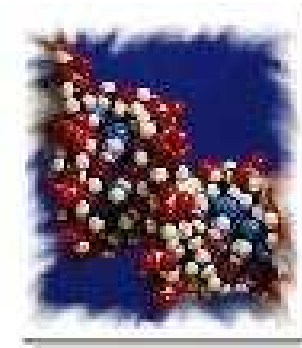
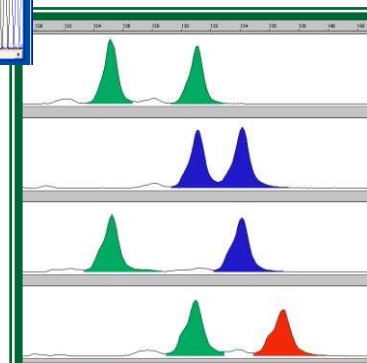
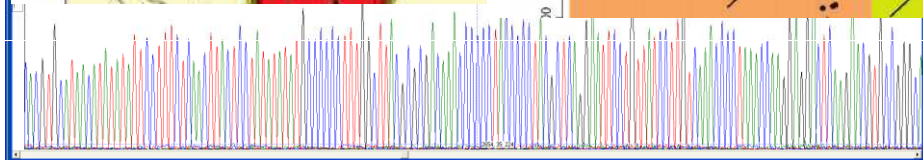
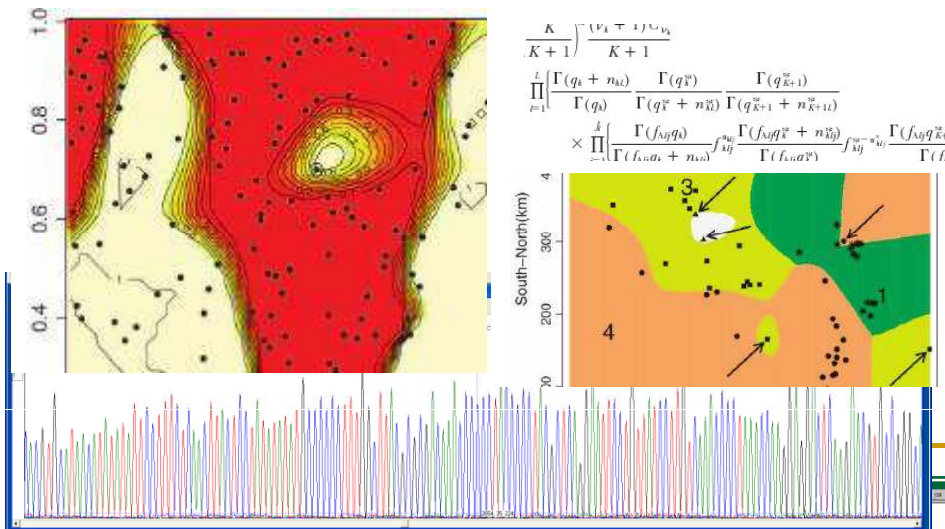
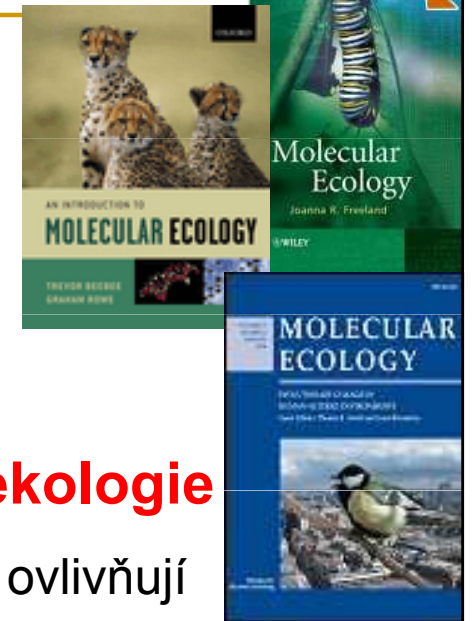


Ochranářská genetik

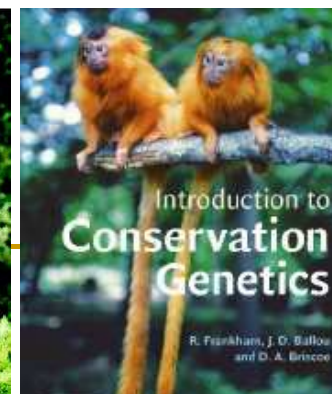
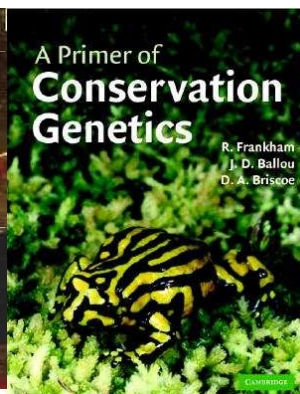
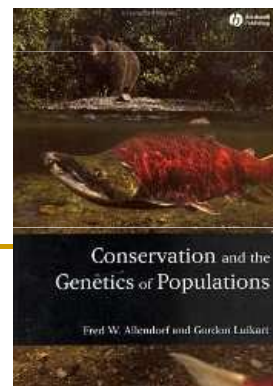
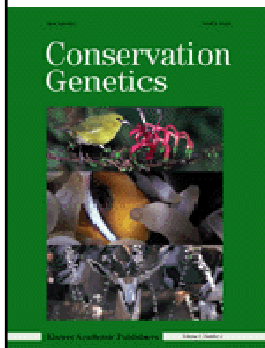
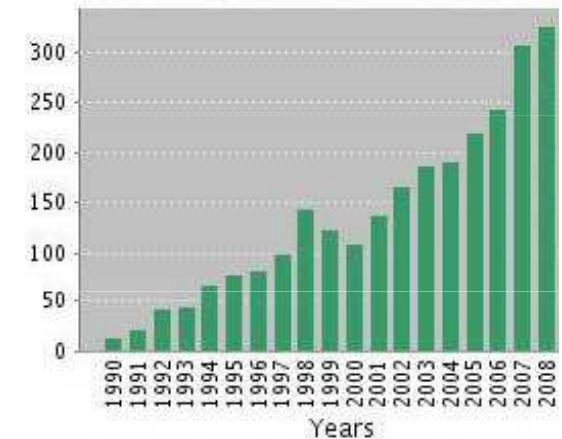
Význam genetické variability pro efektivní druhovou ochranu



Ochranářská genetika („conservation genetics“)



- Využití genetických metod v ekologii = **molekulární ekologie**
- studium genetické variability přírodních populací a faktorů, které ji ovlivňují
- Využití genetických metod v ochranářské biologii = **ochranářská genetika**
- PCR (90. léta) – počátek skutečné ochranářské genetiky (neinvazivní metody - již není potřeba destruktivního vzorkování)
- od r. 2000 - Conservation Genetics
- recentní review a knihy



Genetická diverzita je důležitou složkou biodiverzity

Úmluva o biologické rozmanitosti (CBD), Rio de Janeiro 1992

→ ochrana biodiverzity na úrovni **genů**, **druhů** a **ekosystémů**



Genetická rozmanitost - politicky důležitá (měla by být)

- „Biological diversity is comprised of *genetic differences within species, the diversity of species and the variety of ecosystems* „
(The Convention on Biological Diversity, CBD)

 - Tři úrovně biodiverzity:
 - **Genetic diversity: between individuals and populations**
 - Species diversity
 - Ecosystem diversity
-

Genetická rozmanitost: nejvíce přehlížená součást managementu ochrany biodiverzity

Conserv Genet (2010) 11:349–354
DOI 10.1007/s10592-009-0037-4

COMMENTARY

Genetic diversity is overlooked in international conservation policy implementation

Linda Laikre

Conservation Biology 

Conservation in Practice and Policy

Neglect of Genetic Diversity in Implementation of the Convention on Biological Diversity

LINDA LAIKRE,* FRED W. ALLENDORF,† LAUREL C. ARONER,‡ C. SCOTT BAKER,‡
DAVID P. GREGOVICH,§ MICHAEL M. HANSEN,** JENNIFER A. JACKSON,‡
KATHERINE C. KENDALL,†† KEVIN McKELVEY,‡‡ MAILE C. NEEL,§§ ISABELLE OLIVIERI,***
NILS RYMAN,* MICHAEL K. SCHWARTZ,‡‡ RUTH SHORT BULL,† JEFFREY B. STETZ,††
DAVID A. TALLMON,††† BARBARA L. TAYLOR,§ CHRISTINA D. VOJTA,‡‡‡
DONALD M. WALLER,§§§ AND ROBIN S. WAPLES****

24 dostupných národních strategií

genetická diverzita (GD) má být chráněna: 16 států (67 %)

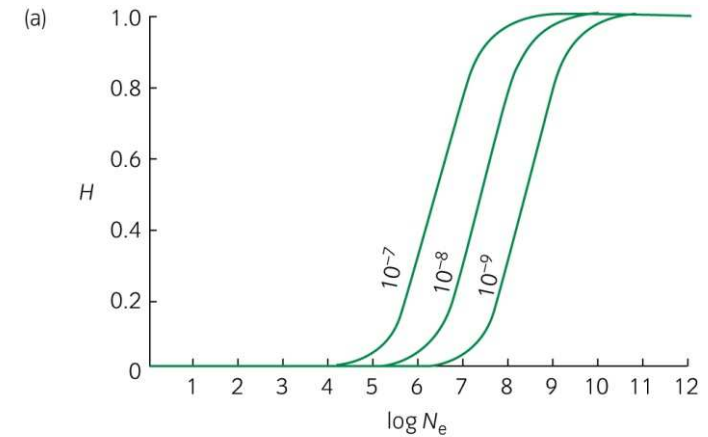
GD má být monitorována: 22 států (90 %)

potřeba nástrojů pro monitoring GD: 5 států (21 %)

PROČ JE VŮBEC GENETICKÁ
VARIABILITA DŮLEŽITÁ ?

Genetická variabilita jako ukazatel efektivní velikosti populace

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



Ne - effective population size

- velikost ideální populace (náhodné páření, rovnoměrný poměr pohlaví), která ztrácí genetickou diverzitu stejnou rychlostí jako aktuální populace
 - ovlivněna genetickou a věkovou strukturou, poměrem pohlaví, intenzitou inbreedingu atd.
 - vývoj genetické variability v malých populacích závisí na N_e více než na N
 - $N_e/N \approx 0.11$ (Frankham 1995), ale velká variabilita
-

Důsledky poklesu N_e

Snížení pozorované variability (H_e) – nejčastěji
neutrální markery (mtDNA, mikrosatelity atd.)



$$H_e = 4N_e\mu / [4N_e\mu + 1]$$

Pokles adaptivní variability – snížení adaptivního
potenciálu (tj. schopnosti přizpůsobovat se změně
prostředí)

$N_e \approx 500-1000$ = zajištění adaptivního potenciálu

„Budoucnost je v genech ...“

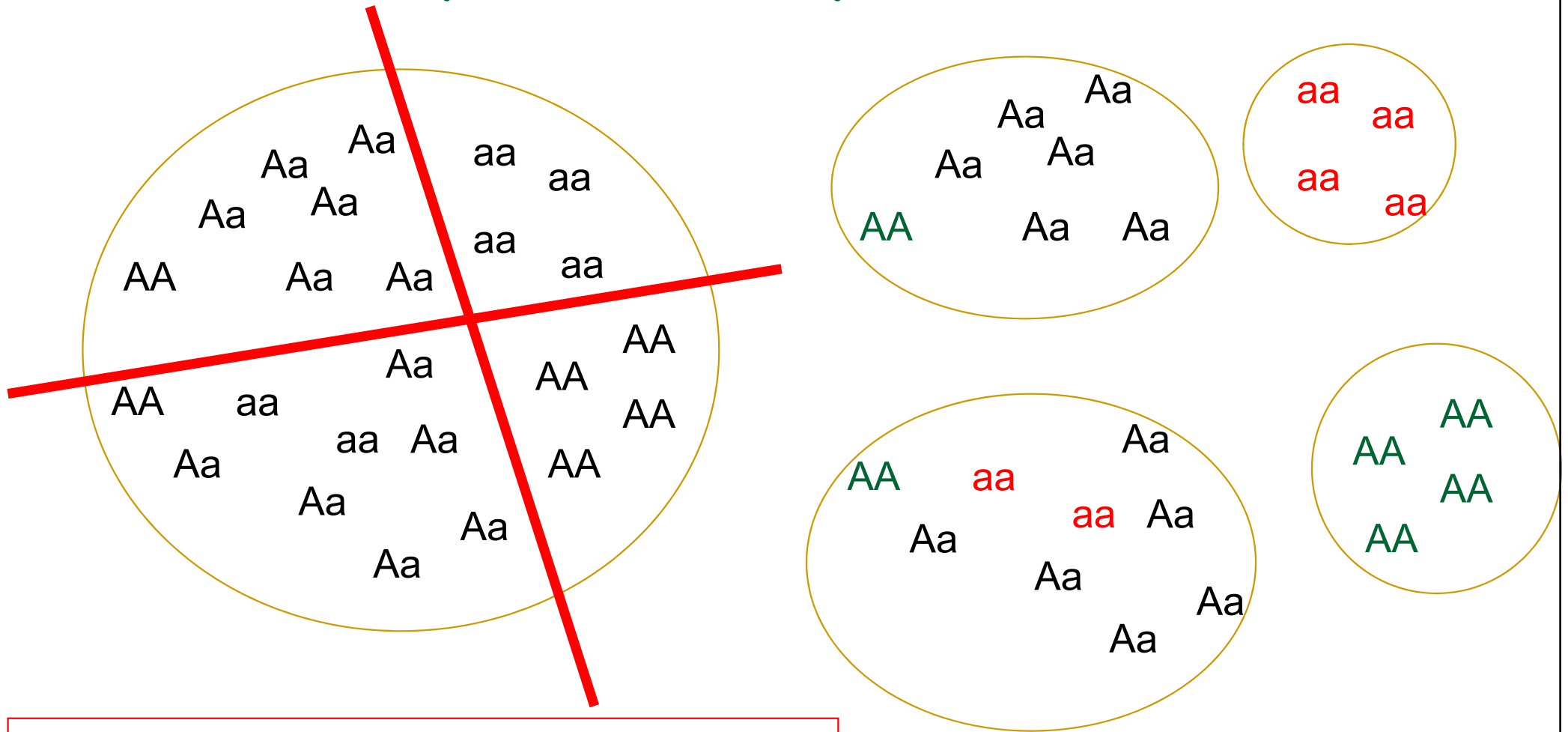
- Změny prostředí (např. klima, patogeny, aj.) → přizpůsob se nebo zmiz!
- Vysoká genetická variabilita znamená, že je zde více genetických variant, z nichž některé mohou být vhodné pro nové podmínky
 - Populace s vyšší genetickou variabilitou mají „více losů v loterii“ (= **adaptivní potenciál**)

Dryas octopetala v Alpách,
Německo. Photo: Steve Smith



**KTERÉ EVOLUČNÍ PROCESY
VEDOU KE SNÍŽENÍ EFEKTIVNÍ
VELIKOSTI POPULACE?**

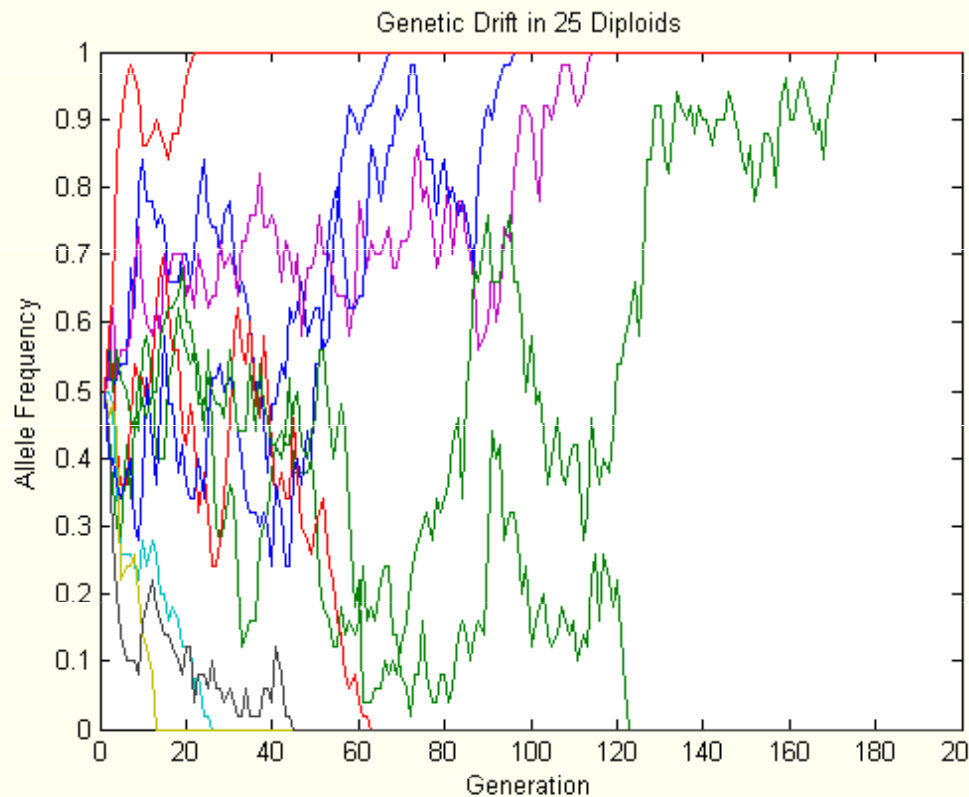
Genetický (náhodný) drift



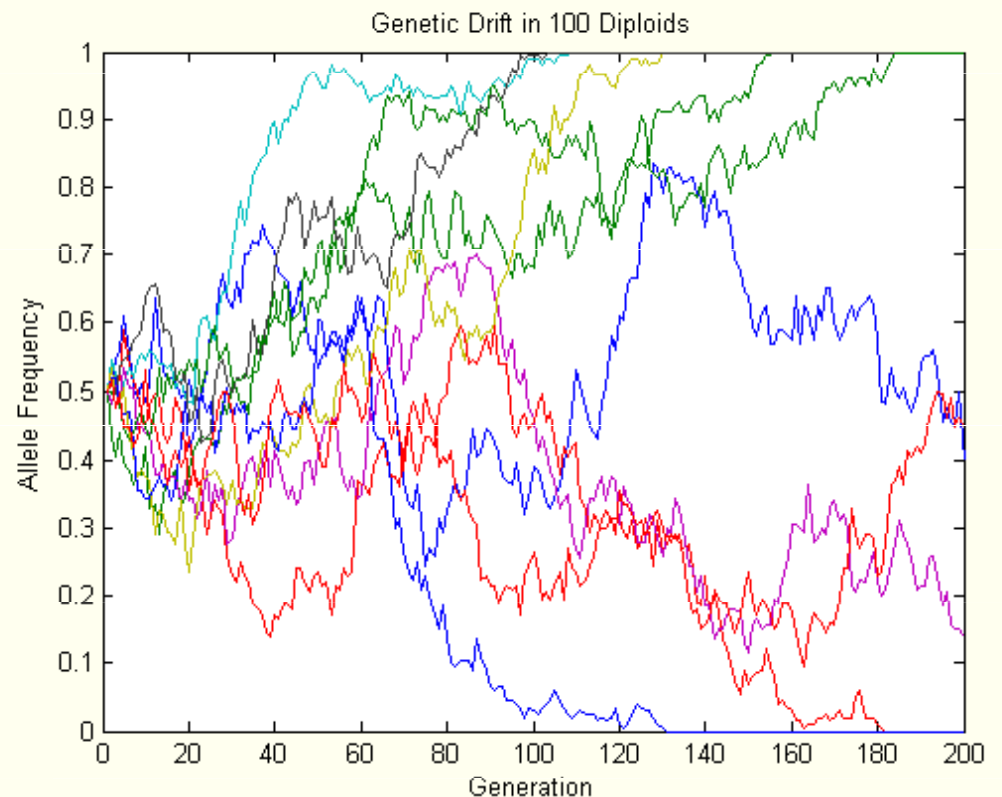
Bariéra toku genů, např. fragmentace biotopů

Snížení H_e a N_e

Intenzita driftu závisí na velikosti populace



25 jedinců



100 jedinců

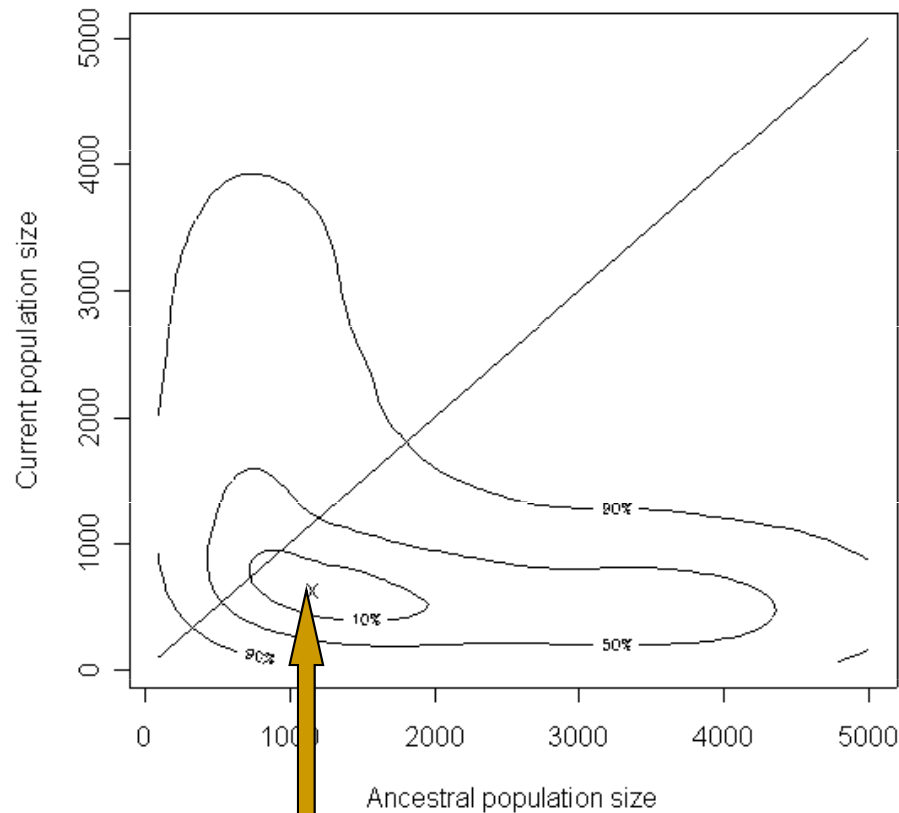
POČÍTAČOVÉ SIMULACE

VELMI VÝZNAMNÝ VLIV V MALÝCH POPULACÍCH !!!

