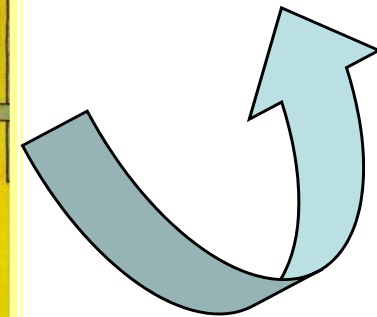
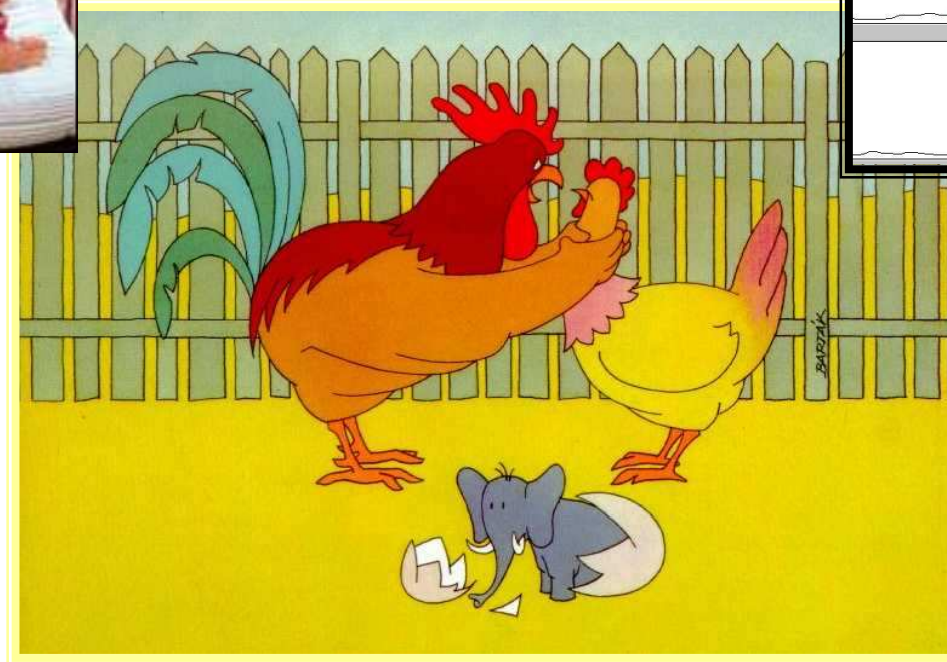
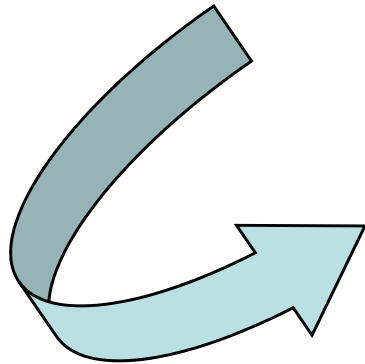
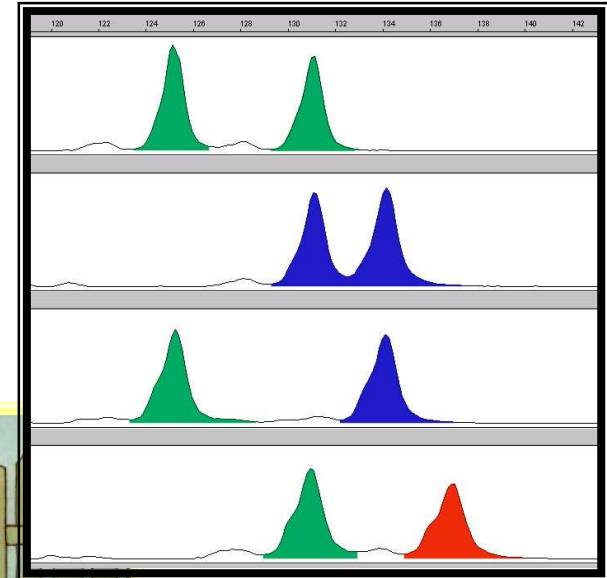


Parentage analysis



Určení otce, matky nebo obou



Jones AG, Ardren WR, 2003, Mol Ecol (invited review)

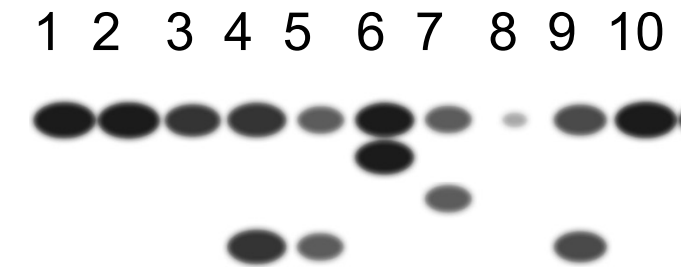
Proč zjišťovat paternitu?

- mimopárové oplození – otec vychovatel vs. genetický otec
- studium faktorů ovlivňujících fitness (reprodukční úspěšnost)
- vícenásobná paternita – analýzy párovacího systému (detekce promiskuity aj.)

