- Адаптивная или неадаптивная или вредная
- Регуляторная или структурная
- Экспрессируемая или неэкспрессируемая
- Генная или хромосомная
- На уровне белков (замены аминокислот) или на уровне ДНК (замены нуклеотидов и инделы)
- Синонимичная или несинонимичная

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Nature (*Genotype*) vs. Nurture (*Environment*)

$$P = G + E + G \times E$$

$$\text{Phenotype} = \text{Genotype} + \text{Environment} + \text{Interaction}$$

Organisms are different because of the:

- *genetic* differences among individuals
- different *environments* where individuals are growing
- and *interactions* between the *genotypes* and the *environments* in which they grow

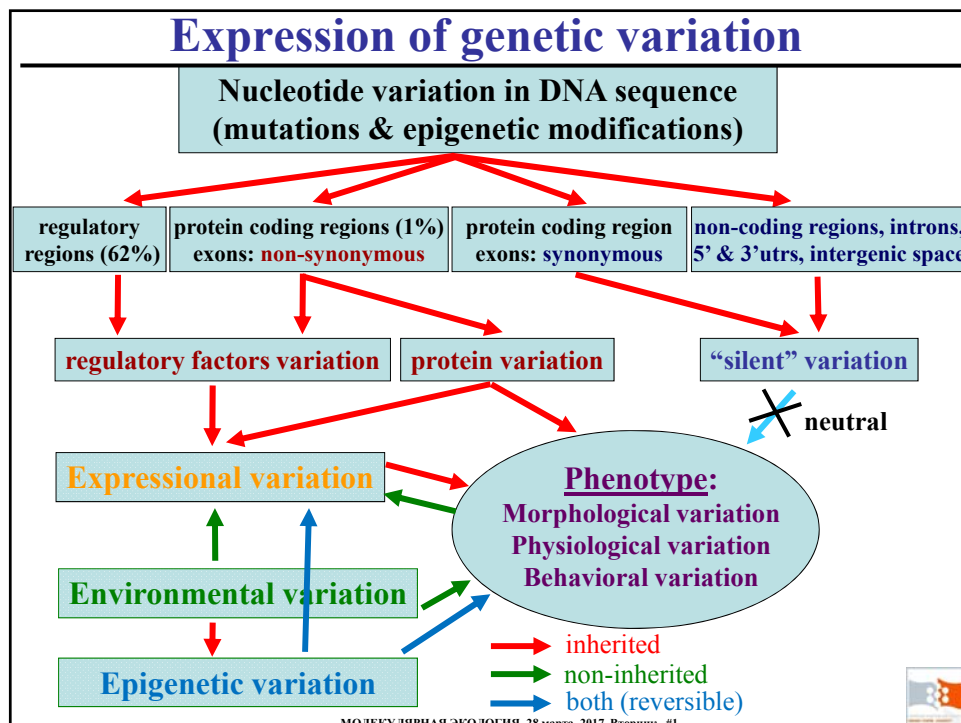
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Mendelian (Monogenic) vs. Complex (Polygenic)

- **Mendelian (Monogenic) = Qualitative**
 - Single gene responsible for most of the observed phenotypic variance
- **Complex (Polygenic) = Quantitative**
 - Multiple genes with gene $\times$ gene, gene $\times$ environment interactions contributing to phenotypic variance

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта. 2017. Выпуск. #1



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта. 2017. Выпуск. #1



How to measure genetic diversity in populations?

1) Traditional methods

- field or common garden experiments (provenance, progeny and clonal tests)
- molecular genetic markers: advantages and disadvantages; summary statistics
- Quantitative Trait Locus (QTL) Mapping

2) Modern population & ecological genomics approaches (курс «Геномика» на след. неделе)

- new type of functional genomic markers
- use of adaptive trait related candidate genes in population studies
- association mapping with phenotypic and environmental variation
- detecting selective signatures and loci under adaptive genetic divergence in natural populations using neutrality tests and outlier-detection approaches
- differential expression, transcriptome profiling, etc.

Integrated approach: 1) & 2)

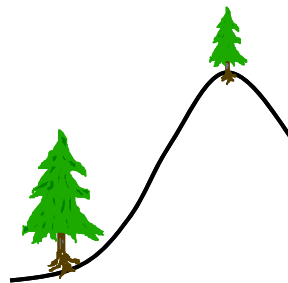
Крутовский К. В. От популяционной генетики к популяционной геномике лесных древесных видов: Интегрированный популяционно-геномный подход // Генетика. 2006. Т. 42. № 10. С. 1304–1318.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1

Nature (Genotype) vs. Nurture (Environment)

How to separate the two?

Example: *Altitudinal gradient*



Common Garden Exp.



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Nature (Genotype) vs. *Nurture* (Environment)

Monozygotic (identical) twins: How to separate the two?



