



Fundusze
Europejskie
Infrastruktura i Środowisko



Główny Inspektorat Ochrony Środowiska

Unia Europejska
Fundusz Spójności



KRAMKO

Monitoring genetyczny populacji wilka (*Canis lupus*) jako nowy element monitoringu stanu populacji dużych drapieżników

Wojciech Śmietana



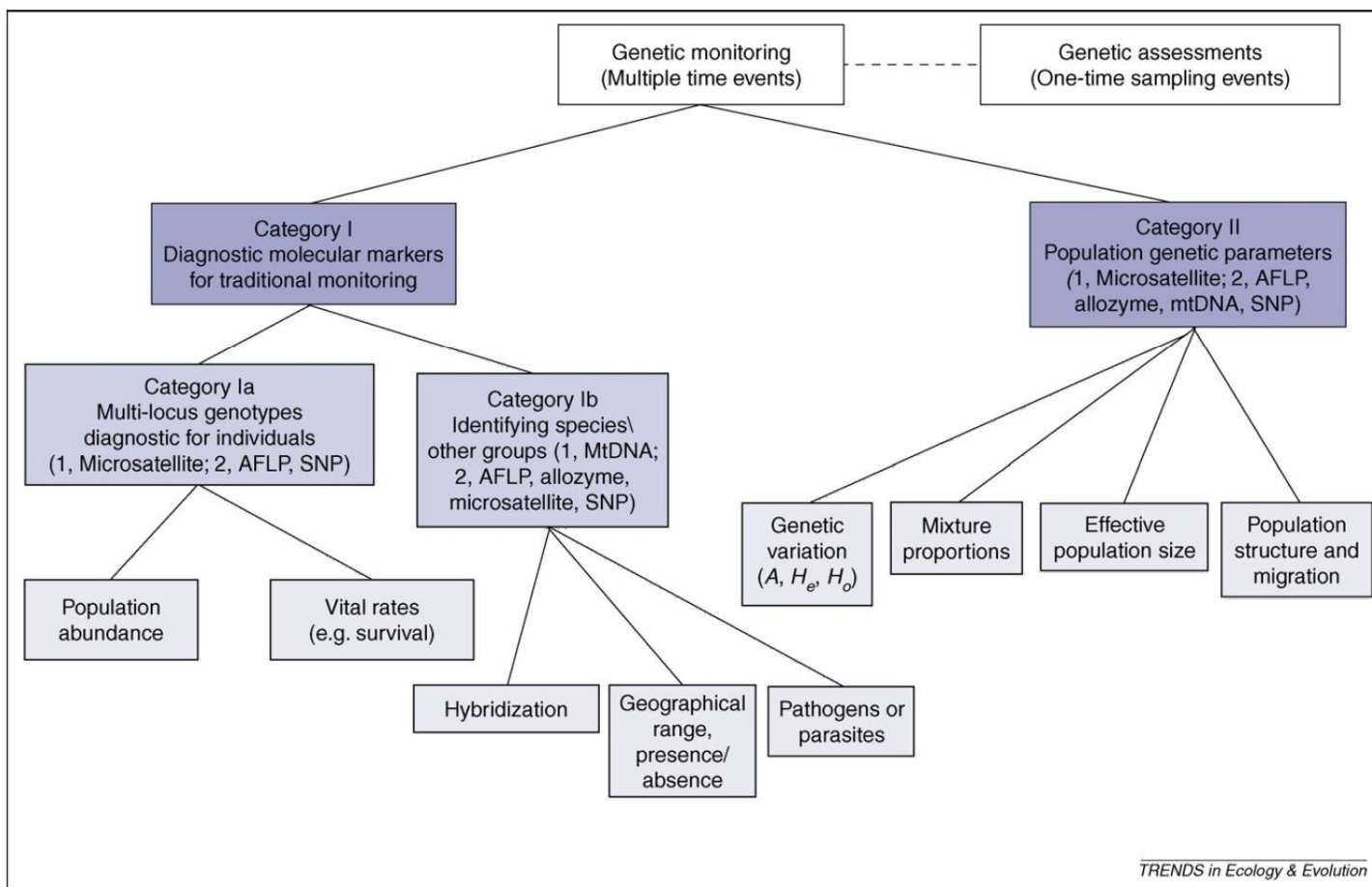
Co to jest monitoring genetyczny?

Monitoring genetyczny to regularnie powtarzane pomiary parametrów populacyjnych przy użyciu molekularnych markerów genetycznych.

Ocena to jednorazowy pomiar parametrów.



Rodzaje monitoringu genetycznego

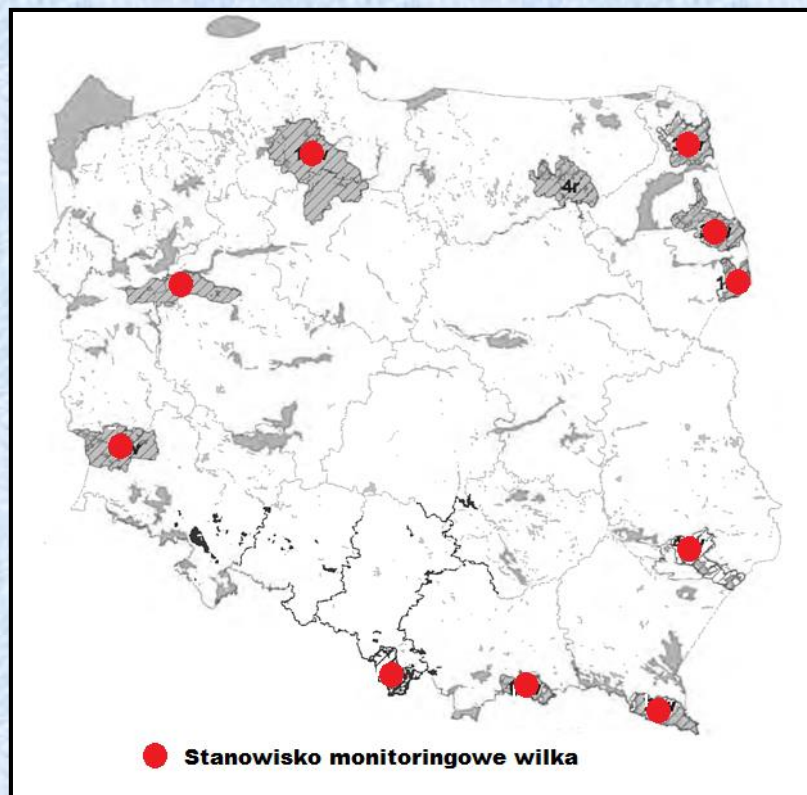


A framework for categorizing genetic monitoring efforts. The categories are guidelines to help direct discussions and spur research on genetic monitoring, rather than being necessarily mutually exclusive. Category I is monitoring traditional parameters using diagnostic molecular markers as tags to identify either individuals (Ia), or species or other groups (Ib). Category II is the monitoring of population genetic parameters (e.g. A, H_e, H_o, N_e, N_m, F_{ST}; defined in Table 1) over time. For each category, the most commonly used molecular markers (designated 1,) and other markers widely used (designated 2,) are listed.

Schwartz M.K. et al. 2006. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. Trends in Ecology and Evolution 22(1): 25-33



Główne założenia oceny liczebności w ramach projektu



- 1) 150 próbek na stanowisko monitoringowe, razem 1 500
- 2) wykrycie osobników należących do wszystkich grup rodzinnych na każdym stanowisku
- 3) rejestracja wszelkich śladów obecności wilków w trakcie prowadzenia prac terenowych – informacje pomocnicze
- 4) próbki zbierane przez zespół 20 przeszkolonych osób (minimum)
- 5) analizy genetyczne w Laboratorium Genetyki Molekularnej Instytutu Zootechniki PIB (akredytacja Państwowego Centrum Akredytacji oraz certyfikat Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Zwierząt- ISAG)
- 6) szczegółowa weryfikacja wyników genotypowania przed wykonaniem oceny liczebności
- 7) ocena liczebności (zagęszczenia) wilka na poszczególnych stanowiskach metodą ponownego odłowu, np. CAPWIRE
- 8) ocena liczebności wilka na terenie całego kraju na podstawie ekstrapolacji



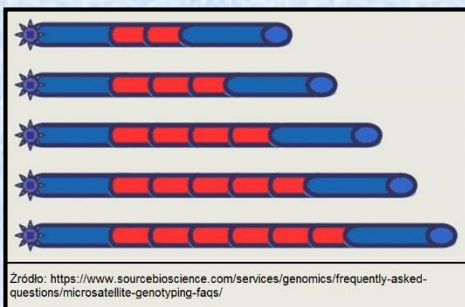
Genotypownie – ustalanie profilu genetycznego osobników na podstawie analizy mikrosatelitarnego DNA



Mikrosatelity DNA – STR (ang. simple tandem repeats) – powtórzenia tandemowe złożone z 2 do 6 pz (np. CAAG, TGA lub CA)

GTCGACTCTAGAGGATCCCAAGTGATGTGCATACACGTGCACACACACACACACACAGAGGGTGTGCACATGTGCATGCACACTCCAAGAGACAGTGCCTAGTAAAGTGTCTCAGCACCATCTGCAGCAAACAGGTTCTGCAA

The **repeat unit** is highlighted in red, while the **forward** and **reverse primers** are highlighted in blue and green.