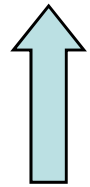
History

- již první studie genetického polymorfismu → genetické techniky mohou rozlišit nejisté otcovství → jedno z hlavních témat molekulární ekologie
- chromosomal polymorphism
- allozyme electrophoresis
- DNA fingerprinting – overturn of existing paradigms in behavioural ecology (birds)
- statistical techniques for single-locus polymorphism (allozymes) – departure from practice (i.e. DNA fingerprinting)

History

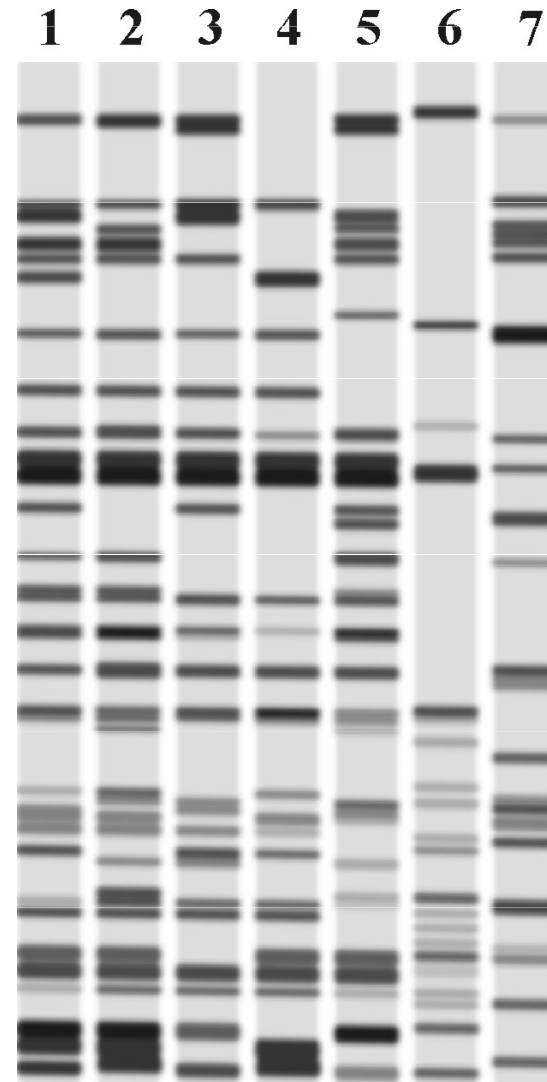


allozymes



low variation

multi-locus genotype



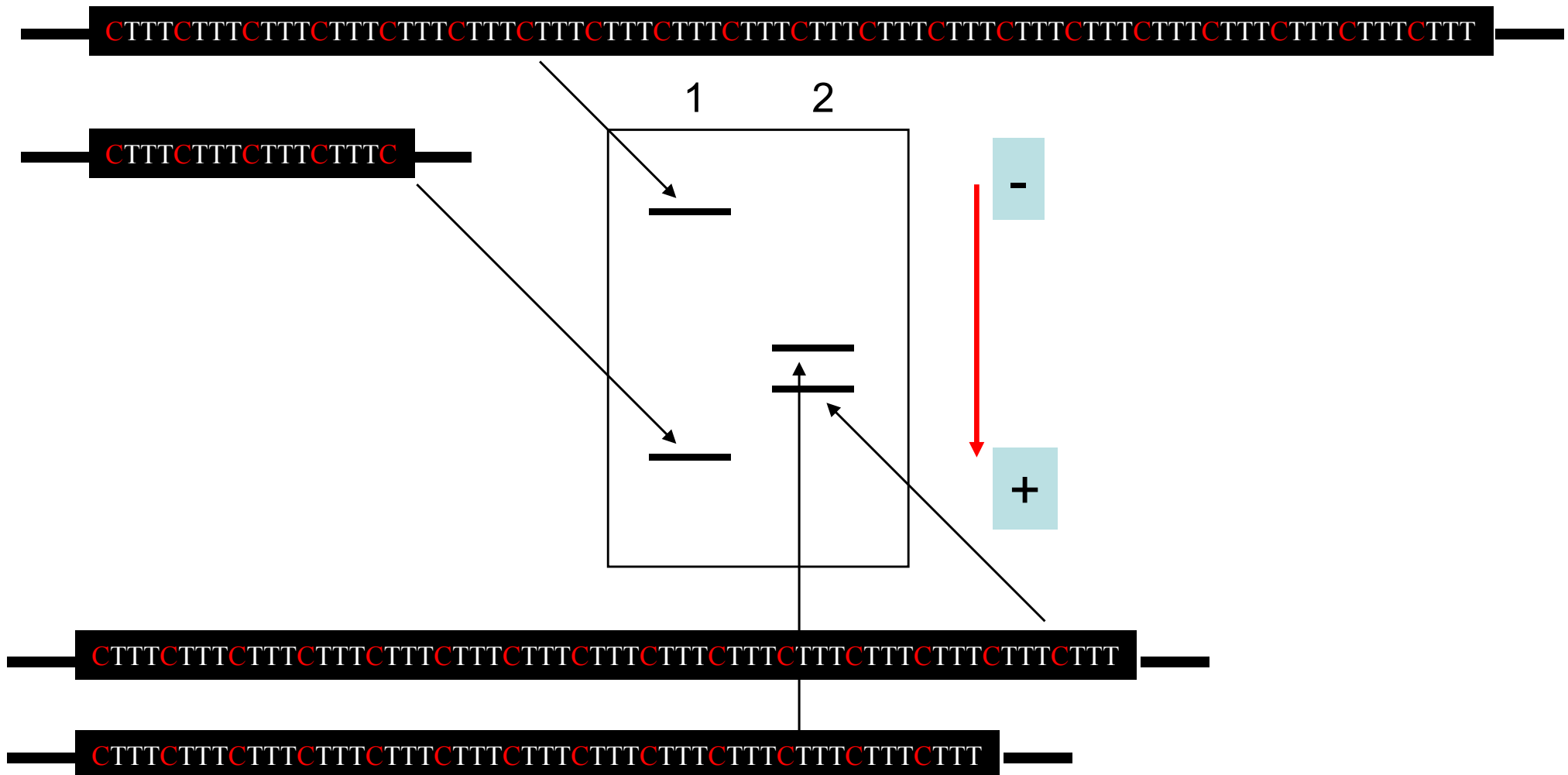
DNA fingerprinting, RAPD
absence of theoretical models

