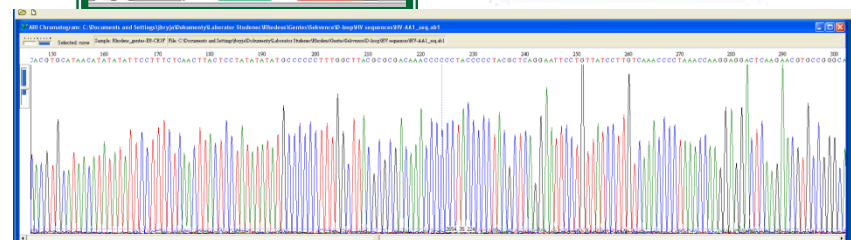
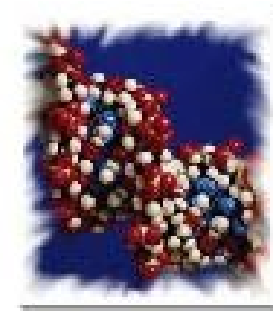
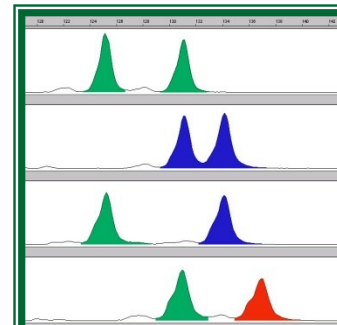
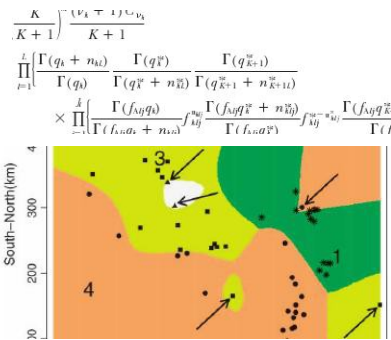
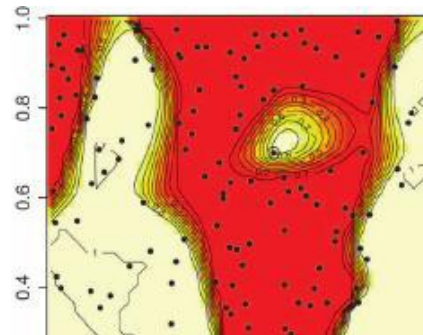
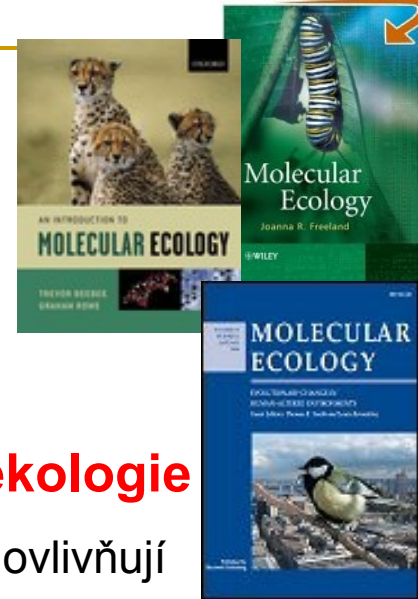


Ochranářská genetika

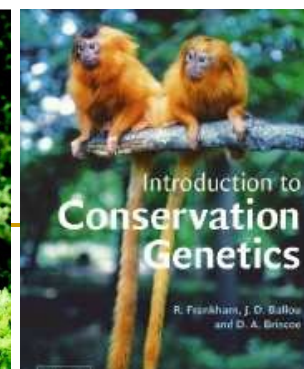
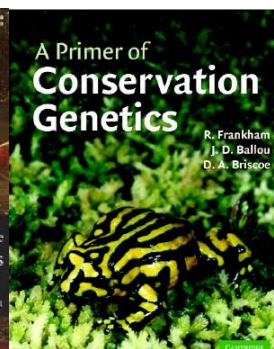
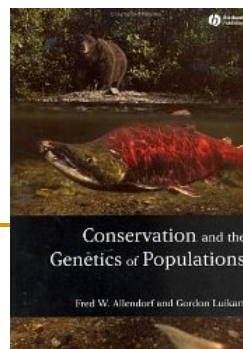
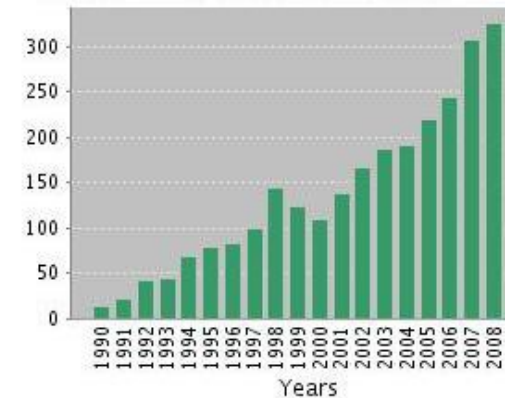
Význam genetické variability pro efektivní druhovou ochranu



Ochranářská genetik („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 genetik**
- PCR (90. léta) – počátek skutečné ochranářské genetiky (neinvazivní metody - již není potřeba destruktivního vzorkování)
- od r. 2000 - Conservation Genetics
- recentní review a knihy



Obsah přednášky

- Úvod – proč studovat genetickou variabilitu volně žijících druhů
 - Metody ochránářské genetiky
 - Aplikace na různých úrovních genetické variability
 - Současné nedostatky a budoucnost ochránářské genetiky
-

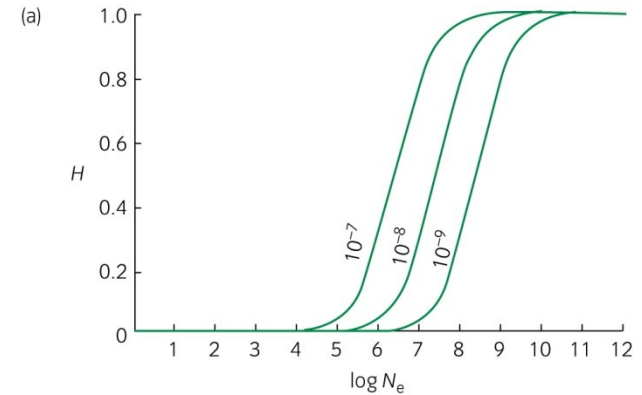
PROČ JE VŮBEC GENETICKÁ
VARIABILITA DŮLEŽITÁ ?

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.)

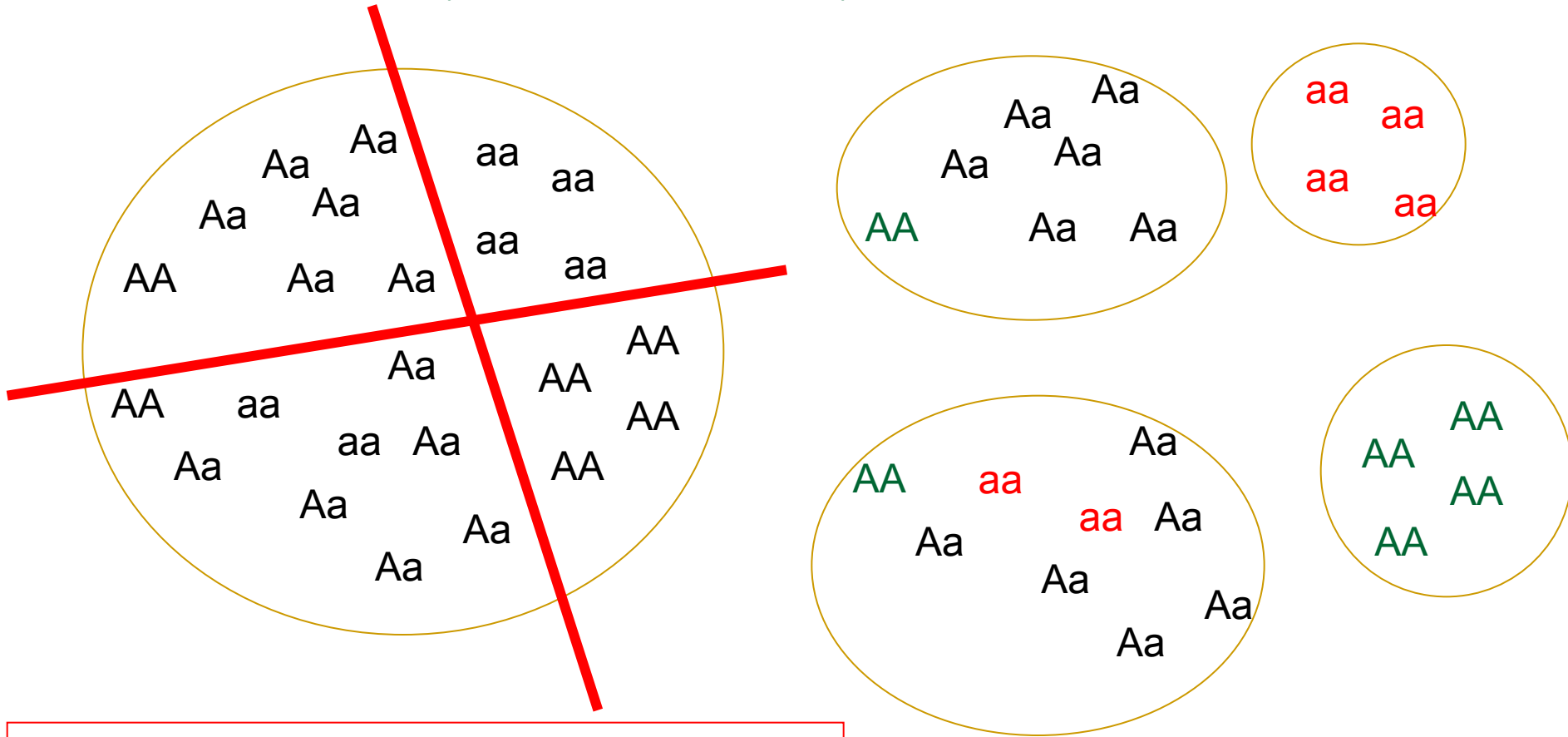


$$H_e = 4N_e\mu / [4N_e\mu + 1]$$

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

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

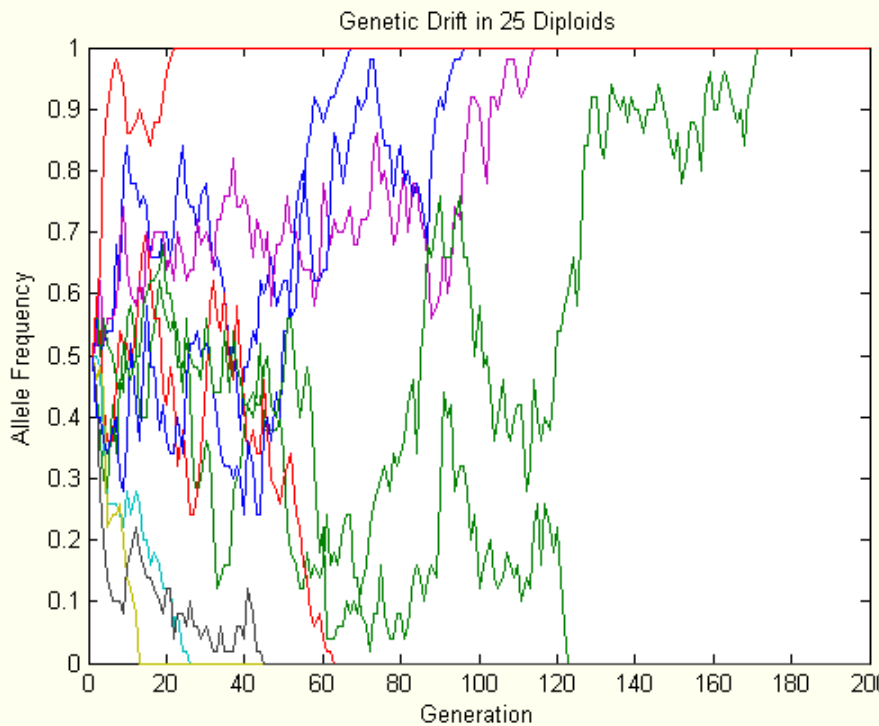
Genetický (náhodný) drift



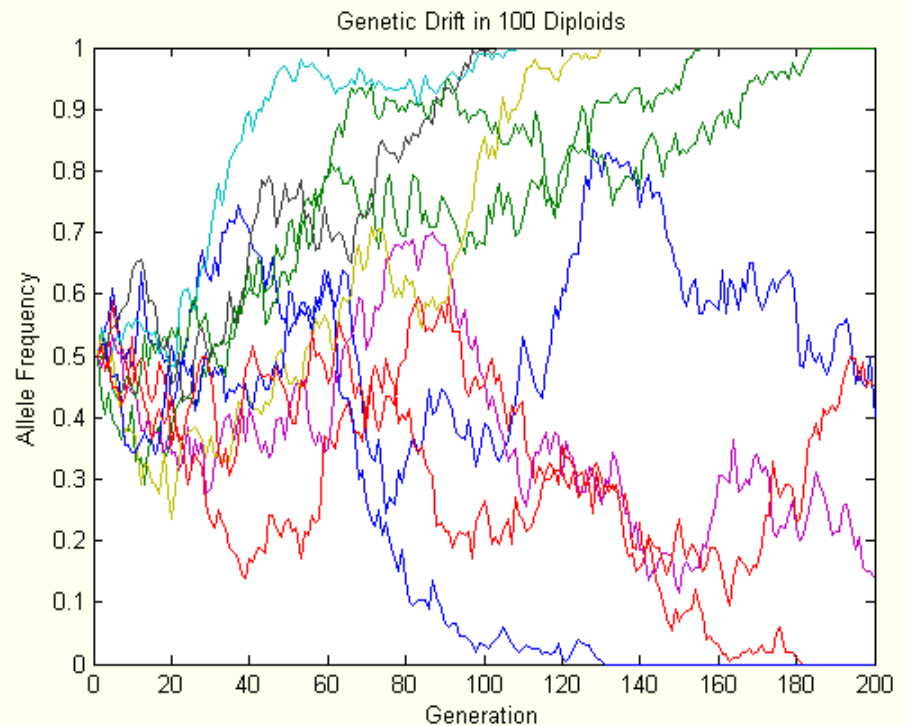
Bariéra toku genů, např. fragmentace biotopů

