

# 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

# Identifikace druhů

# Definice druhu

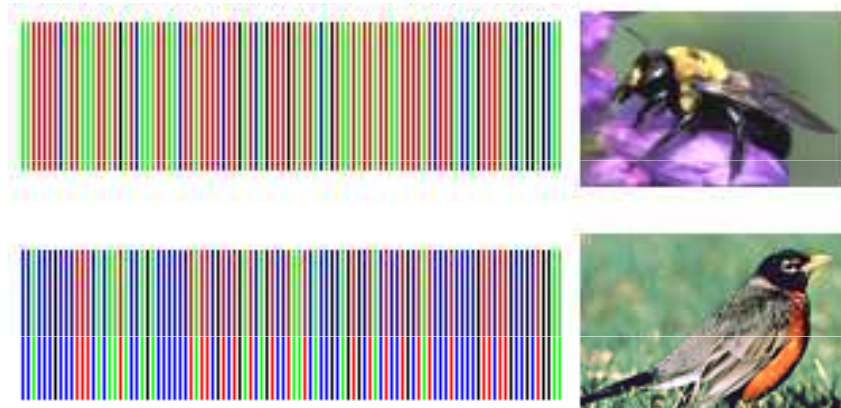
- Koncept **biologického druhu** (Mayr, 1942) – RIM = post- nebo prezygotické bariéry toku genů (ne vždy tak jednoduché – hybridní zóny, alopatická speciace, asexuální druhy atd.)

## Proč je vůbec potřeba druhu určovat?

- Ochranařská biologie – je nutno rozhodnout o taxonomické jednotce (druhu), která vyžaduje pozornost
- Forezní genetika, vývojová stadia bez determinačních znaků, identifikace kořisti v trávicím traktu predátorů, atd.

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.



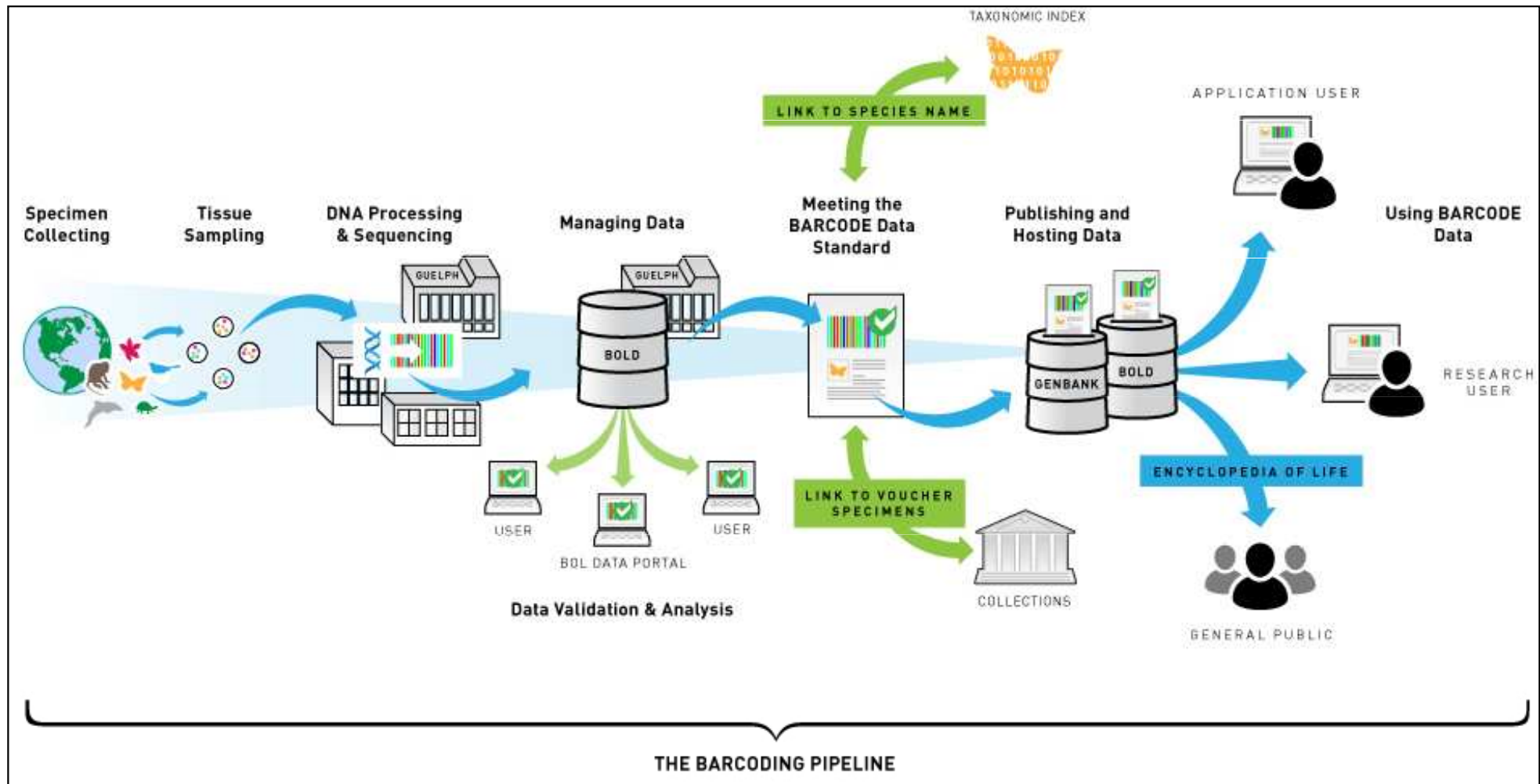
# Biological identifications through DNA barcodes

Paul D. N. Hebert\*, Alina Cywinska, Shelley L. Ball  
and Jeremy R. deWaard

Department of Zoology, University of Guelph, Guelph, Ontario N1G 2W1, Canada

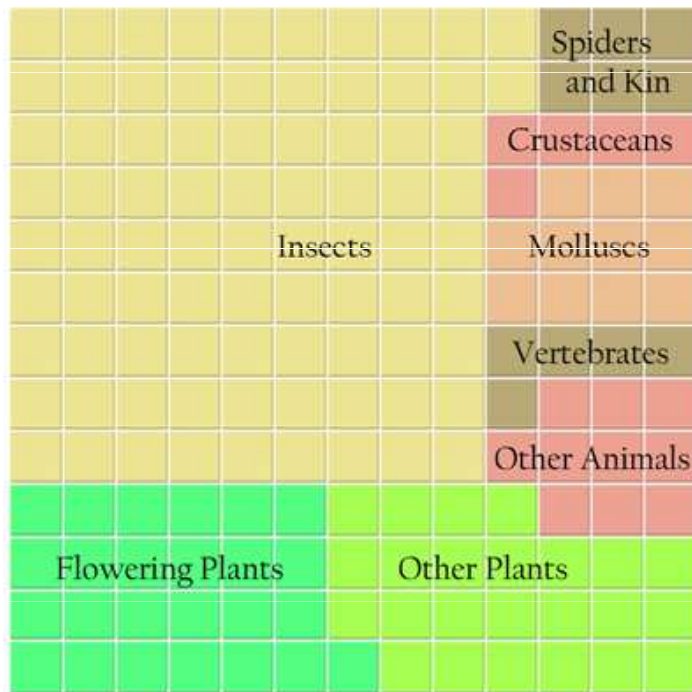


first idea in 2003



# Why barcode animal and plant species?

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

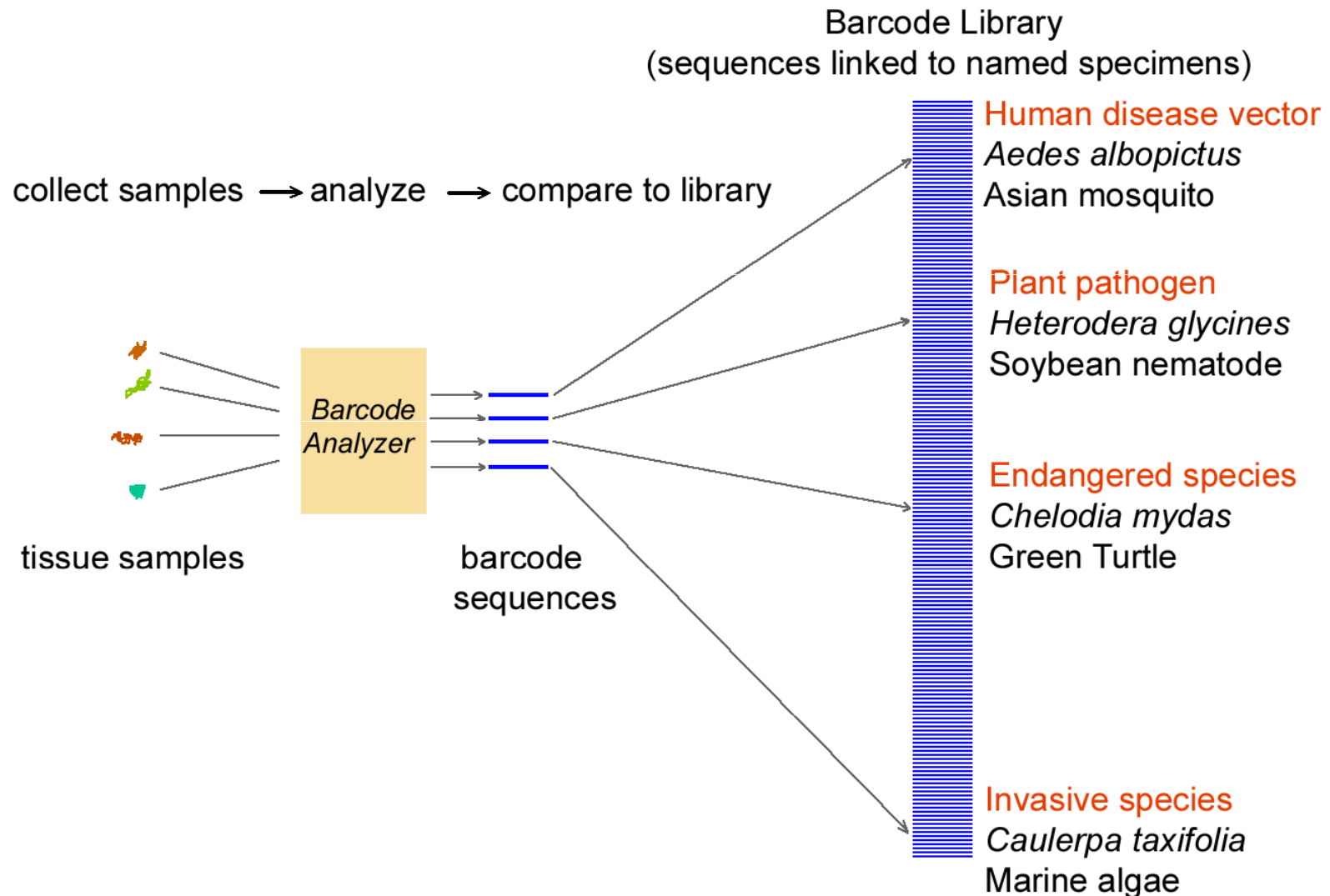


1 square = 10,000 species

Estimated Biodiversity  
*10 million species*



## 2. What are the benefits of standardization?



- 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 markers are genes on cpDNA: **matK** and **rbcL**
- For bacteria, a **16S-rDNA** emerges as very useful marker (especially in using next-generation sequencing)