Využití mikrosatelitů

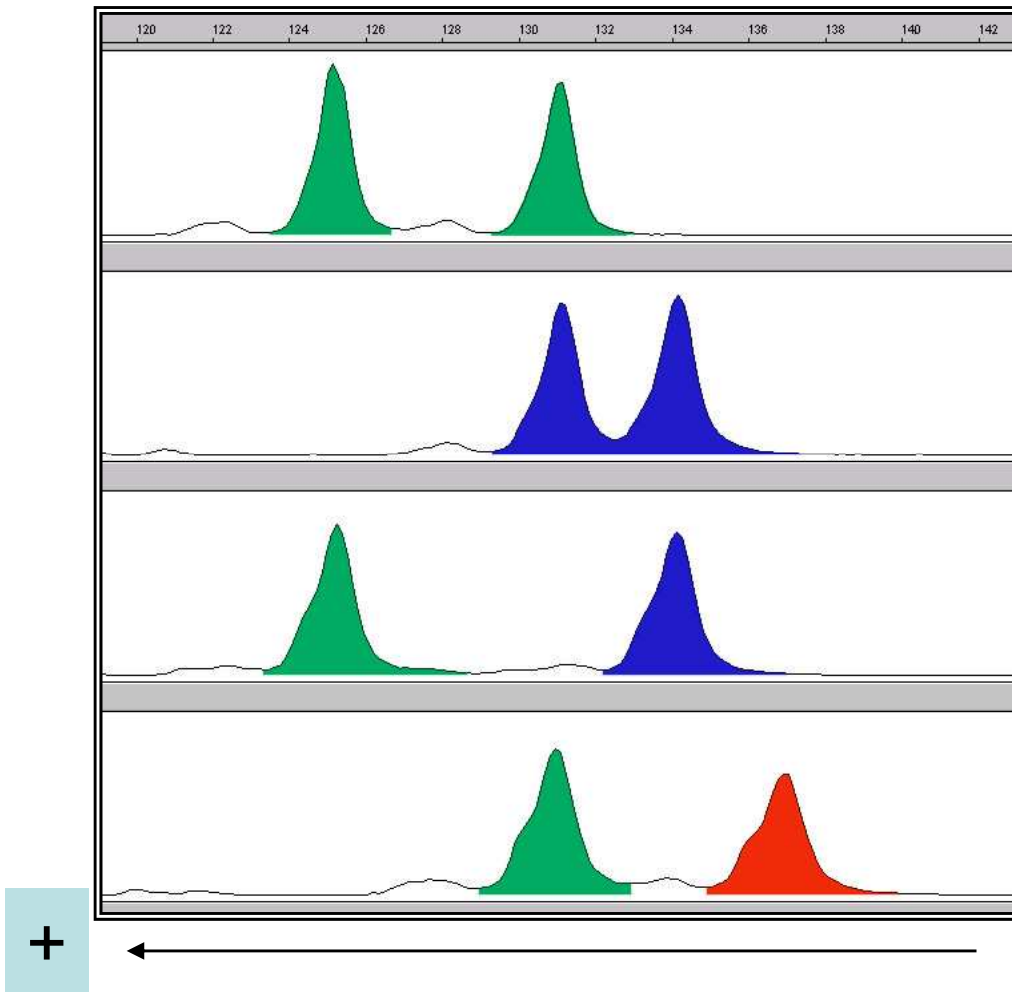
(dnes nejčastěji používané markery pro stanovení paternity)

- Spojení teorie (statistické modely) a praxe (vysoce polymorfní single-locus markery)
- Tandemová opakování krátkých motivů
- Např. $(CTTT)_n$ nebo $(CA)_n$
- Vysoce polymorfní
- Jednoduchá dědičnost
- found in many species (probably common)

Alely se liší délkou – analýza dvou jedinců



Příklad analýzy jednoho lokusu – fragmentační analýza PCR produktů



Genotyp (bp)

Matka: 125/131

Otec: 131/134



Potomek 1: 125/134

Potomek 2: 125/137

Sledovaný otec mohl zplodit potomka 1, ale zcela jistě není otcem potomka 2



Proteinový fingerprinting

- Hohol severní
Andersson & Åhlund 2000
- Proteiny z bílku vajec
- isoelectric focusing
in immobilized pH gradients
- Vnitrodruhový hnízdční parazitismus
(více než polovina hnízd)
- Zanáší si zřejmě příbuzné samice

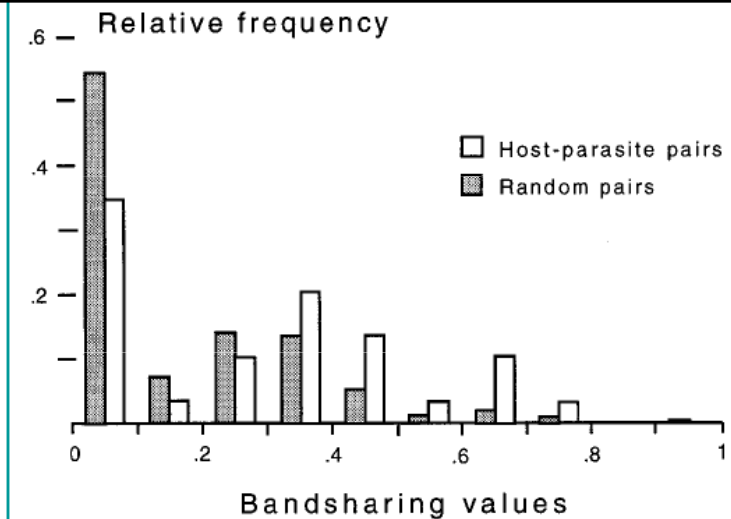


Fig. 2. Distribution of bandsharing values in the 29 pairs of host and primary parasite in 1986 and in the 861 different random pairs that can be drawn among the 42 other females not involved in host-parasite relationship with each other. Bandsharing values are significantly higher for the host-parasite pairs than for the randomly formed pairs (see *Host-Parasite Relatedness*).