Snížení H_e a N_e

Intenzita driftu závisí na velikosti populace



25 jedinců



100 jedinců

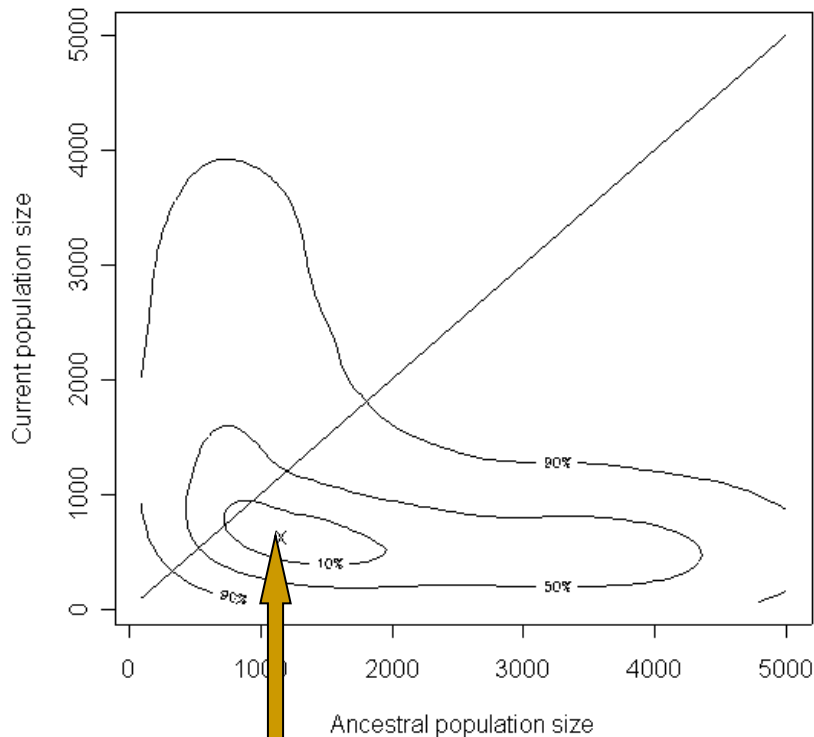
POČÍTAČOVÉ SIMULACE

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 N_0

N_A – ancestral N_e
 N_0 – recent N_e

- testuje i rozdíly N_A a N_0
- 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

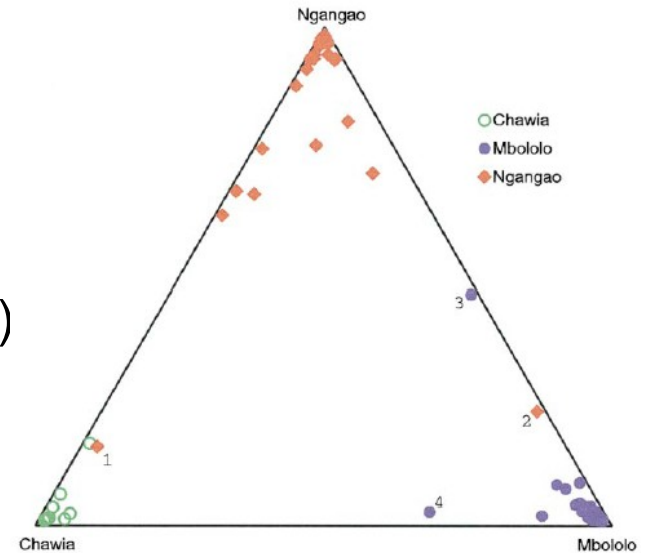
- 1) **Populační genetika** – efektivní velikost populace, tok genů, „bottleneck“, příbuznost, atd. ... neutrální variabilita (např. mikrosatelity)
 - 2) **Fylogeografie** – historický původ populací a jejich fylogenetické vztahy, ESU ... většinou neutrální variabilita
 - 3) **Speciální přístupy** –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

1) Populační genetik

- 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



Genetická struktura populací

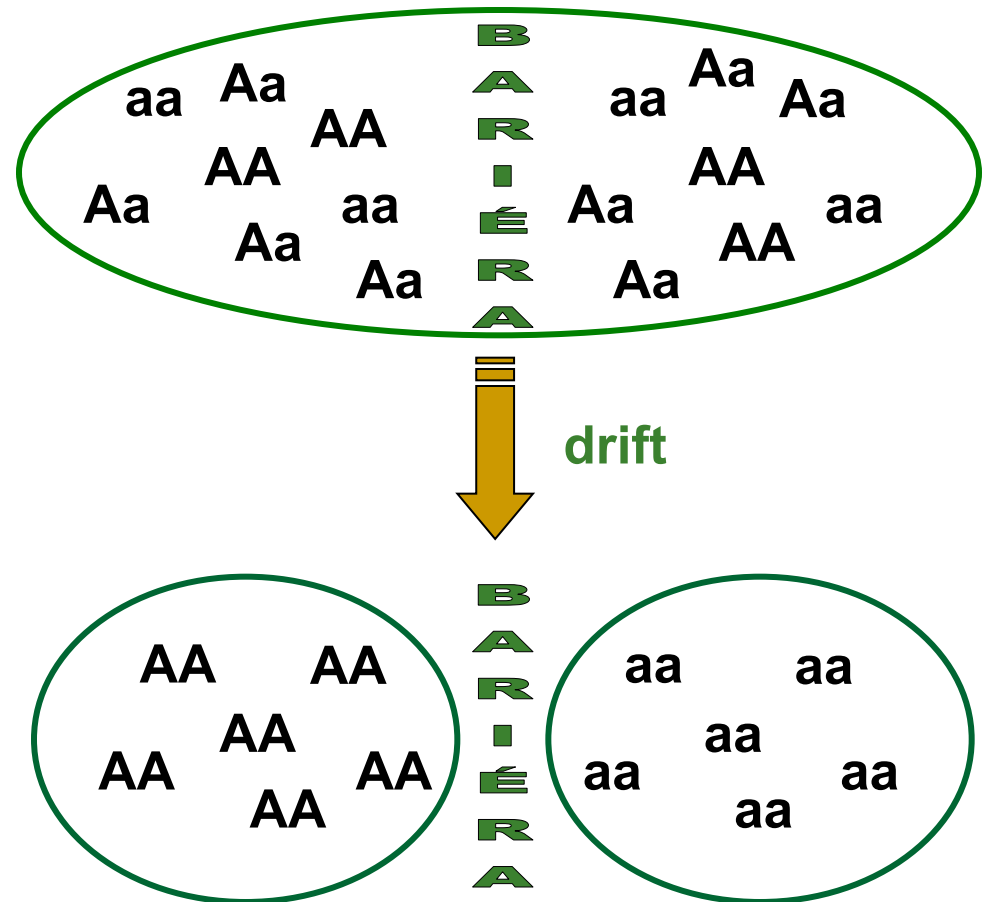
drift, mutace a migrace

■ Drift

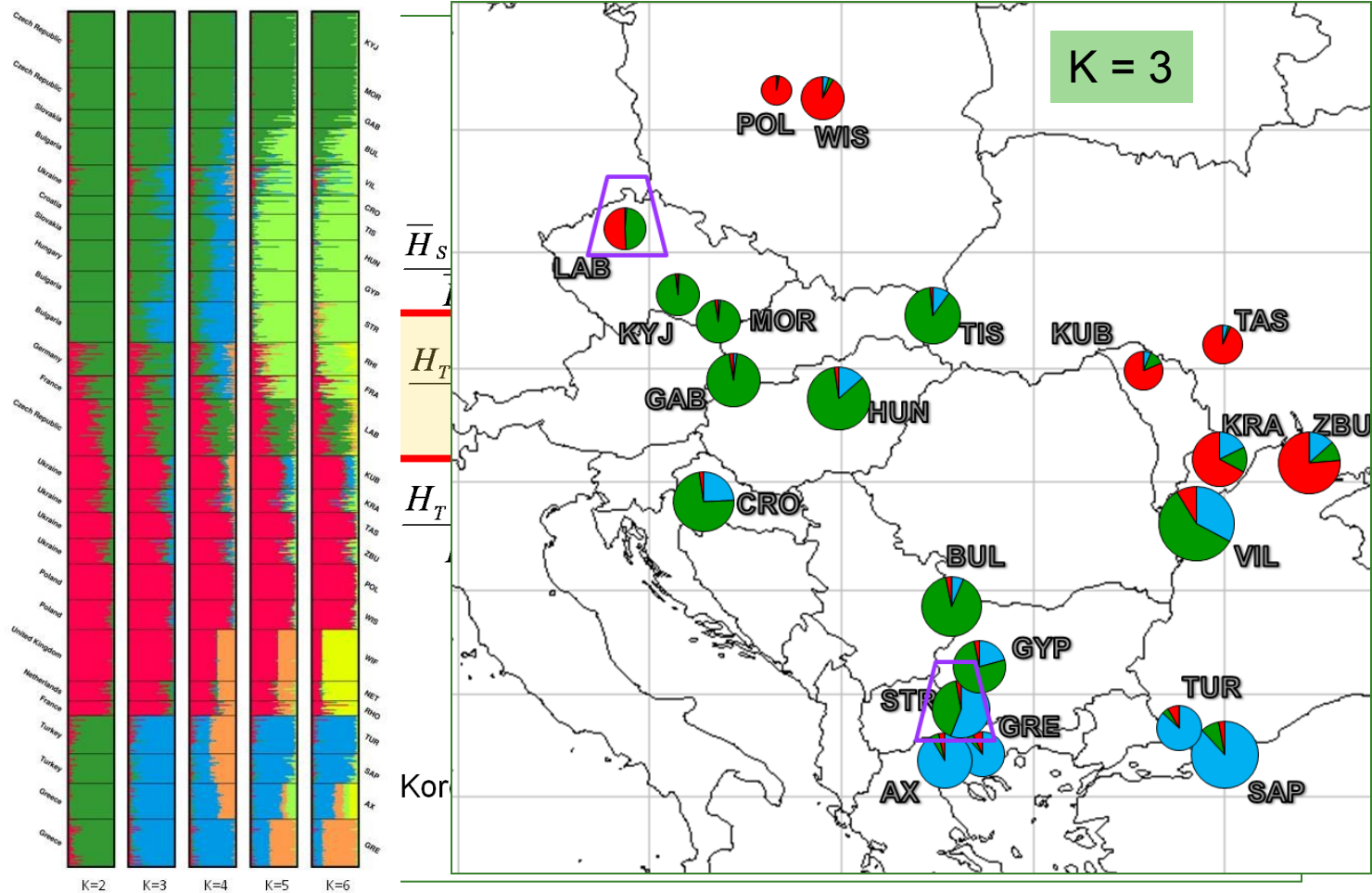
→ diferenciaci subpopulací díky fixaci alternativních alel

■ Mutace

mohou zvýšit diferenciaci (odlišit subpopulace) ale riziko homoplázií

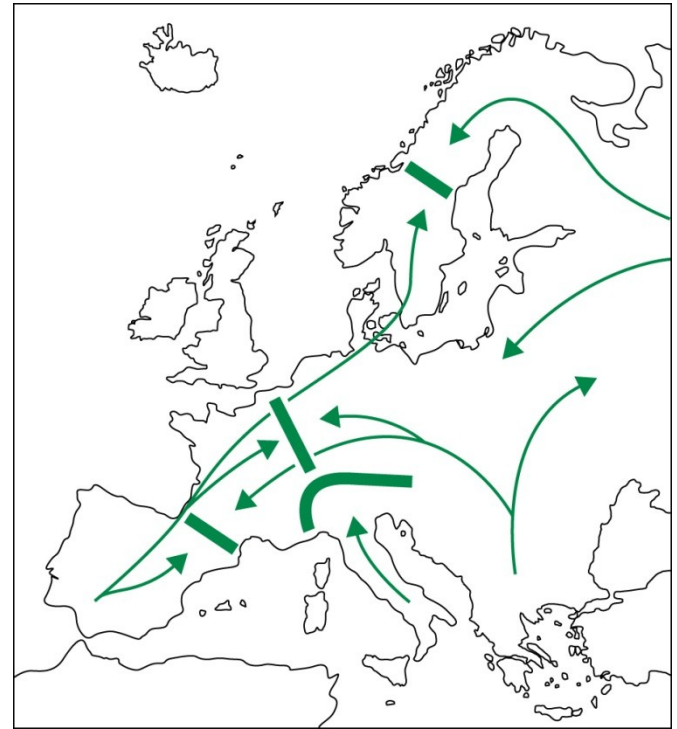


Stanovení ESU („evolutionary significant units“) a MU („management units“)