Odhady N_e

- $F_{ST} = 1/(4N_e \cdot m + 1)$
 - recentní přístup: coalescent theory methods
 - TMVP (Beaumont 2003)
 - CoNe (Anderson 2005)
 - MLNE (Wang and Whitlock 2003)
 - MSVAR (Beaumont 1999)
- } nejméně 2 časové vzorky populace
- } stačí 1 vzorek

TMVP



N_A vs N₀

N_A – ancestral N_e

N₀ – recent N_e

- testuje i rozdíly N_A a N₀
- přesnější odhady pokud je více časových vzorků, ale stačí jen dva

MLNE

- zároveň s N_e odhaduje i *m*

MSVAR

- stačí jeden vzorek mikrosatelitových dat

Metodické přístupy

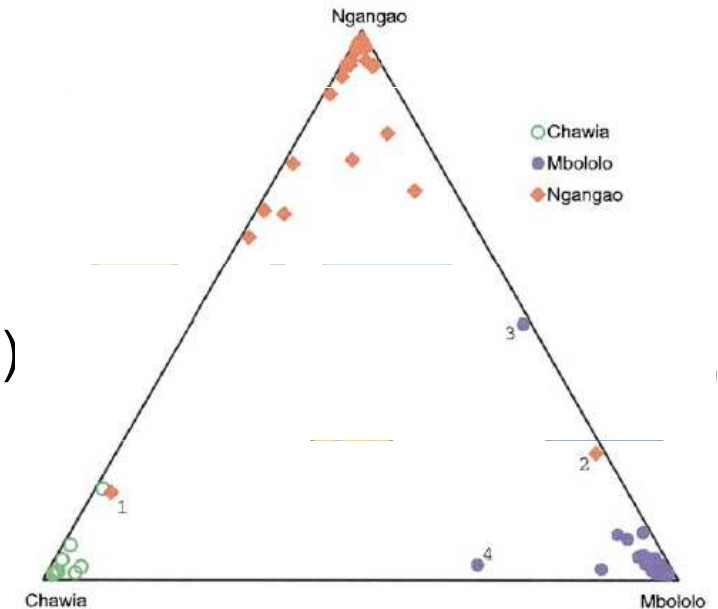
- 1) **Populační genetik**a – efektivní velikost populace, tok genů, „bottleneck“, příbuznost, atd. ... neutrální variabilita (např. mikrosatelity)
 - 2) **Fylogeografie** – historický původ populací a jejich fylogenetické vztahy, ESU ... většinou neutrální variabilita
 - 3) **Speciální přístupy** – neinvazivní genetické metody, vztah genetické diverzity a životaschopnosti populací, experimentální „conservation genetics“, selektované znaky (adaptivní i škodlivé)
-

1) Populační genetiky

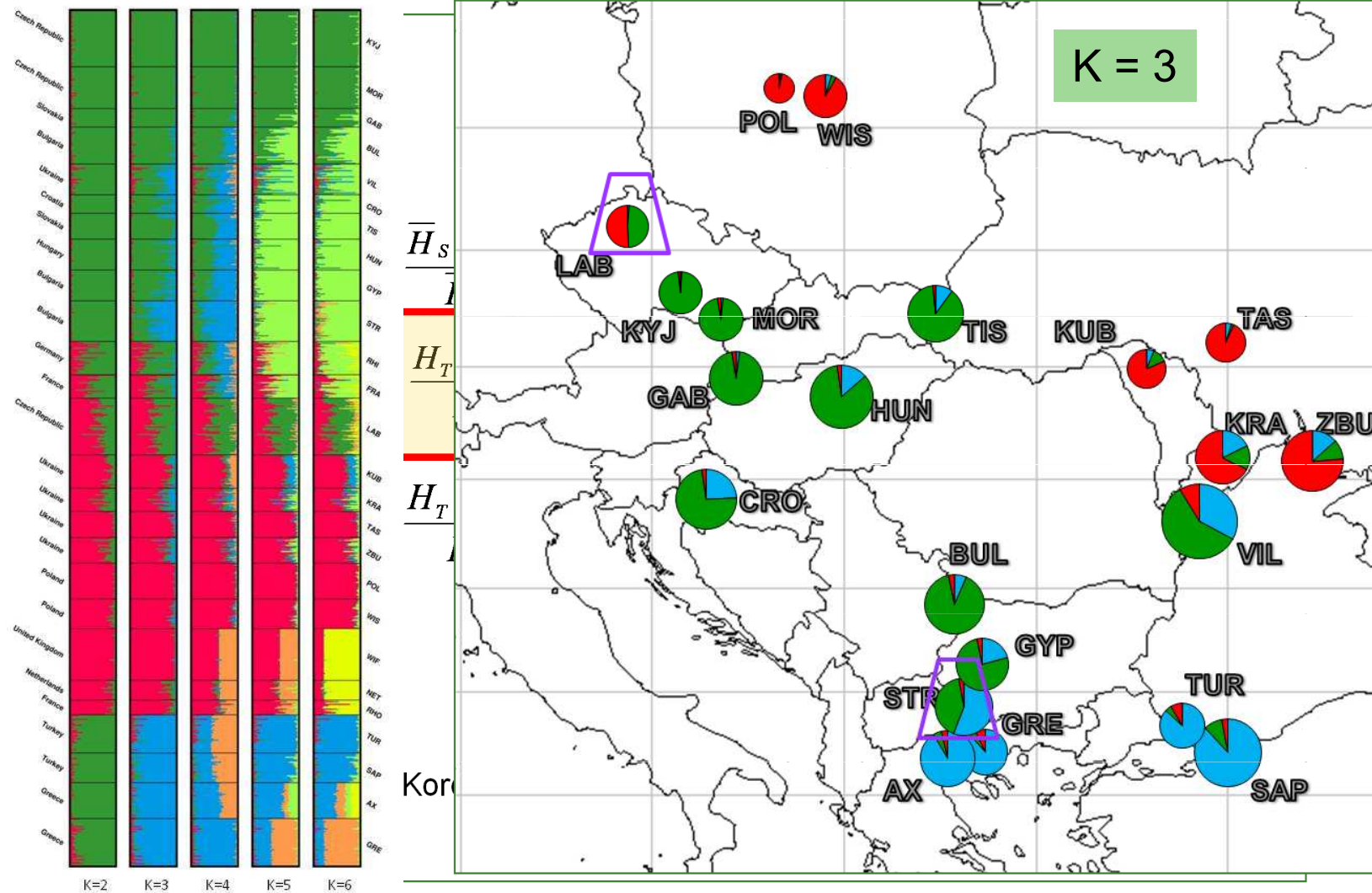
- studium struktury populací
- nejčastěji neutrální znaky - mikrosatelity
- efektivní velikost populace N_e
- tok genů (sex-specific)
- „past bottleneck“
- původ jedinců („assignment tests“)
- příbuzenské křížení (inbreeding), atd.
- „founder contribution“

Bayesiánské analýzy (např. program STRUCTURE, GENELAND aj.)

- identifikace subpopulací („management units“)
- identifikace hybridů
- identifikace geografických bariér toku genů

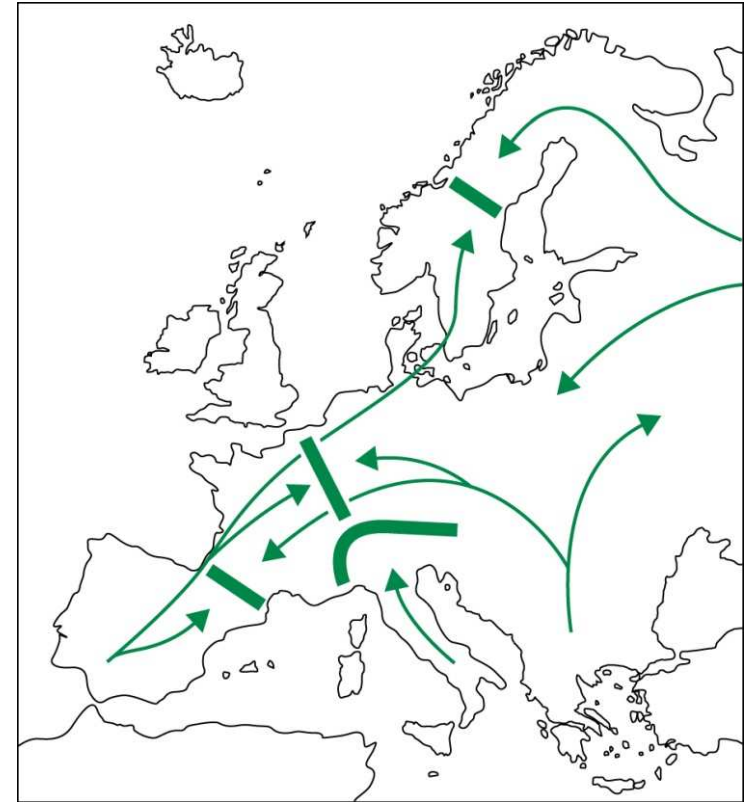


Stanovení ESU („evolutionary significant units“) a MU („management units“)

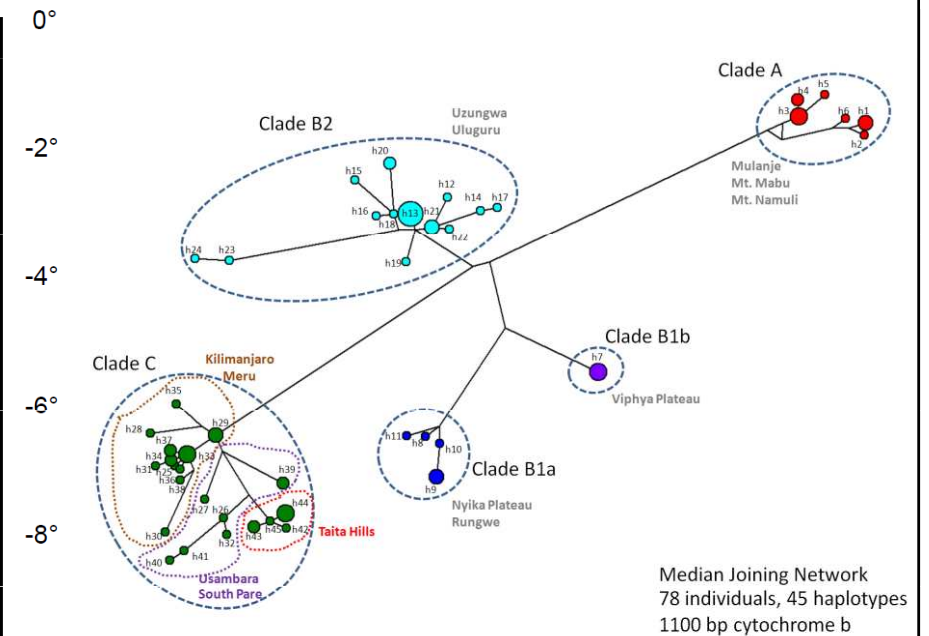
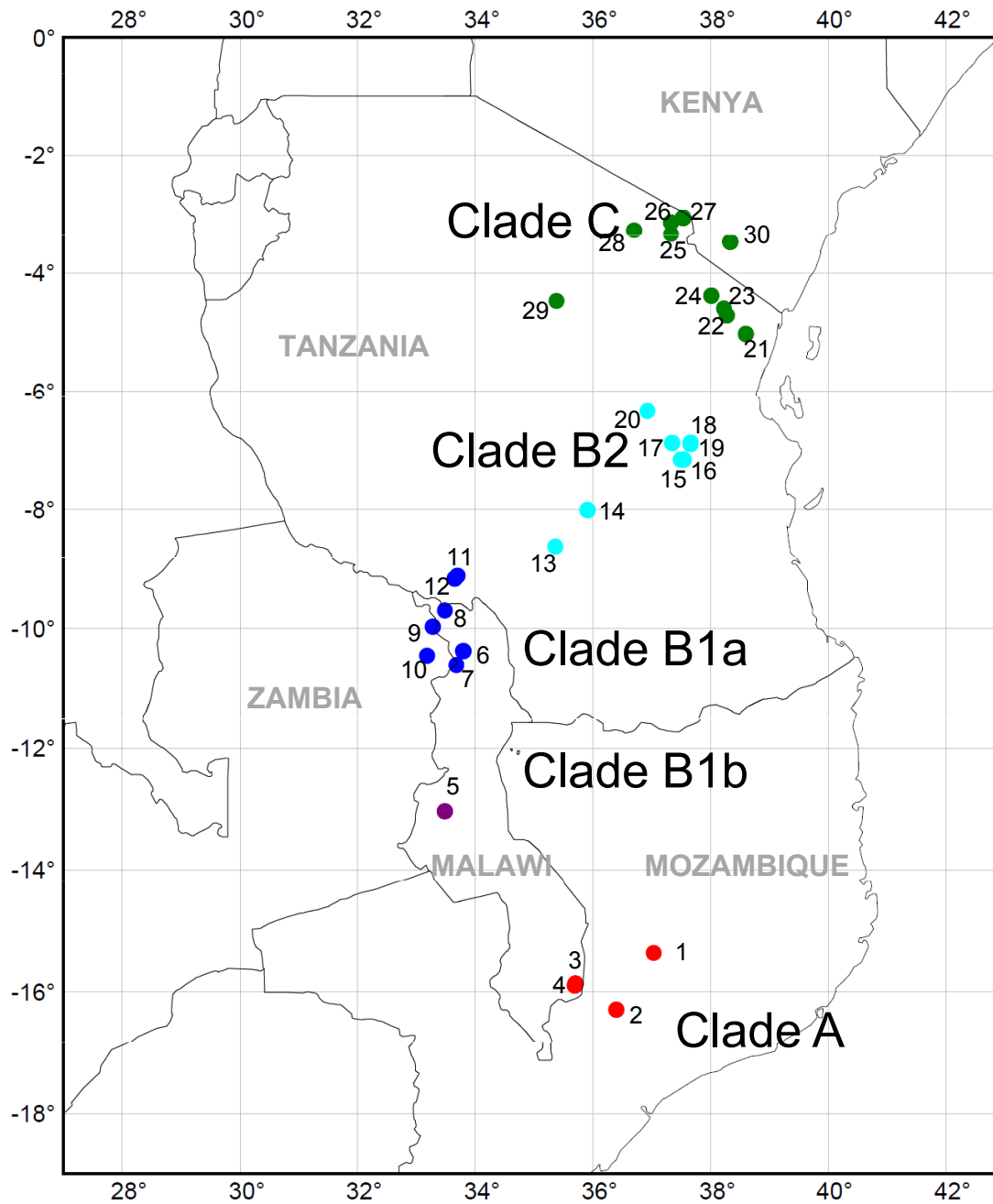


2) Fylogeografie

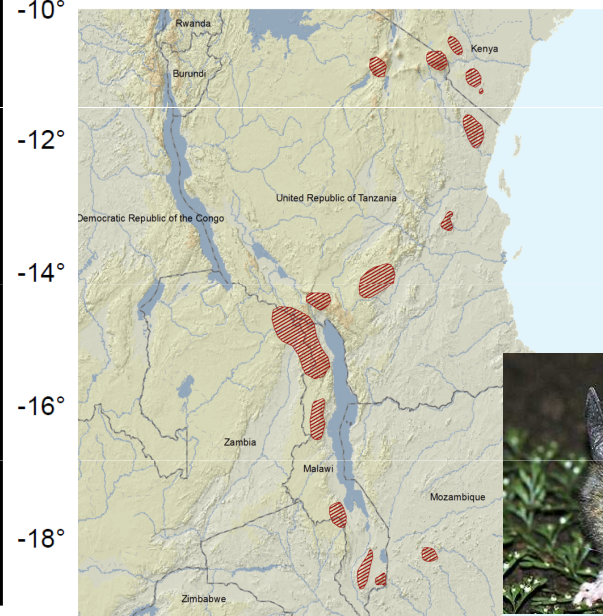
- použití fylogenetických metod na úrovni populací (nejčastěji sekvence mtDNA, jaderné markery jsou málo polymorfní)
- původ populací, jejich stáří a historické vazby
- detekce ESU („evolutionary significant units“) – lokální adaptace (mohou, ale nemusí)
- důležité pro reintrodukce



Př. Směry šíření z glaciálních refugií



Median Joining Network
78 individuals, 45 haplotypes
1100 bp cytochrome b



Praomys delectorum
- zřetelná severojižní struktura



3) Speciální přístupy

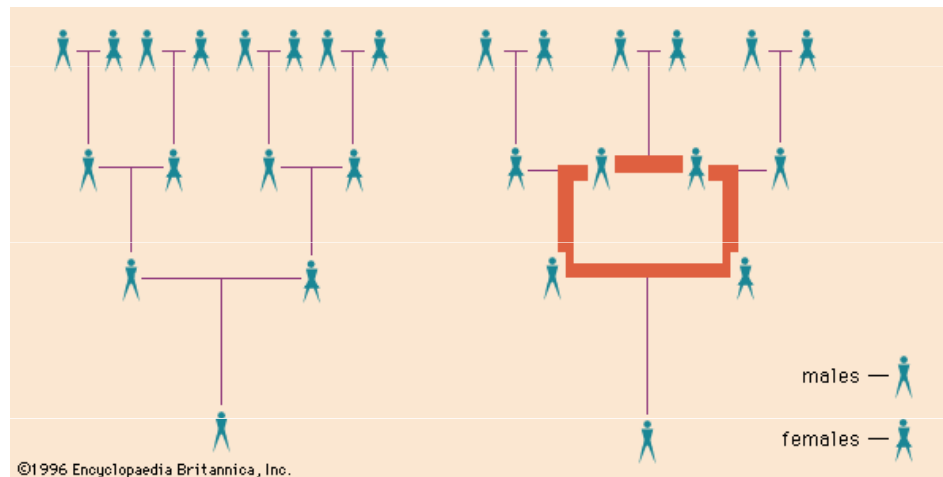
- škodlivá (detrimental) variabilita – detekce **inbrední deprese**
 - identifikace adaptivní variability – **lokální adaptace**
 - **experimentální ochránářská genetika** (zejména hmyz a rostliny)
 - **neinvazivní genetické metody**
-

Inbreeding a fitness

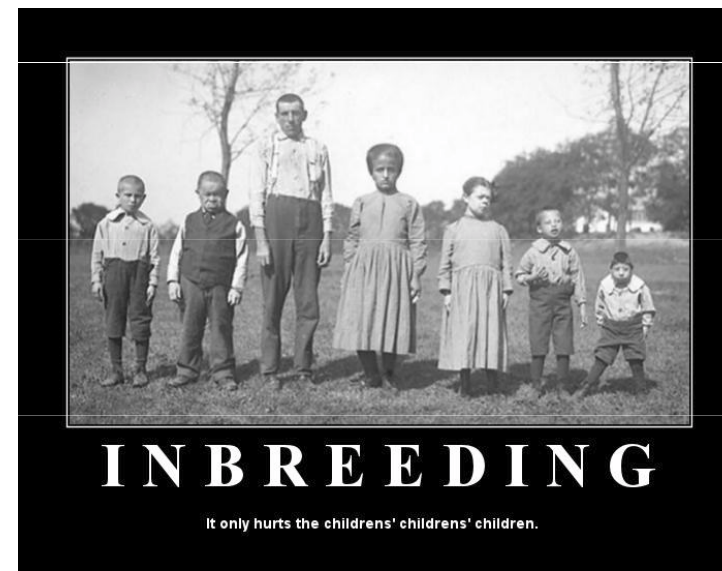
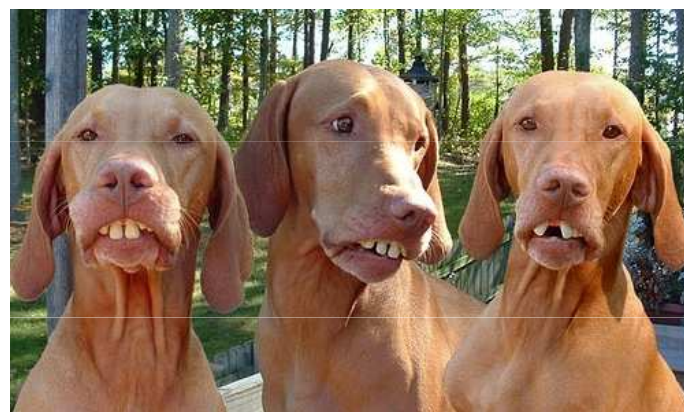
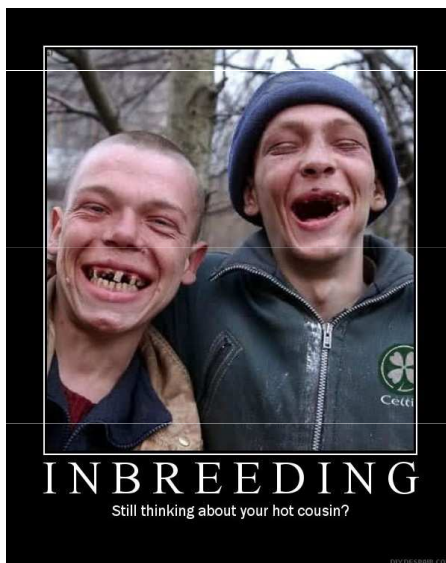
Stanovení výskytu příbuzenského
křížení a jeho vliv na individuální fitness

Príbuzenské křížení - inbreeding

„outbreeding“



„inbreeding“



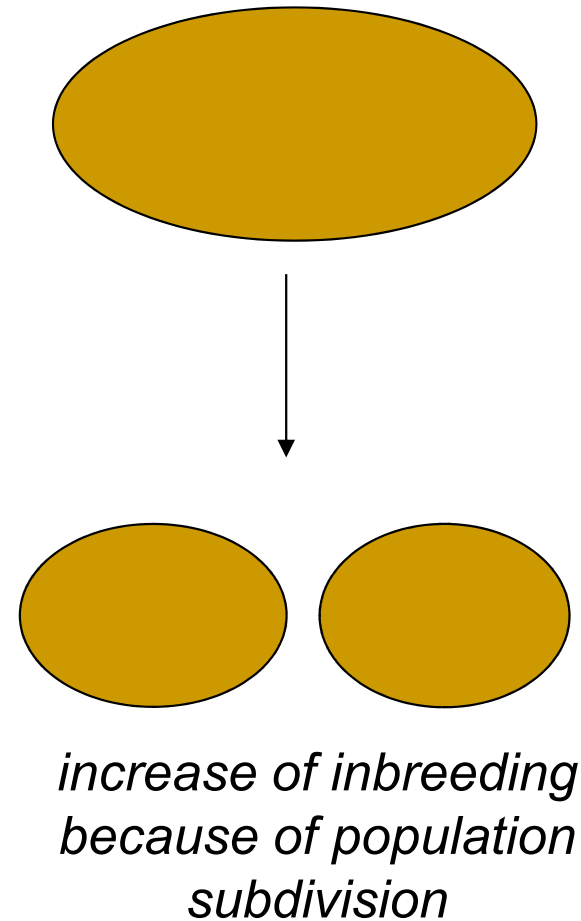
What does „inbreeding“ mean?

F – coefficients of inbreeding

- Inbreeding because of population subdivision (F_{ST})
 - Inbreeding as nonrandom mating (F_{IS})
 - Pedigree inbreeding (F)
-

What does „inbreeding“ mean?

- **Inbreeding because of population subdivision**
- náhodné páření uvnitř subpopulací
- odpovídá Wright's F_{st} – měří inbreeding vzhledem k předpokládanému stavu, kdy by populace nebyla rozdělena

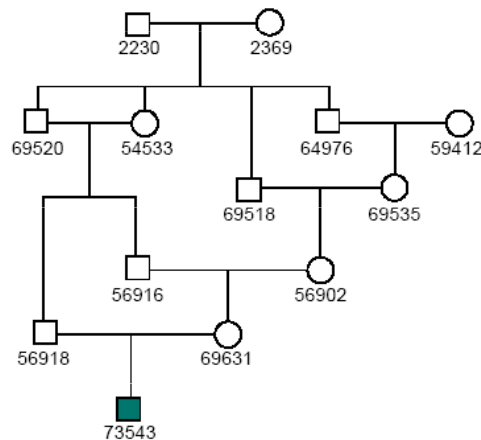


What does „inbreeding“ mean?

