

Analiza zmienności genetycznej polskich populacji żółwia błotnego w aspekcie ochrony gatunku

Prusak B.¹, Górecki G.², Deas A.¹, Pacholewska A.¹, Najbar B.³,
Mitrus S.⁴, Grzybowski G.¹, Hryniewicz A.⁵, Wróblewski R.⁶,
Gralak B.¹, Karpiniak E.¹, Grzybowski T.⁷

¹Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt, Polska Akademia Nauk, Jastrzębiec

²Uniwersytet Warszawski, Instytut Zoologii, Stacja Terenowa w Urwitalcie

³Uniwersytet Zielonogórski, Zakład Ekologii Stosowanej, Zielona Góra

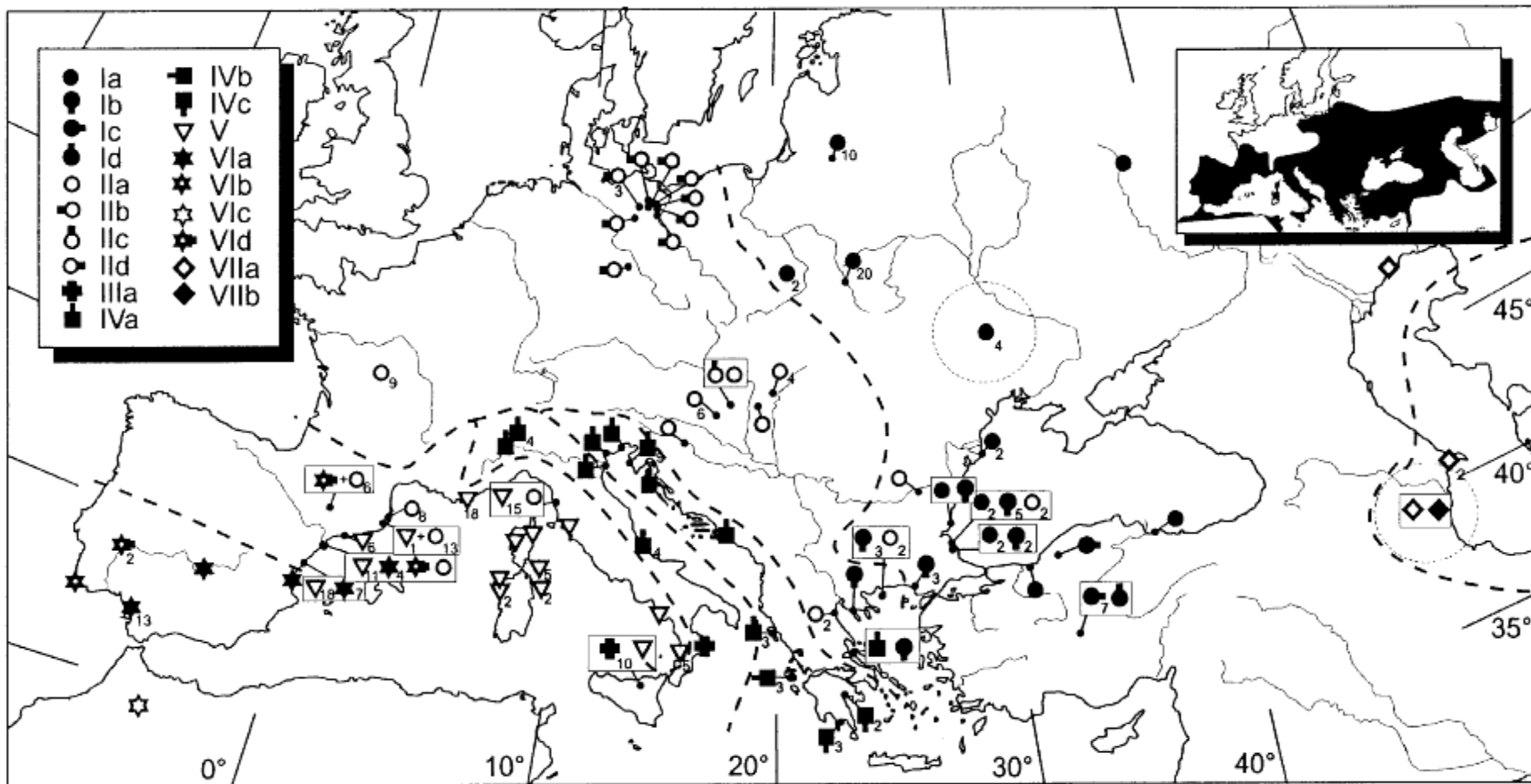
⁴Uniwersytet Opolski, Zakład Ewolucji i Ekologii Zwierząt, Opole

