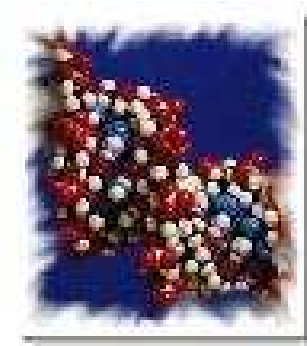
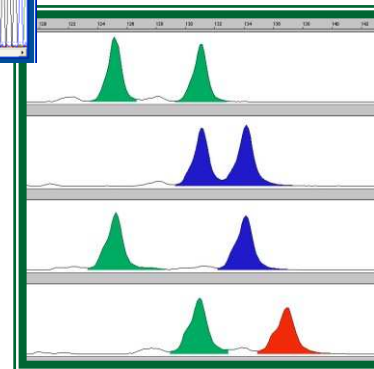
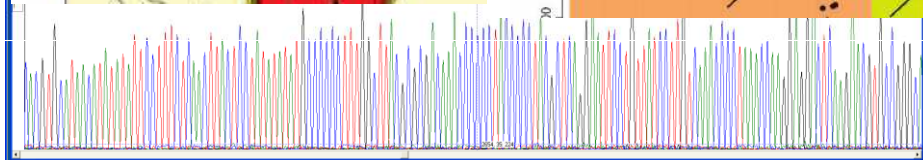
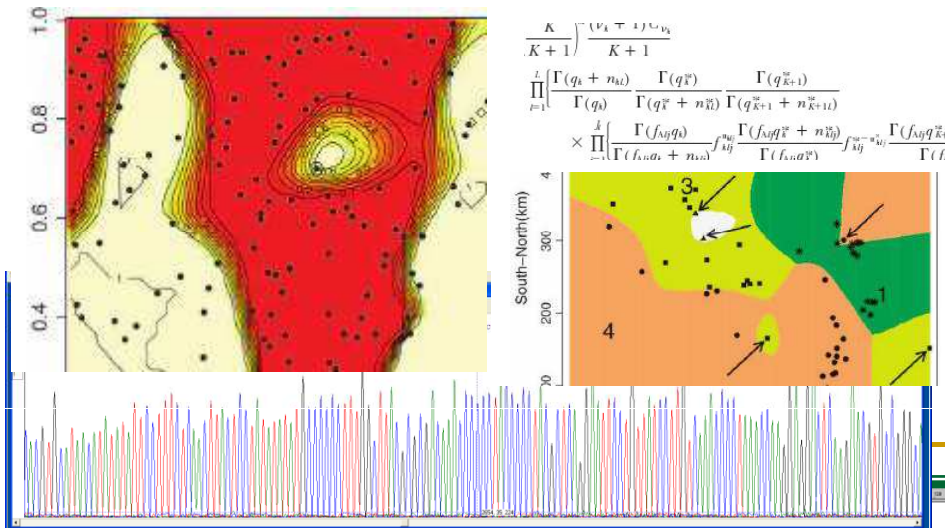


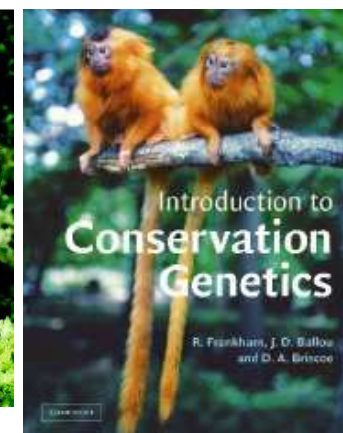
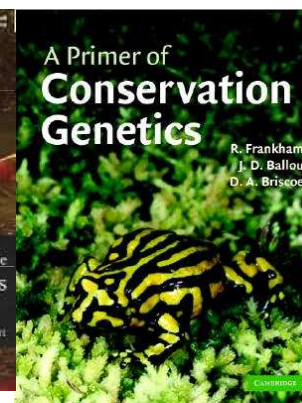
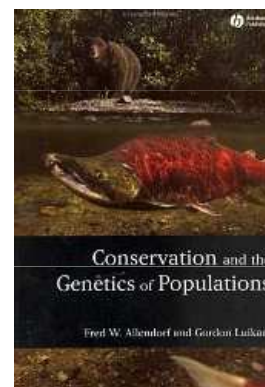
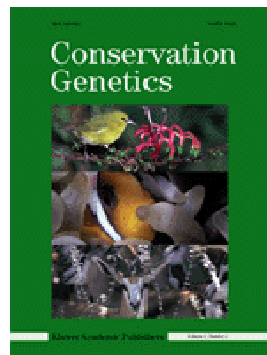
Ochranářská genetika

Význam genetické variability pro efektivní druhovou ochranu



Ochranářská genetika („conservation genetics“)

- 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 (i politicky důležitá)

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

→ ochrana biodiverzity na úrovni genů, druhů a ekosystémů



Target 13

By 2020, the genetic diversity of cultivated plants and farmed and domesticated animals and of wild relatives, including other socio-economically as well as culturally valuable species, is maintained, and strategies have been developed and implemented for minimizing genetic erosion and safeguarding their genetic diversity.

Aichi targets (2011-2020)



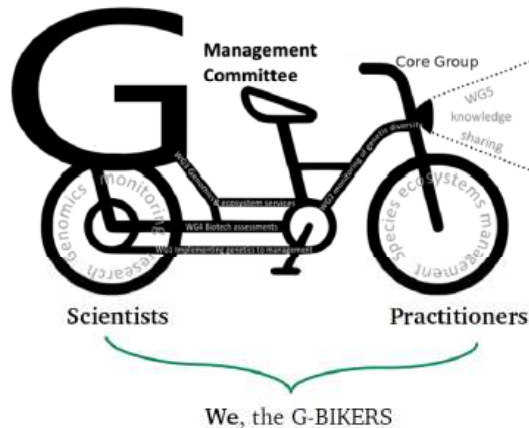
COST Action CA18134

G-BiKE



Genomic Biodiversity Knowledge for Resilient Ecosystems

The Challenge: establish the use of genomics as a standard tool for monitoring and managing wild and ex-situ populations of plants and animals.



- ✓ 33 European countries
- ✓ 60 MC members
- ✓ Start 2019- end 2023

The main direction of G-BiKE:

- ✓ to promote genomics as routine in managing natural systems in face of global change
- ✓ to develop standardized monitoring tools and guides in practical settings

The major actions include:

- setting up fruitful communication between Scientists and Practitioners
- training students and Practitioners
- designing standardized monitoring protocols
- creating concrete outputs (case studies, best practice and policy proposals, public outreach)

www.cost.eu/actions/CA18134



@gbike_cost



@gbikecost

United Nations Biodiversity Conference

COP15 / CP-MOP10 / NP-MOP4

Montreal, Canada, 7-19 December 2022

	Presidency	Schedule	WG2020-5	Documents					High-Level Segment	Associated Events	Share your Content	News and Media	Information note for participants
				COP 15	CP MOP 10	NP MOP 4	All in-session documents						

[CBD // CONFERENCES // 2021-2022 // SCHEDULES](#)

[Overview](#) [Contact Groups](#) [High Level Segment](#)

[Europe/Prague](#)

[9:17](#)

Main Schedule

[Expand All](#)

For a detailed and complete list of side-events, please click here to visit the CBD Side-Events page.

[About](#) [News](#) [Community](#) [Meeting & Events](#) [Open calls](#) [Multimedia/Policy Briefs/Pubs](#) [Webinars](#)

[HomePage](#) / [News](#) / [CBD side event presentation: Genetic Diversity Goal, Target, and Indicators](#)

CBD side event presentation: Genetic Diversity Goal, Target, and Indicators

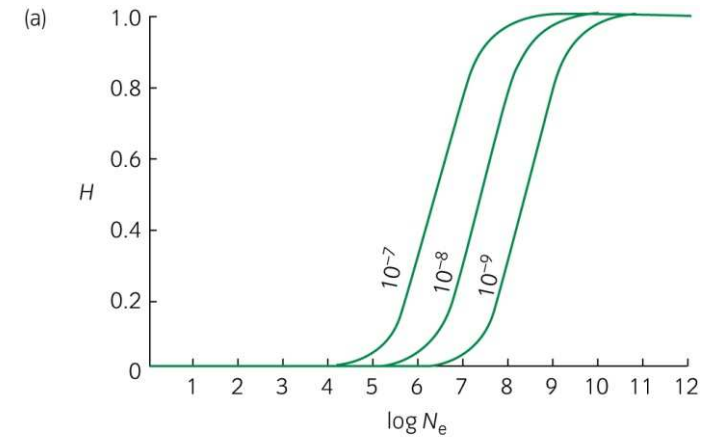
The Coalition for Conservation Genetics and G-BiKE co-hosted a side event on Genetic Diversity goals, targets and indicators at COP15, which included an update on the ongoing application of genetic diversity indicators. The event took place on Saturday 2022.12.10 @ 13:15. and was a huge success, with 115 attendees and interest from parties, NGOs, and the Secretariat of the Convention on Biological Diversity. We also had more than 100 people watching online! It was fantastic to hear the SBSTTA chair acknowledge the diversity in countries, languages, speakers and delicious food for the event.



PROČ JE VŮBEC GENETICKÁ
VARIABILITA DŮLEŽITÁ ?

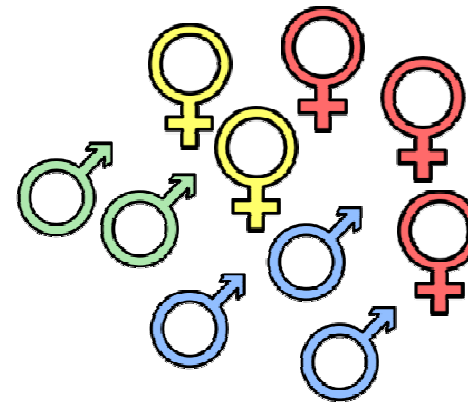
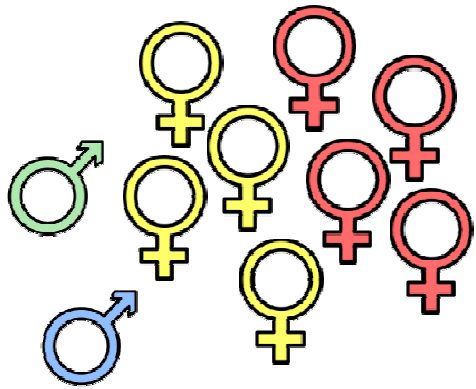
Genetická variabilita jako ukazatel efektivní velikosti populace

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



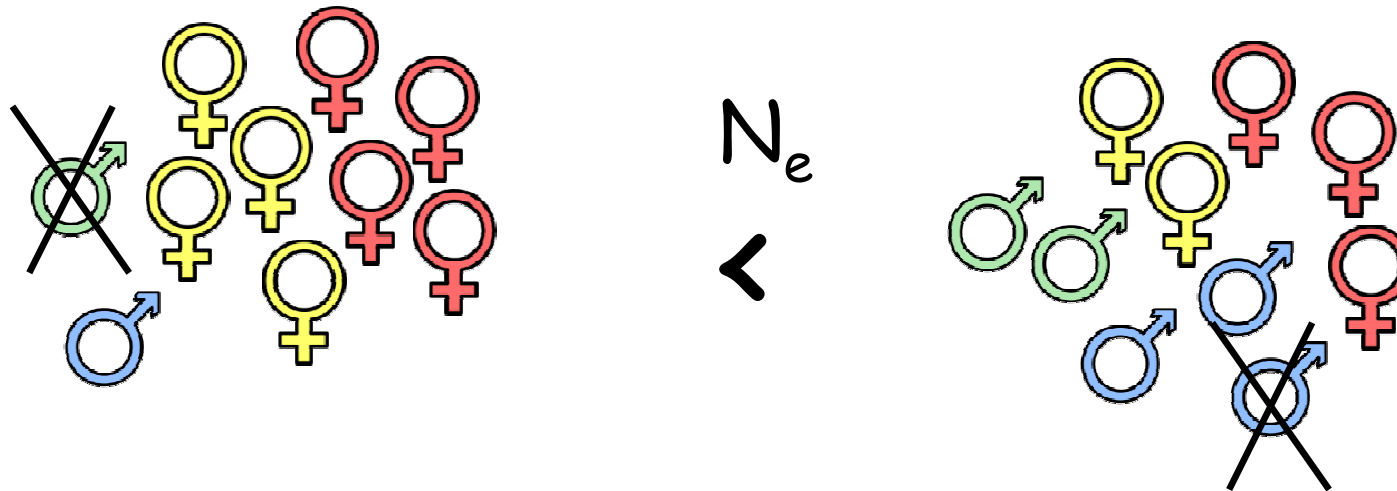
Efektivní velikost populace (N_e)

- N_e = velikost ideální populace (náhodné páření, rovnoměrný poměr pohlaví), která ztrácí genetickou diverzitu stejnou rychlostí jako aktuální populace (vlivem náhody)
- ovlivněna genetickou a věkovou strukturou, poměrem pohlaví, intenzitou příbuzenského křížení atd.



Efektivní velikost populace (N_e)

- N_e = velikost ideální populace (náhodné páření, rovnoměrný poměr pohlaví), která ztrácí genetickou diverzitu stejnou rychlostí jako aktuální populace (vlivem náhody)
- ovlivněna genetickou a věkovou strukturou, poměrem pohlaví, intenzitou příbuzenského křížení atd.



- vývoj genetické variability v malých populacích závisí na N_e více než na N

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 ...“

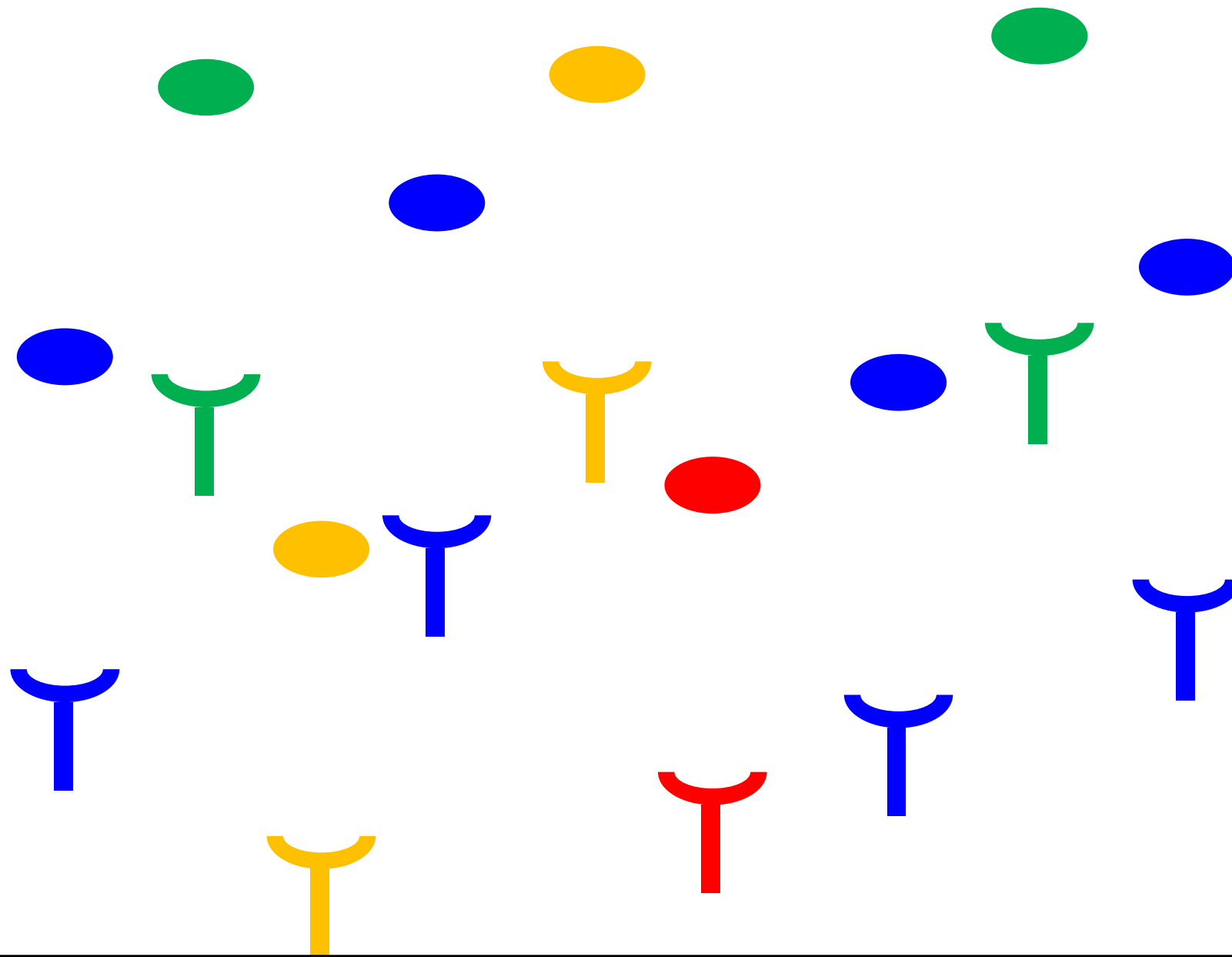
- Změny prostředí (např. klima, patogeny, aj.) → přizpůsob se nebo zmiz!
- Vysoká genetická variabilita znamená, že je zde více genetických variant, z nichž některé mohou být vhodné pro nové podmínky
 - Populace s vyšší genetickou variabilitou mají „více losů v loterii“ (= **adaptivní potenciál**)

Dryas octopetala v Alpách,
Německo. Photo: Steve Smith



Př.: MHC = hlavní histokompatibilní komplex

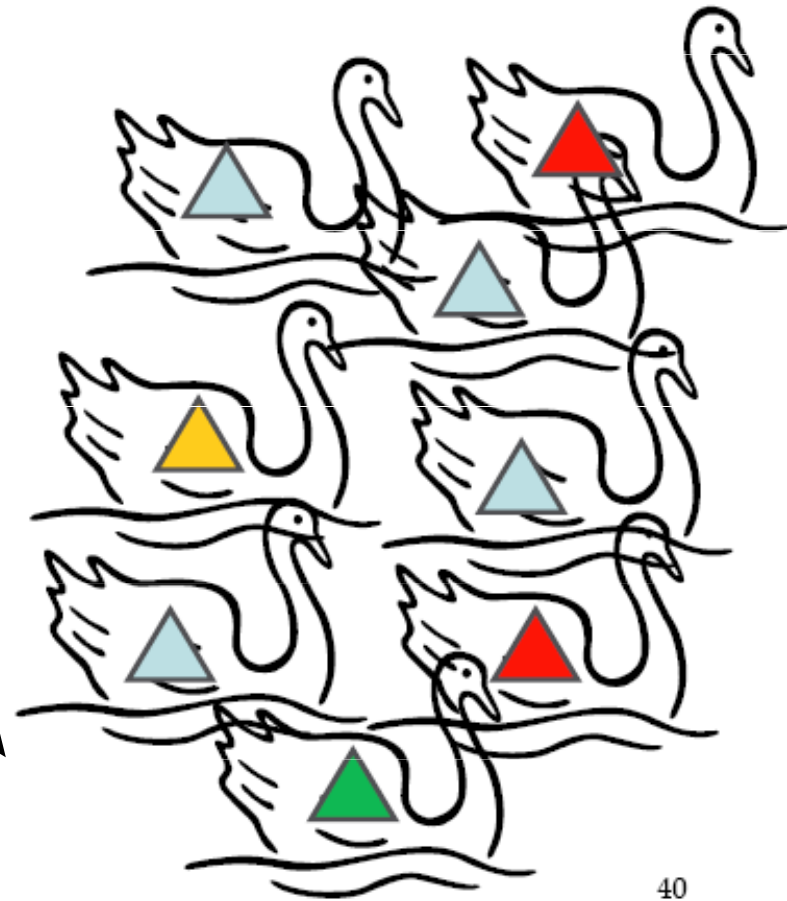
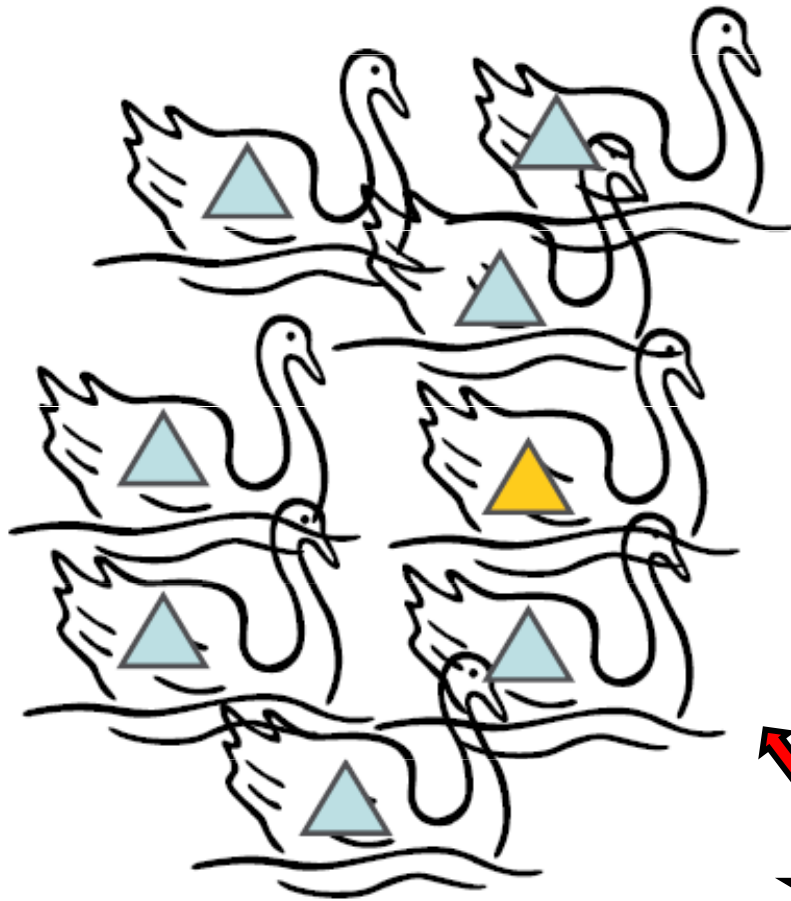
Vysoce specifické rozpoznávání patogenů