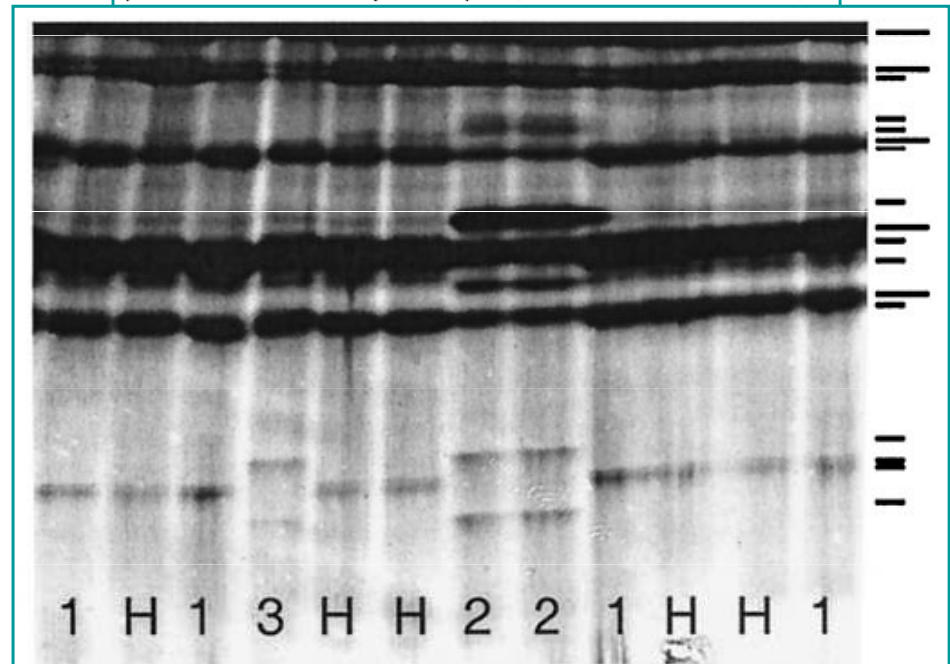


Fig. 1. Electrophoretic gel with albumen band patterns for the 12 eggs of a goldeneye clutch parasitized by three females. There are five host eggs (lanes marked H) and four, two, and one parasite eggs (lanes marked 1, 2, and 3, respectively). Bands that were scored for bandsharing analysis are marked with a short dash in the margin. Several different bands occur in all 902 eggs and can therefore be used as location references; they are marked with a longer dash.

Statistical methods of parentage analysis

- **Exclusion**

nekompatibilita mezi rodičem a potomkem →
zamítnutí rodičovství

- **Categorical and fractional likelihood**

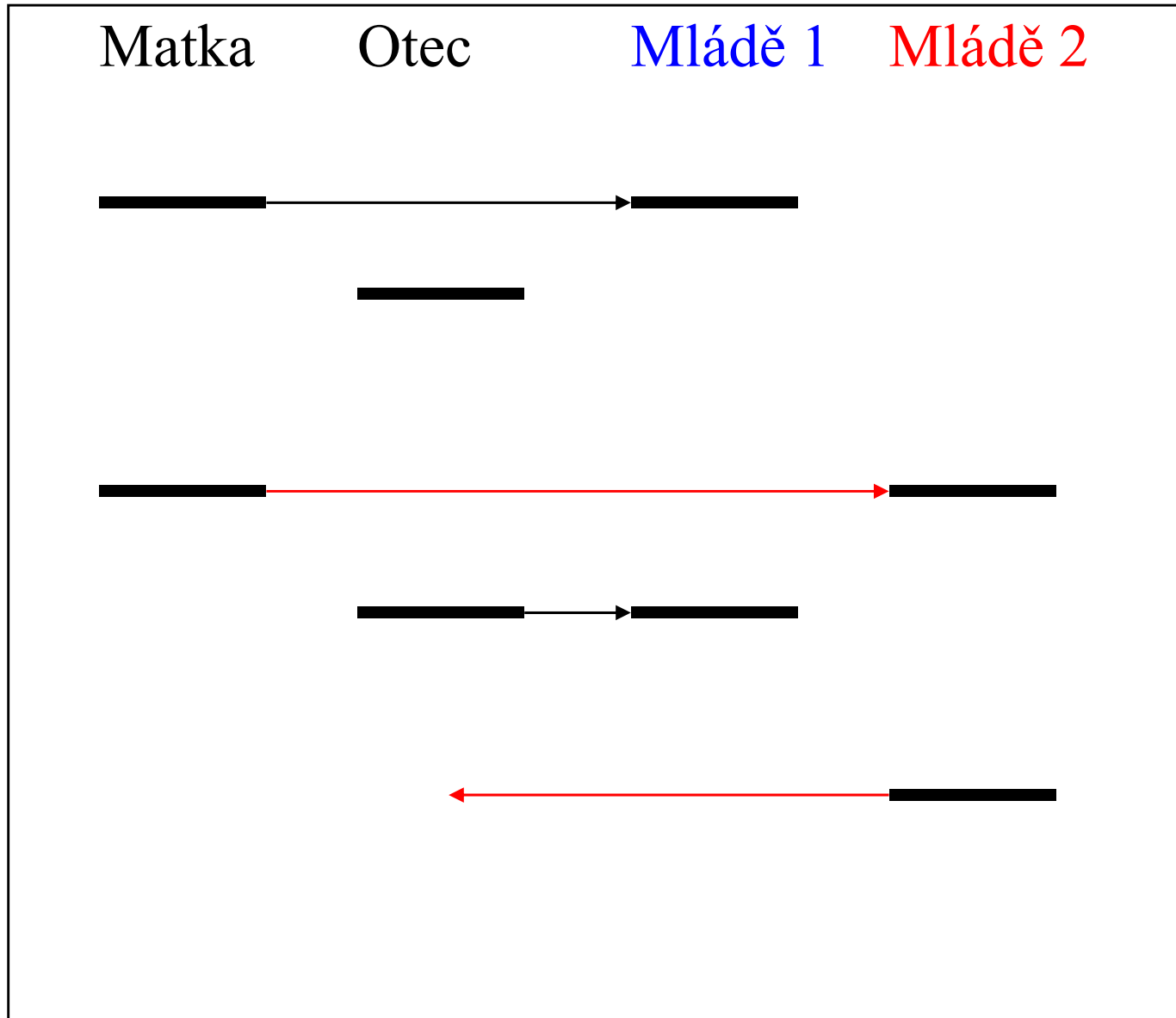
nelze vyloučit více jedinců

- **Parental reconstruction**

z genotypů potomků z jedné rodiny rekonstrukce genotypu rodičů

srovnání se skupinou potenciálních rodičů nebo srovnání navzájem
mezi potomky k určení „multiple paternity“