⁵Miejski Ogród Zoologiczny w Warszawie

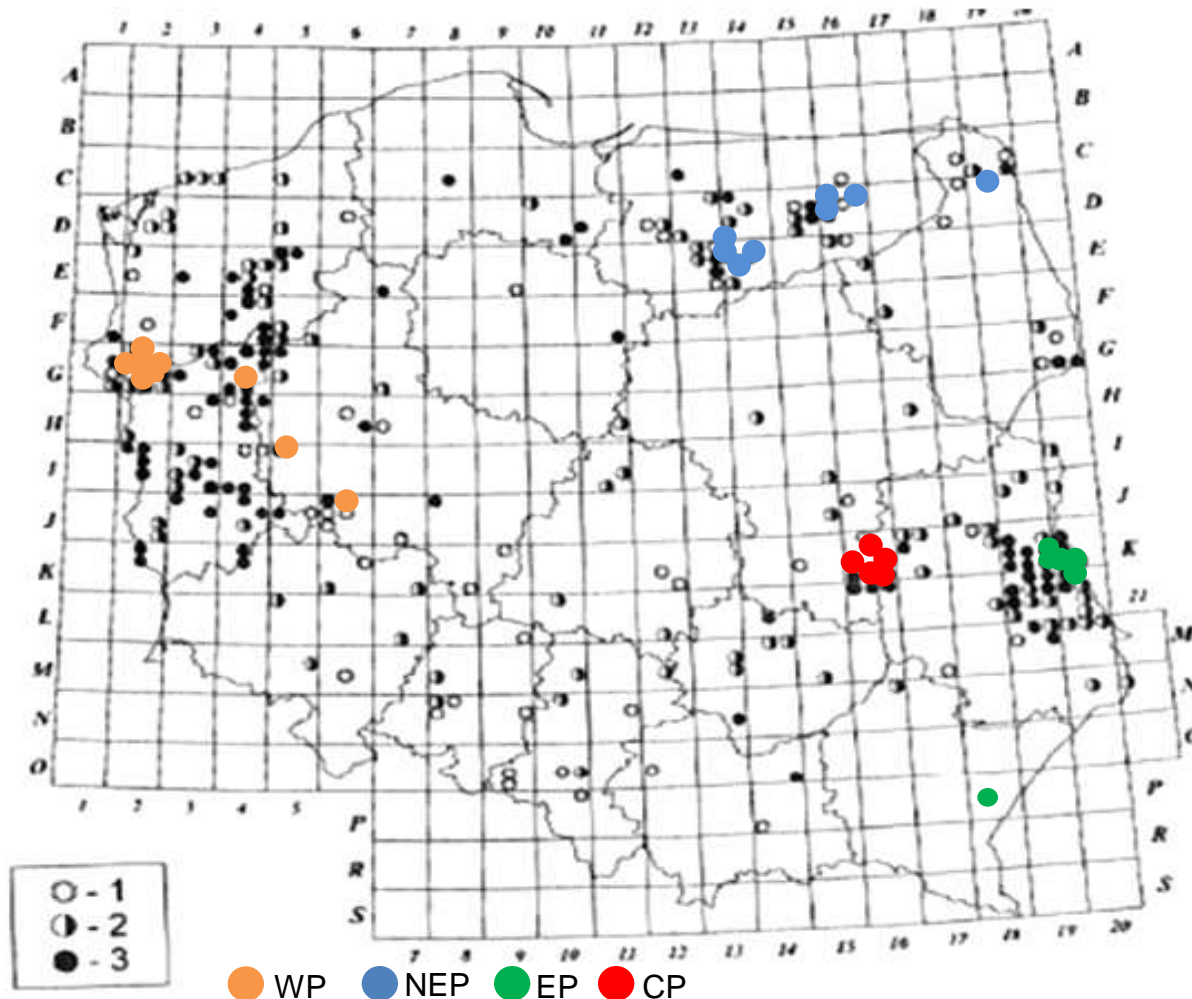
⁶Zespół Lubelskich Parków Krajobrazowych O/Chełm

⁷Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika w Toruniu, Katedra Medycyny Sądowej Collegium Medicum w Bydgoszczy

Rozmieszczenie geograficzne haplotypów *cytb* mtDNA u *E. orbicularis*

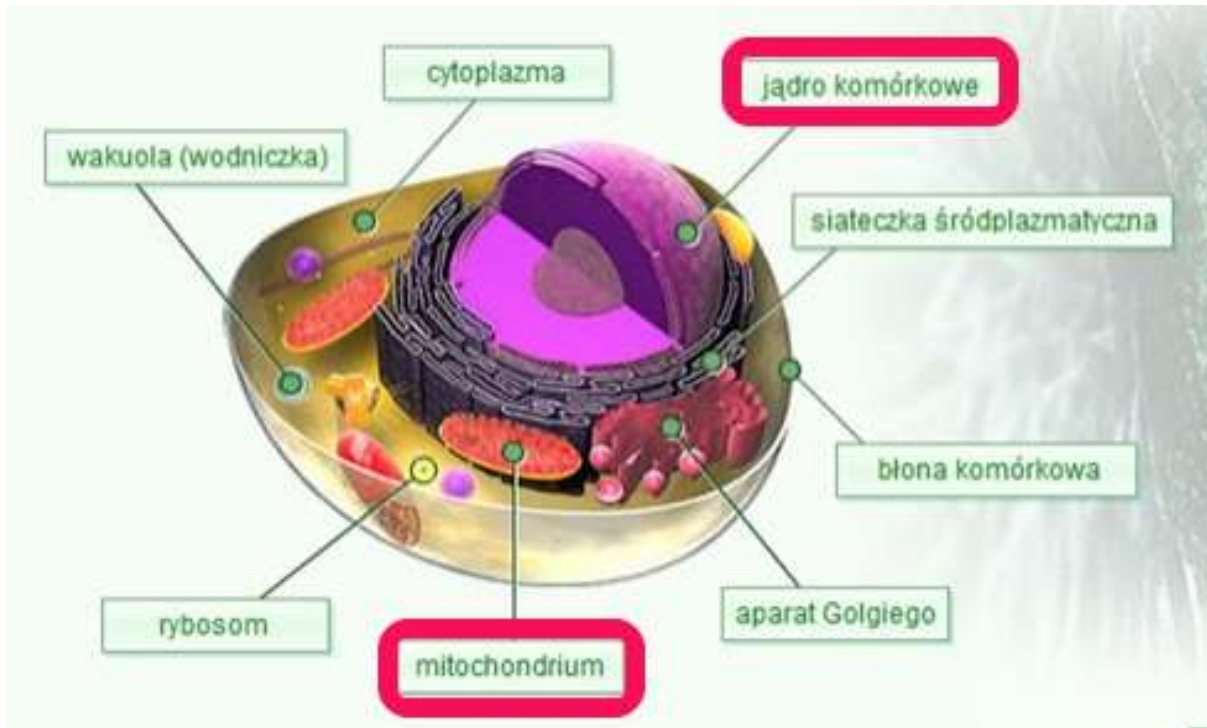


Rozmieszczenie żółwia błotnego w Polsce i miejsca pobrania prób do badań DNA)



Miejsca obserwacji żółwia błotnego w Polsce: 1 – w latach 1945 – 1970, 2 – w latach 1971-1990, 3 – w latach 1991 – 2000 (Rybacki i Maciantowicz, 2001).