Vyšší MHC variabilita = vyšší adaptivní potenciál

Low host genetic diversity

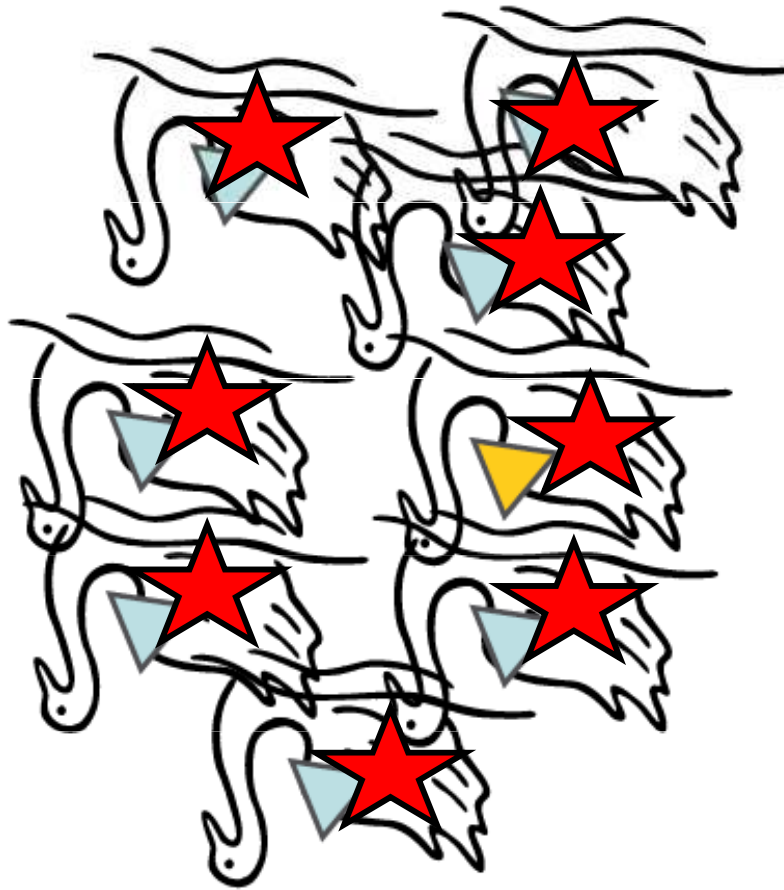
High host genetic diversity



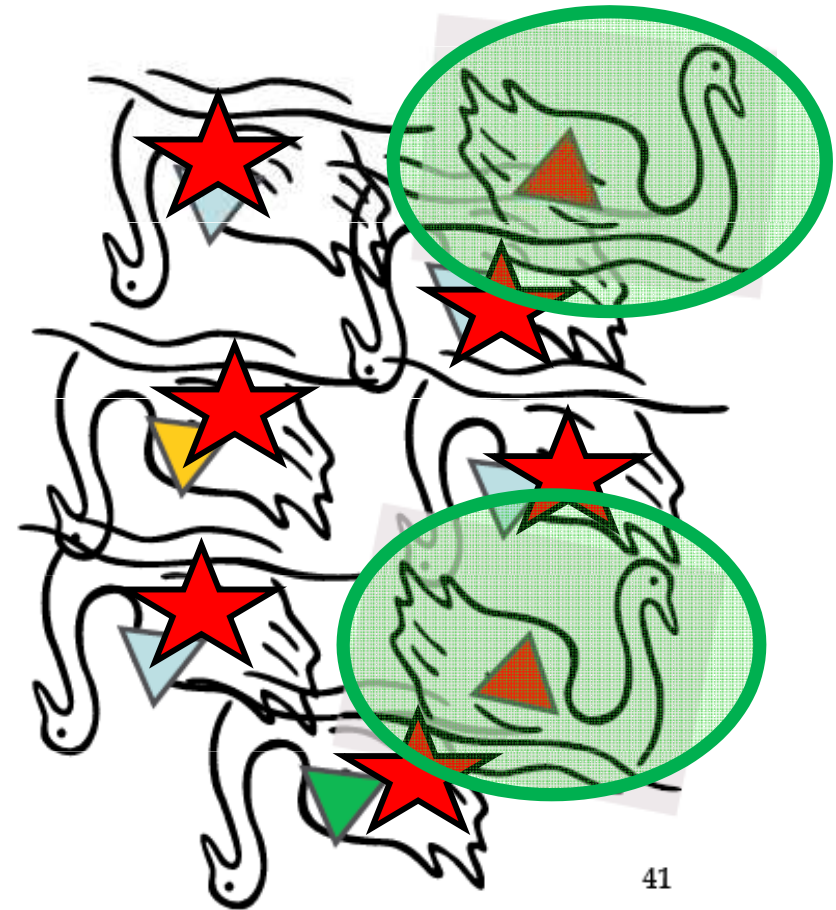
nový ČERVENÝ patogen

Vyšší genetická variabilita = vyšší dlouhodobá životaschopnost populací

Low host genetic diversity

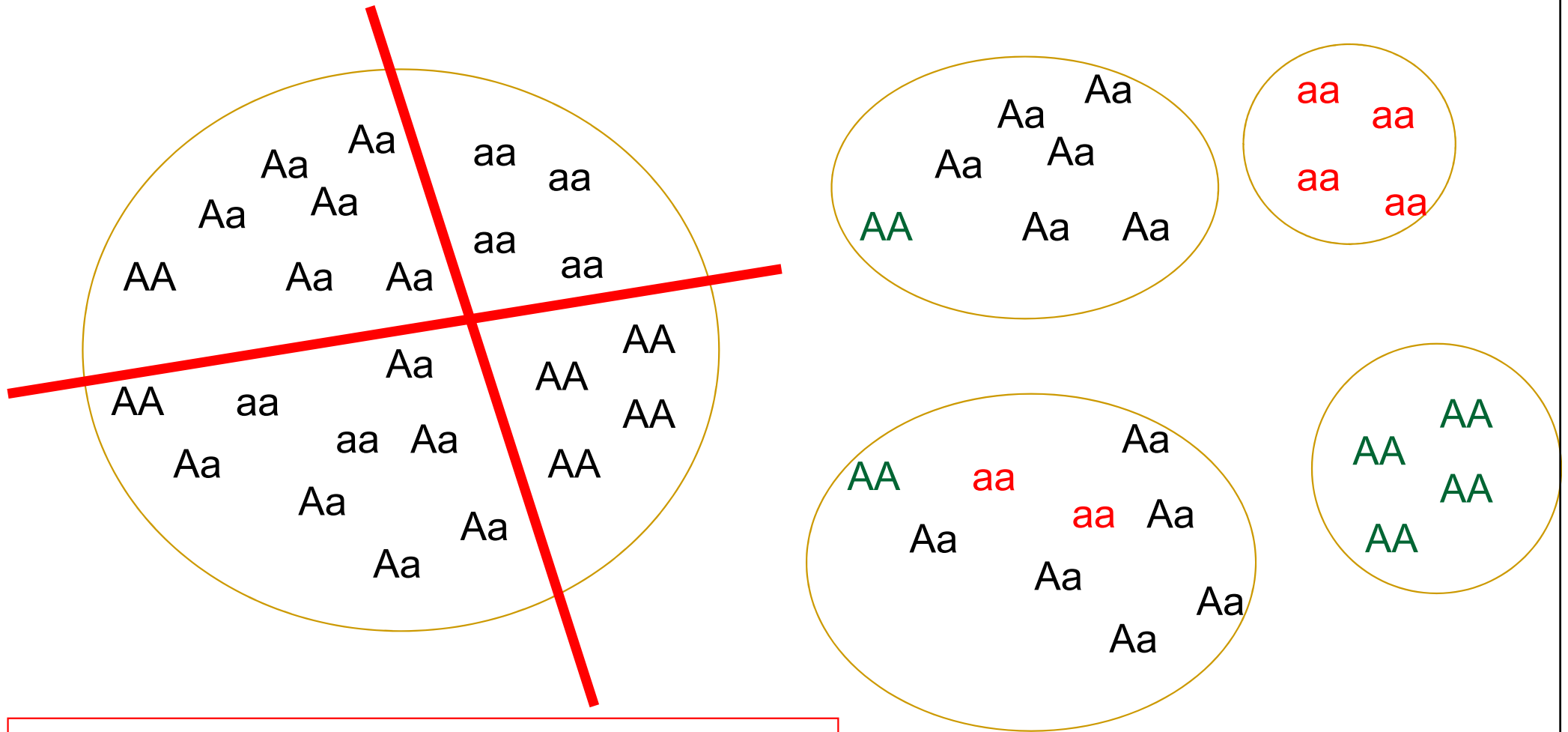


High host genetic diversity



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

Fragmentace



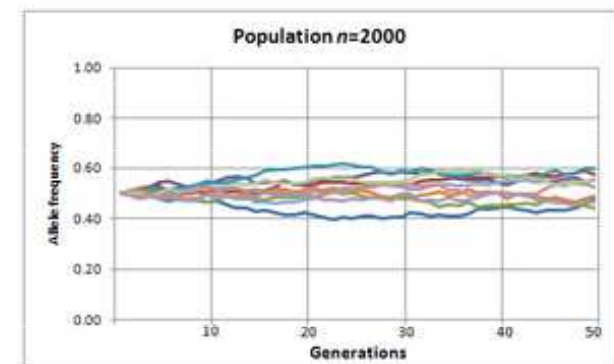
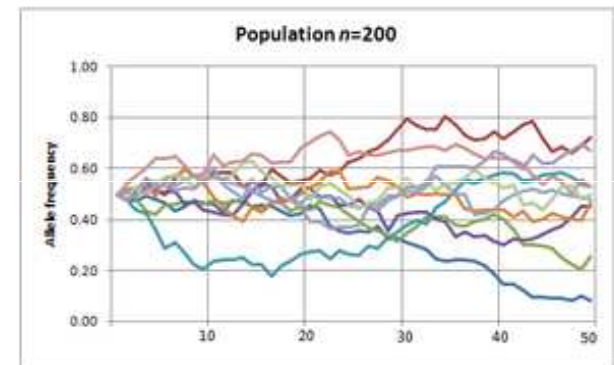
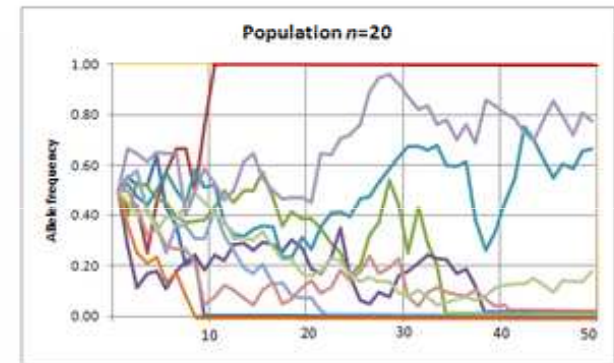
Bariéra toku genů, např. fragmentace biotopů

Snížení H_e a N_e
v důsledku genetického driftu

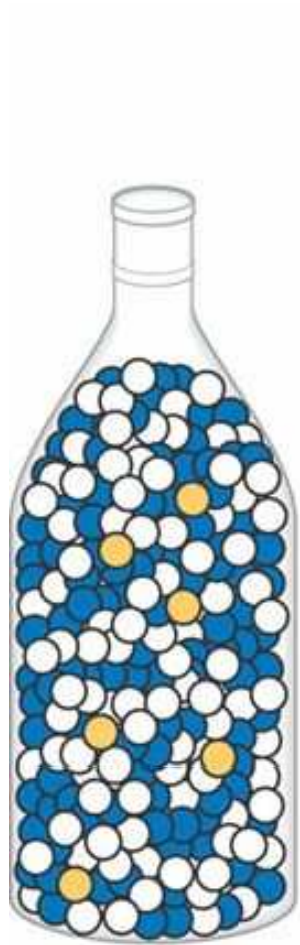
Náhodný genetický drift („random drift“)



- Náhodné změny ve frekvencích alel
- Intenzita driftu (tj. rychlost ztráty genetických variant) závisí na velikosti populace
- VELKÝ VÝZNAM V MALÝCH POPULACÍCH – ohrožené druhy
- může být i silnější než selekce → fixace nevýhodných alel



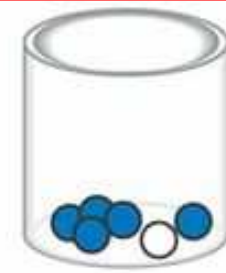
Bottleneck



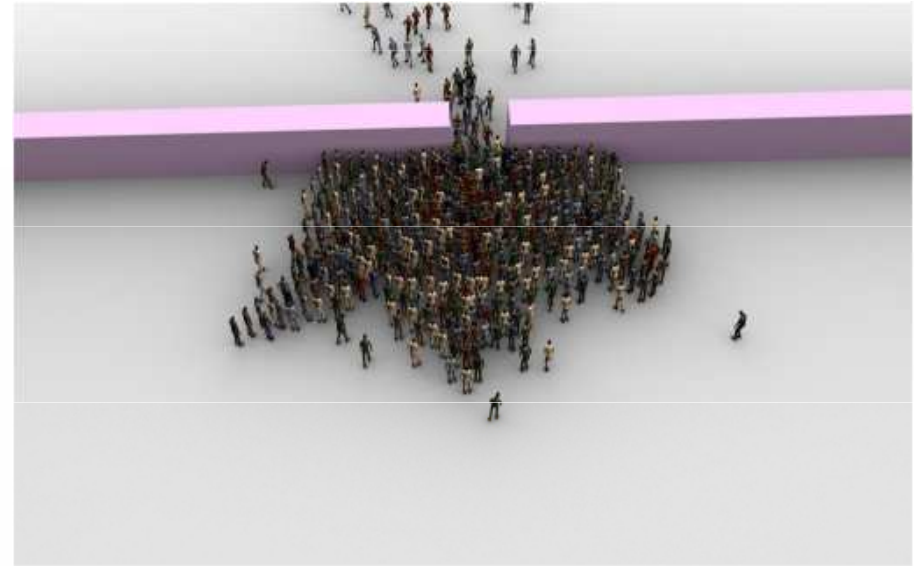
Original population



Bottlenecking event



Surviving population



Snížení H_e a N_e
v důsledku genetického driftu

Metodické přístupy ochránářské genetiky

- 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)
-

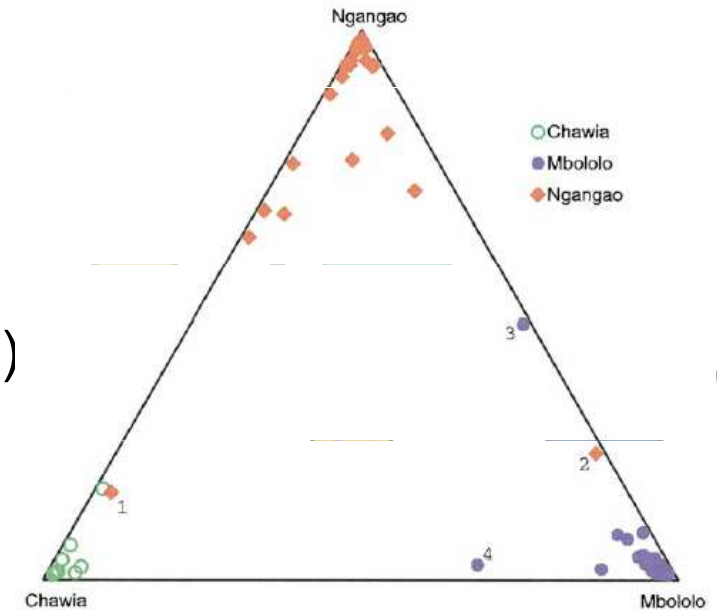
1) Populační genetiky

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



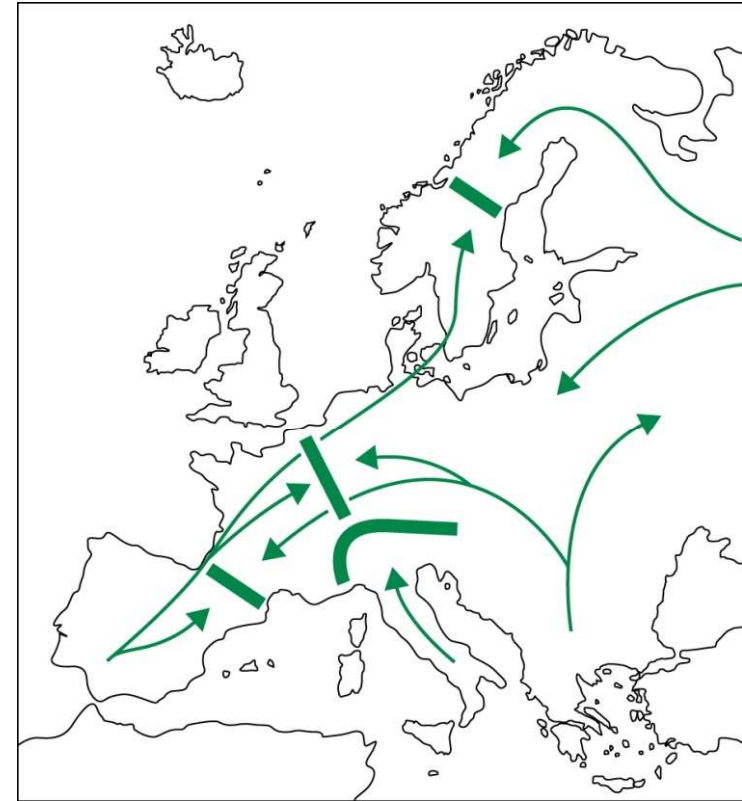
Bayesiánské analýzy (např. program STRUCTURE, GENELAND aj.)