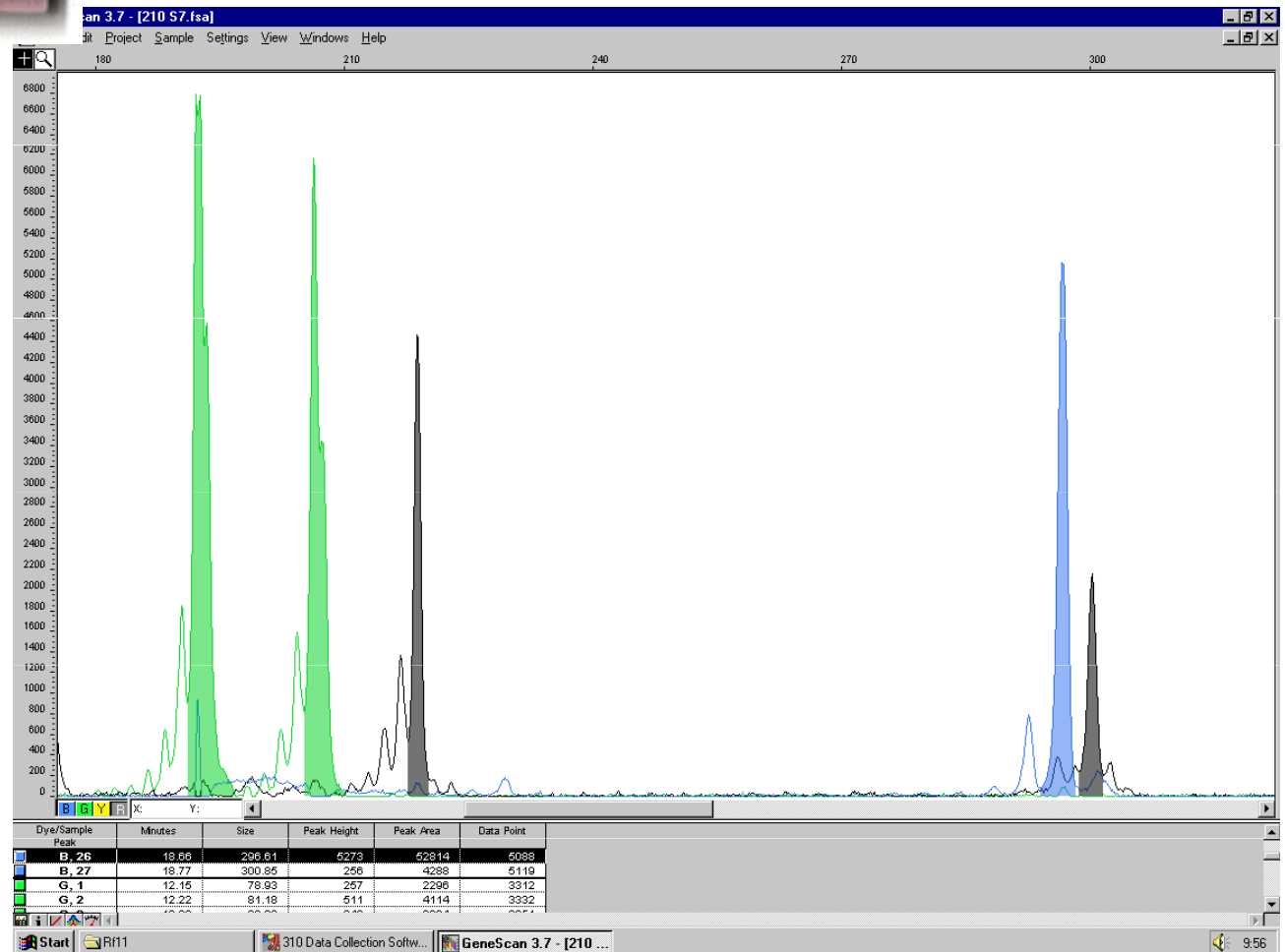
Určení paternity – exclusion principle



Fragmentační analýza

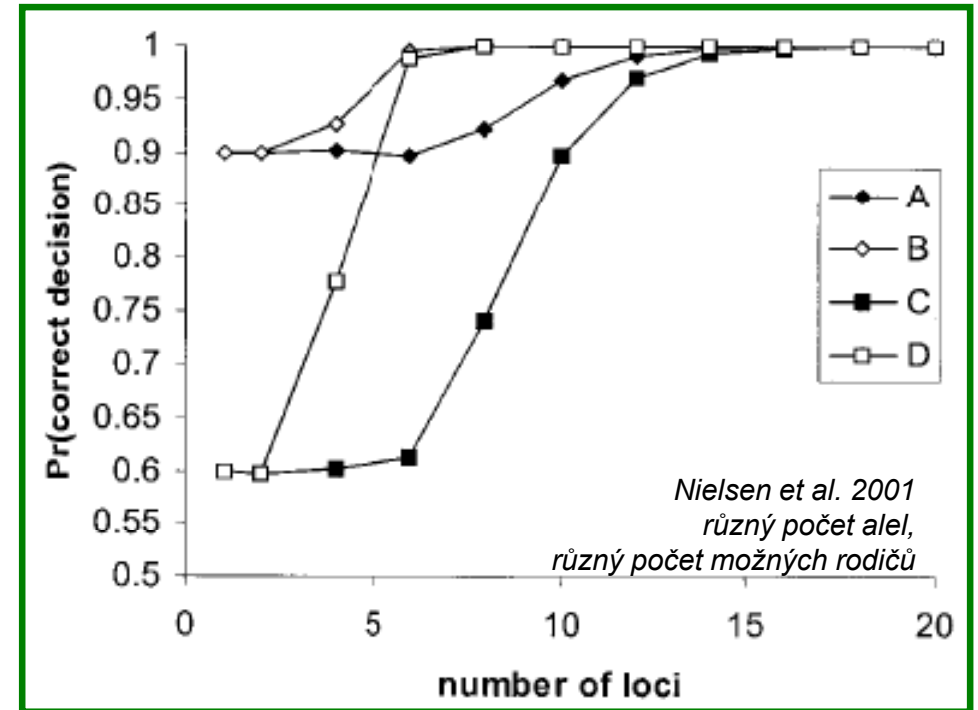


Je možné analyzovat
několik lokusů
najednou.



