

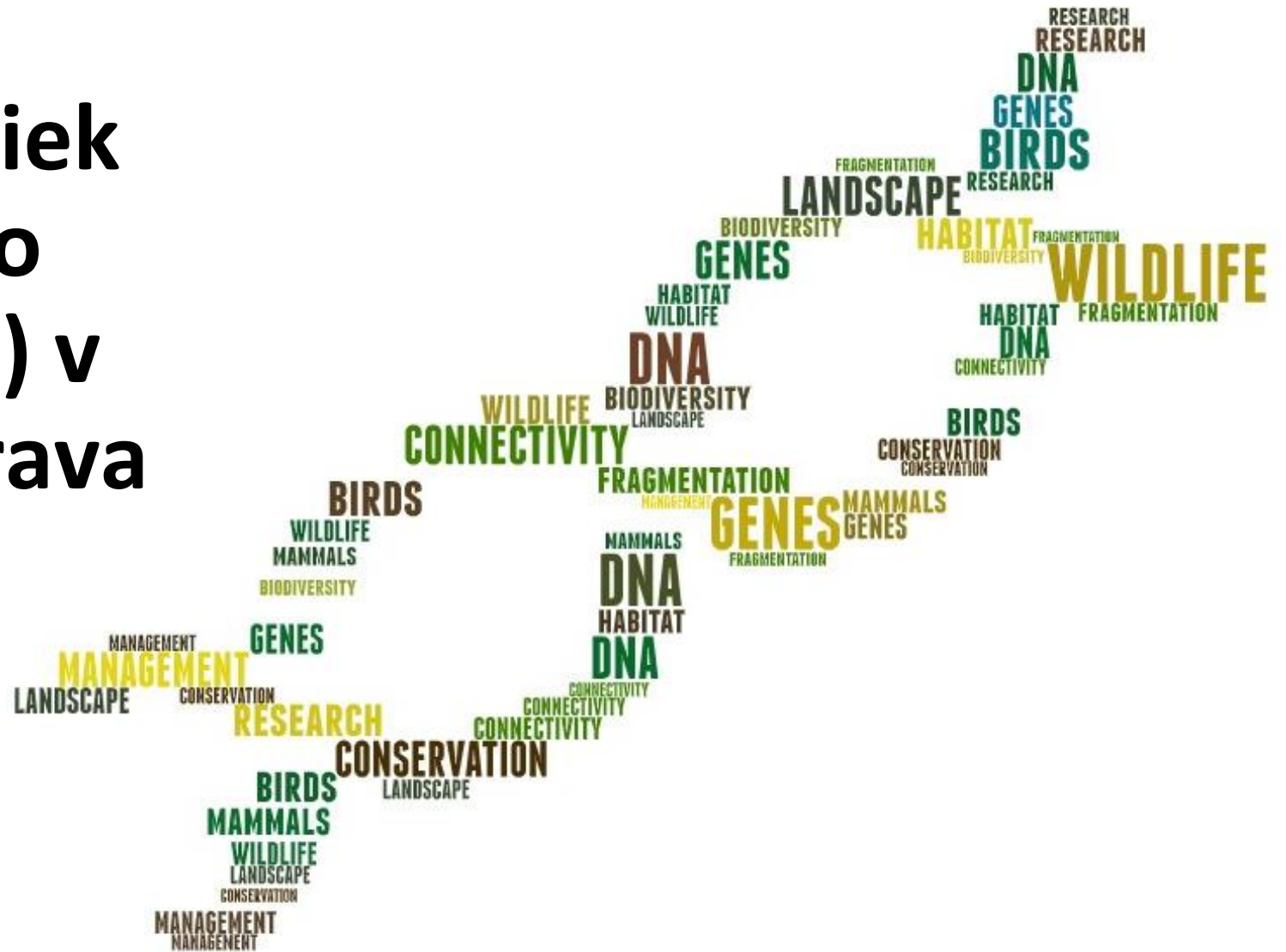
DNA analýza biologických vzoriek hlucháňa hôrneho (*Tetrao urogallus*) v regióne Horná Orava