Analizowane markery genetyczne



Genom jądrowy:

- Mikrosatelity DNA: msEo41, GmuD107, msEo21, GmuD16, msEo2, GmuD8, GmuD93, Emys2, Emys4, Emys5, Emys6, Emys11, msEo29)

Genom mitochondrialny:

- gen *12SrRNA*,
- gen *cytochromu b*,
- geny *ND4*, *tRNA-His*, *tRNA-Ser*, *tRNA-Leu*,
- region kontrolny

Sumaryczne wyniki analizy DNA mitochondrialnego

Analizowany rejon	haplotyp	Rejon występowania	n
cytb	Ia	Polesie, Mazury, Mazowsze, płn-zach Polska, Sierakońce	105
	Iy	północno-zachodnia Polska	1
	IIb	północno-zachodnia Polska	22
	IIIn	północno-zachodnia Polska	1
	IVI	północno-zachodnia Polska	2
12SrRNA (396 pz)	12SH1	Polesie	1
	12SH2	północno-zachodnia Polska	1
	12SH3	Polesie, Mazury, Mazowsze, płn-zach Polska, Sierakońce	138
Region kontrolny (659 pz)	CRH1	Mazowsze	3
	CRH2	północno - zachodnia Polska	2
	CRH3	Mazowsze	1
	CRH4	Polesie	1
	CRH5	Mazury	3
	CRH6	północno - zachodnia Polska	23
	CRH7	Polesie, Mazury, Mazowsze, płn-zach Polska, Sierakońce	104
ND4, tRNA-His, tRNA-Ser, tRNA-Leu (907 pz)	ND4H1	północno - zachodnia Polska	2
	ND4H2	Mazury	15
	ND4H3	Mazury	4
	ND4H4	Polesie, Mazury, Mazowsze, płn-zach Polska, Sierakońce	100

Zróżnicowanie DNA mitochondrialnego (haplotypy kombinowane – 3102 pz)

- Porównanie populacji parami na podstawie wartości współczynnika F_{ST} istotność przy $p \leq 0,05$

	Mazury	Mazowsze	Polesie	Płn-zach Polska
Mazury		+	+	+
Mazowsze	0.661		+	+
Polesie	0.648	0.780		+
Płn-zach Polska	0.525	0.666	0.656	

- Globalny test zróżnicowania mtDNA na podstawie częstości haplotypów (*non-differentiation Exact test* - Raymond i Rousset 1995)

Brak zróżnicowania

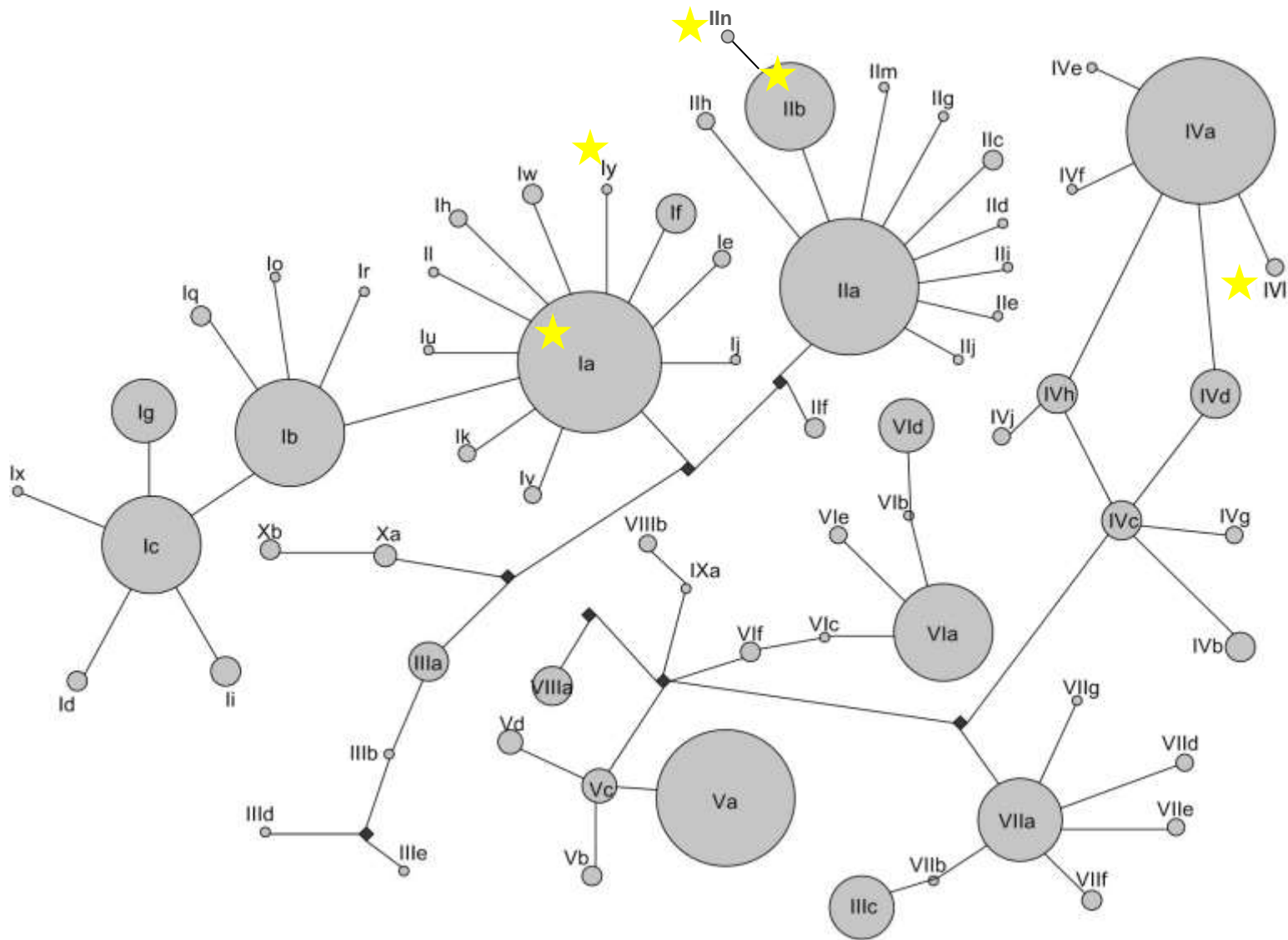
- Test zróżnicowania pomiędzy populacjami (*non-differentiation Exact test* - Raymond i Rousset 1995)