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



2) Fylogeografie

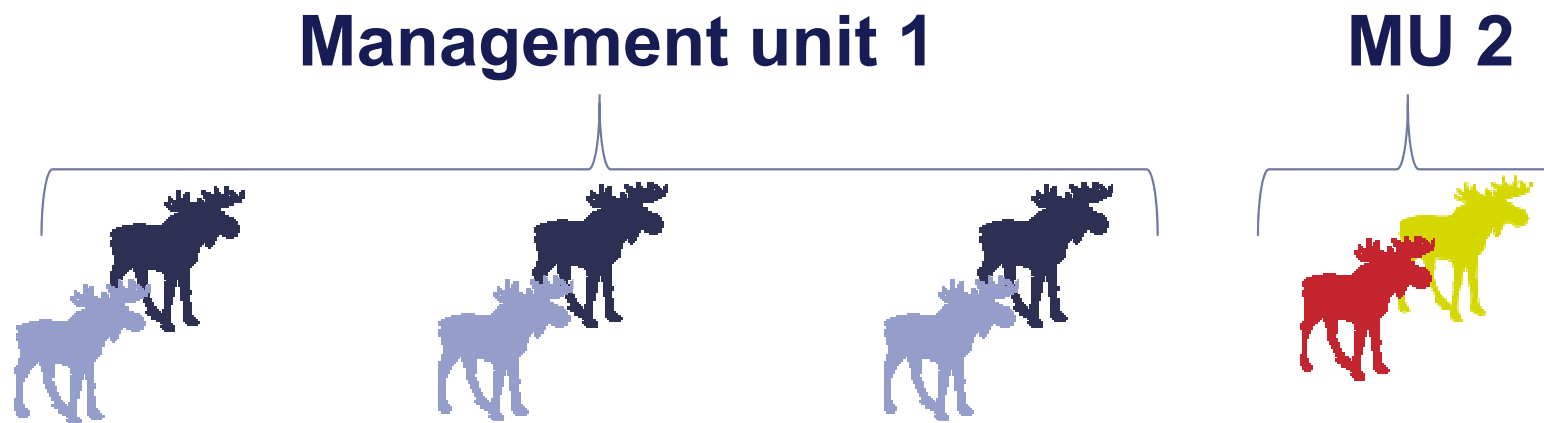
- použití fylogenetických metod na úrovni populací (nejčastěji sekvence mtDNA, jaderné markery jsou málo polymorfní)
- původ populací, jejich stáří a historické vazby
- detekce ESU („evolutionary significant units“; Moritz 1995) – lokální adaptace (mohou, ale nemusí)
- ESU mohou odpovídat „poddruhům“
- důležité pro reintrodukce



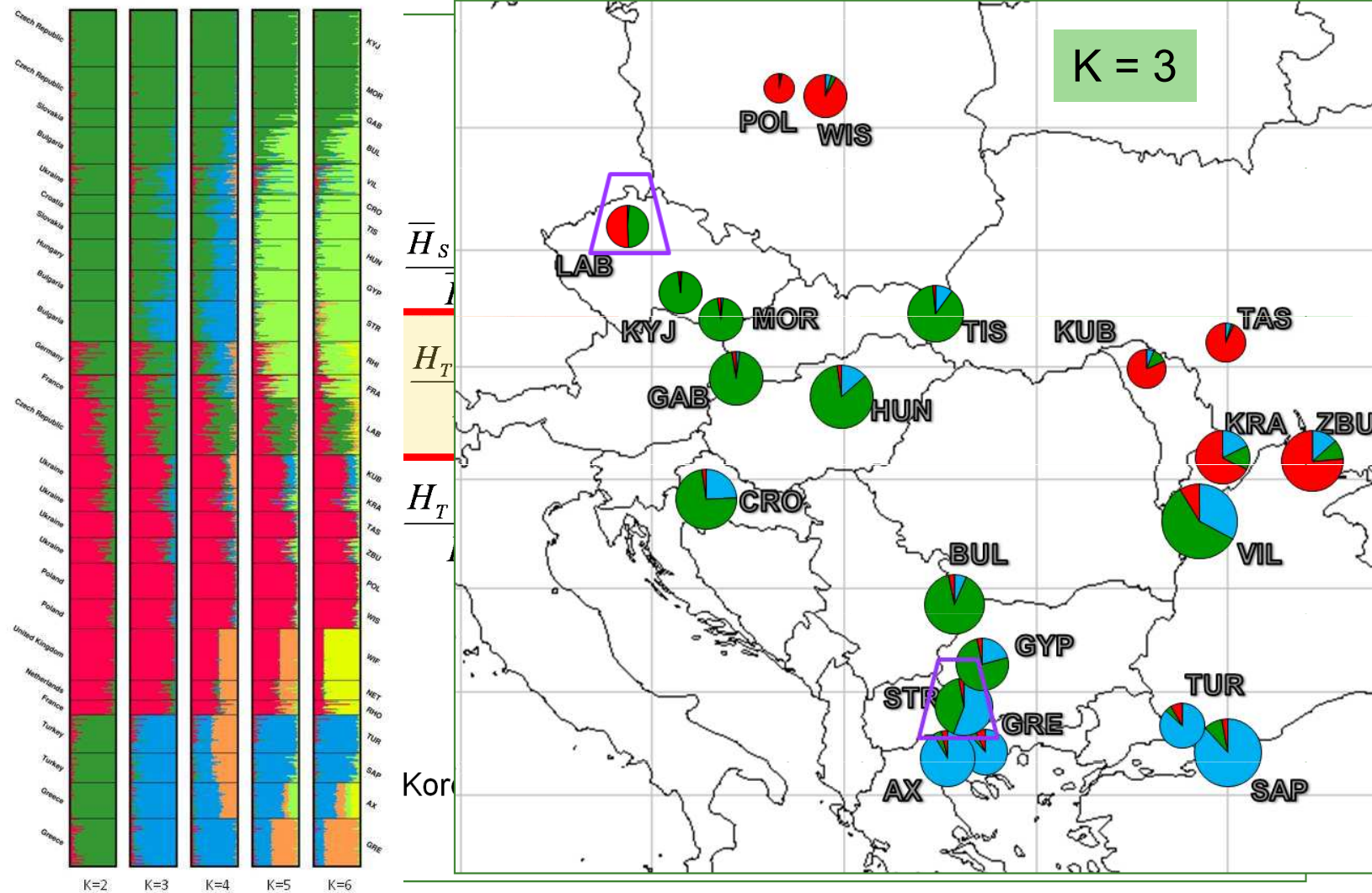
Př. Směry šíření z glaciálních refugií

Identifikace rozdílů mezi populacemi

- Je důležité chránit geneticky odlišné populace, tj. MU („management units“ uvnitř ESU) – jednotky ochrannářského managementu; založeny na „genetic and ecological exchangeability“
 - Analýza genetické (fylogeografické) struktury
 - Nalezení prioritních populací pro ochranu

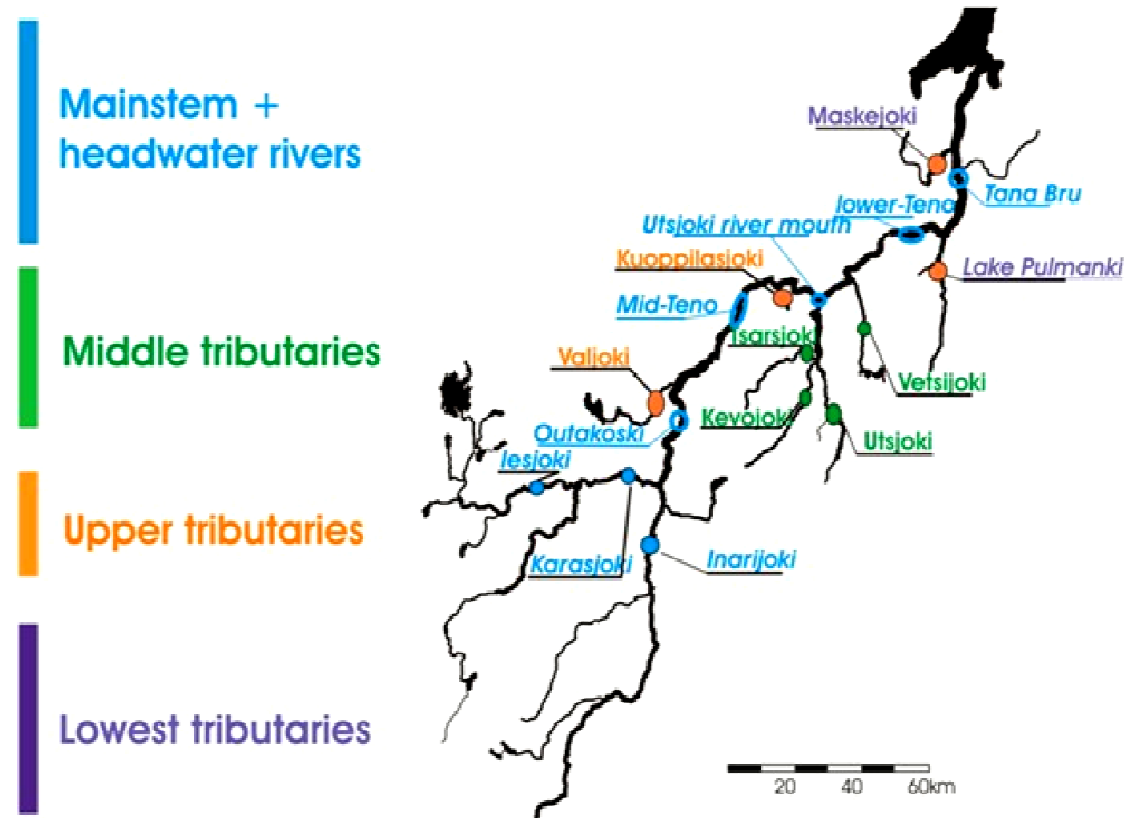


Stanovení ESU („evolutionary significant units“) a MU („management units“)



Identifikace rozdílů mezi populacemi

- lososi v řece Teno (northern Finland and Norway)
- Dříve považováni za jedinou kontinuální populaci
 - genetický výzkum prokázal výraznou strukturovanost a řadu lokálních adaptací

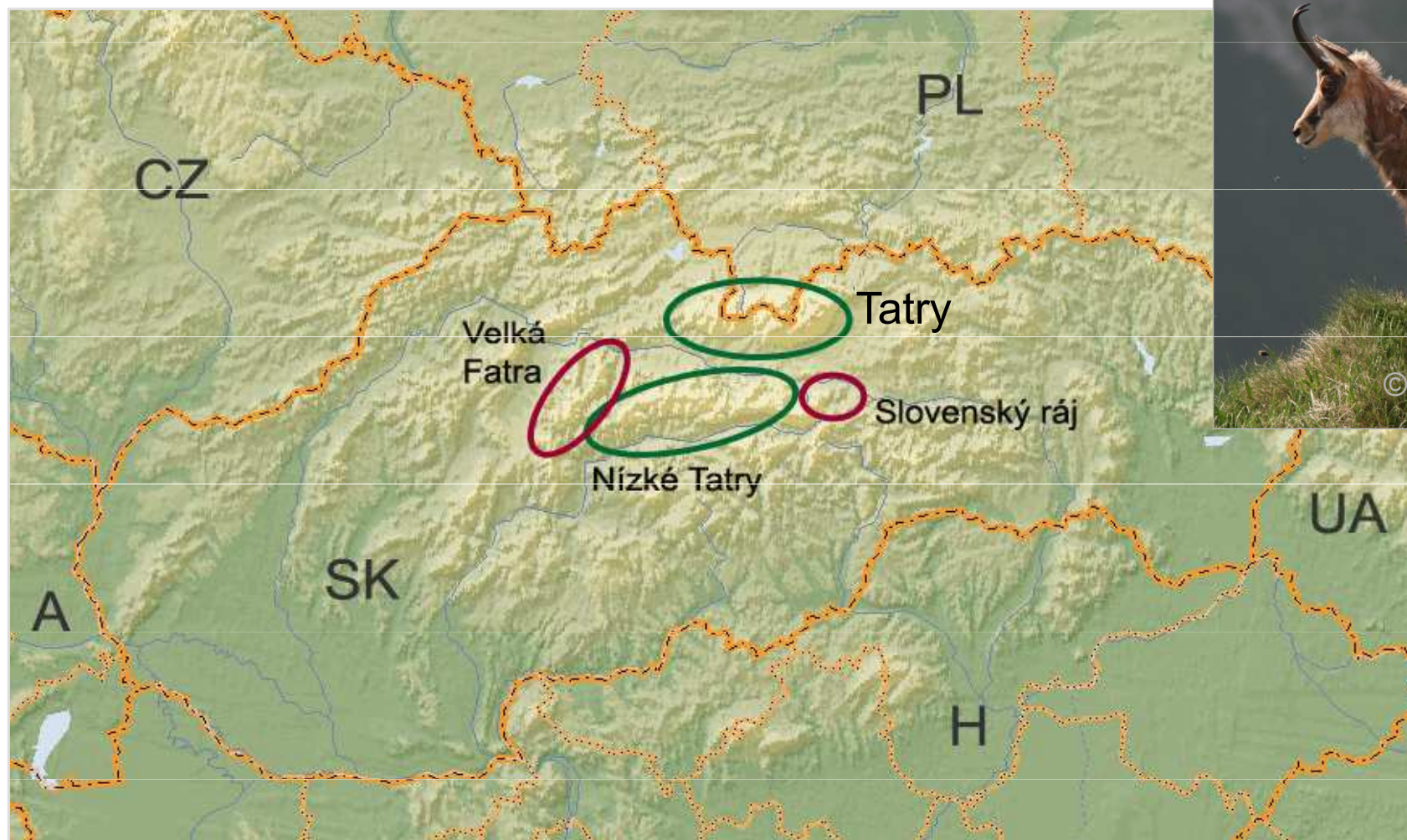


Co tyto rozdíly znamenají?

- Byly navrženy změny v managementu populací
 - např. stanovení rybářských limitů
 - V každé části řeky mohou být lokálně adaptované populace
 - Toto je potvrzeno také ekologickým a parazitologickým výzkumem



Př.: Kamzíci na Slovensku



Hybridizace - sekundární kontakt dvou populací

- disperze samců i přes údolí (nebyla zjištěna introgrese mtDNA)

R. r. tatrica (ESU 1)

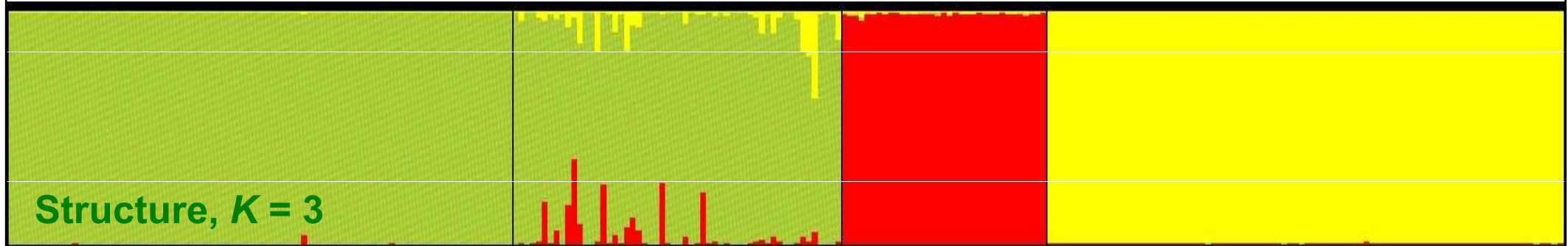
R. r. rupicapra (ESU 2)

Tatry

Nízké Tatry

Vel. Fatra

Slovenský ráj



MU1

MU2 (introgrese)

MU3 (introdukování)

3) Speciální přístupy

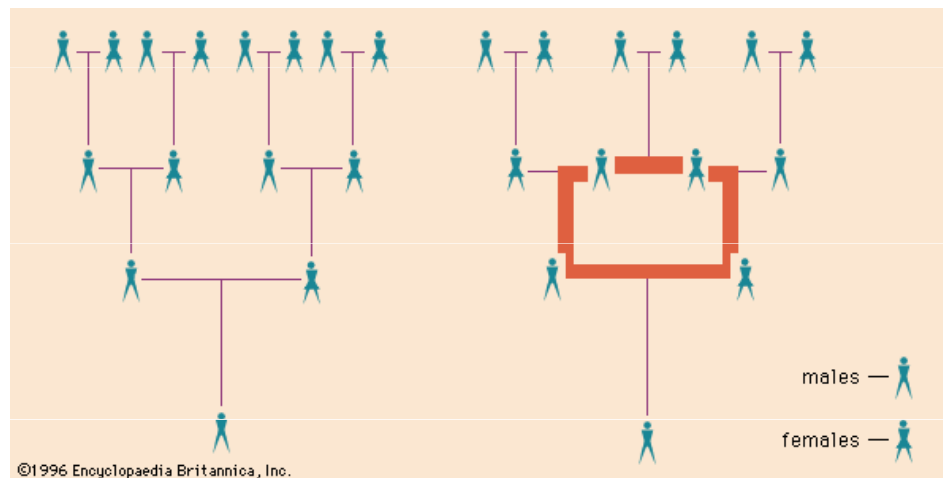
- škodlivá (detrimental) variabilita – detekce **inbrední deprese**
 - identifikace adaptivní variability – **lokální adaptace**
 - **neinvazivní genetické metody**
-

Inbreeding a fitness

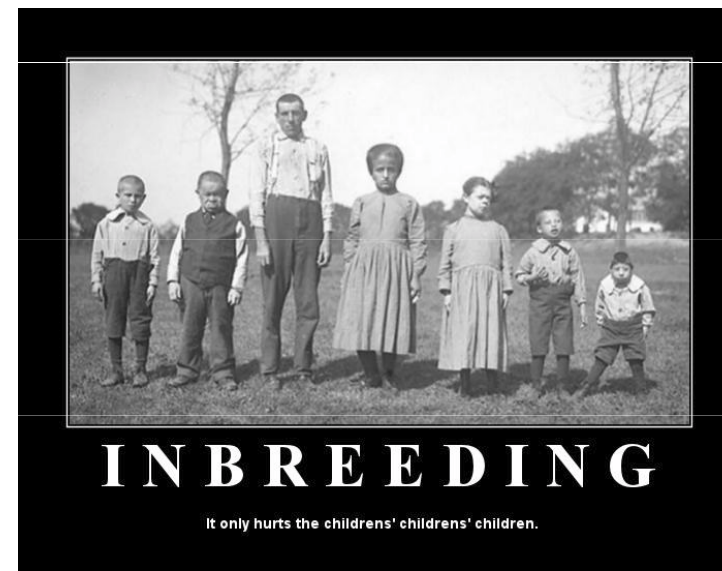
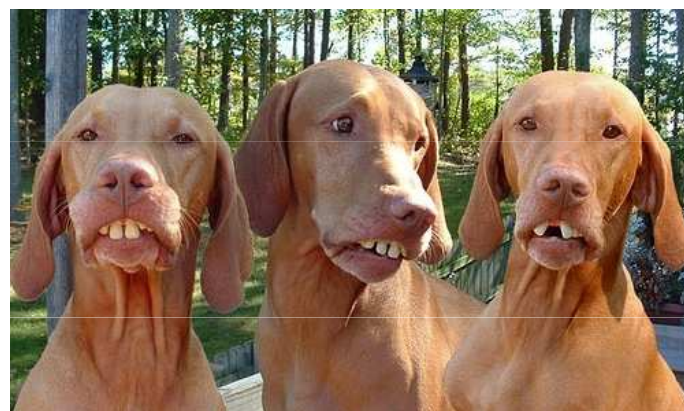
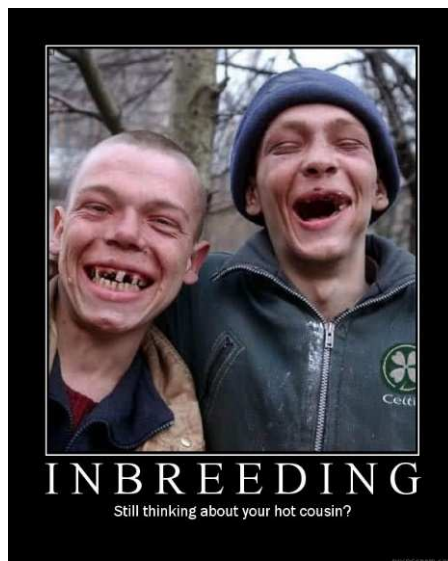
Stanovení výskytu příbuzenského
křížení a jeho vliv na individuální fitness

„Příbuzenské křížení - inbreeding“

„outbreeding“



„inbreeding“



What does „inbreeding“ mean?