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта. 2017. Выпуск. #1

Географические культуры (provenance, progeny and clonal tests)



USDA Forest Service Pacific Northwest Research Station runs an ecogeographic study of Douglas-fir



Weyerhaeuser Company runs clonal evaluation of phenotypes in loblolly pine and Douglas-fir



USDA Forest Service Dorena Tree Improvement Center runs a white pine blister rust screening program in sugar pine

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта. 2017. Выпуск. #1

Географические культуры

- Помогли много узнать об адаптивной изменчивости сложных признаков как на макро-, так и на микро-экологическом уровне
- Помогают выявить географические различия в популяциях лесных деревьев, такие как широтные или высотные клины
- **Время и трудозатратные, относительно дороги и основаны исключительно на фенотипах**
- **Могут оценивать генетические параметры, но только по измеряемым признакам, а не по отдельным генам**
- **Не дают информацию о том, какие именно гены и сколько из них участвуют в адаптации, а также о том, насколько фенотипическая изменчивость может быть объяснена генетической изменчивостью этих генов**

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Типы генетической изменчивости и генетических маркеров

- Генетическая изменчивость является важнейшим и необходимым компонентом эволюции. Генетическая адаптация и эволюция невозможны без генетической изменчивости. Популяции организмов не могут меняться с течением времени, если члены этих популяций не меняются.
- Мутации - это основной источник генетической изменчивости, которые могут возникать разным образом, но относительно случайно, без учета «нужд» организма.
- На генетическую изменчивость и структуру популяции влияют также целый ряд других факторов:
 - генетическая рекомбинация
 - система скрещивания
 - эволюционные факторы (отбор, генетический дрейф и др.)
 - экологические факторы (демография, например, популяции, которые пострадали от случайной экологической катастрофы, могут иметь совершенно разные генетические структуры, чем те, которые не пострадали. Популяции, которые расширяются или сжимаются, также могут быть очень разными генетически, чем популяции постоянного размера)

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Генетические маркеры

- Генетический маркер - легко идентифицируемая часть генетического материала, обычно ДНК или его продукта, который может использоваться для генетической идентификации (генотипирования) клеток, индивидуумов, популяций или видов
- Генотипирование может проводиться путём:
 - измерения или оценки фенотипических признаков (морфологические или физиологические маркеры);
 - экстракции с последующим фракционированием в гель-электрофорезе и визуализацией ферментов, белков или метаболитов (для биохимических маркеров) или фрагментов ДНК (для ДНК маркеров) из различных тканей растений или животных (например, листьев, почек, семян, клеток крови и т.д.)
 - секвенирование (прочтение) нуклеотидных последовательностей ДНК или РНК;
 - преобразование полученных наблюдений в генотипические данные (например, отдельные генотипы, аллельные частоты и т.д.)

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ, 28 марта, 2017, Вторник, #1



Генетические маркеры

- **Morphological** (seed color polymorphisms, mammal coat color polymorphisms, etc.)
- **Physiological** (resistance/susceptibility to insects or disease)
- **Molecular genetic markers used in Molecular Ecology or Ecological Genetics**
 - protein polymorphisms (*e.g.*, allozymes)
 - DNA polymorphisms (RFLPs and PCR-based, such as RAPDs, AFLPs, **SSRs**, **SNPs**, etc.)
 - epigenetic markers (MS-AFLP, bisulfite sequencing)

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ, 28 марта, 2017, Вторник, #1



Преимущества молекулярно-генетических маркеров

- непосредственно отражают основной процесс эволюции - изменения в наследственном материале
- могут обнаружить различие даже между близкородственными организмами (даже теми, между которыми нет фенотипической разницы)
- не зависят от окружающей среды (в отличие от некоторых морфологических признаков)
- так как мутации обычно происходят как случайные события с определённой частотой (вероятностью), то количество мутаций может быть использовано для калибровки эволюционного времени (молекулярных часов)

Недостатки?

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Молекулярно-генетические маркеры

- внесли большой вклад в понимание:
 - потока генов
 - гибридизации
 - структуры популяций
 - генетический дрейф
 - системы скрещивания
- в частности, в молекулярной экологии:
 - измерение генетического разнообразия и дифференциации
 - проверку разных гипотез миграции
 - распространение определенных генотипов опосредованное человеком
 - описание системы скрещивания и потока генов

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Традиционные молекулярно-генетические маркеры

- Аллозимы или Изоферменты (Allozymes)
- Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (Restriction Fragment Length Polymorphism - **RFLP**)
- Полиморфизм длин рестрикционных амплифицированных фрагментов (Amplified Fragment Length Polymorphism - **AFLP**)
- Случайно амплифицируемая полиморфная ДНК (Random Amplified Polymorphic DNA - **RAPD**)
- Рестрикционный амплифицированный полиморфизм (Cleaved Amplified Polymorphism - **CAP**)
- Микросателлиты или Простые повторы (Microsatellites or Simple Sequence Repeats - **SSRs**)

These traditional markers have different advantages and efficiency in addressing conservation genetics problems (reviewed in Krutovsky, K.V. and D.B. Neale, 2005 Forest genomics and new molecular genetic approaches to measuring and conserving adaptive genetic diversity in forest trees. In: Th. Geburek & J. Turok (eds.) Conservation and Management of Forest Genetic Resources in Europe, Arbora Publishers, Zvolen <http://www.fao.org/DOCREP/003/X6884E/X6884E00.HTM>).