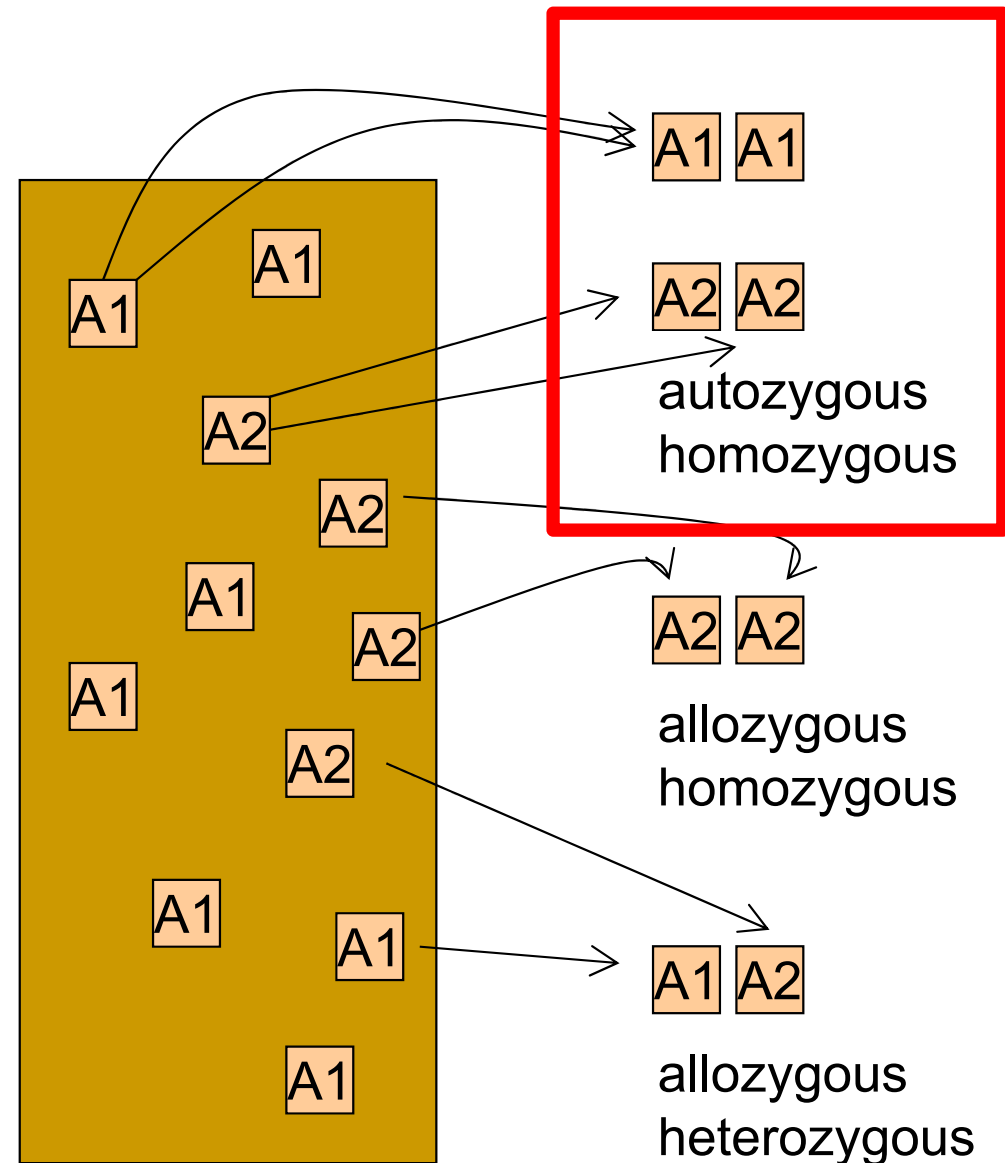
- **Inbreeding as nonrandom mating**
 - jedinec je považován za inbredního pokud jeho rodiče byli více příbuzní než dva náhodně vybraní jedinci
 - $F_{is} = 1 - H_o/H_e$ (odchylky z HWE)
 - malé populace – i náhodné párování je mezi příbuznými
 - i jedna generace náhodného páření vrátí F_{is} na nulu
-

What does „inbreeding“ mean?

- **Pedigree inbreeding**
- F = pravděpodobnost že dva homologní geny jednoho jedince jsou „identical by descent“
- pokles heterozygotnosti v důsledku "identity by descent"

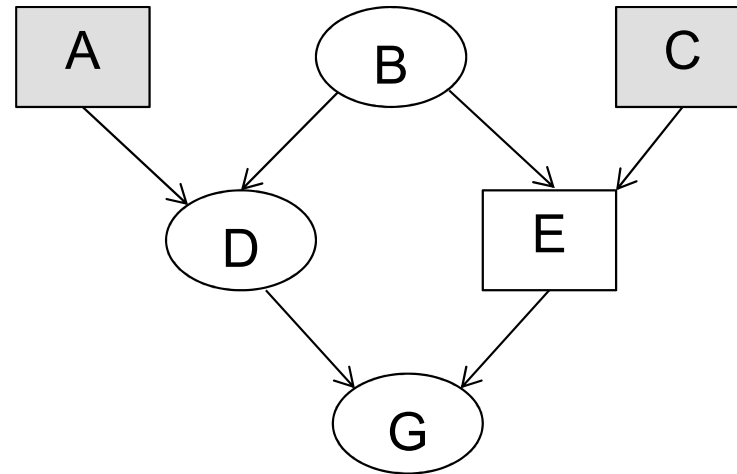


TRENDS in Ecology & Evolution



shodné alely v původní populaci jsou "identical by state", ale ne "identical by descent"

Výpočet koeficientu inbreedingu z rodokmenu



$$F = (1/2)^N(1 + F_{CA})$$

$$F_G = (1/2)^3(1 + 0) = 0.125$$

N = počet jedinců ve smyčce

F_{CA} = inbrední koeficient společného předka

- 1) Jedinec G je identický svým původem (identical-by-descent) na 12.5 % genomu
 - 2) Očekávaná heterozygotnost jedince G je snížena v důsledku inbreedingu o 12.5 %
-

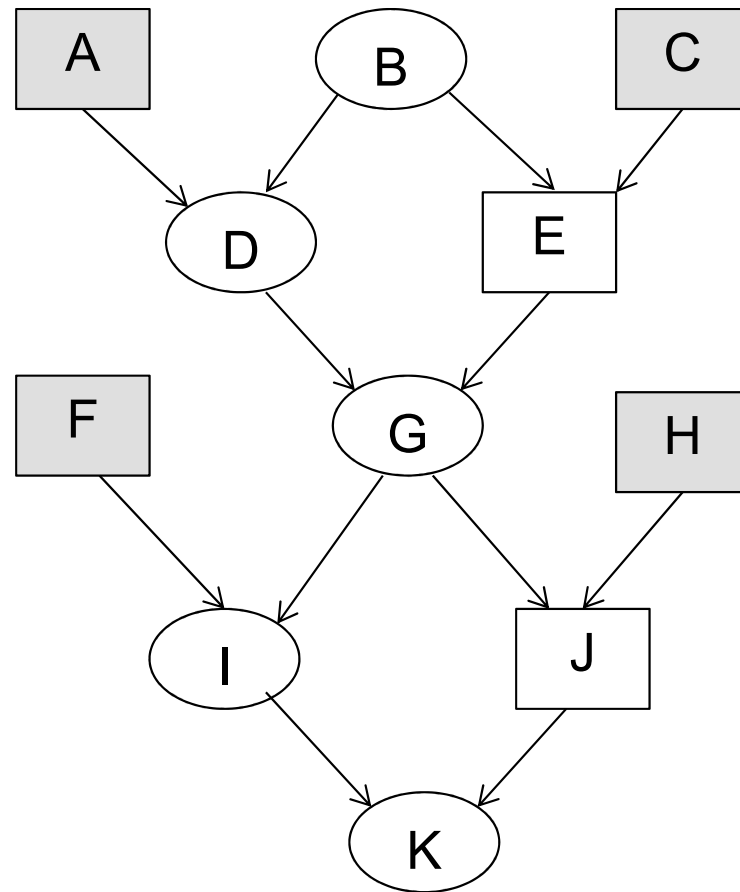
Výpočet koeficientu inbreedingu z rodokmenu

$$F = (1/2)^N(1 + F_{CA})$$

$$F_K = (1/2)^3(1 + F_G)$$

$$F_G = (1/2)^3(1 + 0) = 0.125$$

$$F_K = (1/2)^3(1 + 0.125) = 0.141$$



Příbuzenské křížení - inbreeding

A: zdravá forma genu

a: forma genu způsobující nemoc

Možné genotypy: AA Aa aa

- Nárůst proporce homozygotů (odchylky od HWE) - efekt škodlivých recesivních alel

Outbreeding (= HWE): AA Aa Aa aa



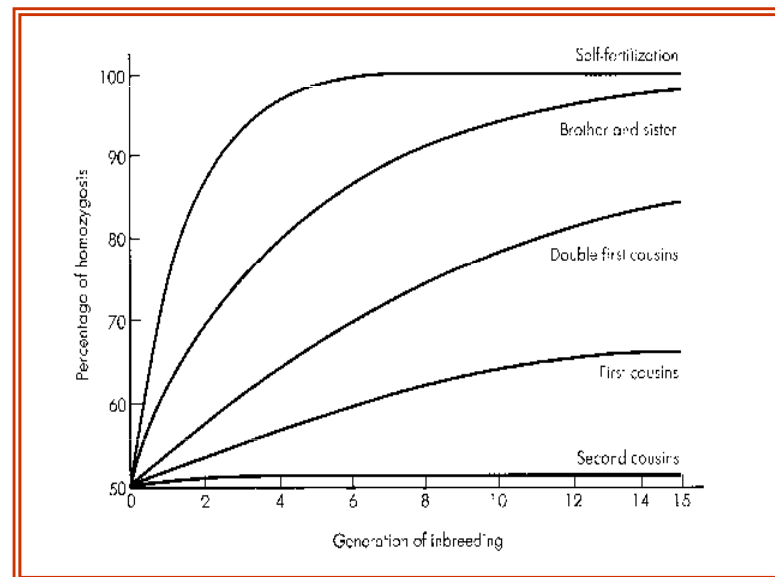
Inbreeding: AA AA aa aa

- Nárůst proporce homozygotů je výrazný v malých populacích

např. self-fertilization

Potomstvo Aa = 1 AA + 2 Aa + 1 aa

50% ztráta heterozygotnosti během jedné generace



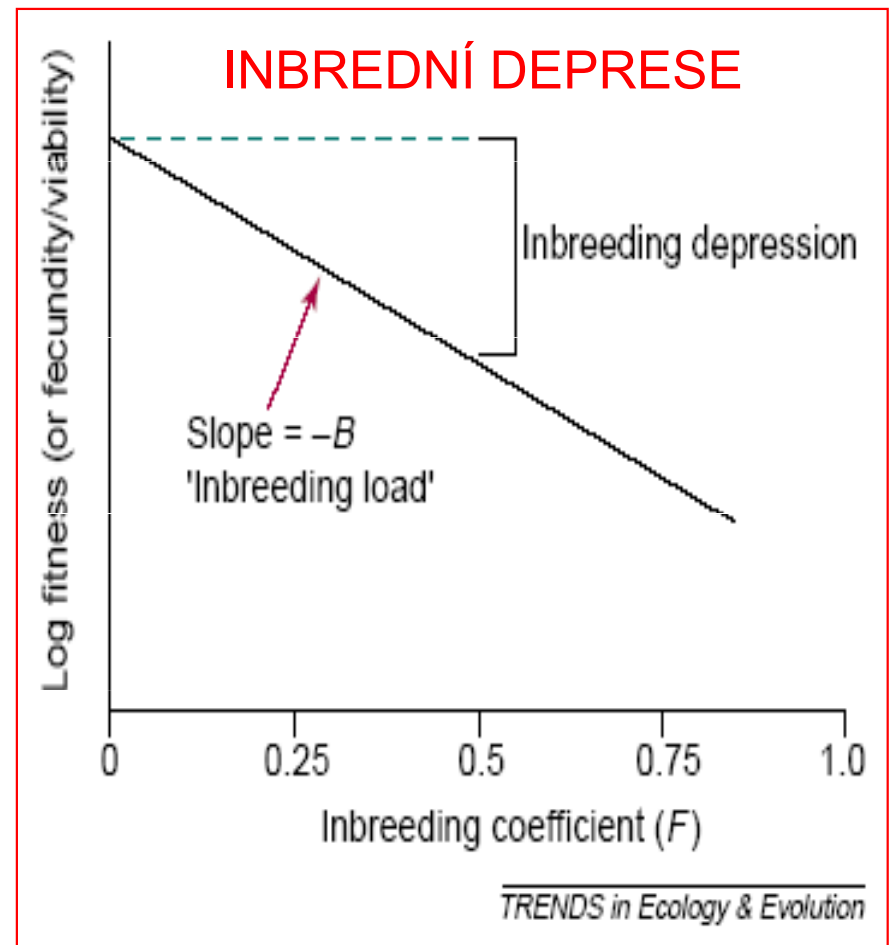
- samooplození

- bratr a sestra

- bratranec a sestřenice

Inbrední deprese

- Inbrední jedinci by měli mít nižší fitness (reprodukční úspěch nebo schopnost přežít)
- Efekt škodlivých recesivních alel (nárůst homozygotnosti) nebo pokles adaptivní variability (pokles heterozygotnosti, např. MHC)
- Známo většinou jen z laboratorního křížení (extrémní příklady)
- Studium v přírodě je obtížné



Florida panther – fixace škodlivých alel

- cryptochordismus, poruchy vývoje ocasních obratlů, srsti a spermií – téměř fixovány genetickým driftem
- pozitivní i negativní dopady introdukce teoreticky testovány (Hedrick 1995)
- introdukce osmi pum z Texasu („*genetic rescue*“) – v následující generaci bylo 20 % genetické informace z Texasu
- ocas – 7 % vs. 88 %
- srst – 24 % vs. 93 %
- cryptochordism – 0 % vs. 68 %
- Hybrid superiority (heterosis) – rychlé šíření introdukovaných alel

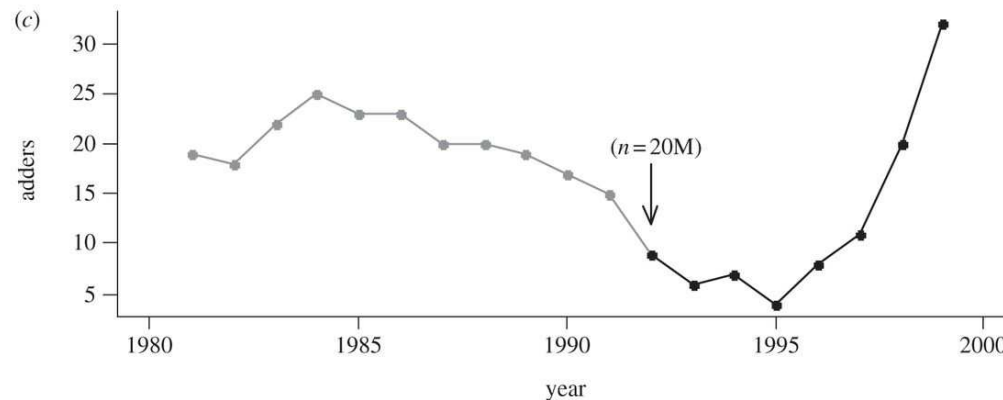
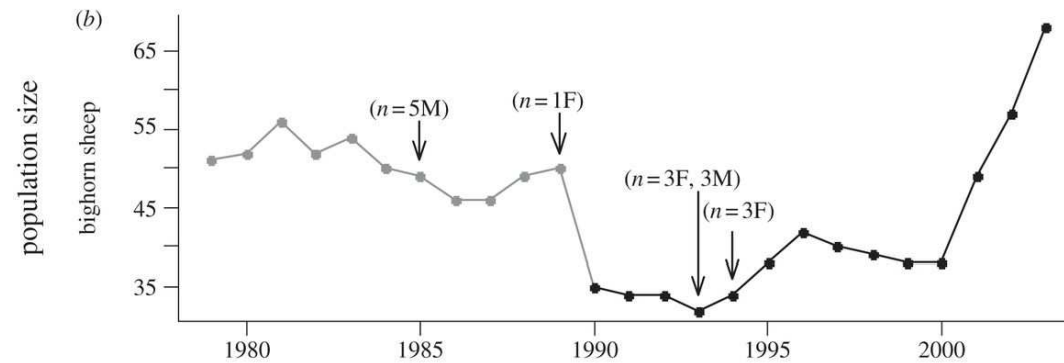
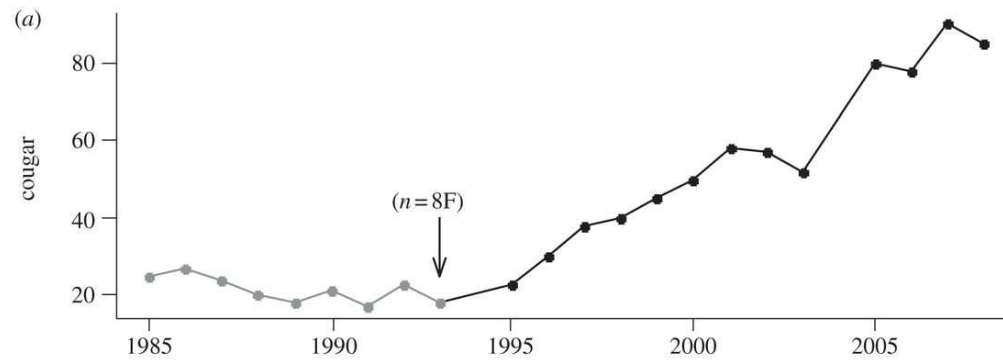


Puma concolor coryi



Puma concolor cougar

Genetická záchrana



„Purging“

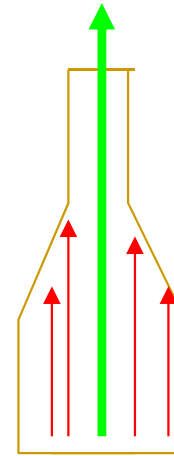
- Druhy s výrazným snížením genetické variability - prošly „hrdlem lahve“
- gepardi - snížení genetické variability o více než 90 %
- přesto se počty výrazně zvedly
- „**purging**“ – odstranění škodlivých alel v důsledku zvýšené selekce na homozygoty

1. Inbreeding: AA AA aa aa

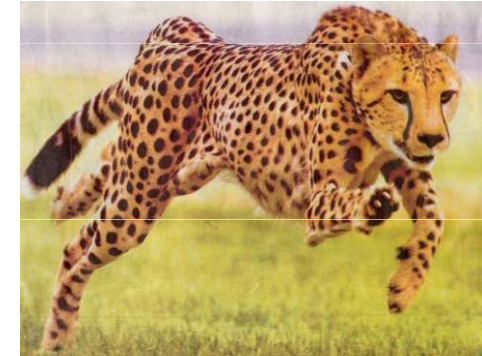
2. Selekcce: AA AA ~~aa~~ ~~aa~~

3. „Purging“: AA AA

Extrémně výjimečné případy



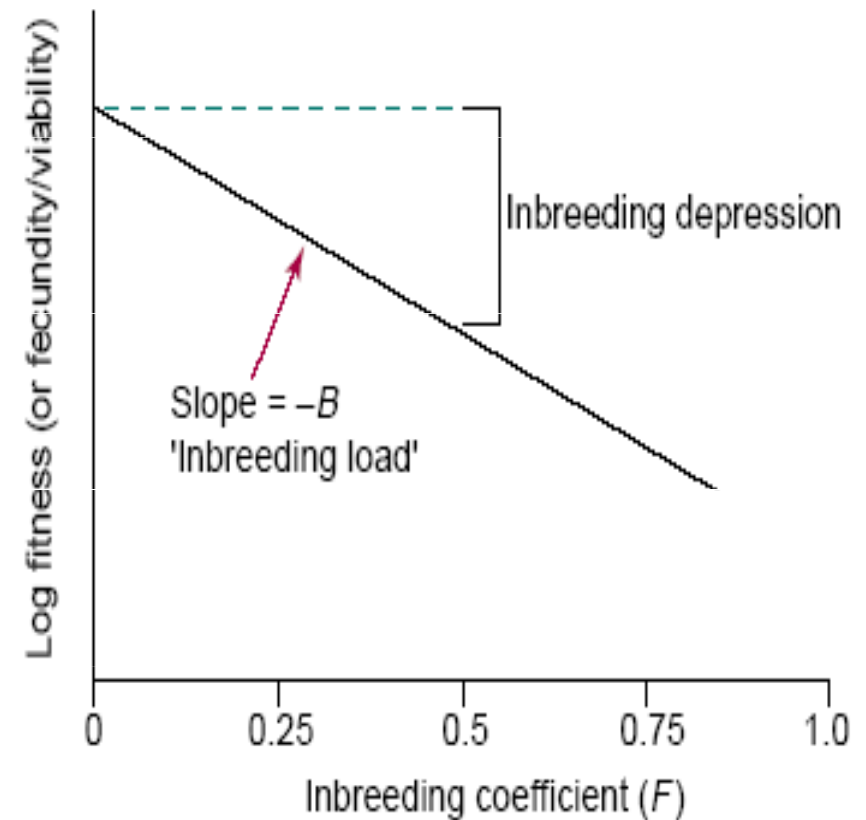
Acinonyx jubatus



Mirounga angustirostris

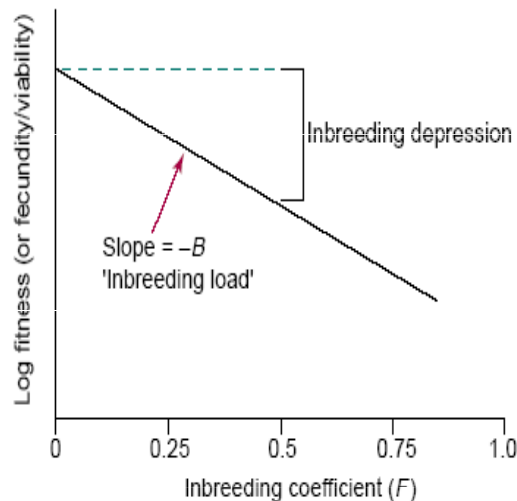
Genotyp a fitness jedince

- Pomocí analýzy paternity známe reprodukční úspěch jedinců (= fitness)
- Lze tento úspěch vztáhnout k míře inbreedingu?
- Jsou více inbrední jedinci málo úspěšní?
- Jak určit stupeň inbreedingu? Nejlépe pomocí mikrosatelitů



Stanovení inbrední deprese

- proportionální redukce fitness inbredního a outbredního potomstva



TRENDS in Ecology & Evolution

$$\delta = 1 - \frac{\omega_s}{\omega_o}$$

fitness in "selfed" progeny

fitness in "outcrossed" progeny

Př.: Srovnání inbredních ($F = 0.25$) a outbredních domácích myší

- inbrední mají 11% redukci velikosti vrhu, ale přežívání do dospělosti je v laboratoři je srovnatelné
- ve venkovních oplocenkách je nicméně sníženo přežívání inbredních myší o 81% u samců a 22% u samic

$$\delta = 1 - \left[(0.89) \left(\frac{0.19 + 0.78}{2} \right) \right] = 0.57$$

redukce velikosti vrhu

redukce venkovního přežívání

Inbreeding o intenzitě $F=0.25$ způsobuje 57% snížení fitness

Jak měřit nakolik je jedinec postižen inbreedingem? Tedy jak příbuzní byli rodiče.

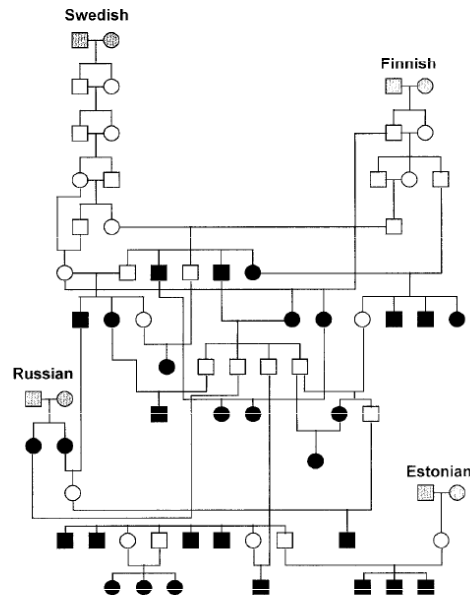
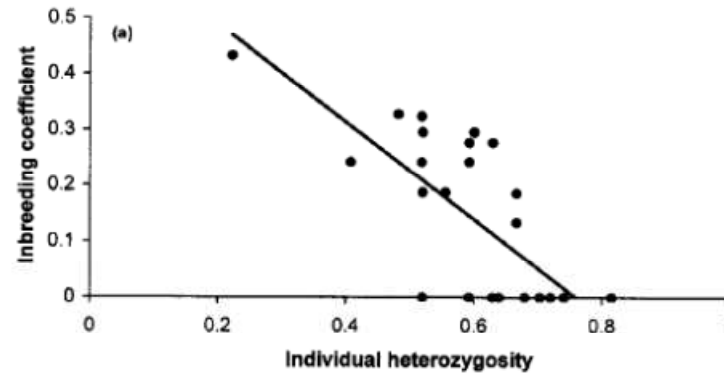
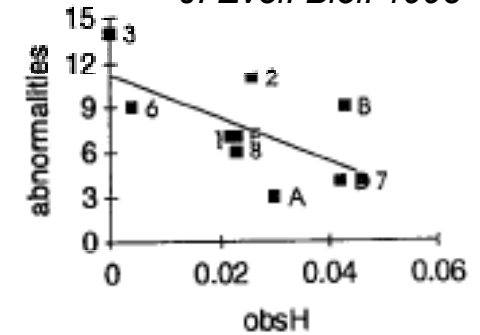


FIG. 1. Pedigree of the wolf population where the animals with closed dark symbols are those included in this study and those with closed gray symbols are the four pairs of founders.