Brak zróżnicowania

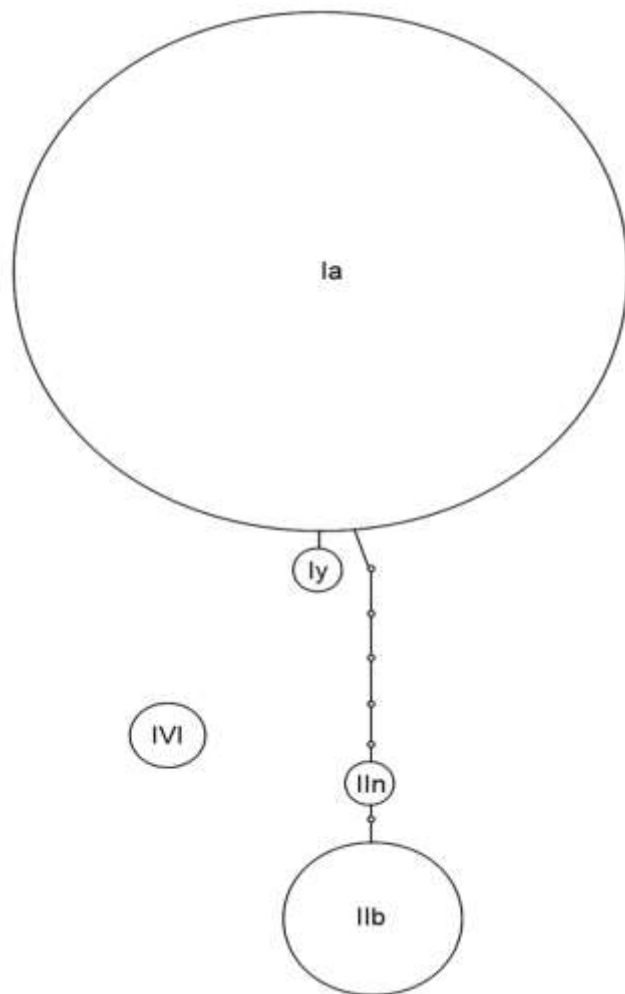
- Analiza wariancji (AMOVA)

Małe zróżnicowanie, wewnątrz grup większe niż pomiędzy grupami

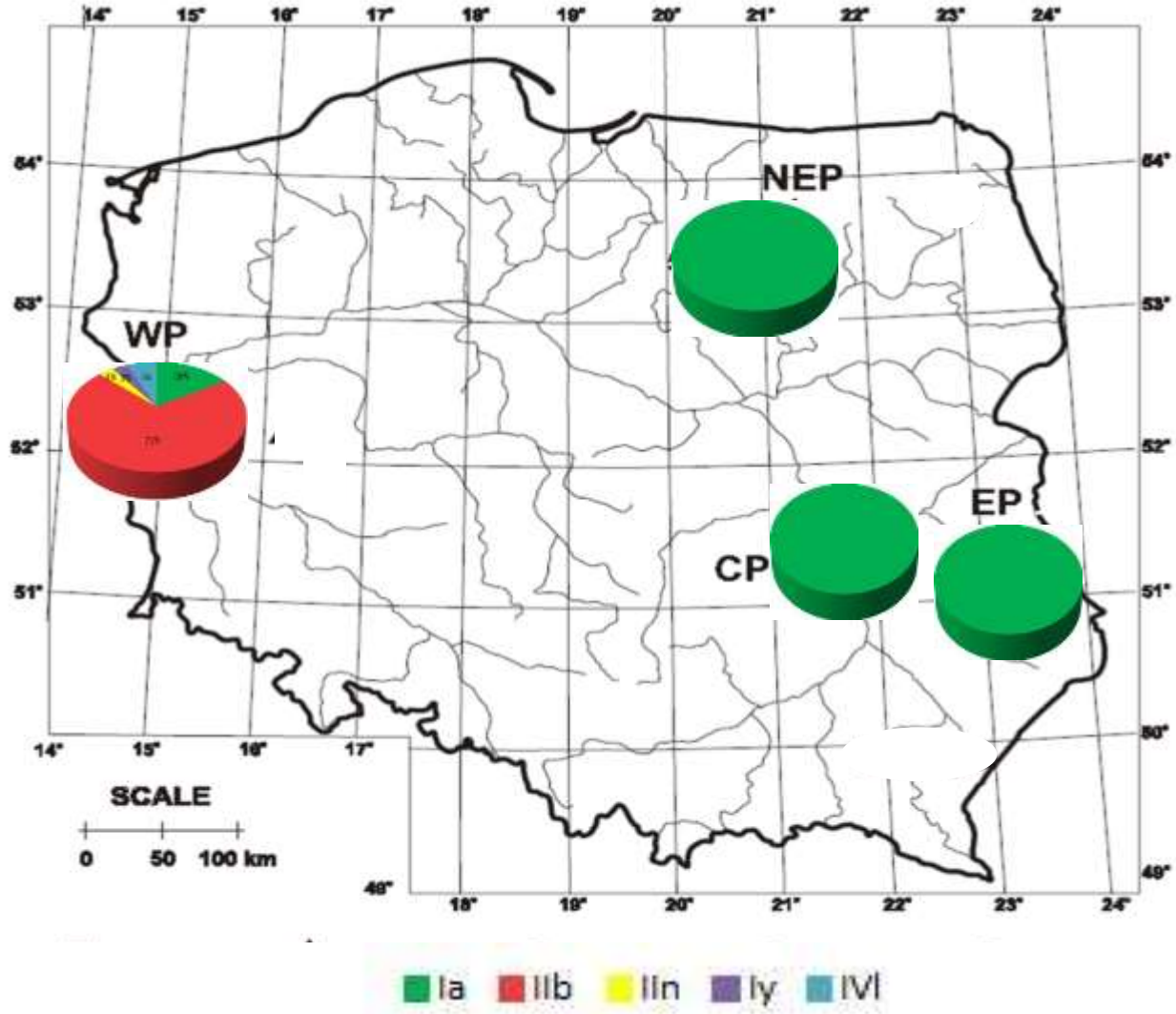
Filogenetyczna sieć haplotypów genu *cytb* mtDNA



Dendrogram ML haplotypów genu *cytb* mtDNA (populacje polskie)