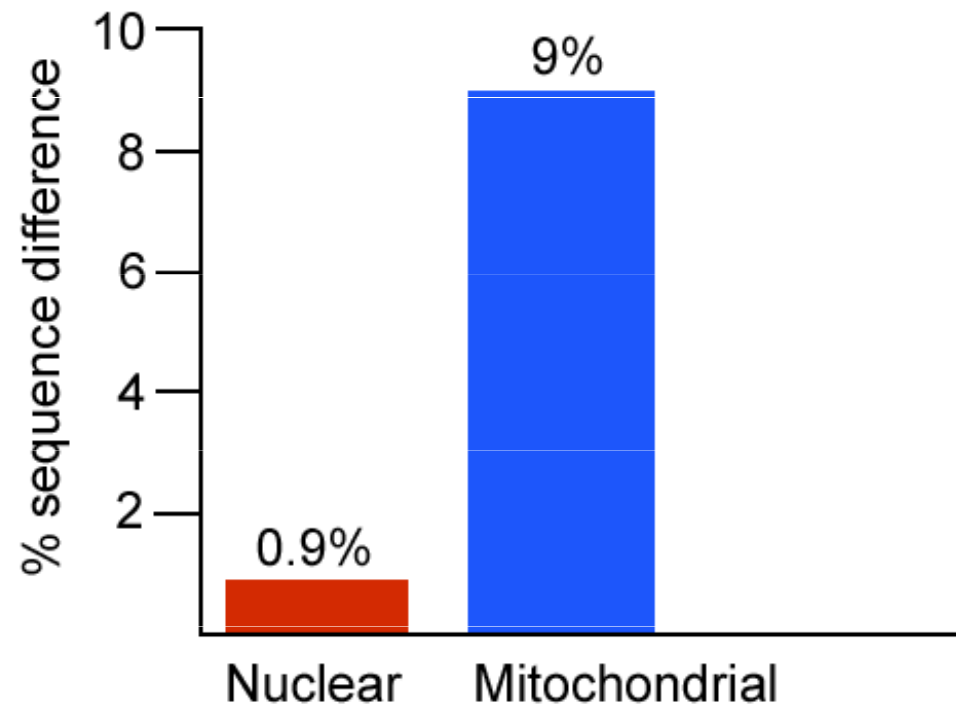
## Why barcode animals with mitochondrial DNA?

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



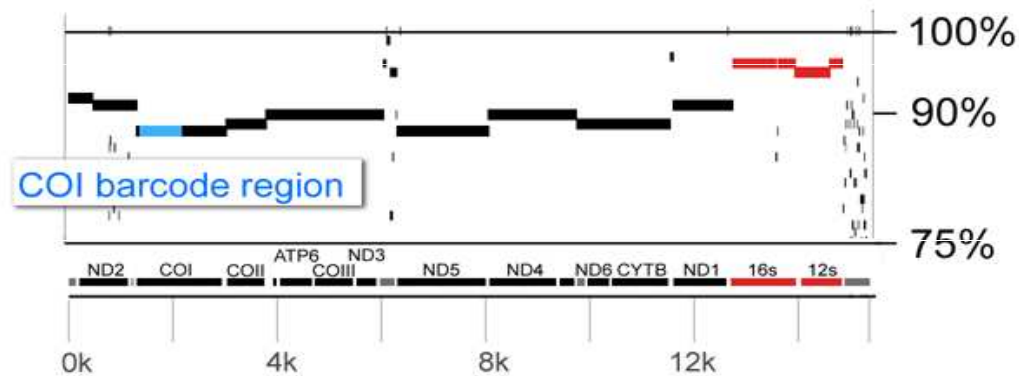
- **Copy number.** There are 100-10,000 more copies of mitochondrial than nuclear DNA per cell, making recovery, especially from small or partially degraded samples, easier and cheaper.
- **Relatively few differences within species** in most cases. Small intraspecific and large interspecific differences 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.

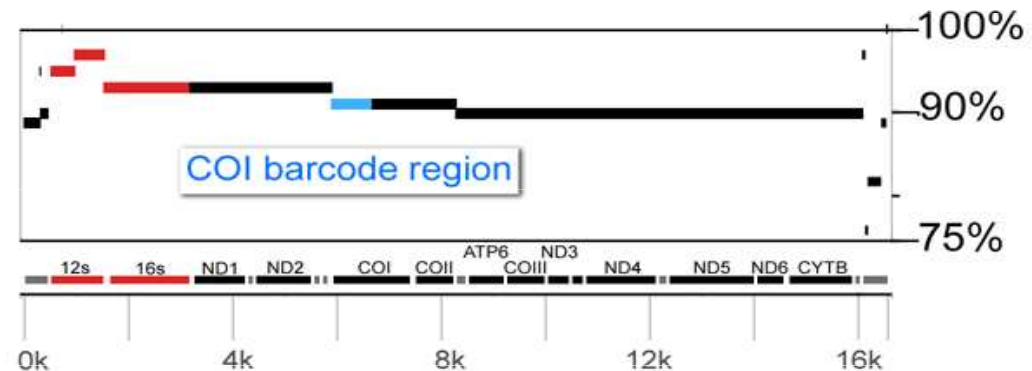
Possible gains in accuracy or cost using a different protein-coding gene would likely be small.

Percent identity plot (PIP) analysis of complete mitochondrial genomes

*Anopheles gambiae*  
vs.  
*A. quadrimaculatus*



*Homo sapiens*  
vs.  
*Pan troglodytes*



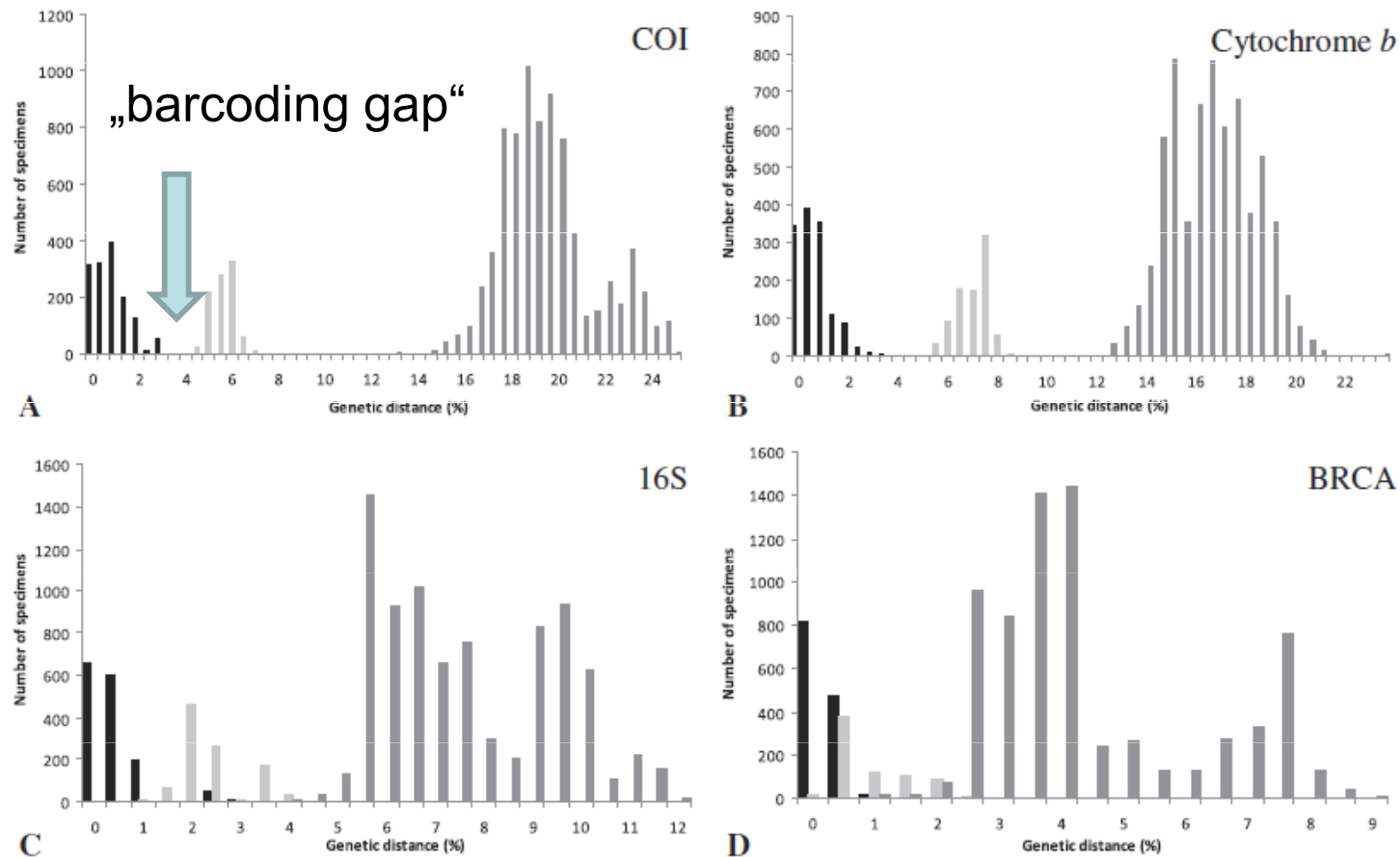
— protein coding gene  
— ribosomal RNA gene

## 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 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, molecular taxonomy, and exploration of the diversity of shrews (Soricomorpha: Soricidae) on Mount Nimba (Guinea)

