

Molekulární identifikace

Druh, jedinec, pohlaví



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Definice druhu

- Koncept biologického druhu (Mayr, 1942) – RIM = post- nebo prezygotické bariéry toku genů (ne vždy tak jednoduché – hybridní zóny, alopatická speciace, asexuální druhy atd.)
- Ochranařská biologie – je nutno rozhodnout o taxonomické jednotce (druhu), která vyžaduje pozornost
- Forenzní genetika, vývojová stadia bez determinačních znaků, identifikace kořisti v trávicím traktu predátorů, atd.

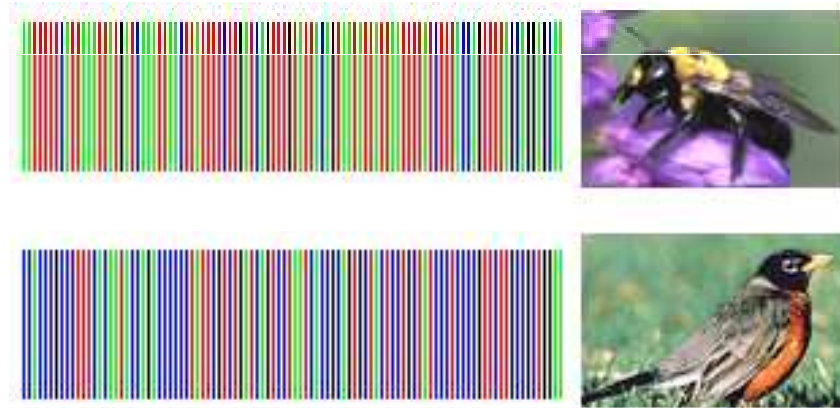
What *is* DNA Barcoding?



- **Definition:** Derivation of short DNA sequence(s) that enables species identification or recognition in a particular domain of life (e.g., eucaryotes).
- **Barcode of Life Initiative (BOLI)** will resolve barcodes for named species and use a barcoding approach to assess undescribed biological diversity.

BARCODING LIFE, ILLUSTRATED

Goals, Rationale, Results



Mark Stoeckle, The Rockefeller University

Paul E. Waggoner, Connecticut Agricultural Experiment Station

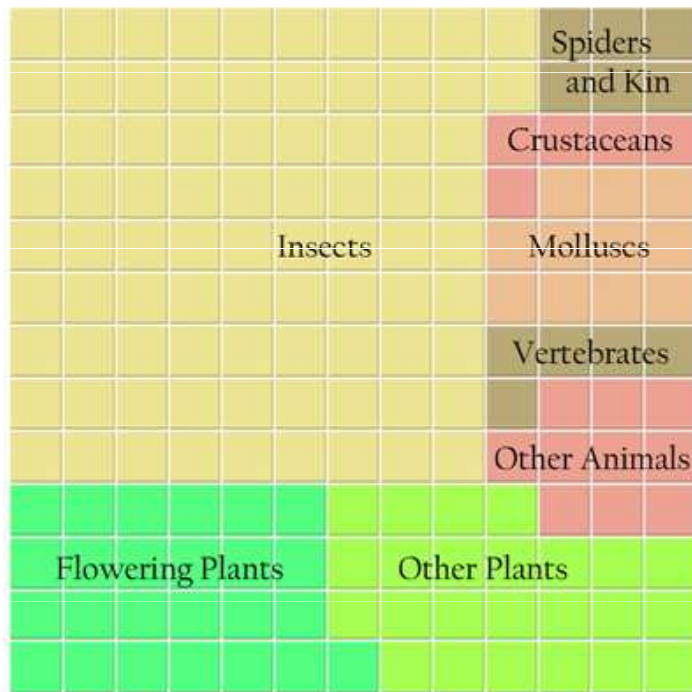
Jesse H. Ausubel, Alfred P. Sloan Foundation

Barcoding is a standardized approach to identifying plants and animals by minimal sequences of DNA, called DNA barcodes.

DNA Barcode: A short DNA sequence, from a uniform locality on the genome, used for identifying species.

Why barcode animal and plant species?

Known Biodiversity
Approximately 1.7 million named species of plants and animals.

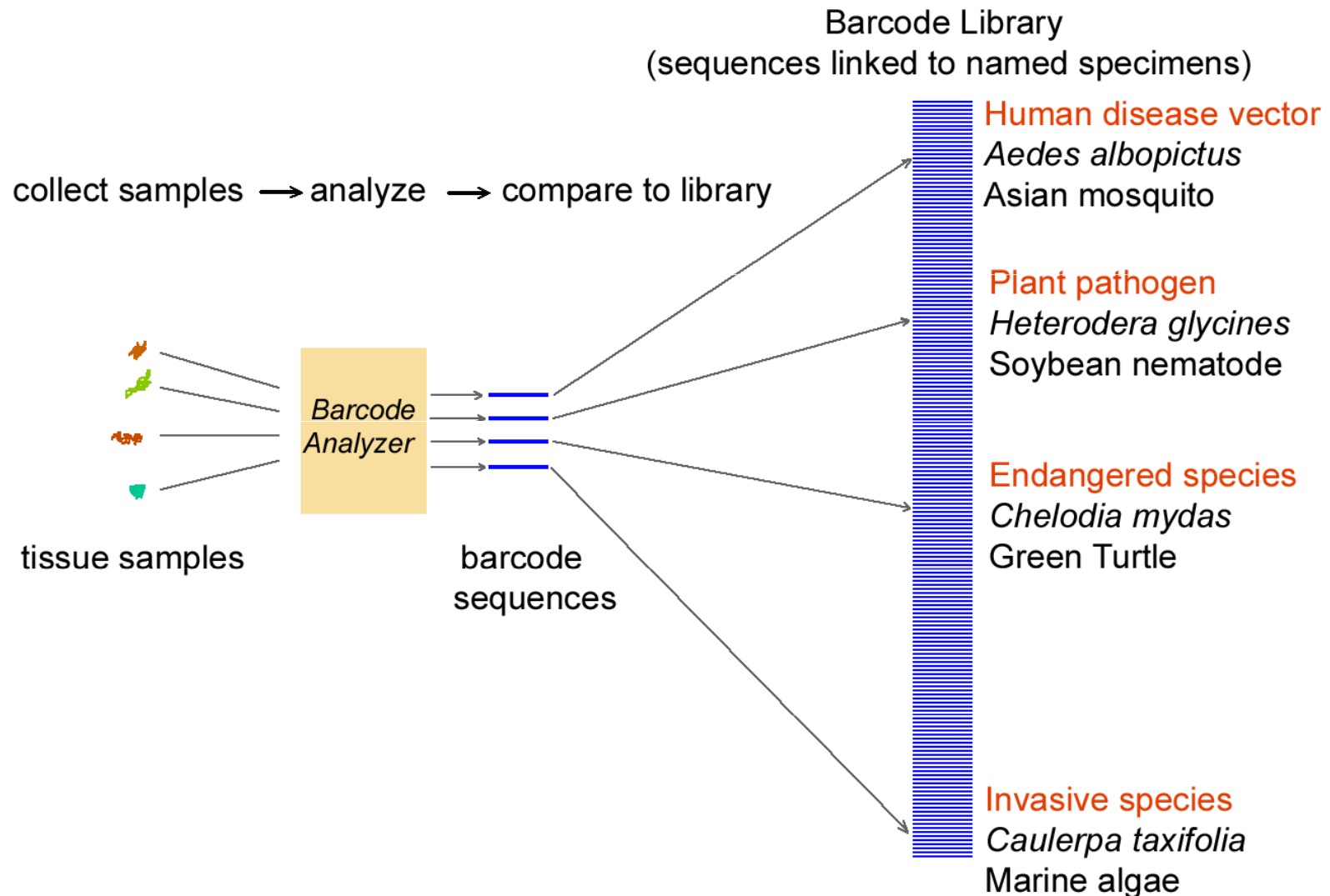


1 square = 10,000 species

Estimated Biodiversity
10 million species



2. What are the benefits of standardization?



Researchers have developed numerous ways to identify species by DNA, typically tailoring the approach to answer a specific question in a limited set of species (e.g. phylogeny).

Like convergence on one or a few railroad gauges, **barcoding aims to capture the benefits of standardization**, which typically lowers costs and lifts reliability, and thus speeds diffusion and use.

- Results so far suggest that a **mitochondrial gene will enable identification of most animal species.**
- **Focus to date:** For animals, a 658 base-pair fragment of the mitochondrial gene, cytochrome oxidase subunit I (mtCOI).
- For plants, mitochondrial genes do not differ sufficiently to distinguish among closely related species. Promising approaches to standardize plant identification use one or possibly more barcode regions are under development.
- For bacteria, a 16S-rDNA emerges as very useful marker (especially in using next-generation sequencing)

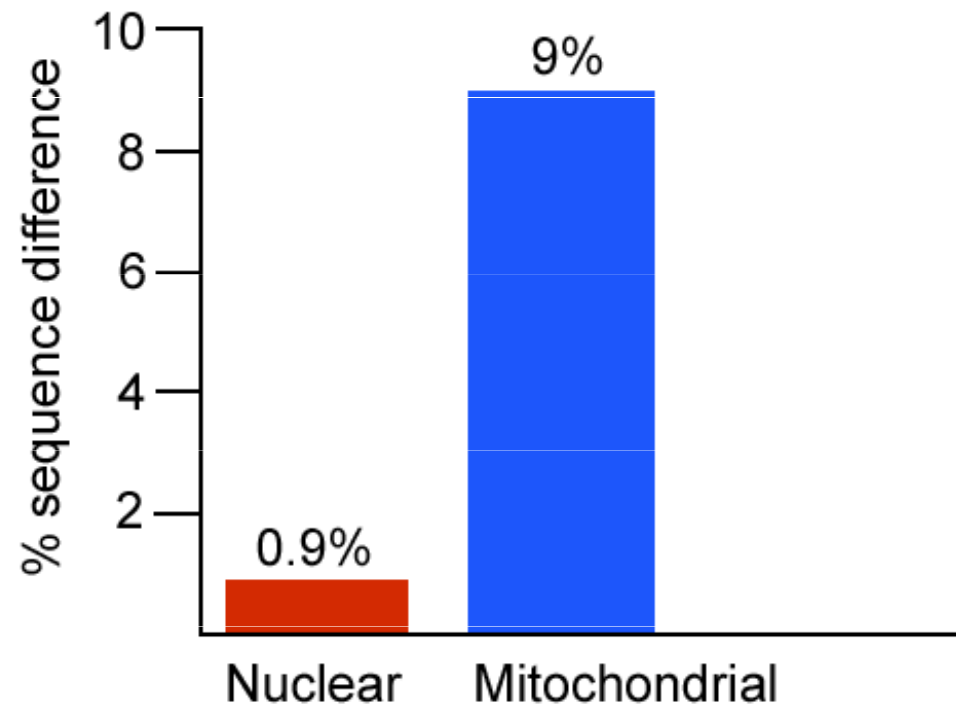
Why barcode animals with mitochondrial DNA?

Mitochondria, energy-producing organelles in plant and animal cells, have their own genome. Twenty years of research have established the utility of mitochondrial DNA sequences in differentiating among closely-related animal species.