Kolik je třeba lokusů?

- Nutný počet není absolutní
- Dáno:
 - ✓ počtem alel
 - ✓ heterozygotností
 - ✓ četností alel
 - ✓ velikostí vzorku
- ideální - hypervariabilní lokusy stačí třeba jen 3



- Tedy nejdříve je nutná **pilotní studie dospělců** v populaci
- → výpočet **Exclusion probability**

Exclusion probability

- Pravděpodobnost, že genotyp náhodně vybraného jedince nebude pasovat na potomka
- Závisí na počtu lokusů a alel
- Jiné hodnoty pro prvního a druhého rodiče
- Dobré jsou hodnoty okolo 0,99
- Vypočítá například Cervus

Exclusion - complications

- Mendelian rules of inheritance: genotyping errors, null alleles, mutations → false exclusions in strict conditions
- Extended family structure (příbuznost potenciálních rodičů) – nejhorší jsou sourozenci
- Linked loci – decrease of variation
- Loci on sex chromosomes
- problems increase with increasing number of individuals and loci
- very useful for experiments where all possible parents are known

Mutace

Ibarguchi et al. 2004

- Obvykle se zanedbávají
- Mohou však být i poměrně časté – vysoká mutační rychlost mikrosatelitů (4.5×10^{-2} - 5.1×10^{-6} na lokus)
- Navíc častější u samců (2 až 6x)
- → Vyloučení na základě jednoho lokusu může být špatně !!!

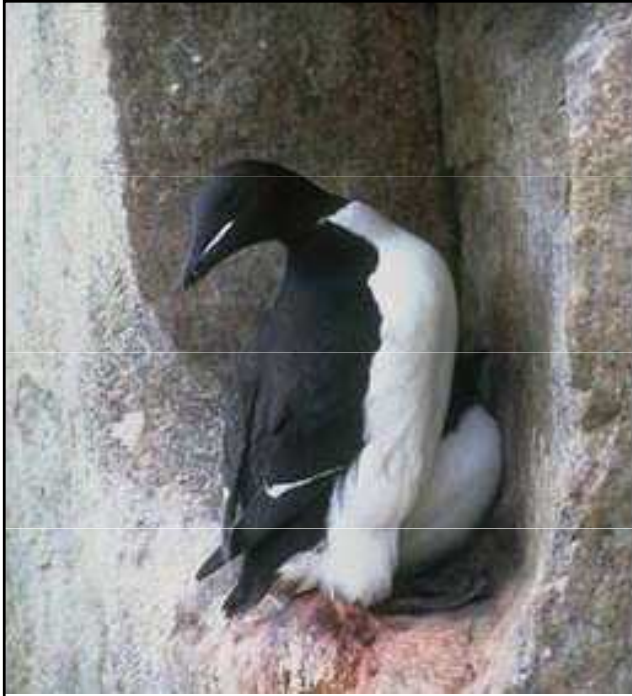
Řešení

- Použít více lokusů
- Probability of resemblance (P_R)

Podívám se na ostatní lokusy a vypočítám s jakou pravděpodobností mohou alely sdílet dva nepříbuzní jedinci.

$$P_{R_s} = (2p_s - p_s^2)^2$$

$$P_{R_{All}} = \prod_r (P_{R_{s_r}}).$$



Uria lomvia

Ibarguchi et al. 2004



- **22%** mimopárová paternita bez korekce na mutace
- **7%** mimopárová paternita s korekcí soulad s jinou použitou technikou

Categorical x fractional likelihood

- likelihood scores derived from progeny and nonexcluded parents genotypes
- **Categorical I.:** potomek jako jednotka přiřazen otci, biologicky validní
- **Fractional I.:** potomek přiřazen všem kompatibilním otcům. Statisticky přesnější a proto někdy výhodnější (f.e. better for comparing the reproductive success of different categories of males)

Categorical allocation

- 1) identifying one parent when the other is known
- 2) identifying one parent with no information about the other parent
- 3) identifying a parental pair starting with no prior information

Fractional allocation

- assigns some fraction (between 0 and 1) of each offspring to all nonexcluded candidate parents
- the portion of an offspring allocated to a particular candidate parent is proportional to its likelihood of parenting the offspring compared to all other nonexcluded candidate parents



*Megaptera
novaeangliae*

Nielsen et al. 2001



- Až 25 samců se pokouší pářit se samicí
- Různé role samců - dominantní společník a vyzyvatel, sekundární společníci
- 6 mikrosatelitových lokusů
- Fractional likelihood paternity method
- Dominantní samci mají asi 3x více mláďat (je to ale neprůkazné)

Categorical and fractional likelihood - disadvantages

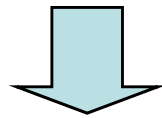
- male's likelihood of paternity is positively related to his **homozygosity** (homozygotes have higher likelihood to have the same allele with the progeny) → be careful when estimating variance in reproductive success
- **categorical** – overestimate the reproductive success of homozygotes and underestimate that of heterozygotes
- **fractional** – a priori equal probability of paternity (required by the technique) underestimates variance in reproductive success

Genotypic (parental) reconstruction

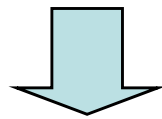
- reconstruction of parental genotypes from progeny arrays of full- or halfsibs
- exhaustive algorithm
- extremely computationally intensive
- most often in fish parentage

Choosing the method

- sampling of unknown parents (all, some, none)
- sampling large groups of full- or halfsibs (yes, no)
- a priori known parents (both, one, neither)

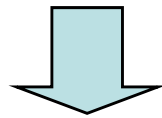


preferred technique



no sufficient markers

alternative technique



choosing computer program

Počítačové programy

- Cervus, Newpat, Probmax, Kinship, Famos, Papa, Parente, Patri, Gerud
- available online – see Jones & Ardren (2003)
- the most important differences – handling sources of difficulty (null alleles, mutations, scoring errors)

Co je nejdůležitější?