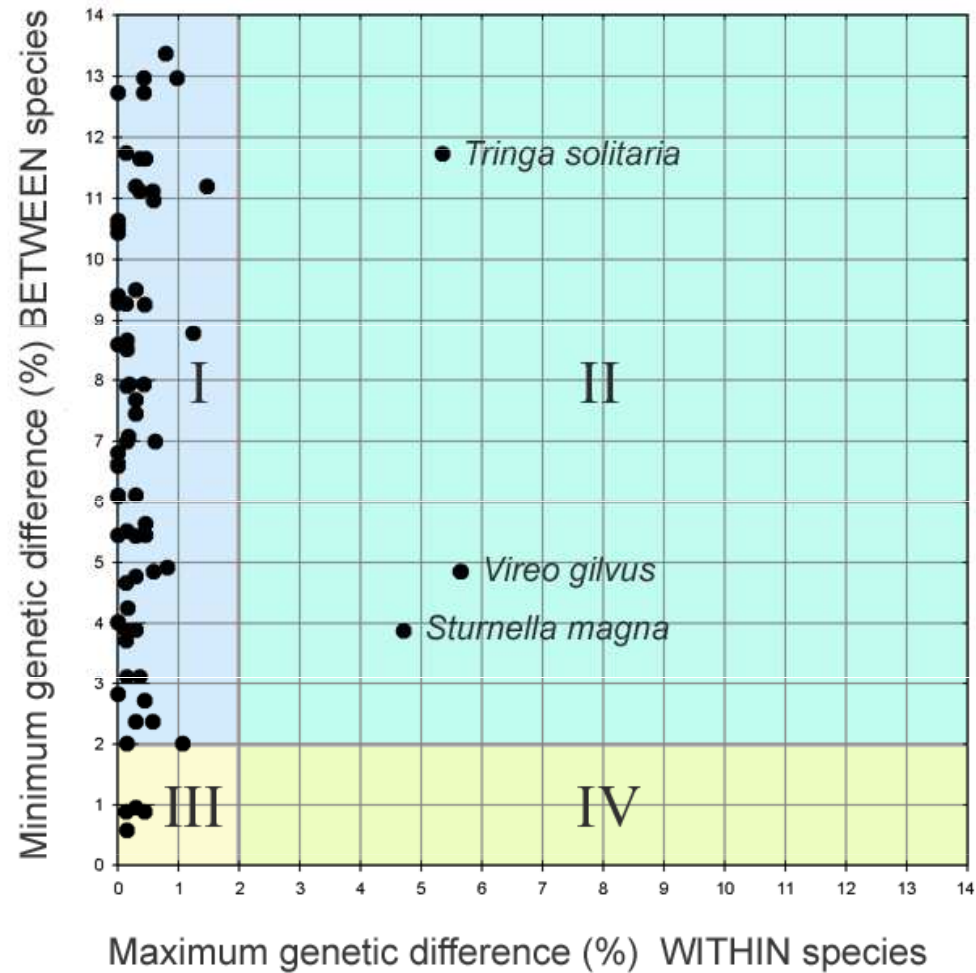
FRANÇOIS JACQUET<sup>1\*</sup>, VIOLAINE NICOLAS<sup>1</sup>, CELINE BONILLO<sup>2</sup>,  
CORINNE CRUAUD<sup>3</sup> and CHRISTIANE DENYS<sup>1</sup>



**Figure 3.** Histograms of divergence percentage values between all sequences. Black, intraspecific distances; light grey, interspecific distances amongst clade C; dark grey, interspecific distances excluding clade C. All sequences were corrected using the Kimura two-parameter substitution model. Sequences corresponding to nuclear copies of cytochrome *b* were excluded from the analysis. BRCA, breast cancer gene; COI, cytochrome oxidase I.

# Barcoding North American birds

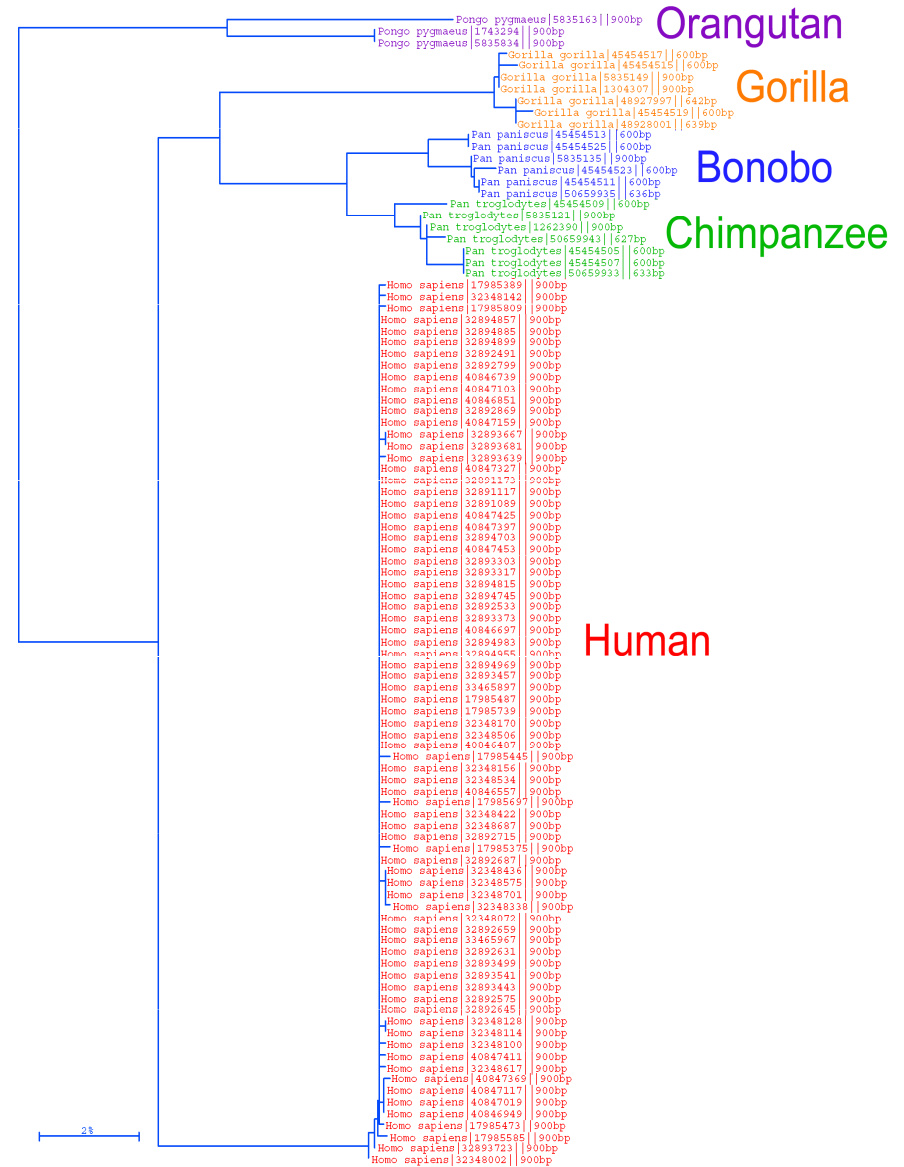
Interspecific vs. intraspecific COI barcode differences



Tak co třeba znamená toto?

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

# What *isn't* DNA Barcoding?

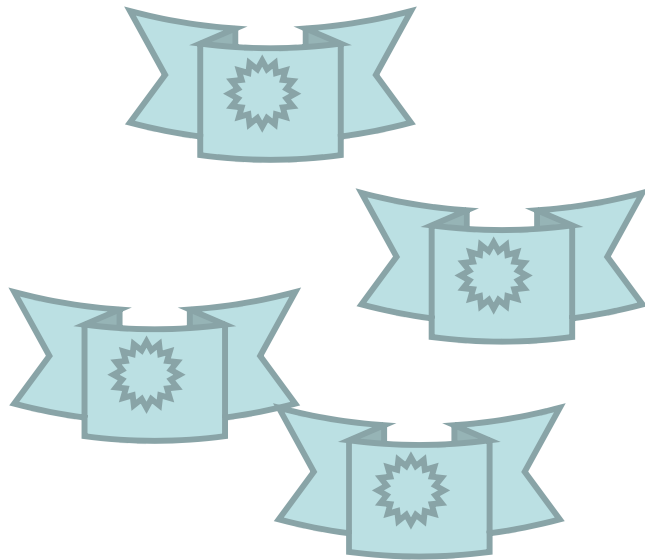


- It is not intended to, in any way, supplant or invalidate existing taxonomic practice.
- It is not DNA taxonomy; it does not equate species identity, formally or informally, with a particular DNA sequence.
- It is not intended to duplicate or compete with efforts to resolve deep phylogeny (e.g., *Assembling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

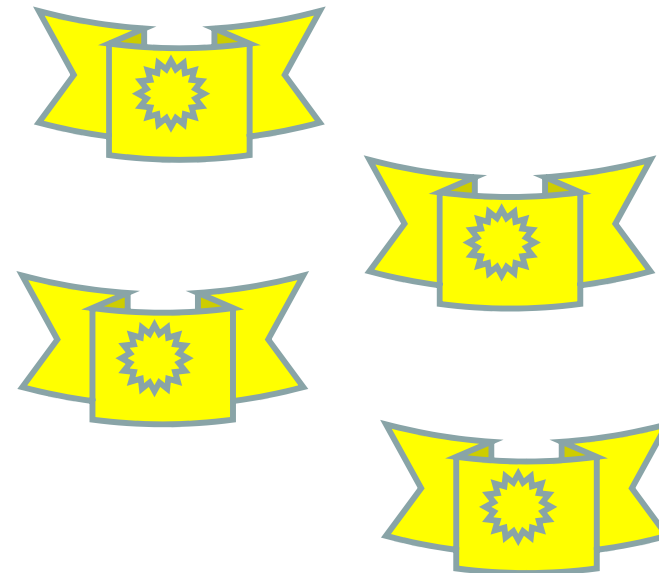
# What are the main limits to barcoding encountered so far?