Four properties make mitochondrial genomes especially suitable for identifying species:

Greater differences among species, on average 5- to 10-fold higher in mitochondrial than in nuclear genes. Thus shorter segments distinguish among species, and because shorter, less expensively.

Average sequence differences in nuclear and mitochondrial DNA between human and chimp

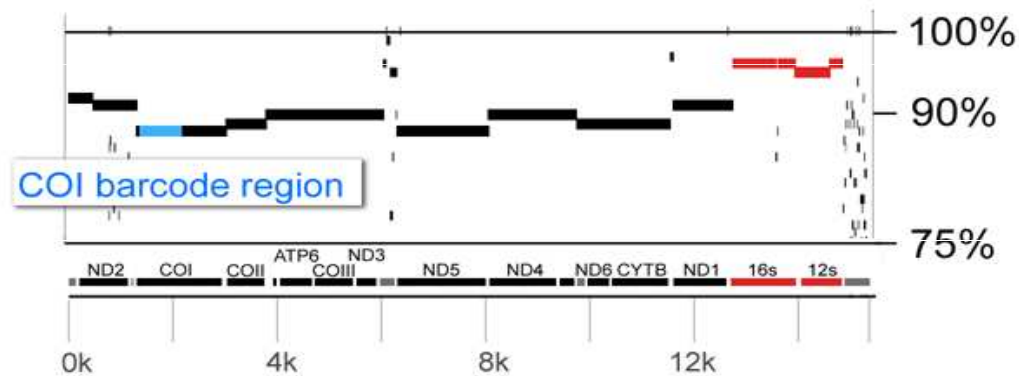


- **Copy number.** There are 100-10,000 more copies of mitochondrial than nuclear DNA per cell, making recovery, especially from small or partially degraded samples, easier and cheaper.
- **Relatively few differences within species** in most cases. Small intraspecific and large interspecific differences signal distinct genetic boundaries between most species, enabling precise identification with a barcode.
- **Introns, which are non-coding regions interspersed between coding regions of a gene, are absent from mitochondrial DNA** of most animal species, making amplification straightforward. Nuclear genes are often interrupted by introns, making amplification difficult or unpredictable.

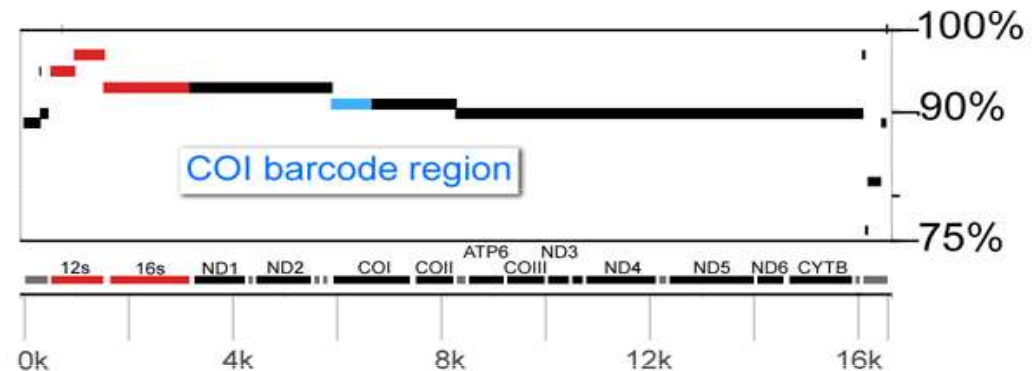
Cytochrome c oxidase I (COI) contains differences representative of those in other protein-coding genes. Possible gains in accuracy or cost using a different protein-coding gene would likely be small.

Percent identity plot (PIP) analysis of complete mitochondrial genomes

Anopheles gambiae
vs.
A. quadrimaculatus



Homo sapiens
vs.
Pan troglodytes



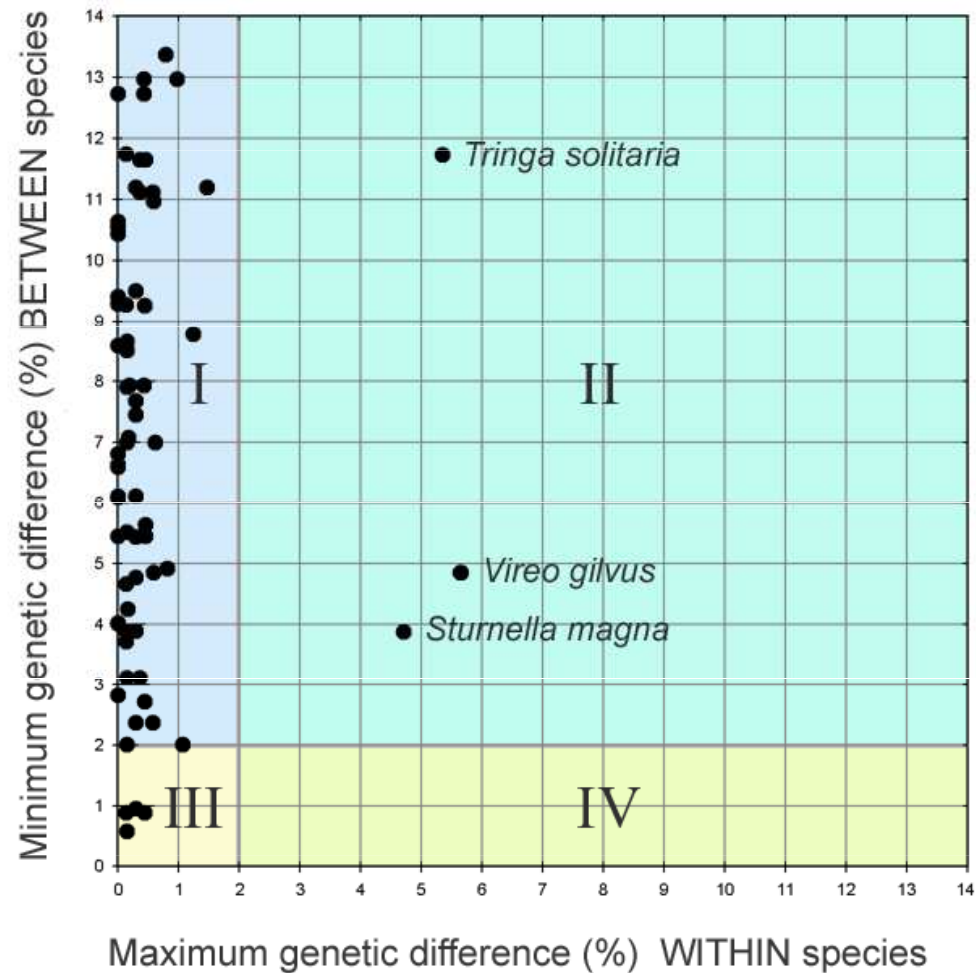
— protein coding gene
— ribosomal RNA gene

What do barcode differences among and within animal species studied so far suggest?

- Barcodes identify most animal species unambiguously.
- Approximately 2-5% of recognized species have shared or overlapping barcodes with closely-related species. Many of the species with overlapping barcodes hybridize regularly.
- In all groups studied so far, distinct barcode clusters with biologic co-variation suggest cryptic species.

Barcoding North American birds highlights probable cryptic species

Interspecific vs. intraspecific COI barcode differences

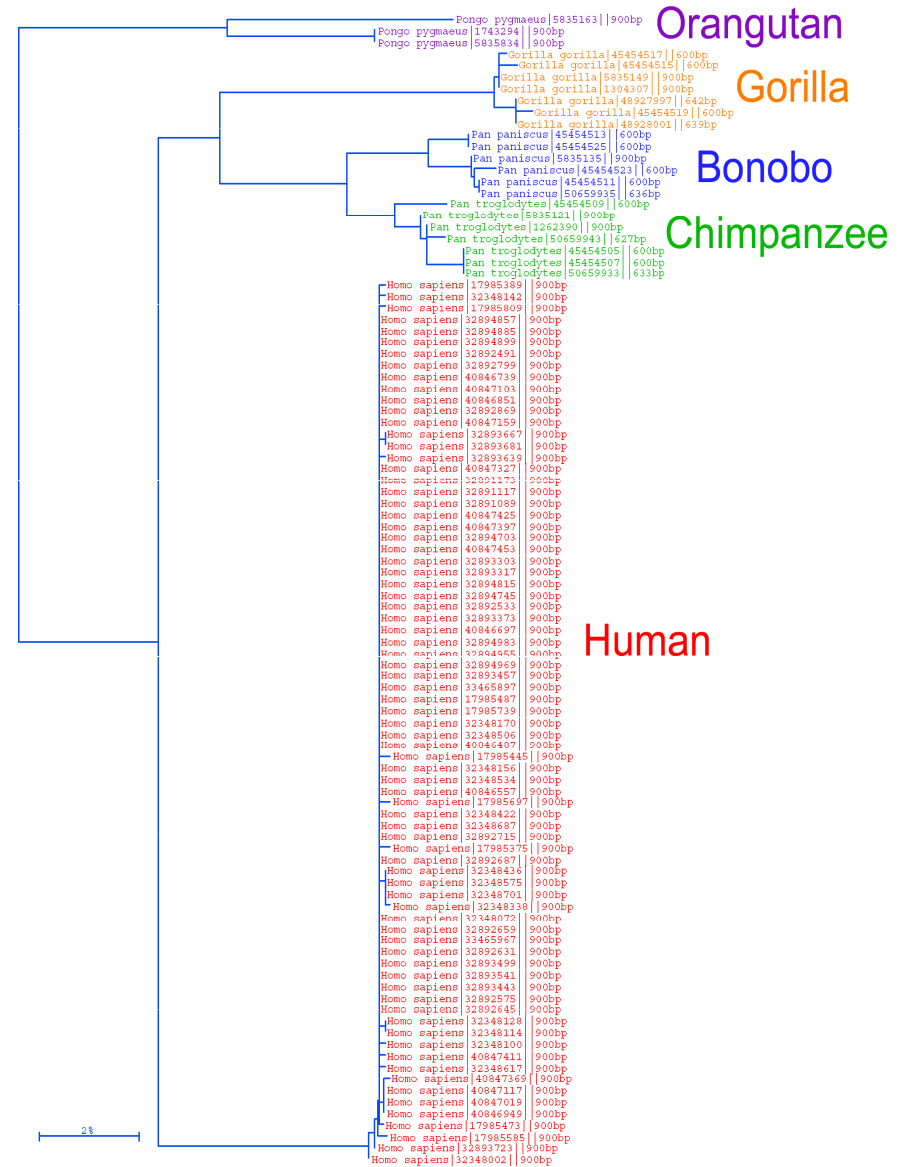


Results for 73 species of North American are shown. Quadrants represent different categories of species:

- I. consistent with current taxonomy
- II. probable lumped species (candidate for taxonomic split)
- III. recent divergence, hybridization, or synonymy.
- IV. probable taxonomic misidentification

Barcodes affirm the unity of the species *Homo sapiens*.

Comparisons show we differ from one another by only 1 or 2 nucleotides out of 648, while we differ from chimpanzees at 60 locations and gorillas at 70 locations.



A barcoder?