Peter Klinga

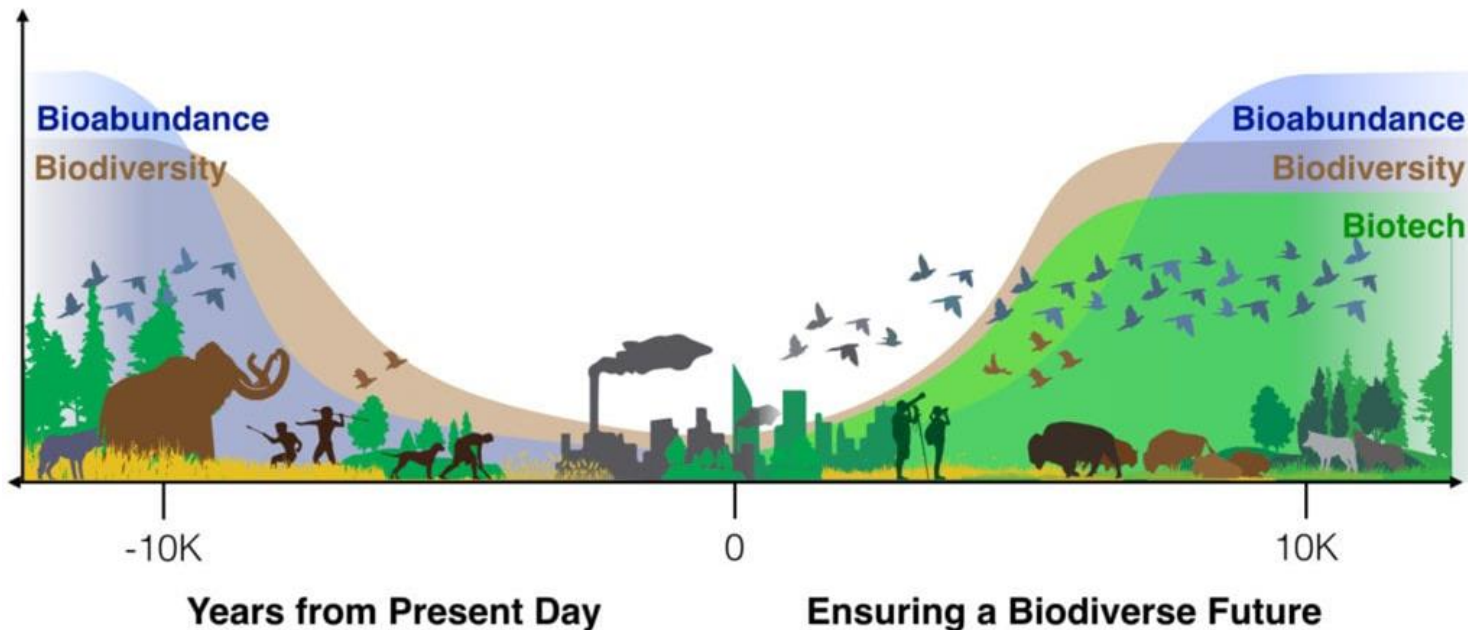
Lesnícka fakulta, TUZVO,

peter.klinga@gmail.com

05.02.2024

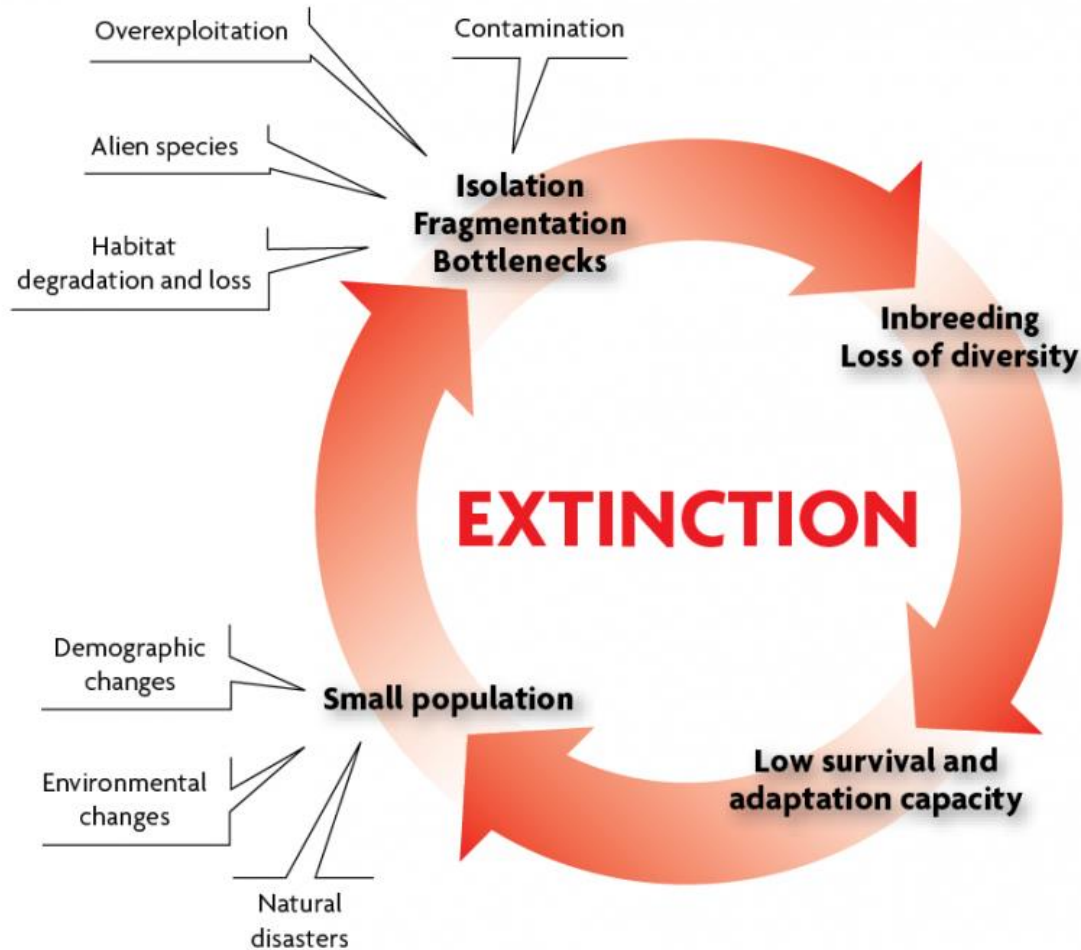


Význam ochranárskej genetiky

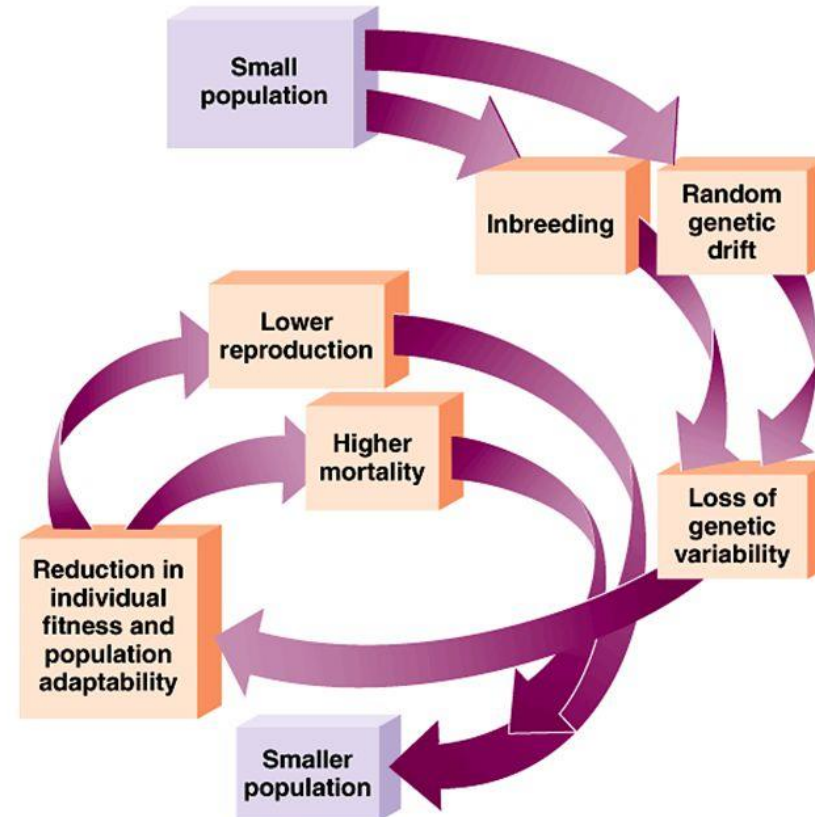


- Ľudia svojou činnosťou ovplyvňujú životné prostredie, a tým aj populácie organizmov v okolí, ich genetickú diverzitu a tok génov medzi populáciami druhu.
- Nadmerný lov, poškodzovanie a strata habitatov môžu ohroziť živočíchy, rastliny a ostatné organizmy.
- Genetika sa zaoberá dedičnými charakteristikami a génmi, ktoré ich ovplyvňujú.

Ochránárska genetika



The Extinction Vortex:



Genetická diverzita (premenlivosť, variabilita) základ pre adaptácie a evolúciu

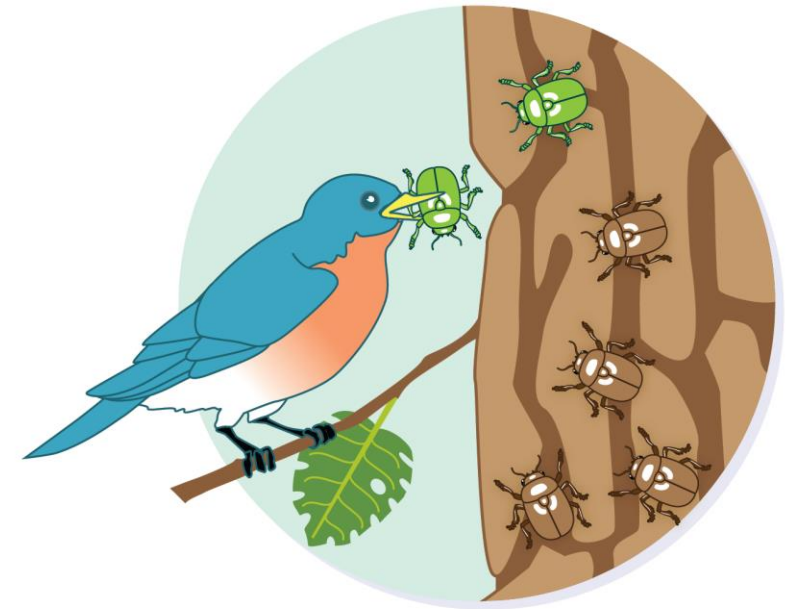


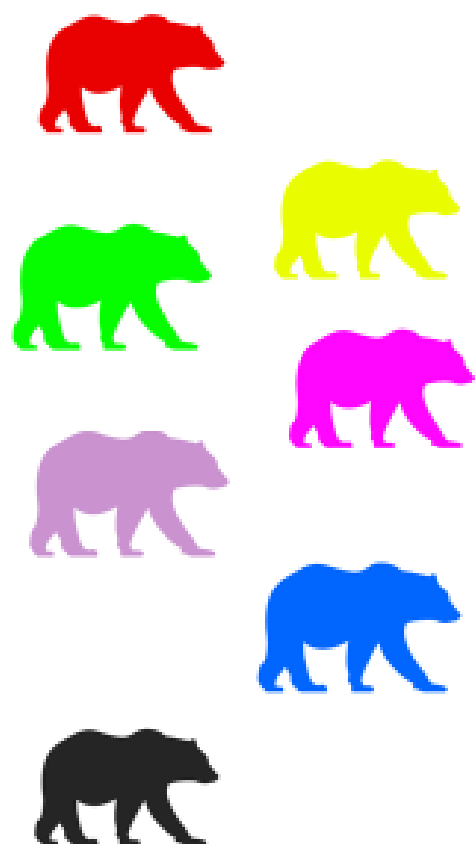
Prevládajúci biely variant motýľa sa v dôsledku znečistenia ovzdušia a smrti lišajníkov prispôobil tmavému pozadiu v dôsledku **predácie = prirodzeného výberu**.

Farebná vlastnosť sa prenáša z rodičov na potomstvo prostredníctvom **genetickej dedičnosti**, ktorá je založená na **genetickej premenlivosti**.

Evolučné mechanizmy efekt zahrdenia, efekt zakladateľa

- Genetická diverzita druhov sa neustále mení,
- Nie je dôležité koľko jedincov sa práve v populácii vyskytuje, lebo iba jedince, ktoré odovzdajú svoje alely ďalšej generácii sa podieľajú na zachovaní genetickej diverzity v budúcnosti.
- Efektívna veľkosť populácie základný parameter sledovaných pri štúdiu genetickej diverzity
- Ak raz niektorá alela zanikne, už sa nikdy neobnoví.

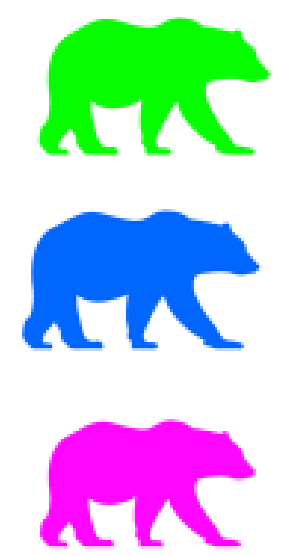




**Efekt
zahrdenia**
(prírodná
katastrofa,
patogén)



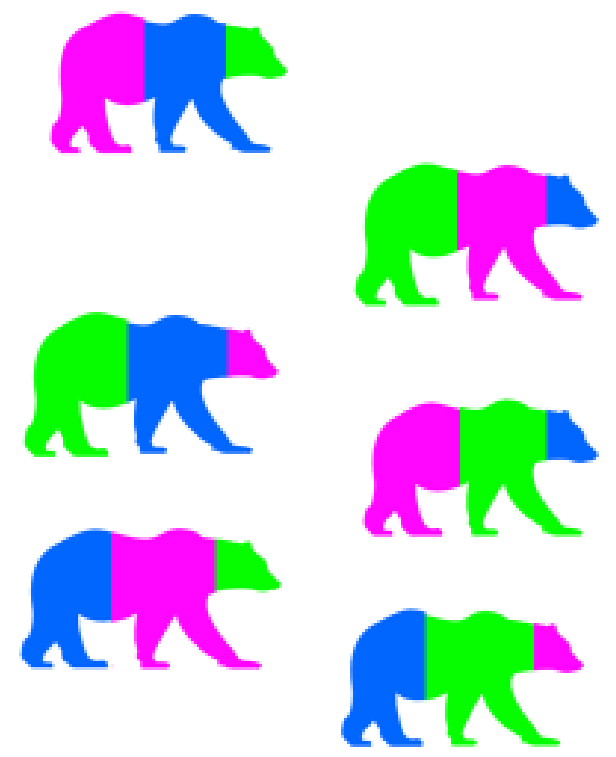
**Efekt
zakladateľa**
(osídľovanie
nových oblastí)