*Hedrick et al.
Evolution 2001*

*Hitchings and Beebee
J. Evol. Biol. 1998*



© lubomir hlasek
www.hlasek.com
Bufo bufo da1281

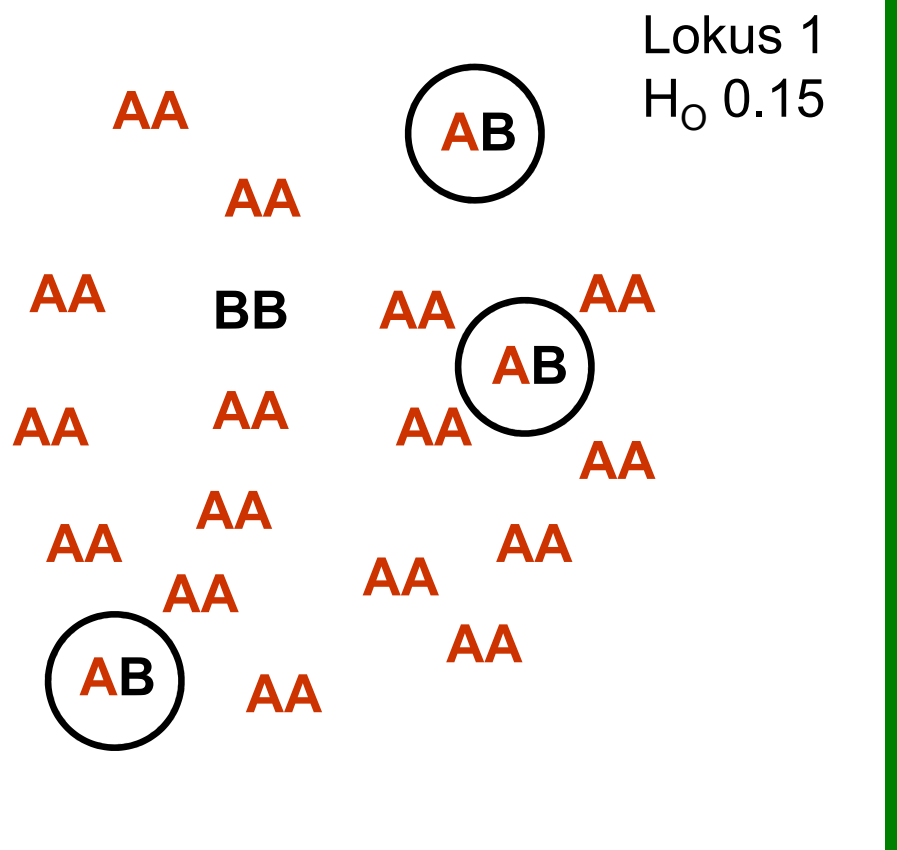
- **Rodokmeny** – z rodokmenů se usoudí, zda se kříží příbuzní
- **Heterozygotnost („heterozygosity-fitness correlations“)**
(průměrná heterozygotnost přes více lokusů)

Jak měřit nakolik je jedinec postižen inbreedingem?
Tedy jak příbuzní byli rodiče.

- **SH - standardizovaná heterozygotnost**
vážení přes průměrnou heterozygotnost na lokusu



Korekce přes frekvenci heterozygotů na lokusu



→ standardizovaná (vážená) heterozygotnost

Jak měřit nakolik je jedinec postižen inbreedingem?

Tedy jak příbuzní byli rodiče.



- **d^2 rozdíl velikosti alel**

Ize opět vážit (standardizovat) přes průměrné rozdíly



Velikost alel a evoluce mikrosatelitů

- **identita alel** (stejně x různé) vs. **rozdíl délek** alel (počtu opakování)
- Indikují podobně dlouhé alely na jednom lokusu bližšího společného předka než alely rozdílných délek?

Rodiče nepříbuzní



Rodiče příbuzní



Teoretické mutační modely

Dva extrémy

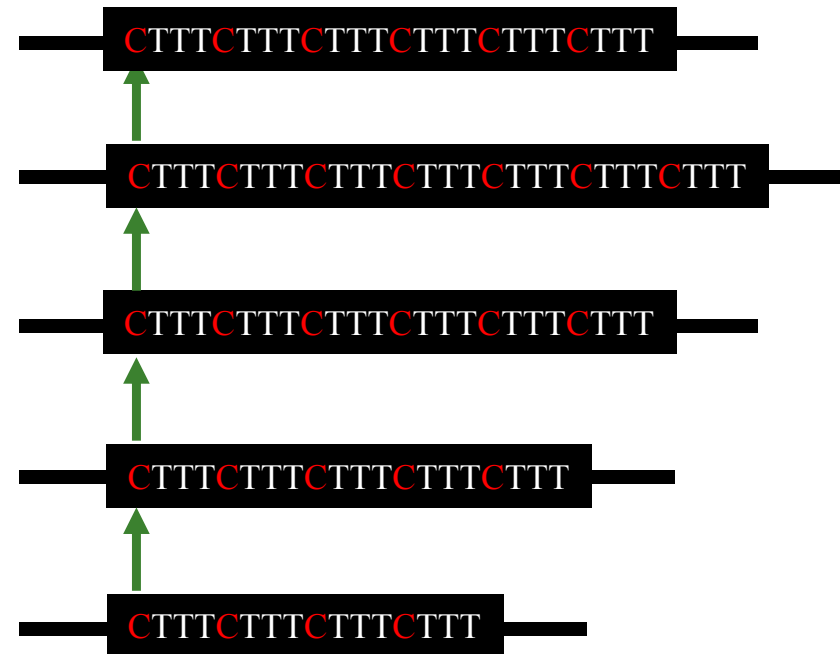
- **IAM – infinite allele model**

(Při mutaci ztráta nebo získání libovolného počtu opakování. Vždy vzniká nová alela, která doposud v populaci nebyla)



- **SMM – stepwise mutation model**

(Mutace způsobeny pouze ztrátou nebo získáním jediného opakování motivu. Mutací může vzniknout alela, která je již v populaci přítomna)



d^2 - Jak to měřit?

$$\text{mean } d^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (i_a - i_b)^2$$

i_a a i_b jsou délky alel na lokusu i (v počtu repeatů)
 n lokusů

Větší rozdíl v délce alel svědčí o menší příbuznosti předků jedince.

Standardizace vydělením nejvyšší hodnotou (→ hodnoty 0 až 1)

Mean d^2

- Lze použít jen pokud platí **stepwise mutation model**

(alely se liší jen počtem opakování motivu, např. u tetranukleotidového mikrosatelitu vždy přesně jen o násobky 4)

- Nelze tedy u složených mikrosatelitů!

Např. $(CA)_n(CAA)_n$

- Nelze při výskytu „indels“ ve „flanking regions“

(delece a inserce v oblastech ohraničujících mikrosatelitový lokus)

Jak měřit nakolik je jedinec postižen inbreedingem?

Tedy jak příbuzní byli rodiče.



■ **IR internal relatedness**

(„příbuznost“ dle alel na daném lokusu = shoda alel vážená přes frekvenci alely)

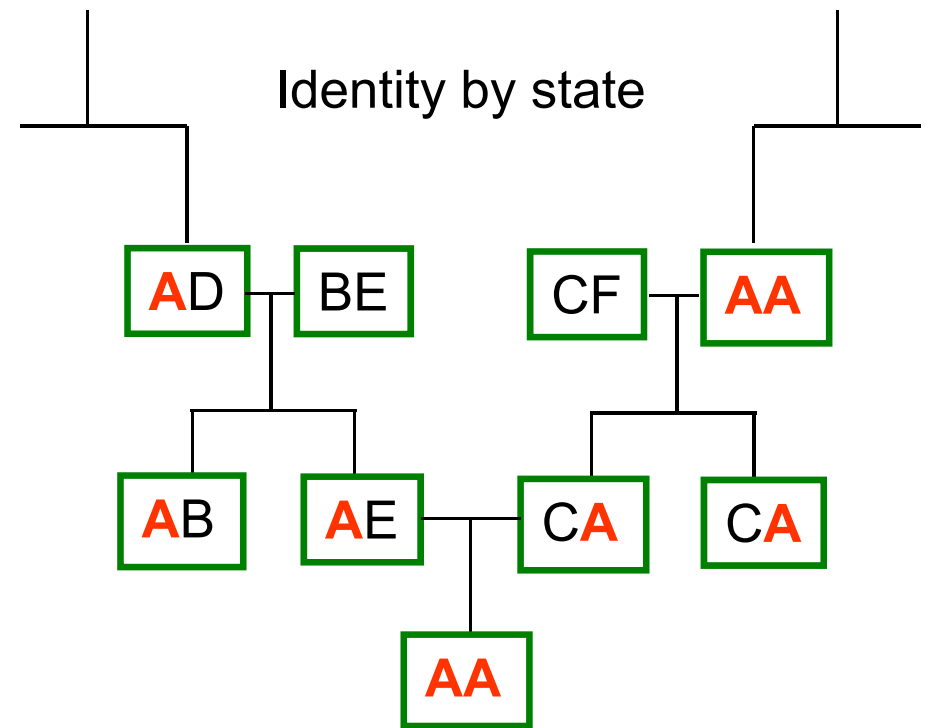
Stejné alely na lokusu

2 příčiny:

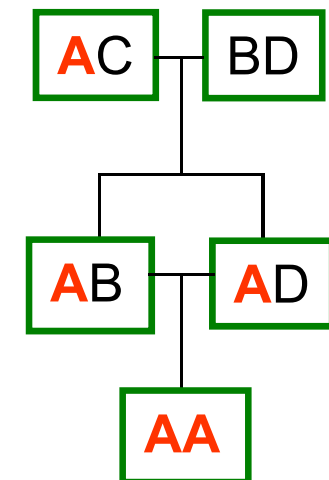
Identity by state IBS (stejný stav)

Identity by descent IBD (stejný původ)

- Pozorují vždy identity by state
- Zjišťují pravděpodobnost pro IBD
- Jde o recentní IBD!
Všechny alely mají společný původ, byť třeba hodně dávny.
- Vzácnější alely od obou rodičů → IBD

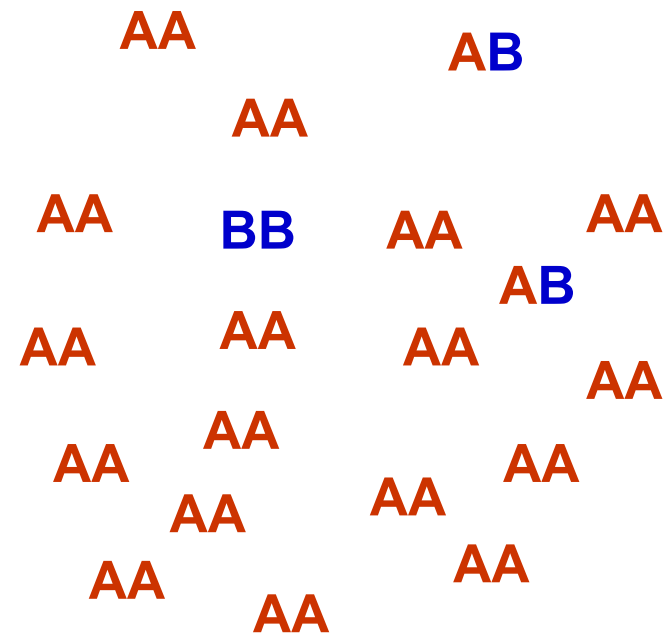


Identity by descent



Stejná alela na lokusu - korekce přes frekvenci alel na lokusu

Frekvence **B** 0,1
Frekvence **A** 0,9



Sdílení alely **A** může být jen náhoda

Sdílení alely **B** → větší pravděpodobnost, že si rodiče byli příbuzní

IR internal relatedness

- Sdílení alely na lokusu
- Vážno přes frekvenci alely
- Vzácnější alely mají větší váhu

$$\frac{(2H - \sum f_i)}{(2N - \sum f_i)}$$

- H počet homozygotních lokusů
 N počet lokusů
 f_i frekvence i -té alely
- Program RELATEDNESS – Mac
- Makro v Excelu (Amos et al. 2001)

Další měřítka individuální heterozygotnosti

- Homozygosity by loci index (HL) (Aparicio et al. 2006) – vhodný při vyšších hodnotách heterozygotnosti (např. mikrosatelity)

$$HL = \frac{\sum E_h}{\sum E_h + \sum E_j}$$

where E_h and E_j are the expected heterozygosities of the loci that an individual bears in homozygosis (h) and in heterozygosis (j), respectively. This index varies between 0 when all loci are heterozygous and 1 when all loci are homozygous. Intermediate values depend on the expected heterozygosity of the loci involved in homozygosis or heterozygosis. A locus will have more weight in HL when their alleles are more evenly frequent, and there are more alleles in the locus.

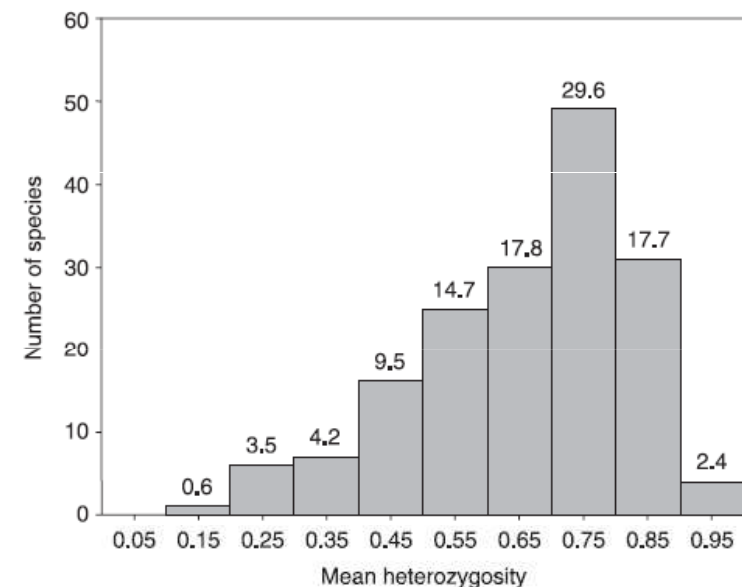
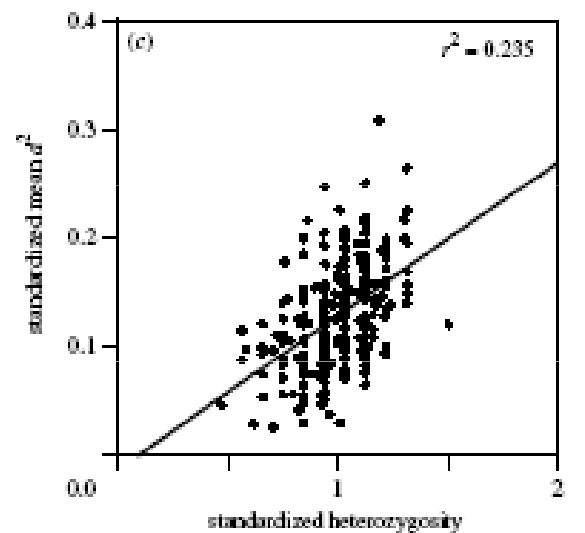
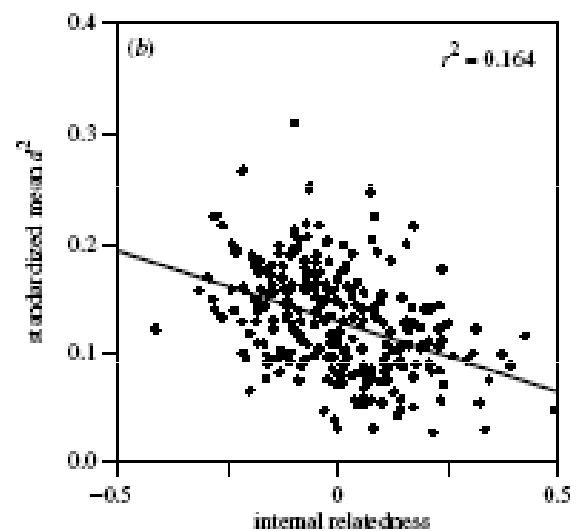
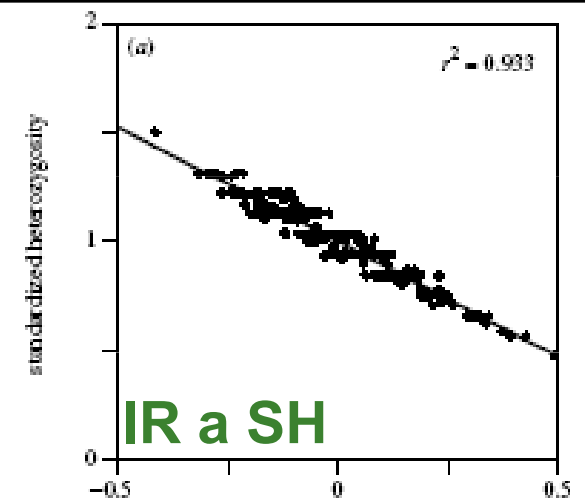


Fig. 3 Distribution of expected heterozygosity for microsatellite markers published for insects and vertebrates in *Molecular Ecology Notes* (2005).

SH, IR a d^2 navzájem korelovány

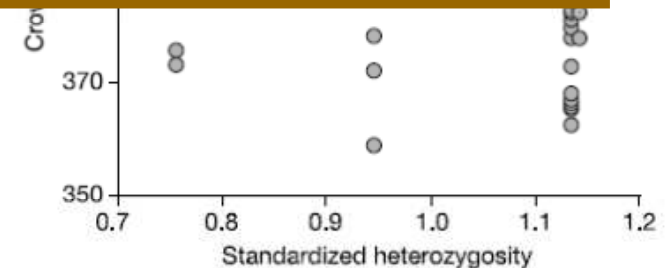
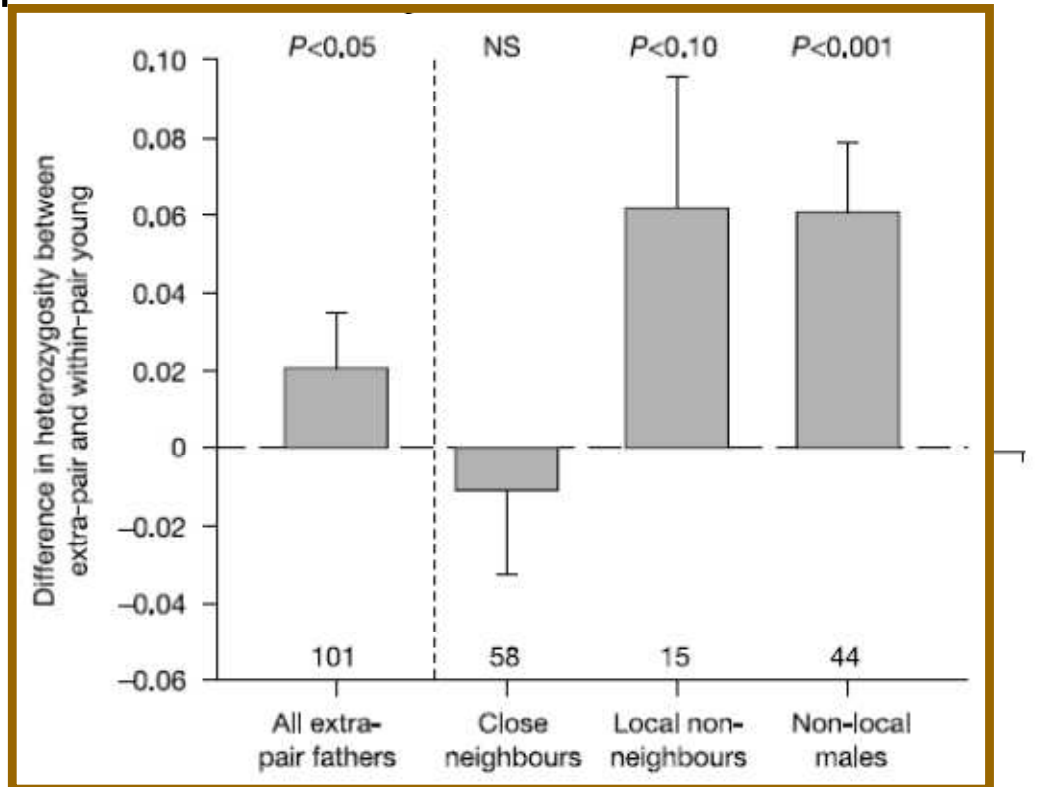
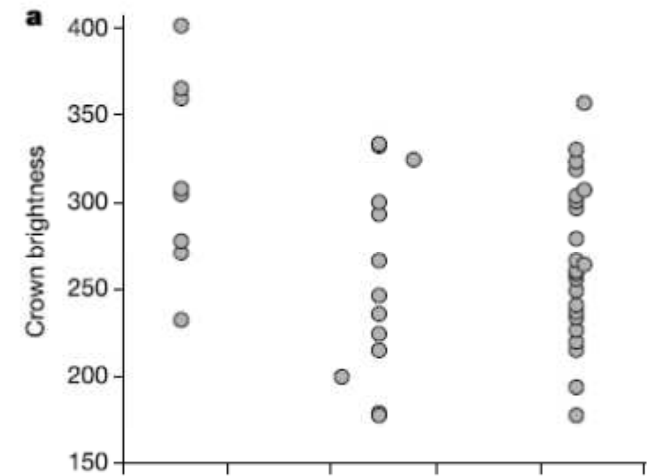
Amos et al. 2001

- Dataset:
Tuleňi, kulohlavci,
3 druhy albatrosů





- 2452 mláďat, 5-7 mikrosatelitových lokusů, SH, IR, d^2
- SH a IR korelovány, d^2 slabé korelace a nic nevysvětluje
- SH koreluje se zbarvením samců
- Mimopároví otcí
 - Sousedí – větší a starší než podvedení samci
 - Cizinci – zvýšení heterozygotnosti



Acrocephalus arundinaceus

Hansson et al. 2001



- Silná filopatrie
- Jižní Švédsko, populace založena v roce 1978
- 5 mikrosatelitových lokusů
- d^2 , srovnání návratnosti sourozenců (největší úmrtnost v prvním roce)
- **Vrací se jedinci s vyšším d^2**

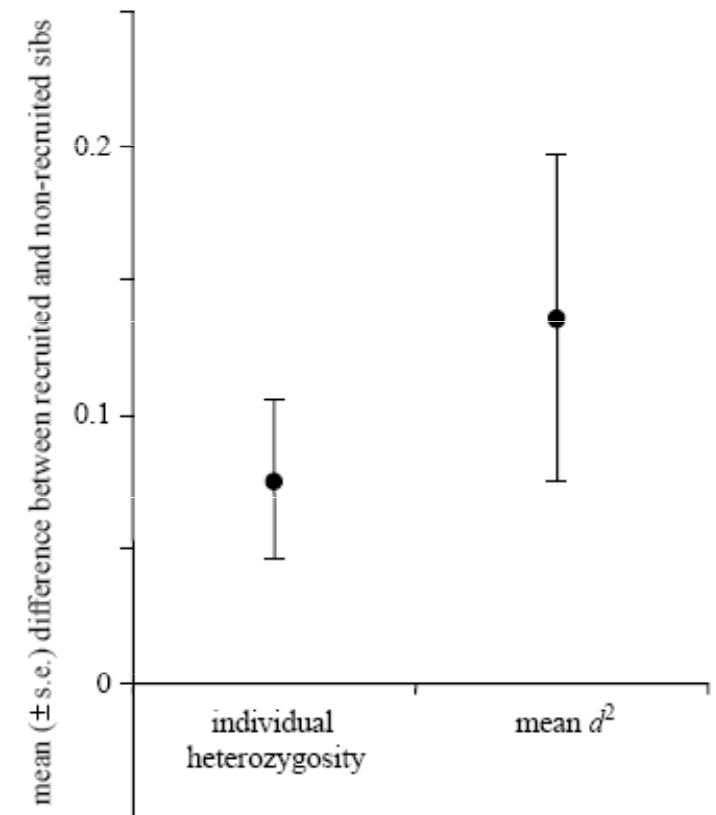


Figure 2. Mean difference (\pm s.e.) in individual heterozygosity (left) and the mean d^2 (right) between recruited and non-recruited great reed warbler siblings. Recruited individuals scored both higher individual heterozygosity and a higher mean d^2 than their non-recruited siblings. The mean d^2 is based on \log_{10} -transformed d^2 (see § 2).