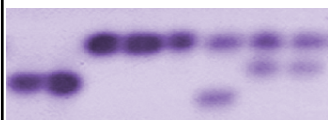
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Аллозимы или Изоферменты (Allozymes)

Advantage:

- Genic
- Inexpensive
- Codominant
- Reproducible
- Easy to develop & assay
- Amino acid substitutions (nonsynonymous variation)
- Relatively polymorphic



Disadvantage:

- Limited number
- Biased
- Only nonsynonymous variation
- Hidden alleles
- Untested orthology
- Tissue demanding
- Observed polymorphic alleles are under strong balancing selection
- Automation is impossible



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1

Allozyme markers applications

Measuring genetic variation	limited
Measuring population genetic structure and differentiation	limited
Estimating introgressive hybridization, migration or gene flow	limited
Studying phylogeny or taxonomy	good, but limited to closely related taxa
Characterizing mating system and paternity analysis	limited
Genecology	poor
Individual identification or DNA fingerprinting	poor

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ, 28 марта, 2017, Вторник, #1



Как диагностировать изменчивость белков

- не прямое сравнение формы и заряда посредством электрофореза и визуализации в агарозе или полиакриламидном геле
- прямое сравнение аминокислотных последовательностей, транслированных из нуклеотидных последовательностей

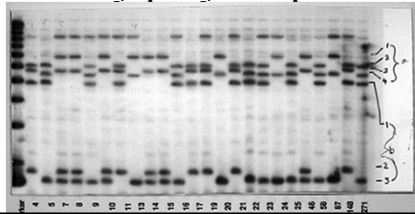
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ, 28 марта, 2017, Вторник, #1



Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Advantage:

- Numerous
- Codominant
- Inexpensive
- Reproducible
- Representative
- Relatively polymorphic



Disadvantage:

- Laborious
- Complex patterns
- Large amount DNA required
- Anonymous
- Untested orthology
- Automation is difficult

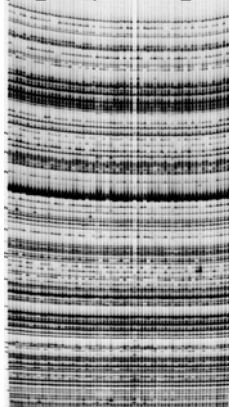
RFLP applications

Measuring genetic variation	limited
Measuring population genetic structure and differentiation	limited
Estimating introgressive hybridization, migration or gene flow	limited
Studying phylogeny or taxonomy	good, but limited to closely related taxa and questionable for organelle markers
Characterizing mating system and paternity analysis	limited
Genecology	poor
Individual identification or DNA fingerprinting	good

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

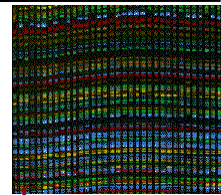
Advantage:

- Numerous
- Moderately expensive
- Very polymorphic



Disadvantage:

- Anonymous
- Dominant
- Untested orthology
- Difficult to score
- Technically demanding
- Requires high quality and quantity of DNA
- Questionable reproducibility
- Low transferability across species



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ, 28 марта, 2017, Вторник, #1



AFLP applications

Measuring genetic variation	good
Measuring population genetic structure and differentiation	good
Estimating introgressive hybridization, migration or gene flow	poor
Studying phylogeny or taxonomy	limited
Characterizing mating system and paternity analysis	poor
Genecology	poor
Individual identification or DNA fingerprinting	poor

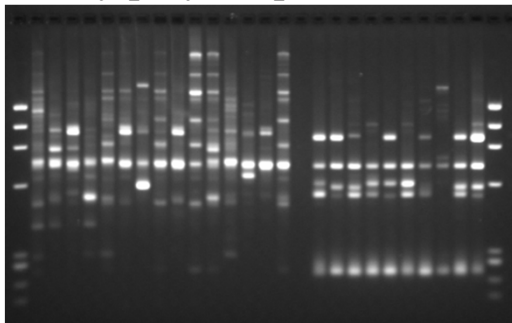
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ, 28 марта, 2017, Вторник, #1



Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Advantage:

- Numerous
- Inexpensive
- Easy to develop & assay
- Very polymorphic



Disadvantage:

- Anonymous
- Dominant
- Untested orthology
- Low reproducibility
- Low transferability across species

Based on single short
(usually 10 bp long)
random PCR primers

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта. 2017. Вторник. #1



RAPD applications

Measuring genetic variation	good
Measuring population genetic structure and differentiation	good
Estimating introgressive hybridization, migration or gene flow	poor
Studying phylogeny or taxonomy	limited
Characterizing mating system and paternity analysis	poor
Genecology	poor
Individual identification or DNA fingerprinting	poor

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта. 2017. Вторник. #1



Cleaved Amplified Polymorphism (CAP)