Mark Stoeckle The Rockefeller University
Paul Waggoner Connecticut Agricultural Experiment Station
Jesse Ausubel Alfred P. Sloan Foundation

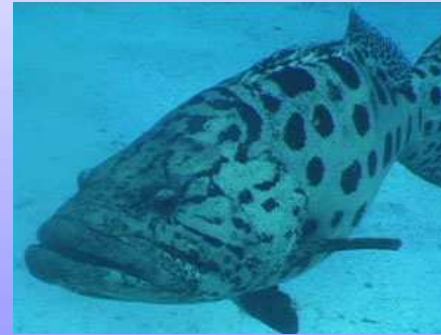
Maintaining Credibility Amongst Taxonomic Community

Recognizing the intellectual content of taxonomy

Demonstrating the utility of DNA barcoding in classical taxonomy problems

Integrating DNA barcoding approaches with classical taxonomy and taxonomic methods

What *isn't* DNA Barcoding?

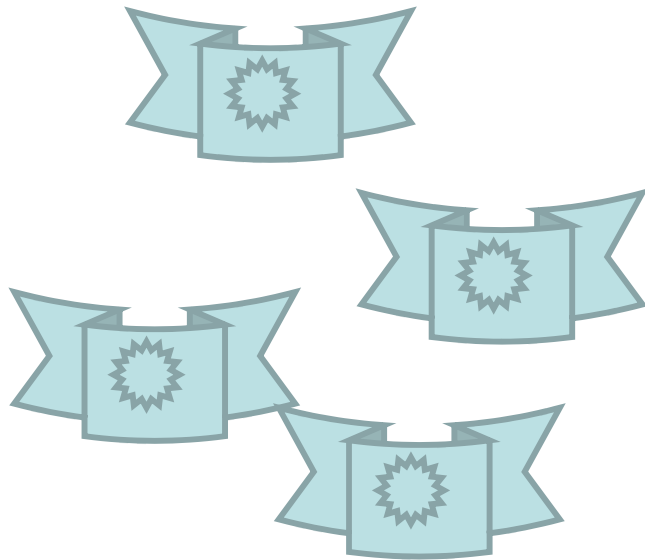


- It is not intended to, in any way, supplant or invalidate existing taxonomic practice.
- It is not DNA taxonomy; it does not equate species identity, formally or informally, with a particular DNA sequence.
- It is not intended to duplicate or compete with efforts to resolve deep phylogeny (e.g., *Assembling the Tree of Life*, ATOL).

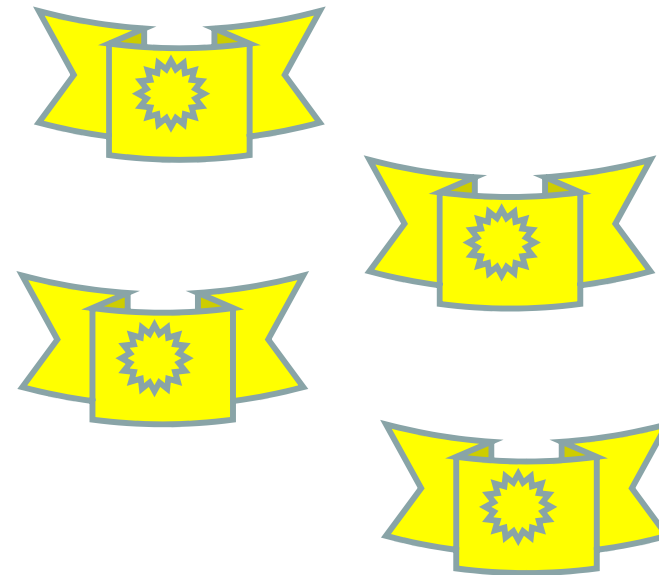
What are the main limits to barcoding encountered so far?

- Groups with little sequence diversity
- Incomplete lineage sorting
- Resolution of recently diverged species
- Hybrids
- Nuclear pseudogenes
- Gene tree vs. organismal tree

Příklad: *Myotis blythii* vs. *Myotis myotis* - introgrese mtDNA

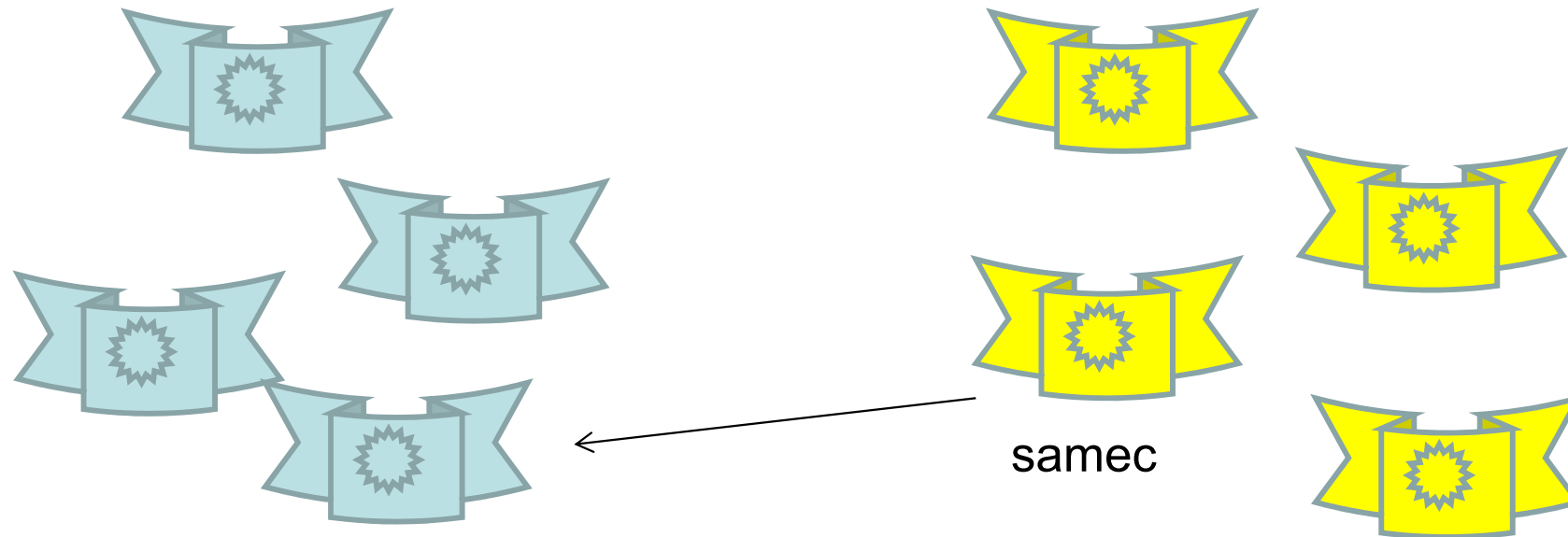


M. myotis - Evropa



M. blythii - Asie

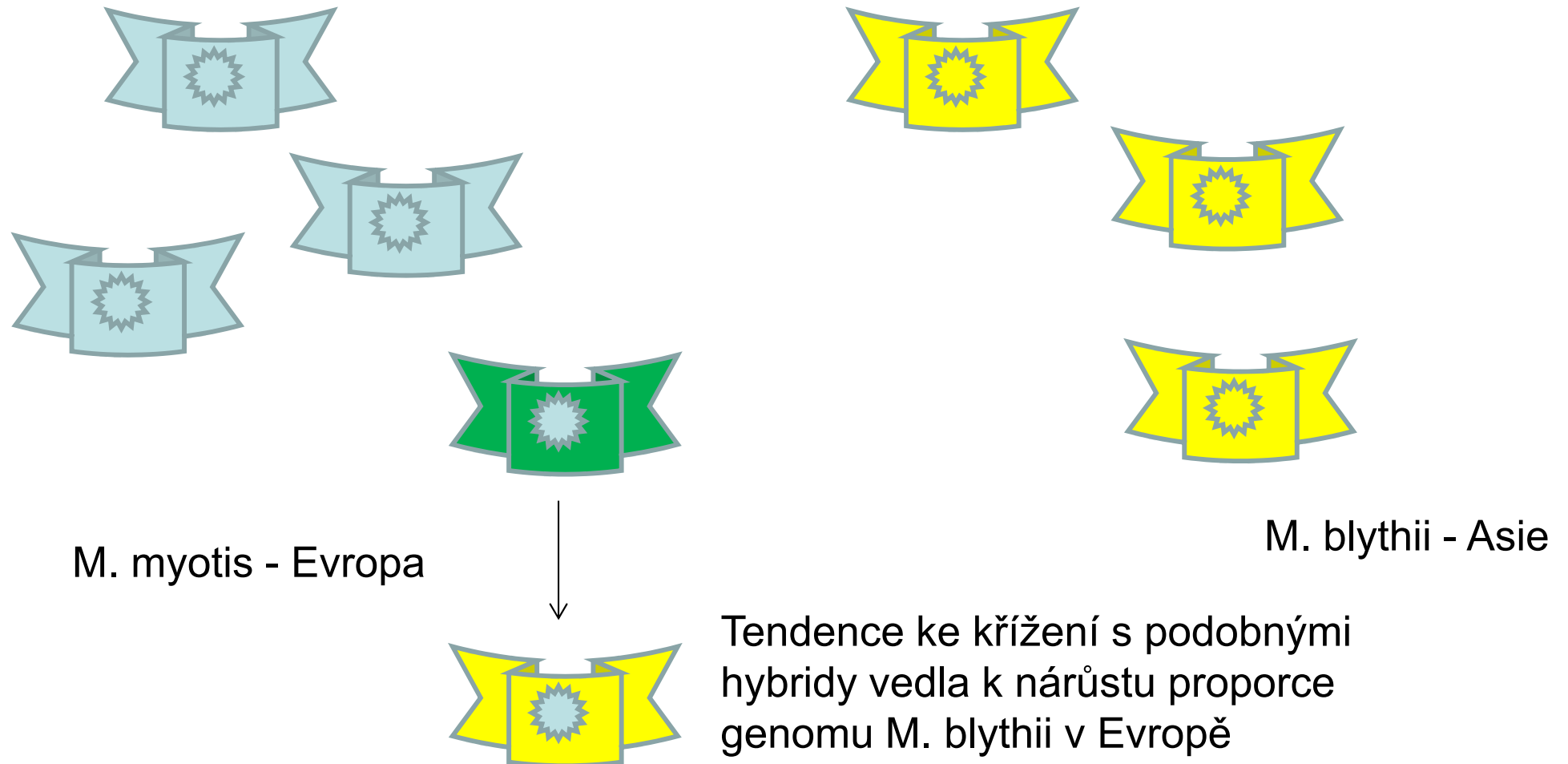
Příklad: *Myotis blythii* vs. *Myotis myotis* - introgrese mtDNA