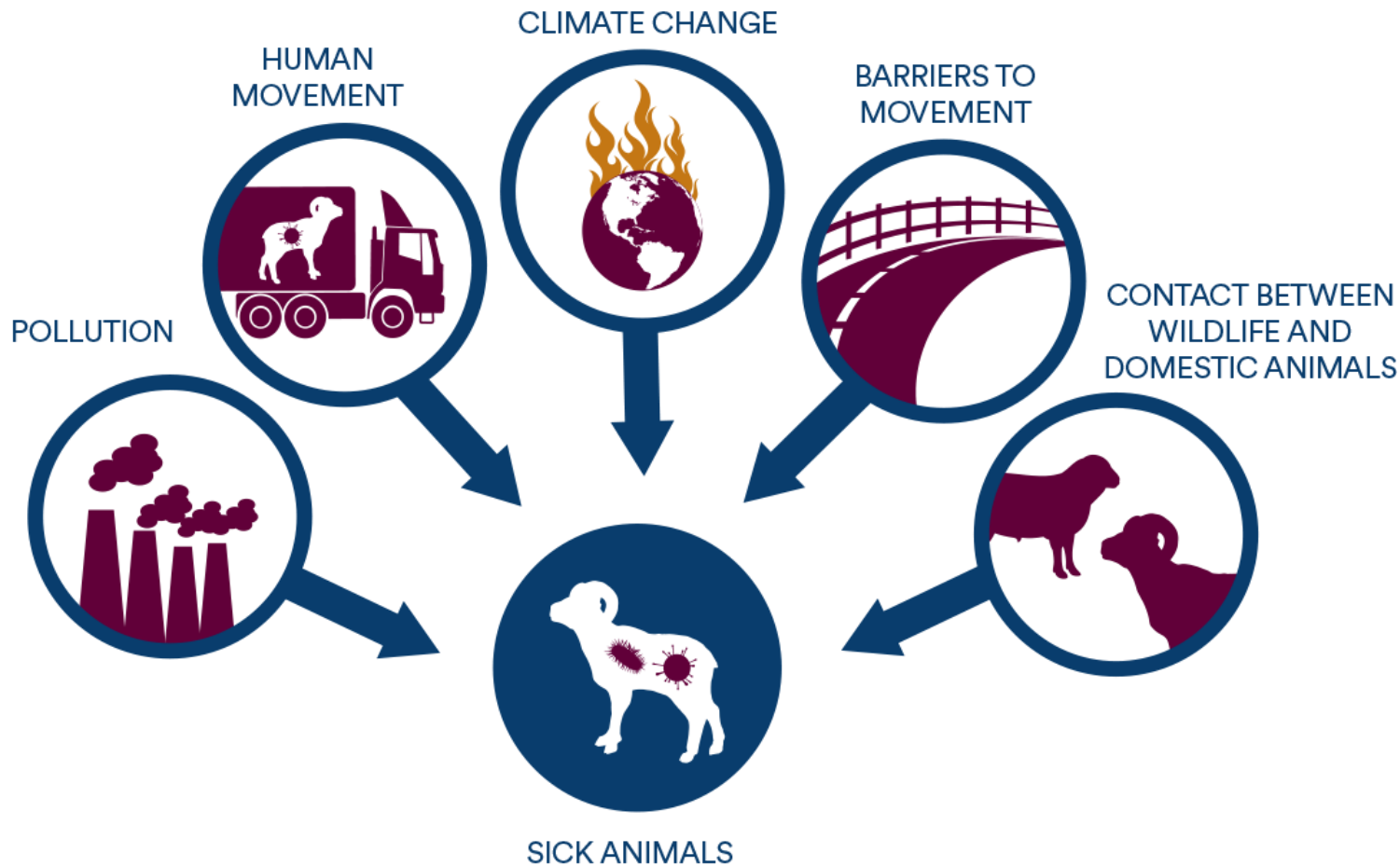
Nová
populácia



Nová
populácia



Genetický monitoring



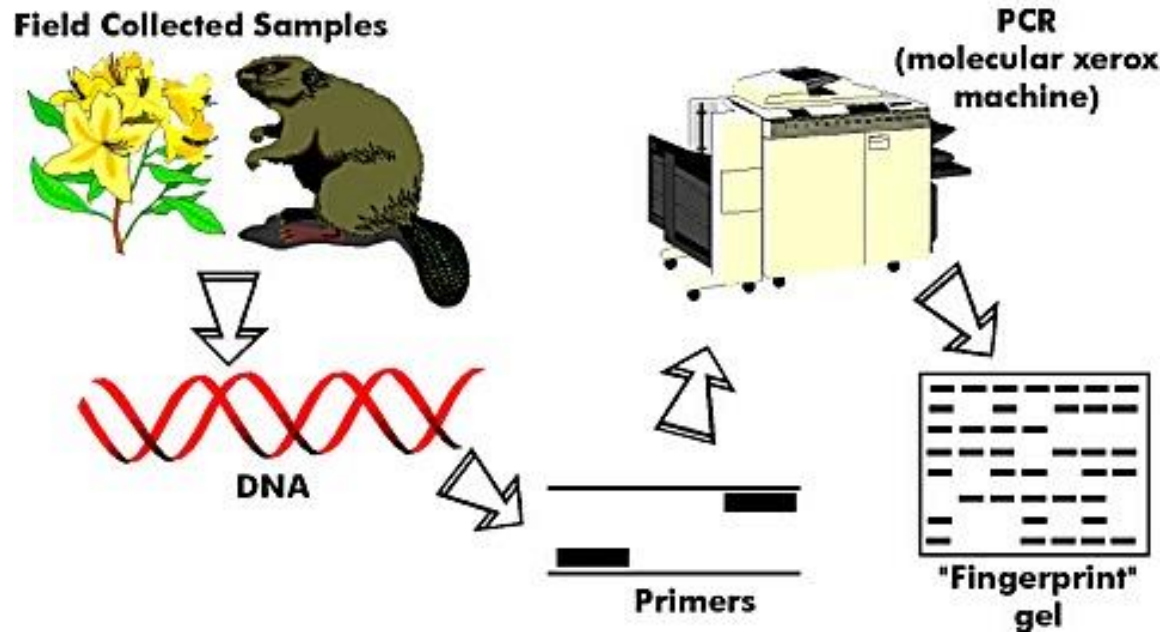
<http://www.wildlifegenetichealth.org/projects-research/wildlife-disease-ecology/>

- odhad **genetickej diverzity** určitej populácie v **minimálne dvoch** časových obdobiach.
- Pravidelný Odhad **početnosti a denzity**

Ciele:

- Genetické zdravie populácií v čase,
- Identifikácia ohrození,
- Usmernenie ochranárskych opatrení a stratégií.

Genetický monitoring = komplexný prístup



- Genetické + ekologické + demografické údaje
- Nástroj pre **včasné manažmentové opatrenia**
- Informácie **problémoch malých populácií** súvisiacich s efektom zahrdenia a zakladateľa
- Informácie o **zmenách početnosti, pomeru pohlavie**
- O **schopnostiach prekonávať bariéry** v krajine (izolácia vzdialenosťou, prostredím, schopnosťou adaptácie)
- **Nízke náklady** – postačuje 30-50 vzoriek geneticky nepríbuzných jedincov za študovanú populáciu resp. genetickú skupinu.

Väčšina programov starostlivosti a záchrany neberie do úvahy genetický monitoring!!!

Genetický monitoring v Európe a na Slovensku

nature ecology & evolution

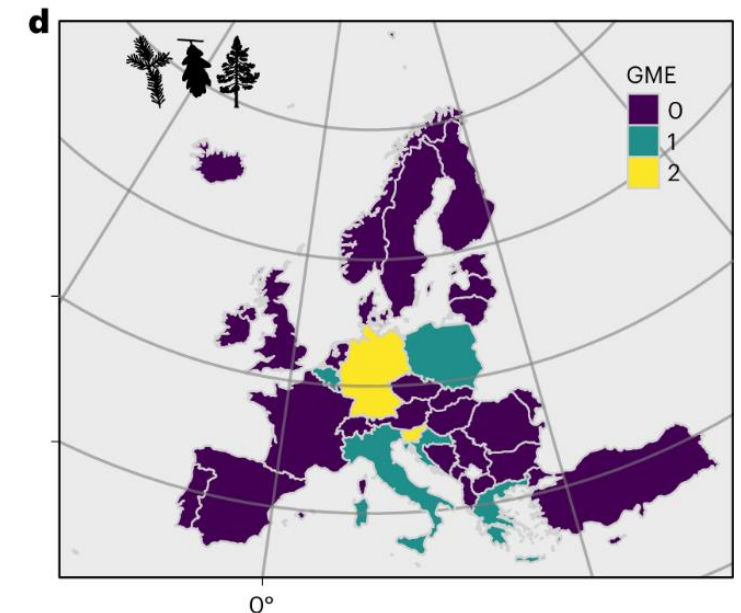
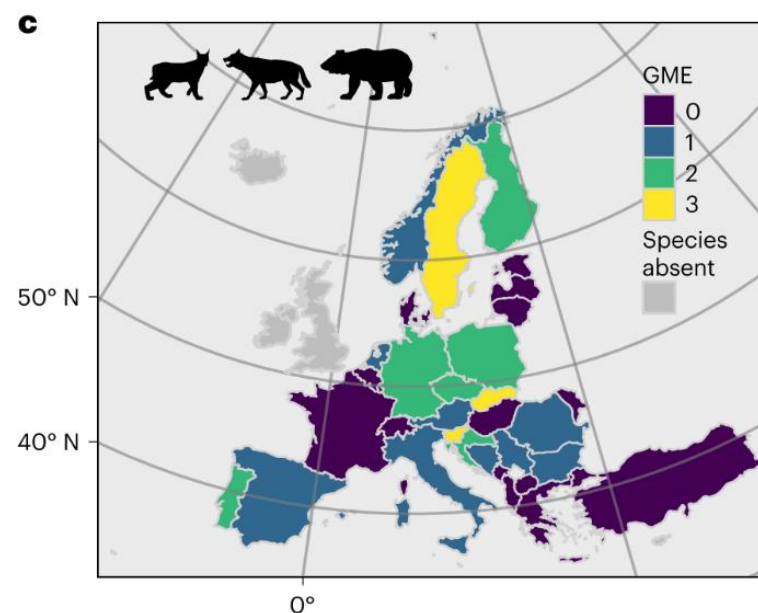
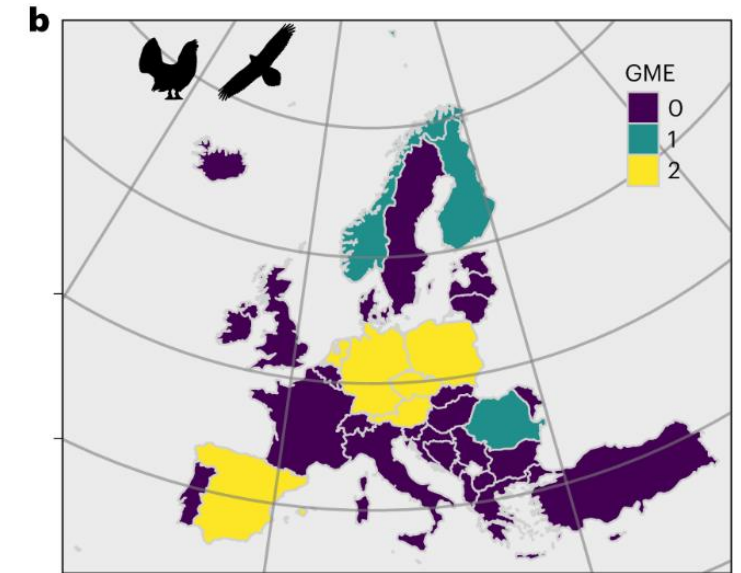
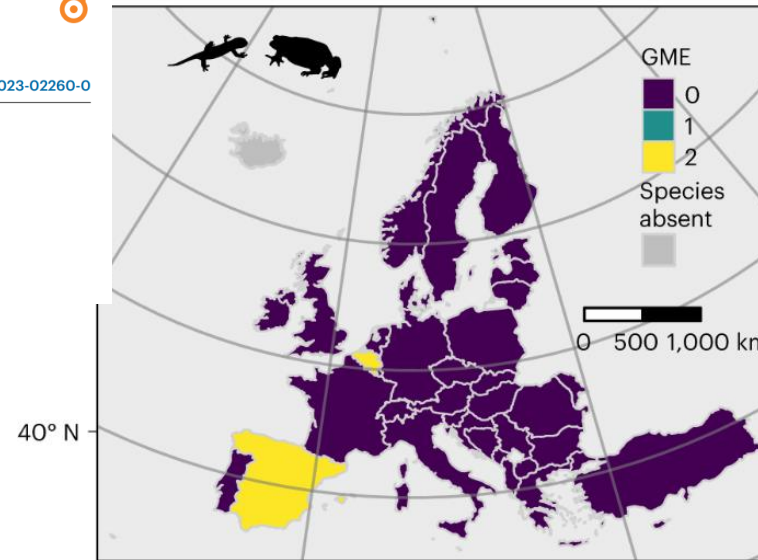