2) Fylogeografie

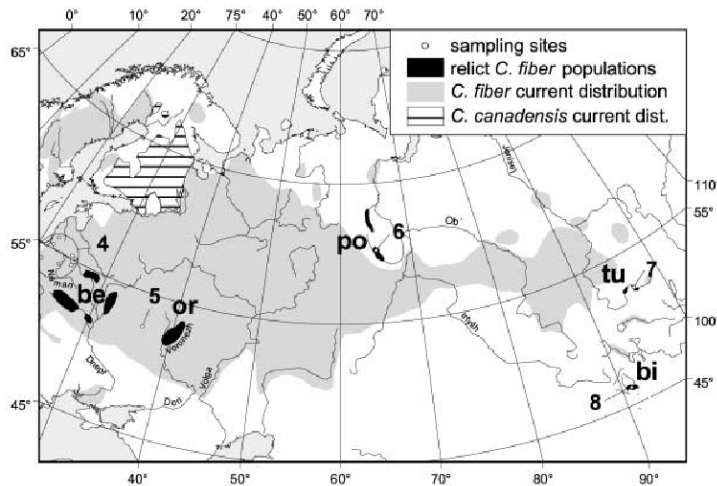
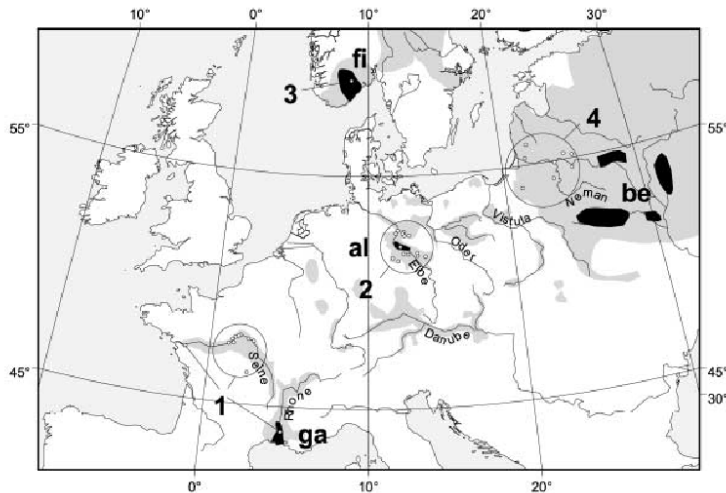
- použití fylogenetických metod na úrovni populací (nejčastěji sekvence mtDNA, jaderné markery jsou málo polymorfní)
- původ populací, jejich stáří a historické vazby
- detekce ESU („evolutionary significant units“) – lokální adaptace (mohou, ale nemusí)
- důležité pro reintrodukce



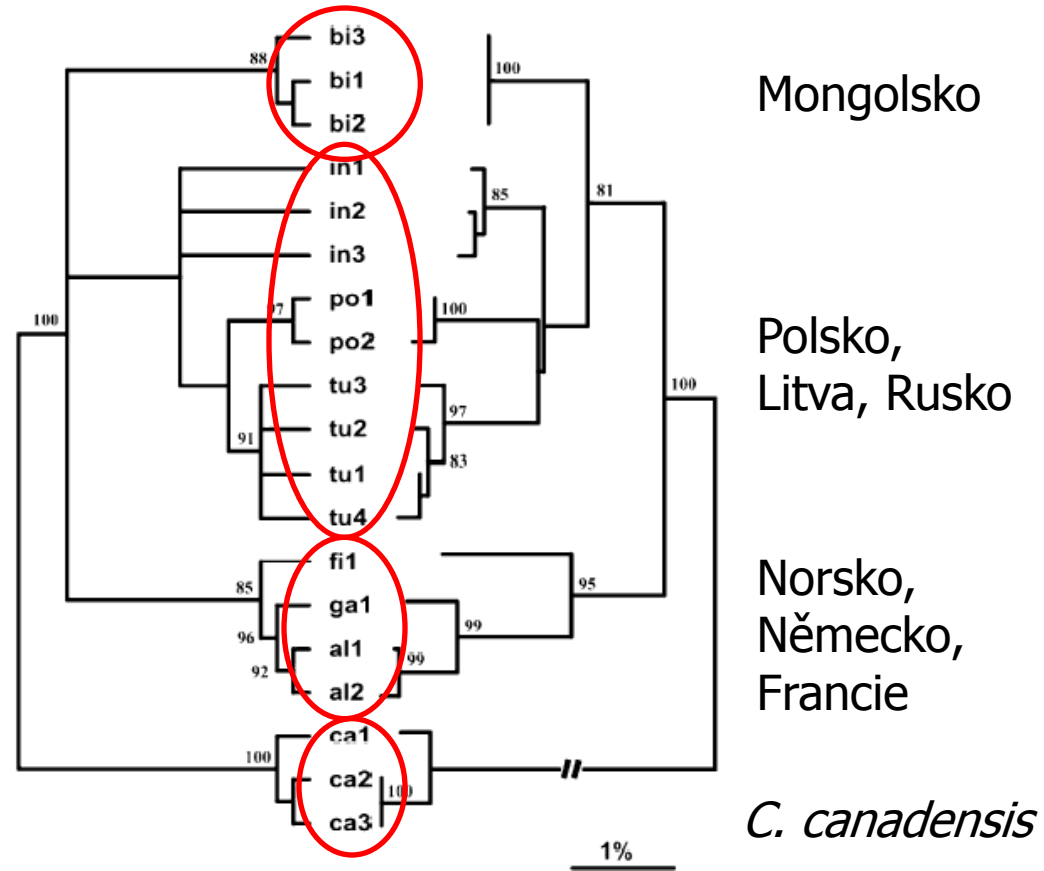
Př. Směry šíření z glaciálních refugií

Příklad: *Castor fiber*, sekvence CR mtDNA

Durka et al., Mol.Ecol, 14: 3843-3856 (2005)



ESU, MU (spolu s populační genetikou)



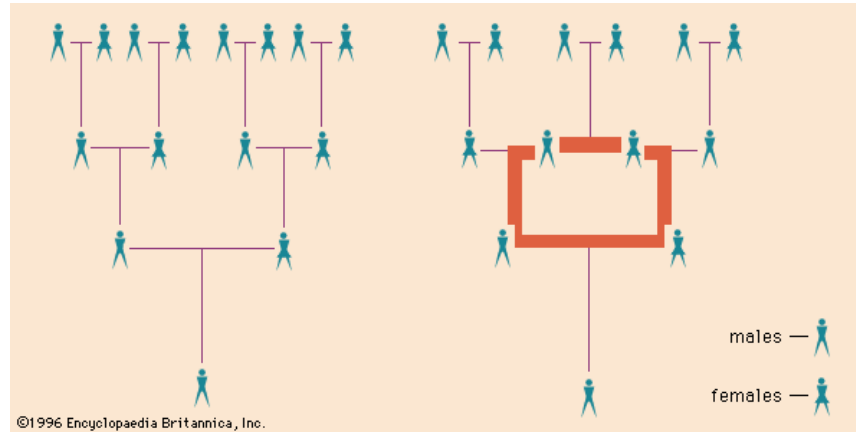
Fylogeografie

3) Speciální přístupy

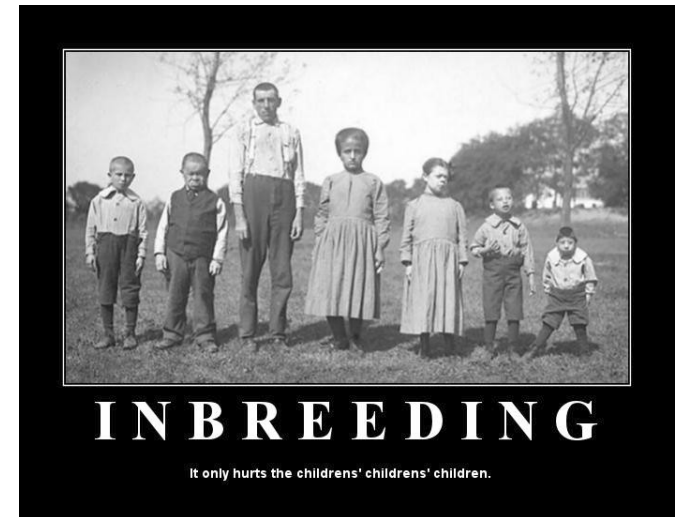
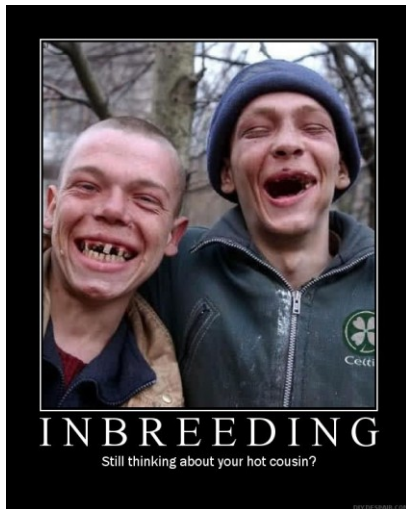
- škodlivá (detrimental) variabilita – detekce inbrední deprese
- identifikace adaptivní variability – lokální adaptace
- experimentální ochranářská genetika (zejména hmyz a rostliny)
- neinvazivní genetické metody

Příbuzenské křížení - inbreeding

„outbreeding“



„inbreeding“



Příbuzenské křížení - inbreeding

A: zdravá forma genu

a: forma genu způsobující nemoc

Možné genotypy: AA Aa aa

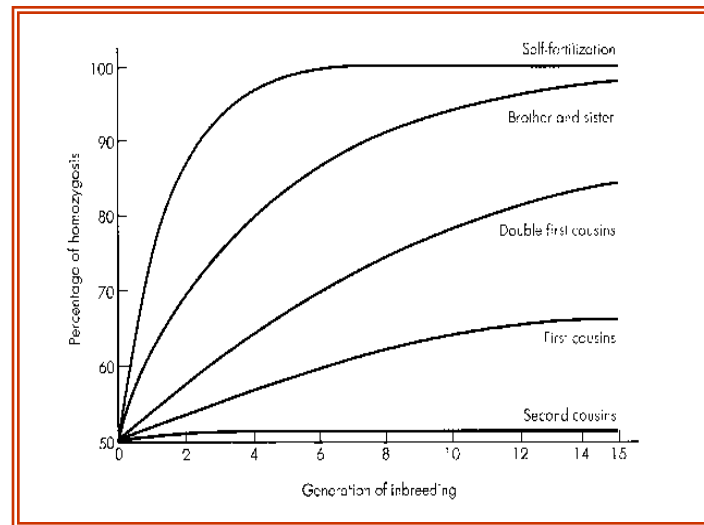
- Nárůst proporce homozygotů (odchylky od HWE) - efekt škodlivých recesivních alel



Outbreeding: AA Aa Aa aa

Inbreeding: AA AA aa aa

- Nárůst proporce homozygotů je výrazný v malých populacích



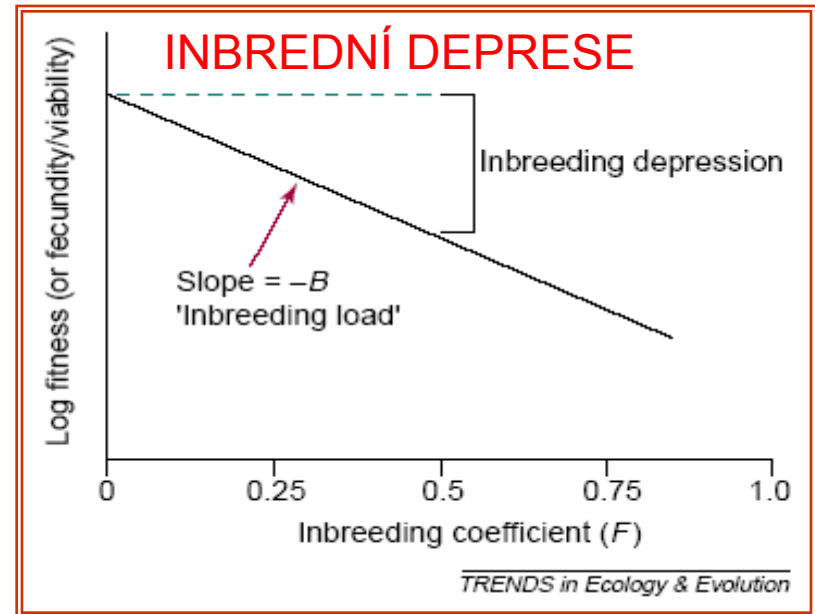
- samooplození

- bratr a sestra

- bratranec a sestřenice

Inbreeding a fitness

- Inbrední jedinci mají nižší fitness v důsledku recesivních genetických poruch (reprodukční úspěch nebo schopnost přežít)



OCHRANÁŘSKÁ GENETIKA

Stanovení intenzity inbreedingu a inbrední deprese v přírodních populacích

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

„Bottleneck“ efekt

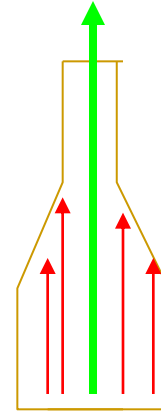
- Druhy s výrazným snížením genetické variability - prošly „hrdlem lahve“
- gepardi - snížení genetické variability o více než 90 %
- přesto se počty výrazně zvedly
- „**purging**“ – odstranění škodlivých alel v důsledku zvýšené selekce na homozygoty