M. myotis - Evropa

M. blythii - Asie

Příklad: *Myotis blythii* vs. *Myotis myotis* - introgrese mtDNA

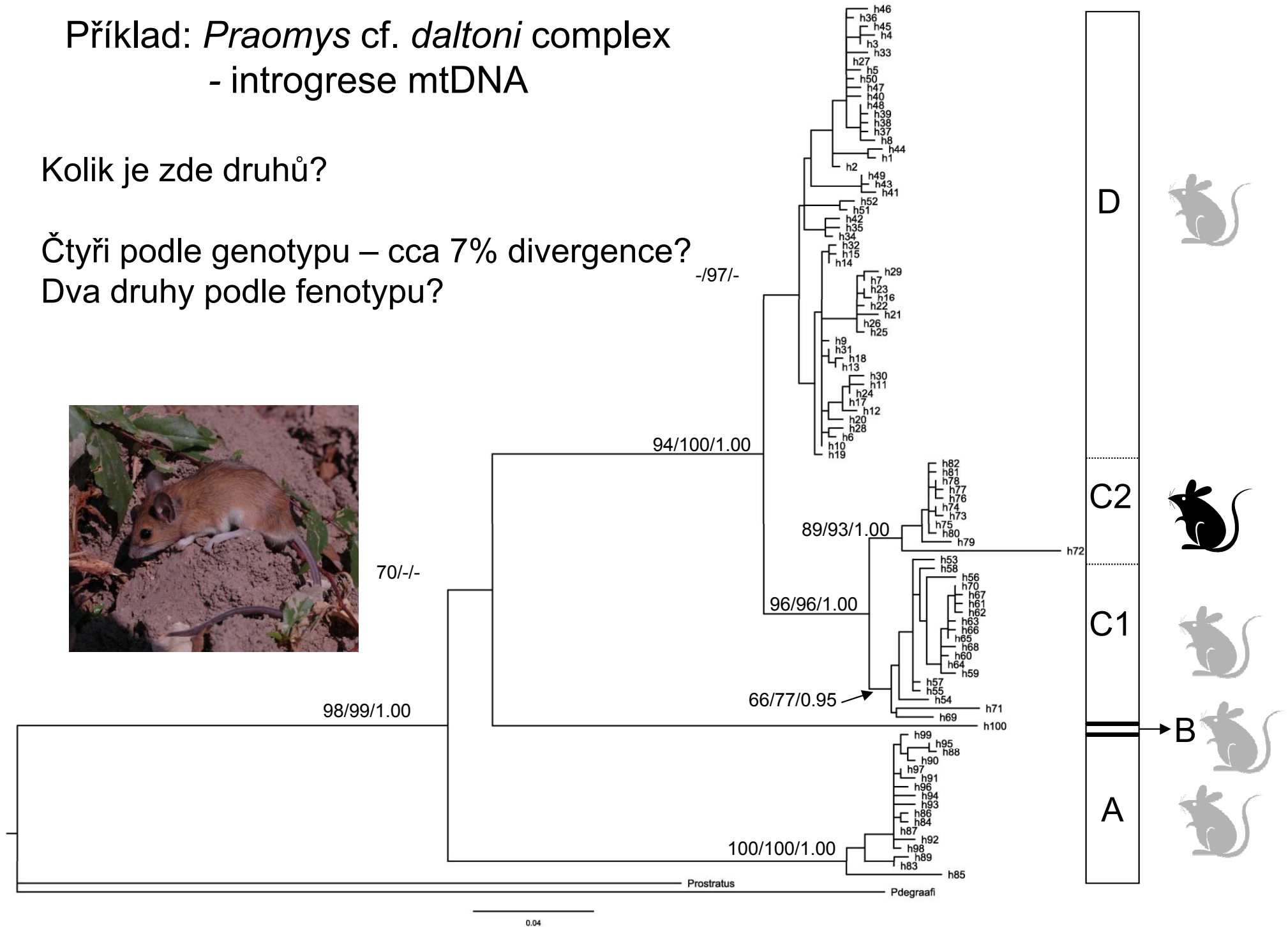


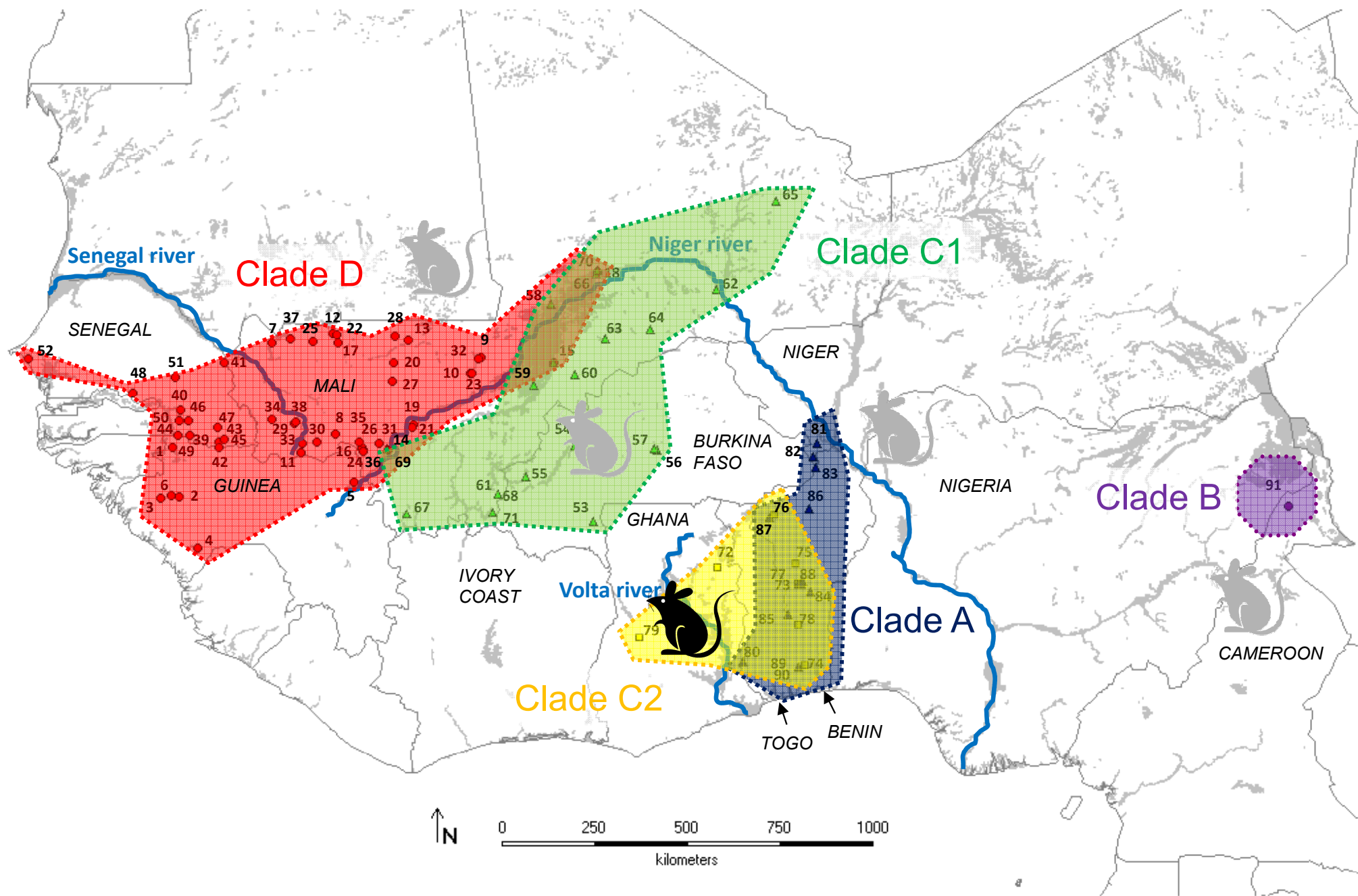
Kolonizující (invazní) druh „ukradne“ mtDNA původnímu druhu

Příklad: *Praomys cf. daltoni* complex - introgrese mtDNA

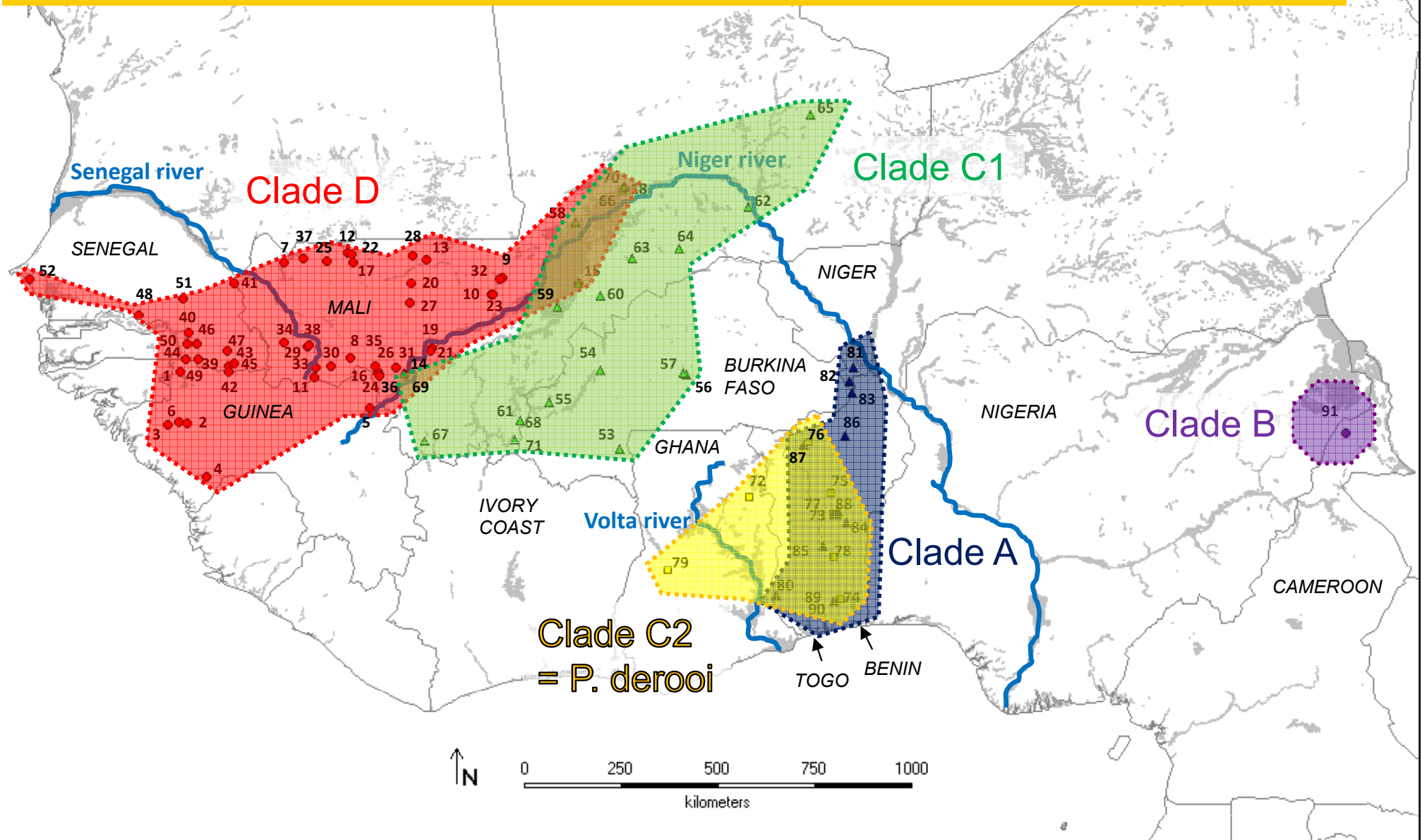
Kolik je zde druhů?

Čtyři podle genotypu – cca 7% divergence?
Dva druhy podle fenotypu?