Article

<https://doi.org/10.1038/s41559-023-02260-0>

Monitoring of species' genetic diversity in Europe varies greatly and overlooks potential climate change impacts

- Do roku 2021
- jednorazové štúdie, sústredené na genetické odhady početnosti šeliem
- potreba systematicky monitorovať menej charizmatičké organizmy (obojživelníky, lesné dreviny, lesné kury a iné).
- potreba **pravidelného** vzorkovania (30 jedincov/populácia)
- potreba prijatia **dlhodobej stratégie monitoringu** pre vybraných zástupcov taxónov ohrozených klimatickými zmenami





Invazívne a neinvazívne metódy odberu vzoriek



Veľký význam majú tkanivá (svalovina) uhynutých jedincov!

Zber srsti, trusu s neviditeľnou DNA ťažko zdieľať na soc. sieťach



Efektívna veľkosť populácie (NE)

=

SMART indikátor

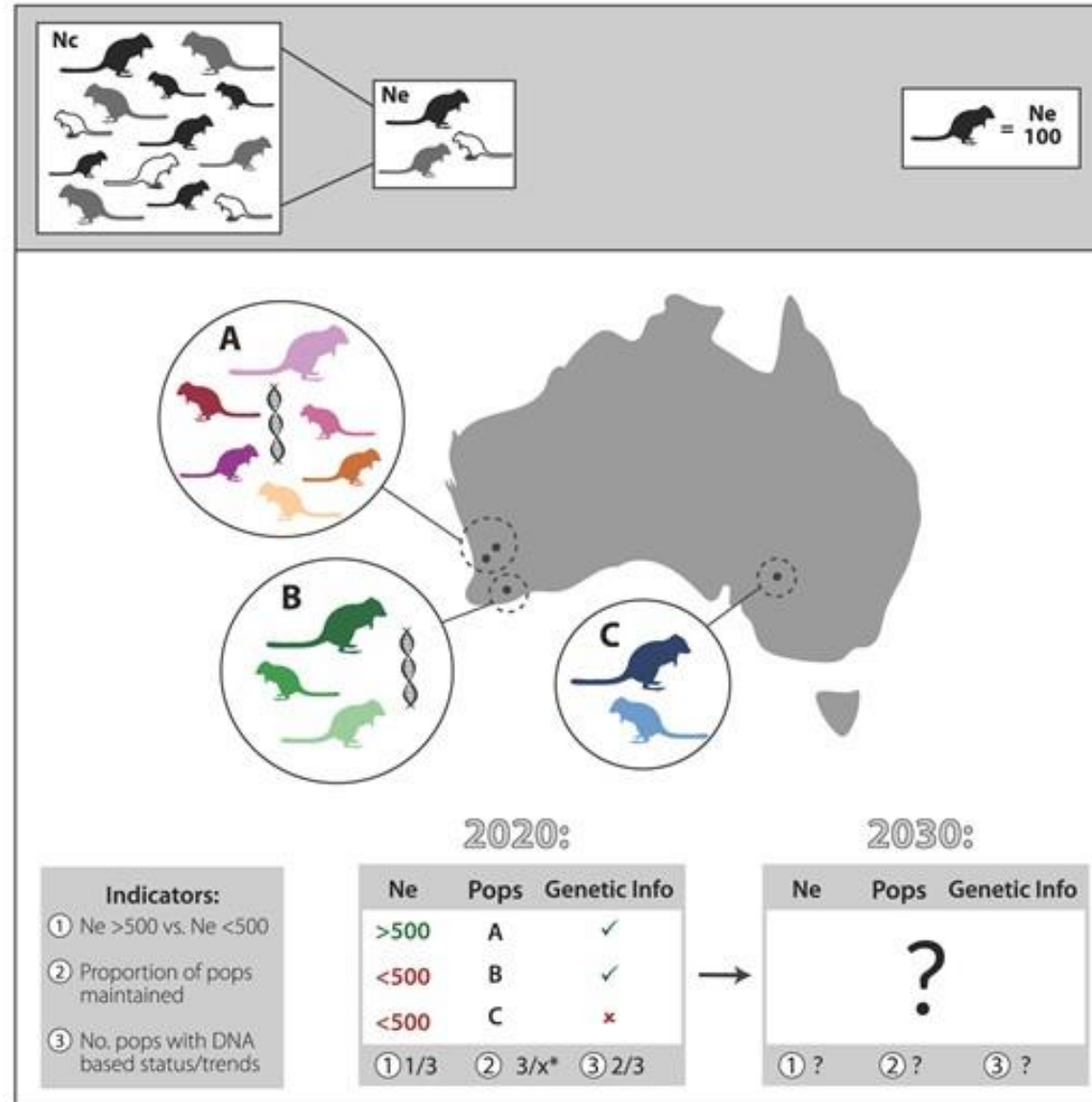
Specific,

Measurable,

Achievable,

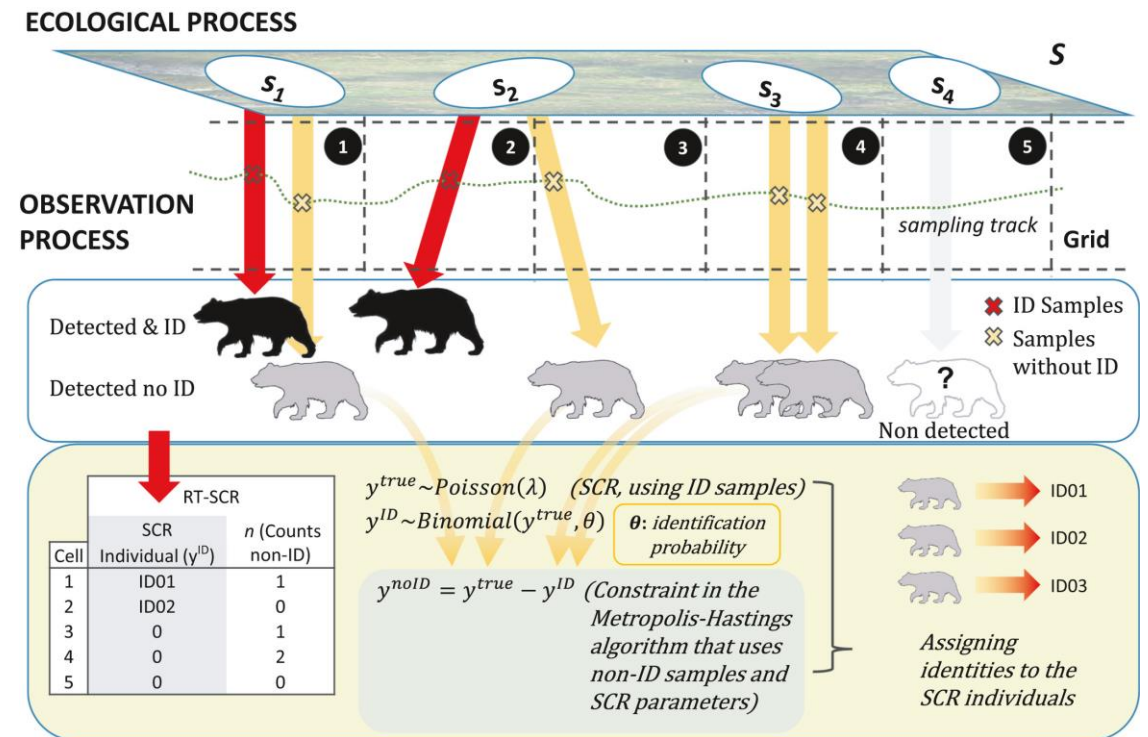
Realistic,

Timely.