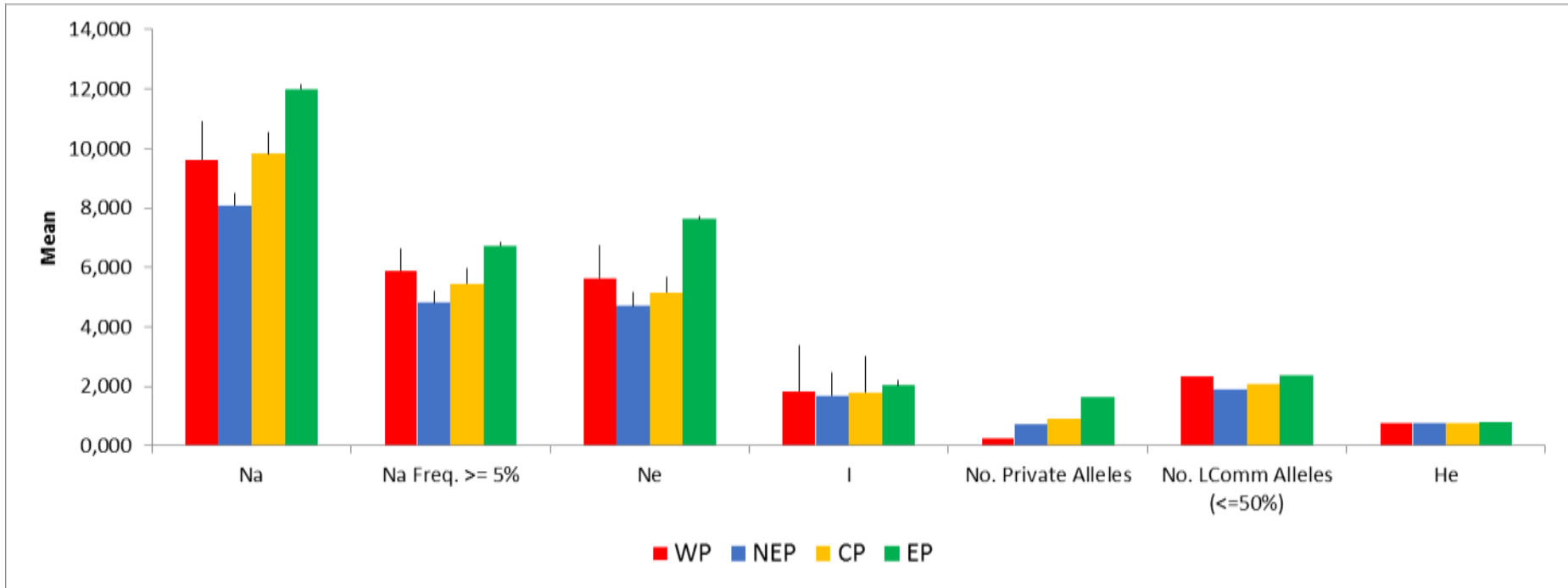
Rozmieszczenie haplotypów genu *cytb* mtDNA w polskich populacjach żółwia błotnego



Markery genomu jądrowego – podstawowe parametry różnicowania populacji

Populacja	N	N_a	N_e	H_o	H_e	I	AR	AR_p	F_{IS}
NEP	28	9.636	5.65	0.808	0.803	1.85	9.64	0.52	-0.007
CP	48	9.818	5.152	0.784	0.791	1.799	8.84	0.77	0.010
EP	55	12.000	7.628	0.806	0.825	2.041	10.71	1.29	0.023
WP	31	8.090	4.700	0.732	0.769	1.68	8.00	0.75	0.048*

Wzory alleliczne z podziałem na populacje



Czy wartości dla 4 populacji różnią się statystycznie?

Analiza wariancji parametrów zróżnicowania genetycznego (ANOVA):

- W teście globalnym (porównanie wszystkich ze wszystkimi) - brak różnic
- Porównania populacji parami: WP istotnie niższe wartości Ne, I, AR, ($P = 0.073, 0.43, 0.52$) w porównaniu z populacją CP

Dystans genetyczny pomiędzy badanymi populacjami żółwia błotnego

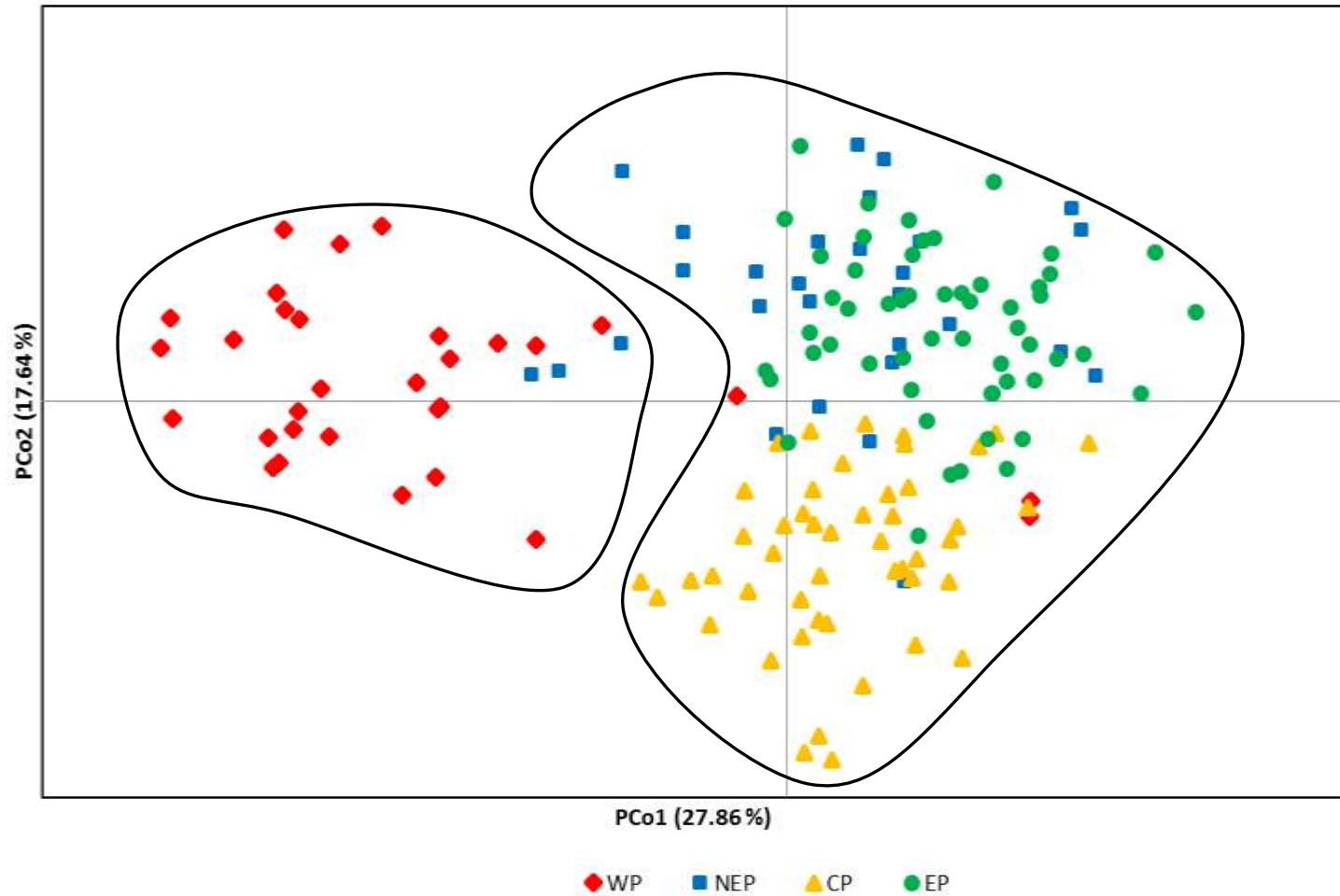
	NEP	WP	CP	EP	
NEP	-	0,472	0,312	0,163	dystans wg Nei
WP	0,0852	-	0,521	0,703	
CP	0,0548	0,0963	-	0,281	
EP	0,0229	0,1089	0,04867	-	