1. Inbreeding: AA AA aa aa

2. Selektce: AA AA ~~aa~~ ~~aa~~

3. „Purging“: AA AA

Extrémně výjimečné případy



Acinonyx jubatus



Mirounga angustirostris

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

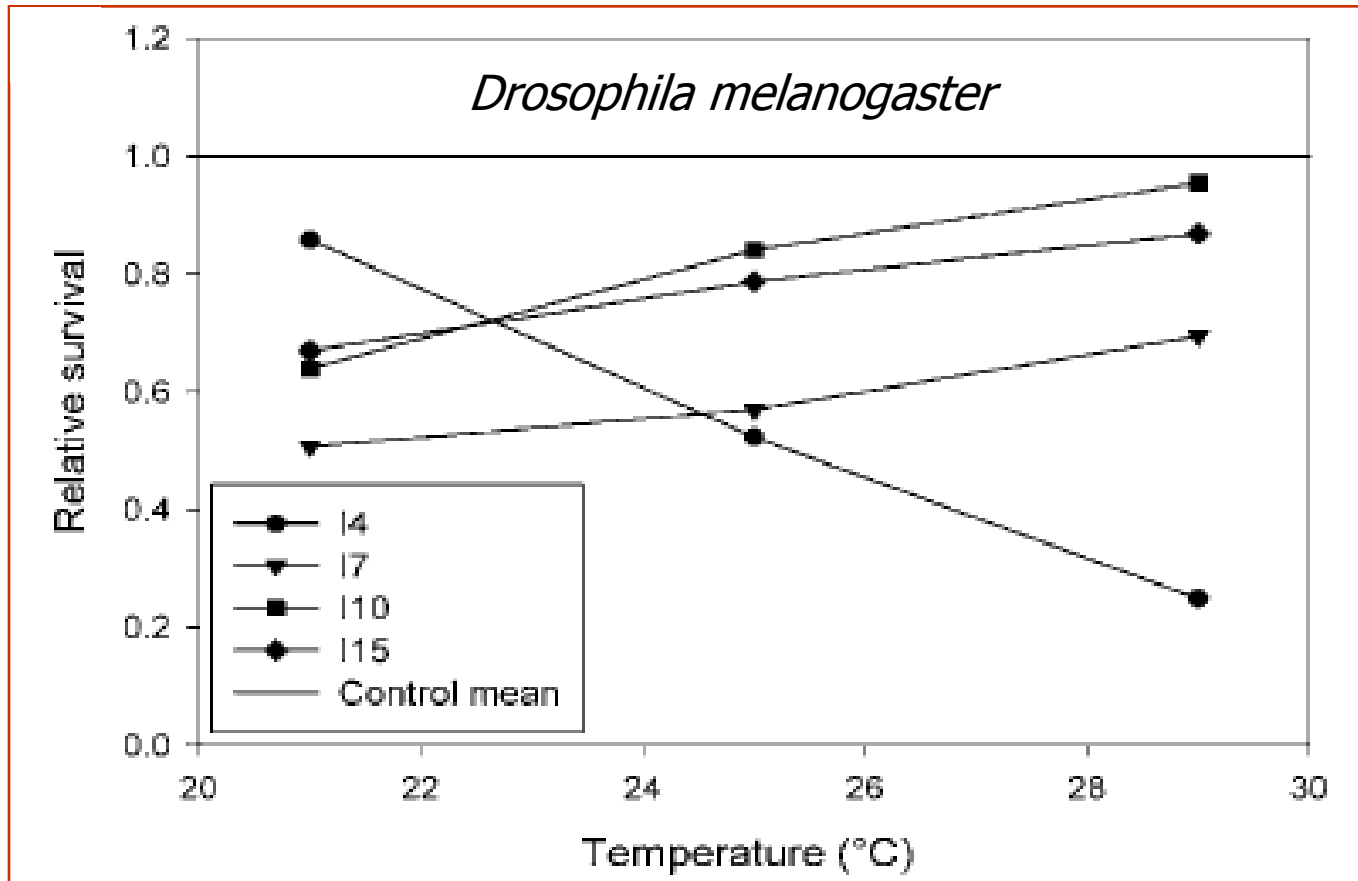


NEMÍCHAT HODNĚ VZDÁLENÉ POPULACE !!!

Experimentální ochránářská genetika

- 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

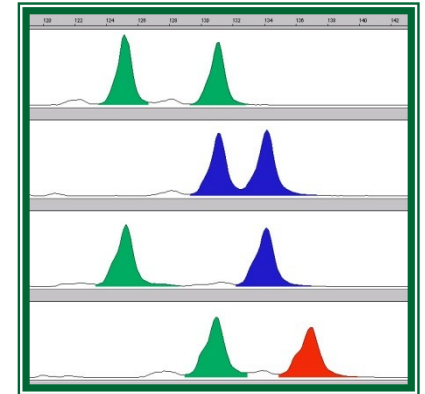


Vermeulen and Bijlsma, Heredity 2004

METODY ZÍSKÁVÁNÍ DAT

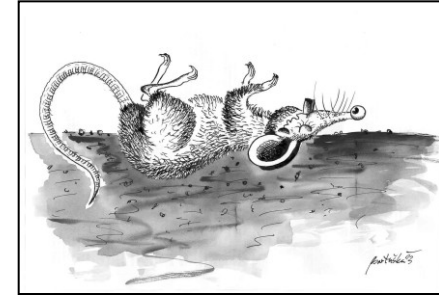
Non-invasive genetic methods in conservation genetics

- 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

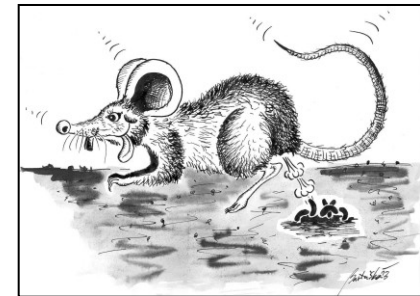


Orig. V. Bartuška

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 („kořínek“)
- speciální lepidlové pasti, ostnatý drát



svišť
medvěd
rys
srnec



Zdroje DNA - peří

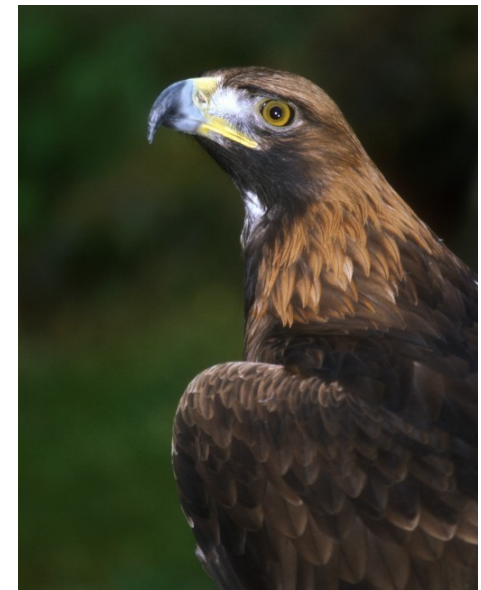
- opět folikul – „kořínek“ jednotlivého pera
- lepší vytržené pero (= pasti) než vypelichané pero (často velmi staré)



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“

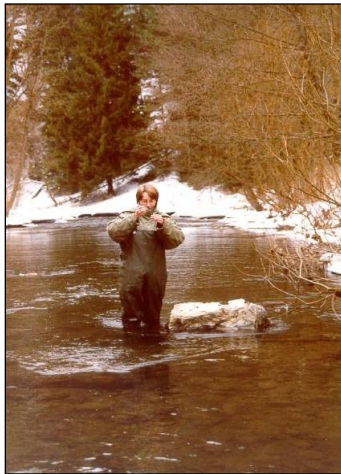


- krevsající ploštica *Triatominae* (Heteroptera)
- hodnocení úrovně stresu
- použitelná jako „méně invazivní“ metoda v ochranářské genetice



Becker et al. 2006

Postup analýzy DNA, např. ze vzorků trusu



vzorkování čerstvého (≤ 18 hod.) materiálu

(96% etanol, SilicaGel aj.)



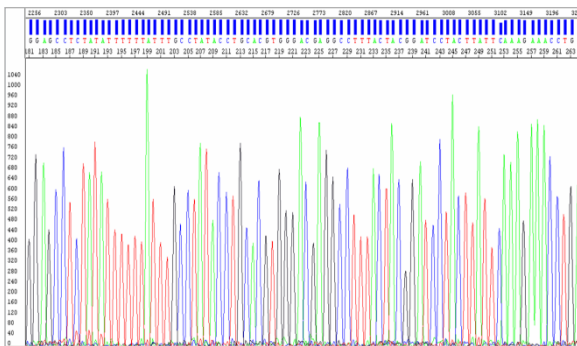
izolace DNA

(komerční kity pro vzácnou DNA)

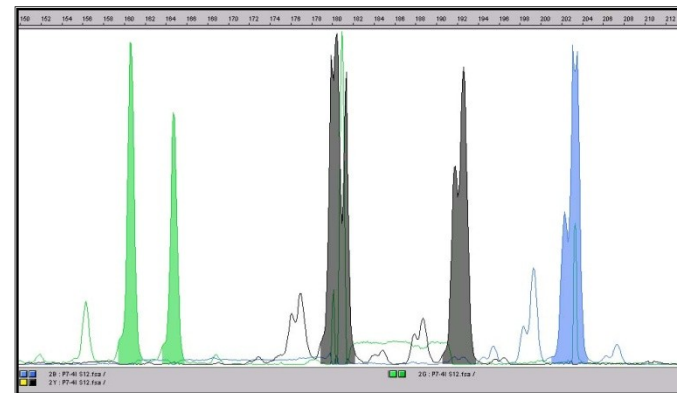


PCR (vysoce kvalitní enzymy)

- 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

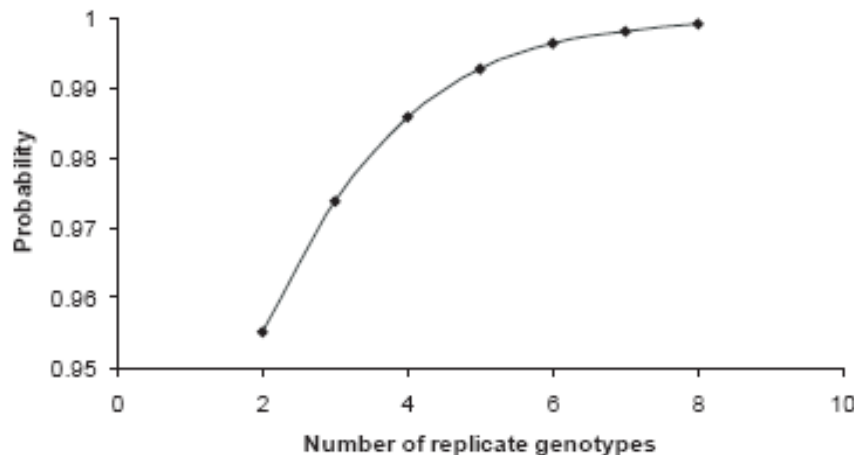
Increase of genotyping success rate

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



Dolphins - tissues vs. fresh faeces

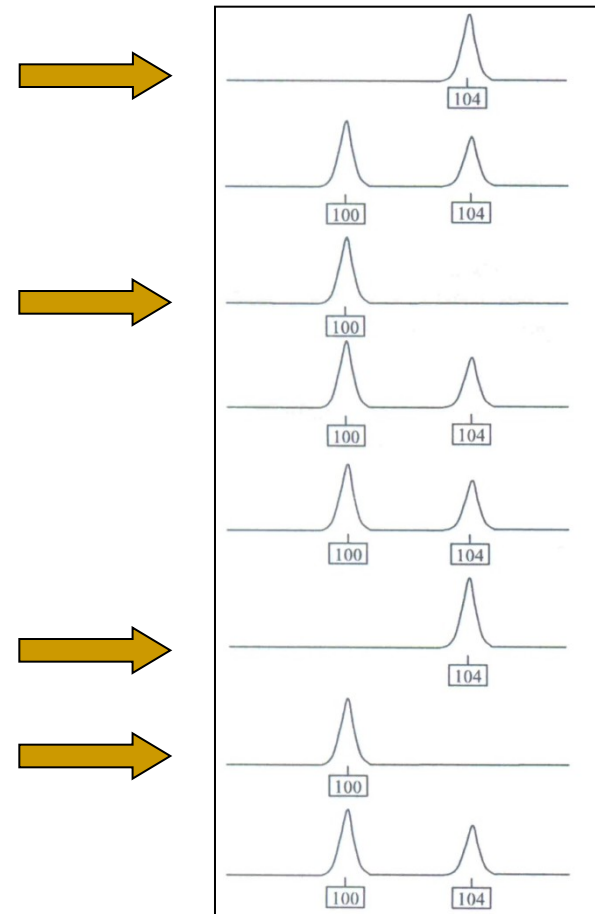
100% probability of obtaining at least two correct genotypes when analysing 8 samples



(Parsons 2001)

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

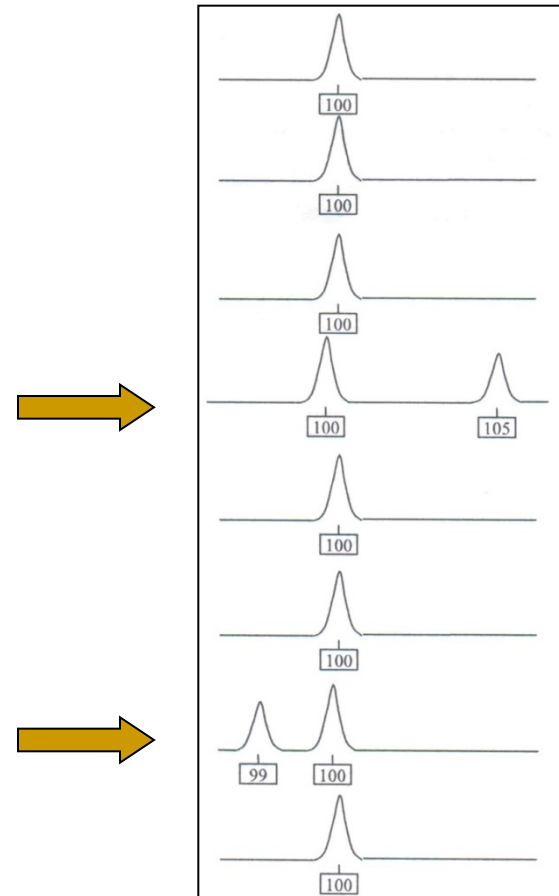


gorilla

x



Clostridium



Homozygote 100/100
(8 different PCRs)