- 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

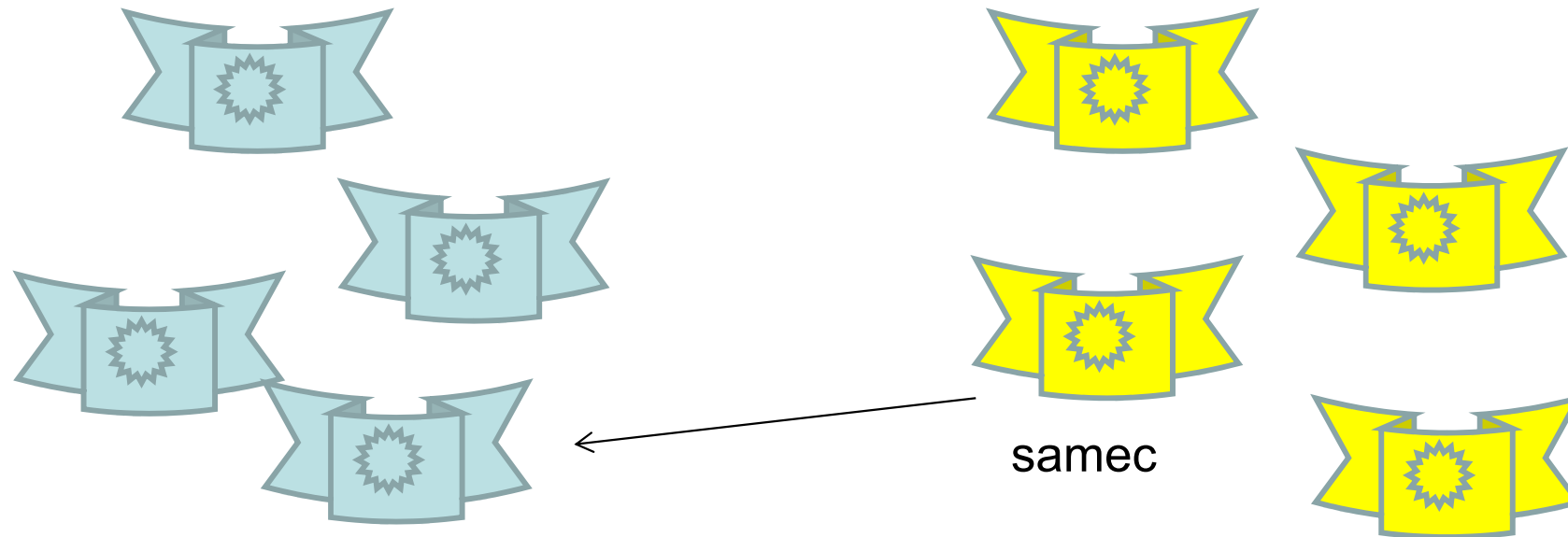


*M. myotis* - Evropa



*M. blythii* - Asie

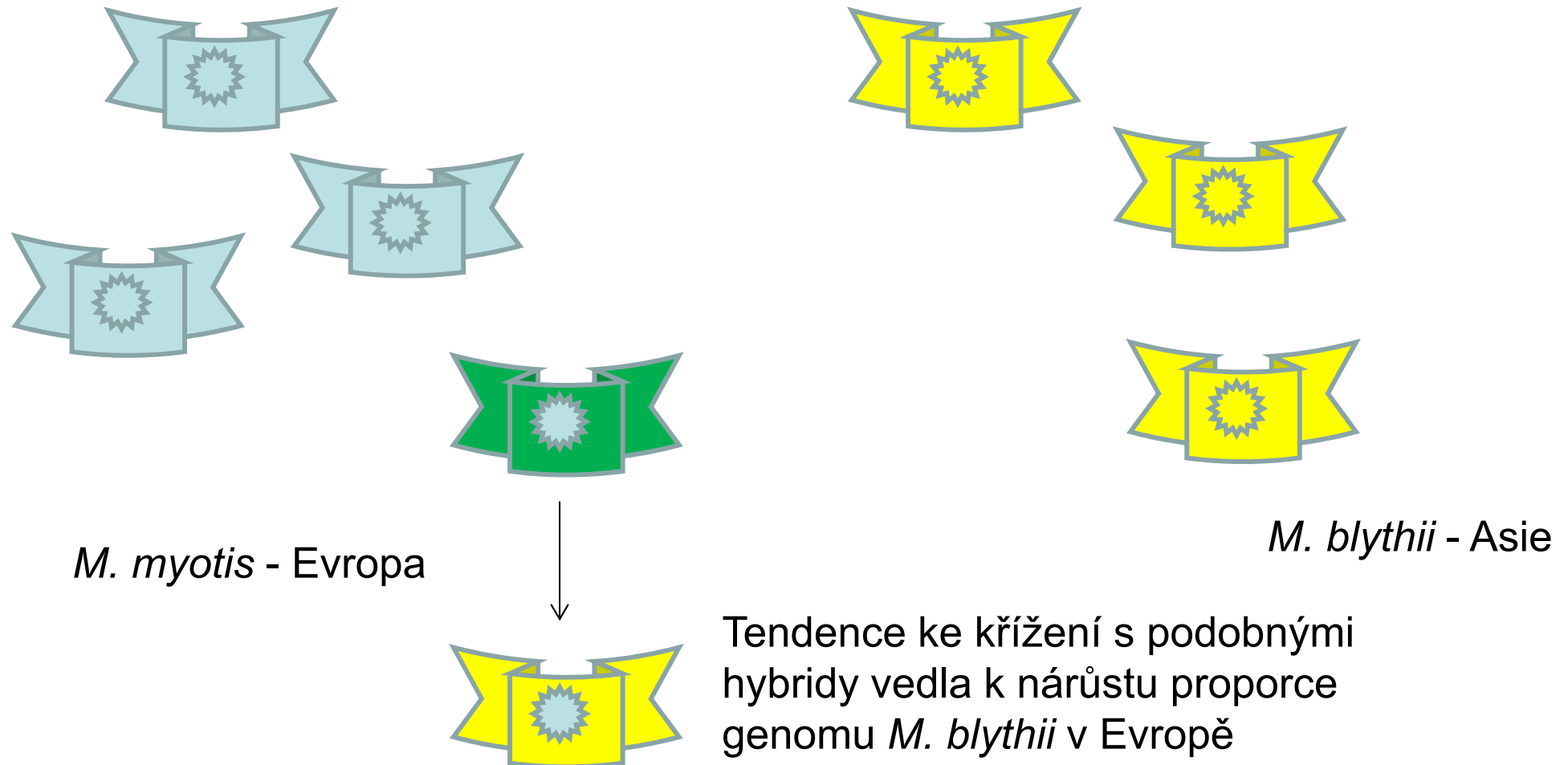
# Příklad: *Myotis blythii* vs. *Myotis myotis* - introgrese mtDNA



*M. myotis* - Evropa

*M. blythii* - Asie

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



Kolonizující (invazní) druh „ukradne“ mtDNA původnímu druhu (Currat et al. 2008)

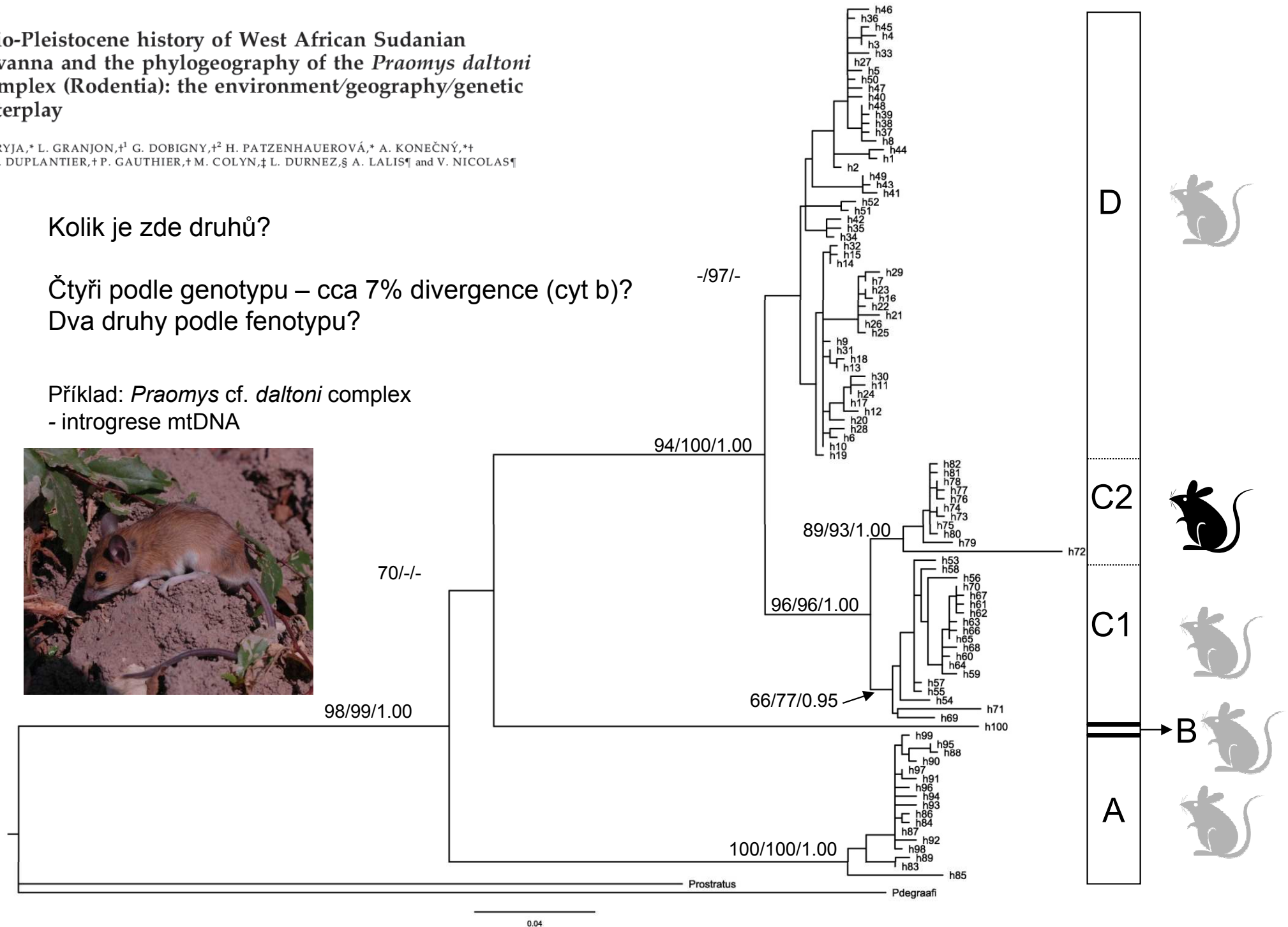
# Plio-Pleistocene history of West African Sudanian savanna and the phylogeography of the *Praomys daltoni* complex (Rodentia): the environment/geography/genetic interplay

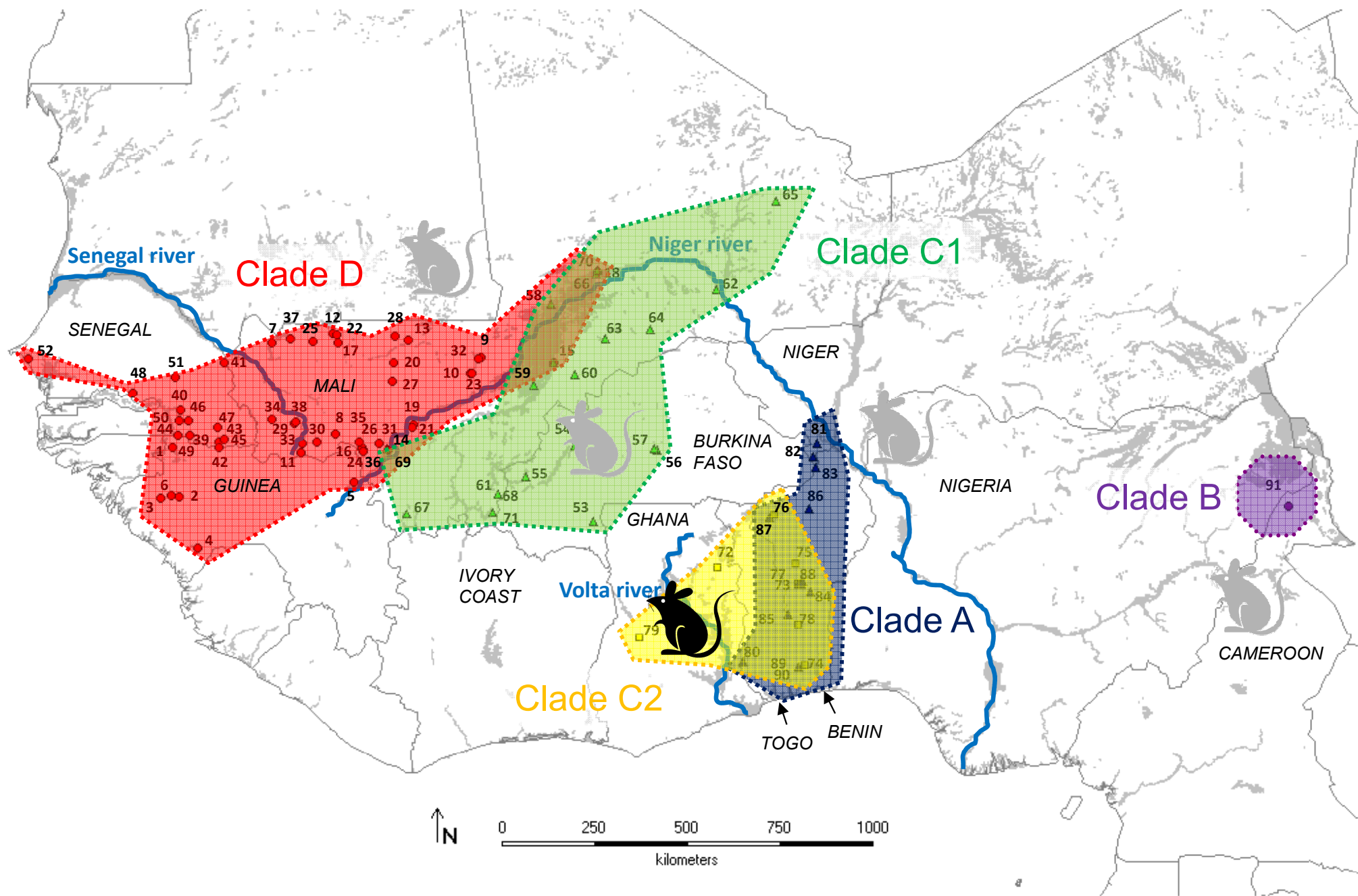
J. BRYJA,\* L. GRANJON,<sup>†1</sup> G. DOBIGNY,<sup>‡2</sup> H. PATZENHAUEROVÁ,\* A. KONEČNÝ,<sup>††</sup>  
J. M. DUPLANTIER,<sup>†</sup> P. GAUTHIER,<sup>†</sup> M. COLYN,<sup>‡</sup> L. DURNEZ,<sup>§</sup> A. LALIS<sup>¶</sup> and V. NICOLAS<sup>¶</sup>