F – coefficients of inbreeding

- Inbreeding as nonrandom mating (F_{IS})
- Pedigree inbreeding (F)

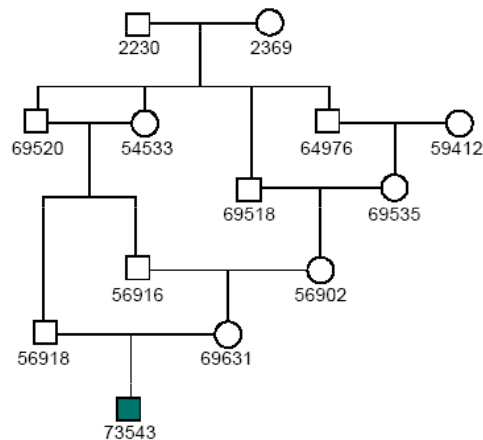


What does „inbreeding“ mean?

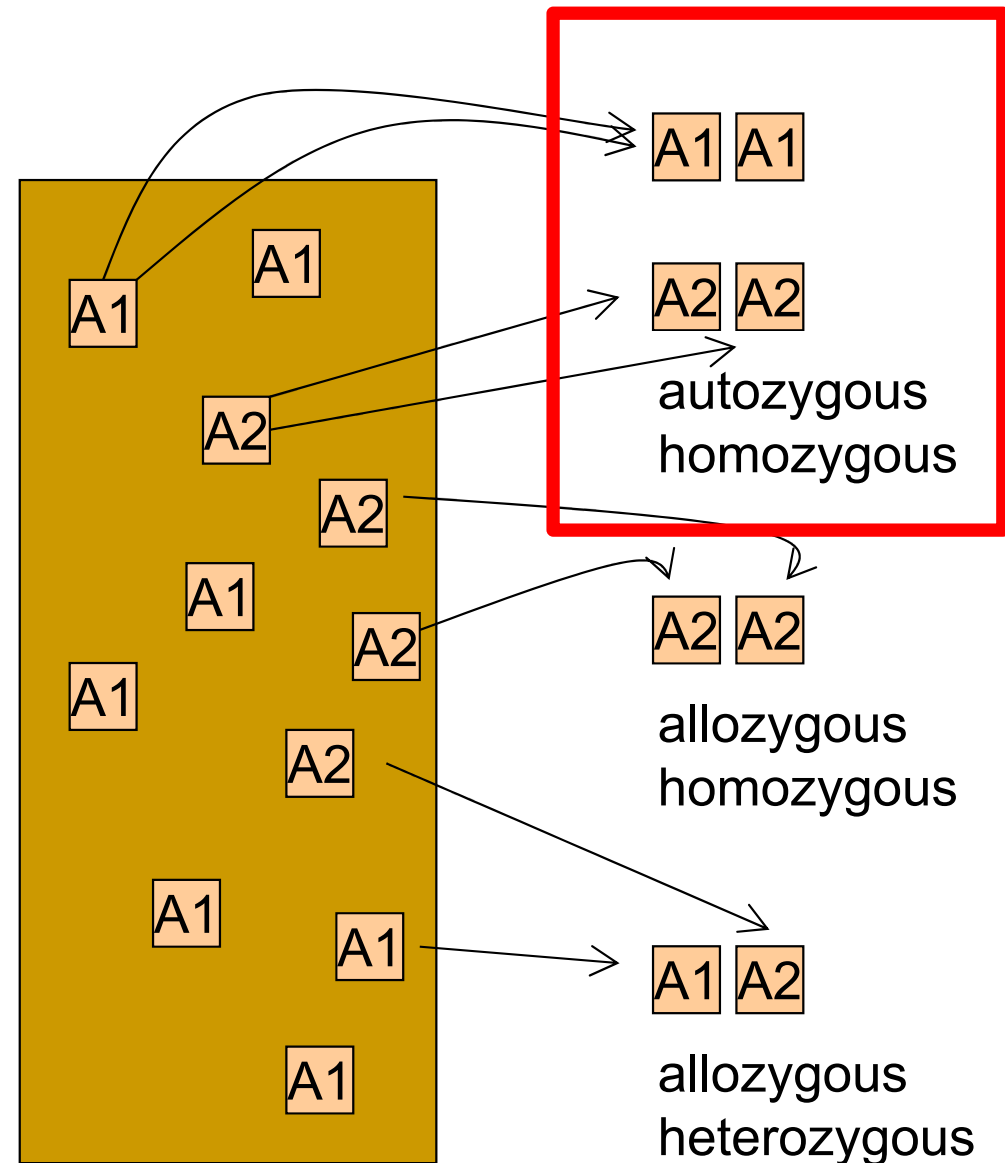
- **Inbreeding as nonrandom mating**
 - jedinec je považován za inbredního pokud jeho rodiče byli více příbuzní než dva náhodně vybraní jedinci
 - $F_{is} = 1 - H_o/H_e$ (odchylky z HWE)
 - malé populace – i náhodné párování je mezi příbuznými
 - i jedna generace náhodného páření vrátí F_{is} na nulu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

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"

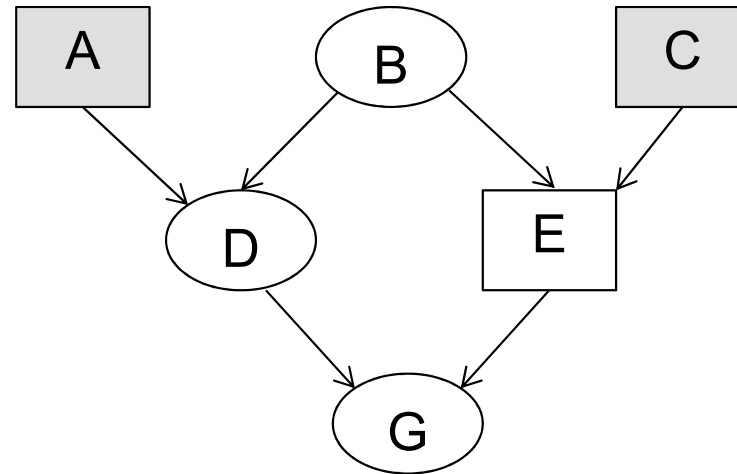


TRENDS in Ecology & Evolution



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
(CA = „common ancestor“)

- 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 %
-

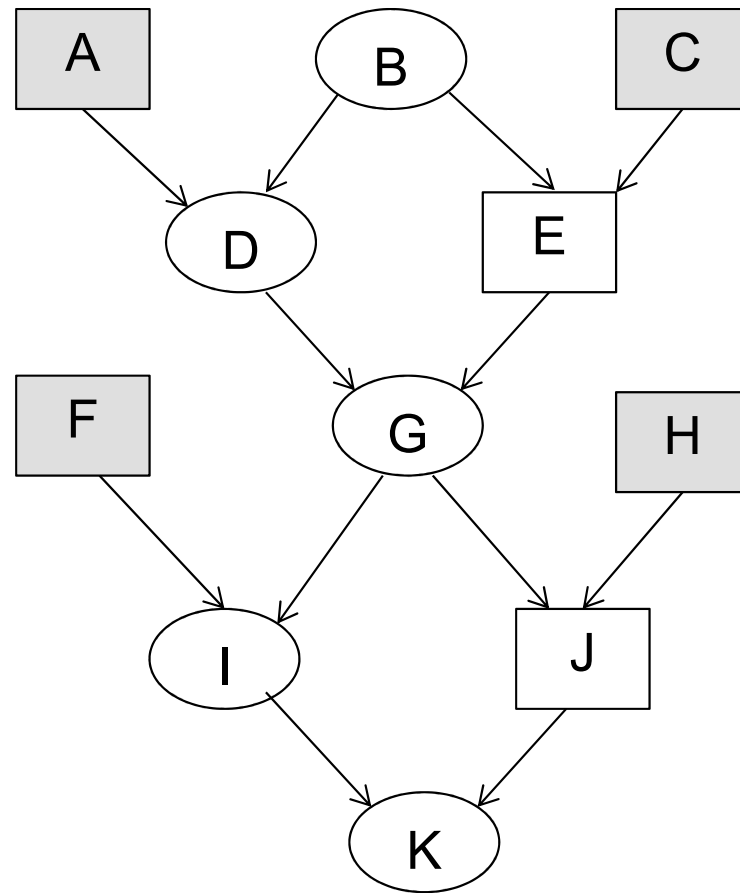
Výpočet koeficientu inbreedingu z rodokmenu

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

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

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

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



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



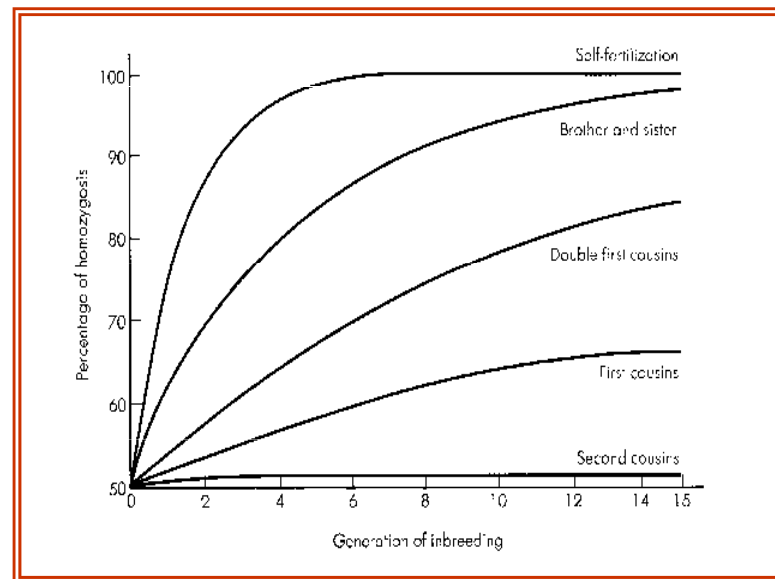
Inbreeding: AA AA aa aa

- 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



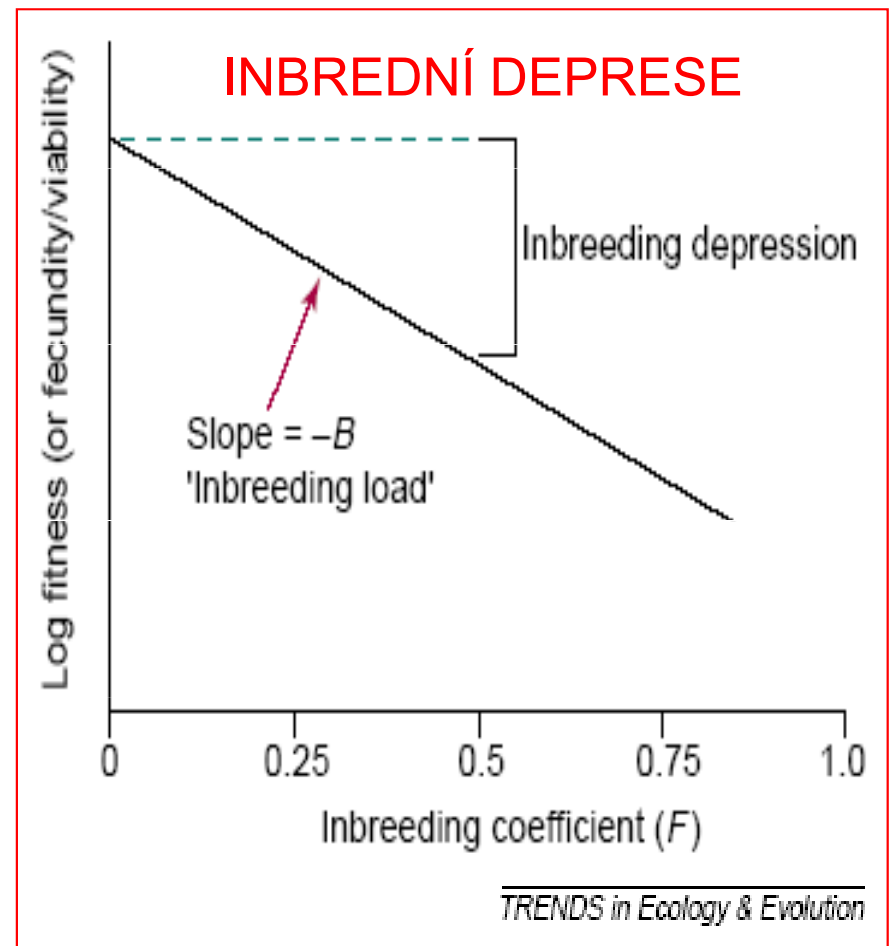
- samooplození

- 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
- „Inbreeding load“ – odpovídá množství škodlivých mutací v genomu



Florida panther – fixace škodlivých alel (drift + inbreeding)

- 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

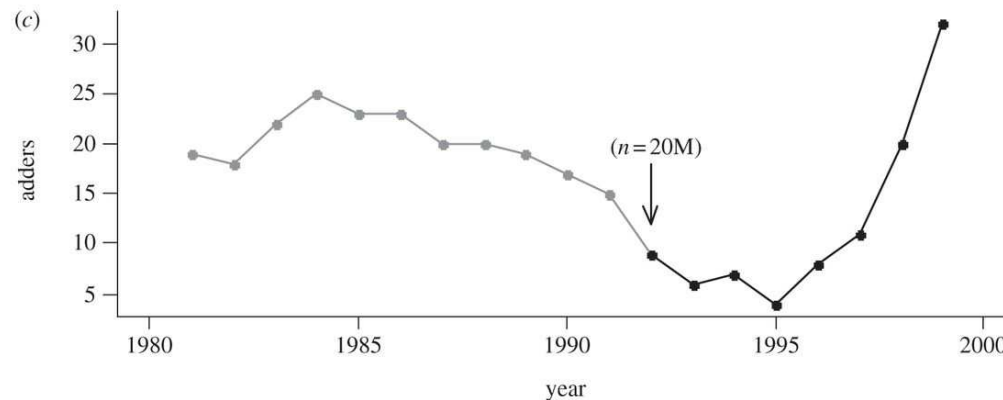
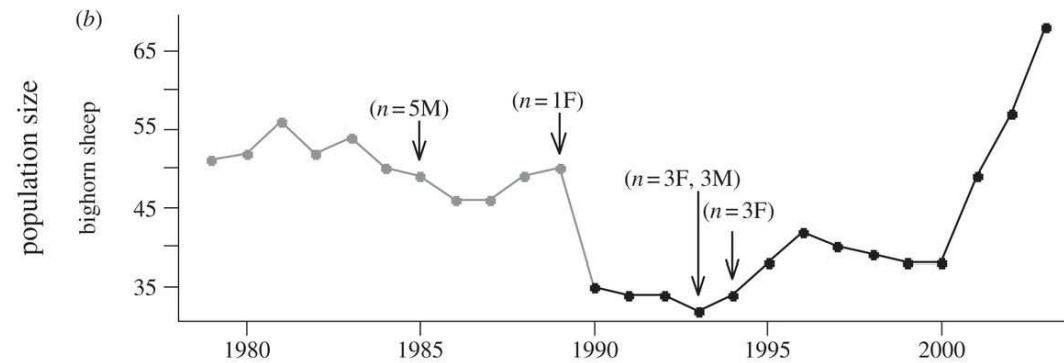
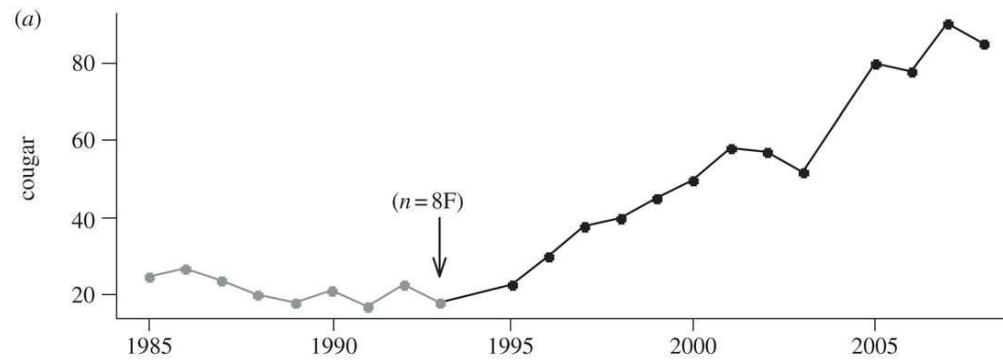


Puma concolor coryi



Puma concolor cougar

Genetická záchrana („genetic rescue“)



„Purging“

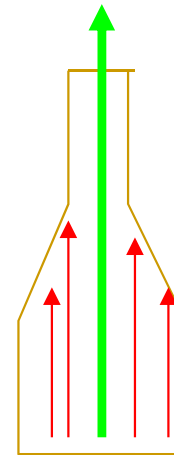
- Druhy s výrazným snížením genetické variability - prošly „hrdlem lahve“
- gepardi - snížení genetické variability o více než 90 %
- přesto se počty výrazně zvedly
- „**purging**“ – odstranění škodlivých alel v důsledku zvýšené selekce na homozygoty

1. Inbreeding: AA AA aa aa

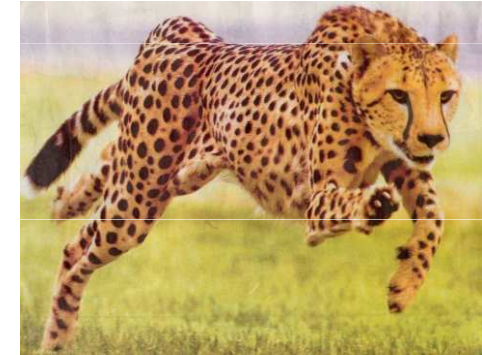
2. Selektce: AA AA ~~aa~~ ~~aa~~

3. „Purging“: AA AA

Extrémně výjimečné případy



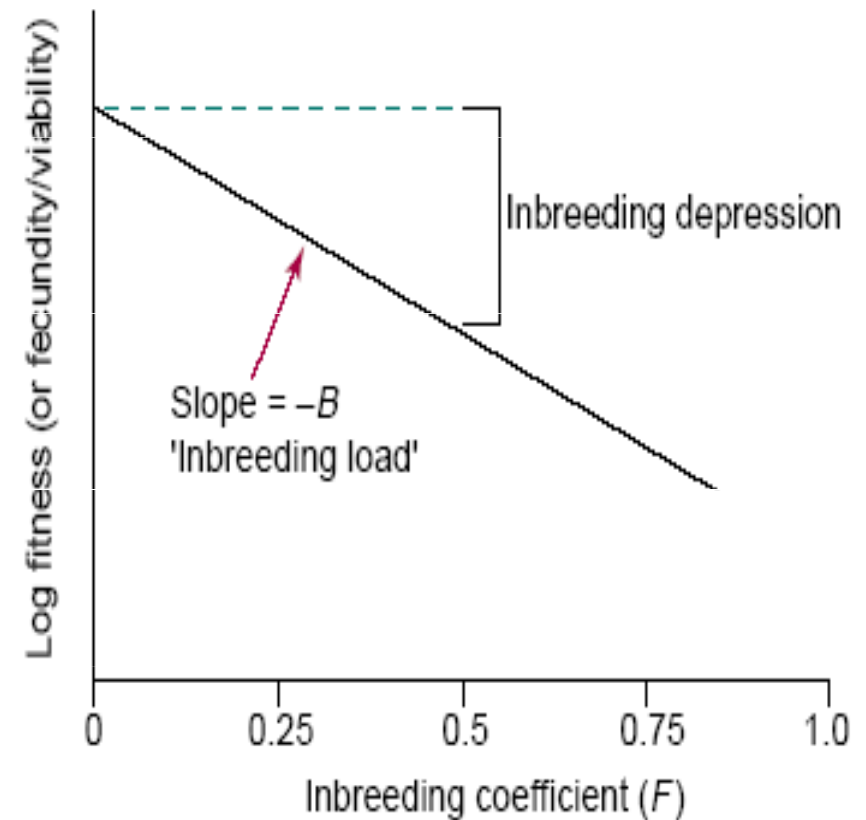
Acinonyx jubatus



Mirounga angustirostris

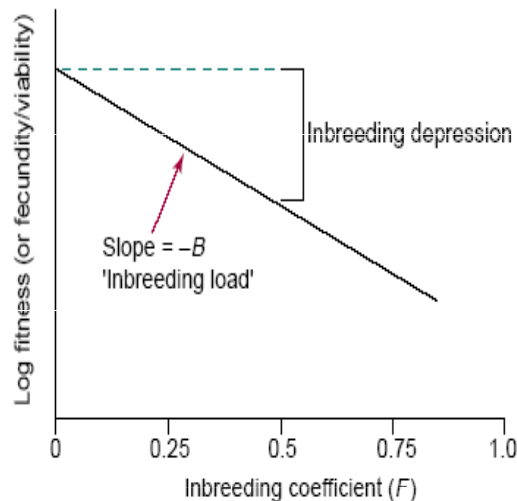
Stanovení inbrední deprese

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



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 inbrední? Tedy jak příbuzní byli rodiče

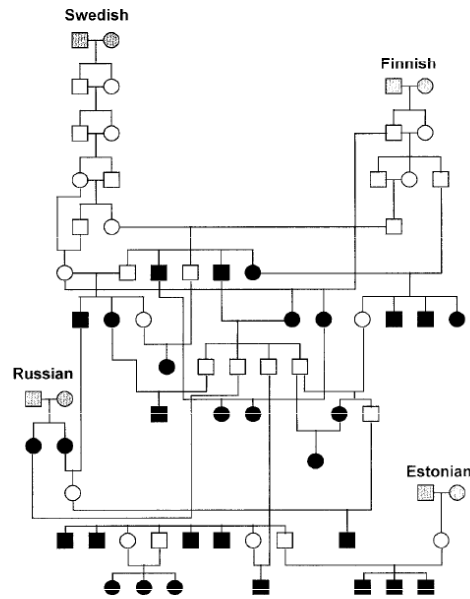
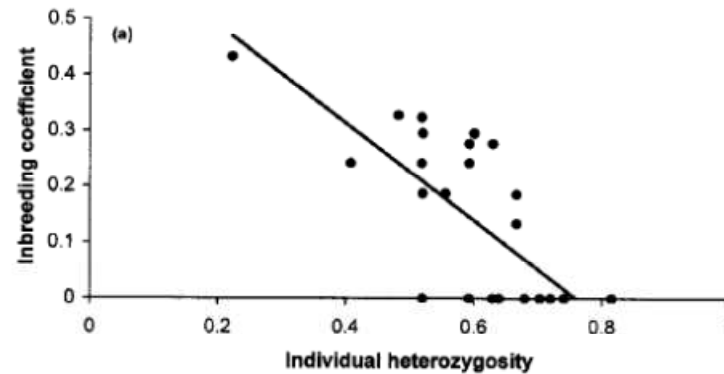
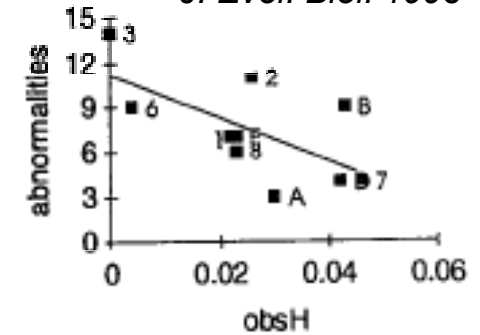


FIG. 1. Pedigree of the wolf population where the animals with closed dark symbols are those included in this study and those with closed gray symbols are the four pairs of founders.