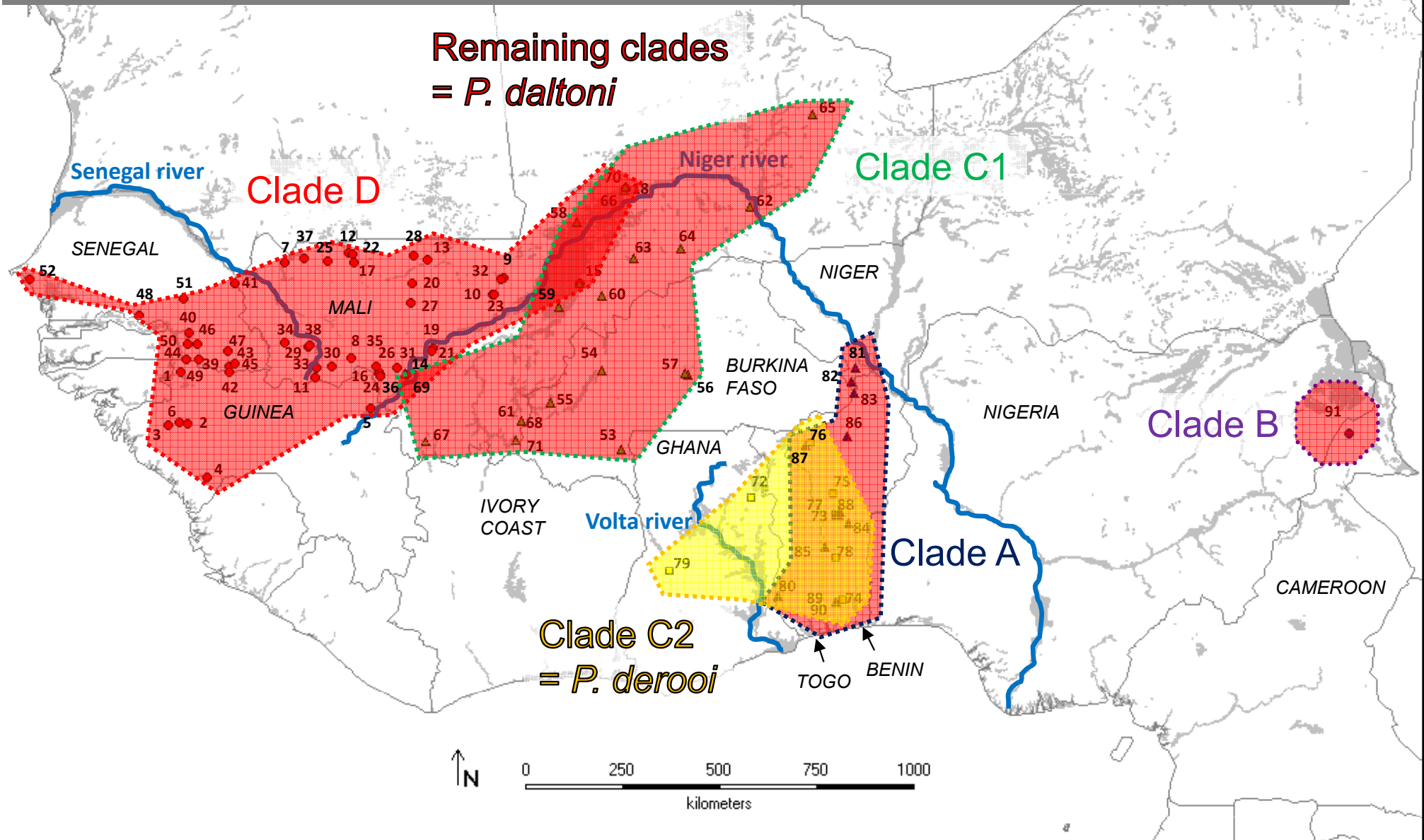




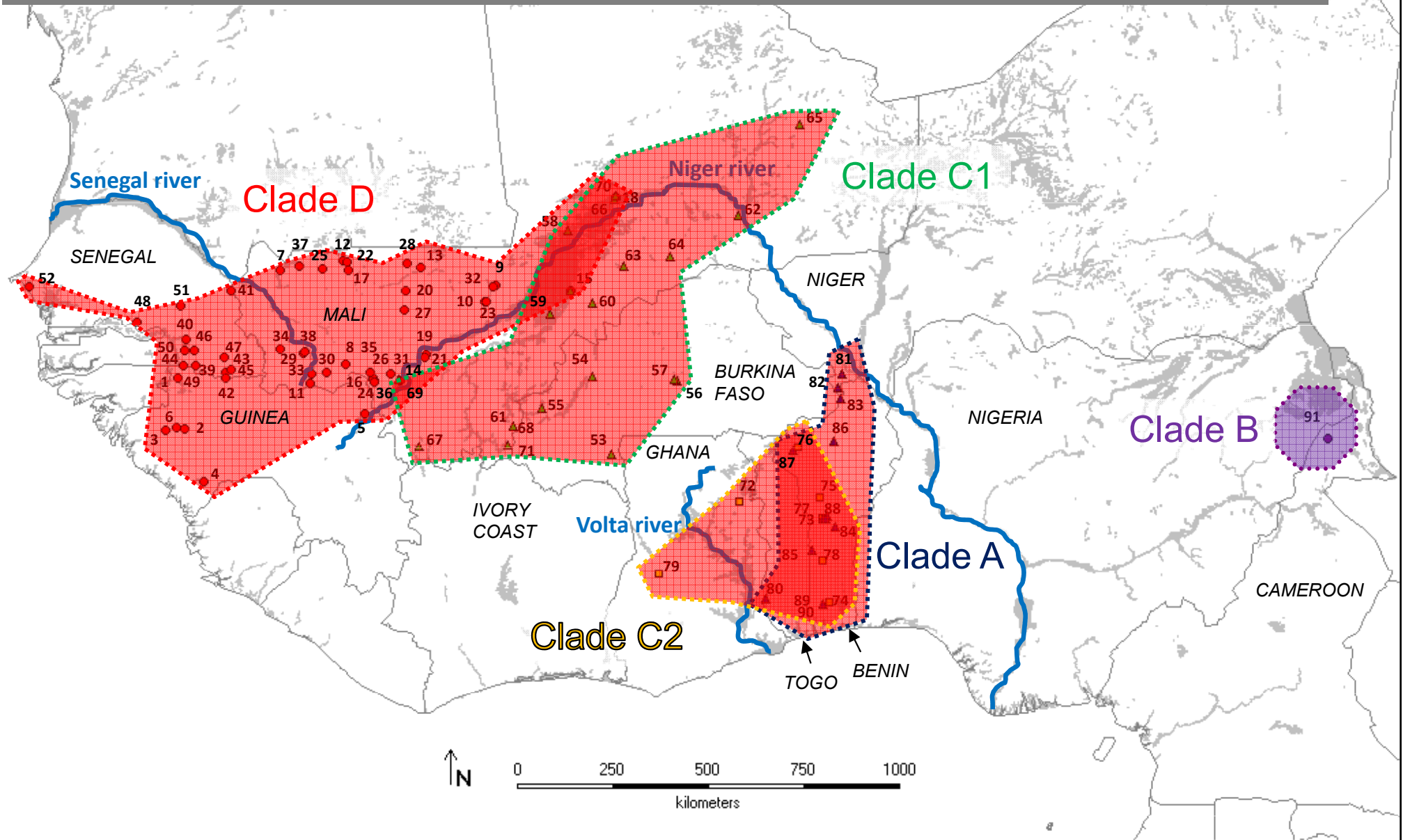
What is species???