Zvýšení koncentrace DNA

- pre-amplifikace (Bellemain & Taberlet 2004)

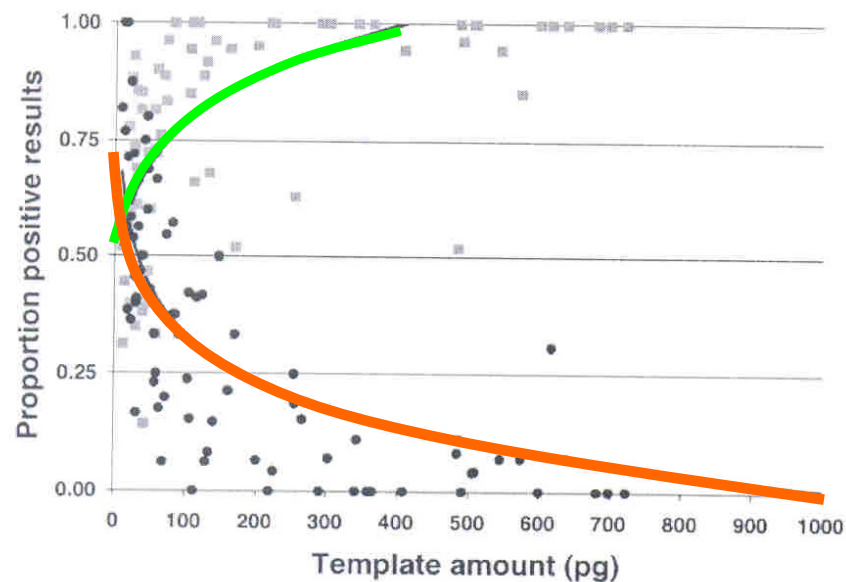


Multiplex preamplifikace
všech lokusů – zvýšení
koncentrace
mikrosatelitové DNA



Semi-nested PCR pro 1-3
lokusy

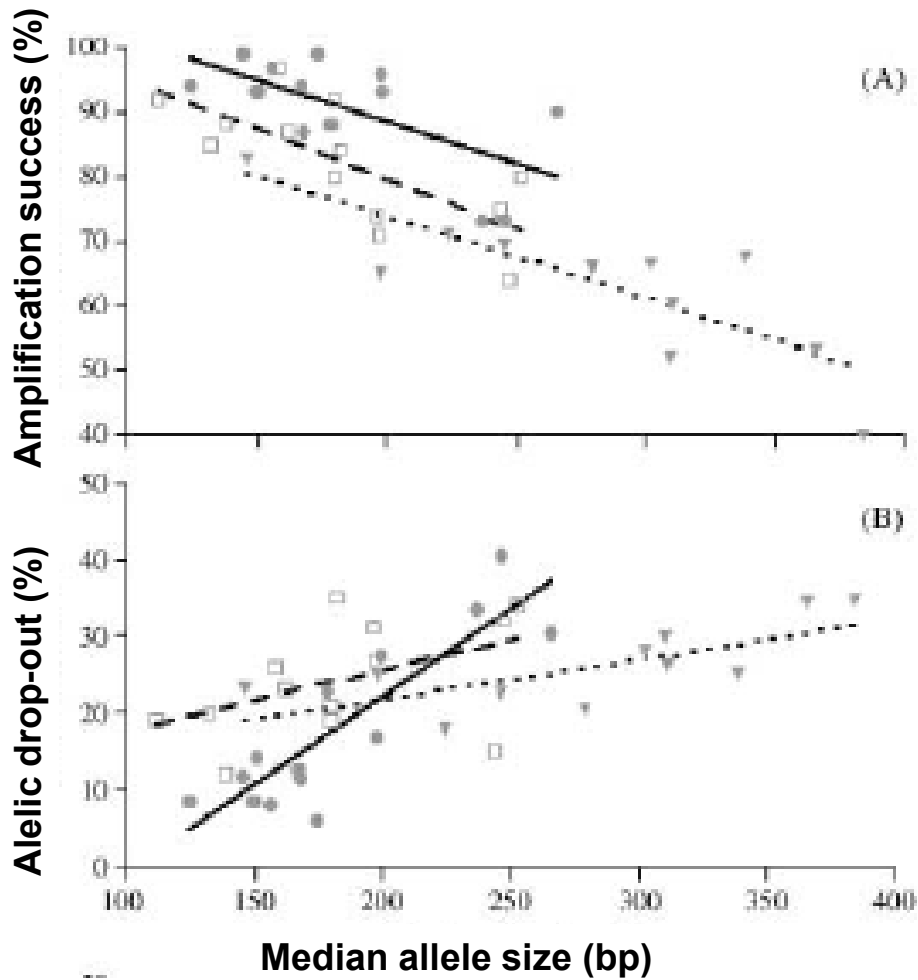
- qPCR (Morin et al. 2000, Zemanová et al., submitted)



Positive PCR Allelic dropout

Genotypizace pouze „dobrých“ vzorků

Effect of locus



(Buchan et al. 2005)

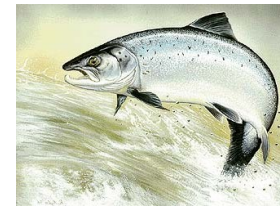
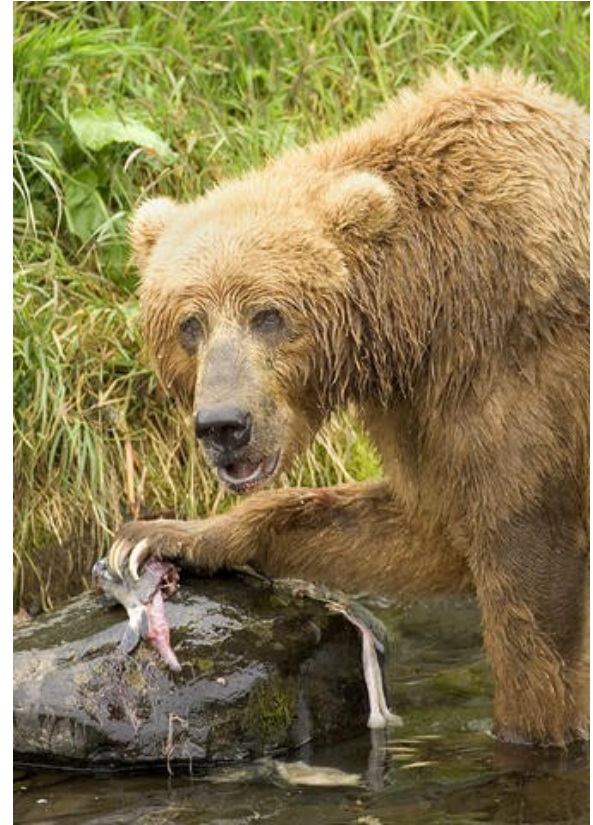


Degraded DNA → amplification of **short fragments** is preferred

Disadvantages and their solution

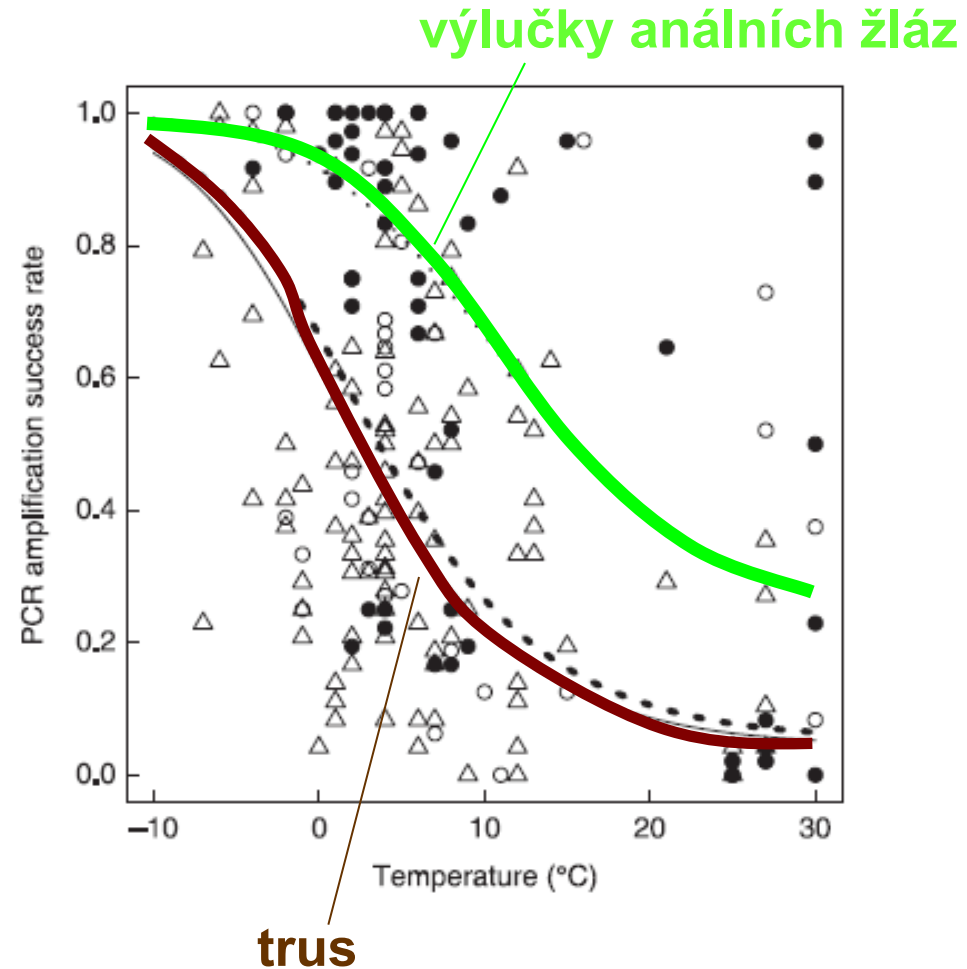
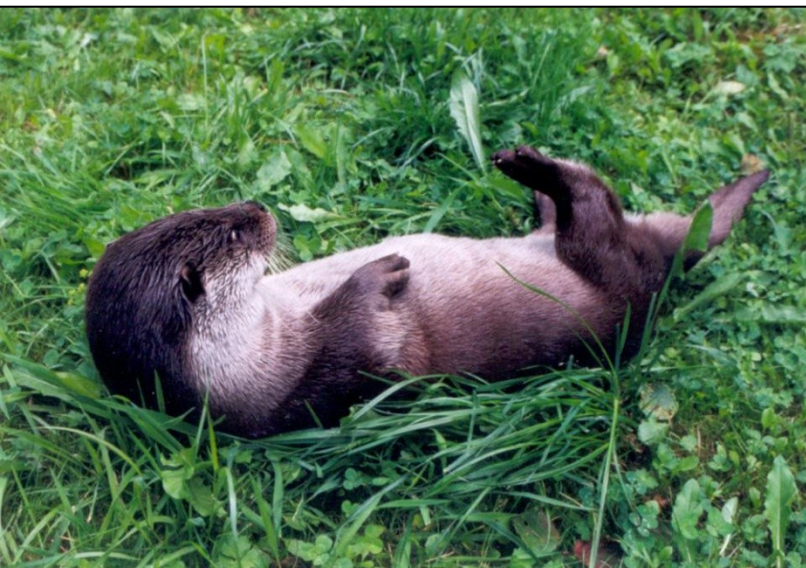
Influence of diet on faecal DNA amplification

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



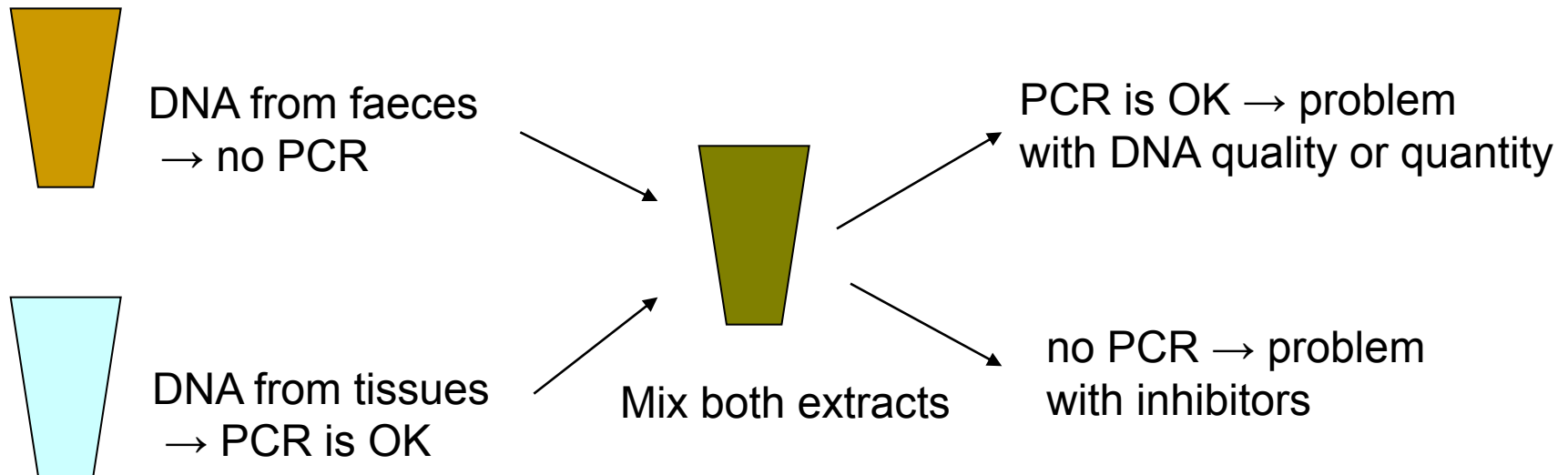
Vliv typu vzorku a teploty

- 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.