Allele mikrosatelitów - warianty długości jednego locus

	Allel 1 -----	Allel 2 -----	
	5	7	osobnik1
	5	5	osobnik2
	4	6	osobnik3

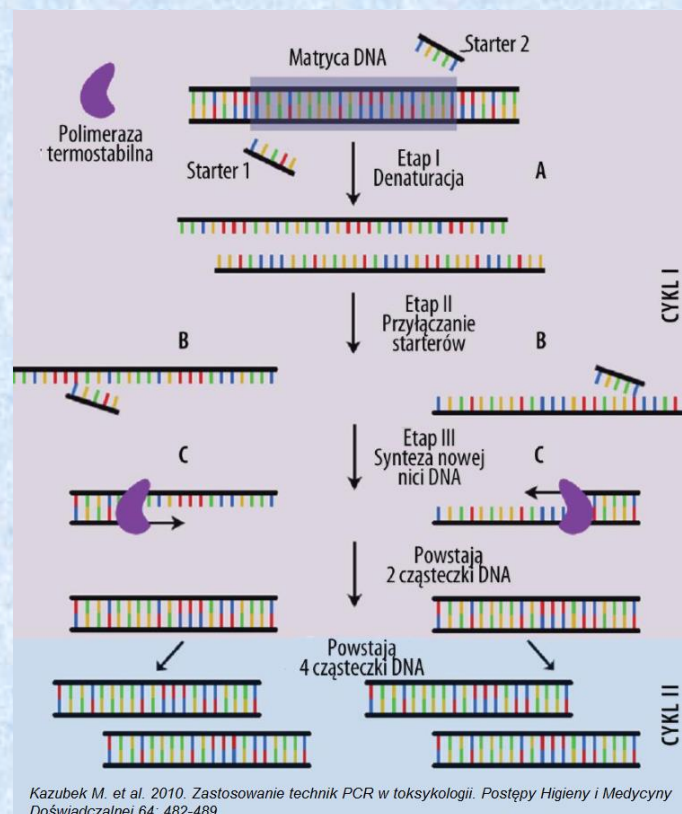


Prace laboratoryjne:

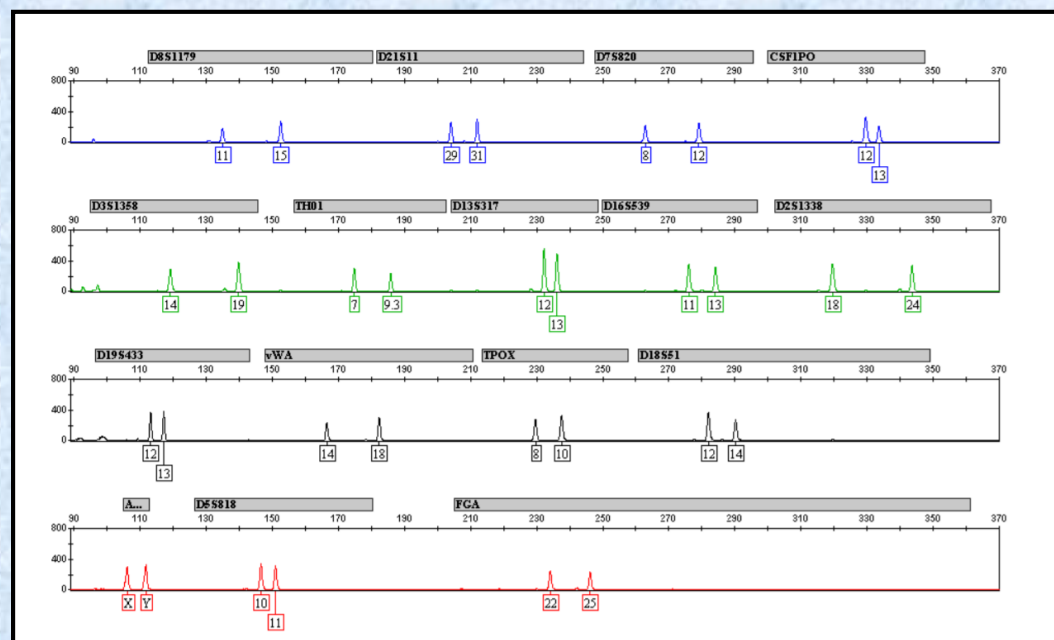
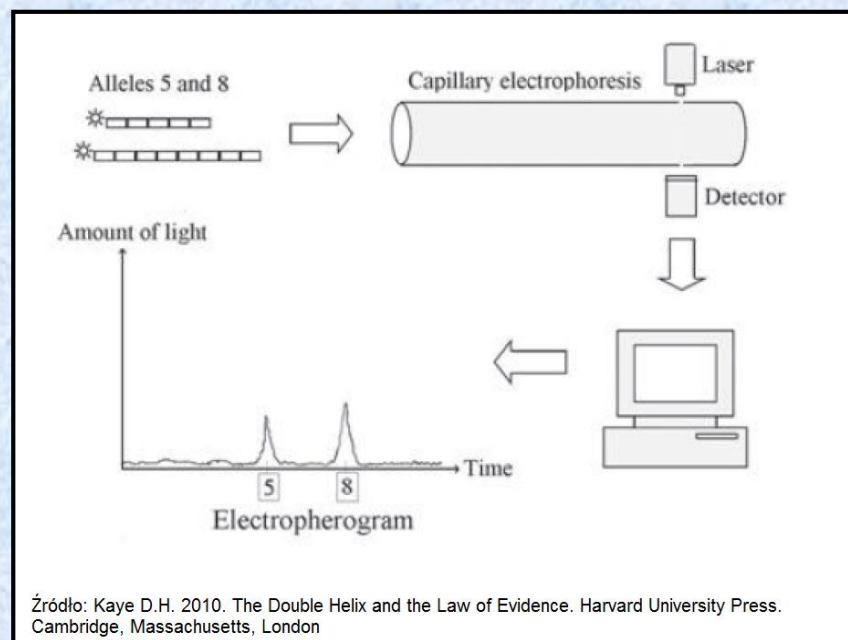
1) Izolacja DNA



2) Amplifikacja DNA - PCR (ang. polymerase chain reaction)



3) Analiza produktów PCR



REN105L03	REN145P07	REN199O08	REN69B24	REN94H15	CPH9	REN316E23	REN106i06	AHT121	CXX251	Sex
162.166	156.166	186.194	123.131	211.221	139.157	214.216	200.200	198.208	133.141	250.250



Problemy związane z analizą prób nieinwazyjnych



Materiał nieinwazyjny:

- odchody
- włosy z cebulkami
- ślady krwi
- mocz
- ślina

Cechy materiału genetycznego pochodzącego z prób nieinwazyjnych:

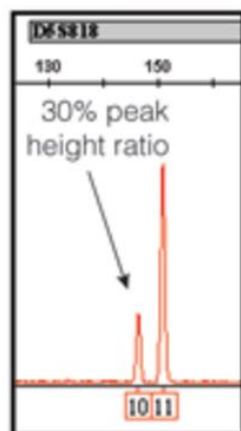
- niewielka ilość
- możliwa degradacja

Konieczność wykonania dużej liczby cykli PCR

Błędy genotypowania:

- amplifikacja preferencyjna
- wypadnięcie allelu (drop-out)
- stuttery
- wstawienie "allelu" (drop-in)

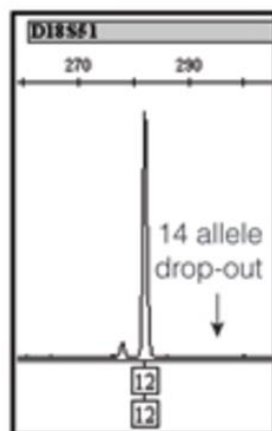
Severe Peak Imbalance



Correct genotype:

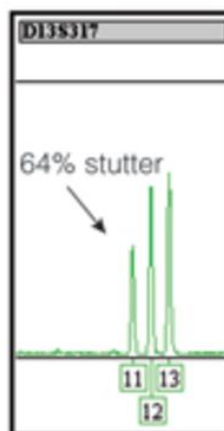
10, 11

Allelic Drop-out



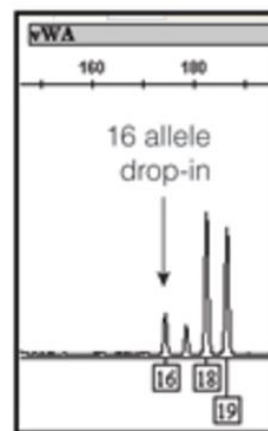
12, 14

High Stutter



12, 13

Allelic Drop-in



18, 19

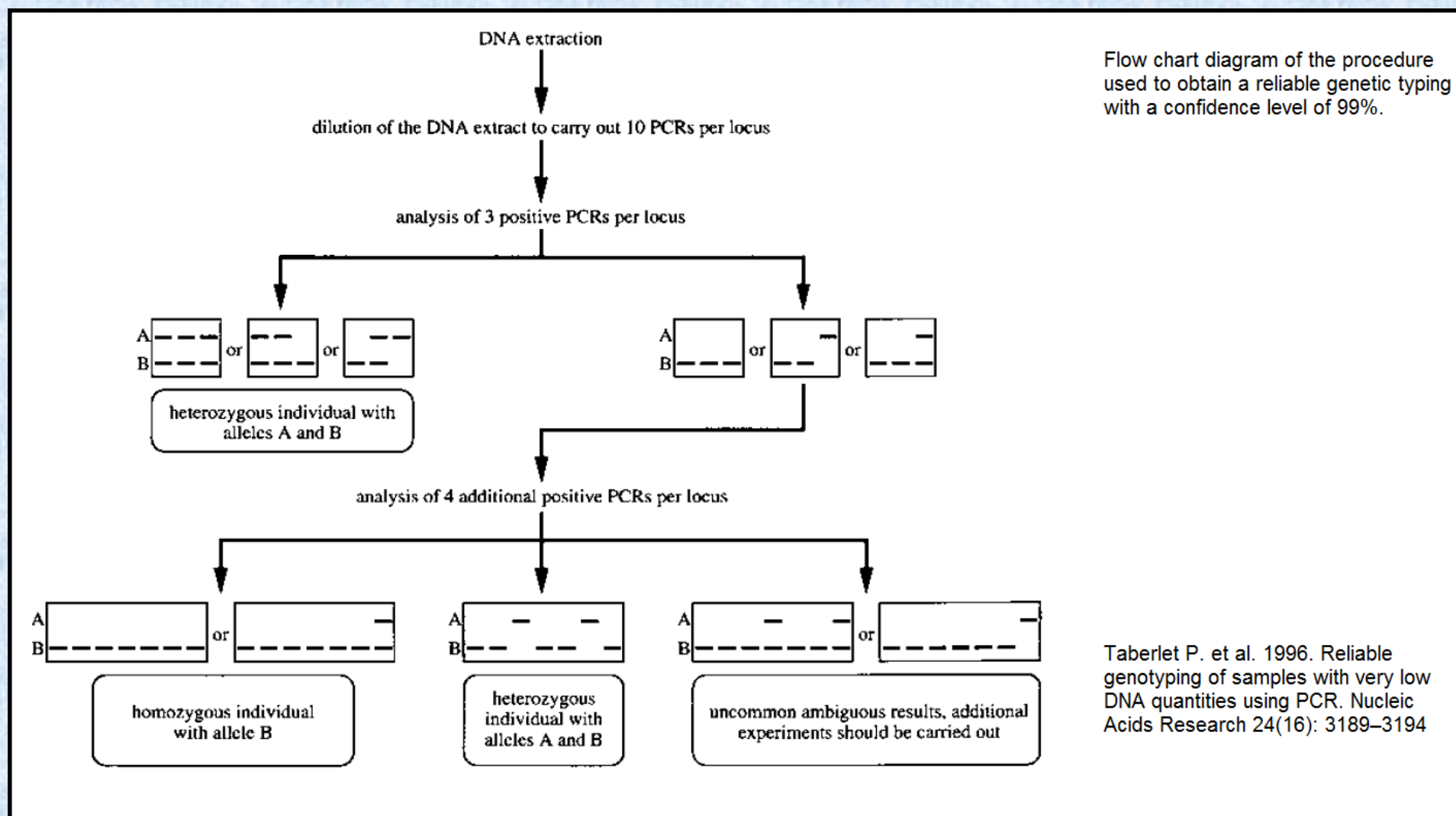
Stochastic effects that randomly occur when PCR amplifying low amounts of DNA using an increased number of PCR cycles.

Butler J.M. and Hill C.R. 2010. Scientific Issues with Analysis of Low Amounts of DNA. Promega Corporation Web site. <http://pl.promega.com/resources/profiles-in-dna/2010/scientific-issues-with-analysis-of-low-amounts-of-dna/>