Kolik je zde druhů?

Čtyři podle genotypu – cca 7% divergence (cyt b)?  
Dva druhy podle fenotypu?

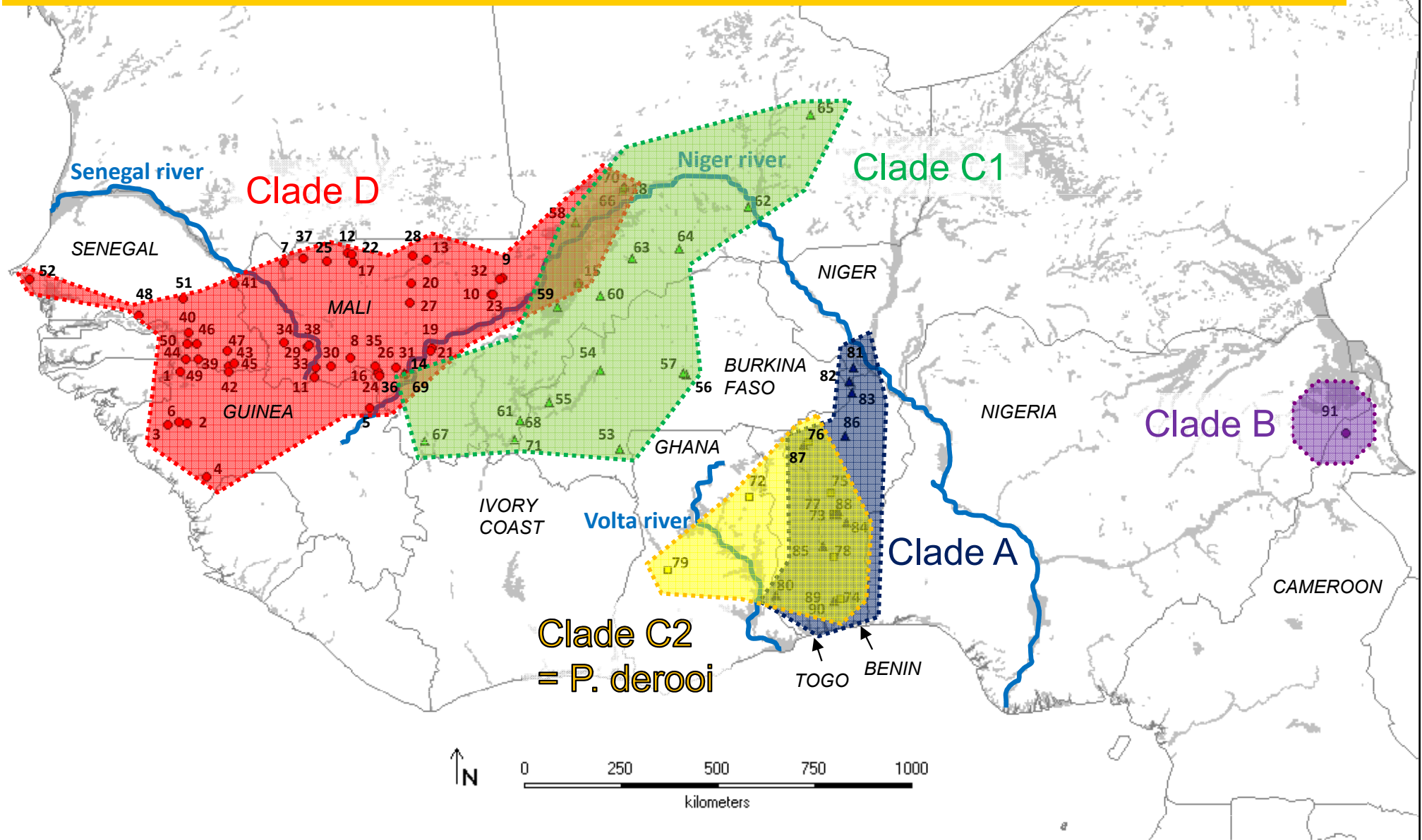
Příklad: *Praomys cf. daltoni* complex  
- introgrese mtDNA