Rana temporaria ve Skandinávii

Lesbarreres et al. 2005

- 8 mikrosatelitových lokusů
- Přežívání mláďat pozitivně korelováno s heterozygotností
- Stejný vztah ve 4 populacích
- Heterozygosity-fitness correlations („HFC“)



Emberiza schoeniclus

Kleven & Lifjeld 2005

- 9 mikrosatelitových lokusů
- SH a d^2
- Samci úspěšní v mimopárových kopulacích x podvedení samci
- Mláďata z mimopárových kopulací x párová mláďata
- **Žádný rozdíl v heterozygotnosti a d^2**



SH a inbreeding

Slate et al. 2004, Pemberton 2004

- Jak dobře heterozygotnost měří inbreeding?
- 101 mikrosatelitových lokusů u 590 ovcí
- Vztah existuje, ale je překvapivě slabý
- Pokud možno → použít raději rodokmeny

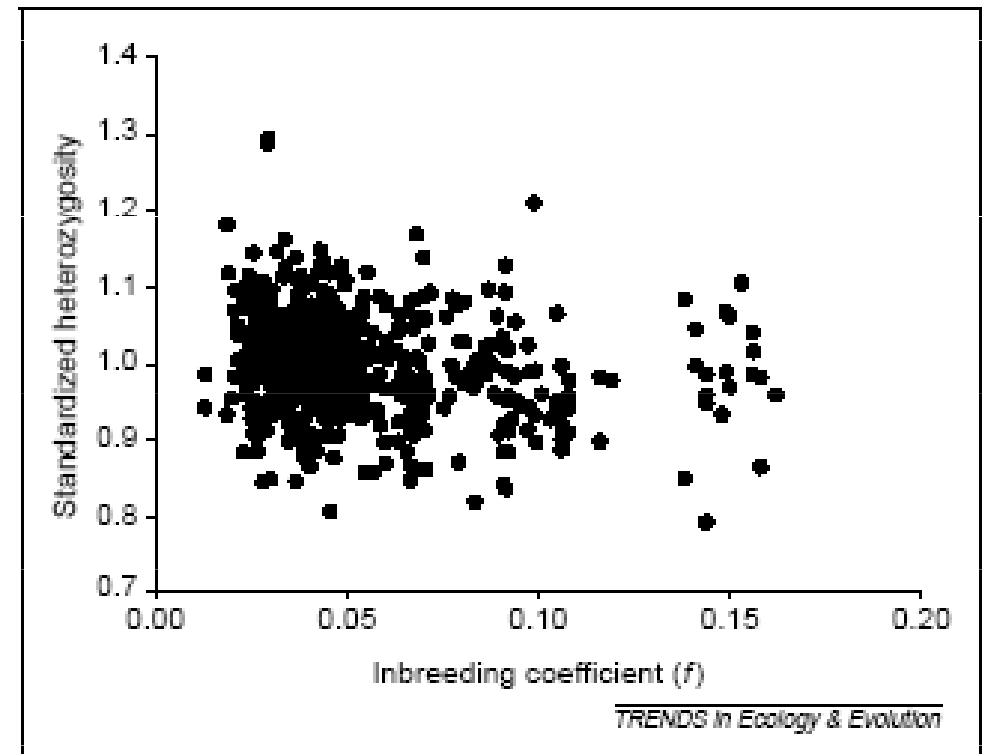


Figure 1. Observed relationship between individual inbreeding coefficient (f) (from a 7+generation pedigree) and standardized mean heterozygosity across an average of 101 microsatellite loci among 590 Coopworth sheep *Ovis aries* ($r^2 = 0.031$; $P < 0.0001$). Reproduced, with permission, from [6].

Simulace a lidé

Balloux et al. 2004

- Korelace silné až při ~200 lokusech
- Slabá korelace mezi heterozygotností na různých lokusech
(400 markerů v různých lidských populacích, 1000 jedinců z 52 populací)
- Pozitivní výsledky znamenají pravděpodobněji:
 - vazbu na konkrétní lokusy pod selekcí
 - Extrémní případy – např. silná polygamie, výrazná strukturovanost populace

Problémy

- **Publikační zkreslení (publication bias)**
Negativní výsledky se většinou nepublikují.
 - **Dostatečná data** (počet lokusů a jedinců)
 - **Odhad celkové heterozygotnosti**
 - Celková heterozygotnost („general effect“)
 - Vazba na konkrétní lokusy („local effect“)
 - Při použití alozymů i přímý efekt studovaného lokusu
 - **Nejednoznačný vztah genetické variability a fitness**
-

Závěry

- Heterozygotnost jako odhad inbreedingu může fungovat hlavně v extrémních případech
 - Jinak hrozí, že i stovky lokusů neukážou skoro nic
 - Je třeba odlišit vliv celkové heterozygotnosti od vlivu jednotlivých genů
 - Nejvhodnější mírou se zdá být IR nebo HL
-

Adaptivní variabilita

- rozdílná prostředí → diverzifikující selekce
→ **lokální adaptace** (např. obrana proti lokálním patogenům, potravní vztahy, klimatické podmínky atd.),

Outbrední deprese

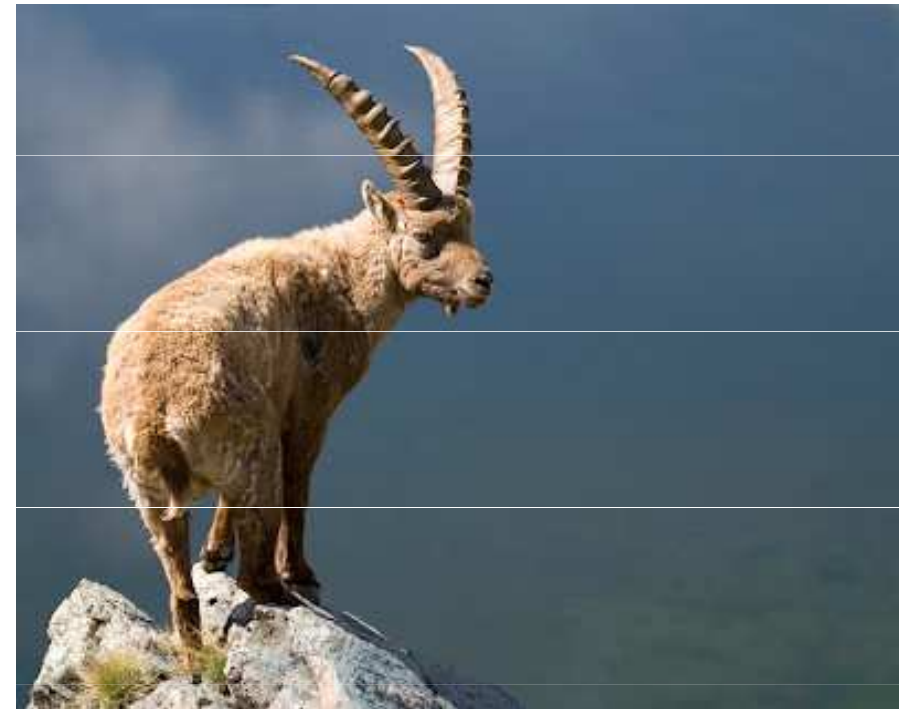
- Intrinsic* – genetická inkompatibilita (Dobzhansky-Muller incompatibility – epistatické interakce mezi alelami více lokusů)
- Extrinsic* – narušení lokálních adaptací

NEMÍCHAT HODNĚ VZDÁLENÉ POPULACE !!!

Příklad outbrední deprese

- kozorožec alpský (*Capra ibex ibex*)

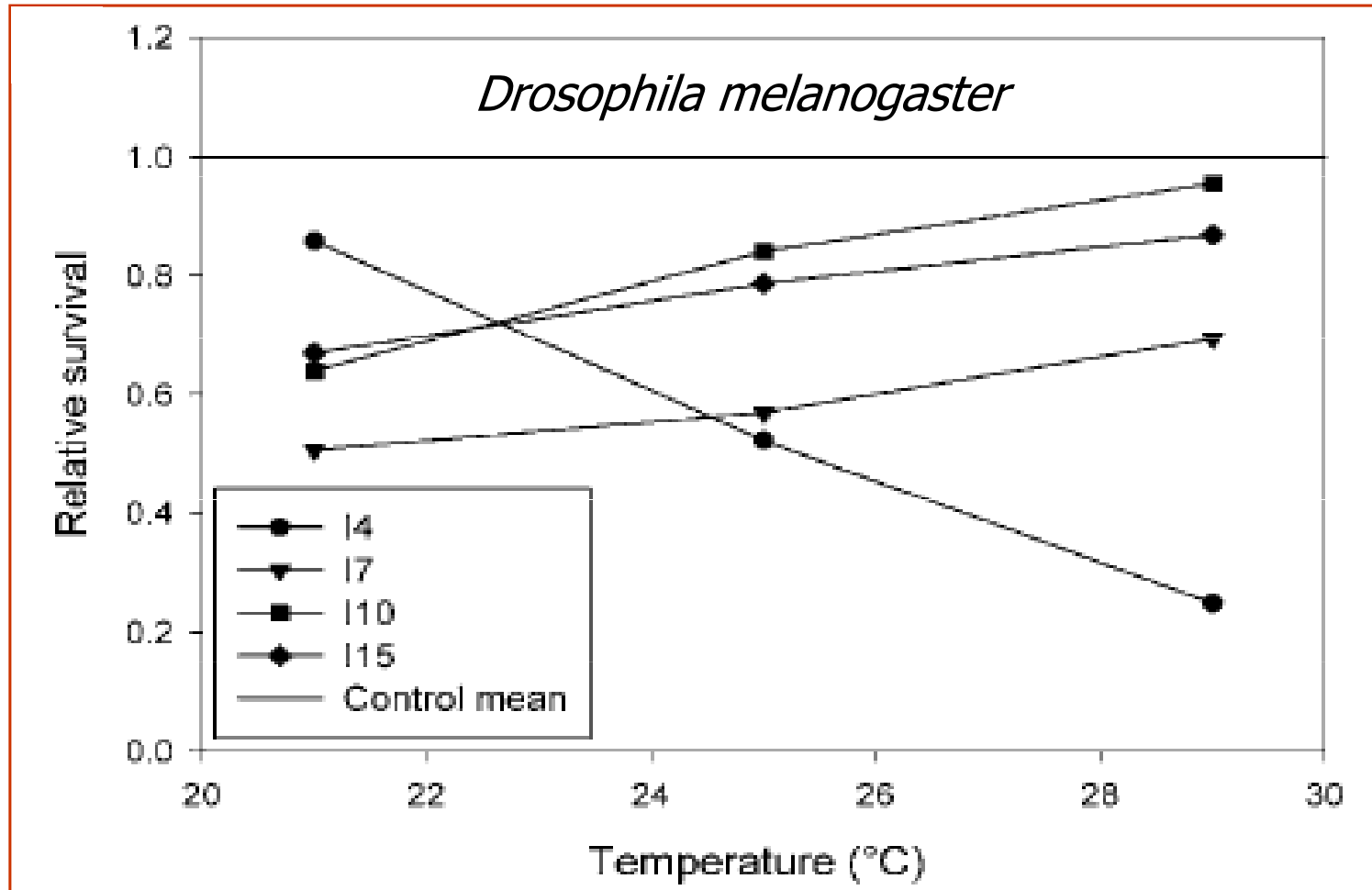
- 1922 – záchrana kozorožců v Gran Paradiso NP a pokus o vytvoření záložní populace v Tatrách
- v tomto programu použity i zvířata ze Sinaje (*Capra ibex nubiana*) a z Egypta (*Capra aegagrus*) – snadná produkce F1 hybridů
- hybridy měli říjí na podzim (ne v zimě), mláďata se rodila v únoru a celá populace brzy vymřela



Experimentální ochranářská genetik

- rekonstrukce historických procesů v laboratoři
 - testování hypotéz
 - ztráta genetické diverzity v malých populacích
 - síla selekce a genetického driftu v malých populacích
 - význam environmentálního stresu na expresi funkčních genů
 - efekt inbreedingu na přežívání
 - apod.
 - modelové organismy – převážně hmyz a rostliny
-

Př.: Vztah inbreedingu a teploty

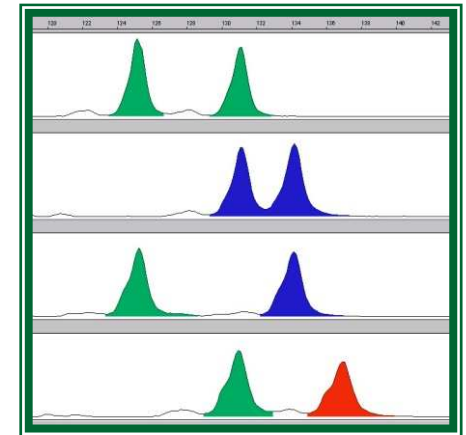


Vermeulen and Bijlsma, Heredity 2004

METODY ZÍSKÁVÁNÍ DAT

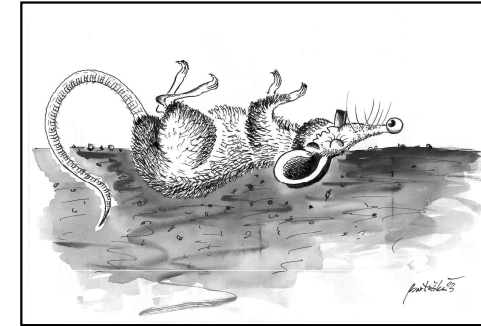
Non-invasive genetic methods in conservation genetics

- by definition „*conservation of rare and endangered animals*“ – not possible to kill or even disturb them
- need of methods allowing collection of genetic data without direct contact
- **non-invasive genetic methods**



Tři metody získávání vzorků pro DNA analýzy

1. Destruktivní – zvíře je zabito pro získání vzorku tkáně pro genetickou analýzu

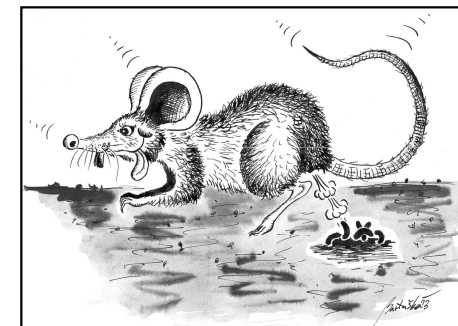


Orig. V. Bartuška

2. Nedestruktivní (invazivní) – zvíře je odchyceno, invazivně odebrán vzorek tkáně (prst) nebo krve



3. Neinvazivní – zdroj DNA je ponechán za zvířetem a může být sbírán bez nutnosti odchytit nebo ho jinak rušit



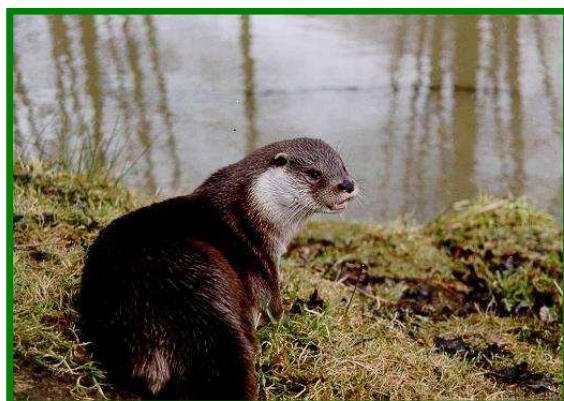
Použití neinvazivních metod

- **skrytě žijící zvířata** – jednoduše získatelné vzorky (trus, chlupy, ...)
 - **vzácné, ohrožené a chráněné druhy** – trus, moč – žádné restrikce např. CITES
 - **minimální vliv na chování** zvířat – použitelné při studiu chování (prostorová aktivita atd.)
-

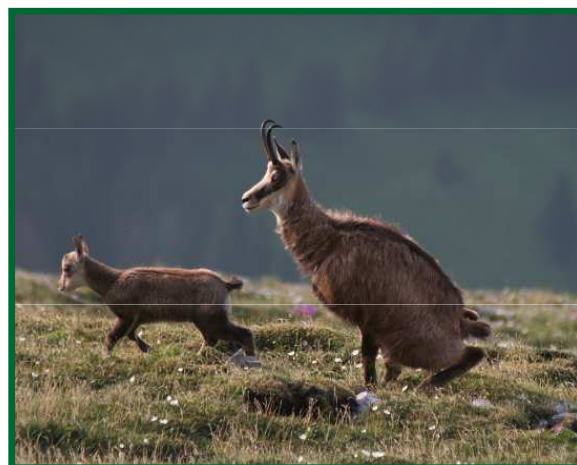
Zdroje DNA - trus



trus (buňky střevní sliznice)
→ „molecular scatology“



vydry



kamzíci



Zdroje DNA - chlupy

- vlasový folikul („koříněk“)
- speciální lepidlové pasti, ostnatý drát

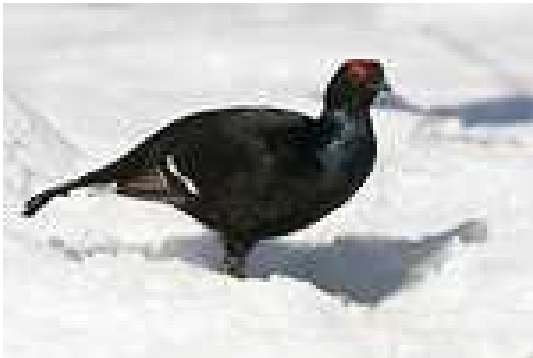


svišť
medvěd
rys
srnec



Zdroje DNA - peří

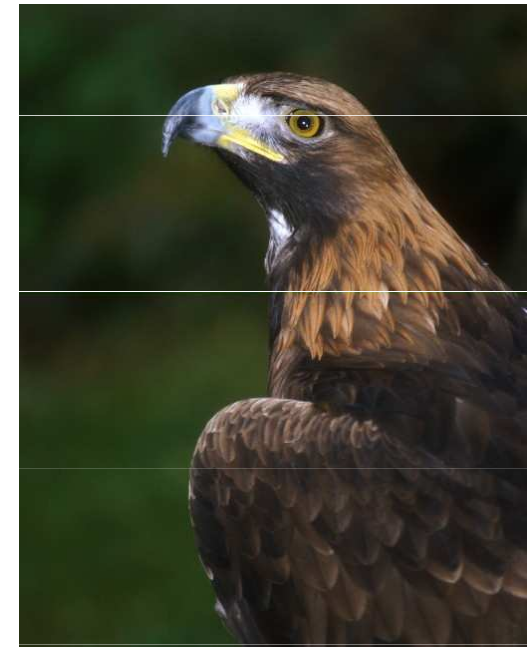
- opět folikul – „kořínek“ jednotlivého pera
- lepší vytržené pero (= pasti) než vypelichané pero (často velmi staré)



tetřívěk
(*Tetrao tetrix*)



tetřev (*Tetrao urogallus*)



orel královský
(*Aquila heliaca*)

Zdroje DNA - ostatní

- **moč** – vzácně (Hausknecht et al. 2006 and references therein)
- více materiálu než trus (frekvence močení je 6 x vyšší než defekace)
- vlci – 33 vzorků s měřitelnou DNA koncentrací – 14 (42%) shodných výsledků pro všechny analyzované znaky



- **svlečená kůže** – plazi
- **ptačí skořápky**
- **buňky bukální sliznice u vývržků potravy**

... umělá „bug-eggs“

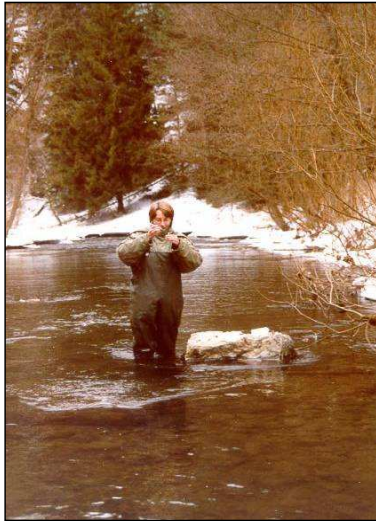


- krevsající ploštice Triatominae (Heteroptera)
- hodnocení úrovně stresu
- použitelná jako „méně invazivní“ metoda v ochranářské genetice



Becker et al. 2006

Postup analýzy DNA, např. ze vzorků trusu



vzorkování čerstvého (≤ 18 hod.) materiálu

(96% etanol, SilicaGel aj.)



izolace DNA

(komerční kity pro vzácnou DNA)

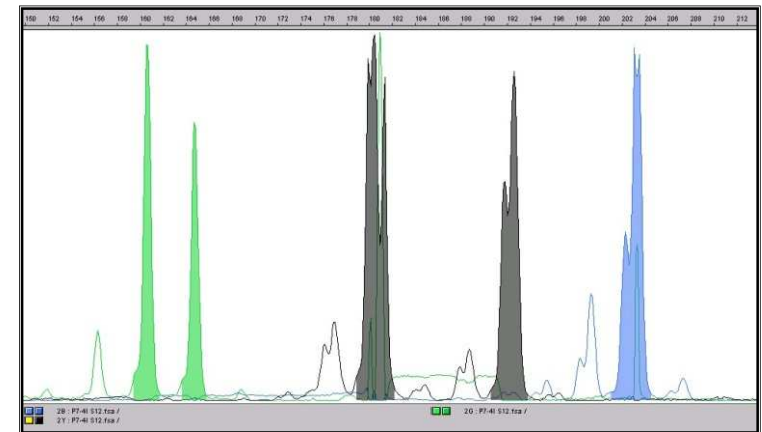
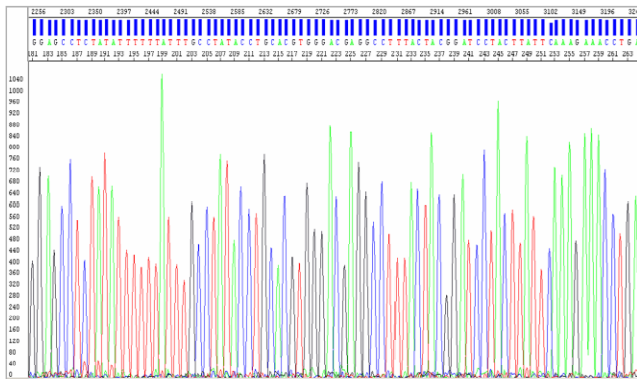


PCR (vysoce kvalitní enzymy)

- stačí jedna buňka s DNA



**analýza
variability
syntetizovaného
úseku**



Nevýhody a jejich řešení

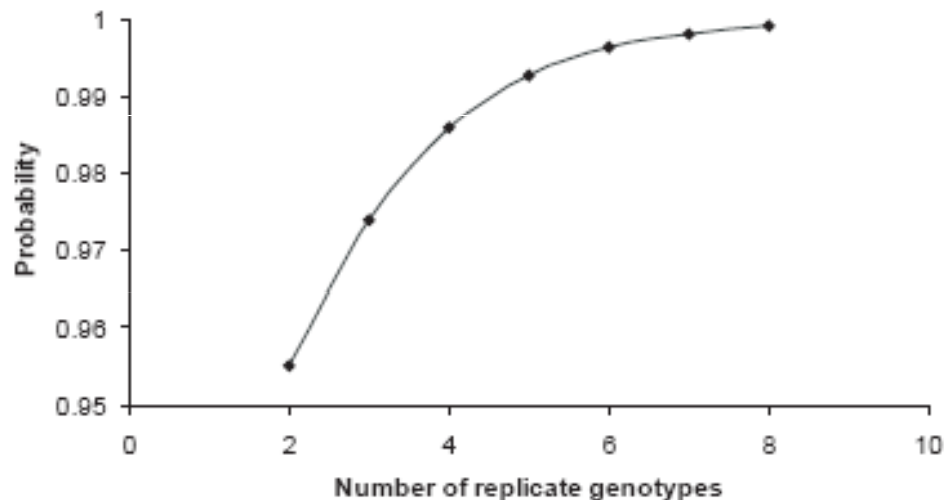
- nízká kvalita/kvantita DNA - nízká úspěšnost zjištění správného genotypu a vysoké riziko kontaminací
- vyloučení genotypizačních chyb a snížení rizika kontaminace



- identifikace faktorů pro úspěšnou analýzu

Increase of genotyping success rate

- multi-samples, multi-extracts (Goosens et al. 2000)
- PCR - multiple-tubes approach (Taberlet et al. 1996)
- cost and time-consuming
- pilot studies are reasonable



(Parsons 2001)

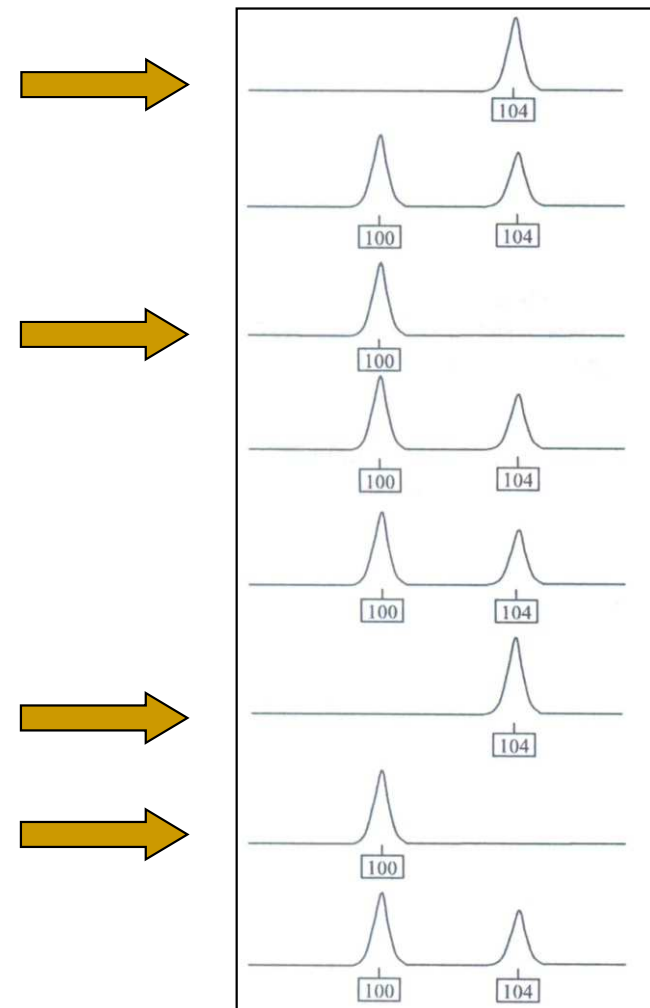


Dolphins - tissues vs. fresh faeces

100% probability of obtaining at least two correct genotypes when analysing 8 samples

Genotyping errors I.