Design monitoringu

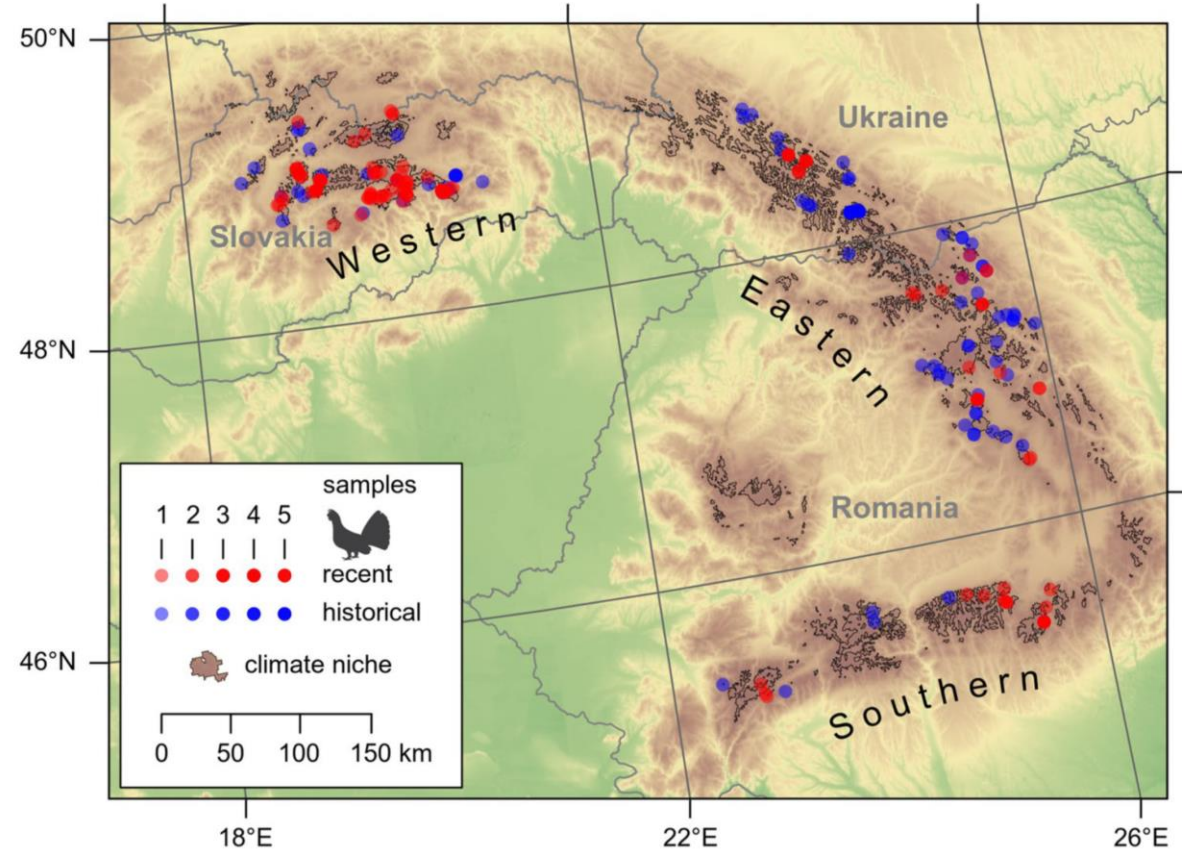
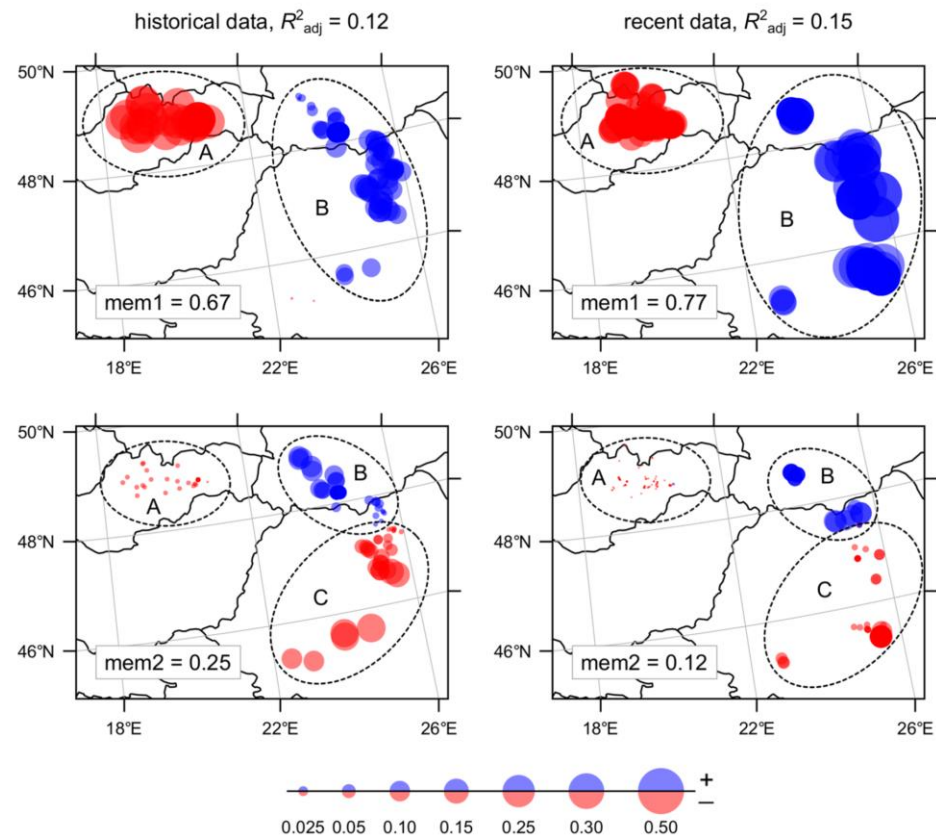
- **Jednorázový genetický skríning** abundance a denzity nie je monitoring genetickej premenlivosti
- **vyhnúť sa náhodnému zberu** na veľkej ploche!!!
- **zachytiť lokálne podmienky** prostredia a študovanej populácie
- **systematický**, pravidelne opakovaný (napr. rovnaké plochy každých 14 dní počas napr. 3 mesiacov = 6ks 14-dňových udalostí, vysoká pravdepodobnosť opätovných záchytov = uzavretá populácia)
- abundancia a **denzita, pomer pohlavia** vo vhodnom biotope modelového územia a následne sa reprezentatívna denzita preráta na výmeru **vhodných** biotopov celkového študovaného územia.



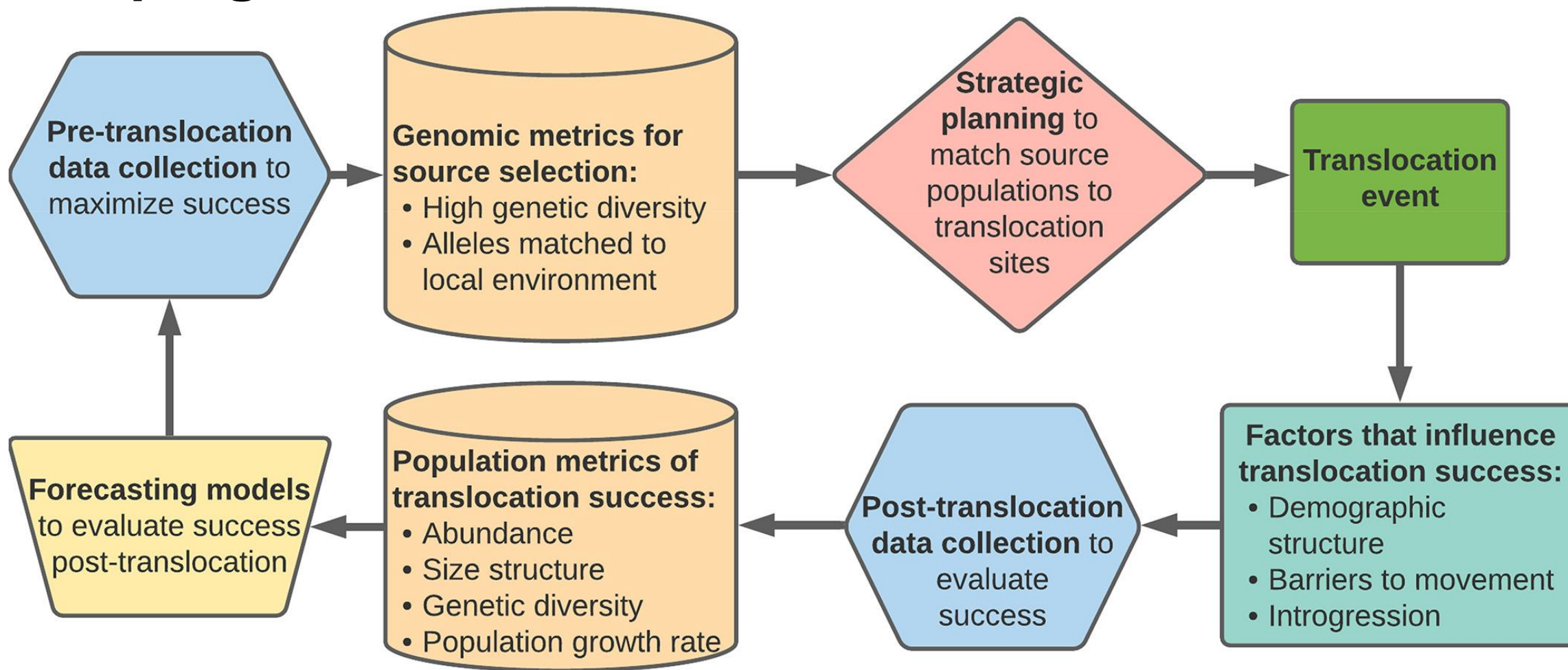
Temporal landscape genetic data indicate an ongoing disruption of gene flow in a relict bird species

Peter Klinga^{1,2} · Martin Mikoláš^{3,4} · Ivan V. Delegan⁵ · Gabriel Dănilă⁶ · Peter Urban⁷ · Ladislav Paule¹ · Peter Kaňuch^{8,9}