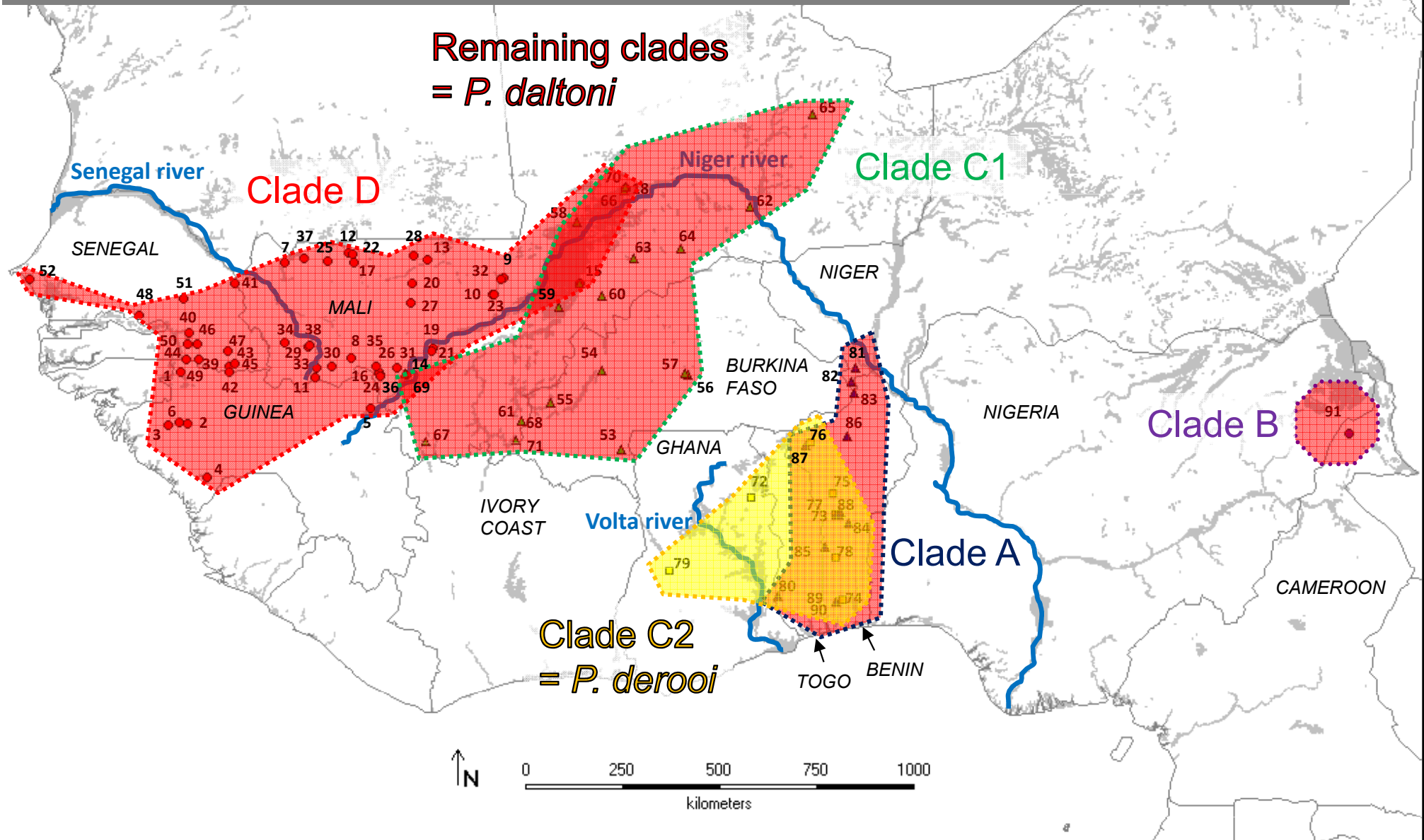




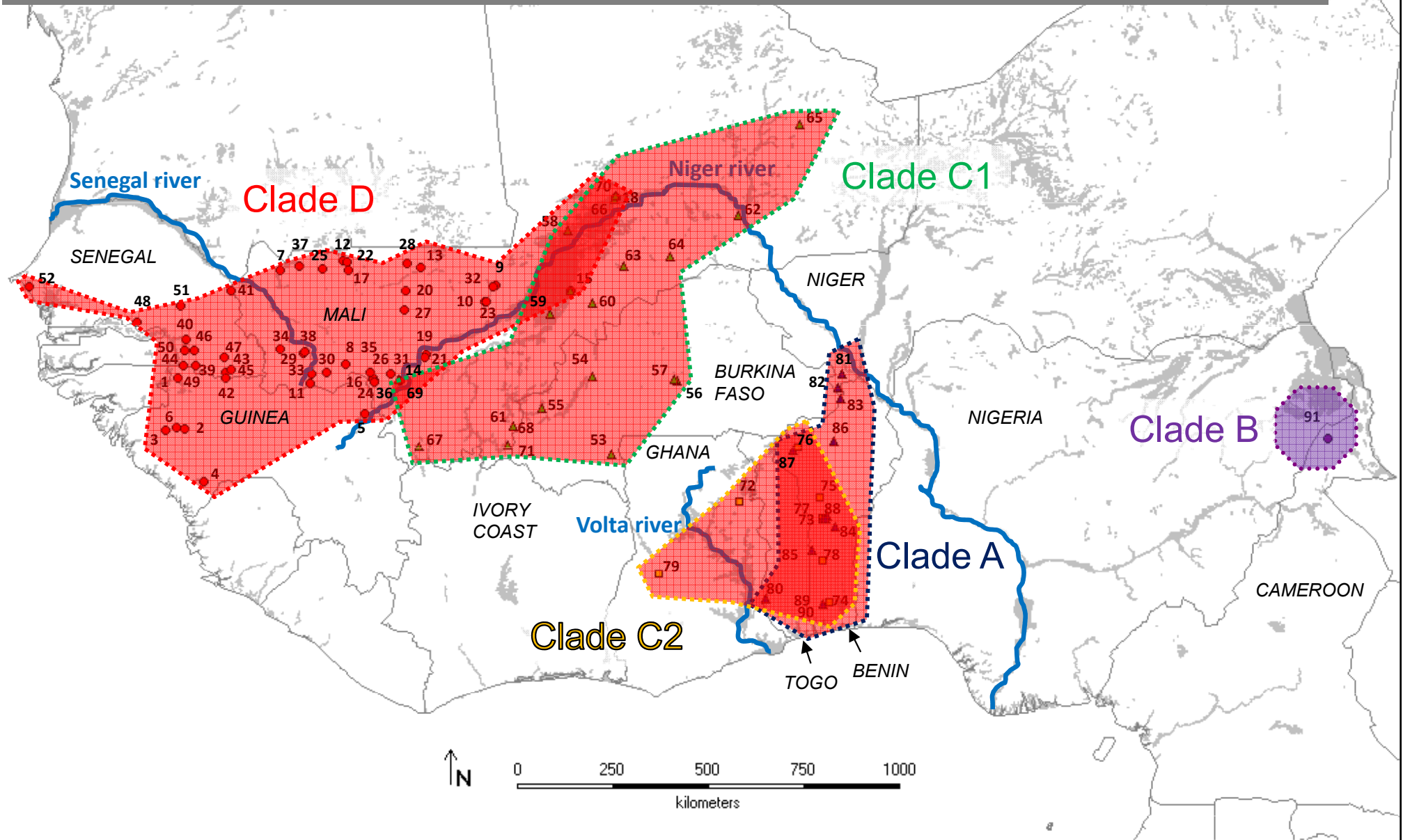
# What is species???