P<0.0001

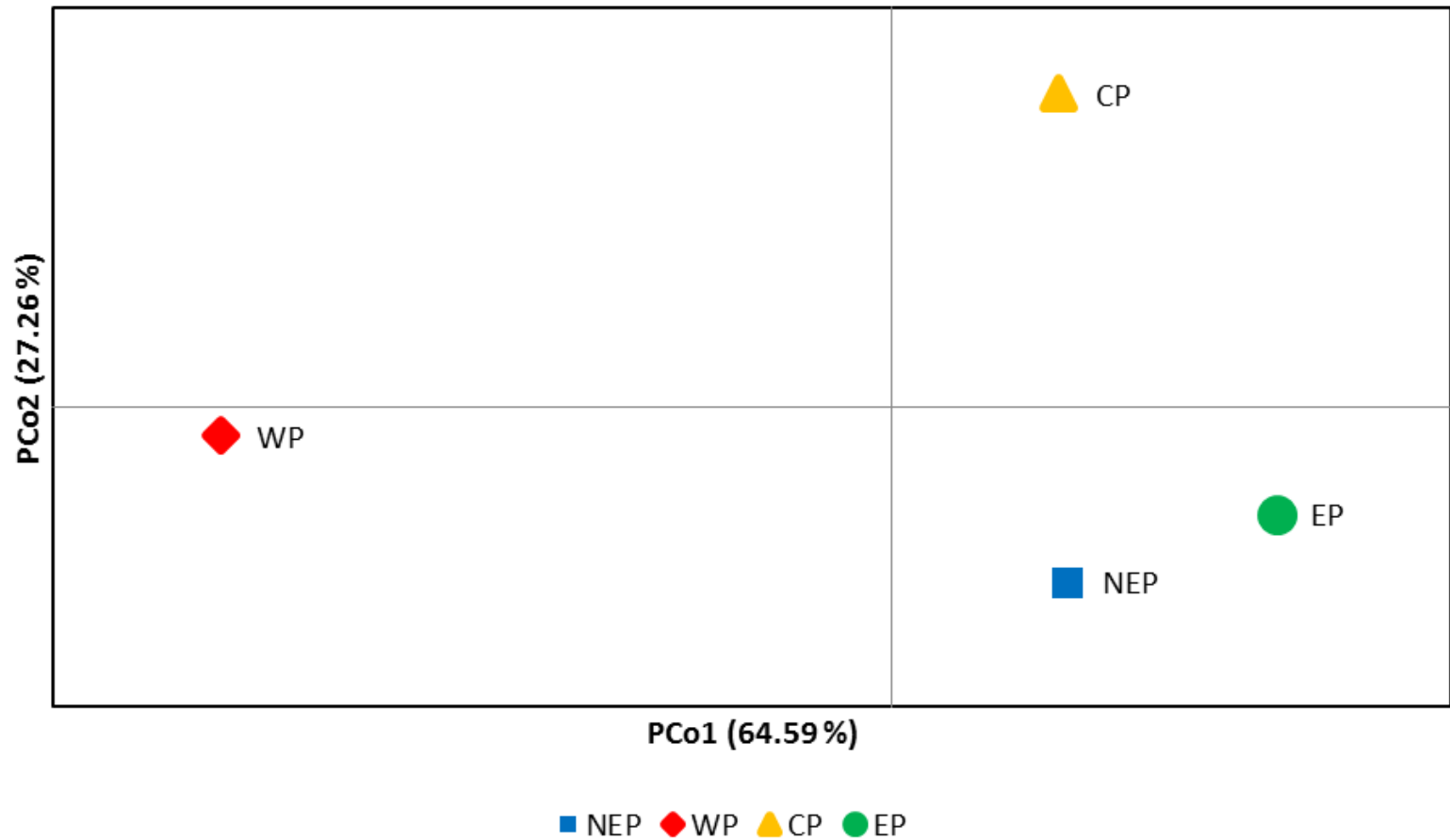
Analiza wariancji - AMOVA

Wariancja	d.f.	Suma kwadratów	Komponenty wariancji	Procent wariancji	<i>P</i> -value
wariancja pomiędzy populacją zachodnią i populacjami wschodnimi	1	49.143	0.27808	5.71	0.240+-0.01
wariancja pomiędzy populacjami wewnątrz grupy wschodniej	2	42.942	0.19947	4.09	0.000
wariancja pomiędzy osobnikami wewnątrz populacji	162	723.324	0.06833	1.40	0.121+-0.01
wariancja pomiędzy osobnikami	166	718.500	4.32831	88.80	0.000