*Hedrick et al.
Evolution 2001*

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



© Lubomir Hlasek
www.hlasek.com
Bufo bufo da1281

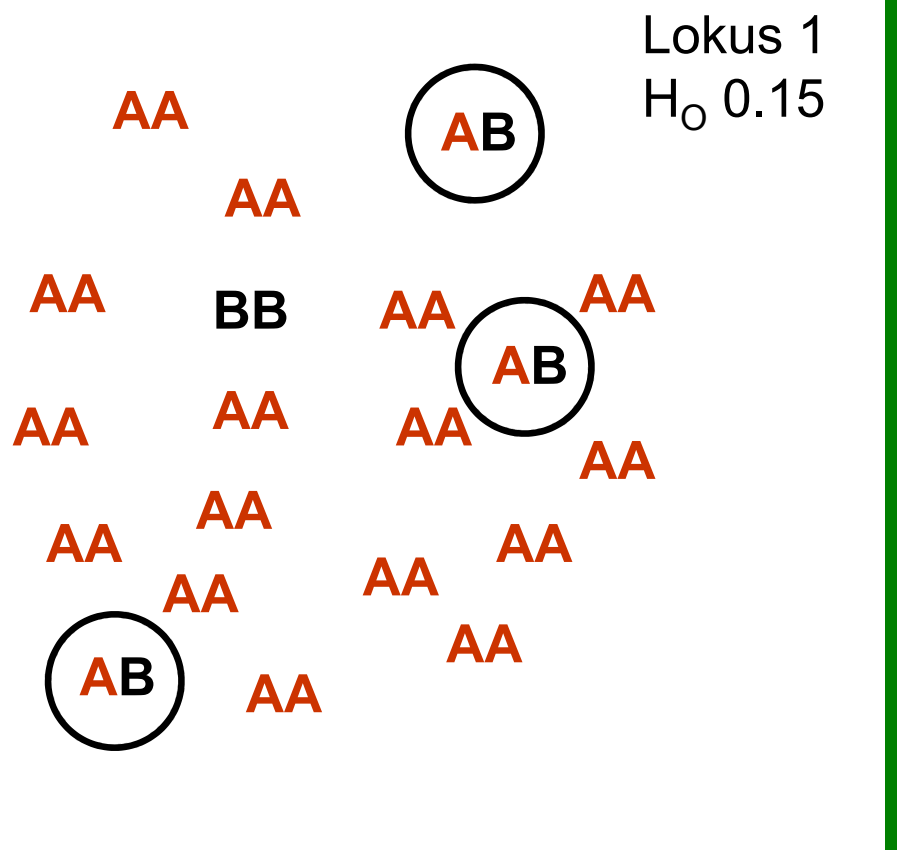
- **Rodokmeny** – z rodokmenů se usoudí, zda se kříží příbuzní
- **Heterozygotnost („heterozygosity-fitness correlations“)**
(průměrná heterozygotnost přes více lokusů)

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.



- **IR internal relatedness**

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

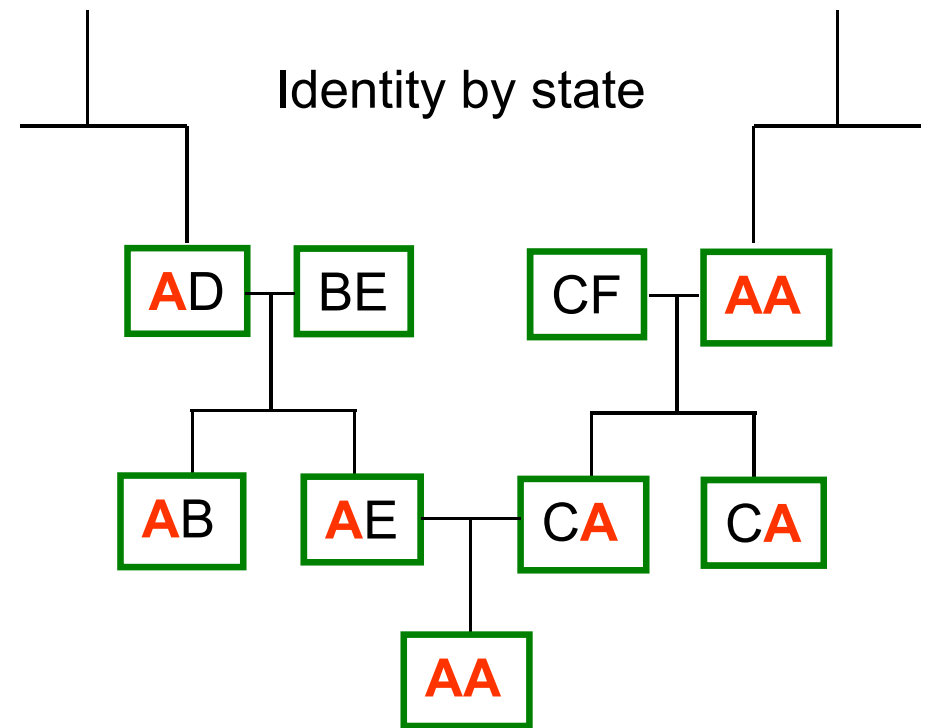
Stejné alely na lokusu

2 příčiny:

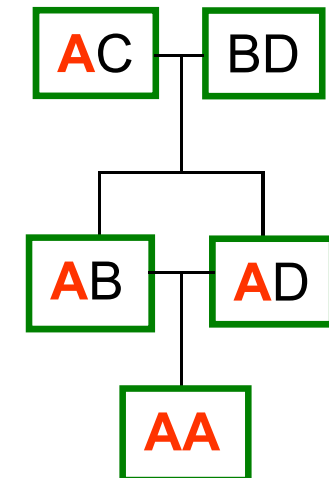
Identity by state IBS (stejný stav)

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

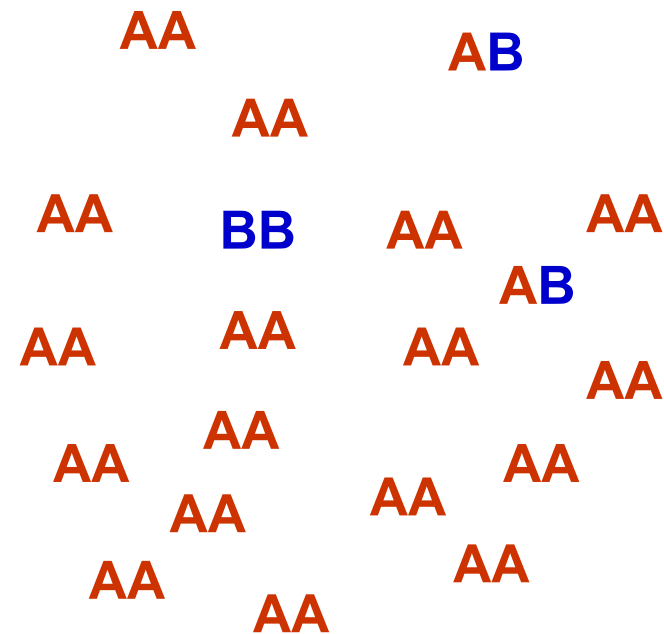


Identity by descent



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

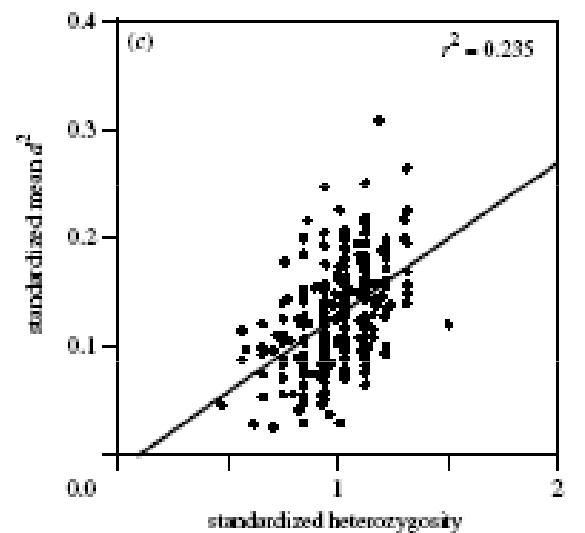
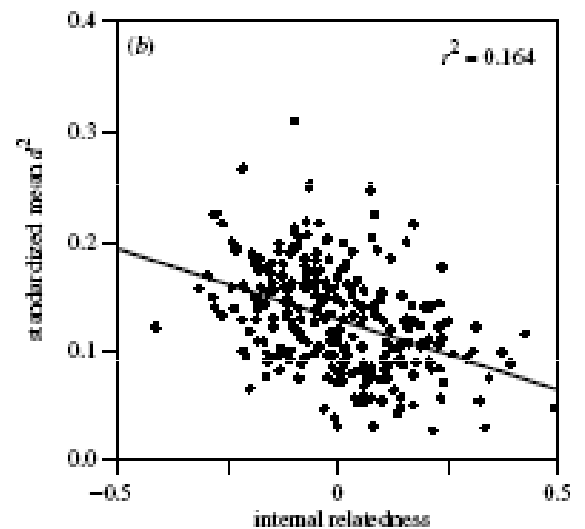
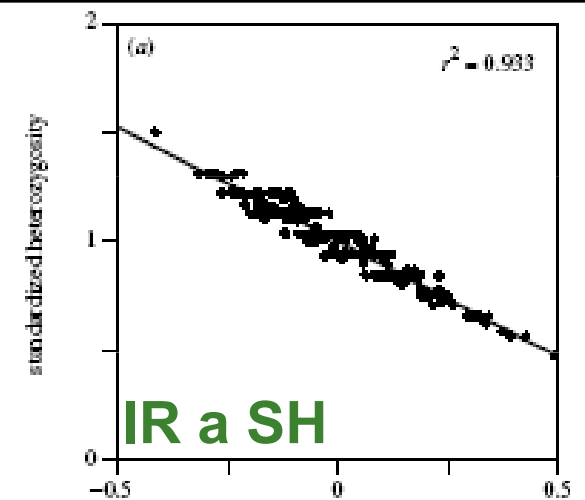
$$\frac{(2H - \sum f_i)}{(2N - \sum f_i)}$$

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

SH, IR navzájem korelovány

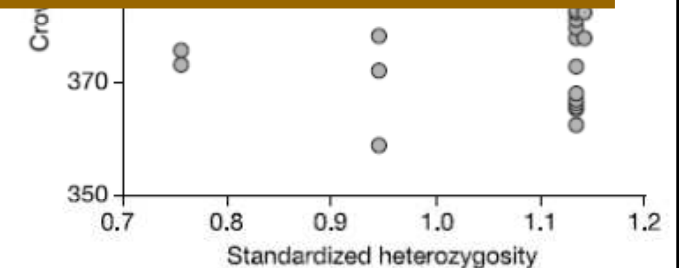
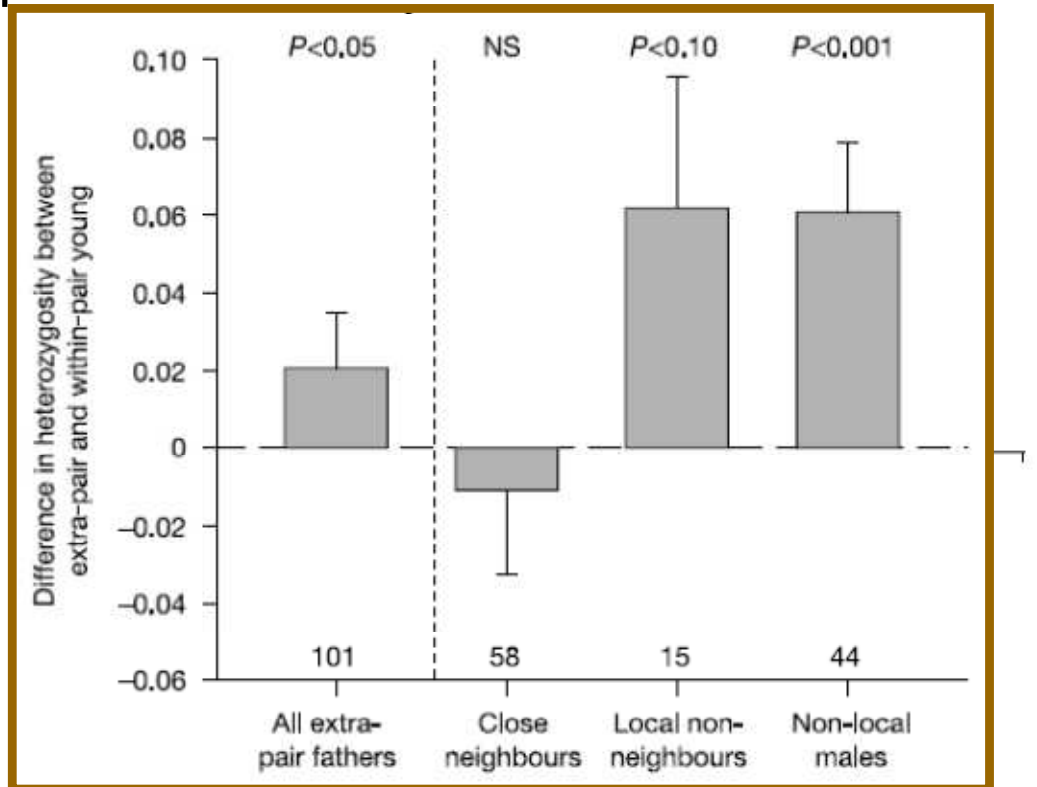
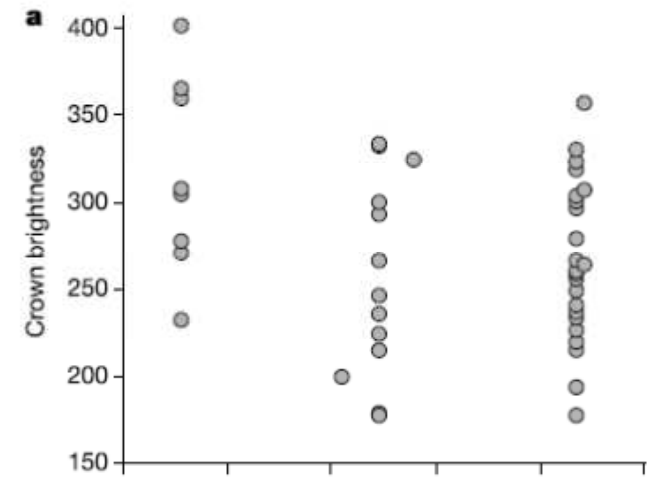
Amos et al. 2001

- Dataset:
Tuleňi, kulohlavci,
3 druhy albatrosů





- 2452 mlád'at, 5-7 mikrosatelitových lokusů, SH, IR
- SH a IR korelovány
- SH koreluje se zbarvením samců
- Mimopároví otci
 - Sousedí – větší a starší než podvedení samci
 - Cizinci – zvýšení heterozygotnosti



Emberiza schoeniclus

Kleven & Lifjeld 2005

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



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

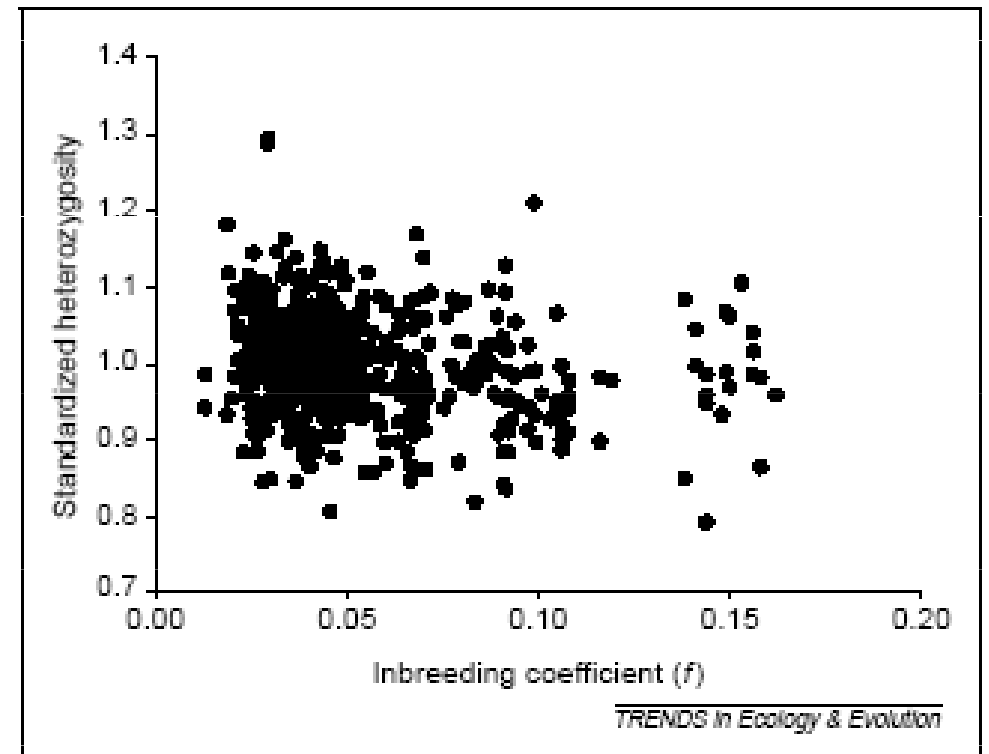


Figure 1. Observed relationship between individual inbreeding coefficient (f) (from a 7+generation pedigree) and standardized mean heterozygosity across an average of 101 microsatellite loci among 590 Coopworth sheep *Ovis aries* ($r^2 = 0.031$; $P < 0.0001$). Reproduced, with permission, from [6].