- **allelic drop-out**
- very low concentration of DNA in samples - only one allele in heterozygotes is amplified
- **multiple tube approach**
- **statistical correction**



Heterozygote 100/104
(8 different PCRs)

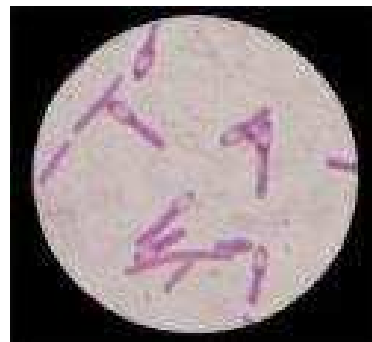
Genotyping errors II.

- **false alleles**
- PCR artefacts – rarely replicated when using „multiple-tubes“ approach
- co-amplification of microbial DNA from faeces (Bradley & Vigilant 2002) – confusions with „real“ alleles

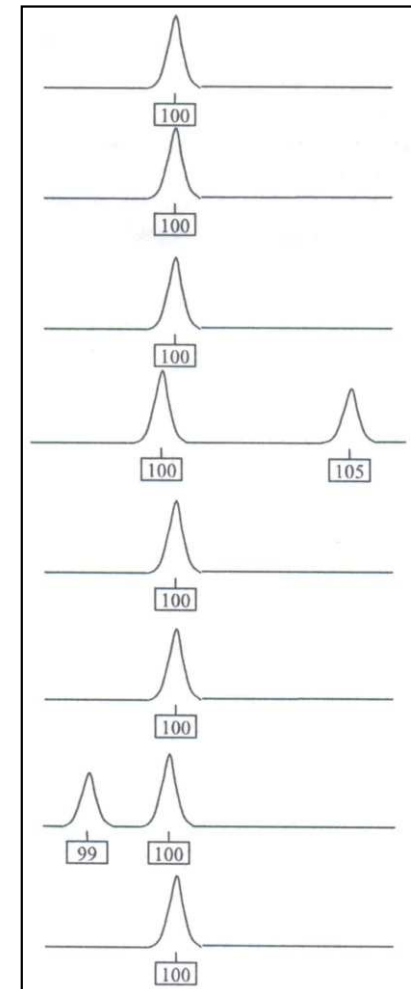


gorilla

x



Clostridium



Homozygote 100/100
(8 different PCRs)

Zvýšení koncentrace DNA

- pre-amplifikace (Bellemain & Taberlet 2004)

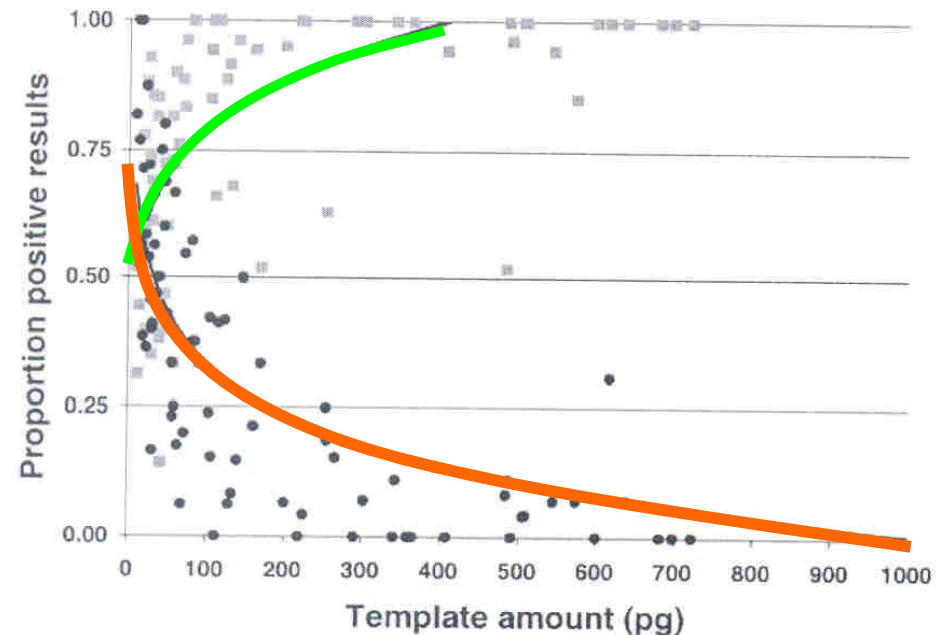


Multiplex preamplifikace
všech lokusů – zvýšení
koncentrace
mikrosatelitové DNA



Semi-nested PCR pro 1-3
lokusy

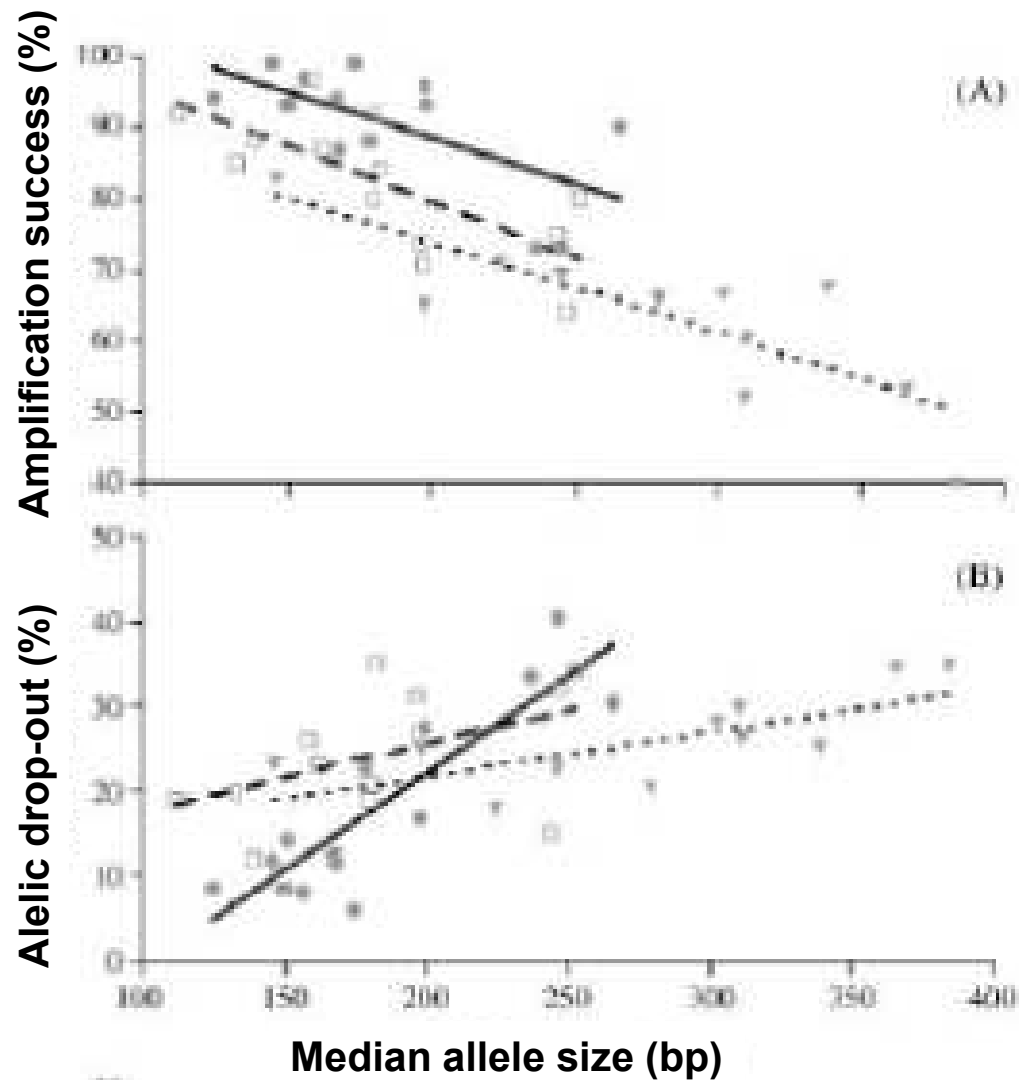
- qPCR (Morin et al. 2000, Zemanová et al., submitted)



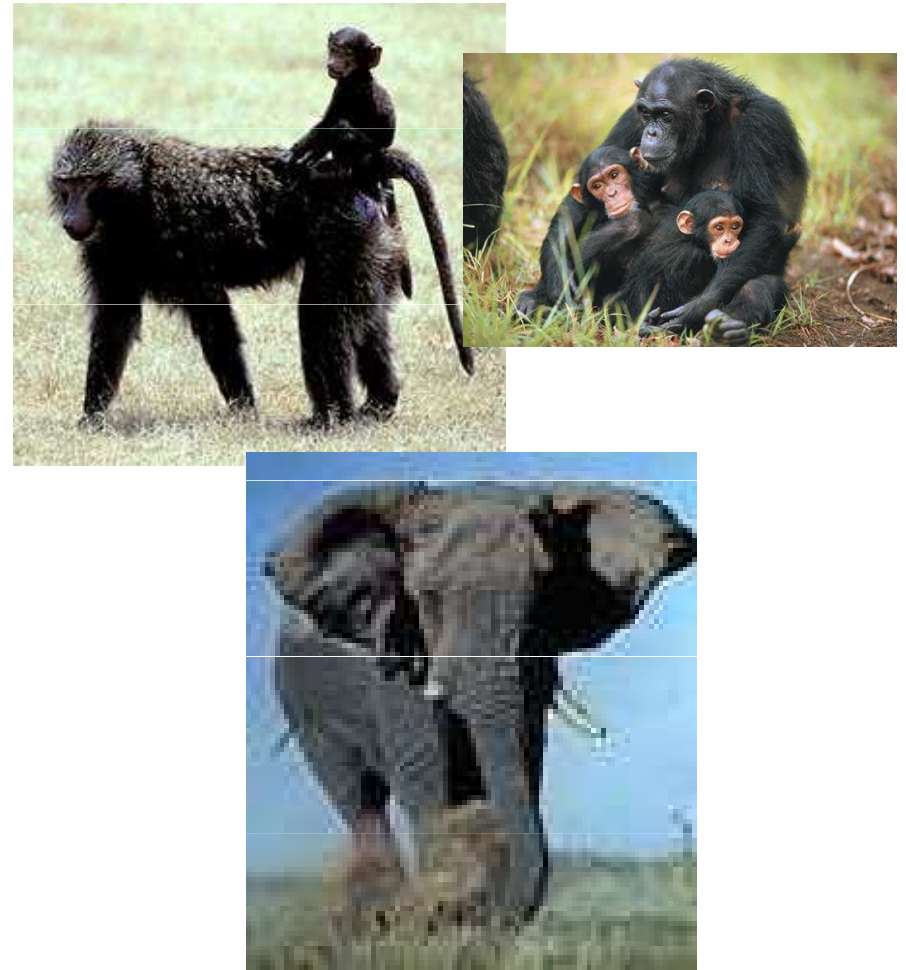
Positivní PCR Allelic dropout

Genotypizace pouze „dobrých“ vzorků

Effect of locus



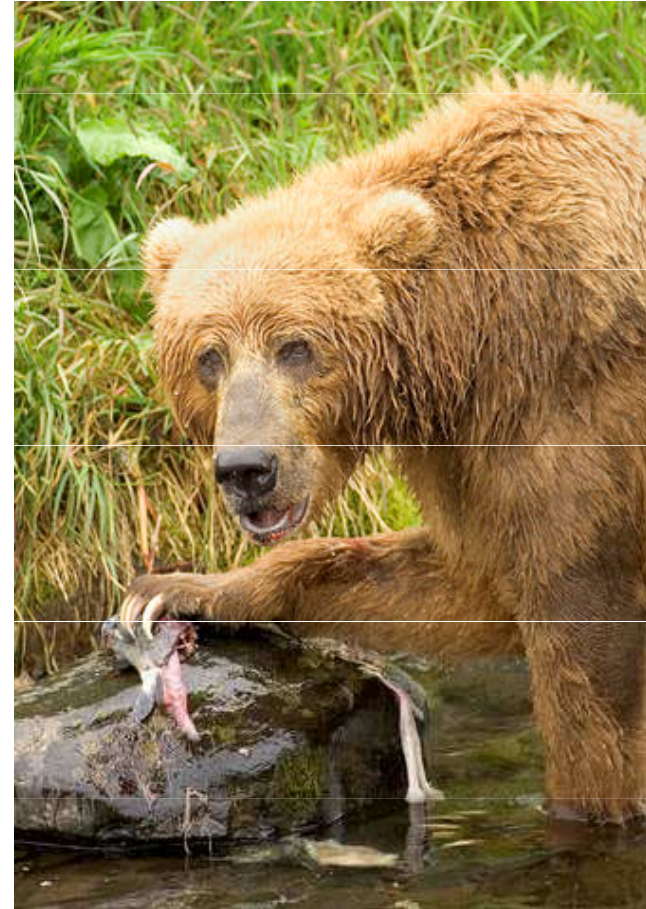
(Buchan et al. 2005)



Degraded DNA → amplification of **short fragments** is preferred

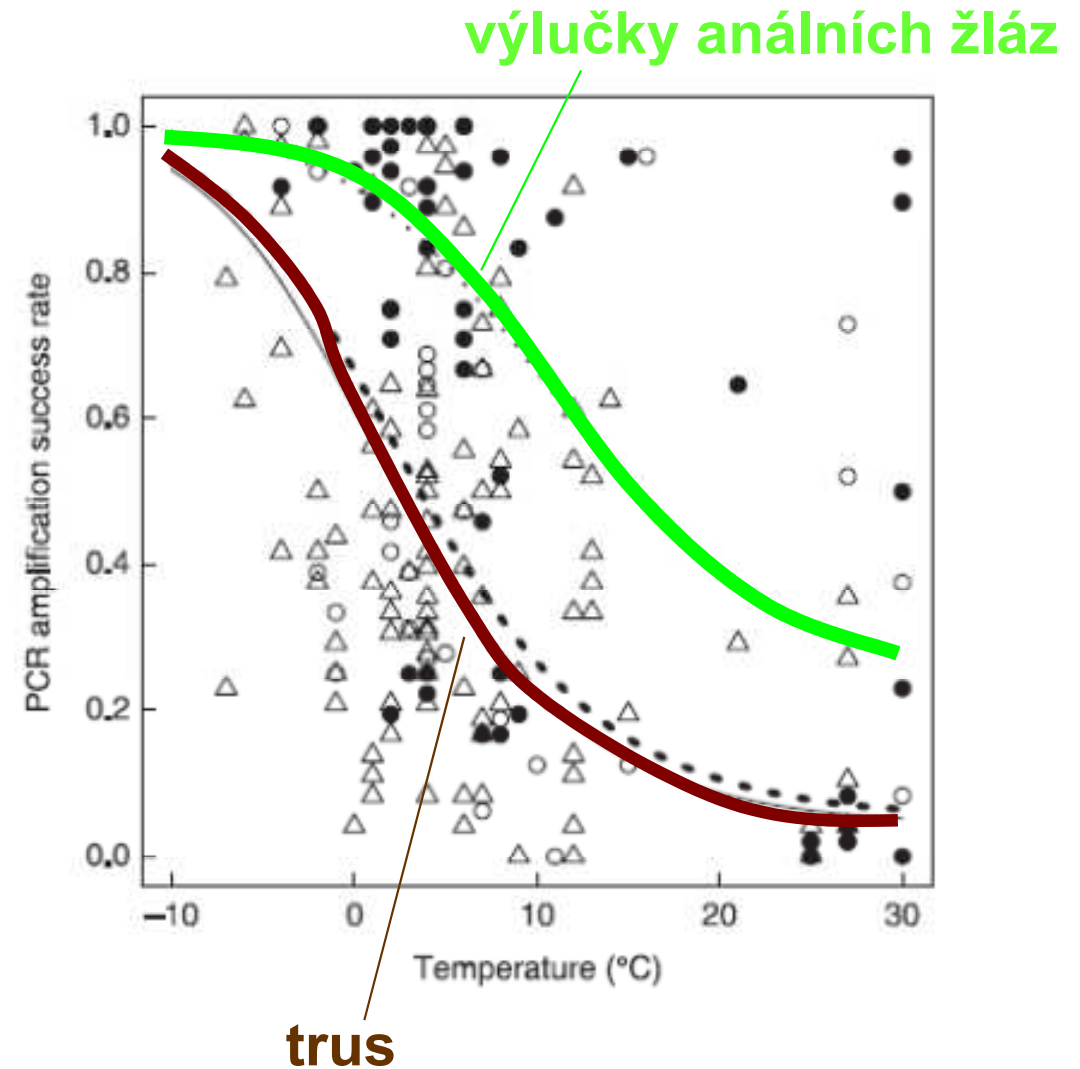
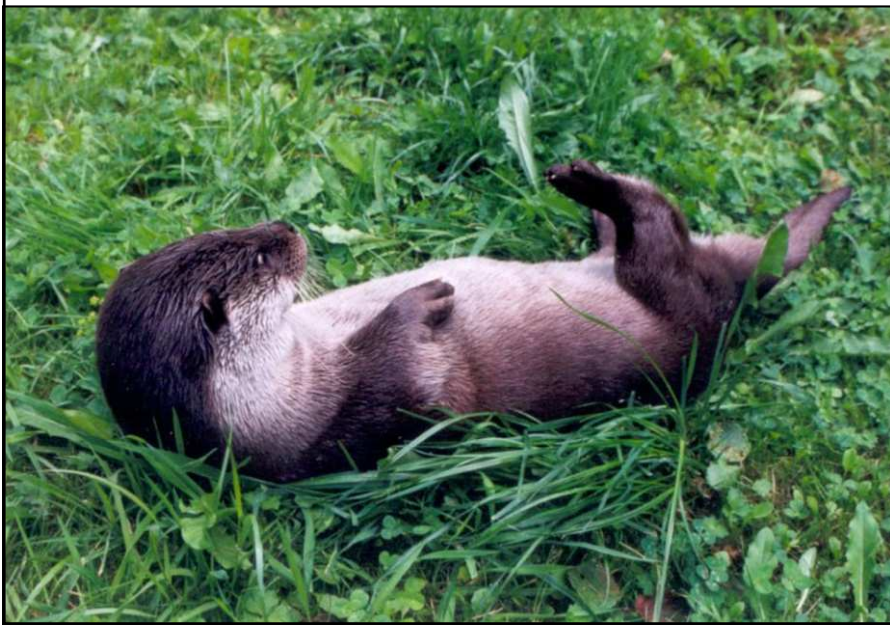
Influence of diet on faecal DNA amplification

- poorly known
- Murphy et al. 2003 – brown bears
- salmons in the diet – significant decrease of amplification success
- herbivores – better results than carnivores



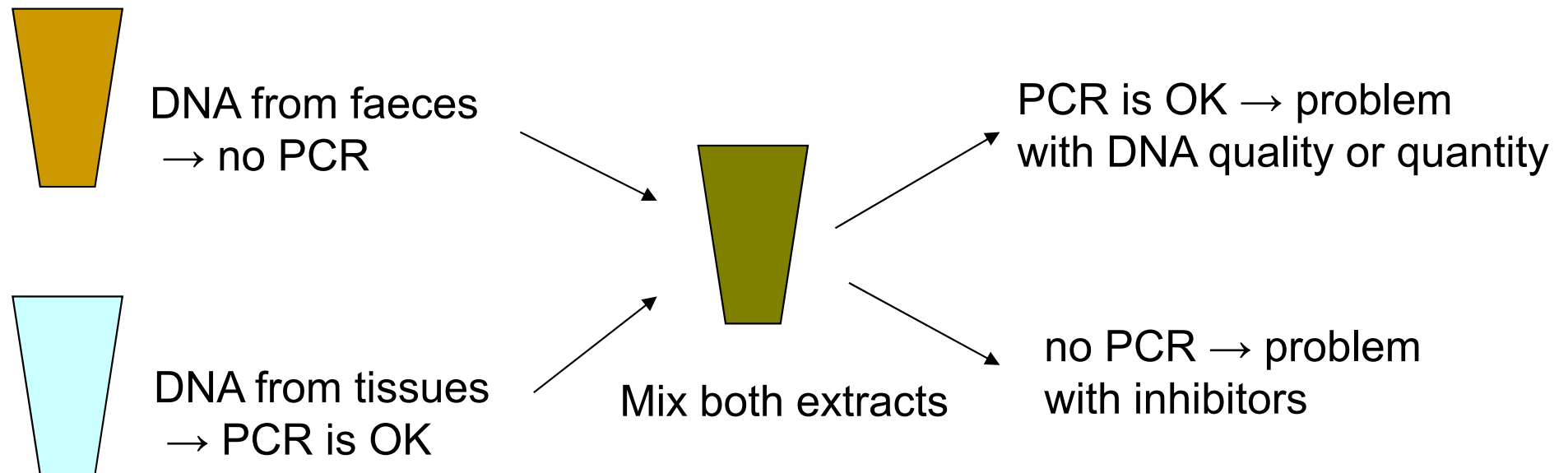
Vliv typu vzorku a teploty

- vydry – masožravci specializovaní na ryby
- vliv typu vzorku: výlučky análních žláz (82%) vs. trus (34%) u zmraženého trusu
- výrazný vliv teploty - velmi rychlá degradace DNA v teplém prostředí



Effect of PCR inhibitors (faeces)

- many inhibitors in faeces (products of digestion, chemicals in plants) – addition of special reagents (BSA), hot-start etc., dilution of template etc.