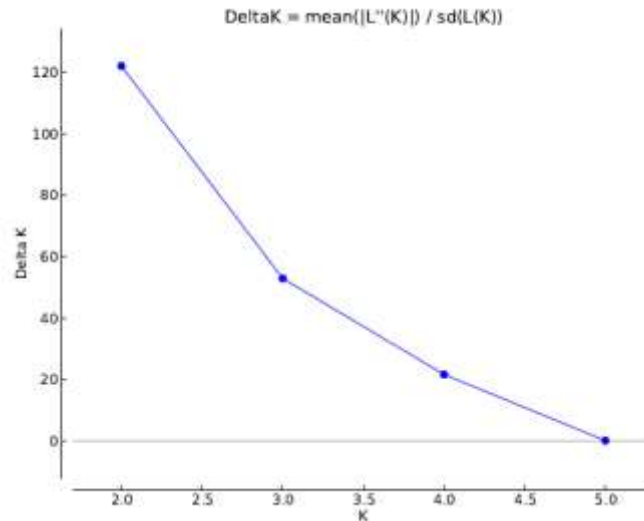
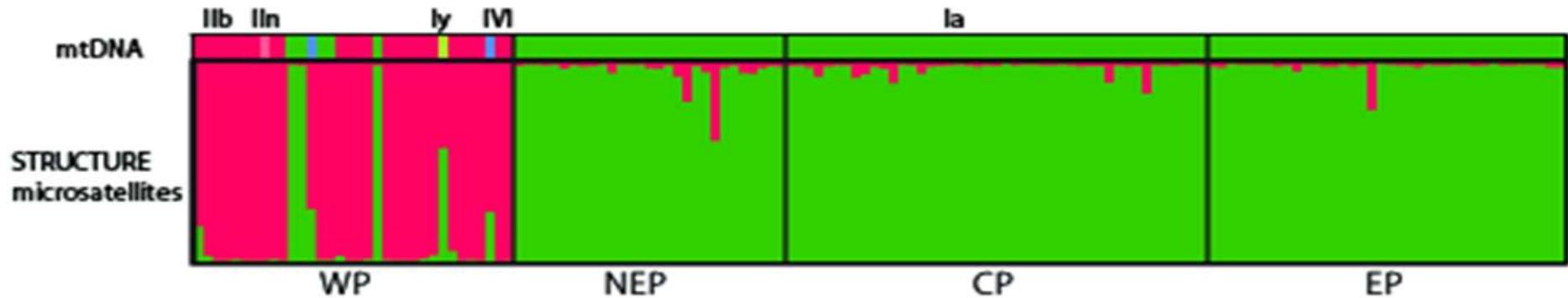
Analiza głównych składowych (PCoA)



Analiza głównych składowych (PCoA)

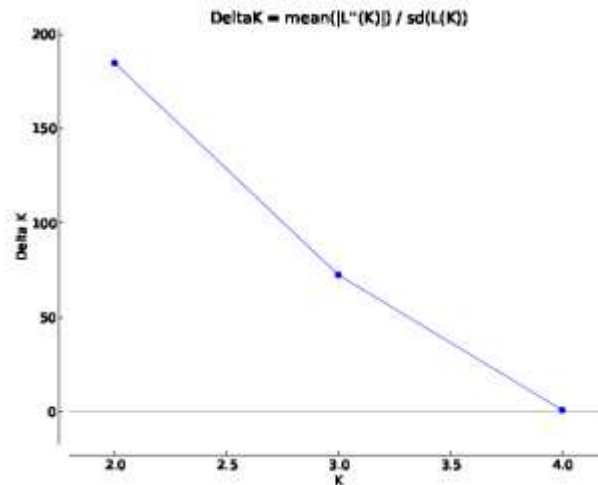
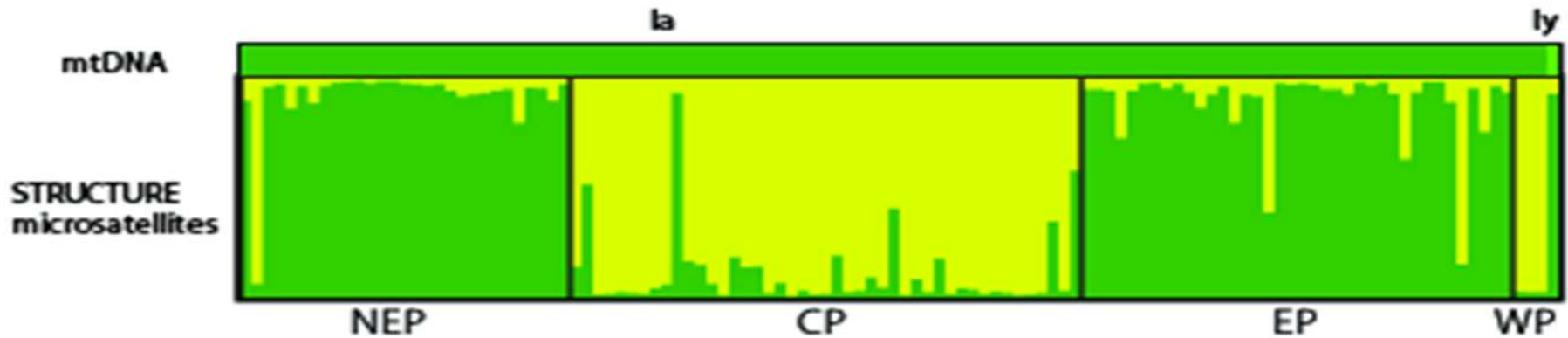


Analiza bajesowska liczby niezależnych klastrow genetycznych



Zmiany delta K w zależności od liczby klastrow genetycznych. ($\Delta K = \frac{m(|L''(K)|)}{s[L(K)]}$).