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“) – nejlepší asi IR nebo HL
 - Vazba na konkrétní lokusy („local effect“)
 - **Nejednoznačný vztah genetické variability a fitness**
-

Adaptivní variabilita

Lokální adaptace a outbrední deprese

Adaptivní variabilita

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

Outbrední deprese

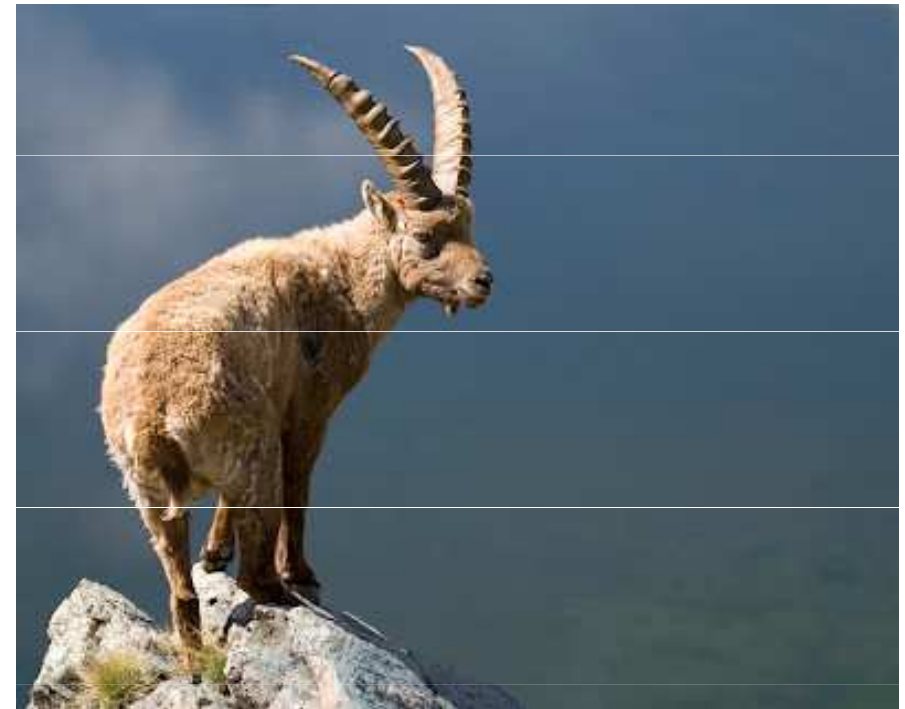
- Intrinsic* – genetická inkompatibilita (Dobzhansky-Muller incompatibility – epistatické interakce mezi alelami více lokusů) – selekce proti hybridům, např. v hybridních zónách
- Extrinsic* – narušení lokálních adaptací

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 říji na podzim (ne v zimě), mláďata se rodila v únoru a celá populace brzy vymřela

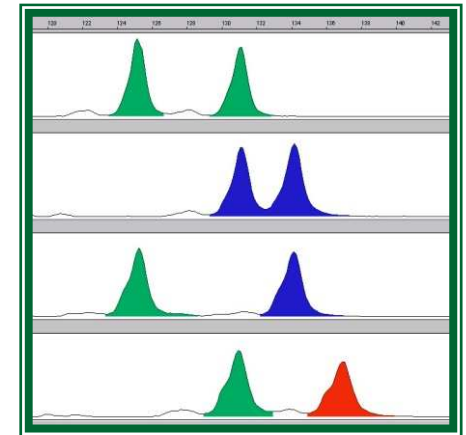


Speciální vzorkovací metody

Neinvazivní genetika

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**



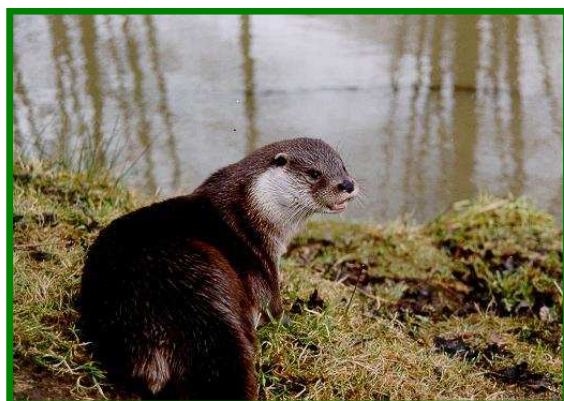
Použití neinvazivních metod

- **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.)
-

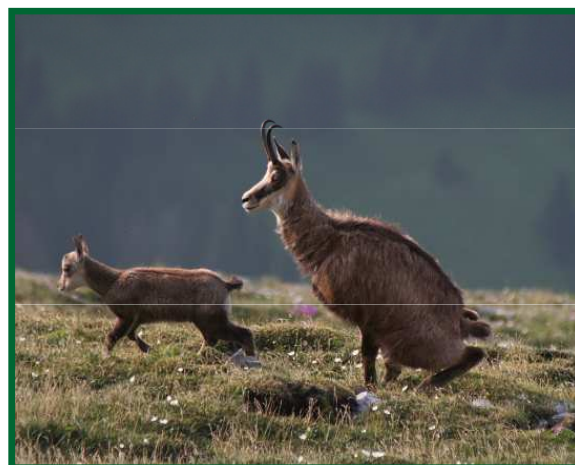
Zdroje DNA - trus



trus (buňky střevní sliznice)
→ „molecular scatology“



vydry



kamzíci



Zdroje DNA - chlupy

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

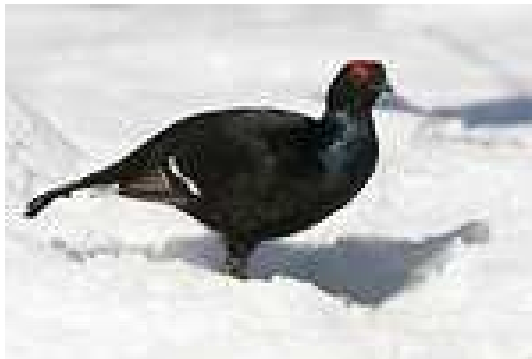


svišť
medvěd
rys
srnec



Zdroje DNA - peří

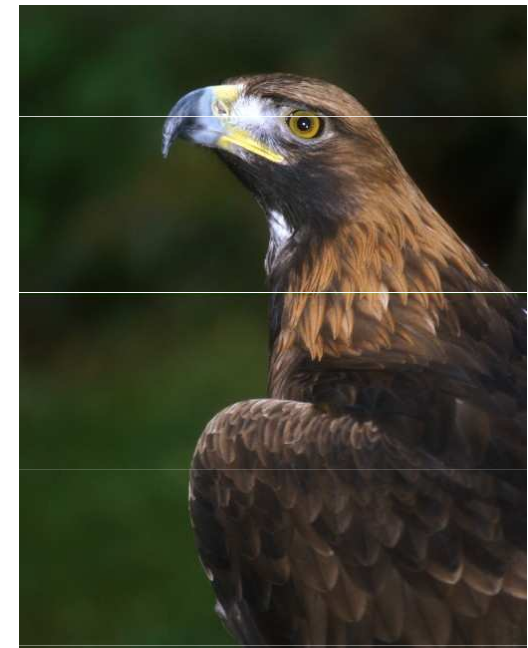
- opět folikul – „kořínek“ jednotlivého pera
- lepší vytržené pero (= pasti) než vypelichané pero (často velmi staré)



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“

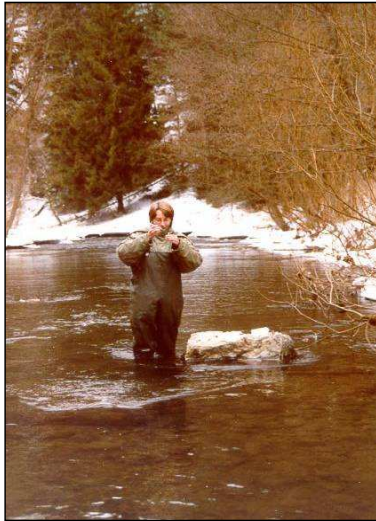


- krevsající ploštice Triatominae (Heteroptera)
- hodnocení úrovně stresu
- použitelná jako „méně invazivní“ metoda v ochranářské genetice



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)

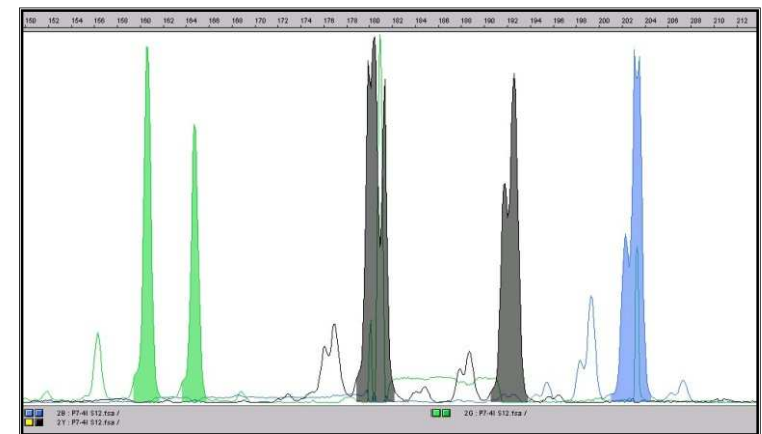
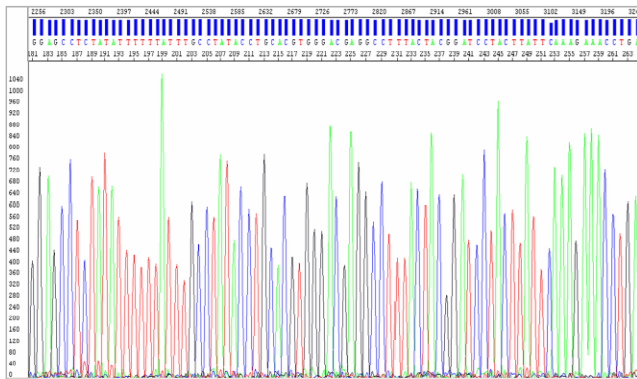


PCR (vysoce kvalitní enzymy)

- stačí jedna buňka s DNA



**analýza
variability
syntetizovaného
úseku**



Nevýhody a jejich řešení

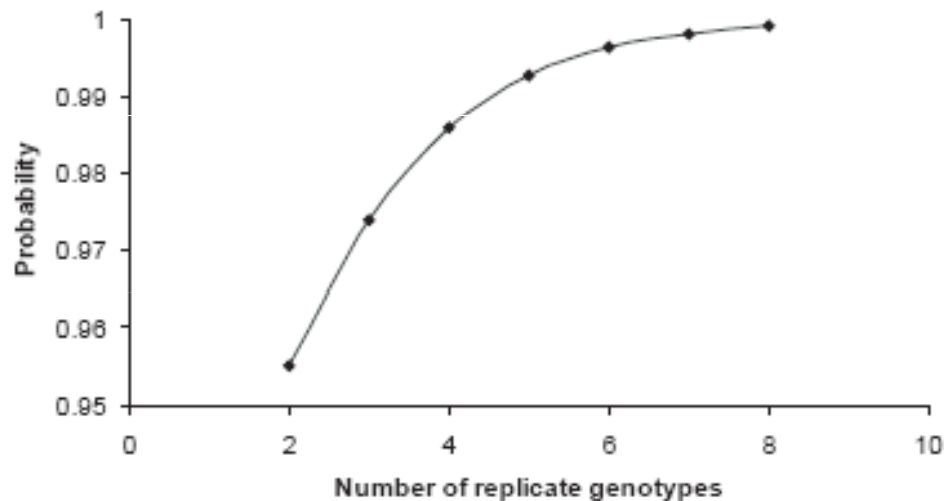
- nízká kvalita/kvantita DNA - nízká úspěšnost zjištění správného genotypu a vysoké riziko kontaminací
- vyloučení genotypizačních chyb a snížení rizika kontaminace



- 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)

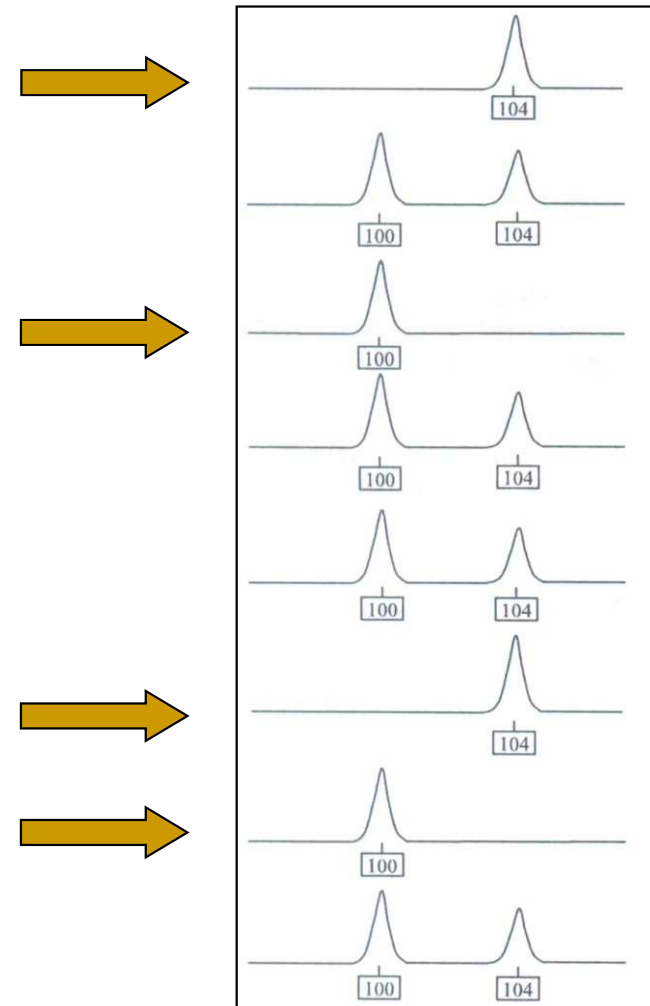


Dolphins - tissues vs. fresh faeces

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

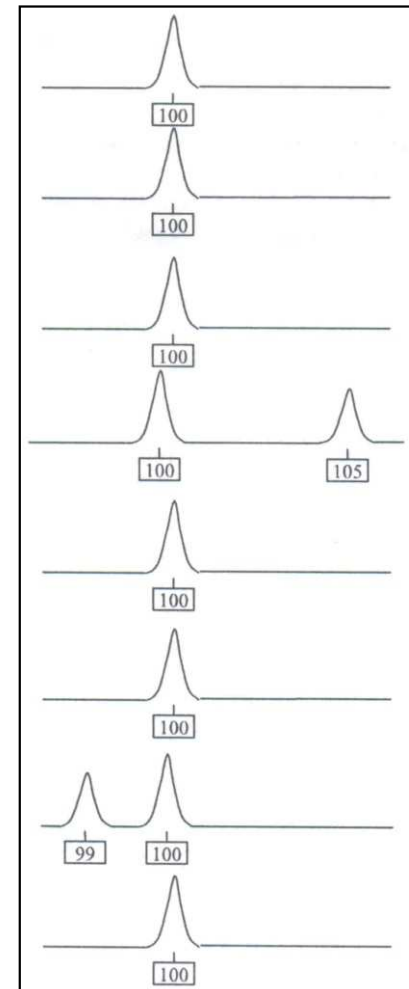


gorilla

x



Clostridium



Homozygote 100/100
(8 different PCRs)

Zvýšení koncentrace DNA

- pre-amplifikace (Bellemain & Taberlet 2004)

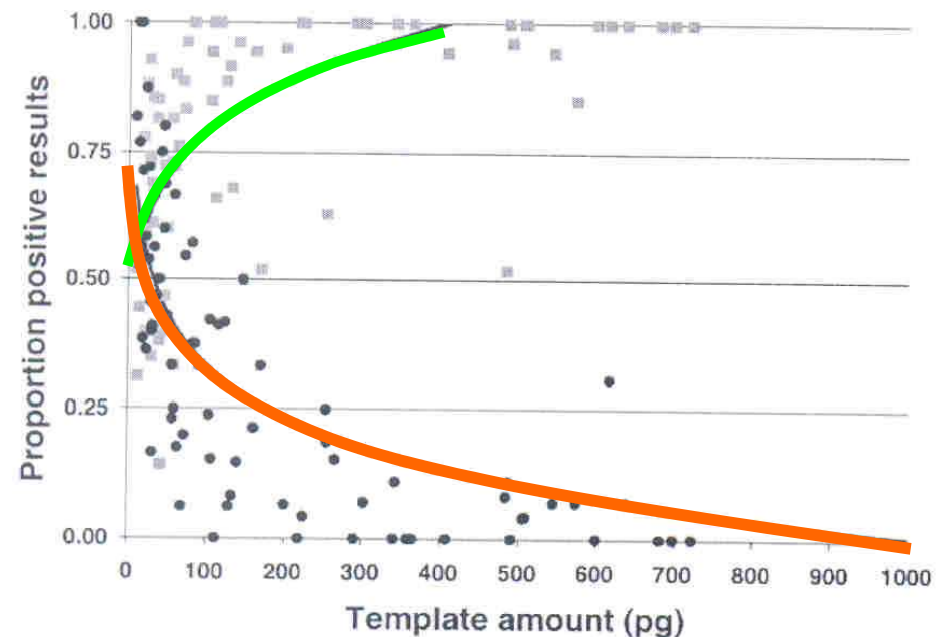


Multiplex preamplifikace
všech lokusů – zvýšení
koncentrace
mikrosatelitové DNA



Semi-nested PCR pro 1-3
lokusy

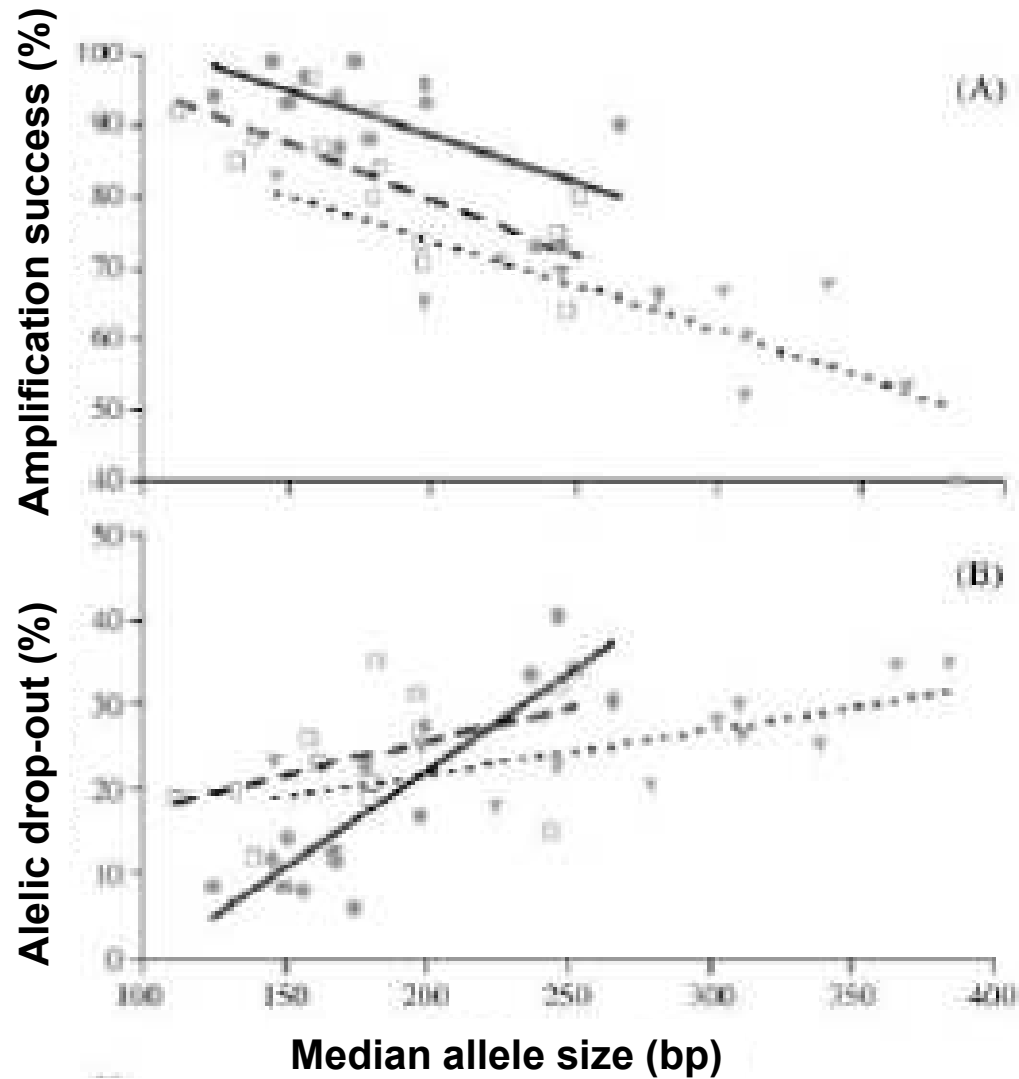
- qPCR (Morin et al. 2000)