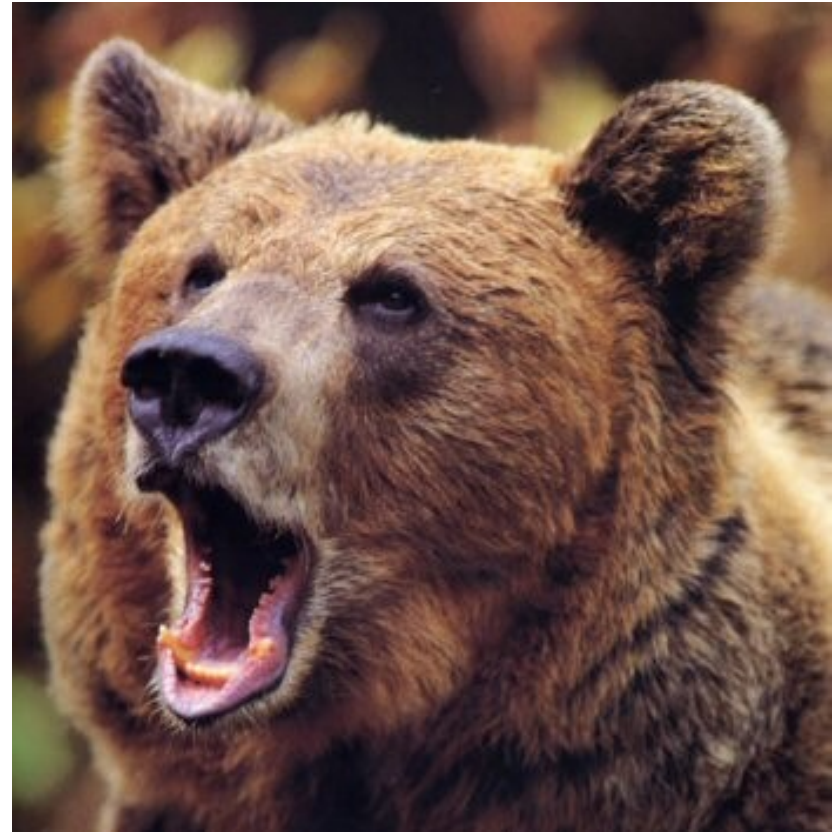
High contamination risk

- 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

Identifikace druhů - „DNA barcoding“

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



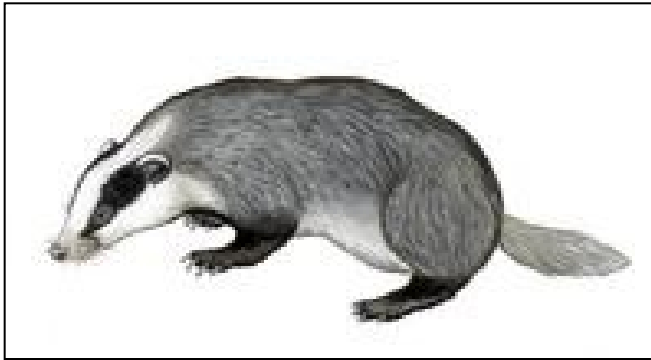
Forenzní analýzy

- 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 bělohřdlý (*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

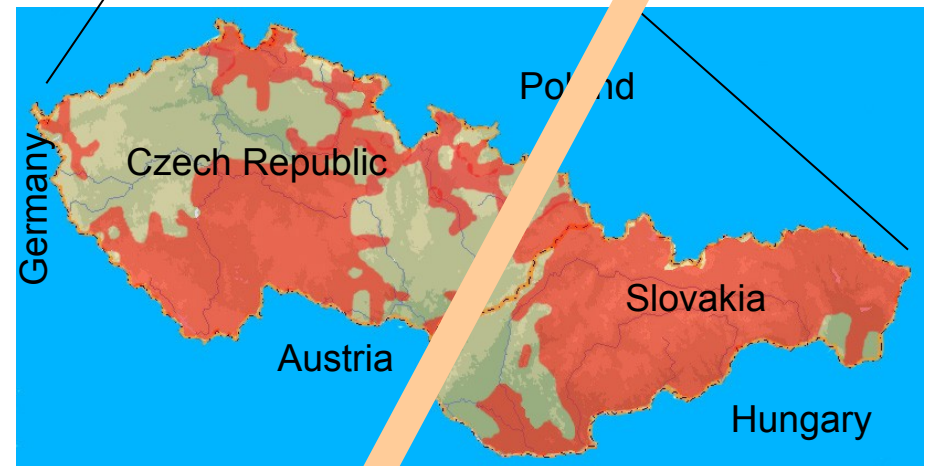
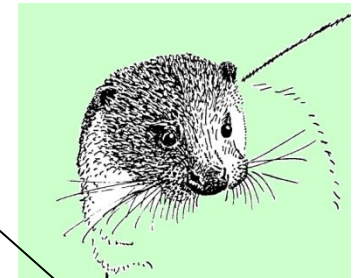
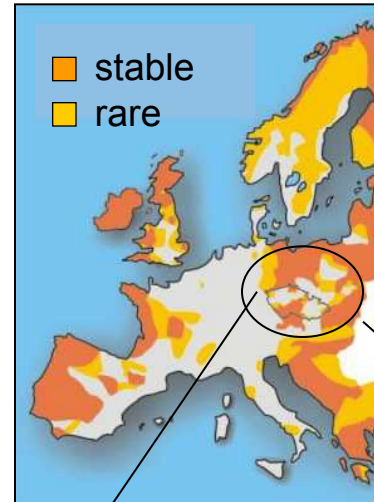
Vydra říční ve střední Evropě

- 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



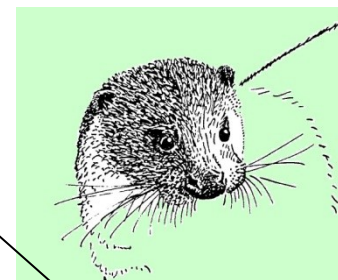
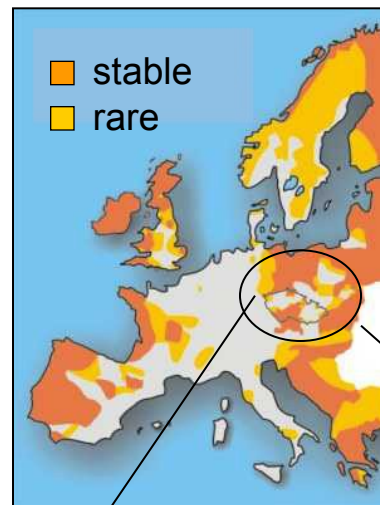
Vydra říční ve střední Evropě

- silný pokles početnosti v minulém století
- fragmentace populací

Cíle:

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

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

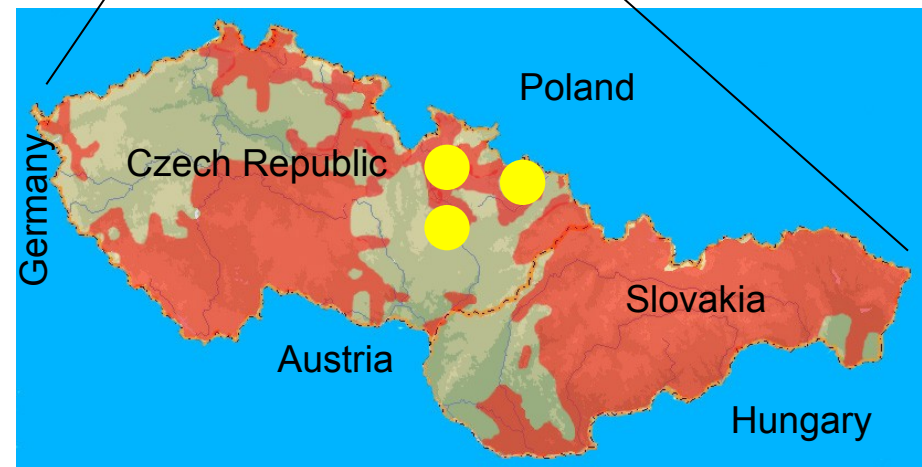
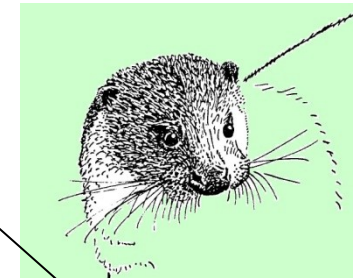
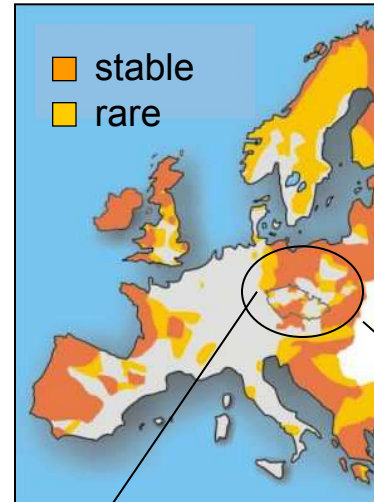


Vydra říční ve střední Evropě

- silný pokles početnosti v minulém století
- fragmentace populací

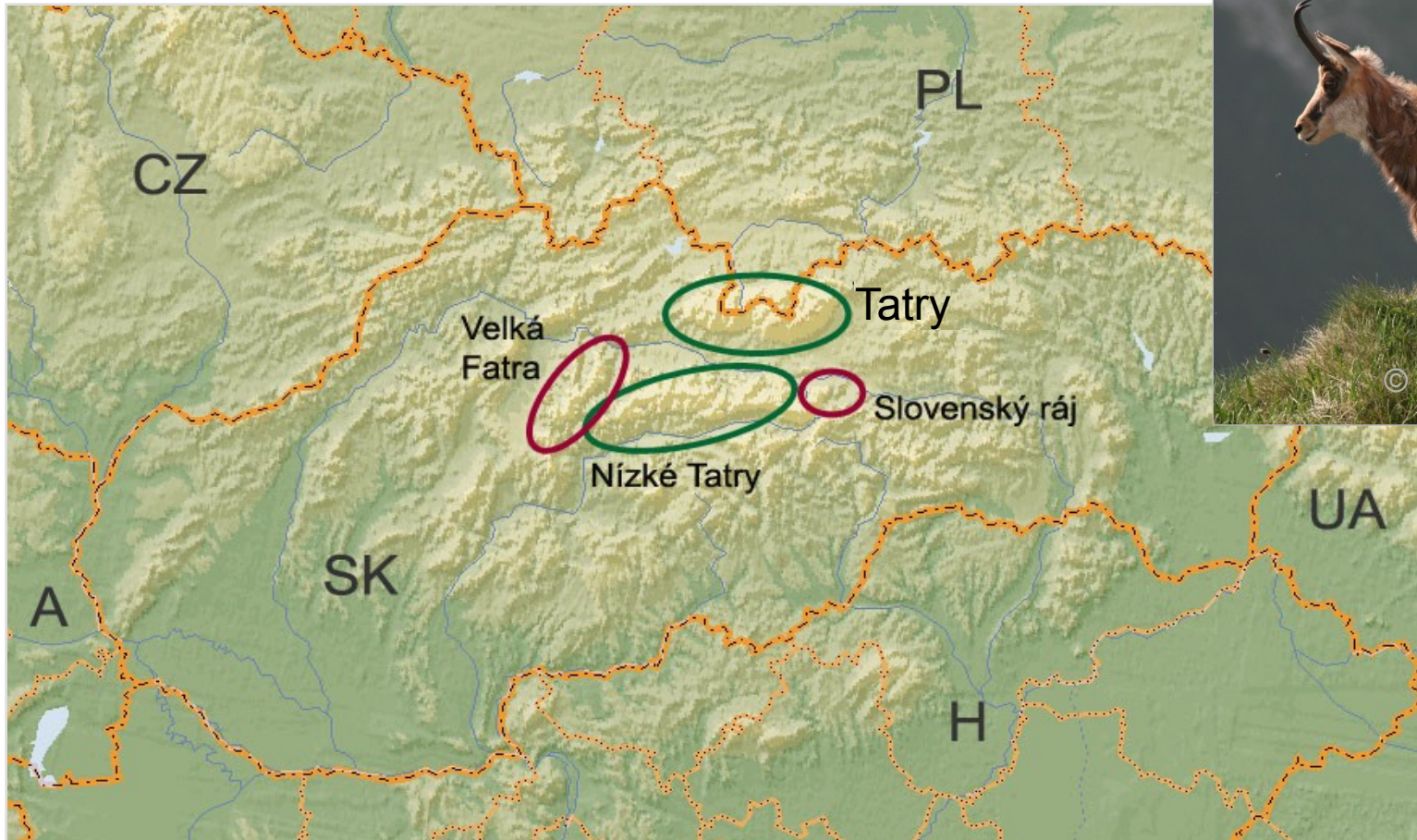
Cíle:

- 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, $K = 2$

Structure, $K = 3$

BAPS, $K = 3$

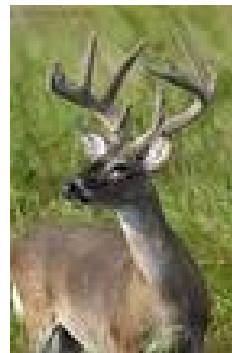
Příklady:
IDENTIFIKACE POHLAVÍ

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



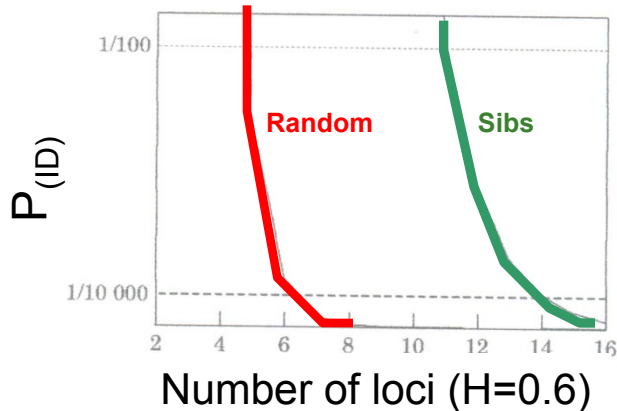
Murphy et al. 2003

Příklady:
IDENTIFIKACE JEDINCŮ

Identification of individuals

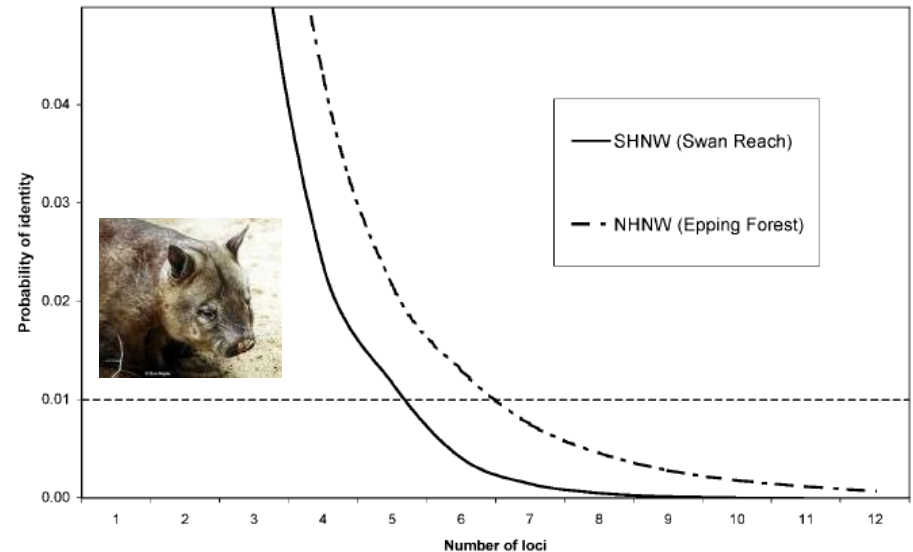
- multilocus microsatellite fingerprinting – power estimated as „probability of identity“ ($P_{(ID)}$) (Waits et al. 2001)

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



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

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

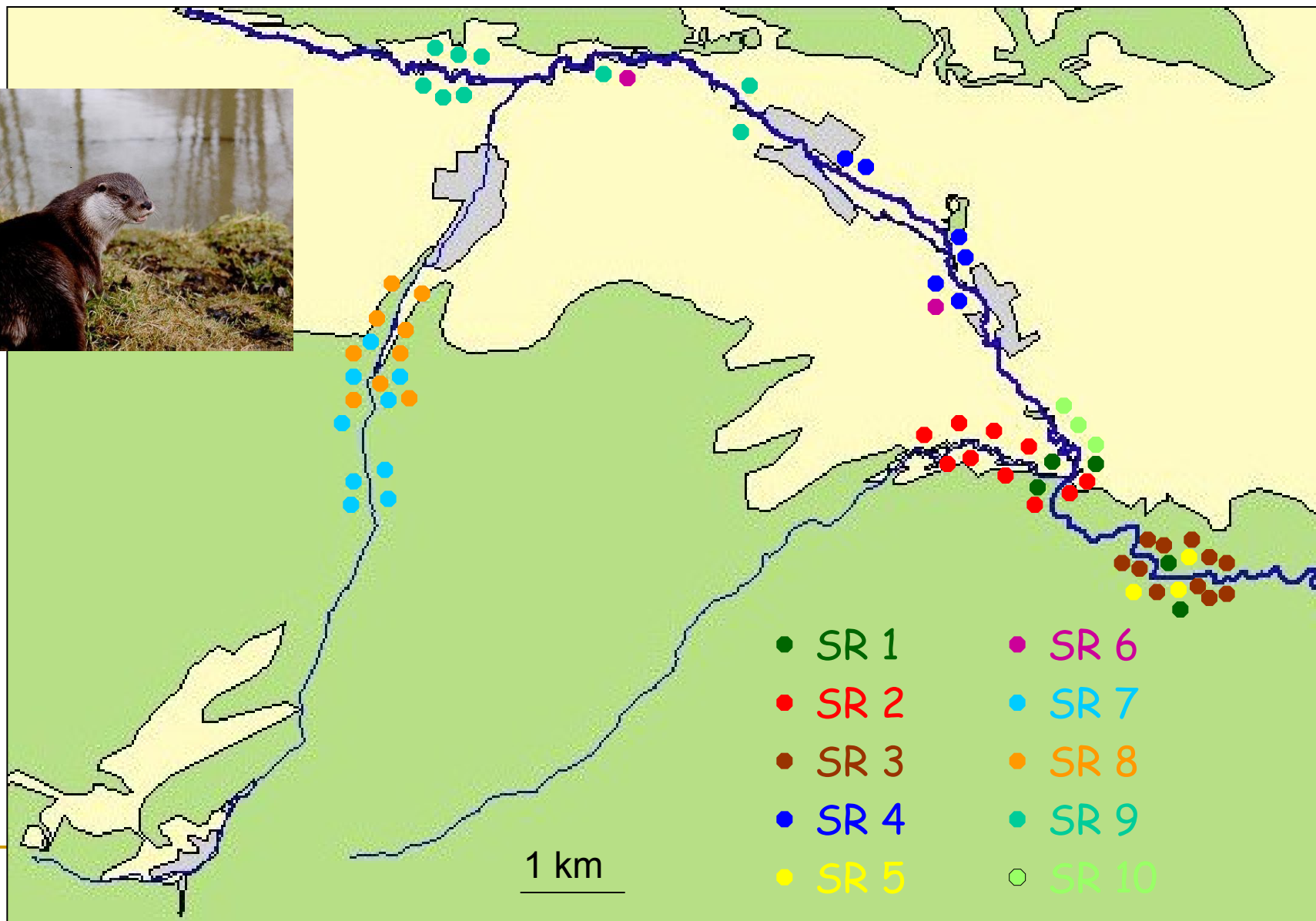
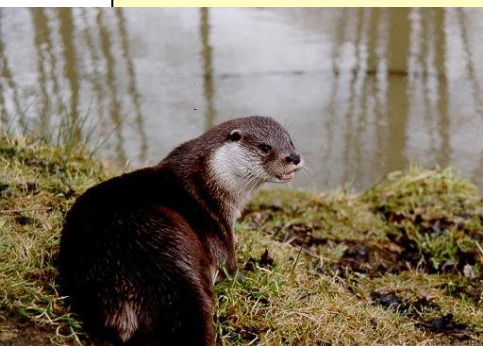


Identifikace jedinců

- **prostorová aktivita**

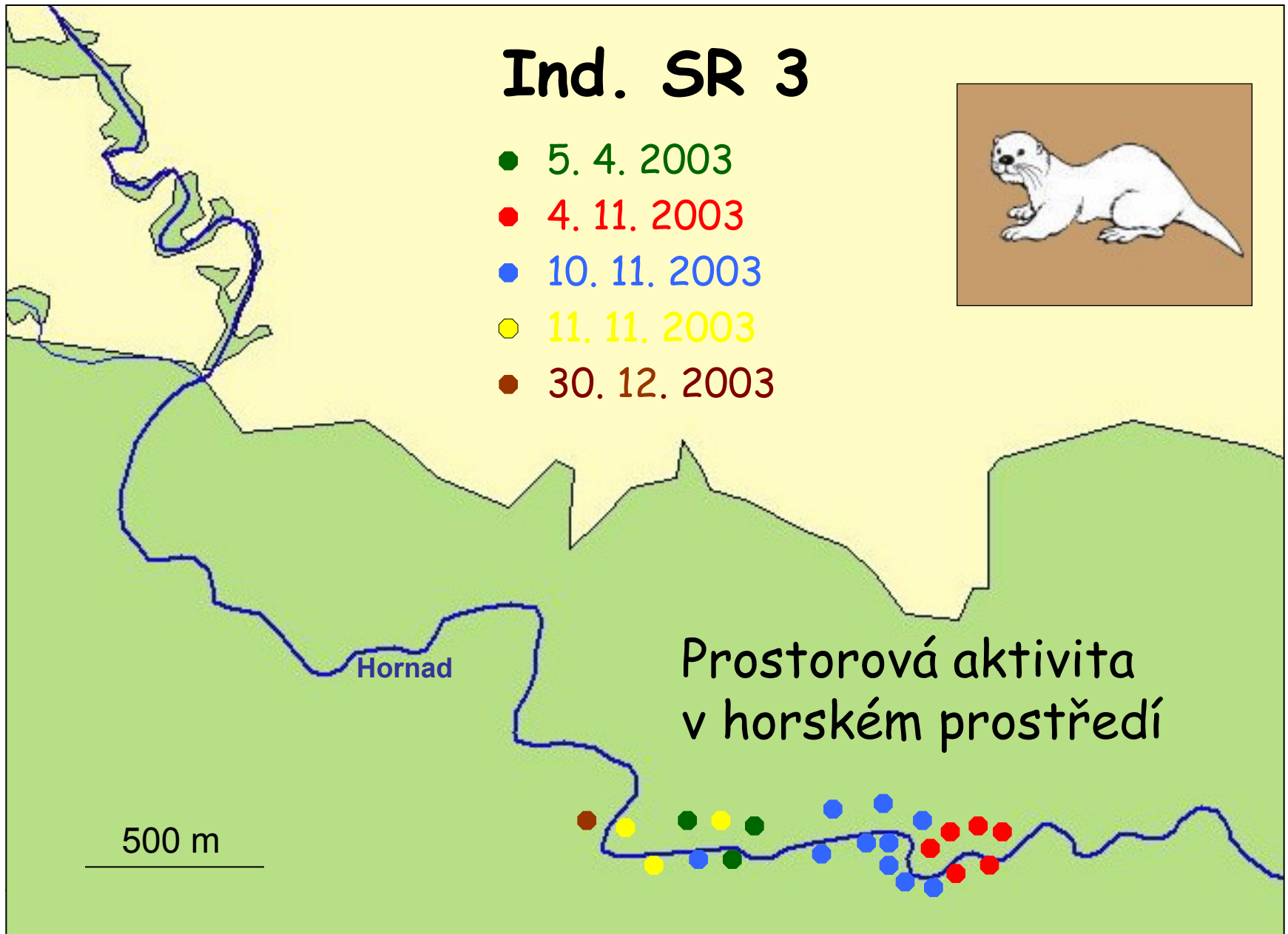


Identifikovaní jedinci - Hornád, NP Slovenský Raj



Ind. SR 3

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



Non-invasive CMR studies

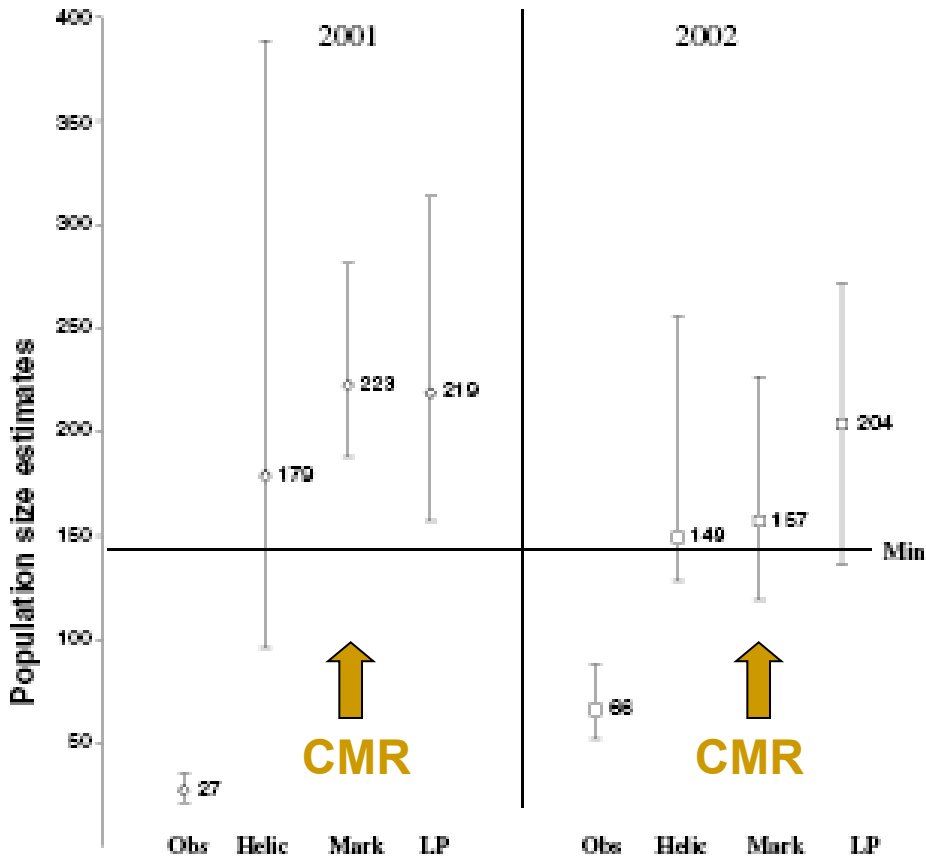
- **Velikost populace**
- „Capture-Mark-Recapture“ (review in Lukacs & Burnham 2005)
- Opakované vzorkování stejného zvířete
- Přežívání, populační dynamika atd.
- Closed population models, open population models, Robust design models
- Korekce na genotypizační chyby
- Trus – analýza **individuální variability**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