High contamination risk

- avoiding of „laboratory“ contamination (tips with filters, separated pre- and post-PCR laboratories, UV sterilisation, etc.)
- „mixed samples“ – problems in social species (communal latrines, marking in fixed sites) or in sampling at broad intervals („hair traps“) – usually identified by 3 or more alleles/sample; problem in species with low genetic variability
- primates – contamination with human DNA



Tracking of the endangered Pyrenean brown bear population

- hair and faeces
- 24 microsatellite loci
- one yearling, three adult males, one adult female
- spatial activity
- suggestions for conservation management



Příklady:
IDENTIFIKACE DRUHŮ
(DNA barcoding)

Identifikace druhů - „DNA barcoding“

- cytochrom b (mt DNA – mnoho kopií v jedné buňce) – 189 bp PCR produkt (100% úspěšnost amplifikace ze vzorků trusu)
- štěpení restriktčními enzymy:
 - vydra 80 a 189 bp
 - norek 101 a 189 bp
 - tchoř 127 a 189 bp



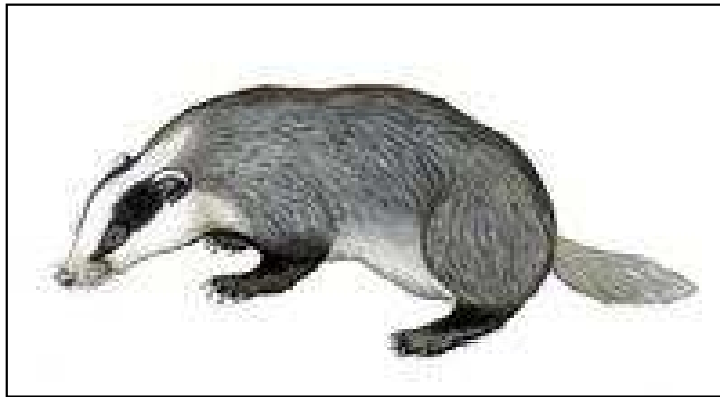
Forenzní analýzy

- nelegální lov a obchod
- rostoucí obchod s vydřími kožešinami v Asii (Kambodža, Indie, Čína, Nepál, Rusko; Kruuk 2006, Yoxon 2007, IOSF)



Jezevčí chlupy v luxusních holicích štětkách

- Domingo-Roura et al., Biological Conservation (2006)



Jezevec lesní (*Meles meles*)

X



Jezevec bělohrdlý (*Arctonyx collaris*)

- 4 štětky z 8 pocházely z jezevce lesního
- 3 z nich z Holandska, kde je ilegální "*držet, prodávat, transportovat nebo používat ke komerčním účelům mrtvé jezevce lesní nebo produkty z nich odvozené*"



- identifikace chráněných druhů v různých produktech (např. tygři vs. asijská medicína)
- analýzy mtDNA – velrybí maso legálně prodávané v J Korei a Japonsku – i chráněné druhy velryb, delfíni, sviňuchy, ale i ovčí a koňské maso (Baker et al. 1996, 2006)





- monitoring ilegálního obchodu se slonovinou (Comstock et al. 2003, Wasser et al. 2004), identifikace „bush-meat“ – nelegální lov velkých savců v Africe (Malisa et al. 2006)

Příklady:
IDENTIFIKACE POPULACÍ A JEJICH
VZÁJEMNÝCH VZTAHŮ

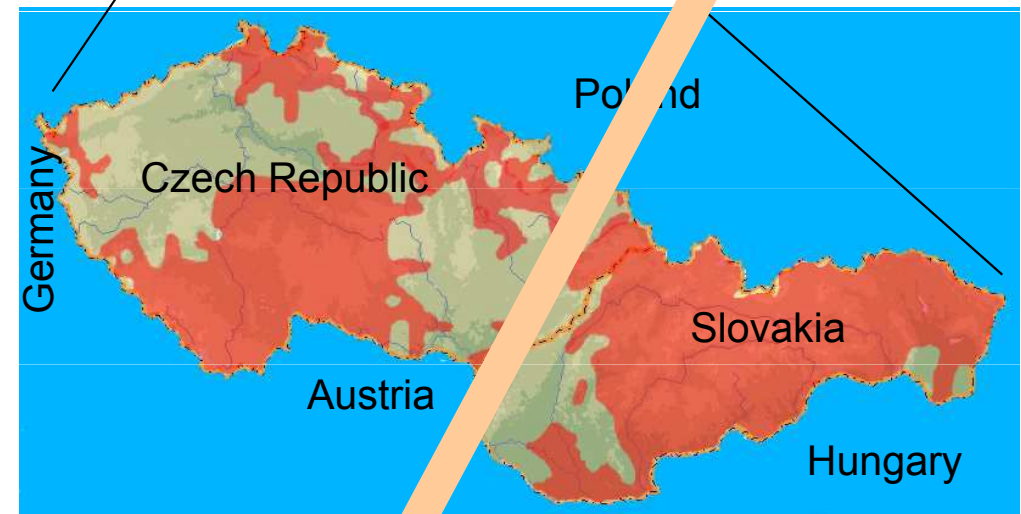
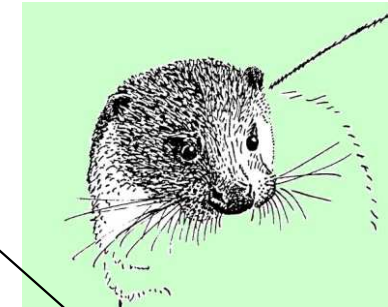
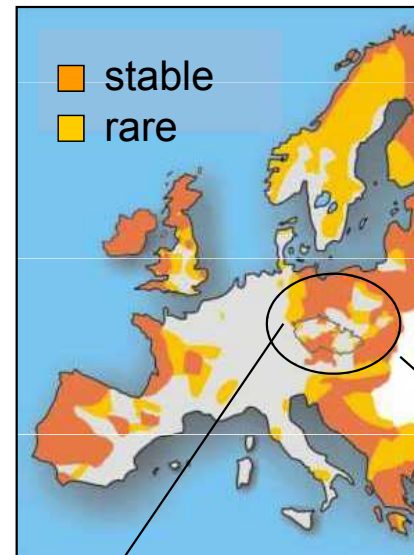
Vydra říční ve střední Evropě

- silný pokles početnosti v minulém století
- fragmentace populací

Cíle:

- odhad populační početnosti ze vzorků trusu
- populačně-genetická analýza – stanovení bariér toku genů, N_e , "bottlenecks" atd.

1. BARIÉRA MEZI ČESKOU A SLOVENSKOU POPULACÍ



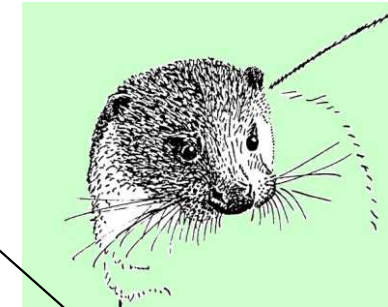
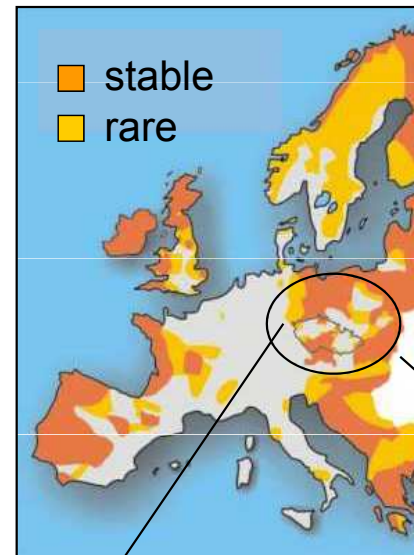
Vydra říční ve střední Evropě

- silný pokles početnosti v minulém století
- fragmentace populací

Cíle:

- odhad populační početnosti ze vzorků trusu
- populačně-genetická analýza – stanovení bariér toku genů, N_e , "bottlenecks" atd.

2. VÝRAZNÉ SNÍŽENÍ N_e ZHRUBA PŘED TŘICETI LETY (od té doby nárůst české populace)

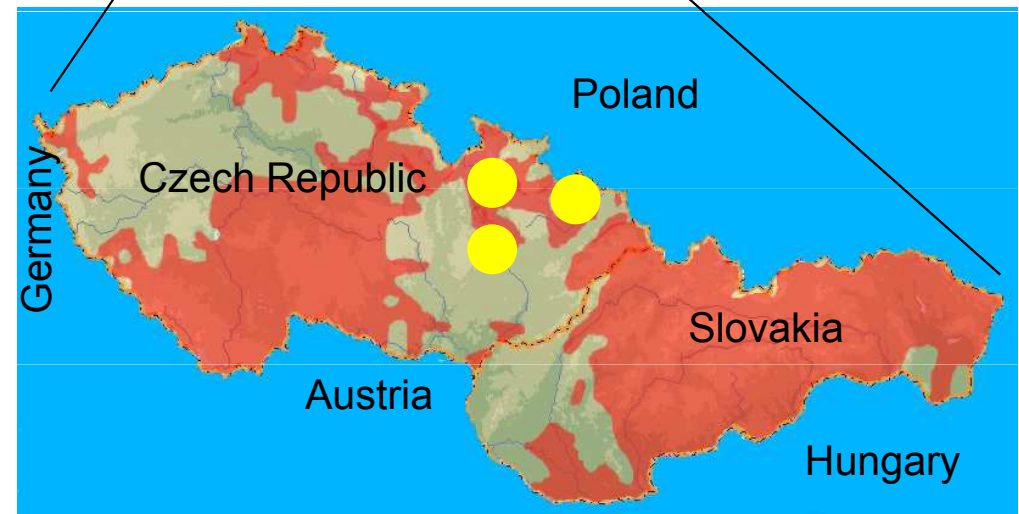
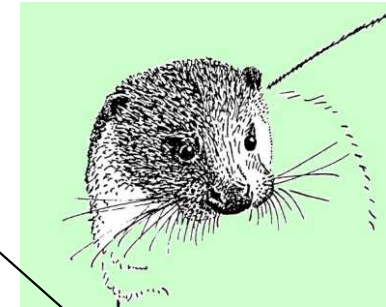
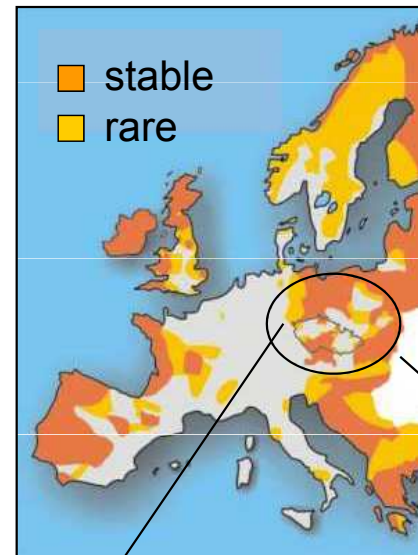


Vydra říční ve střední Evropě

- silný pokles početnosti v minulém století
- fragmentace populací

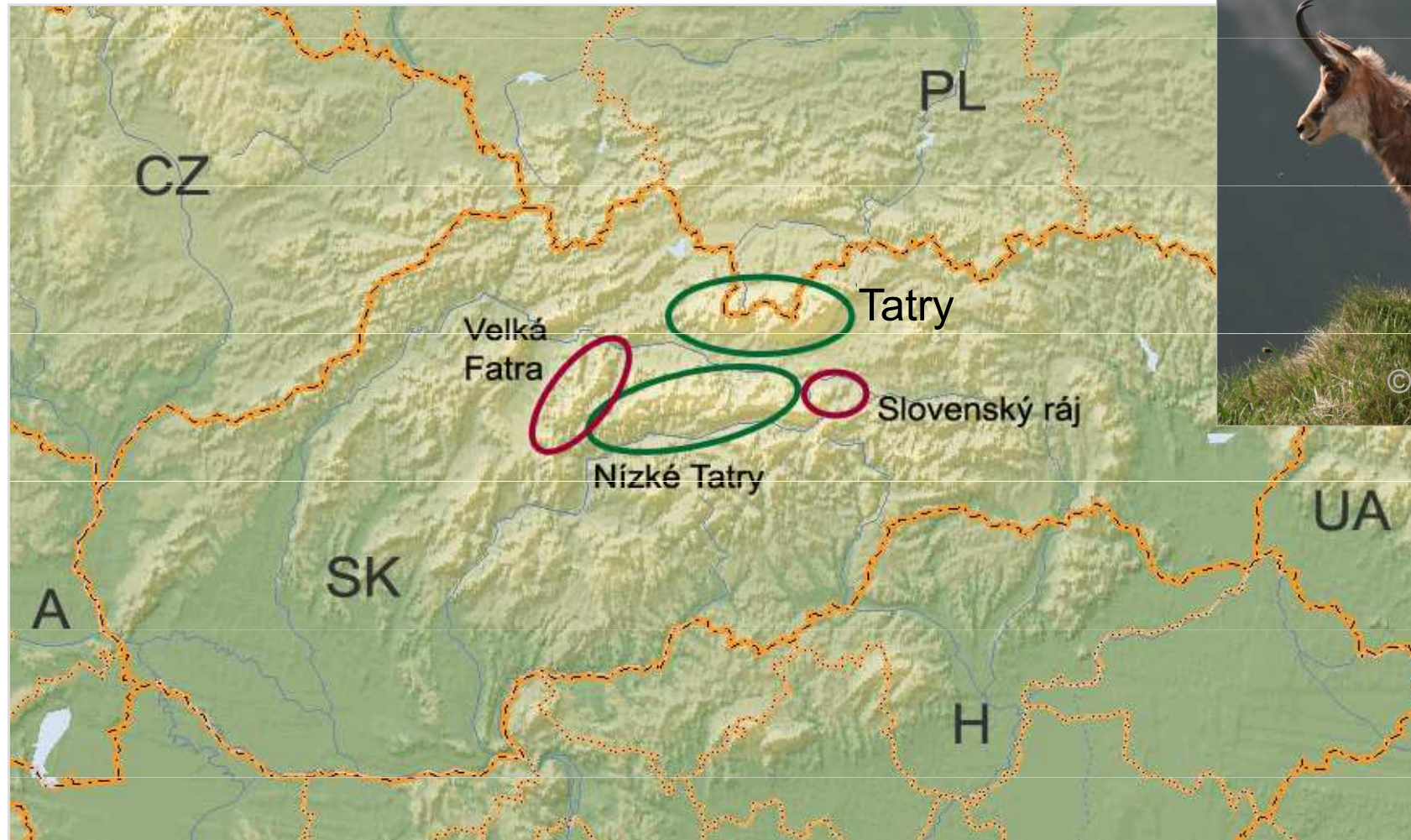
Cíle:

- odhad populační početnosti ze vzorků trusu
- populačně-genetická analýza – stanovení bariér toku genů, N_e , "bottlenecks" atd.



3. INTRODUKOVANÍ JEDINCI NA SEVERNÍ MORAVĚ NEPOCHÁZEJÍ Z ČESKÉ ANI SLOVENSKÉ POPULACE

Hybridizace - sekundární kontakt dvou populací



Hybridizace - sekundární kontakt dvou populací

R. r. tatrica

R. r. rupicapra

Tatry

Nízké Tatry

Vel. Fatra

Slovenský ráj

Structure, $K = 2$

A horizontal bar chart representing genetic structure with K=2 clusters. The background is green for the first two populations (Tatry and Nízké Tatry) and red for the last two (Vel. Fatra and Slovenský ráj). The Nízké Tatry population shows vertical red lines, indicating admixture between the two clusters.

Structure, $K = 3$

A horizontal bar chart representing genetic structure with K=3 clusters. The background is green for the first two populations, red for the third (Vel. Fatra), and yellow for the fourth (Slovenský ráj). The Nízké Tatry population shows vertical lines in red and yellow, indicating admixture between the three clusters.

BAPS, $K = 3$

A horizontal bar chart representing genetic structure with K=3 clusters. The background is green for the first two populations, red for the third (Vel. Fatra), and yellow for the fourth (Slovenský ráj). The Nízké Tatry population shows vertical lines in red and yellow, indicating admixture between the three clusters.

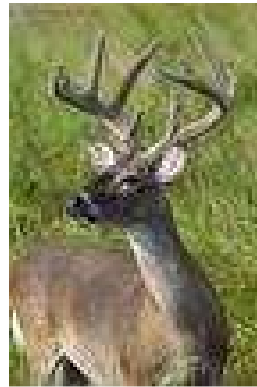
Příklady:
IDENTIFIKACE POHLAVÍ

Identification of sex

- sexual structure of population
- genetically determined sex
- markers: mammals – *SRY*, amelogenin; birds – CHD
- species-specific markers must be used (otherwise cross-amplification with species in the diet)



X



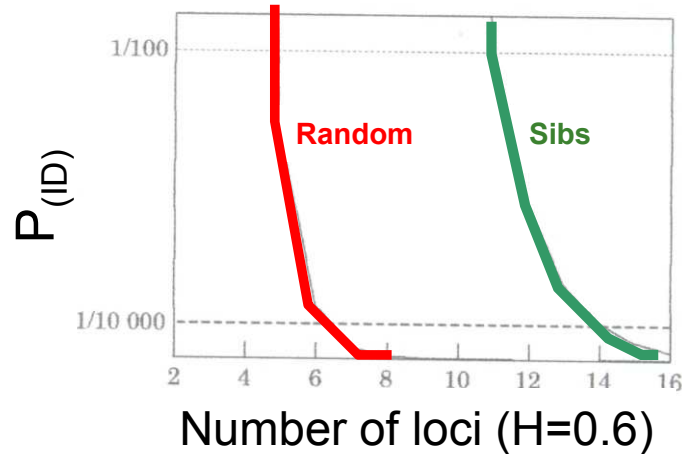
Murphy et al. 2003

Příklady:
IDENTIFIKACE JEDINCŮ

Identification of individuals

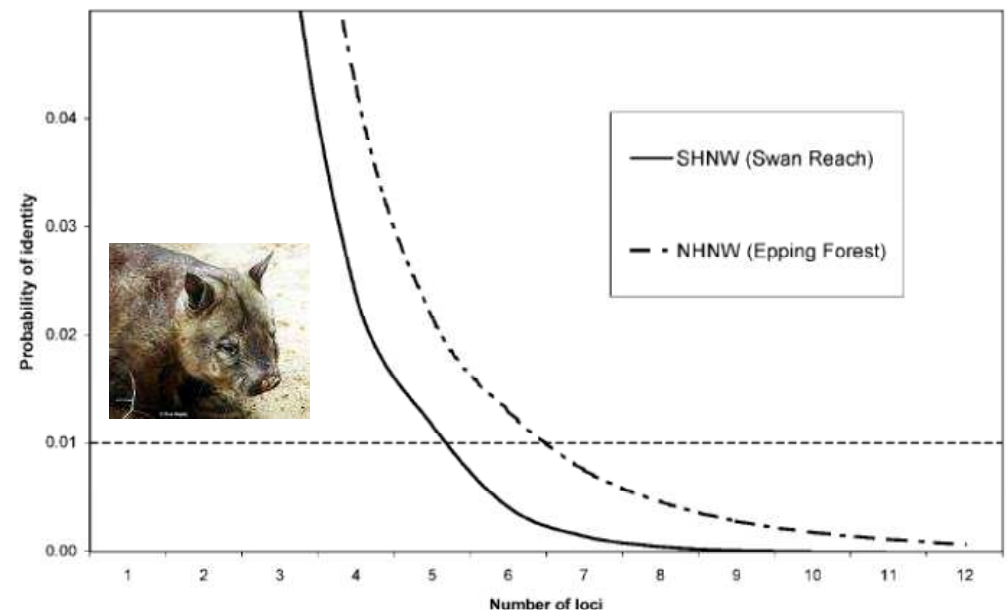
- multilocus microsatellite fingerprinting – power estimated as „probability of identity“ ($P_{(ID)}$) (Waits et al. 2001)

$$P_{(ID)} = \sum p_i^4 + \sum \sum (2p_i p_j)^2$$



$$P_{(ID)sib} = 0.25 + (0.5 \sum p_i^2) + [0.5(\sum p_i^2)^2] - (0.25 \sum p_i^4)$$

- pilot studies with tissue samples are required to identify $P_{(ID)}$ in a studied population