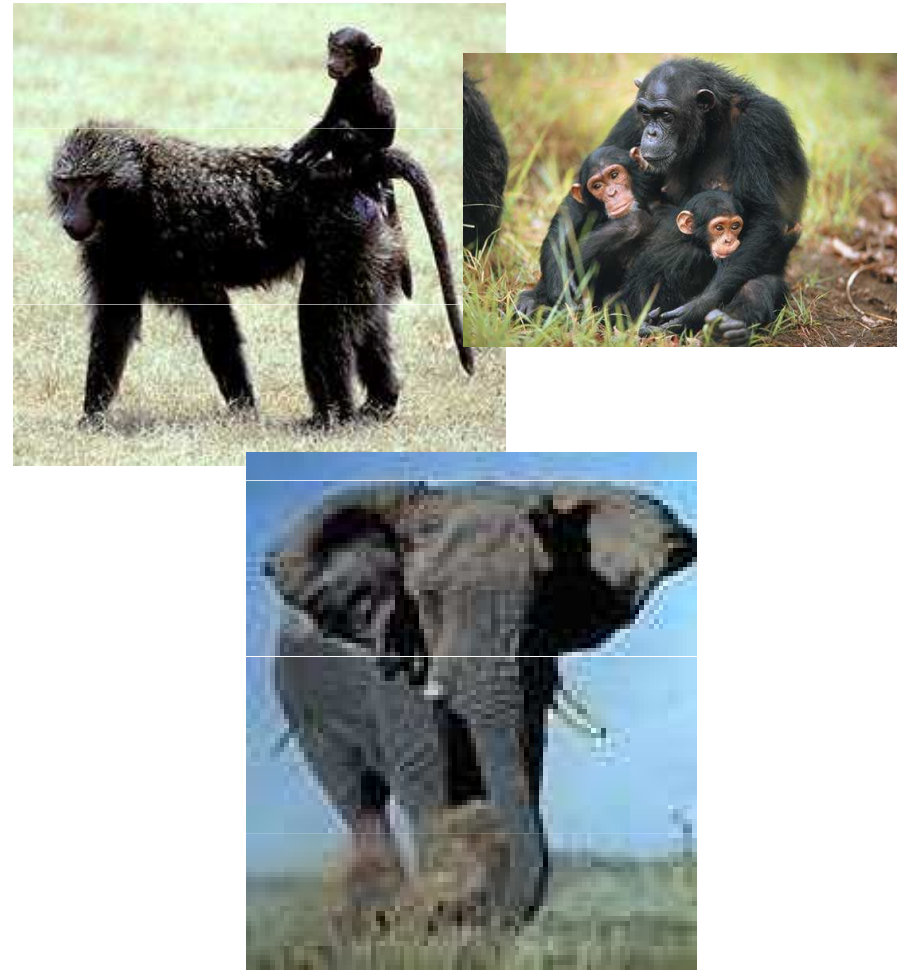
Positivní PCR Allelic dropout

Genotypizace pouze „dobrých“ vzorků

Effect of locus



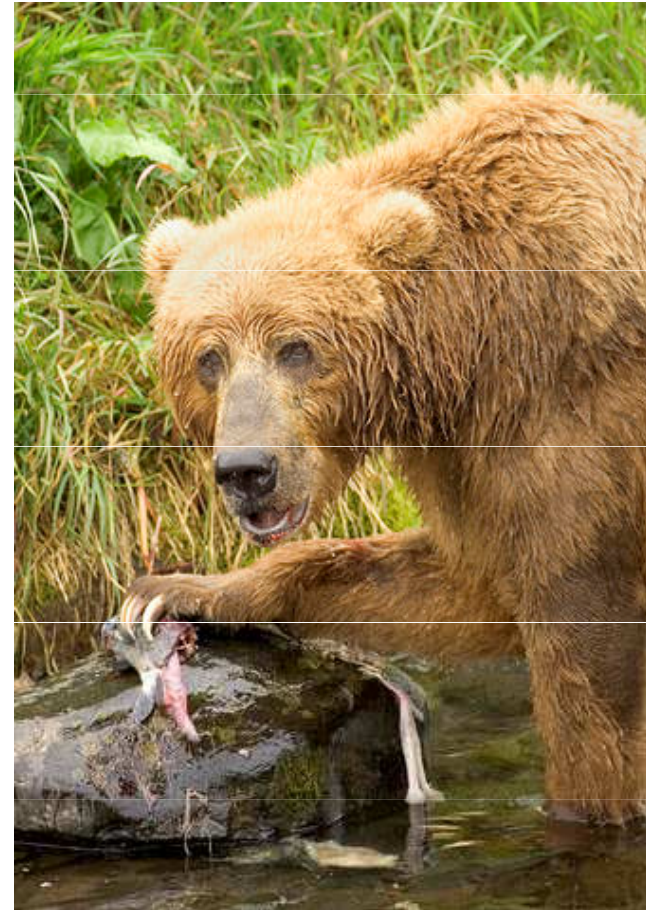
(Buchan et al. 2005)



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

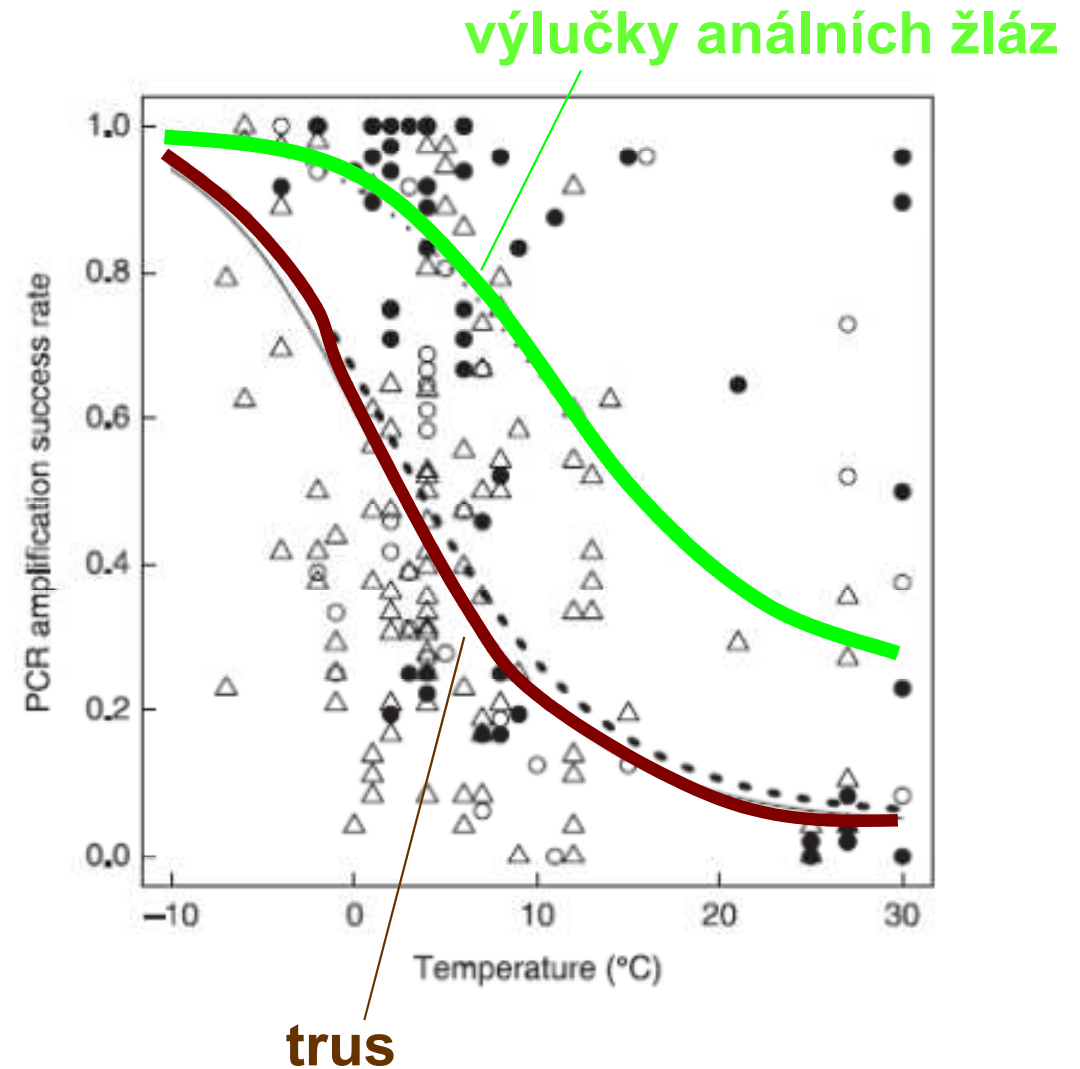
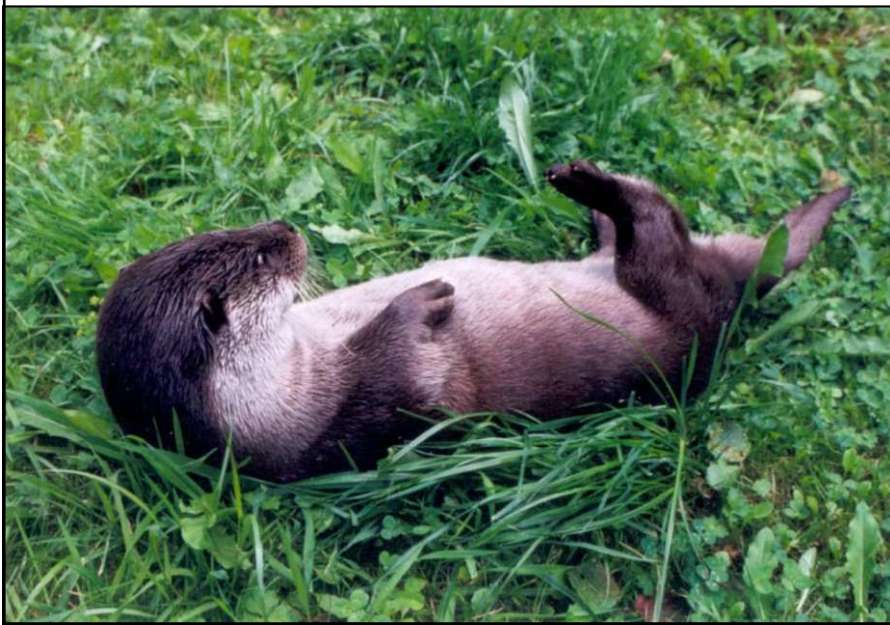
Influence of diet on faecal DNA amplification

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



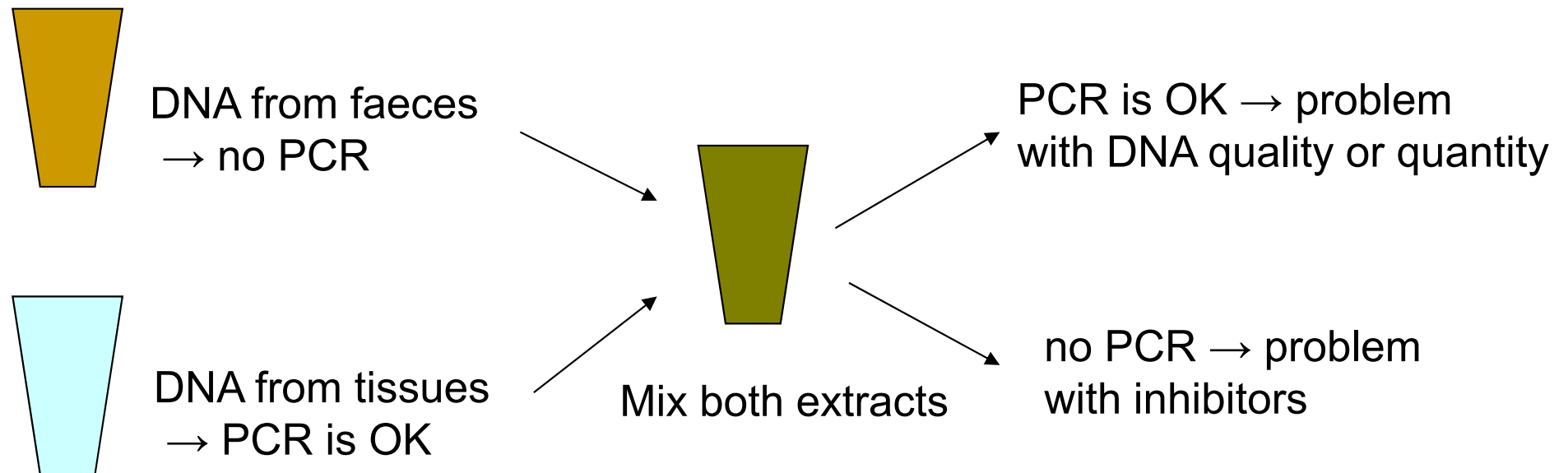
Vliv typu vzorku a teploty

- 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



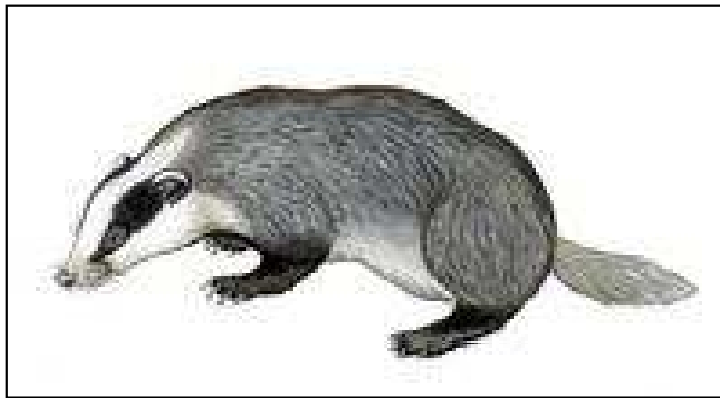
Forenzní analýzy

- 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

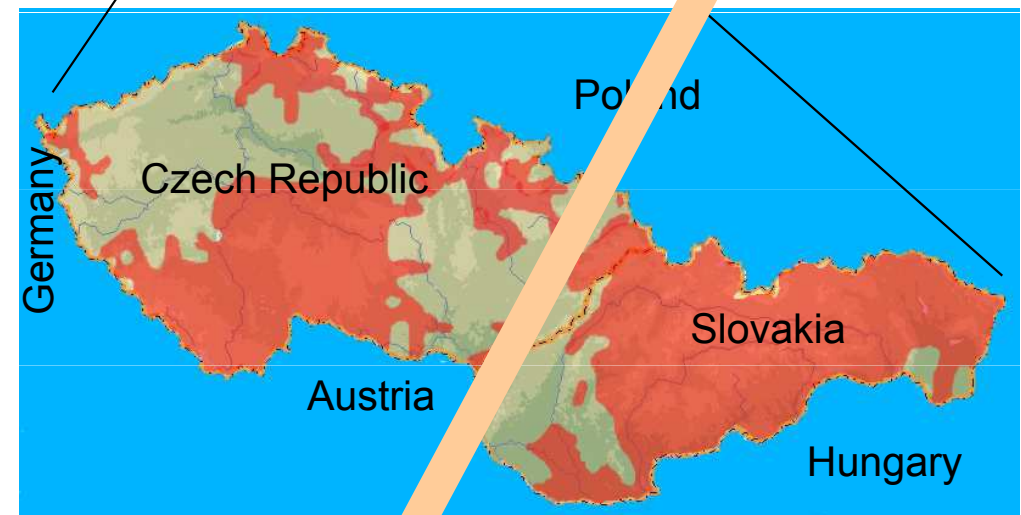
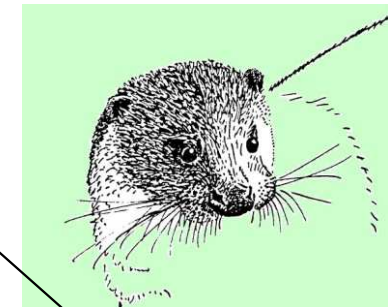
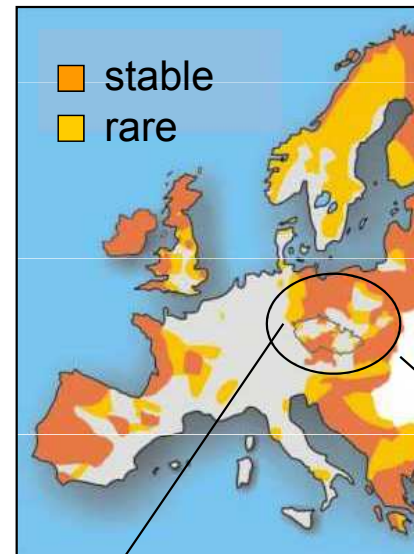
Vydra říční ve střední Evropě

- 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



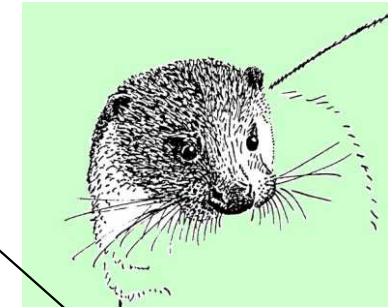
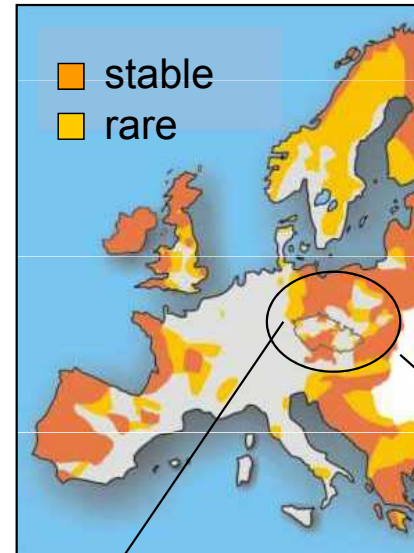
Vydra říční ve střední Evropě

- 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)

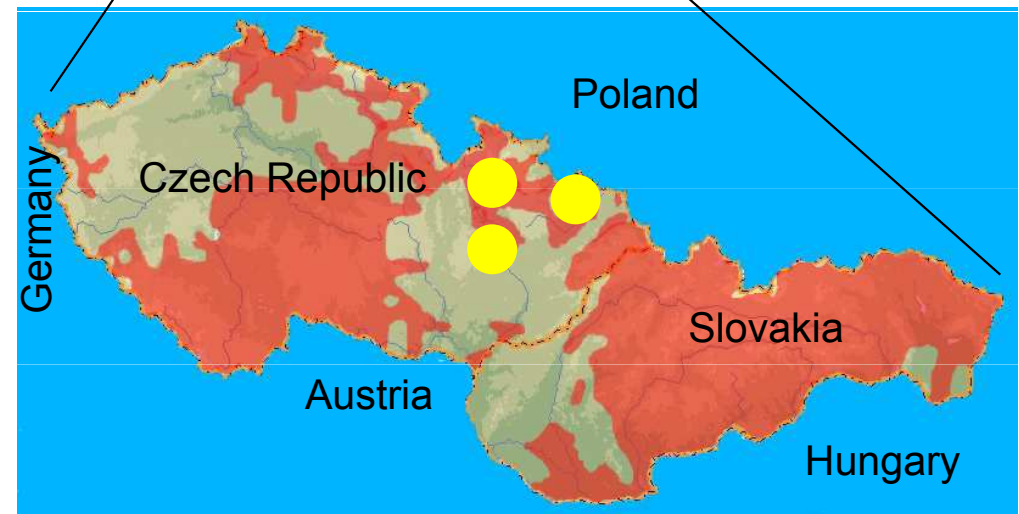
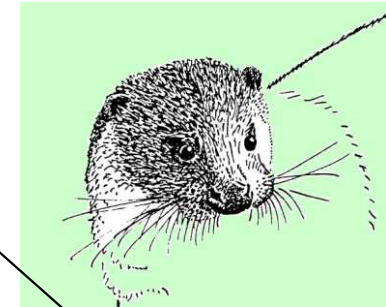
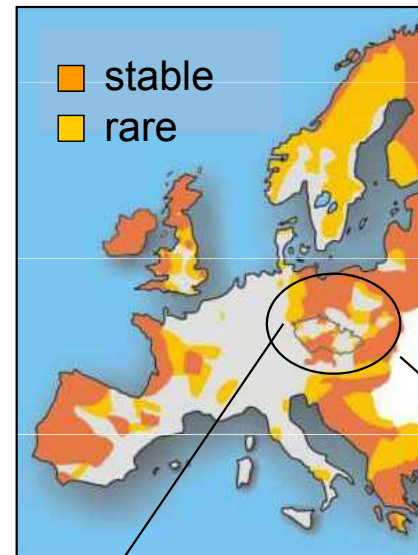