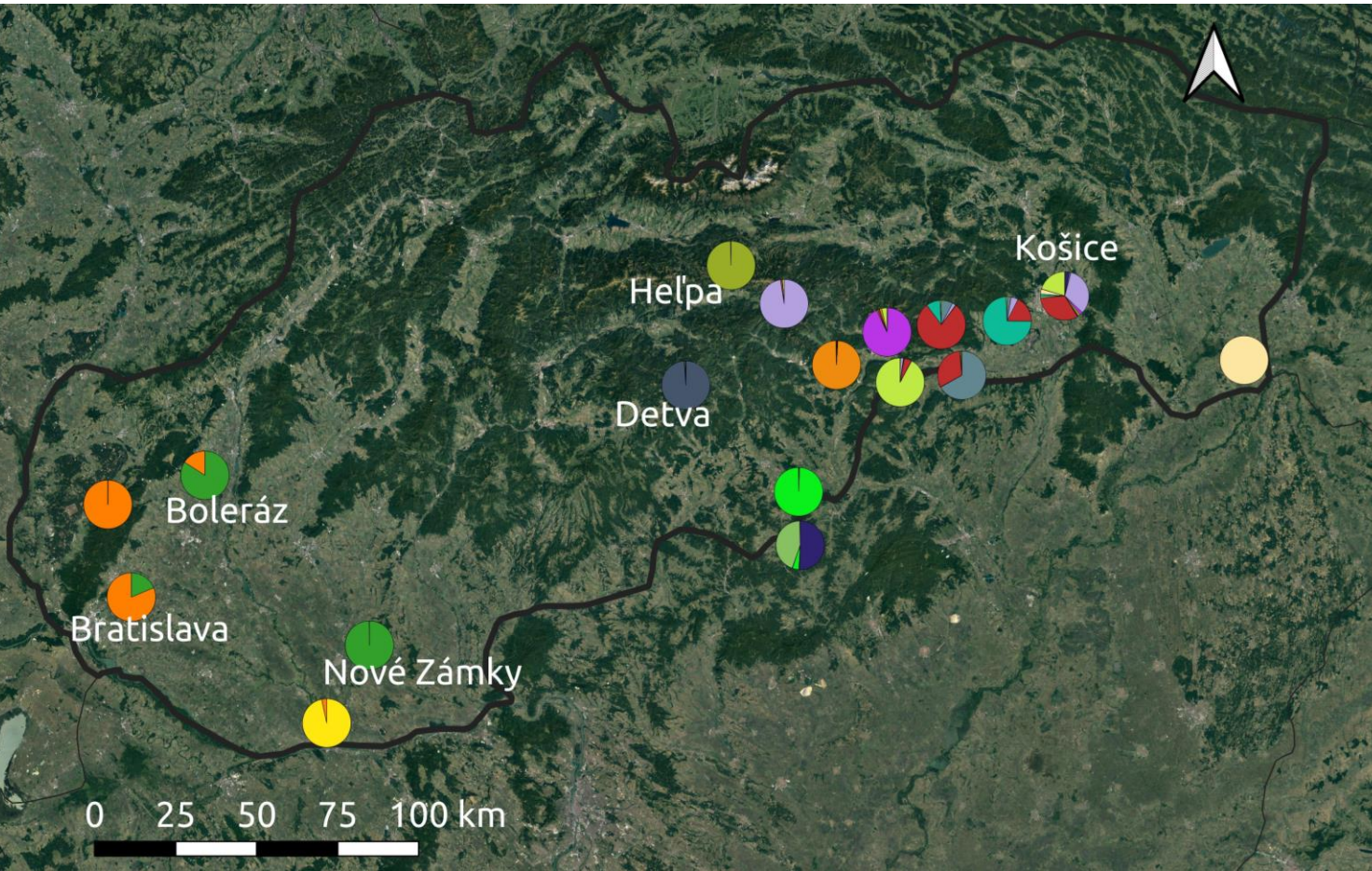
Časovo-priestorové
a genetické
=
Efektívny nástroj pre
ochranu a
manažment
populácií.

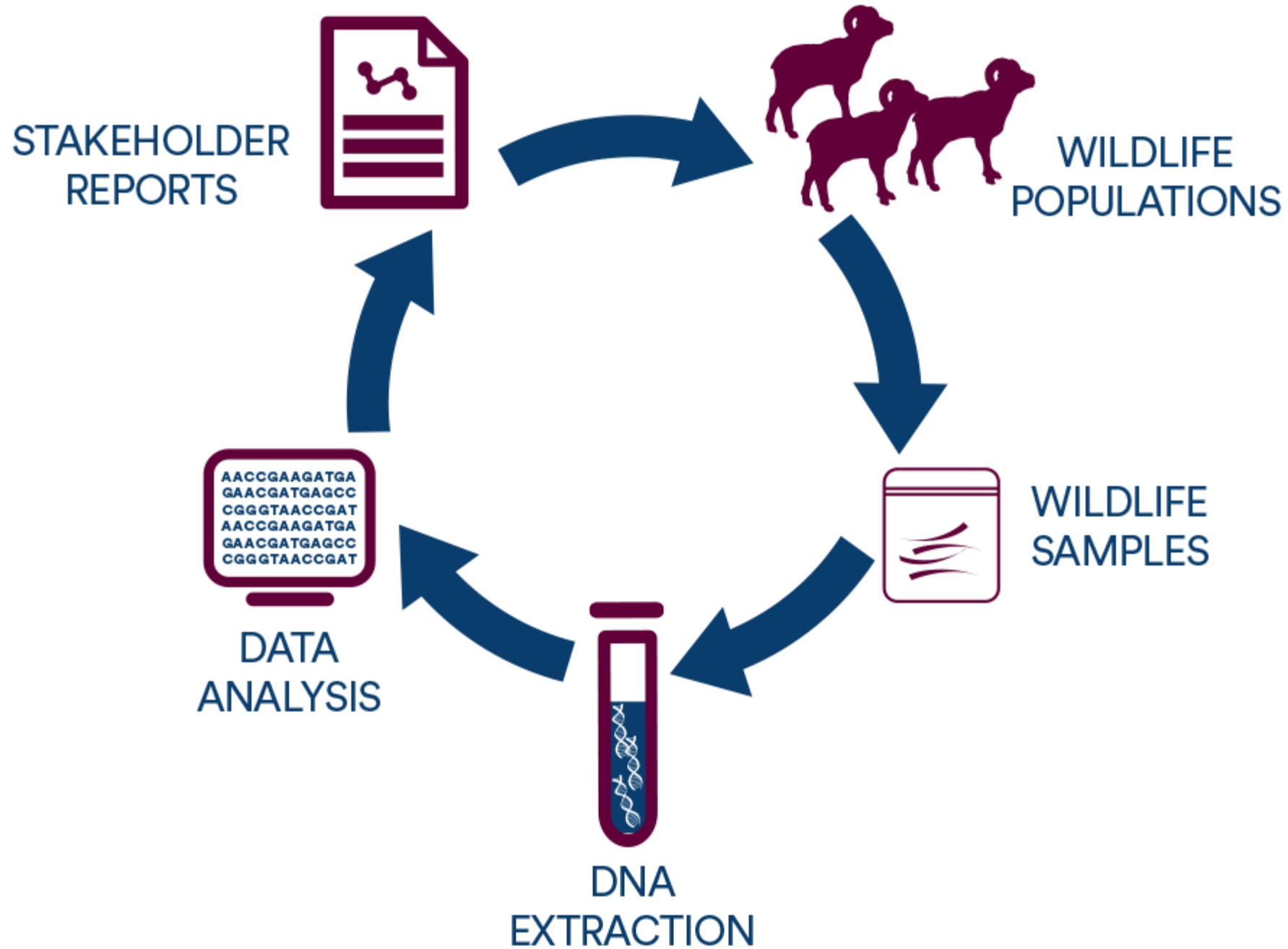


Genetický monitoring v záchranných programech



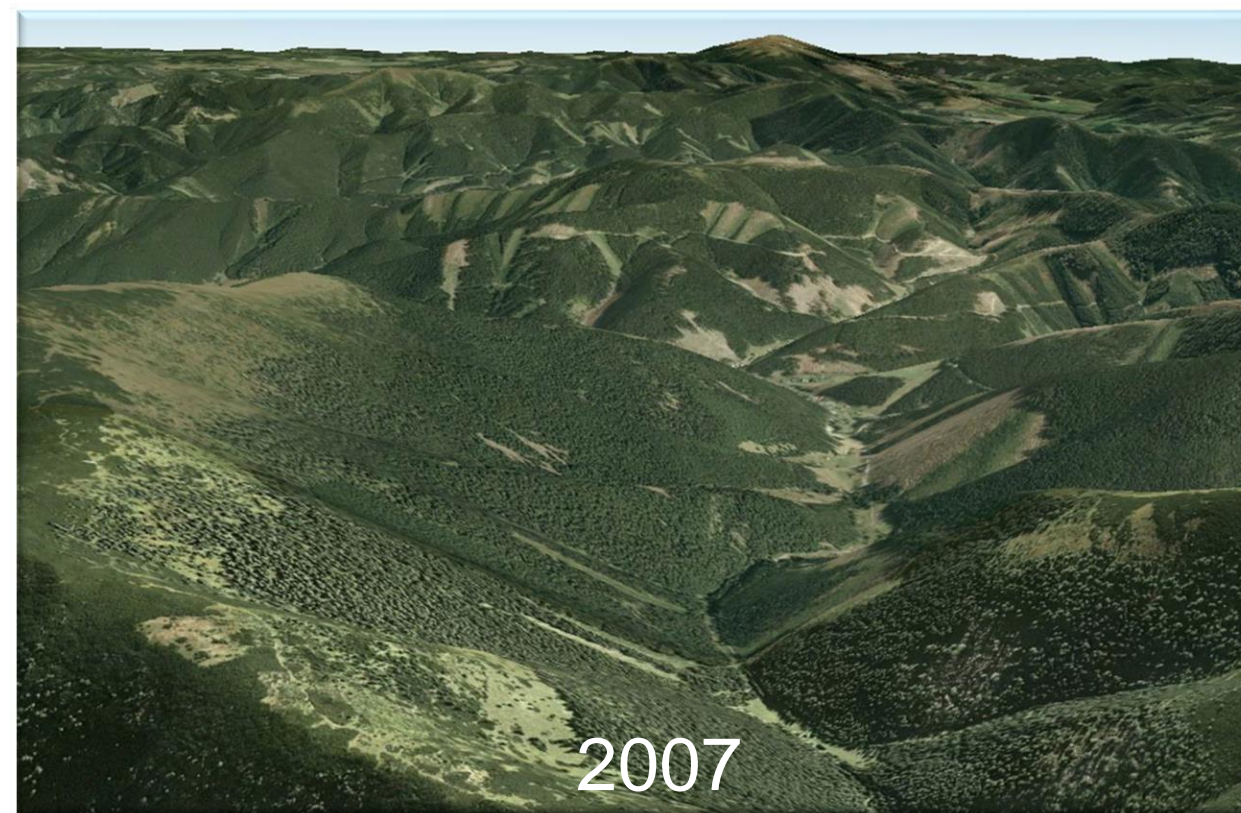
Genetický monitoring v záchranných programoch