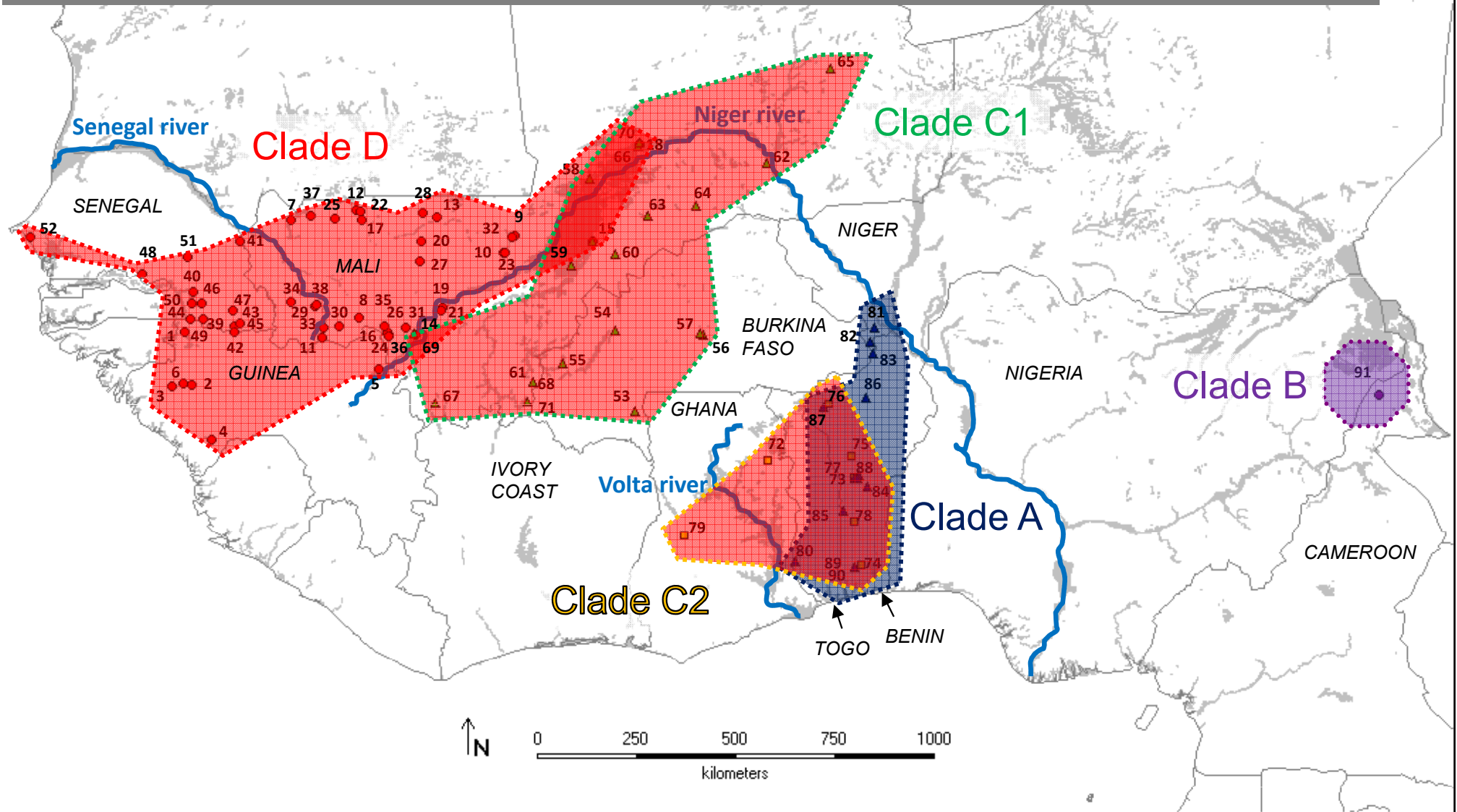
Morphology and ecology



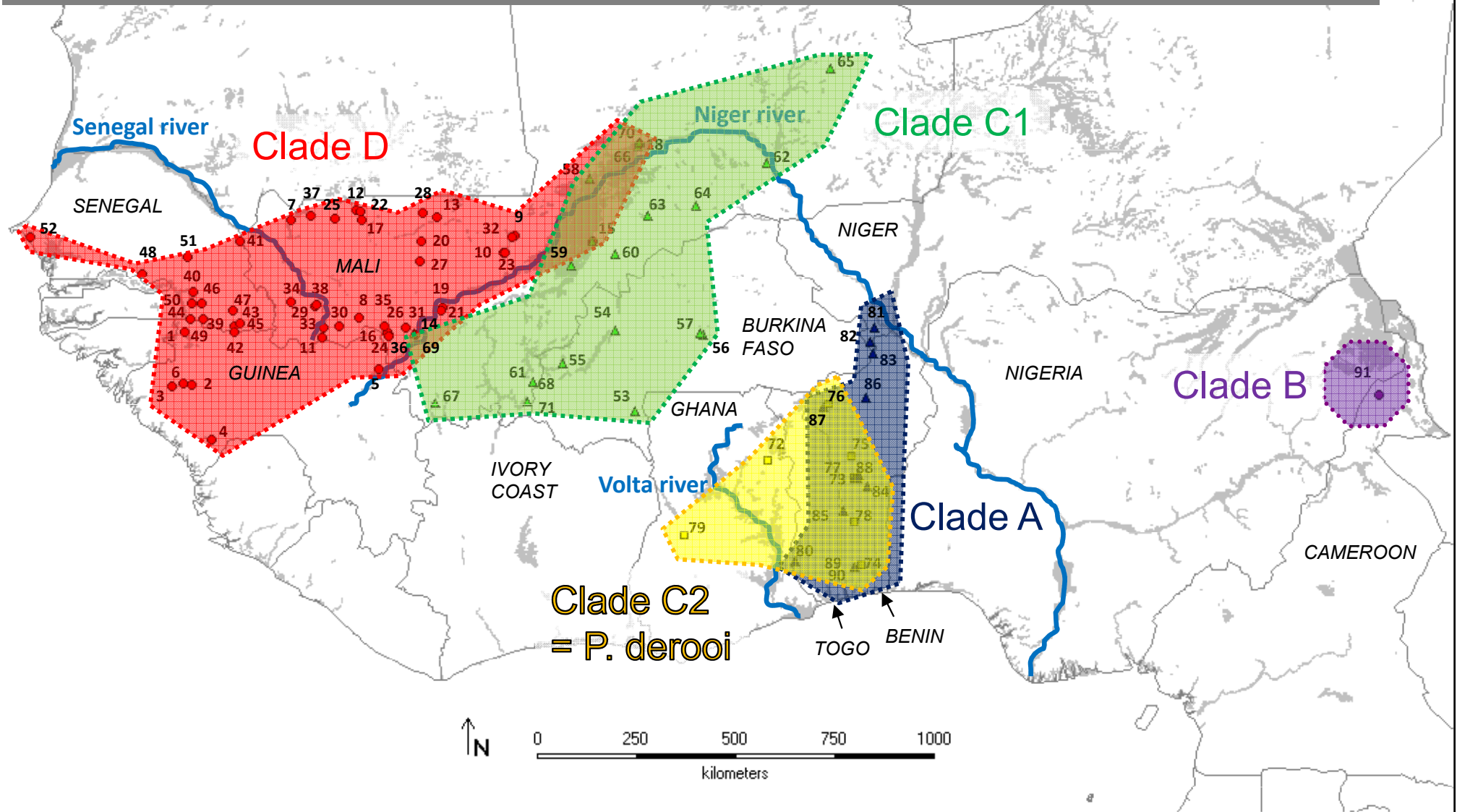
Karyotypes



Mitochondrial DNA + microsatellites in Benin + karyotypes



Splitting approach taking morphology and ecology into account – the reproductive barrier between Clade C1 and Clade D remains to be identified

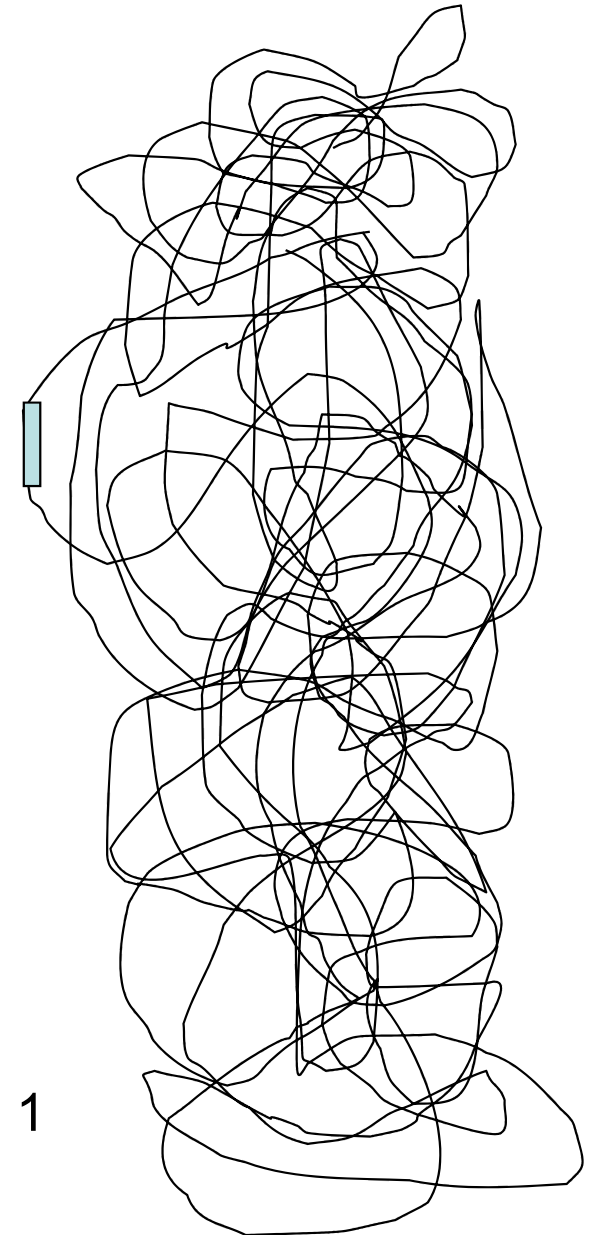


Identifikace jedince - metody

- **DNA fingerprinting (název dnes používán pro různé metody)**
 - velké množství kvalitní DNA
 - technická náročnost
 - + univerzalita
- **AFLP**
 - kvalitní nedegradovaná DNA
 - + univerzalita
- **Sekvenování, alozomy**
 - nemusí rozlišit jedince
- **Mikrosatelity**
 - + stačí malé množství nekvalitní DNA, **optimální pro neinvazivní přístupy**
 - je nutné znát konkrétní lokusy a sekvence specifických primerů

Single-locus genetic markers

- kodominantní – možno stanovovat frekvence alel
- allozomy a jiné funkční geny
- mikrosatelity – délkový polymorfismus
- SNPs (single nucleotide polymorphisms) – sekvenční polymorfismus
- SINE, LINE

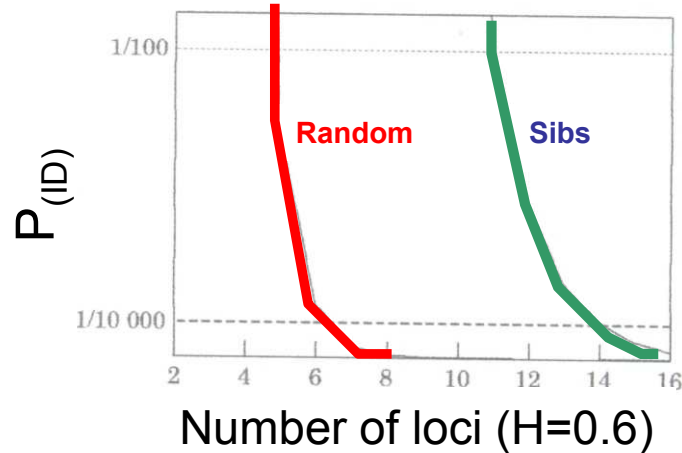


Př.: chromozóm 1

Identifikace jedinců závisí na stupni polymorfismu

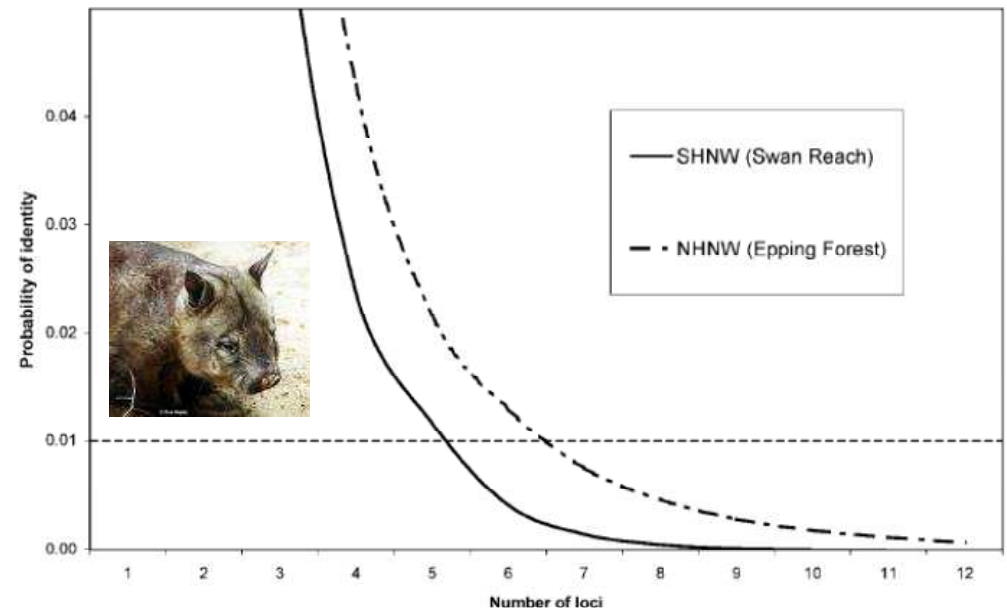
- multilocus microsatellite fingerprinting – power estimated as „probability of identity“ ($P_{(ID)}$) (Waits et al. 2001)

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



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

- pilot studies with tissue samples are required to identify $P_{(ID)}$ in a population studied by e.g. Non-invasive methods





Medvědi v Pyrenejích

Taberlet et al. 1997



- Trus a chlupy
- 24 mikrosatelitových lokusů
- 4 samci a jedna samice
(o jednoho víc než podle stop a fotografií)
- Multiple-tube approach,
mnohonásobné opakování PCR
reakcí