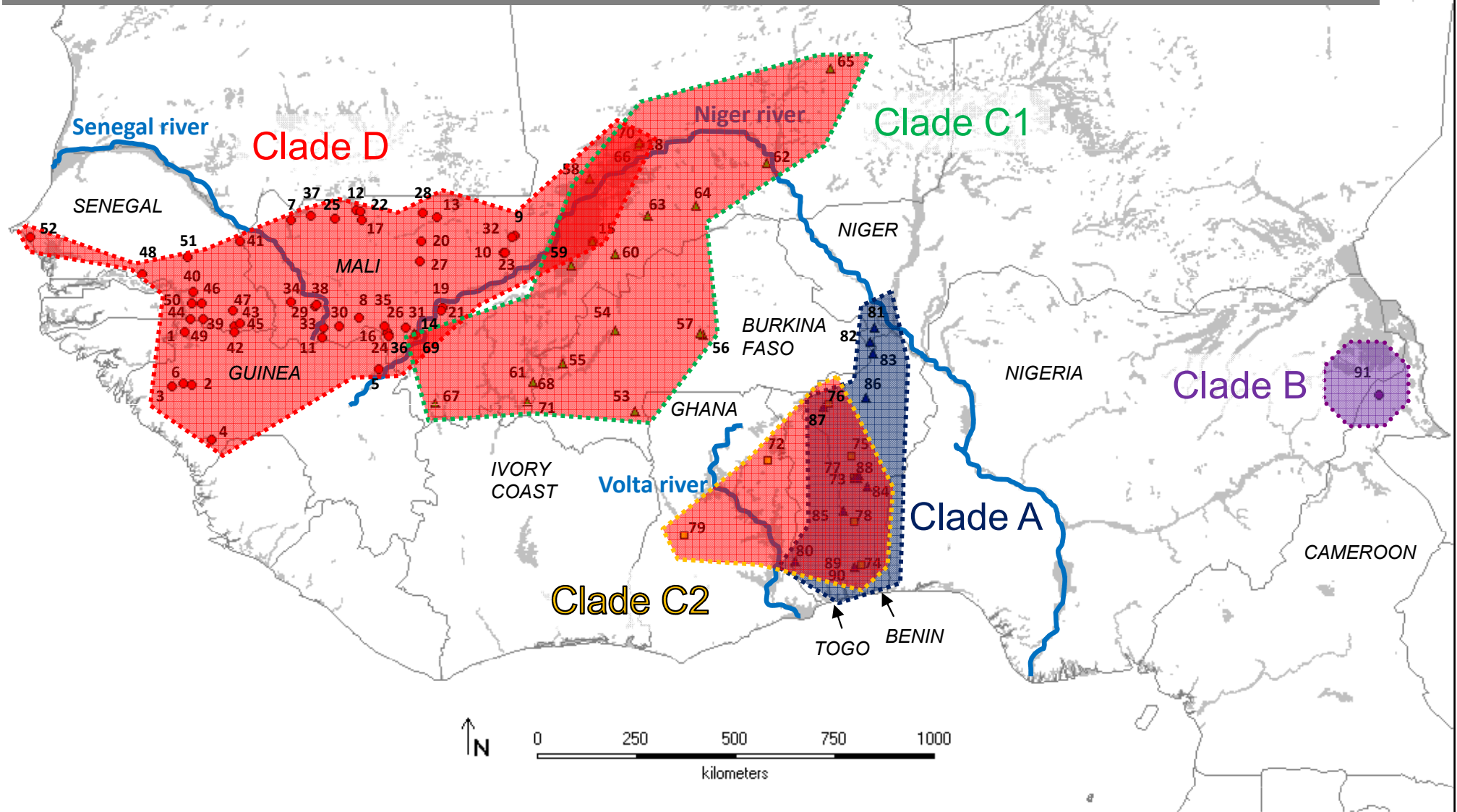
# Morphology and ecology



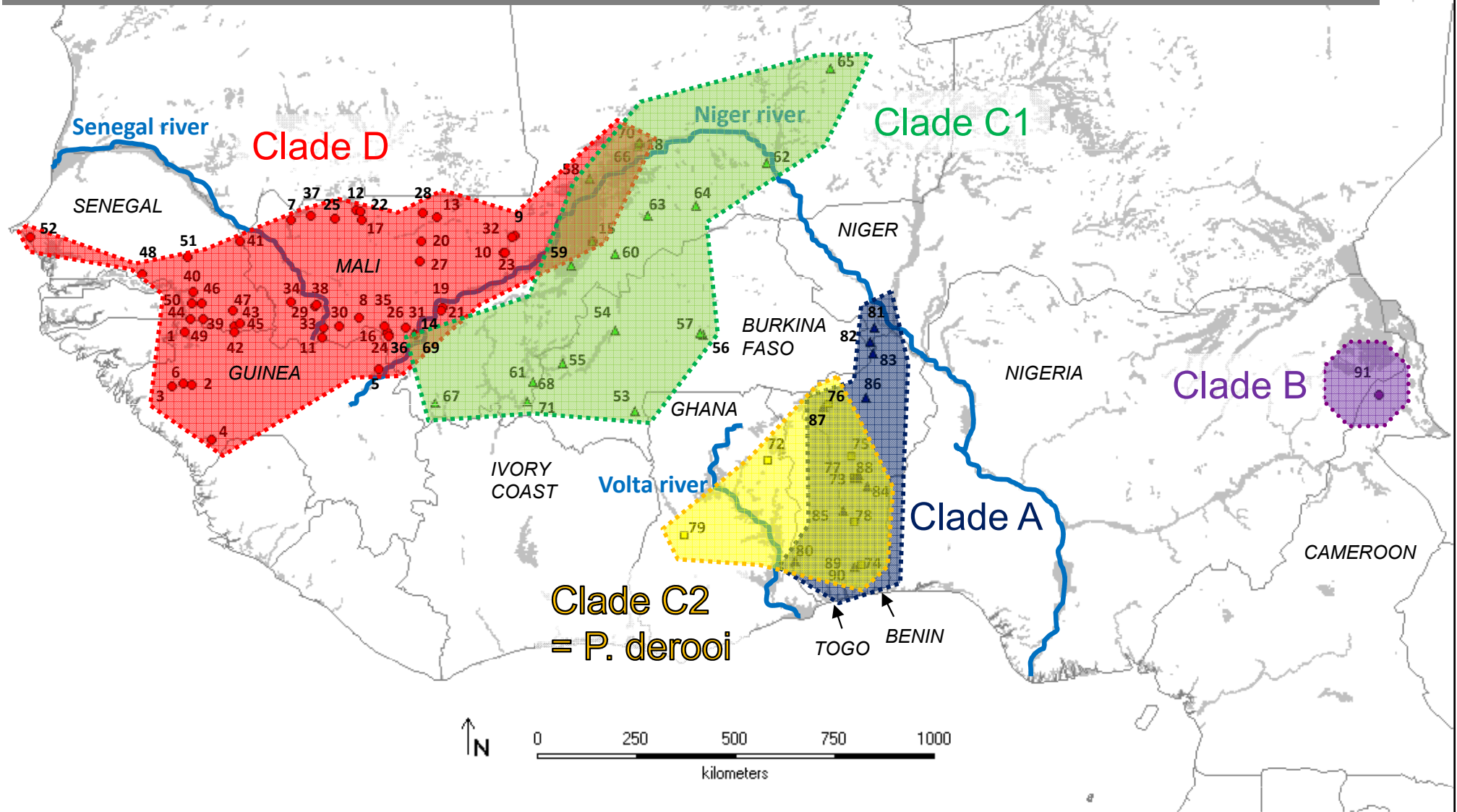
# Karyotypes



# 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 jedinců

# 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

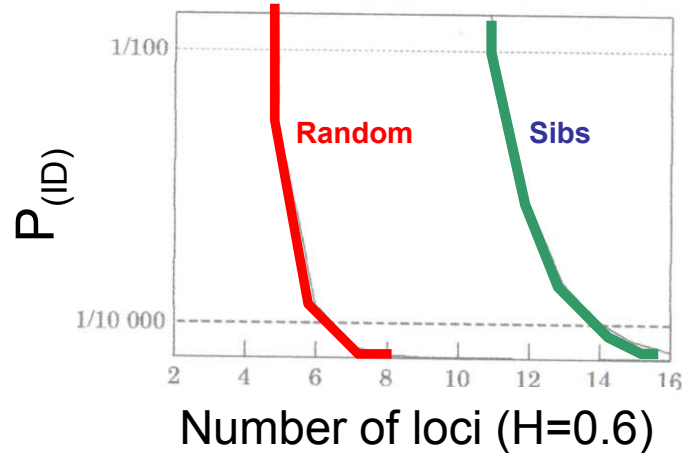




# Identifikace jedinců závisí na stupni polymorfismu

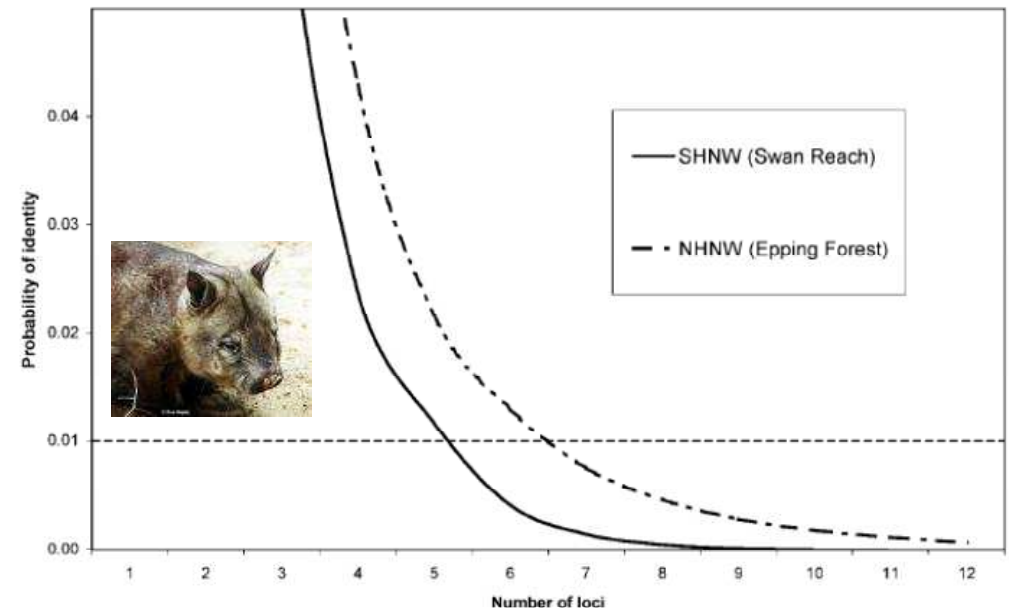
- multilocus microsatellite fingerprinting – power estimated as „probability of identity“ ( $P_{(ID)}$ ) (Waits et al. 2001)

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



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

- 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

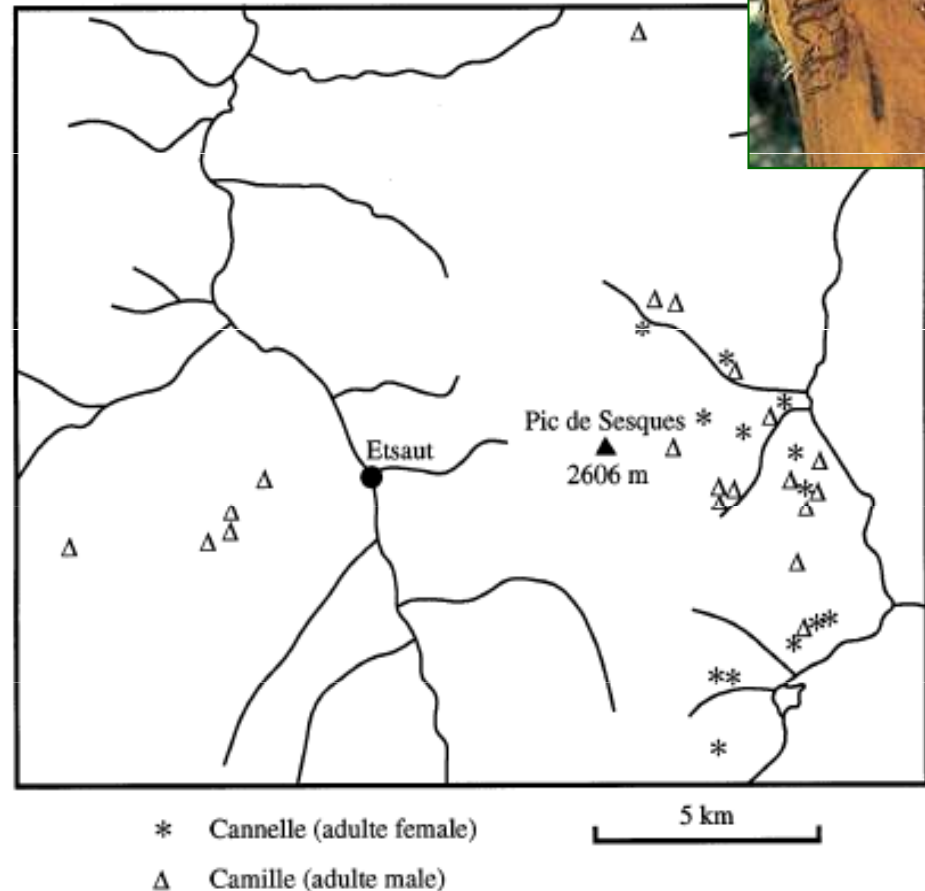


Fig. 3 Home range of two Pyrenean brown bears obtained by noninvasive genetic sampling and genotyping.

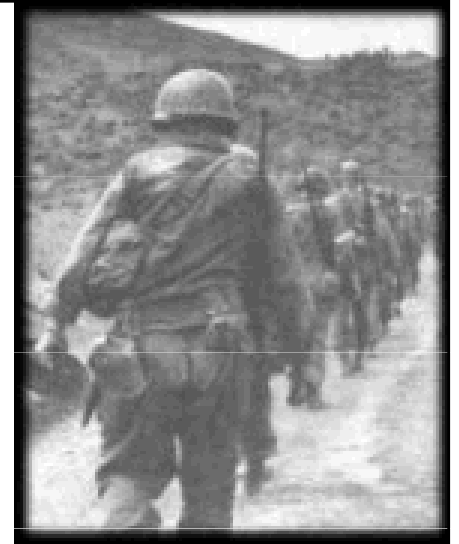
# Lidská forenzní genetik

- **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



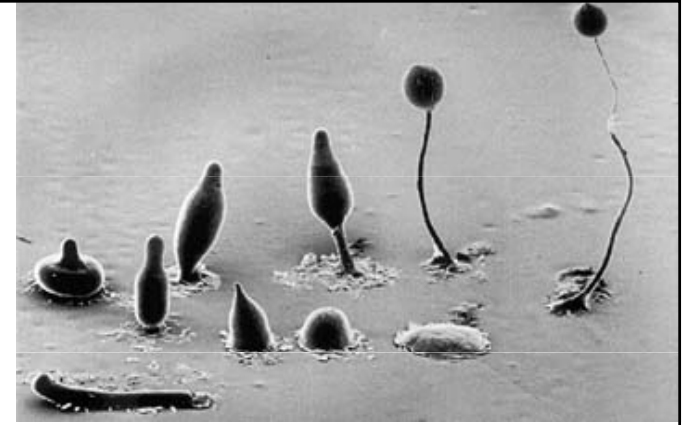
# Slavní klonální bezobratlí

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

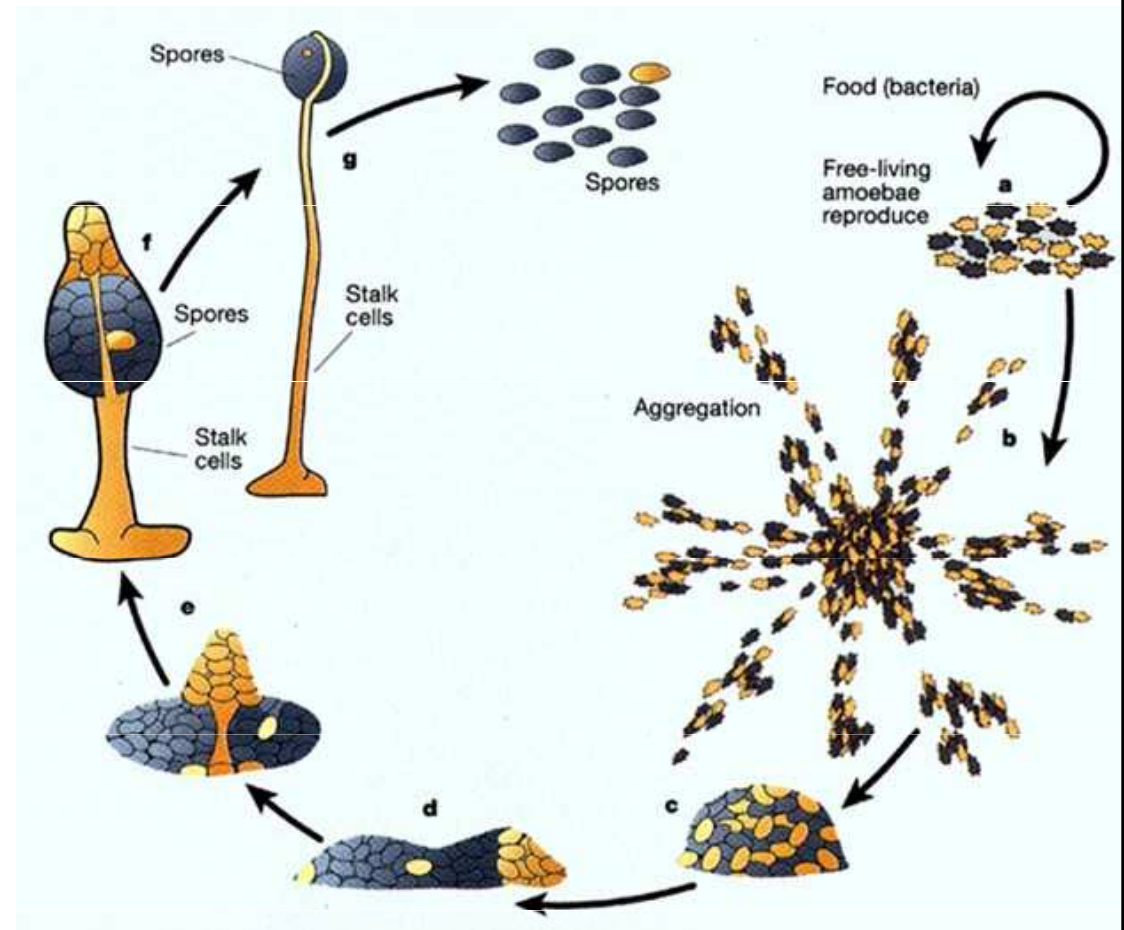


*Darwinula stevensoni*

# Genetické chiméry

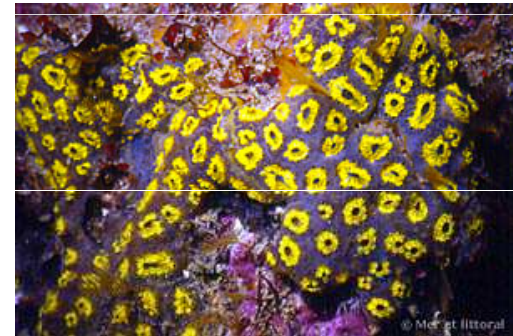


- organismy složené z buněk s různými genotypy
- *Dictyostelium discoideum*  
chimérismus je pravidelná součást života