Eliminacja błędów genotypowania

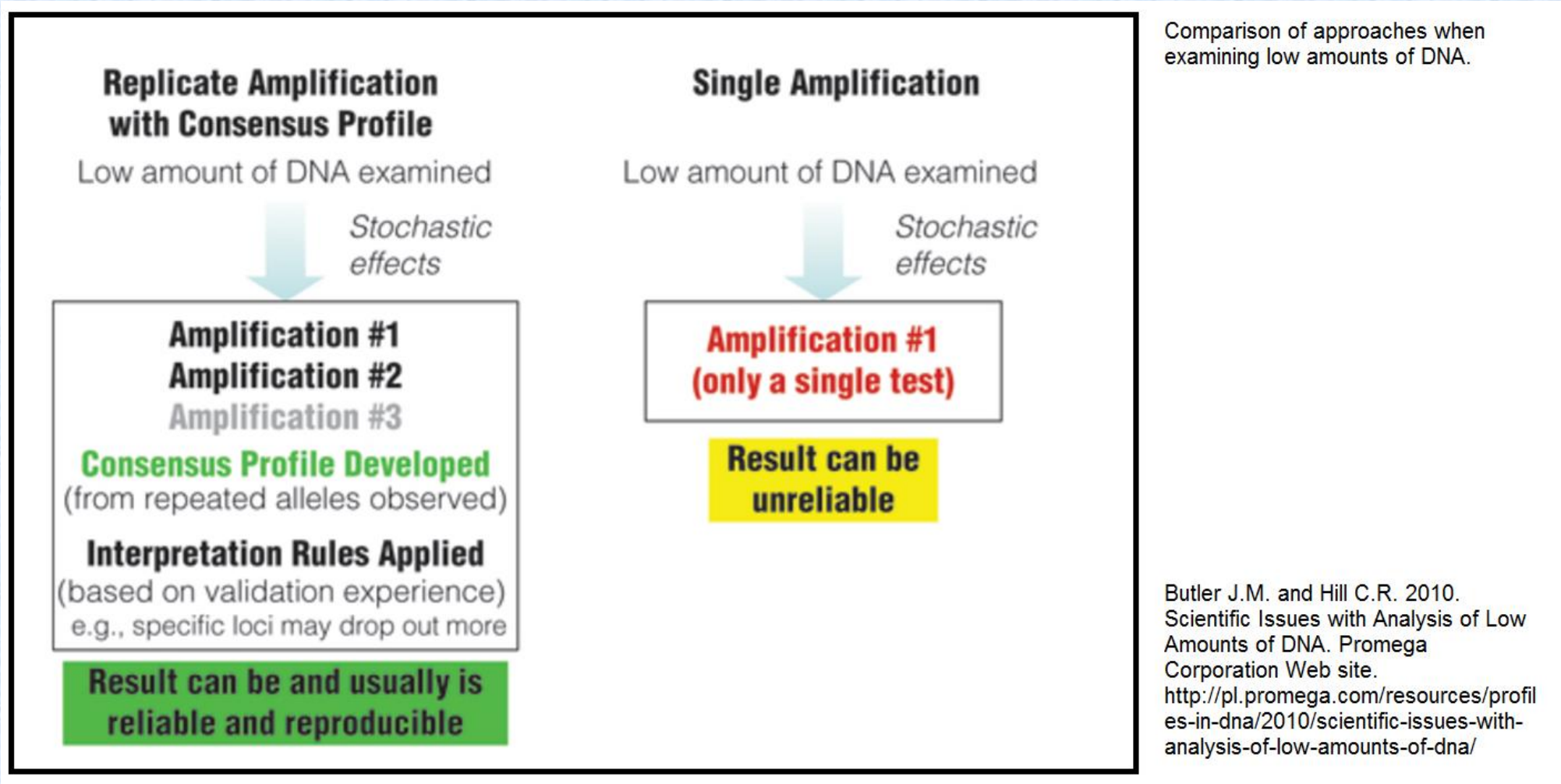
1) Multiple tubes





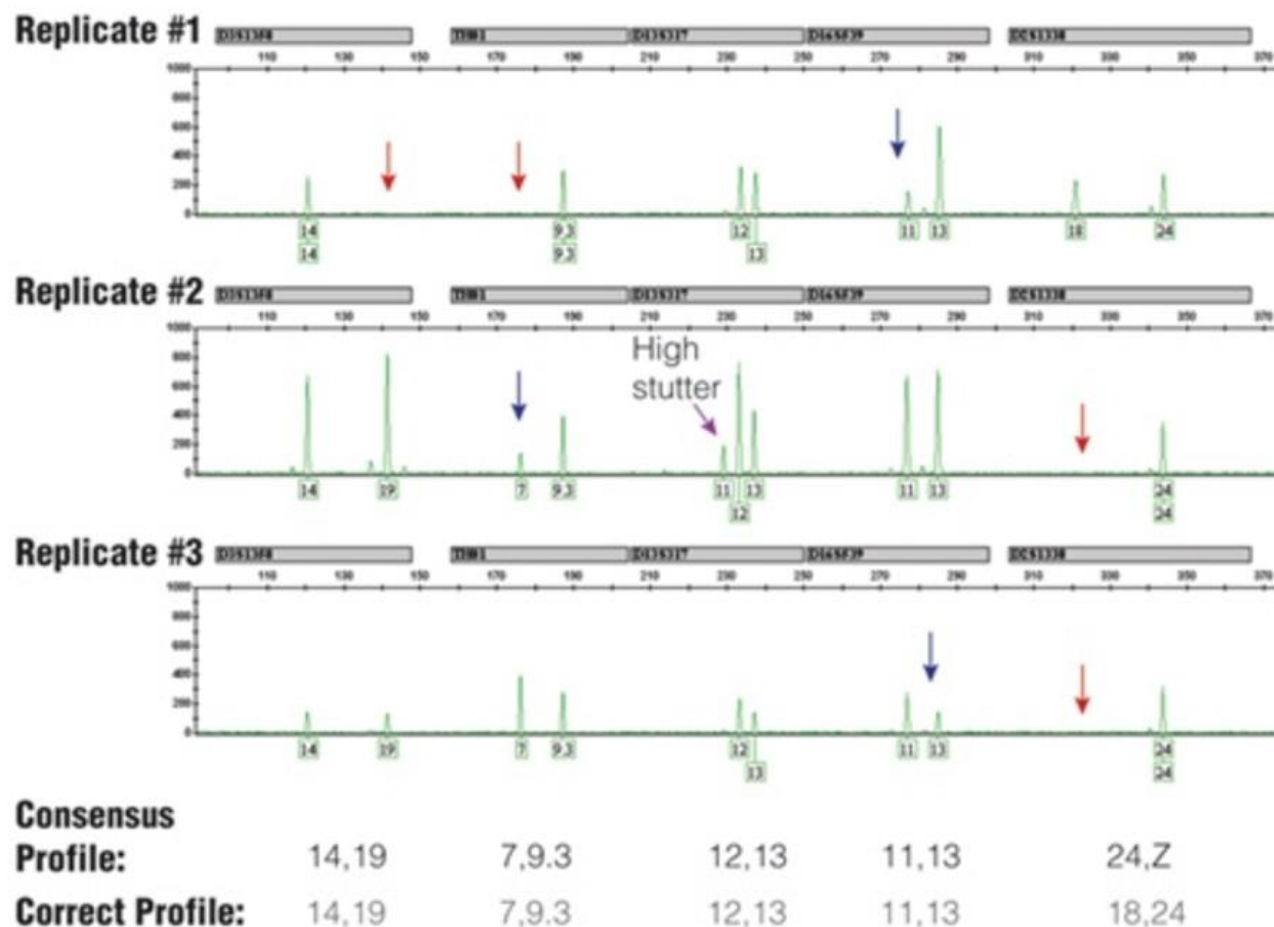
Eliminacja błędów genotypowania, cd.

2) Replicate amplification – powtarzana amplifikacja





Replicate amplification, cd.



Three replicate PCR amplifications of a 10pg single-source DNA template.

Butler J.M. and Hill C.R.
2010. Scientific Issues with Analysis of Low Amounts of DNA. Promega Corporation Web site.
<http://pl.promega.com/resources/profiles-in-dna/2010/scientific-issues-with-analysis-of-low-amounts-of-dna/>



Ogólne zalecenia dotyczące identyfikacji osobniczej z prób nieinwazyjnych w badaniach mających na celu ocenę liczebności (Paetkau 2003)

- **odpowiedni dobór markerów**
- **odrzuć z dalszej analizy prób dających bardzo słaby wynik**
- **powtórne analizy prób średniej jakości**
- **weryfikacja podobnych do siebie par genotypów**



Ile i jakich markerów użyć w celu identyfikacji osobniczej?



Przykład wyboru najlepszych markerów dla identyfikacji osobniczej w oparciu o analizę zmienności 11 genotypów.

A- liczba alleli

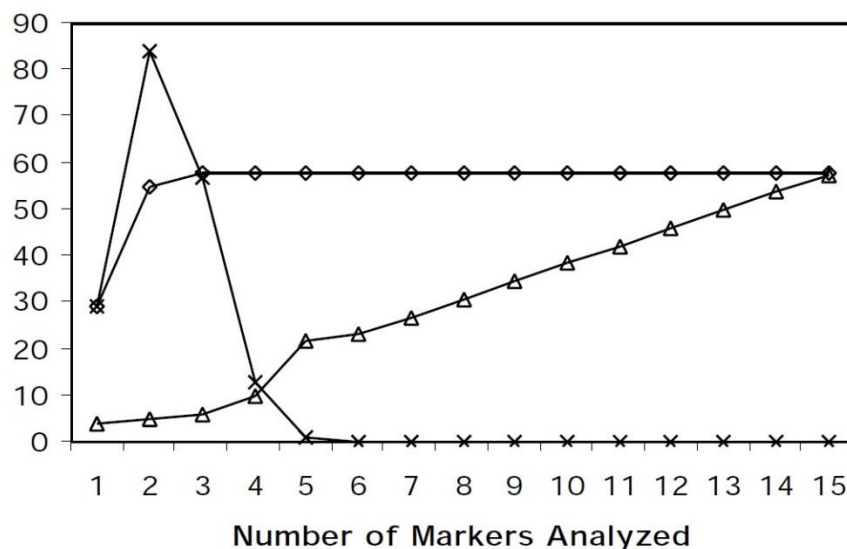
He- heterozygotyczność oczekiwana

Q- wskaźnik powtarzalności wyniku

MARKER	A	He	Q
REN105L03	7	0,82	0,99
AHT121	7	0,82	0,98
CPH9	6	0,81	0,94
REN145P07	5	0,80	0,97
REN94H15	5	0,78	0,98
CXX251	5	0,77	0,99
REN199O08	5	0,79	0,93
REN69B24	4	0,76	0,97
REN106I06	4	0,72	1,00
REN316E23	4	0,72	1,00
REN210D03	5	0,69	1,00
REN85N14	5	0,65	0,94
REN144A06	4	0,66	0,93
REN68B08	6	0,71	0,90
CXX30	3	0,57	0,93
REN233H01	3	0,65	0,98
REN112G06	4	0,57	0,99