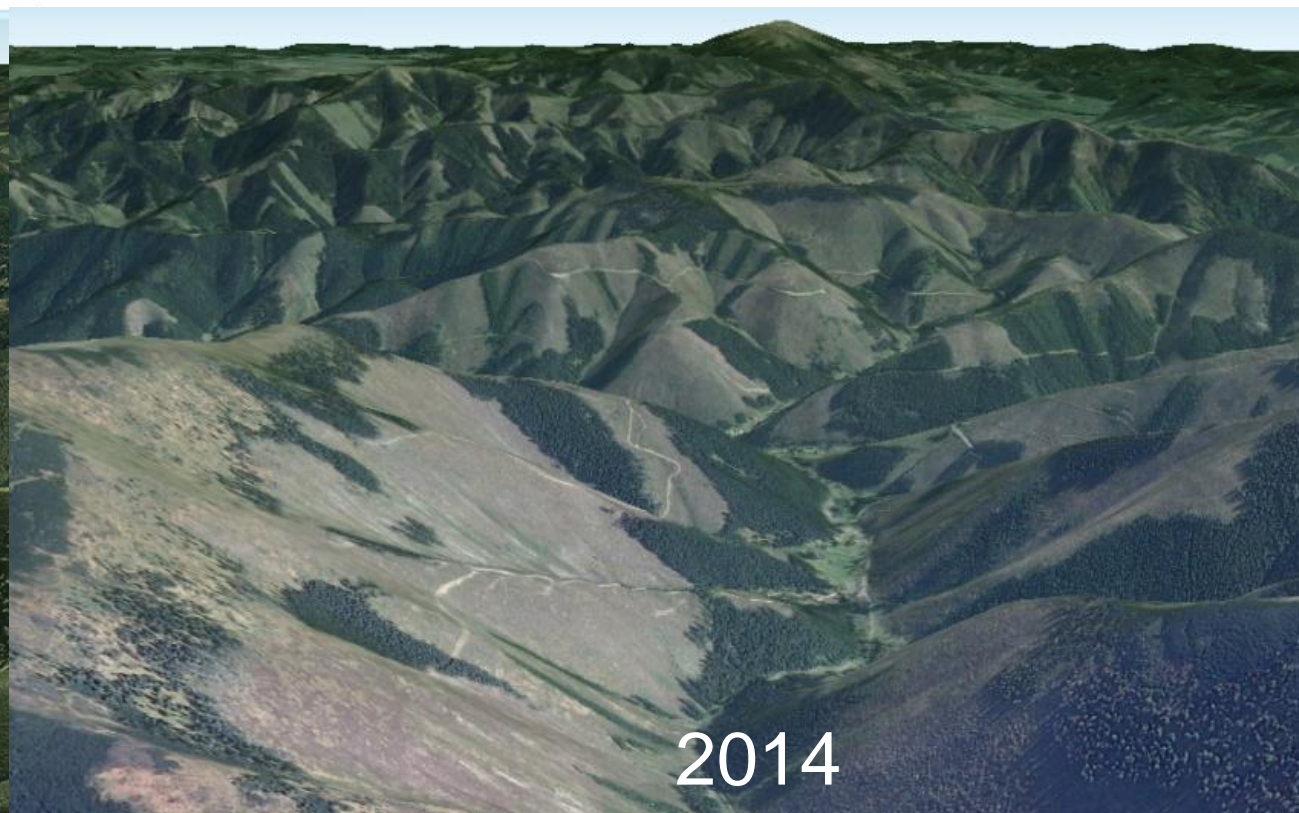


Hlucháň hôrny (*Tetrao urogallus*)

- Kurovitý vták
- daždníkový druh boreálnych ihličnatých lesov
- Ohrozenia: strata habitatu, globálne otepľovanie, predácia



2007

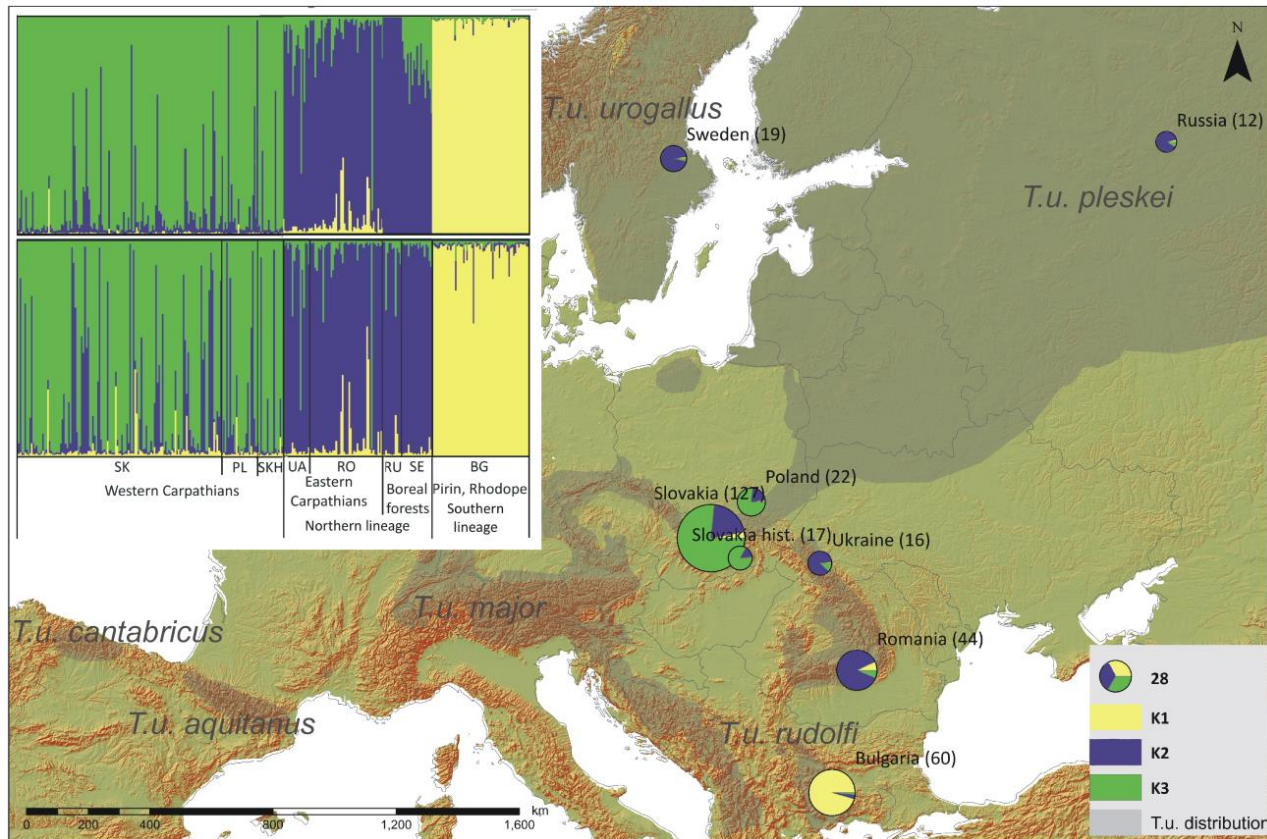


2014



- ❑ Priestorová štruktúra vhodného biotopu:
 - Nízky korunový zápoj
 - Bohatá vegetácia
 - Stromy zavetvené po zem.