Advantage:

- Numerous
- Codominant
- Easy to assay
- Reproducible
- Polymorphic

Disadvantage:

- Laborious and expensive to develop
- Requires upfront discovery of restriction site polymorphisms or sequencing
- Selective genotyping

Derived Cleaved Amplified Polymorphism (dCAP)

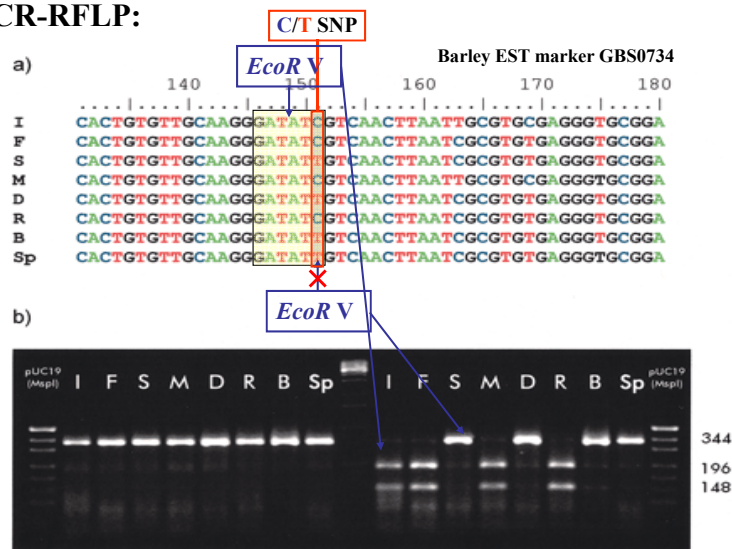
- Restriction sites can be introduced in the PCR amplified sequence using modified PCR primers
- Requires upfront sequencing

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Выпуск. #1



Cleaved Amplified Polymorphism (CAP)

aka PCR-RFLP:



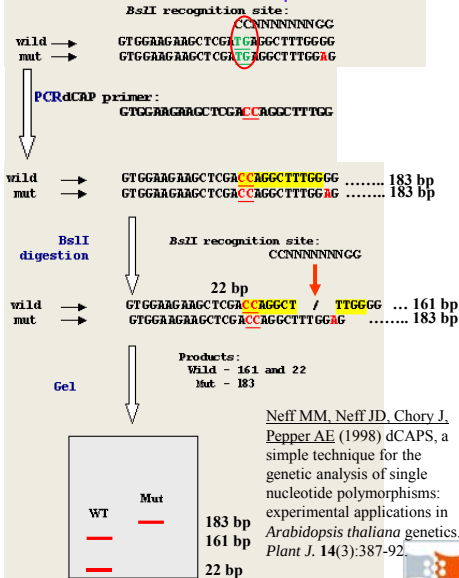
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Выпуск. #1



Derived Cleaved Amplified Polymorphism (dCAP)

- dCAP assay is a modification of CAP technique for detection of SNPs.
- A mismatch or mismatches in PCR primer are used to complement a target SNP and to create a restriction endonuclease (RE) site that includes this SNP.
- The modified PCR product is then subjected to restriction enzyme digestion and gel electrophoresis, and the presence or absence of the SNP is determined by the resulting restriction pattern.
- This technique is useful for genotyping known SNPs or mutations and for genetic mapping of PCR amplified DNAs.
- Similar to the CAPS technique, this method is simple, relatively inexpensive, and uses the robust technologies of PCR, restriction digestion and standard agarose gel electrophoresis.

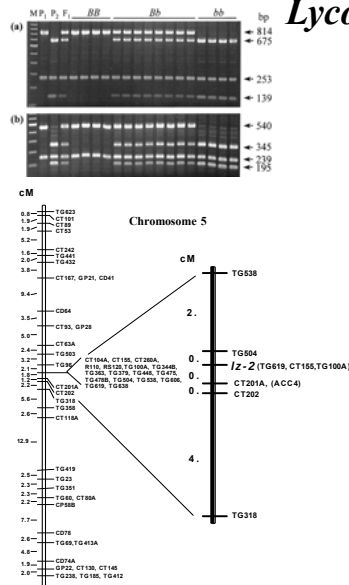
The *Bsa*I dCAPS assay: creating the RE recognition site to discern wild and mutant sequences



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Встреча. #1

Derived Cleaved Amplified Polymorphism (dCAP)

Fine mapping of the gravitropic tomato mutant *lazy-2* in *Lycopersicon esculentum*



Well, Meyer, Krutovsky, White & Lomax, 2000

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Встреча. #1

CAP or dCAP applications

Measuring genetic variation	good
Measuring population genetic structure and differentiation	good
Estimating introgressive hybridization, migration or gene flow	good
Studying phylogeny or taxonomy	good
Characterizing mating system and paternity analysis	good
Genecology	good
Individual identification or DNA fingerprinting	good

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Выпуск. #1



Microsatellites or Simple Sequence Repeats (SSRs)