Populační dynamika kojotů
(Prugh et al. 2005)

Brown bears (*Ursus arctos*) in Scandinavia

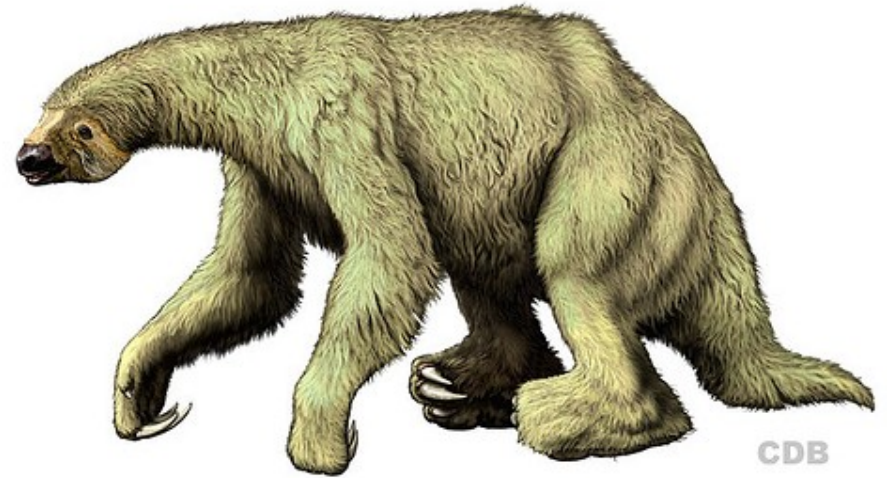
(Hakon Solberg et al. 2006, Biological Conservation)



- 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

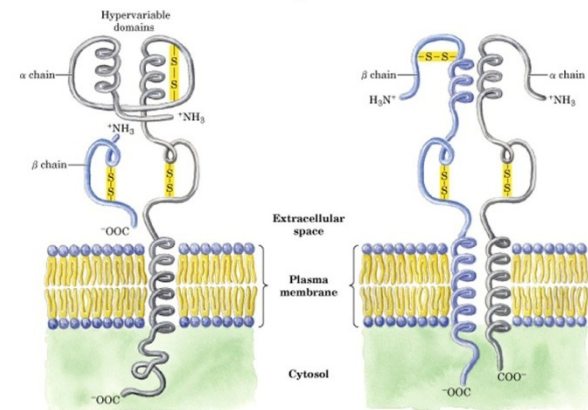
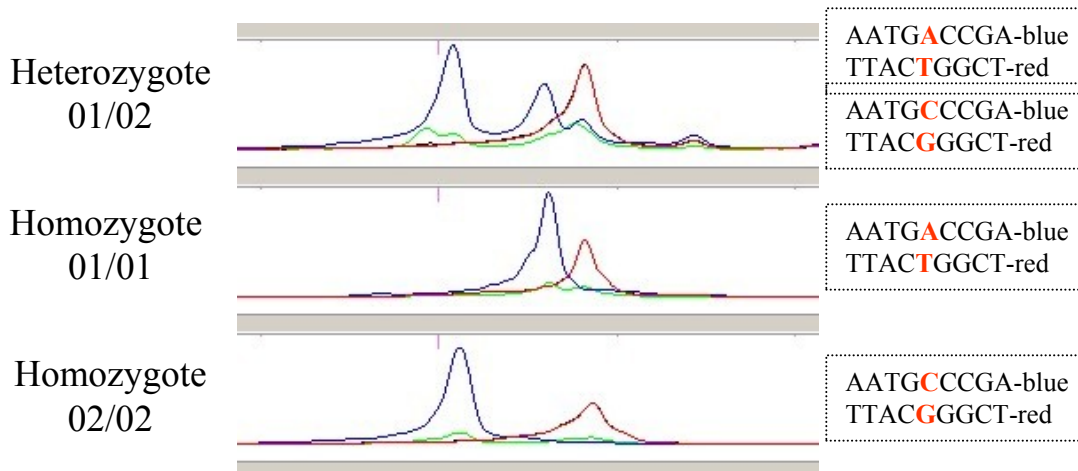
Praktické problémy ochranářské genetiky

- mladé odvětví = mnoho problémů
- význam genetické variability pro životaschopnost populací => **experimentální ochranářská genetik**
- extrémní neznalost adaptivní variability u volně žijících druhů

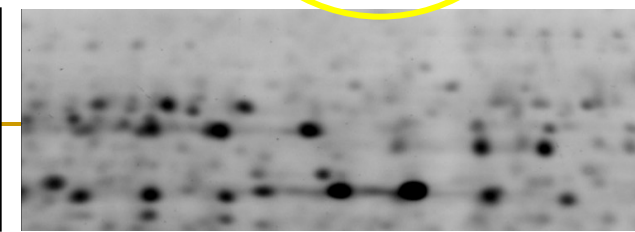
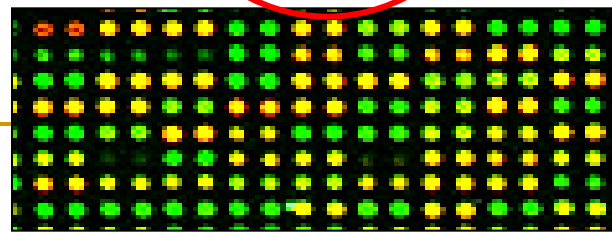
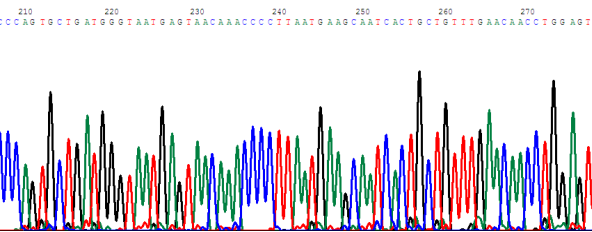
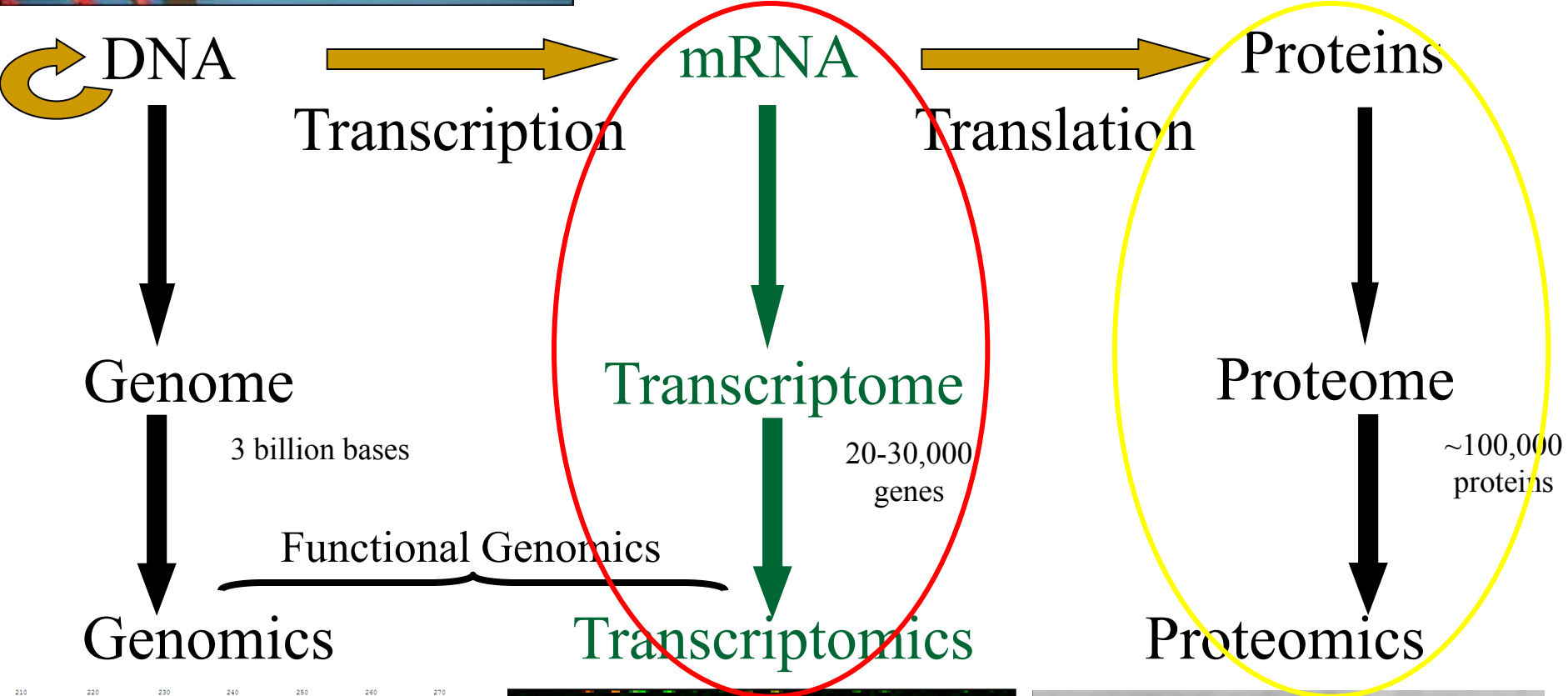
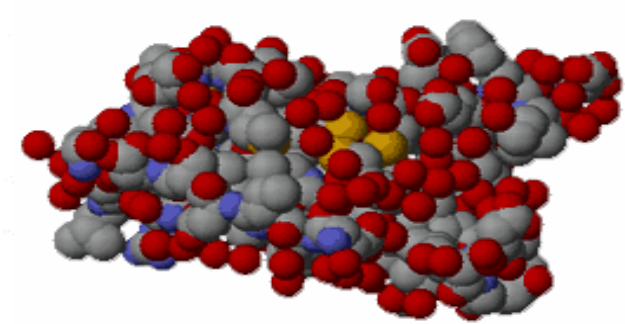
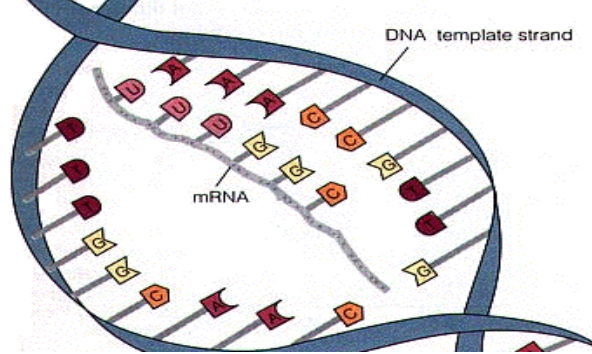
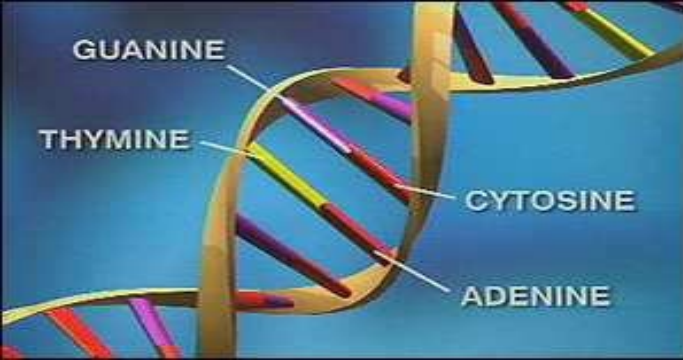


Adaptivní variabilita imunitních genů

- MHC („major histocompatibility complex“)
- geny významné pro zahájení imunitní odpovědi
- trus – parazitologické vyšetření – asociace mezi výskytem určité MHC alely a napadením parazity

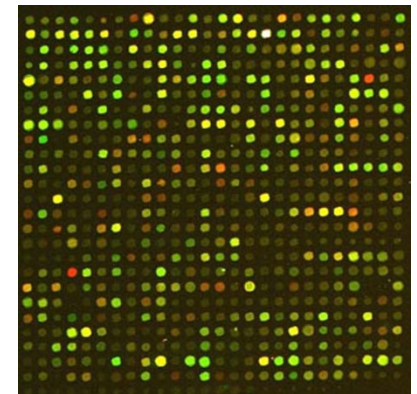
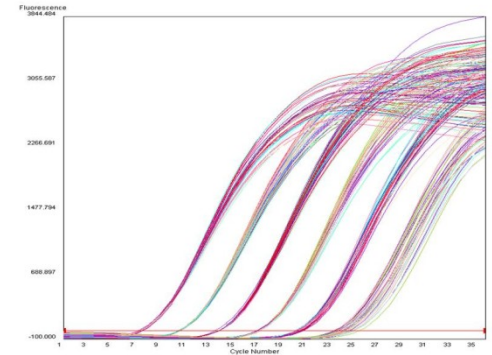


Př. Použití metody SSCP na identifikaci MHC alel



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