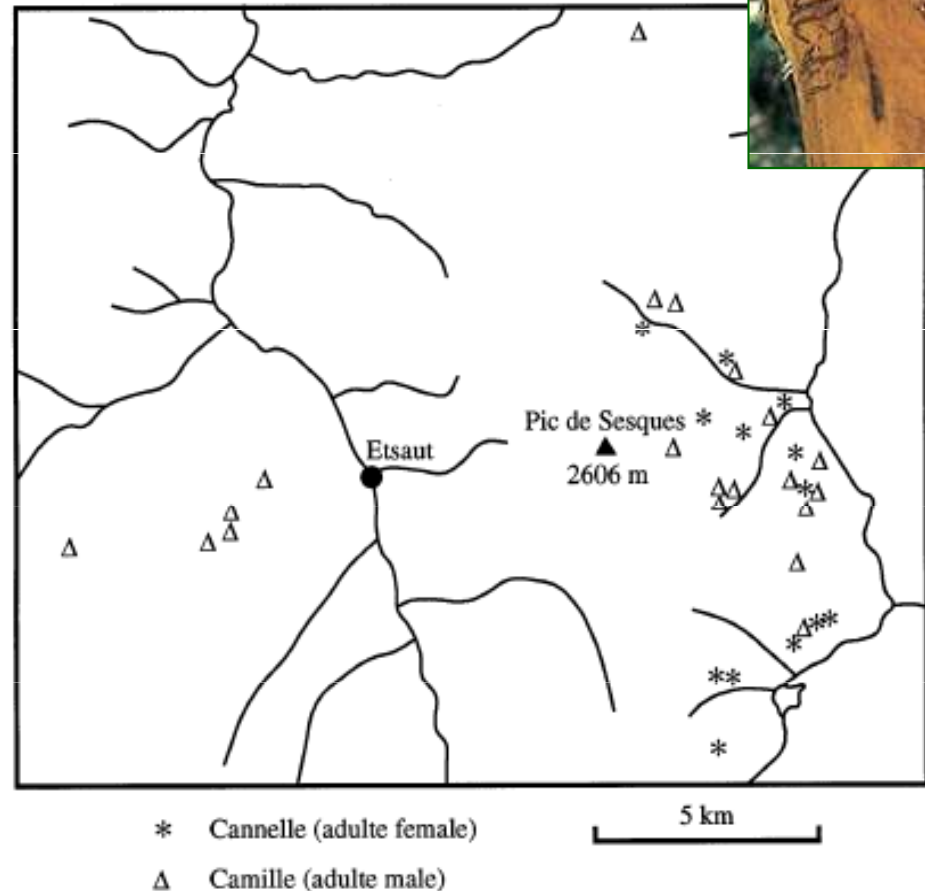


Fig. 3 Home range of two Pyrenean brown bears obtained by noninvasive genetic sampling and genotyping.

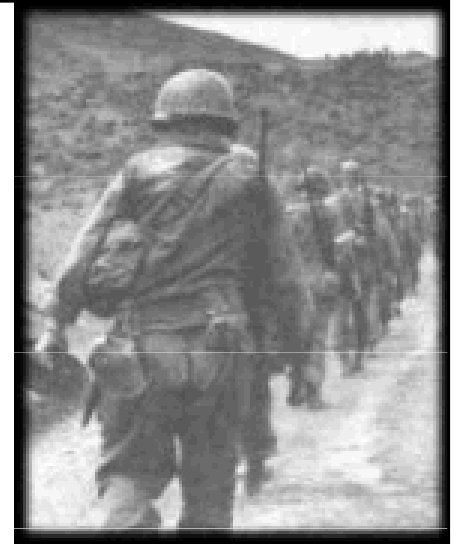
Lidská forenzní genetik

- **Pozůstatky vojáků z války** Vietnam a Korea

Identifikace na základě mtDNA příbuzných osob
(Ize jen někdy)

V současnosti: vzorek DNA (krve) při odvodu, jiné markery

Armed Forces Repository of Specimen Samples for the Identification of Remains



- **Soudní pře**
Clinton-Lewinská
Pozůstatky ruského cara Nikolaje II

- **Kriminalistika**

- **Oběti tragických událostí**



Klony

Bambus *Sasa senanensis*

- Suyama et al. 2000
- Plocha 10 hektarů
- AFLP
- 22 klonů
- Klon na ploše 300 m v průměru



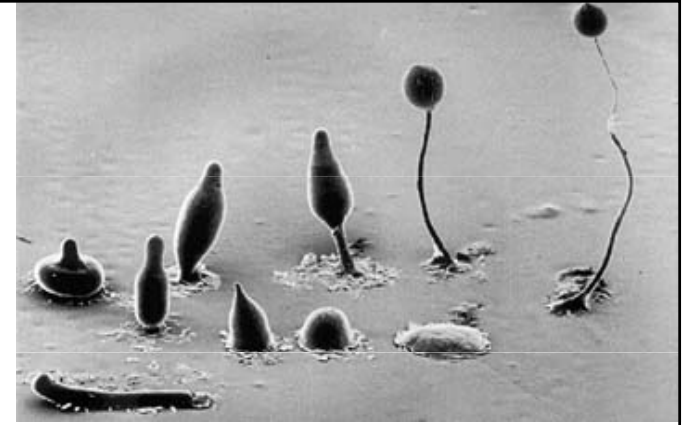
Slavní klonální bezobratlí

- Rotifera – Bdelloidea
- Ostracoda
(*Darwinula*)
- Partenogenetické
klony vysokého stáří
(milióny let)

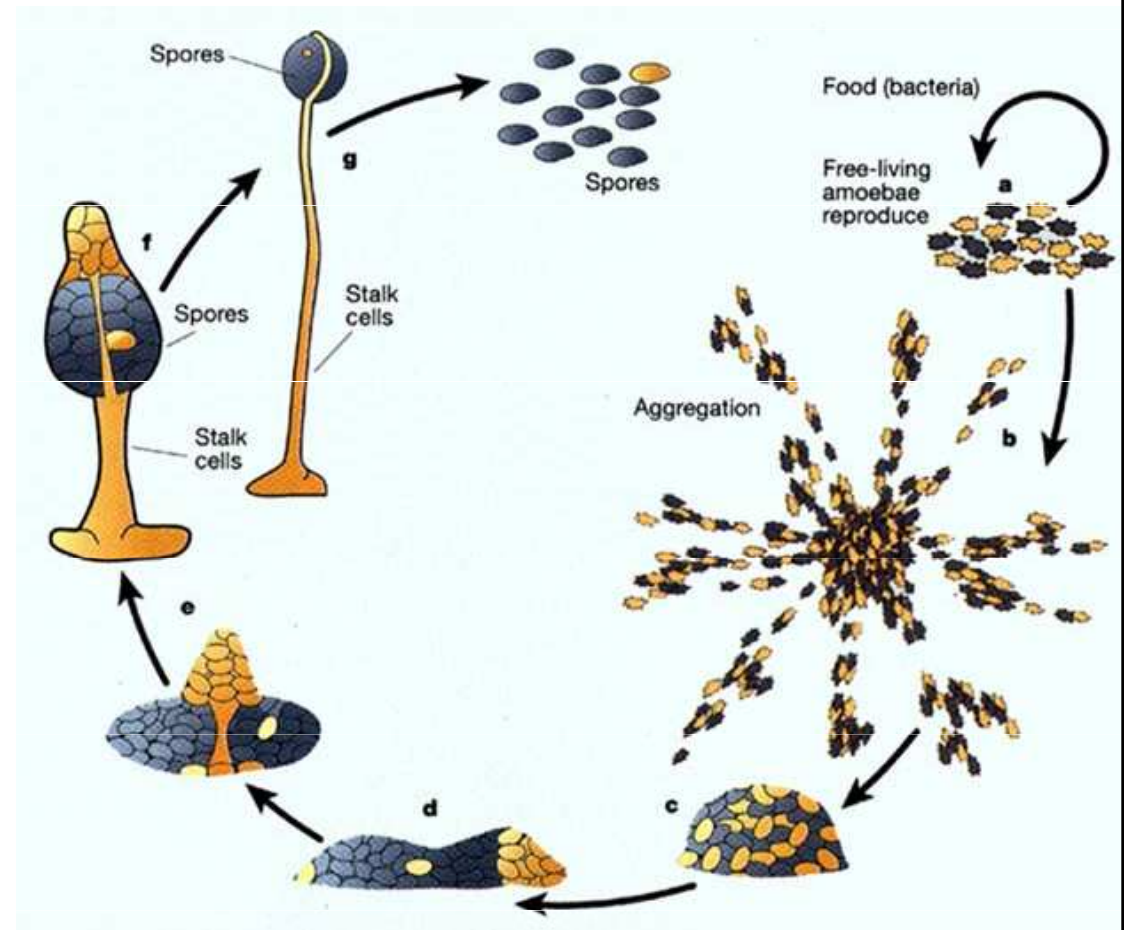


Darwinula stevensoni

Genetické chiméry

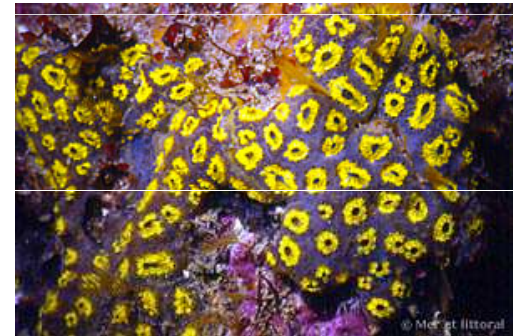


- organismy složené z buněk s různými genotypy
- *Dictyostelium discoideum*
chimérismus je pravidelná součást života