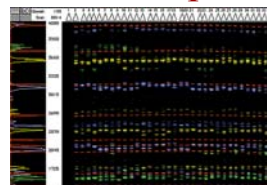
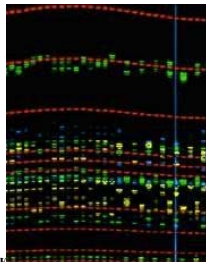
Advantage:

- Numerous
- Codominant (mostly)
- Reproducible (within species)
- Relatively easy to assay
- Very polymorphic
- Automation is possible



Disadvantage:

- Nongenetic
- Expensive to develop
- Frequent return mutations
- Frequent null alleles
- Low transferability across species



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Выпуск. #1



SSRs applications

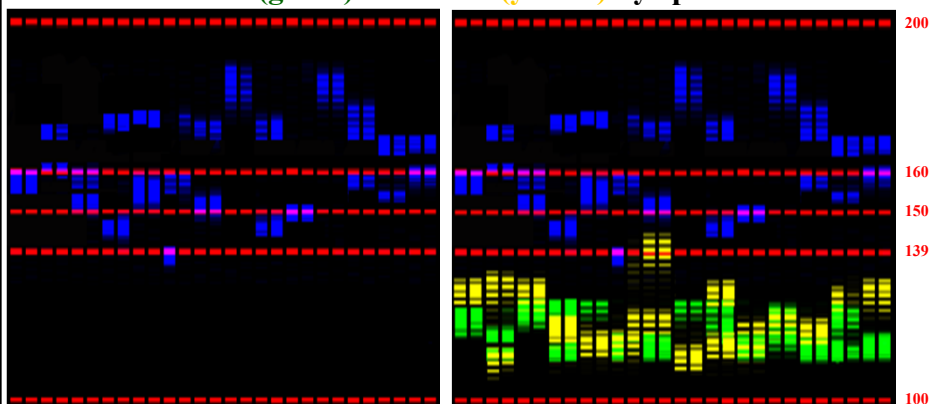
Measuring genetic variation	good
Measuring population genetic structure and differentiation	good
Estimating introgressive hybridization, migration or gene flow	limited to within species analysis
Studying phylogeny or taxonomy	poor
Characterizing mating system and paternity analysis	very good
Genecology	poor
Individual identification or DNA fingerprinting	very good

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта. 2017. Выпуск. #1



Microsatellite (SSR) markers in Douglas-fir

ABI377 multiplexed gel image of nuclear microsatellite DNA fragments amplified by PCR with fluorescent labeled **FAM (blue)**, **TET (green)** and **HEX (yellow)** dye primers



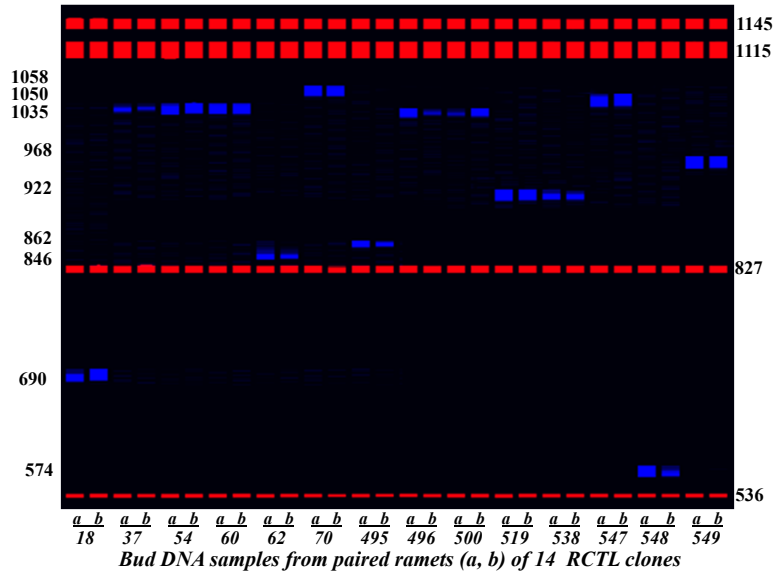
Slavov, G.T., G.T. Howe, I. Yakovlev, K.J. Edwards, K.V. Krutovsky, G.A. Tuskan, J.E. Carlson, S.H. Strauss and W.T. Adams, 2004 Highly variable SSR markers in Douglas-fir Mendelian inheritance and map locations. *Theor. Appl. Genet.* **108**: 873–880.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта. 2017. Выпуск. #1



Chloroplast minisatellite marker in Douglas-fir

ABI377 gel image of chloroplast minisatellite “hot-spot” DNA fragments amplified by PCR with fluorescent labeled FAM (blue) dye primers