Analiza bajesowska liczby niezależnych klastrow genetycznych



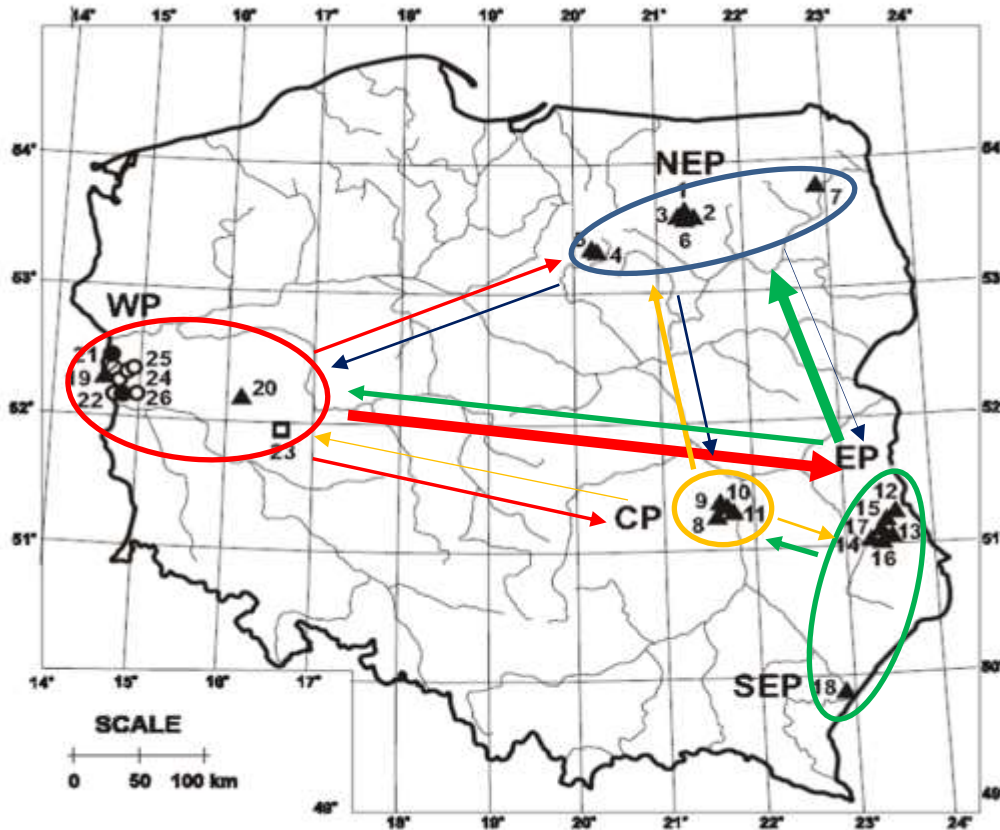
Zmiany delta K w zależności od liczby klastrow genetycznych. ($\Delta K = \frac{\text{mean}(|L''(K)|)}{\text{sd}(L(K))}$).

Analiza zjawisk demograficznych

Efekt wąskiego gardła

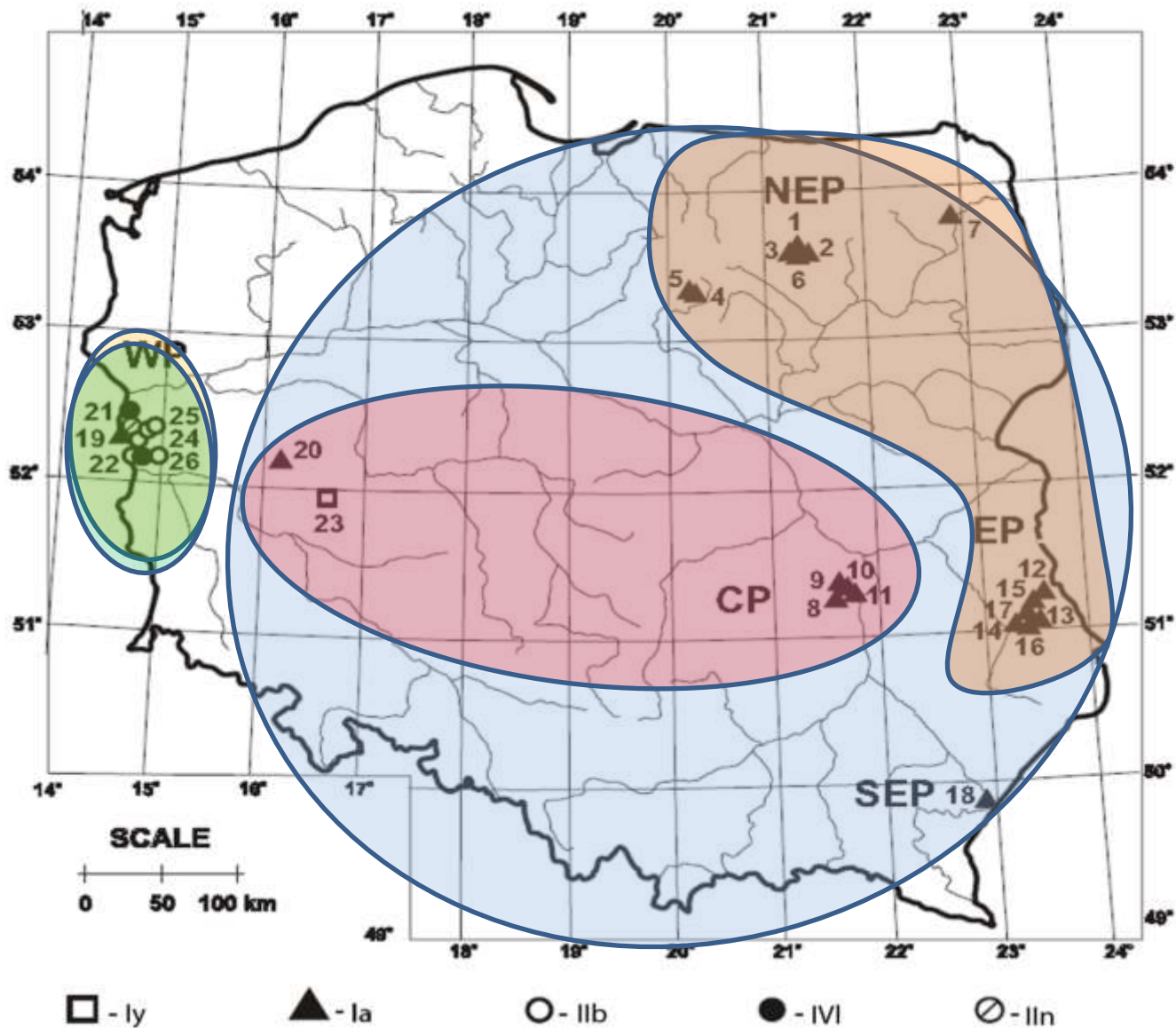
Populacja	Sign Test	Standardized Differences Test	Wilcoxon Test	Test Mode- shift
NEP	NS	NS	NS	L-shaped
WP	NS	0.0218 SMM	NS	L-shaped
CP	0.007 SMM	0.001 SMM	NS	L-shaped
EP	NS	NS	NS	L-shaped

Analiza zjawisk demograficznych: izolacja geograficzna i przepływ genów



	R ²	Probability
All populations	0.0243	0.01
NEP vs. WP	0.12	0.01
CP vs. WP	0.1707	0.01
EP vs. WP	0.239	0.01
Eastern populations:	0.0151	0.01
EP vs. NEP	0.0127	0.01
EP vs. CP	0.0695	0.01
NEP vs. CP	0.0788	0.01

Podsumowanie



Praktyczne wykorzystanie badań DNA