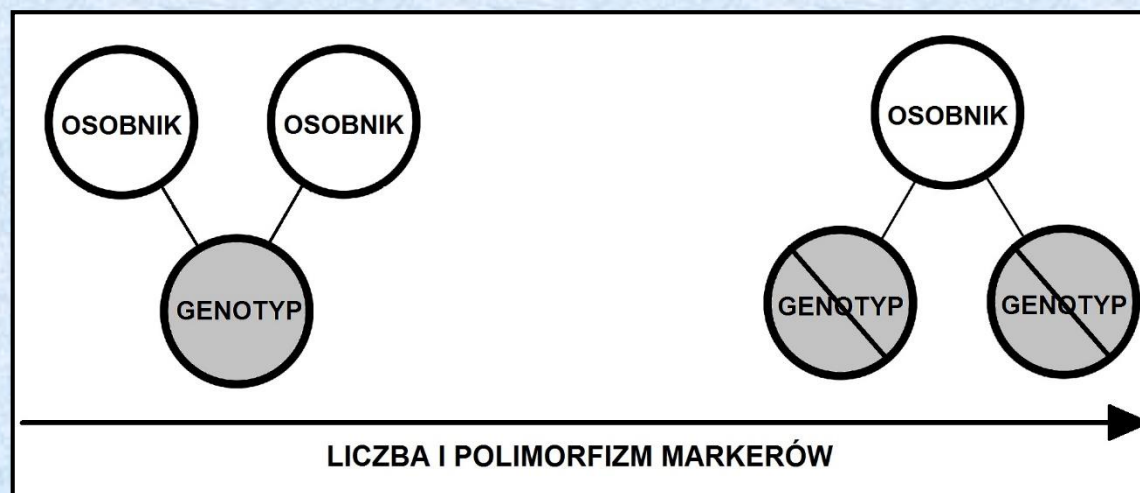


Optymalna liczba markerów dla oceny liczebności



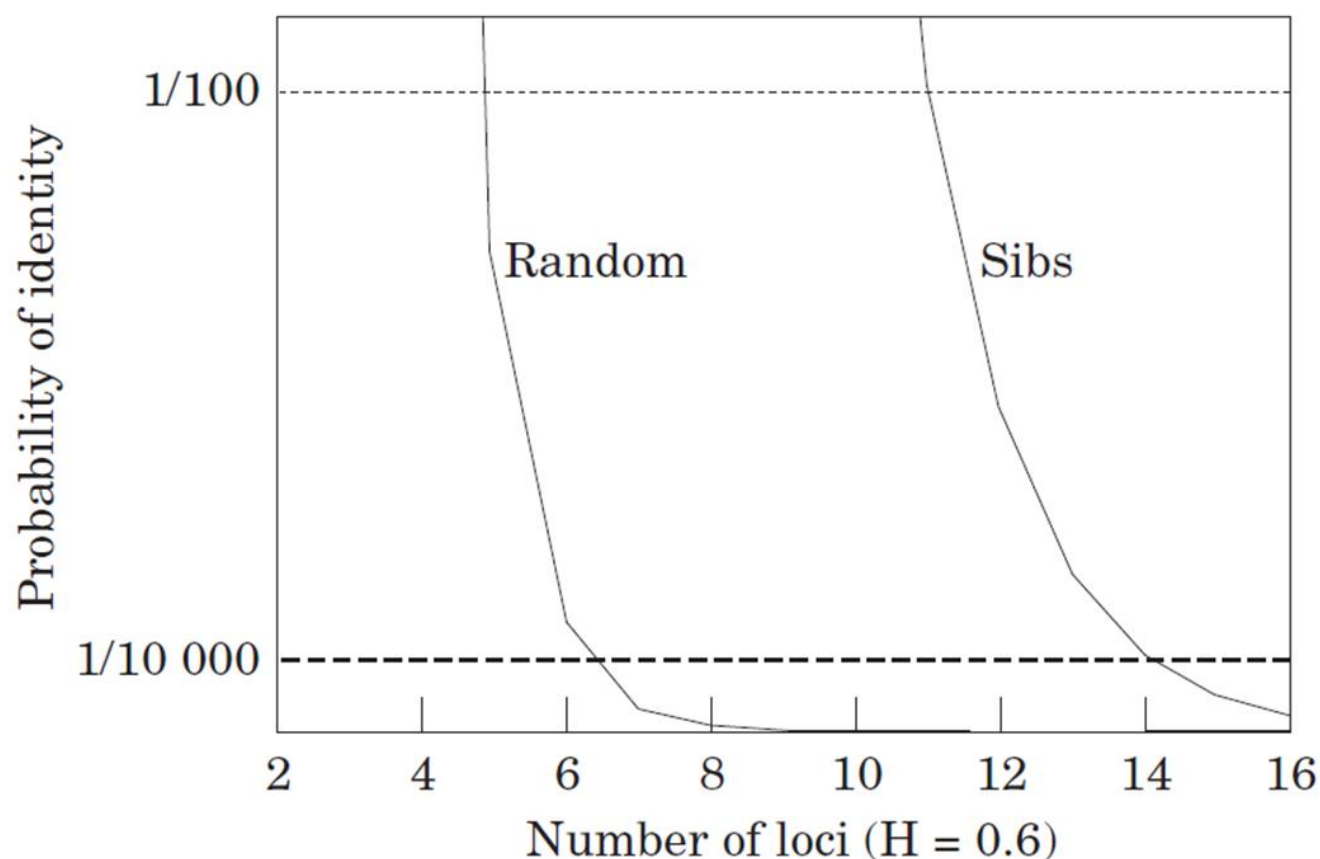
Effect of changing the number of markers in a Yukon grizzly bear study that was originally analyzed using six markers. The number of unique genotypes (◇) is lower than the presumed number of individuals (58) when using one or two markers, but stabilizes thereafter. The minimum number of re-analyses — under the conservative assumption that each error is detected and corrected with a single PCR — is the number of errors detected (Δ) plus the number of re-analyses required as a result of different individuals having genotypes that are similar enough to meet criteria for re-analysis (x; Paetkau 2003). The number of errors detected is taken from actual records for the first six markers, and then increased proportionally thereafter. This ignores the increase in error that would result from using less DNA per reaction as the number of markers increases.

Paetkau D. 2004. The optimal number of markers in genetic Capture-Mark-Recapture Studies. *Journal of Wildlife Management* 68(3): 449–452





Prawdopodobieństwo identyczności genotypów



Relationship between the number of loci ($H=0.6$) and the probability of finding two identical genotypes. All loci have five alleles with frequencies 0.59, 0.2, 0.1, 0.07, and 0.04. These allele frequencies were chosen to achieve $H=0.6$, which is typical of microsatellite loci in many species. **For capture-recapture studies, a sufficiently low PI may be only 0.01.**

$$PI_{sibs} = 0.25 + (0.5 \sum p_i^2) + [0.5(\sum p_i^2)^2] - (0.25 \sum p_i^4)$$

where p_i are the frequencies of the i th alleles.

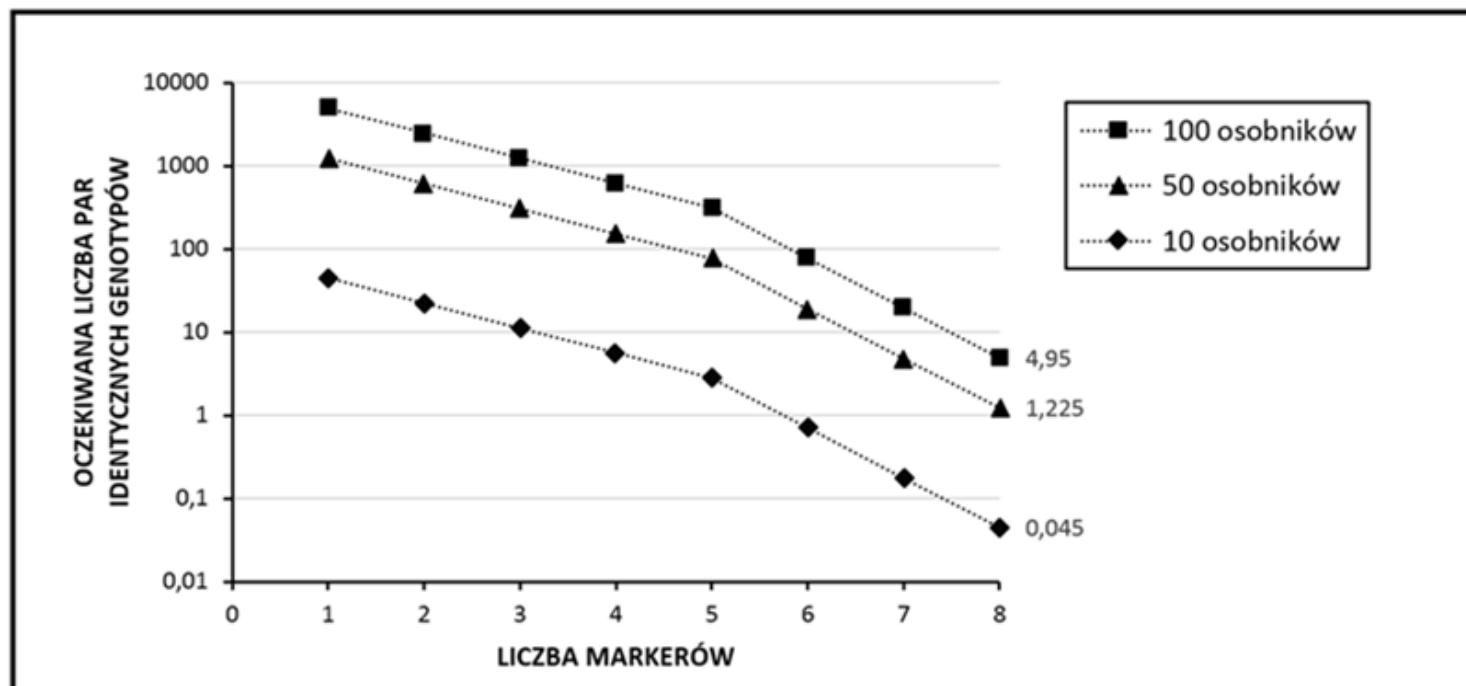
Taberlet P. & Luikart G. 1999. Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 41–55



Prawdopodobieństwo identyczności genotypów, cd.