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1

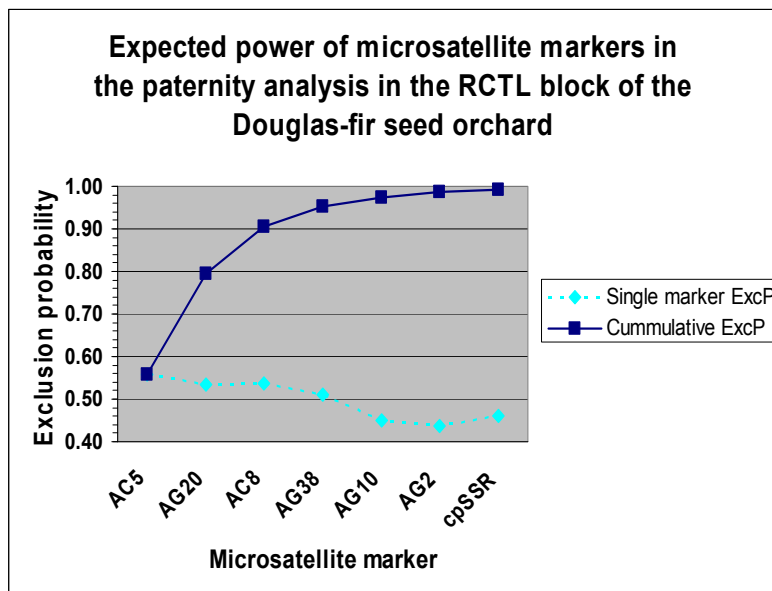
Microsatellite markers in paternity analysis: Douglas-fir clonal orchards

Genome	Marker	Number of RCTL clones	alleles	Hetero- zygosity	Exclusion probability Single	Cumulative
nSSR	AC5	18	12	0.8897	0.5581	0.5581
	AG20	18	10	0.8746	0.5348	0.7944
	AC8	15	9	0.8828	0.5369	0.9048
	AG38	13	9	0.8492	0.5096	0.9533
	AG10	19	6	0.7624	0.4510	0.9744
	AG2	17	5	0.7469	0.4363	0.9856
cpSSR	#17	19	10	0.7624	0.4597	0.9922
	Mean	17	8.7	0.8240	0.4981	
11 allozyme loci		70	2.7	0.2160		0.7560

The Timber Company, Cottage Grove, Oregon

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1

Paternity analysis in the Douglas-fir seed orchard using microsatellite markers



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Как диагностировать изменчивость ДНК

• Непрямые методы

- **аллозимы и белки**: экстракция из ткани, электрофорез, окрашивание и визуализация белковых продуктов в полимерном (агарозном или полиакриламидном) геле
- **RFLP**: экстракция ДНК, расщепление рестрикционными ферментами, электрофорез в полимерном (агарозном или полиакриламидном) геле, блоттинг, гибридизация, экспонирование и визуализация рентгеновской пленки
- **RAPD**: экстракция ДНК, ПЦР-амплификация с использованием неспецифических праймеров, электрофорез в полимерном (агарозном или полиакриламидном) геле, окрашивание EtBr или серебром и визуализация
- **VNTR / STR, SSR**: экстракция ДНК, ПЦР-амплификация с использованием специфических праймеров, электрофорез в полимерном (агарозном или полиакриламидном) геле, использование флуоресцентной метки или окрашивание EtBr или серебром и визуализация
- **EcoTILLING**: экстракция ДНК, ПЦР-амплификация, денатурация, ренатурация, ферментативное расщепление нуклеазами, режущими одноцепочную ДНК в месте гетеродуплексов, электрофорез в полимерном (агарозного или полиакриламидного) геле, окрашивание EtBr или серебром и визуализация

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Как диагностировать изменчивость ДНК

- **Прямые методы**

- ПЦР-амплификация, секвенирование ампликонов
- ПЦР-амплификация, SNP-генотипирующие платформы (сканеры)
- **генотипирование через секвенирование (genotyping by sequencing)**

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта. 2017. Вторник. #1



Основные недостатки традиционных молекулярно-генетических маркеров

Неизвестны:

- характер генетической изменчивости (кодирующие или некодирующие локусы, синонимичные или несинонимичные нуклеотидные замены - за исключением аллозимов и dCAP)
 - отношение к фенотипической изменчивости
 - селективное значение аллелей и генотипов
 - гапlostруктура
 - уровень экспрессии
- Мы практически ничего не знаем об адаптивном значении наблюдаемой генетической изменчивости!**

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта. 2017. Вторник. #1



Идеальный маркер для оценки адаптивной изменчивости должен соответствовать следующим критериям:

- быть непосредственно вовлеченным в генетический контроль адаптивных признаков
 - иметь известную последовательность ДНК, положение в геноме и известную функцию
 - быть легкодоступным для генетического анализа
 - иметь легко идентифицируемую аллельную изменчивость
 - быть легко использованным для разных популяций и видов
- Ни один традиционный маркер полностью не удовлетворяет всем этим критериям!**

Новый класс перспективных маркеров, который, удовлетворяет большинству, если не всем этим критериям, появился недавно в результате геномных исследований.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1



Новый класс функциональных геномных маркеров на основе ПЦР:

- Амплифицированные районы с охарактеризованной нуклеотидной последовательностью (**Sequence Characterized Amplified Regions (SCAR) or Sequence Tagged Sites (STS)**)
- Маркерная экспрессирующаяся последовательность (**Expressed Sequence Tags -ESTs**)

Генетическая изменчивость этих маркеров в основном представлена однонуклеотидными полиморфизмами (**single nucleotide polymorphisms - SNP**), которые в основном являются двуаллельными и хорошо поддаются высокопроизводительному генотипированию в большом популяционном масштабе.