Genetické chiméry

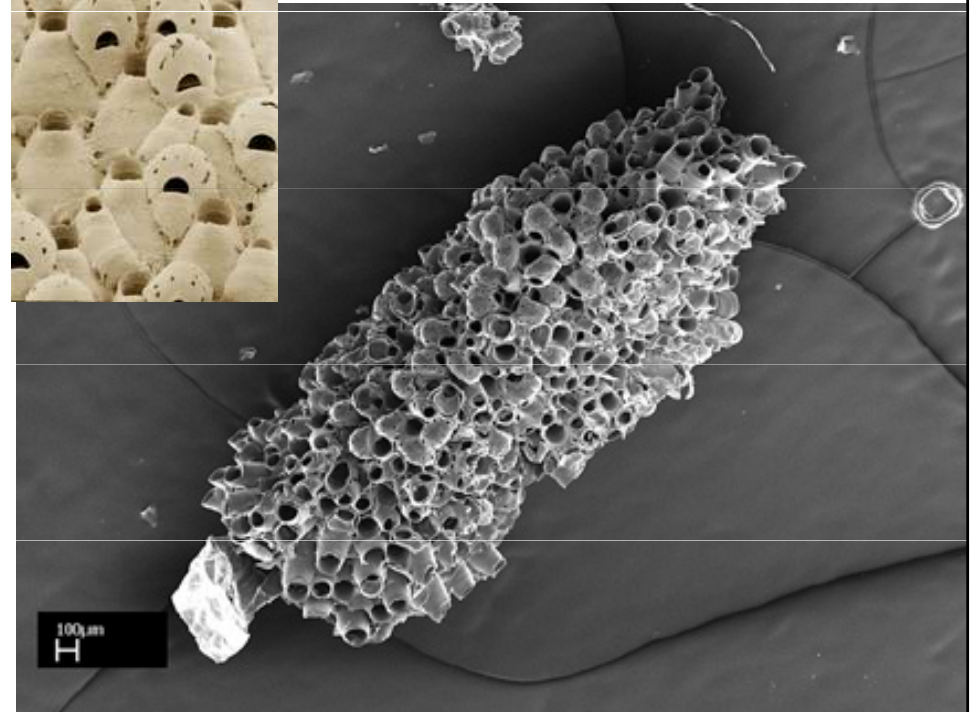
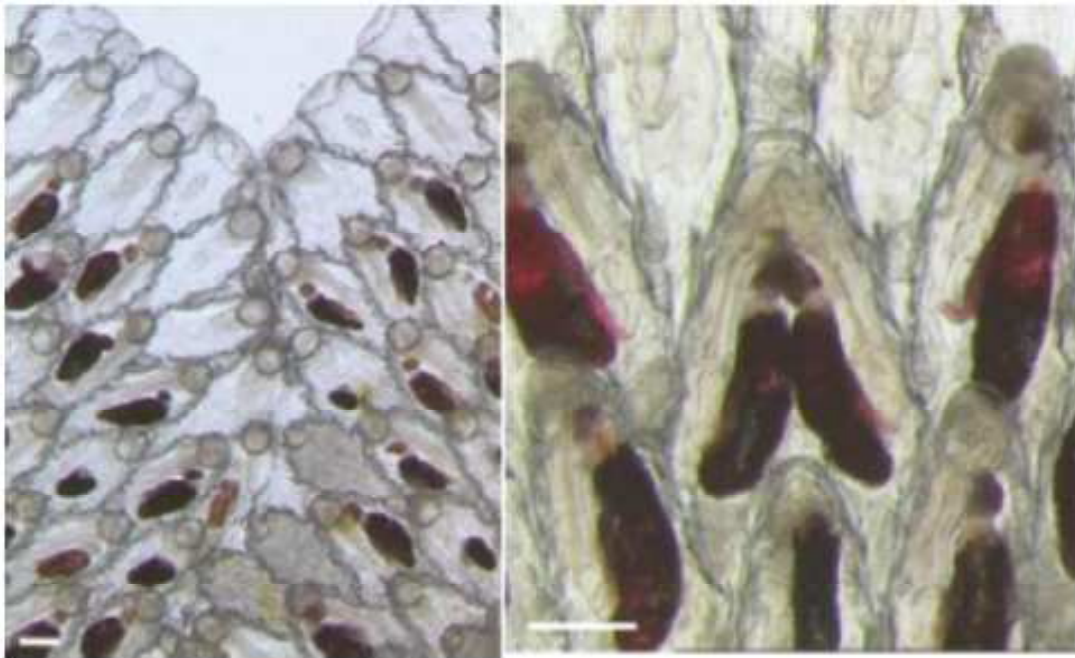
- *Ficus* srůst kořenů různých jedinců
- sumky *Botryllus schlosseri* chimérické kolonie příbuzní jedinci
- *Diplosoma listerianum* i nepřibuzní



Celleporella hyalina (Bryozoa)

Hughes et al. 2004

- Pravděpodobnost fúze koreluje s příbuzností
- Histokompatibilita
- Lepší rozpoznávání v pokročilejších fázích
→ dozrávání imunokompetence
- Speciální proteiny (spongikany...)



Genetické chiméry



- kosman bělovousý *Callithrix jacchus* (asi i *Saguinus*)
- Dizygotická dvojčata
- DNA fingerprinting krve
- Jsou to hematopoietické chiméry
- Během embryonálního vývoje vzájemná výměna buněk kostní dřeně
- Týká se to asi jen krve (neinvazivní metody – chlupy, trus →jeden genotyp)
- Průnik embryonálních erytroblastů a volné DNA přes placentu u člověka
- (pohlaví dítěte před narozením lze určit i pomocí PCR sekvencí typických pro Chr Y, jako templát periferní krev matky)

Genetická identifikace pohlaví

- 1) druhy s nevýrazným pohlavním dimorfismem (ptáci)
- 2) zárodky v ranném stádiu ontogeneze (embrya)
- 3) neinvazivní metody (trus, skořápky, šupiny)

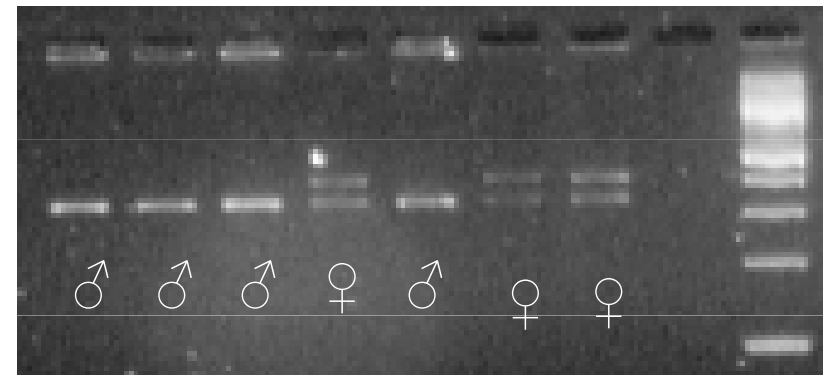
Genetická identifikace pohlaví

- druhy s genetickou determinací pohlaví (tj. nejčastěji pohlavní chromozómy)
- ptáci ($\text{♂}=\text{ZZ}$, $\text{♀}=\text{ZW}$)
- savci ($\text{♂}=\text{XY}$, $\text{♀}=\text{XX}$)
- amplifikace DNA oblasti specifické pro heterogametické pohlaví
- W, Y – malé chromozómy

Určení pohlaví – ptáci

Griffith et al. 1998

- *CHD1W* a *CHD1Z*, geny na pohlavních chromosomech (chromobox-helicase-DNA-binding gene (CHD) – Griffiths & Tiwari 1995)
- Primery amplifikují introny obou genů
- Introny se mohou lišit délkou
- Existují už tři možnosti běžně používaných primerů
- Problematické druhy Struthioniformes



Manorina melanocephala

(Meliphagidae) *Arnold et al. 2001*

- Synové fungují jako pomocníci
- U adultů
2,31 samců na 1 samici
- Mláďata v hnízdě
poměr pohlaví 1:1 (57:57)
- První se líhnou samci
(v 17 hnízdech z 18)
Při opouštění hnízda jsou větší a těžší



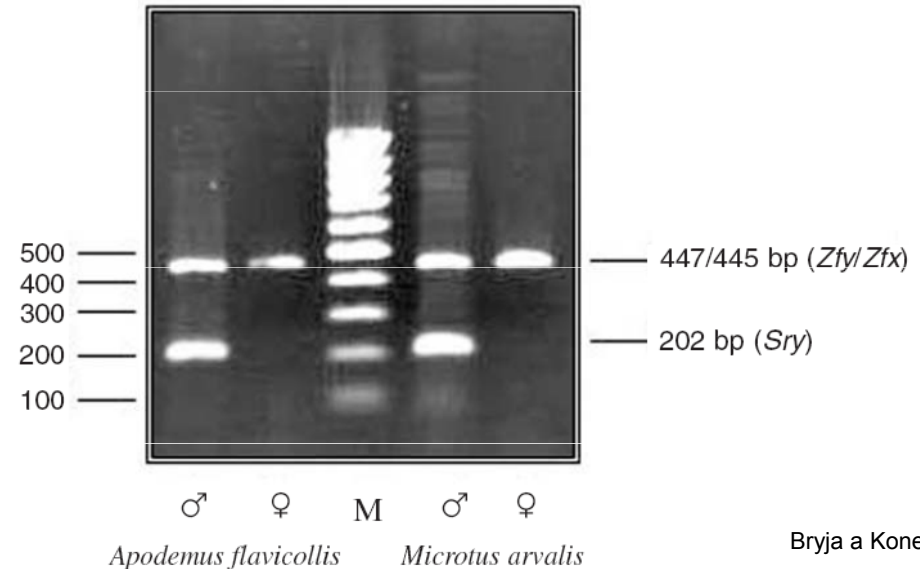
medosavka hlučná

Určení pohlaví - savci

- Amplifikace genu na Chr Y (*Sry*)
(nejlépe duplex PCR s genem na X nebo autosomech)

- *Sry* DNA-binding motif (HMG box)
velmi podobný u vačnatců i placentálů

- *Microtus cabrerae*
Sry na Chr X
Ellobius, *Tokudaia*
Sry zcela chybí
- *Nannomys*
Velká variabilita



Bryja a Konečný 2003

M. cabrerae



Ellobius



Nannomys



Tokudaia osimensis



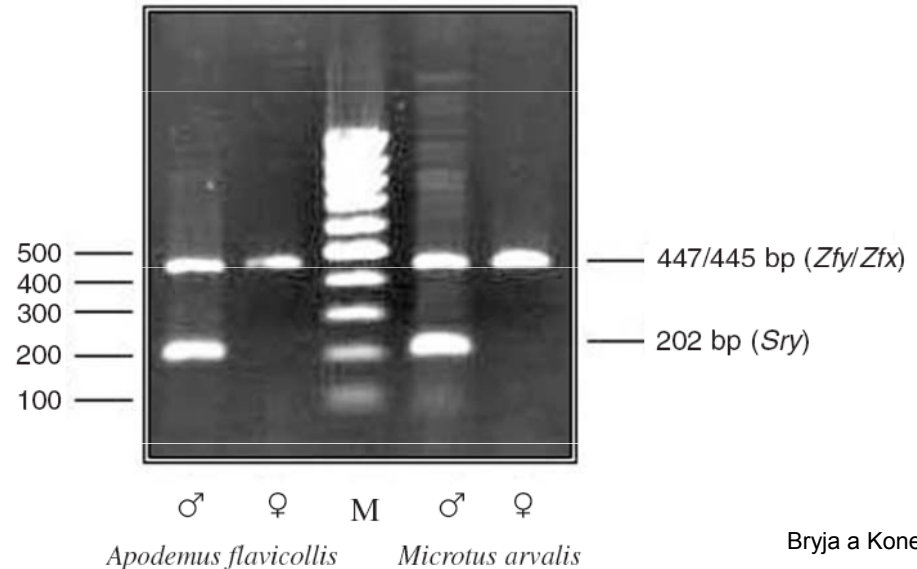
© 奄美野生生物保護センター

Určení pohlaví - savci

- Amplifikace genu na Chr Y (*Sry*)
(nejlépe duplex PCR s genem na X nebo autosomech)

- *Sry* DNA-binding motif (HMG box)
velmi podobný u vačnatců i placentálů

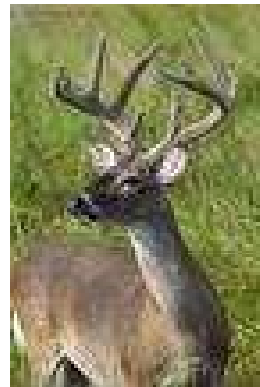
- Analýzy z trusu: nutno používat druhově specifické markery
(jinak cross-amplification s druhy tvořícími potravu)



Bryja a Konečný 2003



X



Murphy et al. 2003

Určení pohlaví – jiné skupiny

- Chr Y občas i u rostlin
Rumex
- Plazi
Calotes versicolor
Sry má i 50% samic!
- Hledání markerů pomocí nescifických metod (RAPD, AFLP)