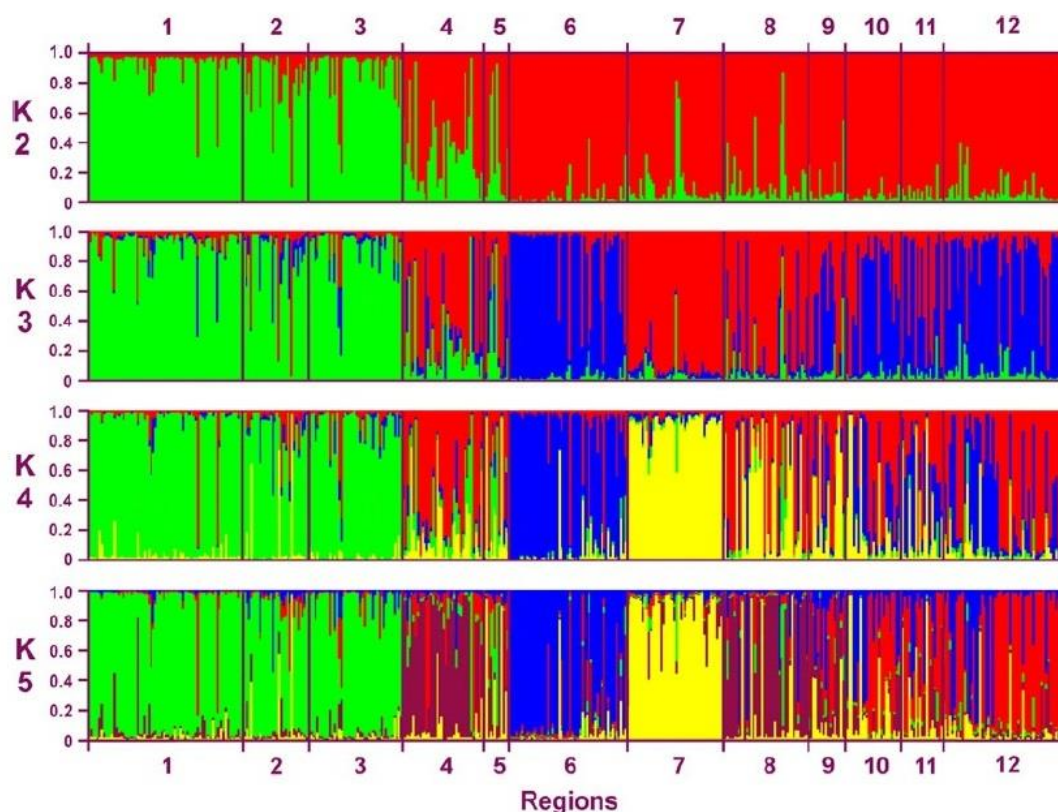
IDENTYCZNOŚĆ GENETYCZNA RODZEŃSTWA

(Przykład rzeczywisty, $PI=0,001$)





Struktura genetyczna wilków na obszarze Polski a liczba markerów



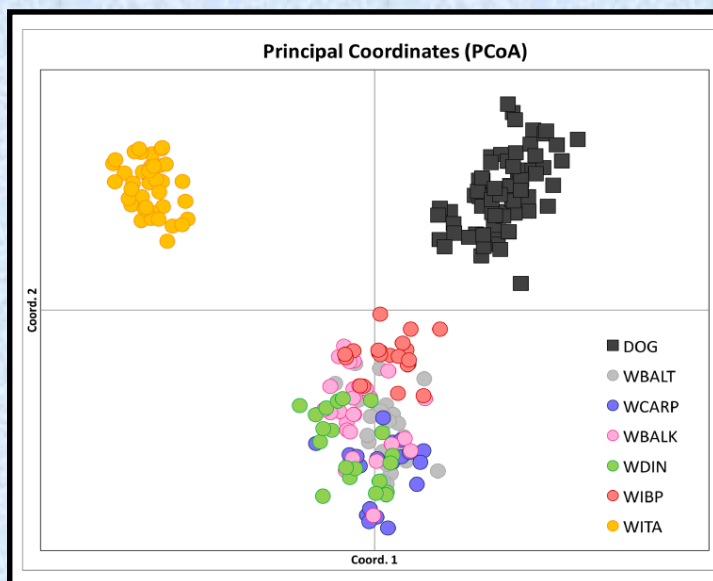
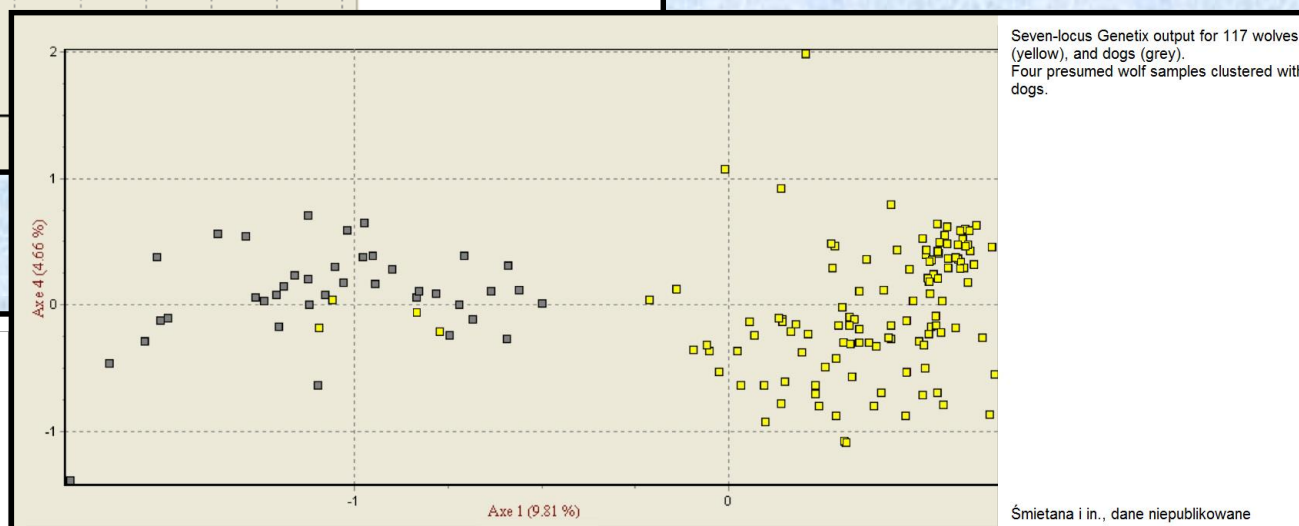
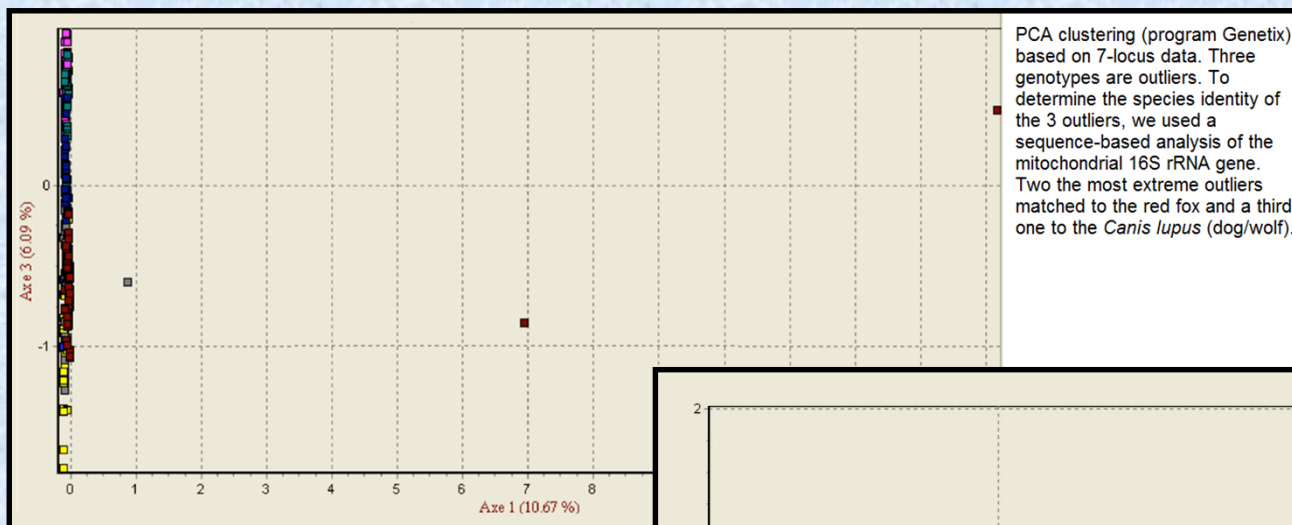
Results of STRUCTURE analysis for Polish wolves, based on 11 microsatellite loci, assuming K = 2 to 5 subpopulations of wolves. Black lines separate wolves from different sampling regions.