# Genetické chiméry

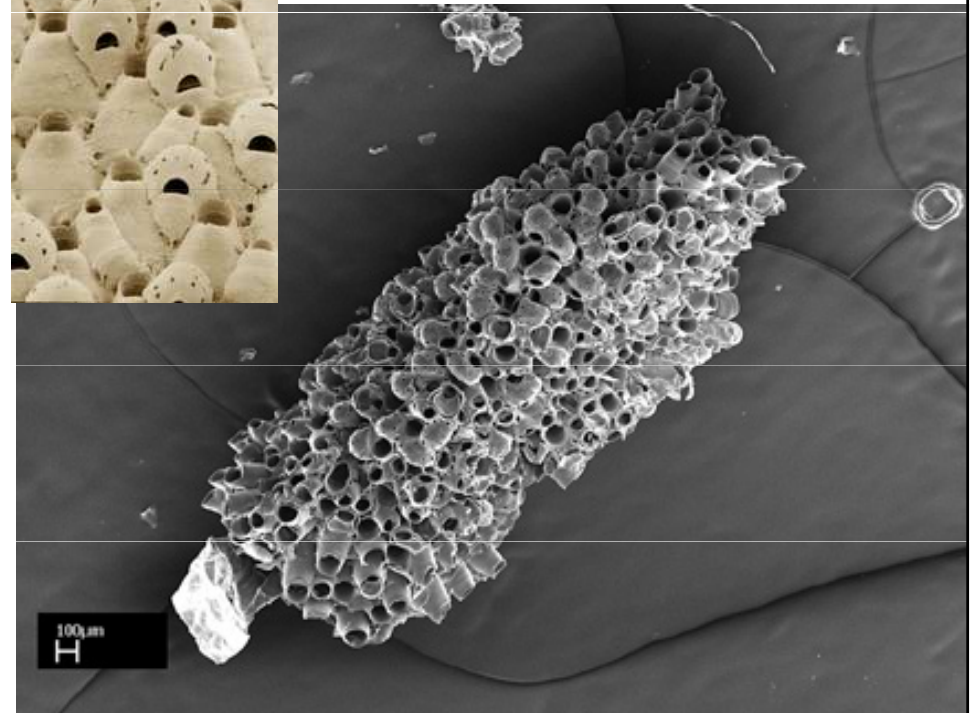
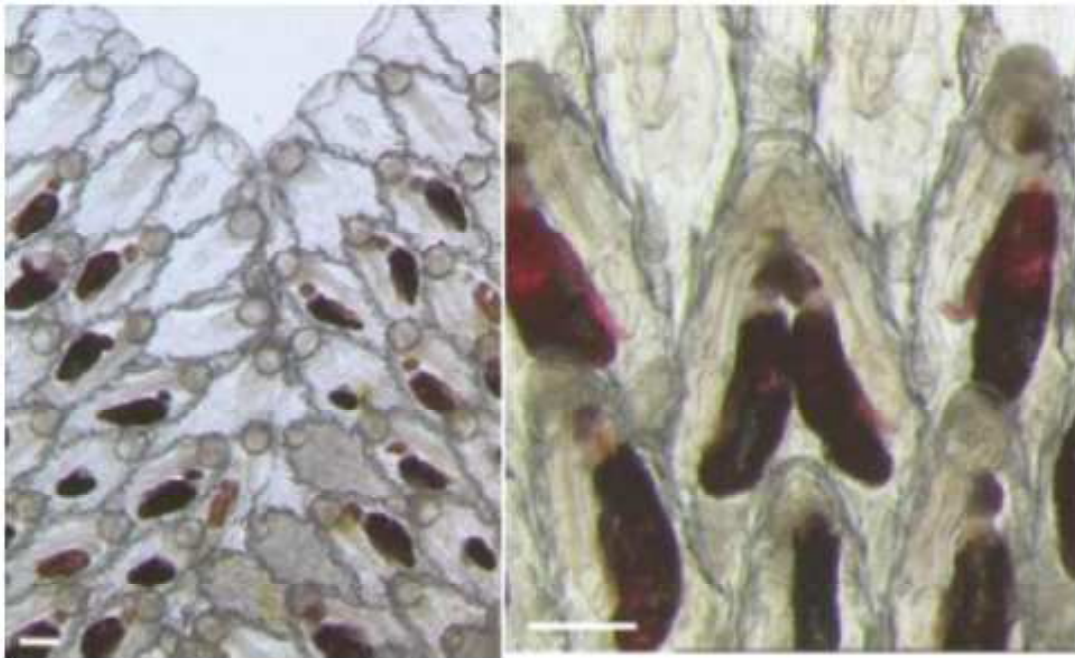
- *Ficus* srůst kořenů různých jedinců
- sumky *Botryllus schlosseri* chimérické kolonie příbuzní jedinci
- *Diplosoma listerianum* i nepřibuzní



# *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)

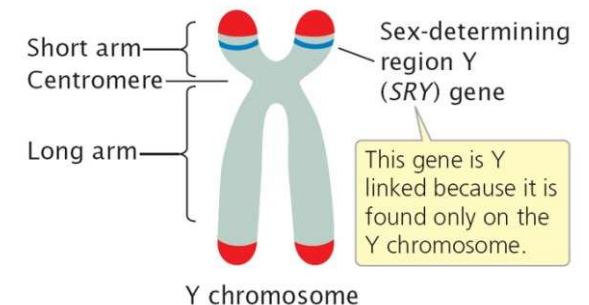
# Identifikace pohlaví

# 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

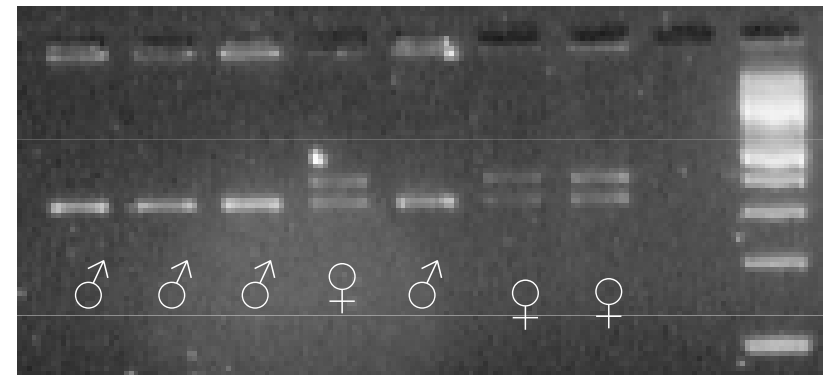
- druhy s genetickou determinací pohlaví (tj. nejčastěji pohlavní chromozómy)
- ptáci ( $\text{♂} = ZZ$ ,  $\text{♀} = ZW$ )
- savci ( $\text{♂} = XY$ ,  $\text{♀} = XX$ )
- amplifikace DNA oblasti specifické pro heterogametické pohlaví
- W, Y – malé chromozómy



# 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*

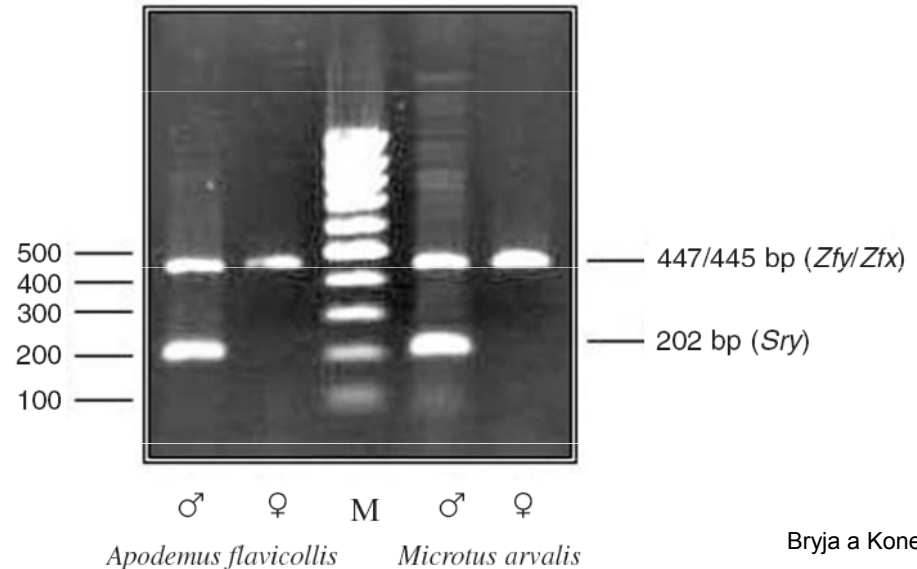
- Synové fungují jako pomocníci
- U adultů  
2,31 samců na 1 samici
- Mláďata v hnízdě  
poměr pohlaví 1:1 (57:57)
- První se líhnou samci  
(v 17 hnízdech z 18)  
Při opouštění hnízda jsou větší a těžší



medosavka hlučná

# Určení pohlaví - savci

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



Bryja a Konečný 2003

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

*M. cabrerae*



*Nannomys*



*Ellobius*



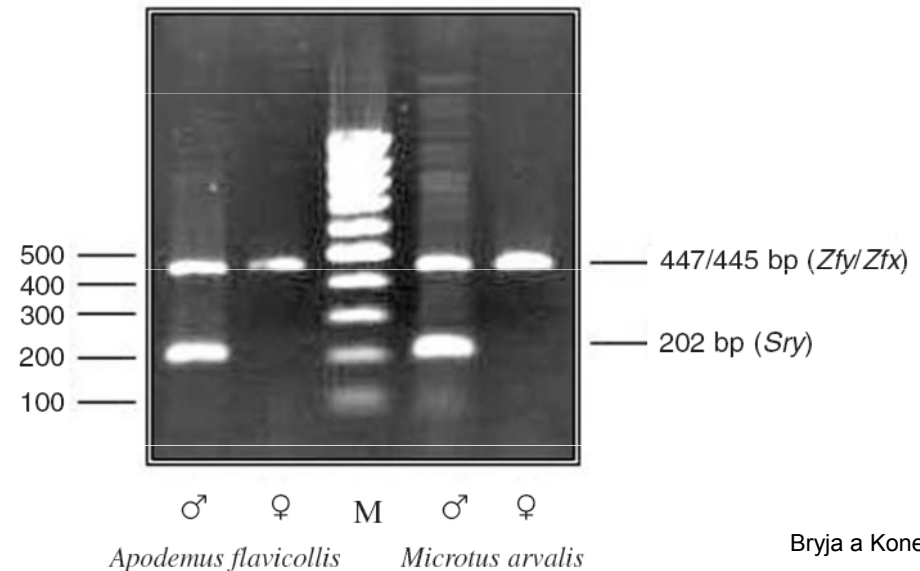
*Tokudaia osimensis*



© 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)

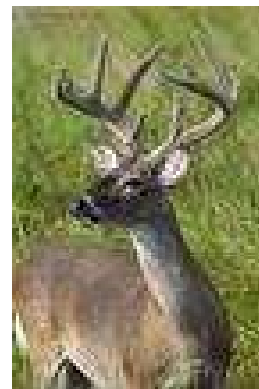


Bryja a Konečný 2003

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



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 nspecifických metod (RAPD, AFLP)