- Kvalitní data z terénu!
- Nejlépe všichni dospělci z populace, behaviorální a jiná fenotypická data, mláďata přiřazena do rodin (matka + sociální partner)
- Špatná data = špatné výsledky

Stane se, že nemohu získat vzorky všech dospělých jedinců z populace (potenciálních rodičů) nebo nelze říci, která mláďata jsou z jedné rodiny

- Nemusí se zdařit najít rodiče všem potomkům
- I tak ale mohu zjistit ledacos zajímavého (multiple paternity)

Příklad

genotypy matky a embryí

	lokus 1		lokus 2	
Matka	100	150	300	350
1. embryo	100	115	300	320
2. embryo	150	120	350	310
3. embryo	120	100	350	365

Alely od matky

	lokus 1		lokus 2	
Matka	100	150	300	350
1. embryo	100	115	300	320
2. embryo	150	120	350	310
3. embryo	120	100	350	365

Na druhém lokusu více **než dvě alely**,
které nejsou od matky → více otců

... nebo mutace – data nutno korigovat – viz *Uria lomvia*

Apodemus agrarius

mláďata až od tří samců



- „Multiple paternity“ závisí na sezóně (populační hustotě dostupných samců?)
- v létě již prakticky neexistují vrhy zplozené jedním samcem
 - výrazné mezidruhové rozdíly v rámci rodu *Apodemus*



Orangutan na Sumatře (paternity)

- Nápadný dimorfismus
(vystouplé tváře a hrdelní vaky u samců)
- Předpoklad:
Samci bez nápadných znaků hormonálně suprimováni a nemnoží se
- Mikrosatelity – 50 % mláďat je od samců bez nápadných znaků → alternativní strategie

L. macrochirus

Lepomis (maternity)



- Samec (bourgeois male) hlídá hnízdo s jikrami
- *L. marginatus*, *L. punctatus*, *L. auritus*
samec má v hnízdě jikry od několika samic
- *L. macrochirus*
tři typy samců (alternativní reprodukční strategie):

bourgeois (> 7 let, staví hnízda)

mladí samci (vjíždějí do hnízd a vypouštějí spermie)

nespárování staří samci (napodobují samice)

20% potomků není od bourgeois

Skladování spermií



Chrysemys picta

- Dny u savců
týdny u ptáků nebo hmyzu
měsíce u mloků
roky u hadů a želv
- *Chrysemys picta*
mikrosatelity → po 3 roky mláďata od stejného otce, opakované páření se stejným otcem je nepravděpodobné

Ptáci

- Řada druhů považována za monogamní (pěvci)
- Ale u 75 % druhů ptáků mimopárová mláďata
- Skutečně monogamní pěvci – jen 14% (*Phylloscopus*)