1. Bieszczady Mountains and Dynów Foothills
2. Low and Sądecki Beskid
3. Gorce and Tatra Mountains, Żywiec-Silesian Beskid
4. Roztocze
5. Parczew, Sobibór and Włodawa Forests
6. Knyszyn, Białowieża and Mielnik Forests
7. Biebrza River Valley
8. Augustów Forest
9. Rominicka and Borki Forests
10. Pisz Forest
11. Napiwoda-Ramuki Forest
12. Western Poland (and Eastern Germany)

Czarnomska S.D. et al. 2013. Concordant mitochondrial and microsatellite DNA structuring between Polish lowland and Carpathian Mountain wolves. *Conservation Genetics* 14: 573–588



**Czy konieczne jest badanie przynależności
gatunkowej wszystkich próbek?**



Montana L. et al. 2017. Combining phylogenetic and demographic inferences to assess the origin of the genetic diversity in an isolated wolf population. PLoS ONE 12(5): e0176560.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176560>



Fundusze Europejskie
Infrastruktura i Środowisko



Główny Inspektorat Ochrony Środowiska

Unia Europejska
Fundusz Spójności



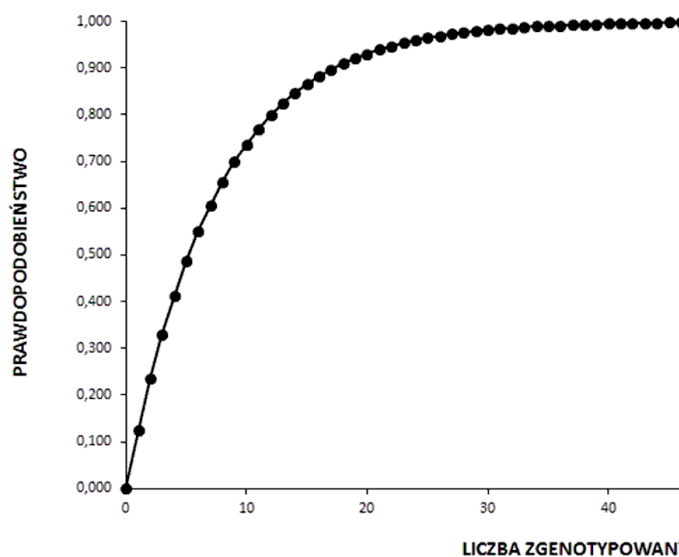
KRAMEKO

Ile należy zebrać próbek, aby
(1) wykryć wszystkie osobniki,
(2) ocenić liczebność populacji?



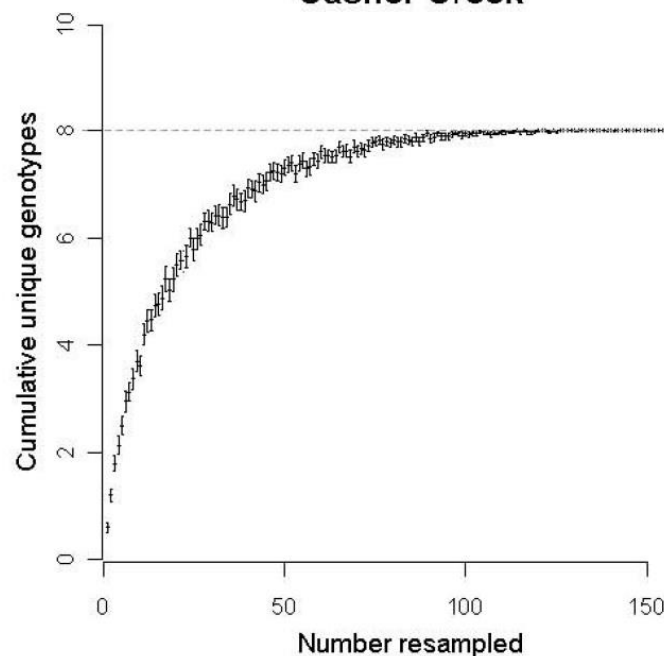
Czy możliwe jest wykrycie wszystkich osobników?

**PRAWDOPODOBIENSTWO WYKRYCIA WSZYSTKICH OSOBNIKÓW
Z GRUPY OŚMIOOSOBNIKOWEJ - OBLICZENIA TEORETYCZNE**



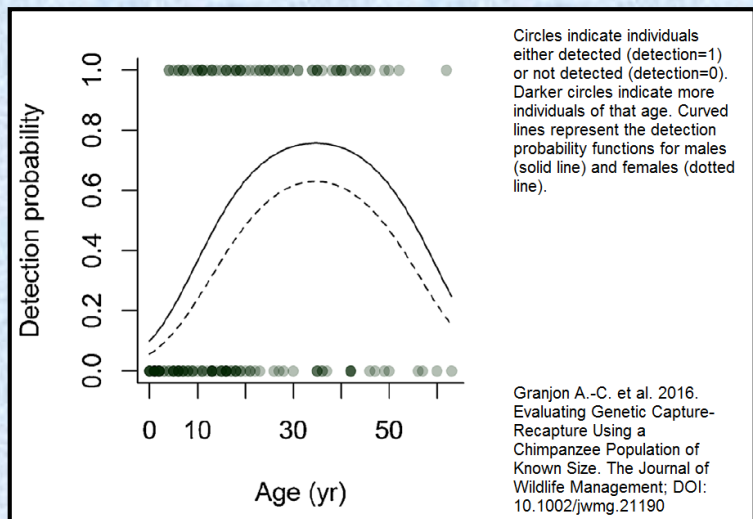
Śmietana, obliczenia własne

Casner Creek



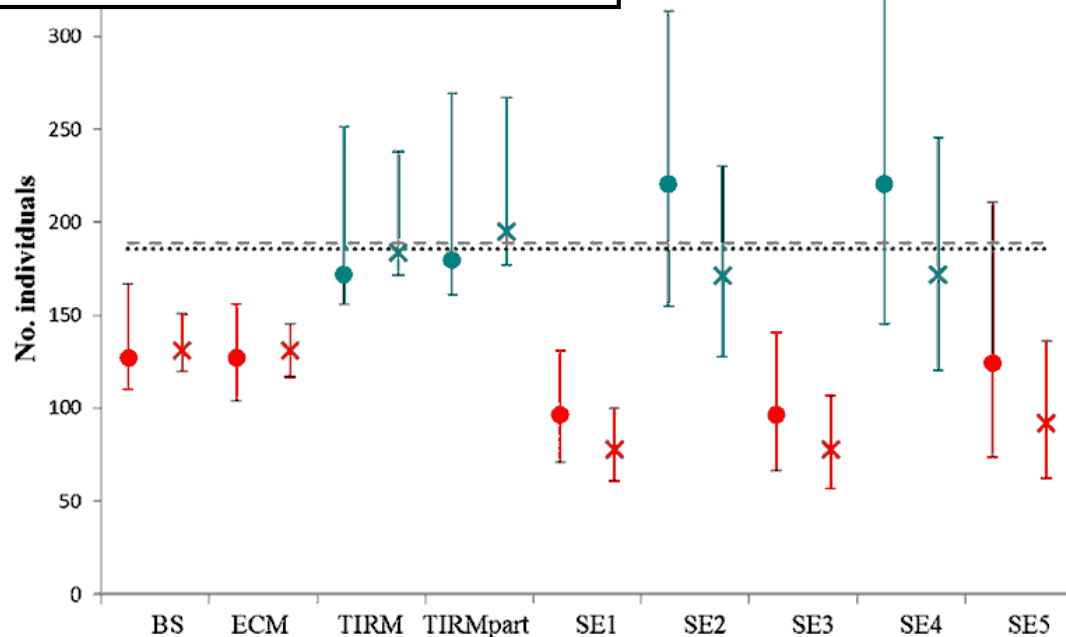
Accumulation of individual gray wolves as all scat and hair samples collected. The 95% confidence intervals show the variation of 100 iterations for each number of samples from 1 to the actual number of samples collected. The horizontal dashed line show the number of wolves detected with noninvasive genetic sampling from analyzing all scat and hair samples. Casner Creek pack, Idaho. Sample size - 260, consensus genotypes - 150.

Stenglein J.L. et al. 2011. Estimating gray wolf pack size and family relationships using noninvasive genetic sampling at rendezvous sites. *Journal of Mammalogy*, 92(4): 784-795, *modified*



Wybór właściwego modelu oceny liczebności.

Jednakowe czy zróżnicowane prawdopodobieństwo wykrycia poszczególnych osobników?