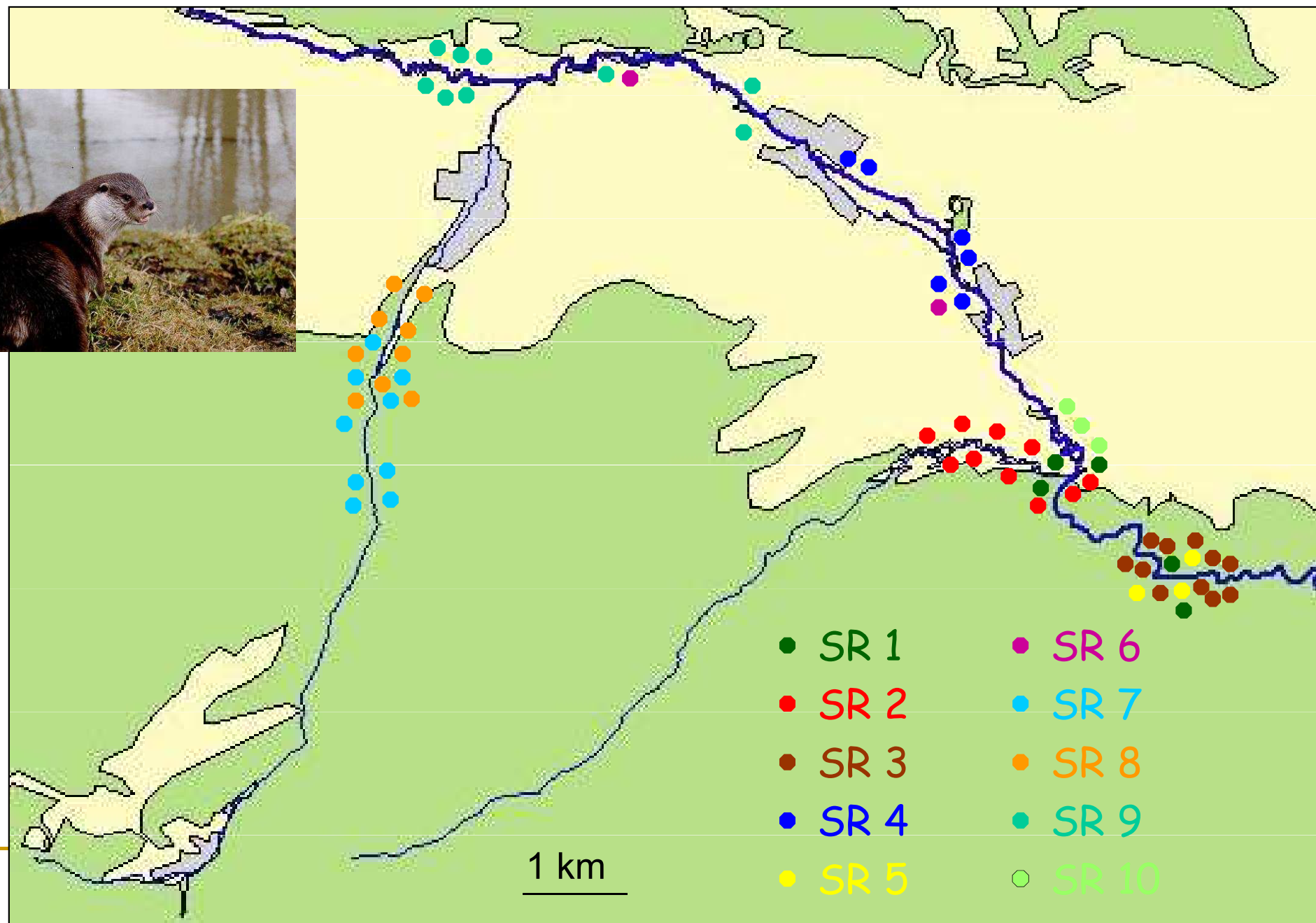


Identifikace jedinců

- **prostorová aktivita**

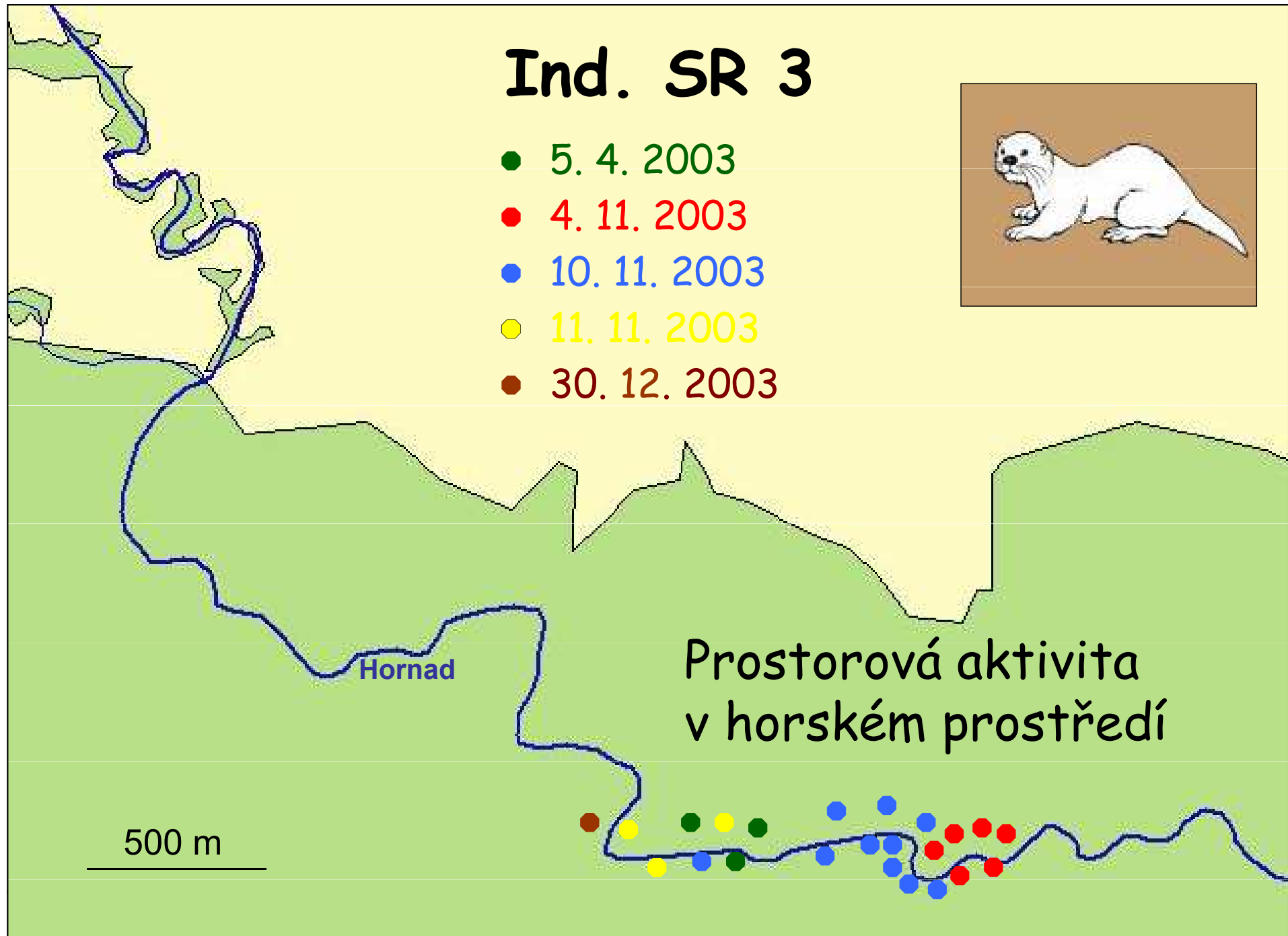
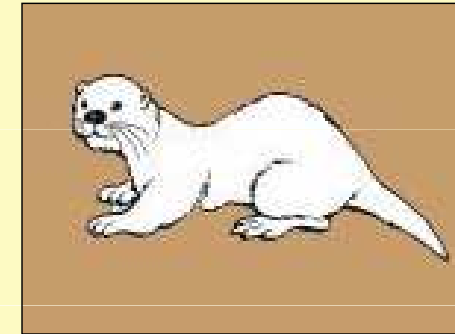


Identifikovaní jedinci - Hornád, NP Slovenský Raj



Ind. SR 3

- 5. 4. 2003
- 4. 11. 2003
- 10. 11. 2003
- 11. 11. 2003
- 30. 12. 2003



Non-invasive CMR studies

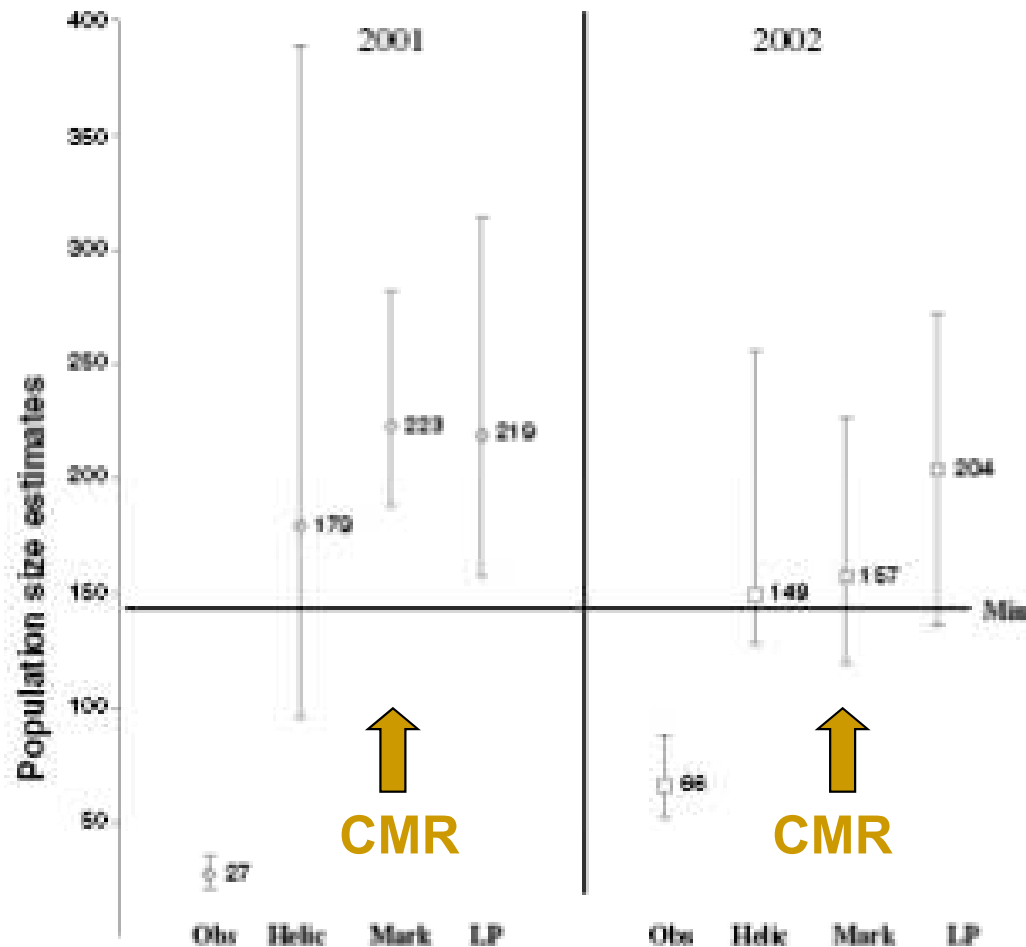
- **Velikost populace**
- „Capture-Mark-Recapture“ (review in Lukacs & Burnham 2005)
- Opakované vzorkování stejného zvířete
- Přežívání, populační dynamika atd.
- Closed population models, open population models, Robust design models
- Korekce na genotypizační chyby
- Trus – analýza **individuální variability** v potravě (př. kojoti - Fedriani & Kohn 2001)



Populační dynamika kojotů
(Prugh et al. 2005)

Brown bears (*Ursus arctos*) in Scandinavia

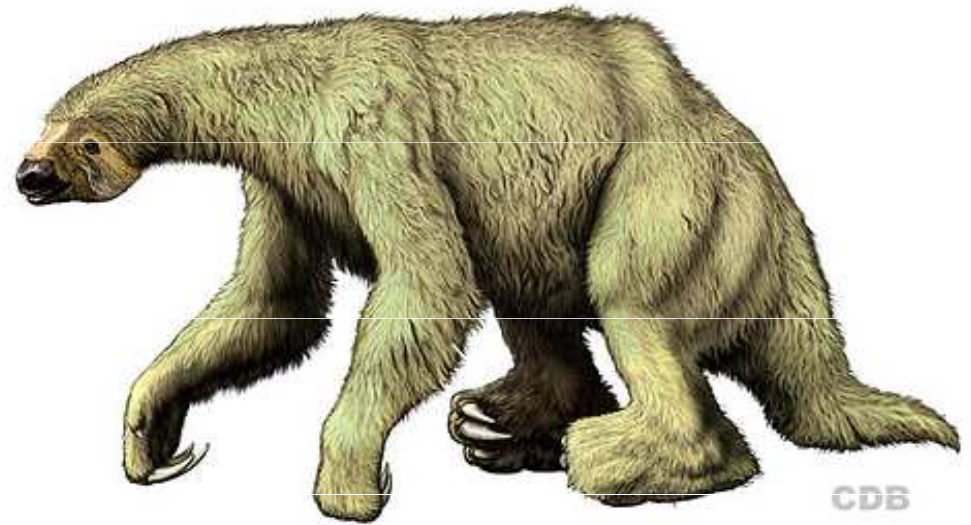
(Hakon Solberg et al. 2006, Biological Conservation)



- observations – underestimate numbers
- non-invasive CMR is cheaper and more precise than helicoptere census

Diet of the extinct Ground Sloth (*Nothrotheriops shastensis*)

- Poinar et al. (1998) – Science
- 20 000 years ago
- chemical modification of DNA in ancient faeces before PCR
- identification of species and phylogeny to modern mammals
- cpDNA – diet of the Ground Sloth



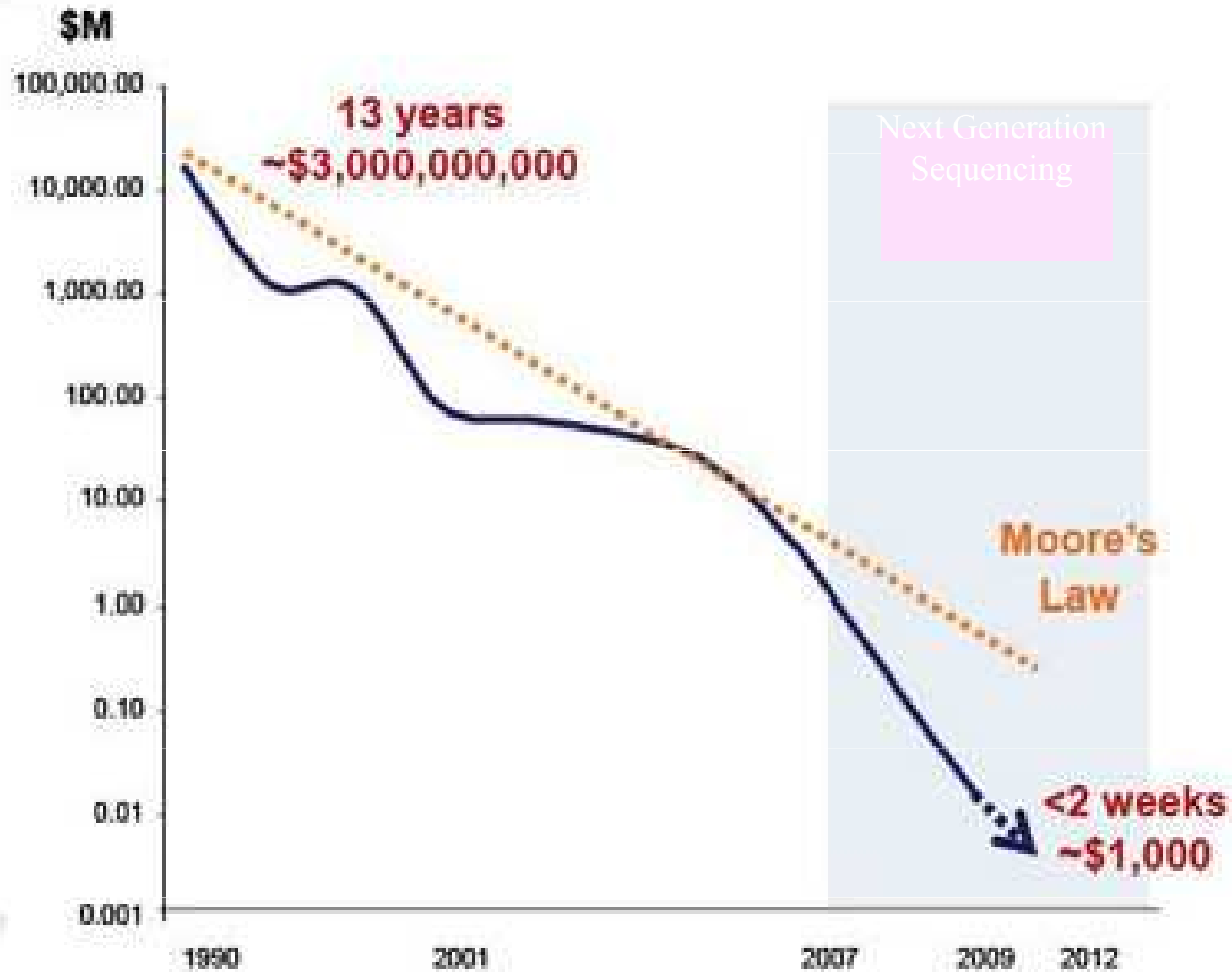
BUDOUCNOST OCHRANÁŘSKÉ GENETIKY

Praktické problémy ochranářské genetiky

- mladé odvětví = mnoho problémů
- význam genetické variability pro životaschopnost populací => **experimentální ochranářská genetik**
- extrémní neznalost adaptivní variability u volně žijících druhů (rychle se mění v souvislosti s technologickým vývojem)



Cost per Human Genome



Traditional Sequencing vs. Next Generation Sequencing: Data Throughput

1 x Illumina GAII



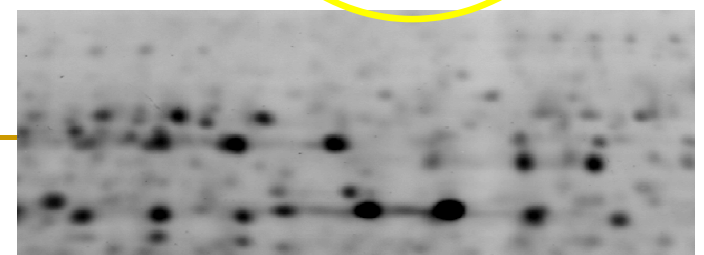
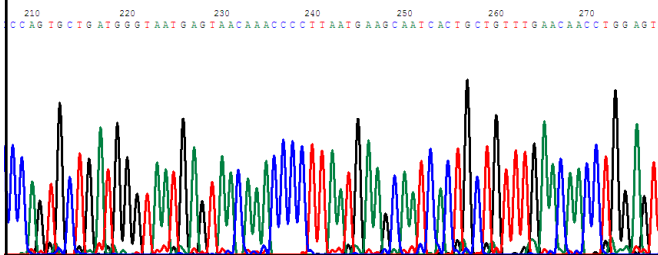
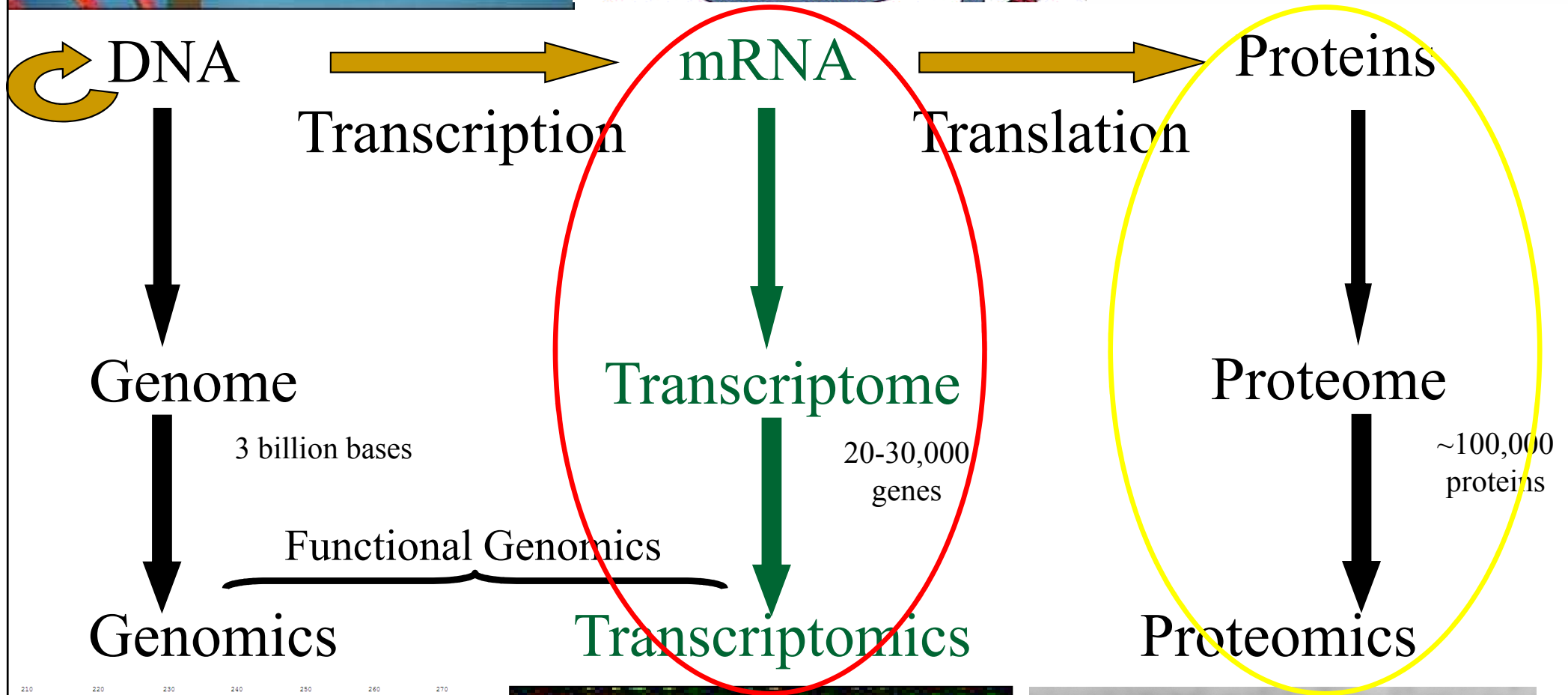
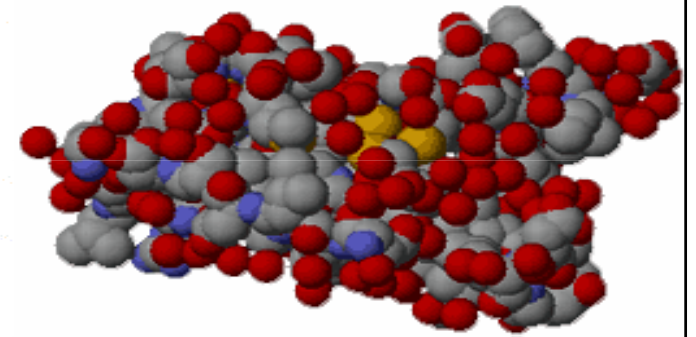
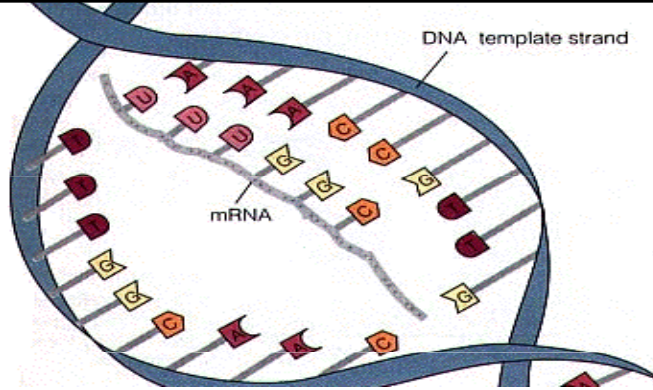
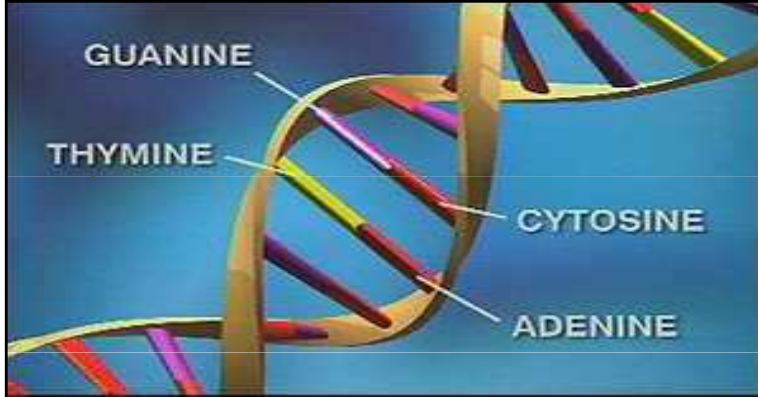
Vs.

200+ of 3730xl



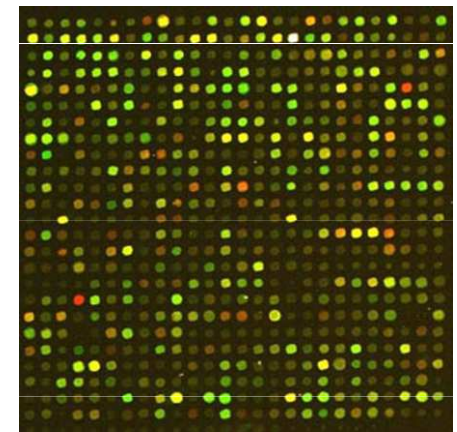
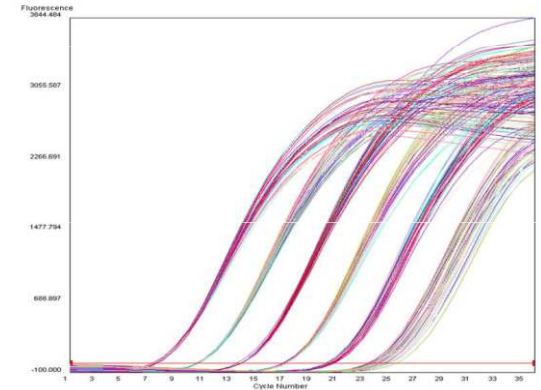
Days vs. Years

The Sequencing Landscape is Changing



Transkriptomika

- **Expresse jednotlivých genů** – quantitative real-time PCR
 - známý kandidátní gen (modelové druhy)
- **Expresse mnoha genů najednou** (genomic scale) - microarray
 - identifikace kandidátních genů – detekce jejich exprese může podat důležitou informaci o jeho funkci (různá v odlišném prostředí, vývojovém stadiu, stresu atd.)



Praktické problémy ochranářské genetiky

- mladé odvětví = mnoho problémů
- význam genetické variability pro životaschopnost populací => **experimentální ochranářská genetik**
- extrémní neznalost adaptivní variability u volně žijících druhů
- identifikace ochranářských jednotek na základě genetických dat → praktická ochrana



CONGRESS (2010-2013)

Conservation Genetic Resources for Effective Species Survival

FP7-ENV-2009-1, Coordination and support action