Vydra říční ve střední Evropě

- silný pokles početnosti v minulém století
- fragmentace populací

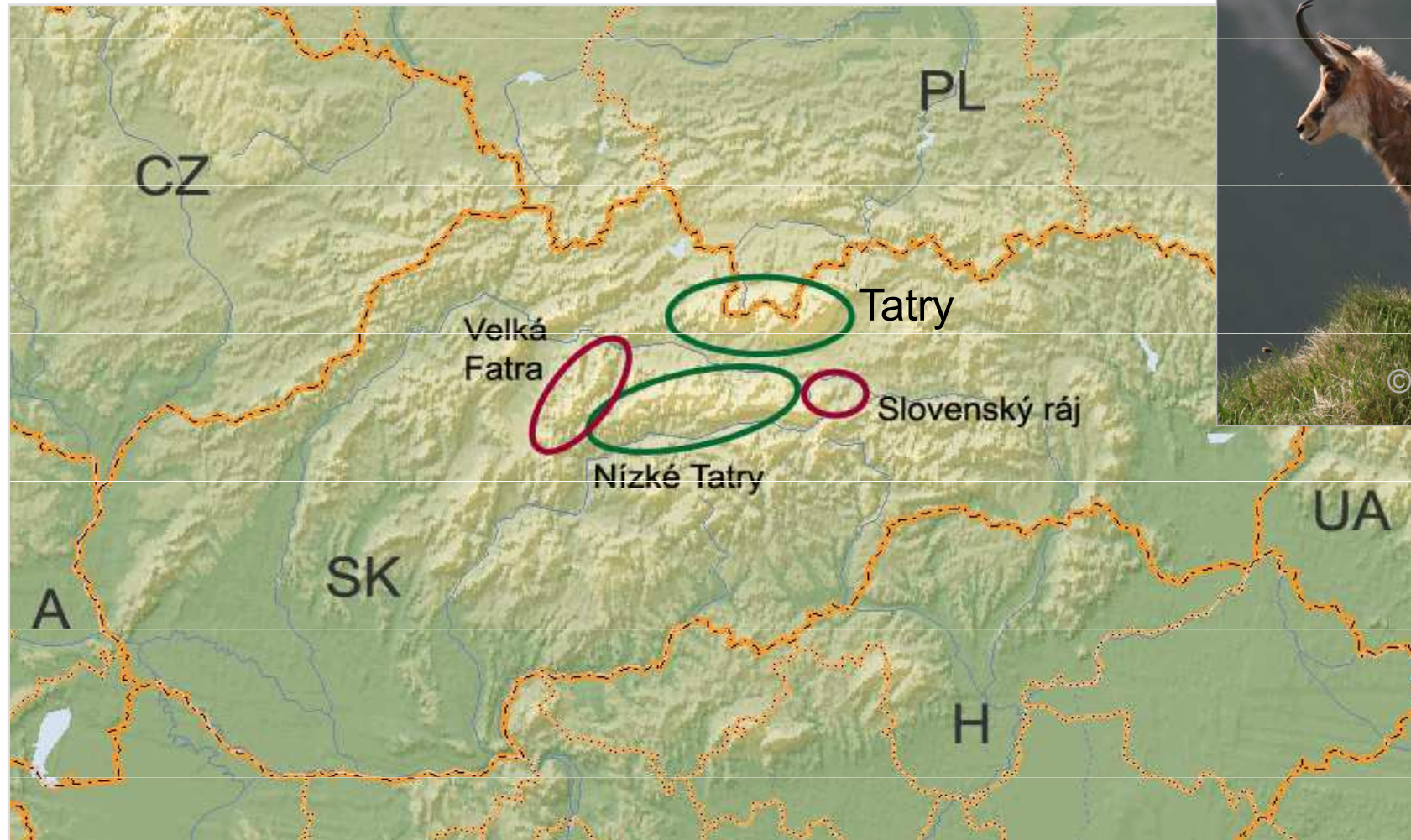
Cíle:

- 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 bars, 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 bars 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 bars in red and yellow, indicating admixture between the three clusters.

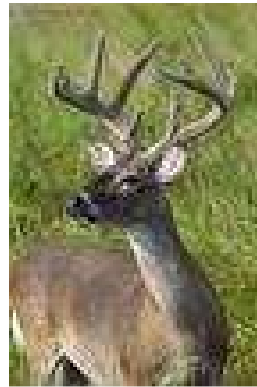
Příklady:
IDENTIFIKACE POHLAVÍ

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



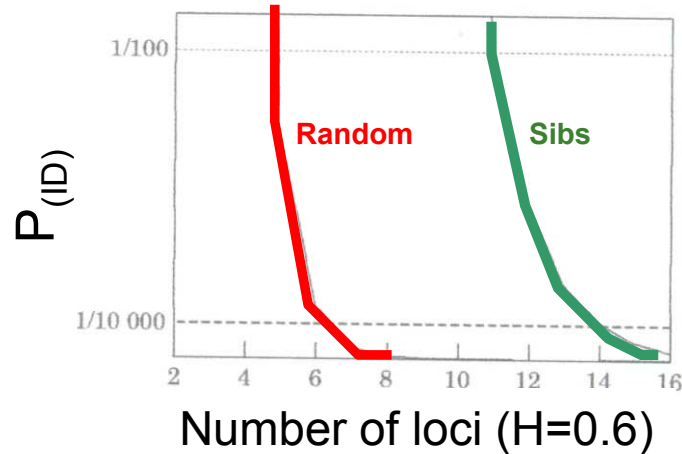
Murphy et al. 2003

Příklady:
IDENTIFIKACE JEDINCŮ

Identification of individuals

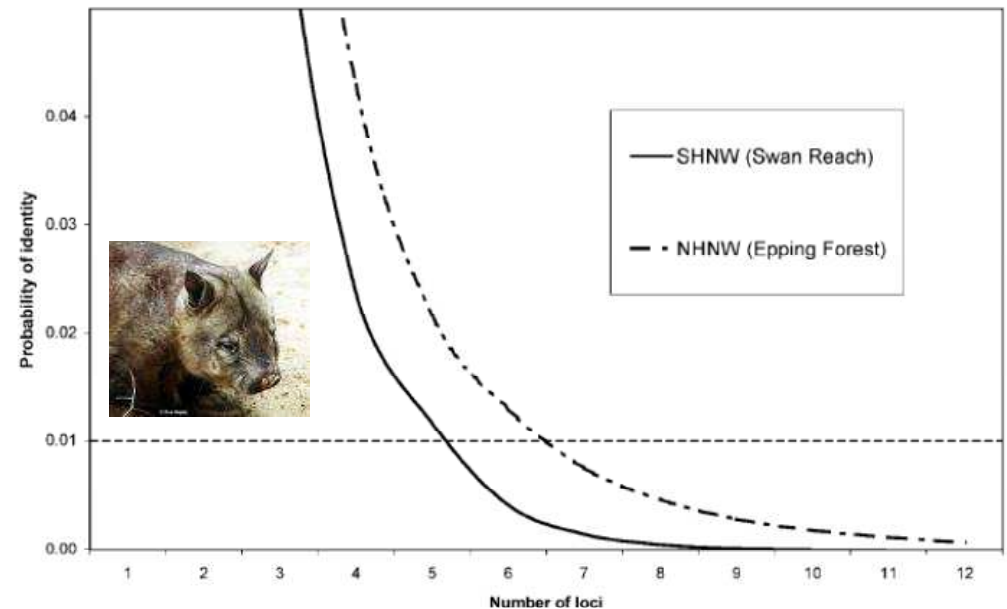
- multilocus microsatellite fingerprinting – power estimated as „probability of identity“ ($P_{(ID)}$) (Waits et al. 2001)

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



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

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

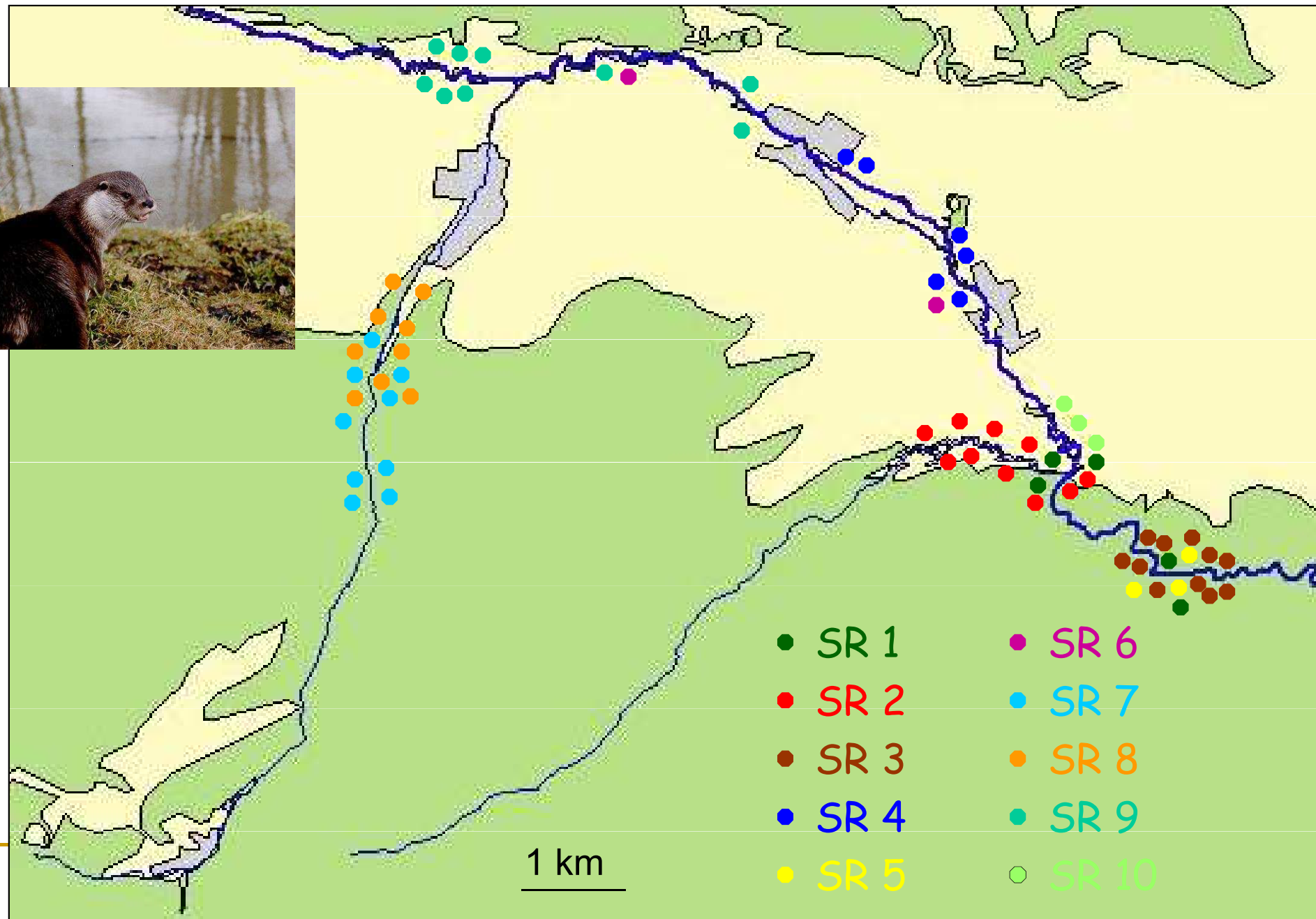


Identifikace jedinců

- **prostorová aktivita**

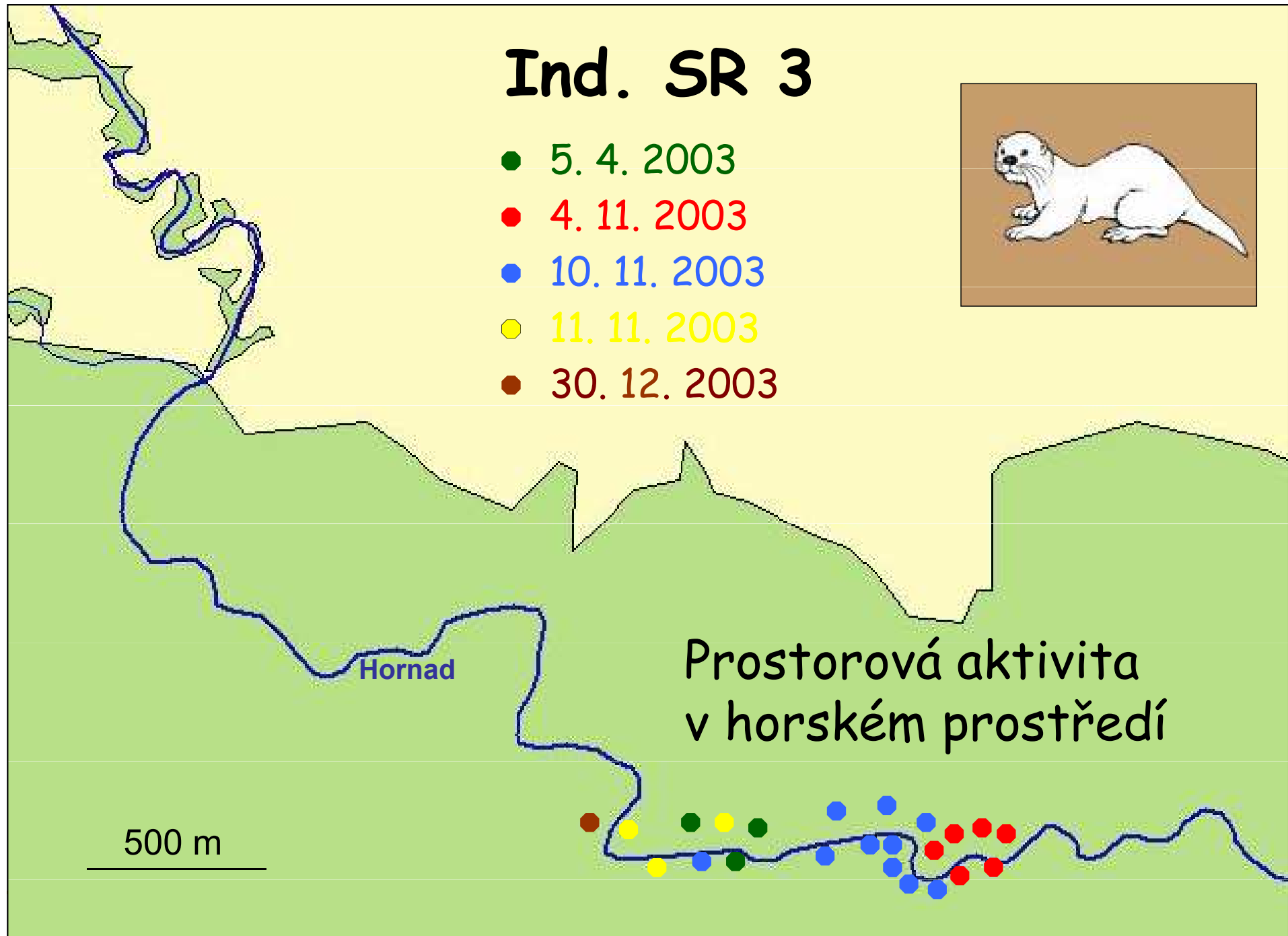
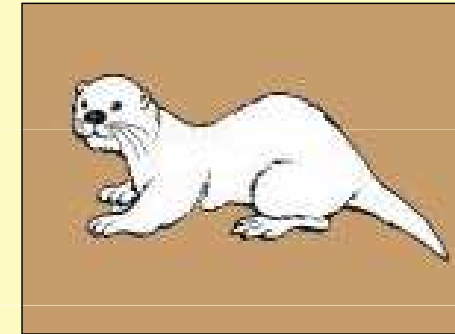


Identifikovaní jedinci - Hornád, NP Slovenský Raj



Ind. SR 3

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



Non-invasive CMR studies

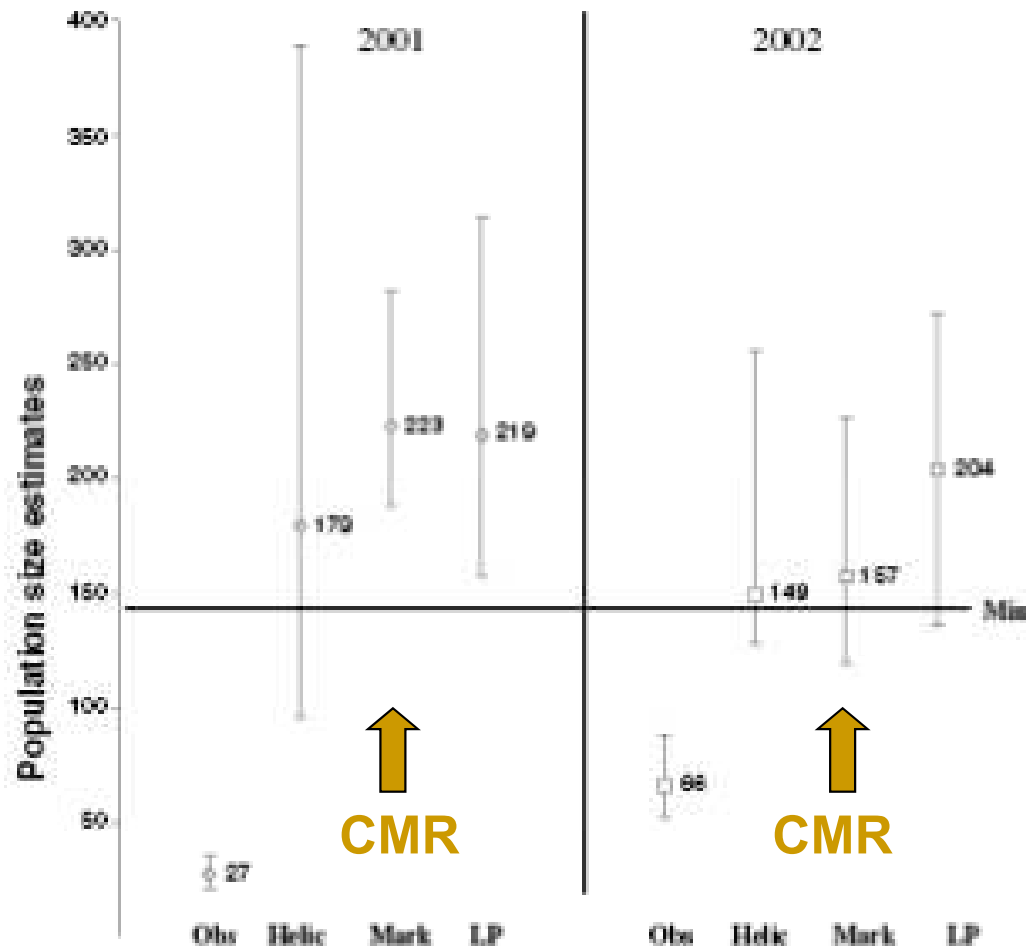
- **Velikost populace**
- „Capture-Mark-Recapture“ (review in Lukacs & Burnham 2005)
- Opakované vzorkování stejného zvířete
- Přežívání, populační dynamika atd.
- Closed population models, open population models, Robust design models
- Korekce na genotypizační chyby
- Trus – analýza **individuální variability**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