Sialia sialis

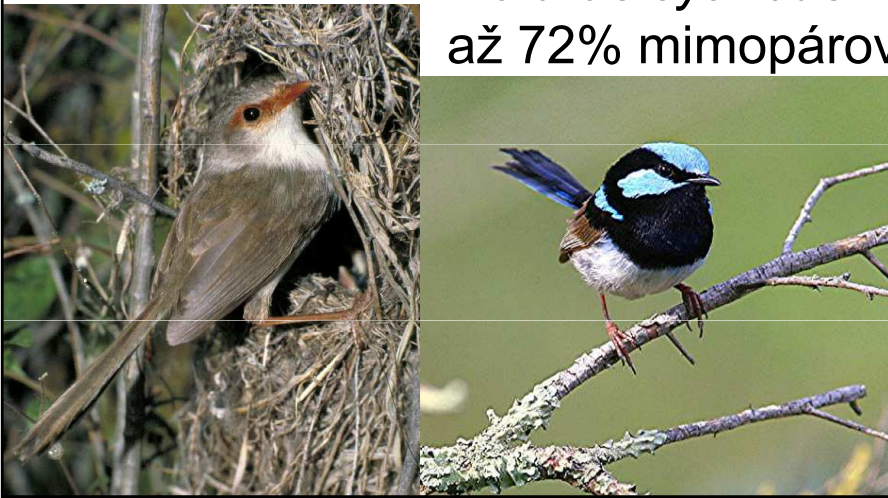
8-35 % mimopárových mláďat

Emberiza schoeniclus

až 55% mimopárových mláďat

Malurus cyaneus

až 72% mimopárových mláďat



Odhad % mimopárových mlád'at

- Dostatečný vzorek pro odhad
- Více než 200

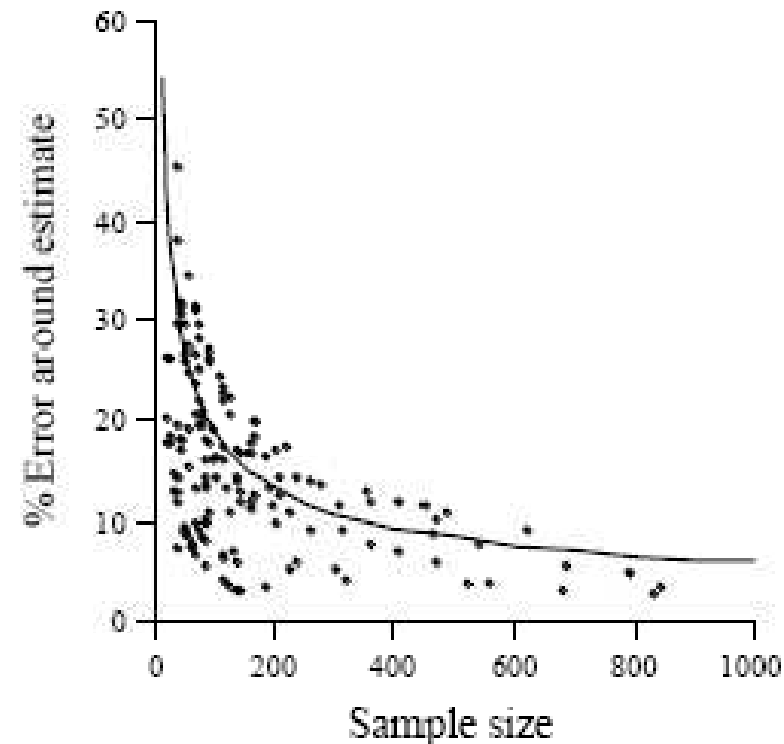


Fig. 2 The magnitude of error around actual estimates of EPP levels against the sample size of those studies. '% error' on the vertical axis refers to the magnitude of the difference between the upper and lower 95% confidence intervals around an estimate. The line plotted is this '% error' for a hypothetical population with a rate of 15% EPP across different sample sizes.



Photo Tavi Grepp

Halichoerus grypus

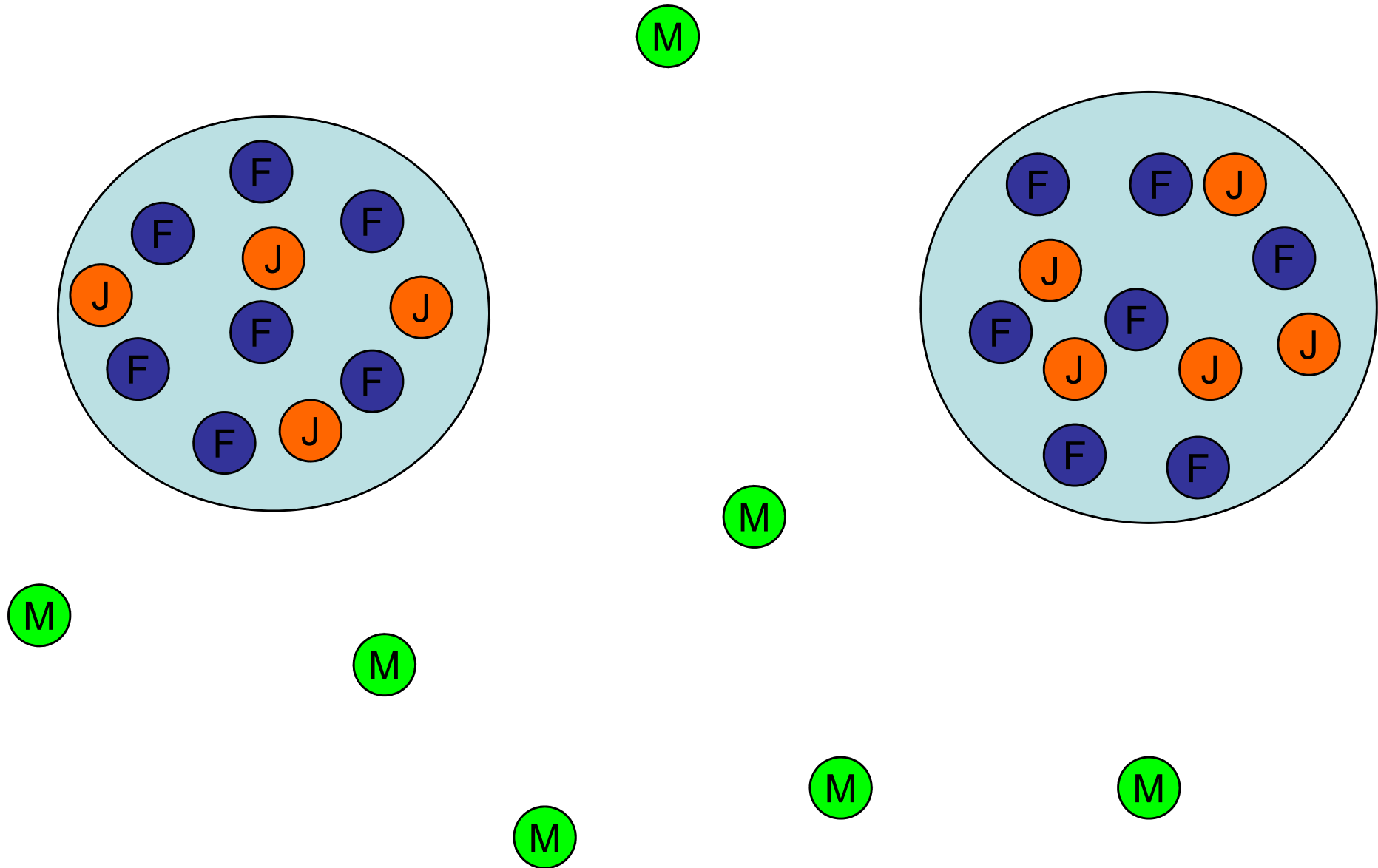
tuleň kuželozubý

Wilmer et al. 1999

- Kolonie, dimorfismus → polygynie
 - Dvě skotské kolonie North Rona a Isle of May
 - Vzorky ze zhruba deseti let
 - 9 mikrosatelitových lokusů
 - IDENTITY, NEWPAT, CERVUS
-
- Samci z centra kolonie úspěšnější (až 30x)
 - Samci reprodukčně aktivní 10 let i déle
 - Pro více než polovinu mláďat nenalezení otci → role páření ve vodě



Příklad: Maternita a paternita u netopýrů



Pipistrellus nathusii – jižní Čechy (Jahelková, Hulva, Bryja)