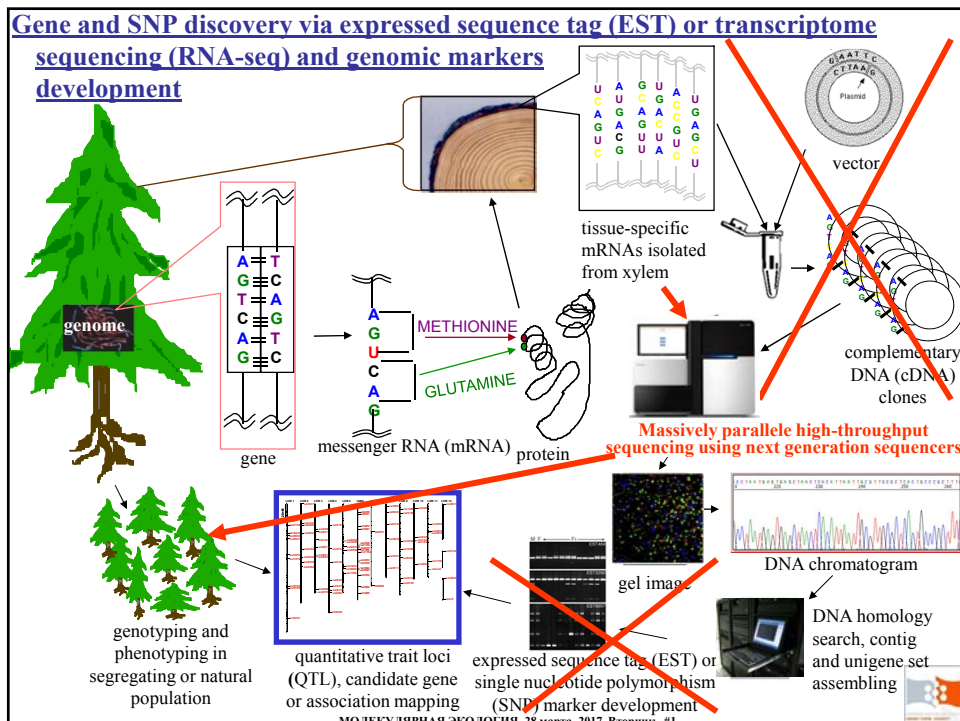
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Вторник. #1

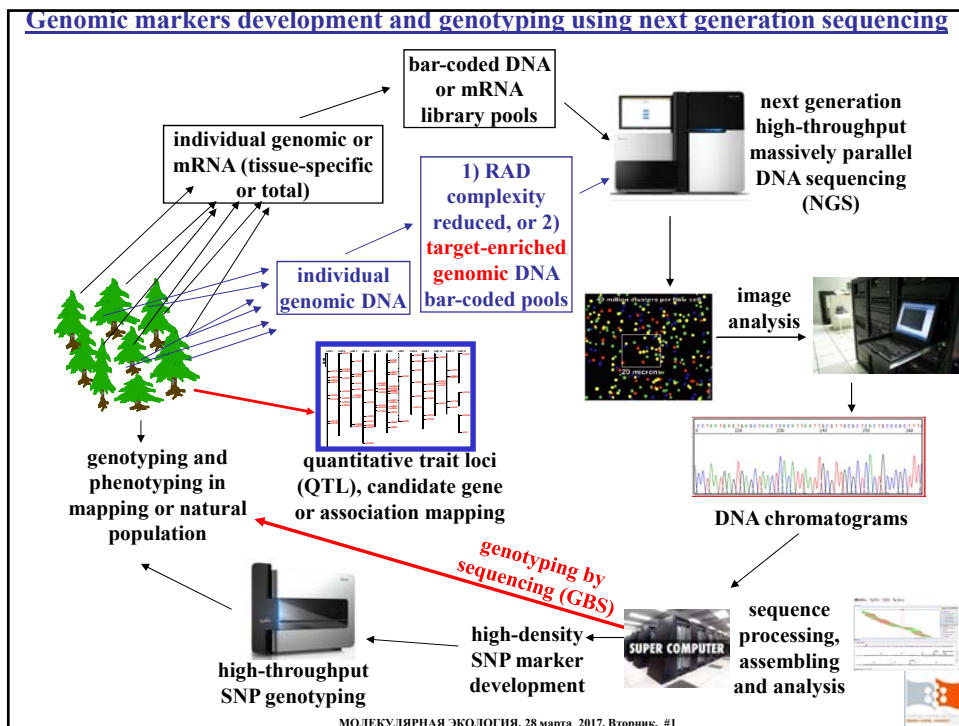


Developing new genomic markers using high-throughput massively parallel next generation sequencing (NGS)