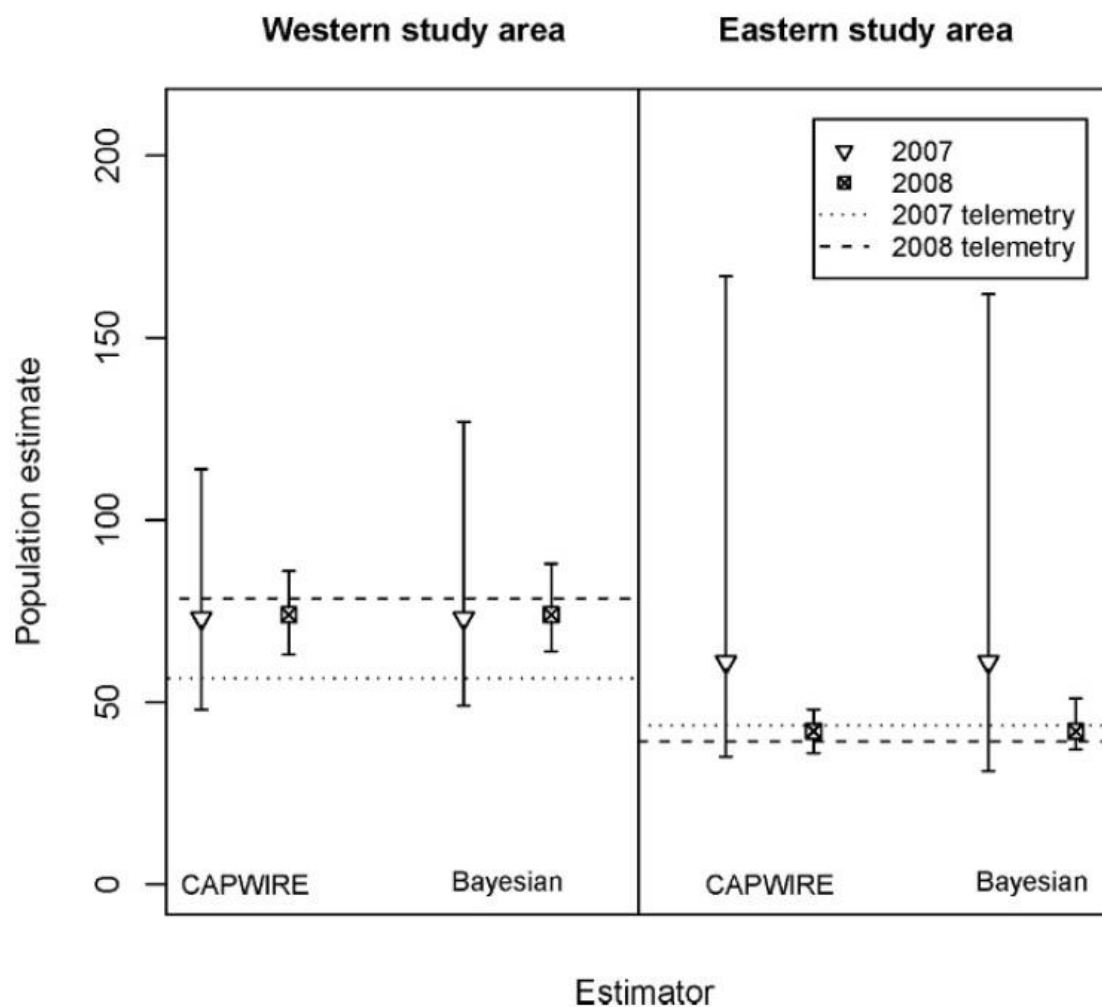


Chimpanzee population size estimates in Kibale National Park, Uganda, with the 3-month dataset (gray circles; 2012) and the 3-year dataset (black crosses; 2011–2013). The symbol (circle or cross) and the vertical lines indicate the point estimates and confidence intervals or credible intervals of each model. The dashed gray horizontal line indicates the true number of individuals in the population in the 3-month period ($N=189$). The dotted black horizontal line indicates the true number of individuals in the population in the 3-year period ($N=186$). BS=Bayesian model assuming equal detection probability. ECM=non-spatial maximum likelihood (ML) model assuming equal detection probability. TIRM=non-spatial ML model assuming 2 detection probabilities. TIRMpart=TIRM with high detection probability individuals excluded (partitioned dataset). Maximum likelihood spatially explicit models have the following assumptions: SE1=constant density and equal detection probability; SE2=constant density and 2 detection probabilities; SE3=sex-dependent density and equal detection probability; SE4=sex-dependent density and 2 detection probabilities for each sex; SE5=sex-dependent density and detection probability.

Granjon A.-C. et al. 2017. Evaluating genetic capture-recapture using a chimpanzee population of known size. The Journal of Wildlife Management 81: 279–288, DOI:10.1002/jwmg.21190, modified



Wielkość próby a dokładność oceny liczebności

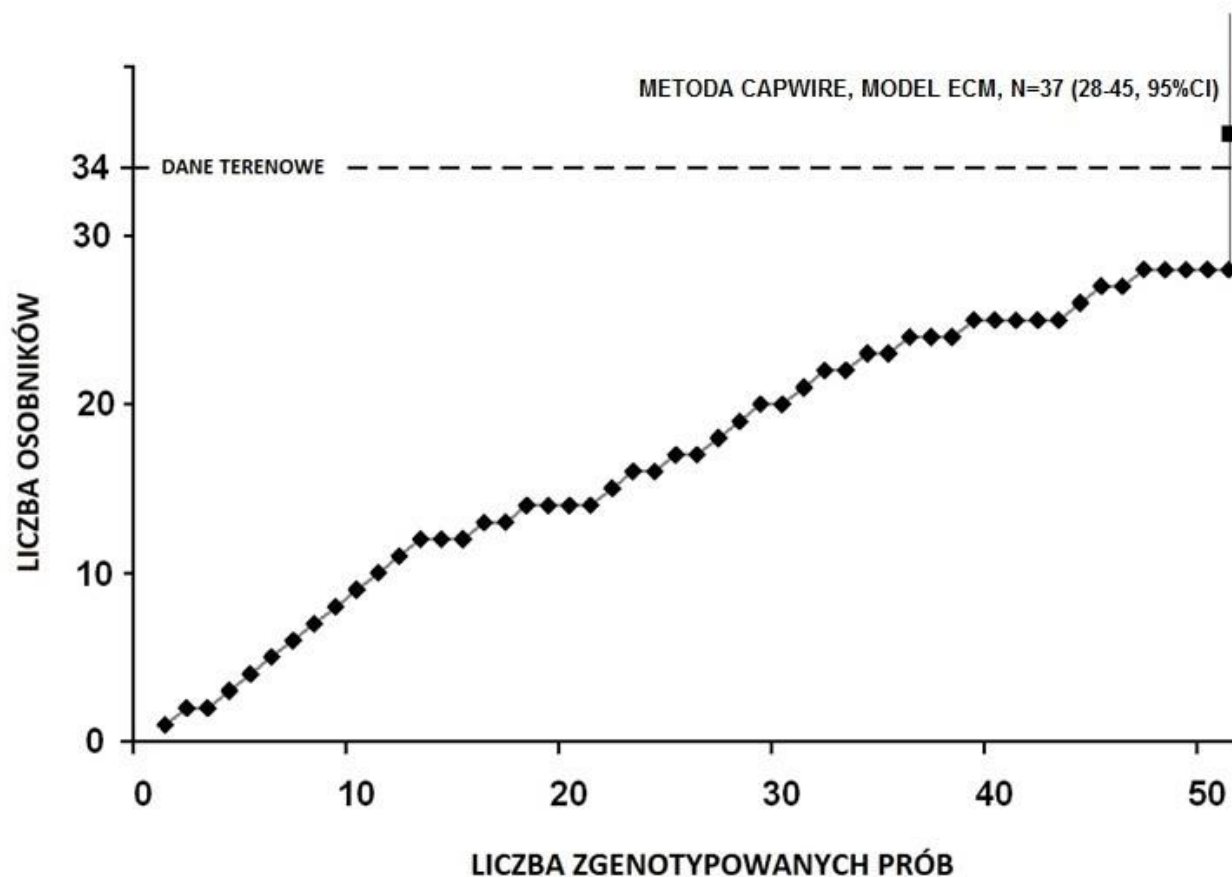


Population estimates of gray wolves in 2 areas (western and eastern study areas) of central Idaho, USA, in 2007 and 2008. Microsatellite analysis resulted in a consensus genotype for **126 samples in 2007** and **694 samples in 2008**. The CAPWIRE and Bayesian, single-session estimates and the 95% confidence intervals and 95% credibility intervals are shown. The horizontal, dotted and dashed lines depict the population estimate from radiotelemetry in each year. **Performance of the population estimators was reduced when average number of observations per individual was <1.7.**

Steinglein J.L. et al. 2010. Efficient, Noninvasive Genetic Sampling for Monitoring Reintroduced Wolves. *Journal of Wildlife Management* 74(5): 1050–1058



Ocena liczebności genetyczną metodą ponownego odłowu - wyniki badań pilotażowych

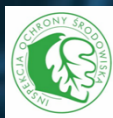


Zależność pomiędzy liczbą zgenotypowanych prób pobranych z odchodów wilków a liczbą zidentyfikowanych osobników. Liczebność wilków określona na podstawie danych terenowych (34 os.) oraz liczebność oceniona metodą *capwire* (37 os.). Bieszczady, 2008-2012.

Śmietana W. 2013. Koncepcja monitoringu liczebności i rozmieszczenia wilka *Canis lupus* w Polsce. Roczniki Bieszczadzkie 21: 212-233, uzupełnione



Fundusze Europejskie
Infrastruktura i Środowisko



Główny Inspektorat Ochrony Środowiska

Unia Europejska
Fundusz Spójności



KRAMKO

Dziękuję za uwagę!