- **EST or transcriptome (total mRNA) sequencing (RNA-seq)** (mostly SNPs in coding regions of expressed genes)
- **whole genome sequencing** (all SNPs)
- **partial genome sequencing** (subsets of SNPs):
 - target sequencing using target enrichment methods
 - restriction site associated DNA (RAD) sequencing

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ. 28 марта 2017. Выпуск. #1





SNPs discovery and analysis

Traditional (old) approach for SNPs discovery via amplicon sequencing:

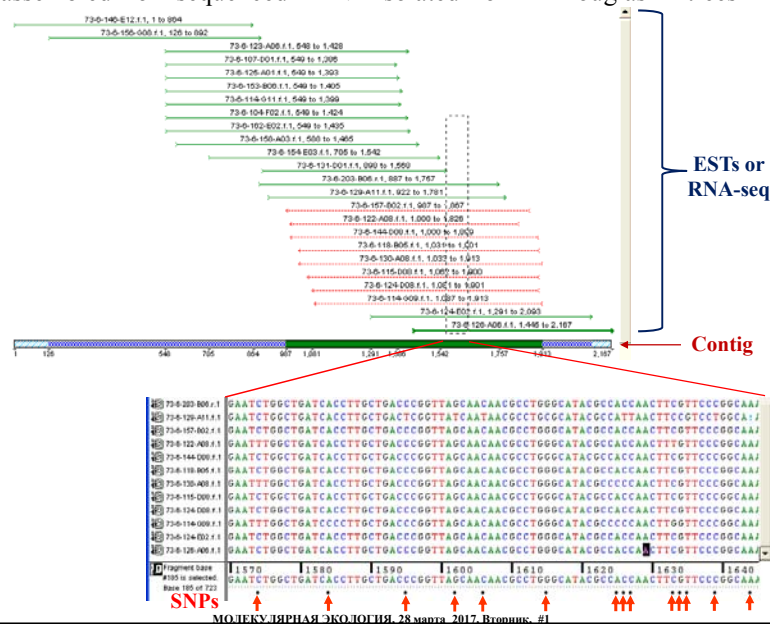
- selection of genes using available RNA or DNA sequences
- design of single gene member specific PCR primers PCR amplification and sequencing gene fragments from a population sample
- estimation of nucleotide diversity
- selection of SNPs for genotyping of population samples

Modern approach for SNPs discovery using next-generation sequencing (NGS) and high throughput SNP-genotyping platforms:

- **NGS allows to sequence simultaneously population pools consisting of multiple individually barcoded samples**

SNP detection *in silico*

Alignment for the contig of the light harvesting chlorophyll a/b-binding protein gene assembled from sequenced mRNA isolated from 24 Douglas-fir trees



Genotyping of PCR-based genomic markers:

doesn't require a priori SNP discovery:

- (1) Restriction enzyme cutting (CAP)
- (2) Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)
- (3) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)
- (4) Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)
- (5) **Direct genotyping by sequencing (GBS) either using single amplicons (Sanger or NGS) or total DNA (NGS)**

requires a priori SNP discovery:

- (1) Restriction enzyme cutting (dCAP)
- (2) Single nucleotide extension (e.g., fluorescence polarization detection; Amplifluor universal energy-transfer (ET) labeled primers; microarrays; mass spectrometry, such as, MALDI-TOF or Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight)
- (3) Oligonucleotide ligation assay (OLA)
- (4) Exonuclease detection (TaqMan)
- (5) Invasive cleavage of oligonucleotide probes (invader assay)
- (6) **SNP genotyping assays** (Life Technologies TaqMan® SNP Genotyping Assays; Illumina GoldenGate, Infinium, etc.)

Молекулярная экология. 28 марта 2017. Вторник. #1

Genetic Markers: Desirable properties

Depending on our purpose, we may desire genetic markers to be:

- biparental inheritance (nuclear), maternal (mitochondrial), or paternal (chloroplast)
- dependent or independent from environment (controlled by environment or by genotype; respectively)
- co-dominant inheritance (to be able to discriminate homo- and heterozygotes)
- polymorphic or monomorphic
- subject or not subject to selection (selectively neutral)
- phenotypically important or unimportant (*e.g.* DNA forensic loci)
- easily detectable and highly reproducible
- inexpensive for development and assay



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ, 28 марта 2017, Вторник, #1

Генетические маркеры в молекулярной экологии

- **Определение отдельных генотипов**
- **Оценка генотипических и аллельных частот**
- **Сравнение наблюдаемых генотипических частот с ожидаемыми согласно равновесию Харди-Вайнберга**
- **Сравнение частот**
 - ✓ между популяциями
 - ✓ между локальностями
 - ✓ во времени (т.е., в поколениях)
- **Демографический анализ**
- **Изучение взаимодействия аллелей разных локусов**
- **Описание уровня и распределения генетической изменчивости**



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ, 28 марта 2017, Вторник, #1