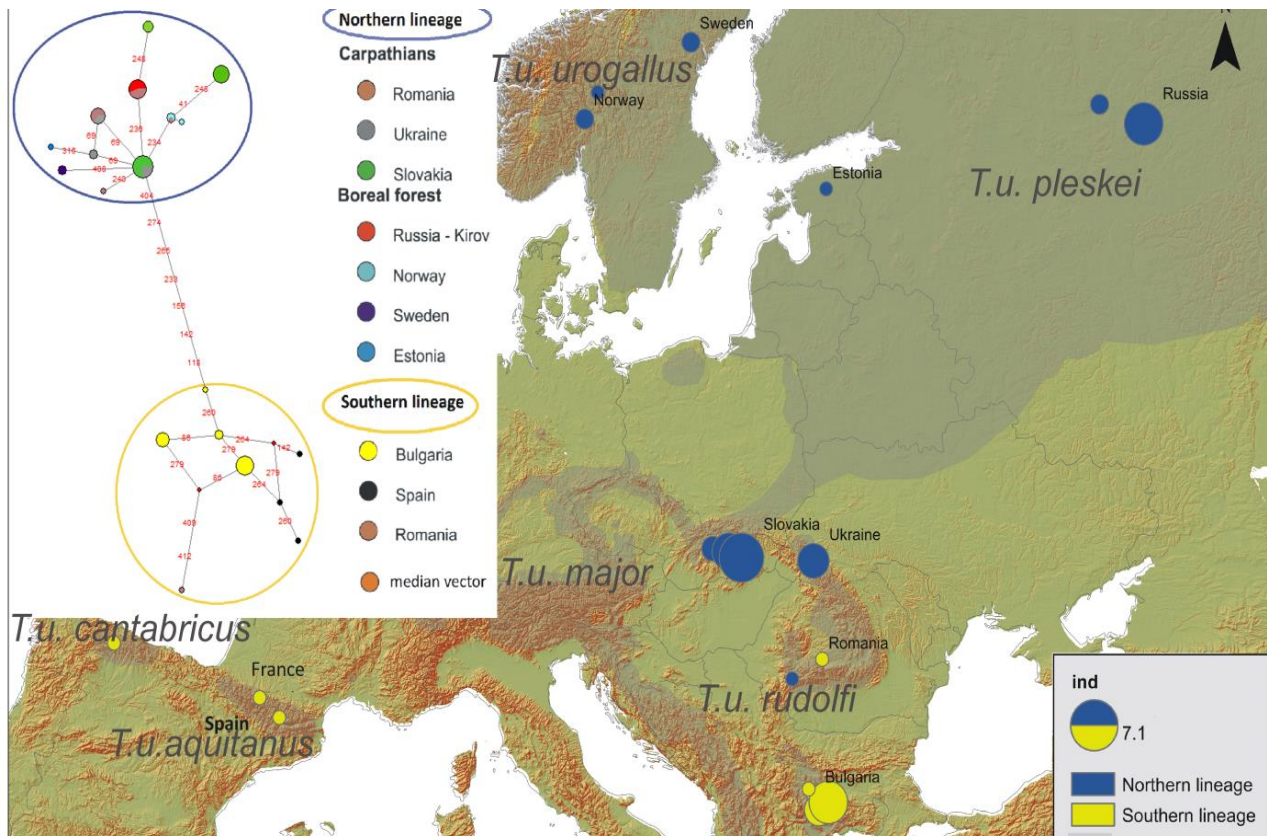
- ❑ Typická štruktúra horských alebo rašeliniskových smrekových lesov



Biological Journal of the Linnean Society, 2015, 116, 873–889. With 5 figures.

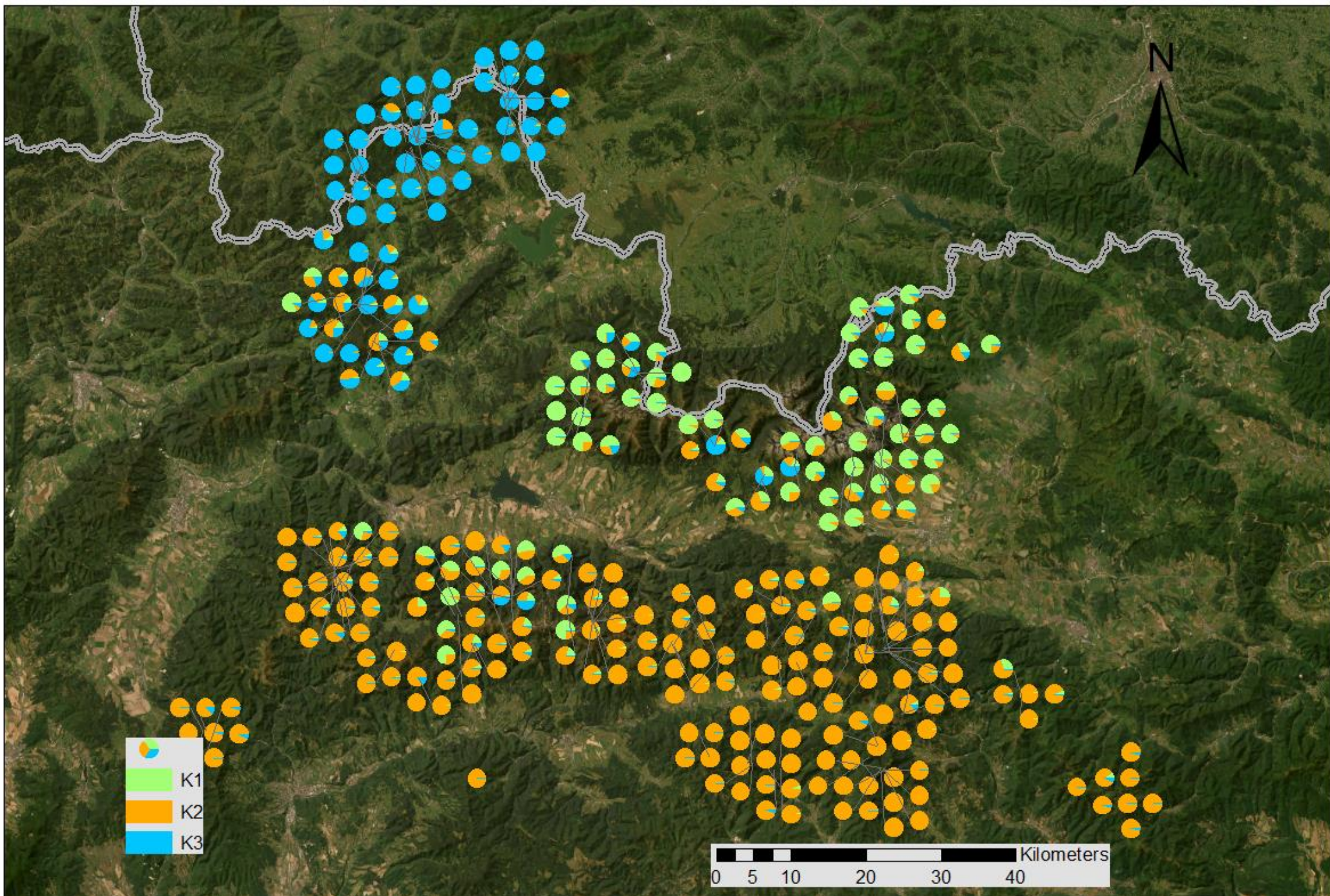
Genetic differentiation of western capercaillie in the Carpathian Mountains: the importance of post glacial expansions and habitat connectivity

PETER KLINGA^{1*}, MARTIN MIKOLÁŠ^{2,3}, PETAR ZHELEV⁴, JACOB HÖGLUND⁵ and LADISLAV PAULE¹

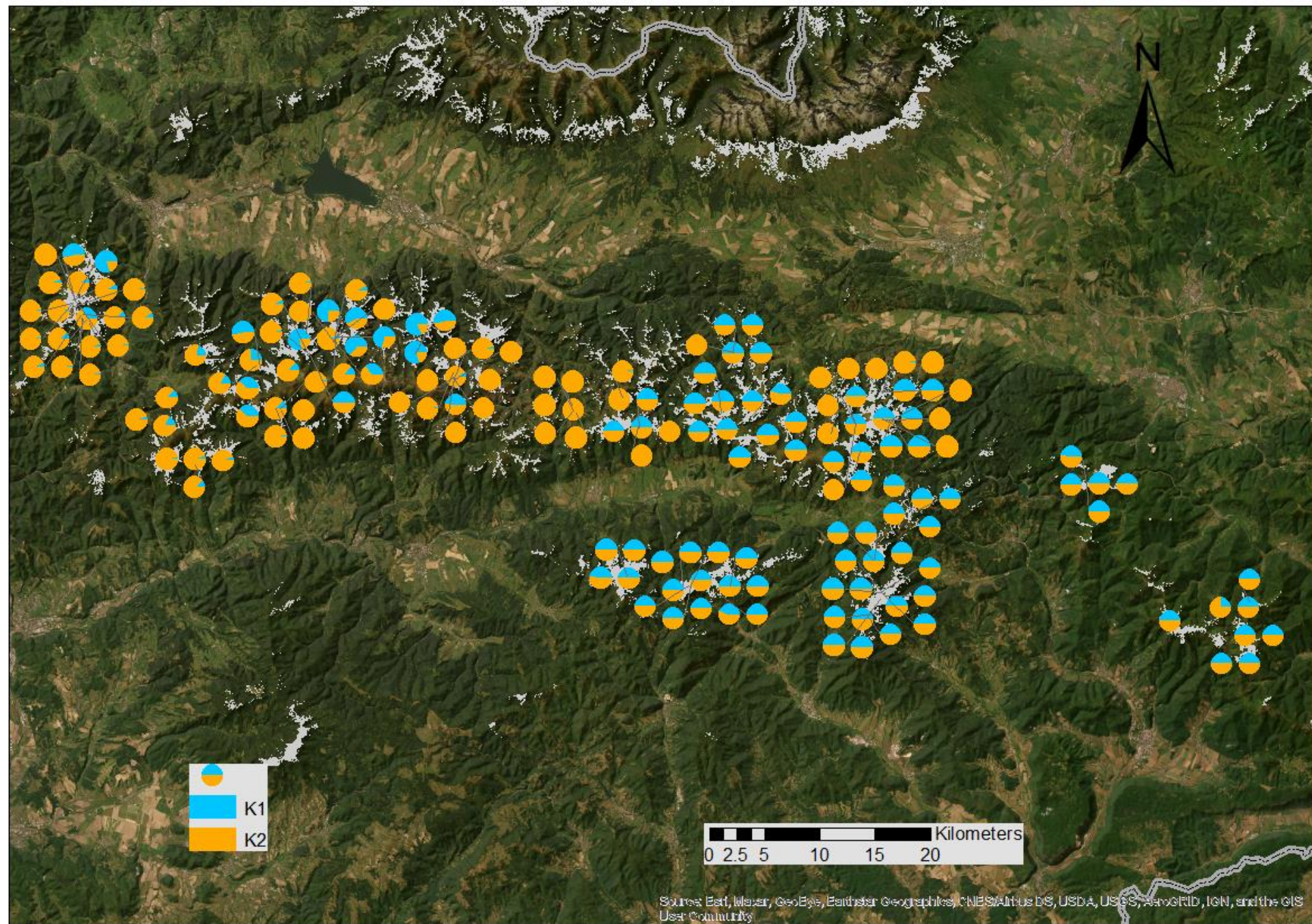


Populačná genetika a fylogeografia

Genetické skupiny hlucháňa



Genetické skupiny hlucháňa

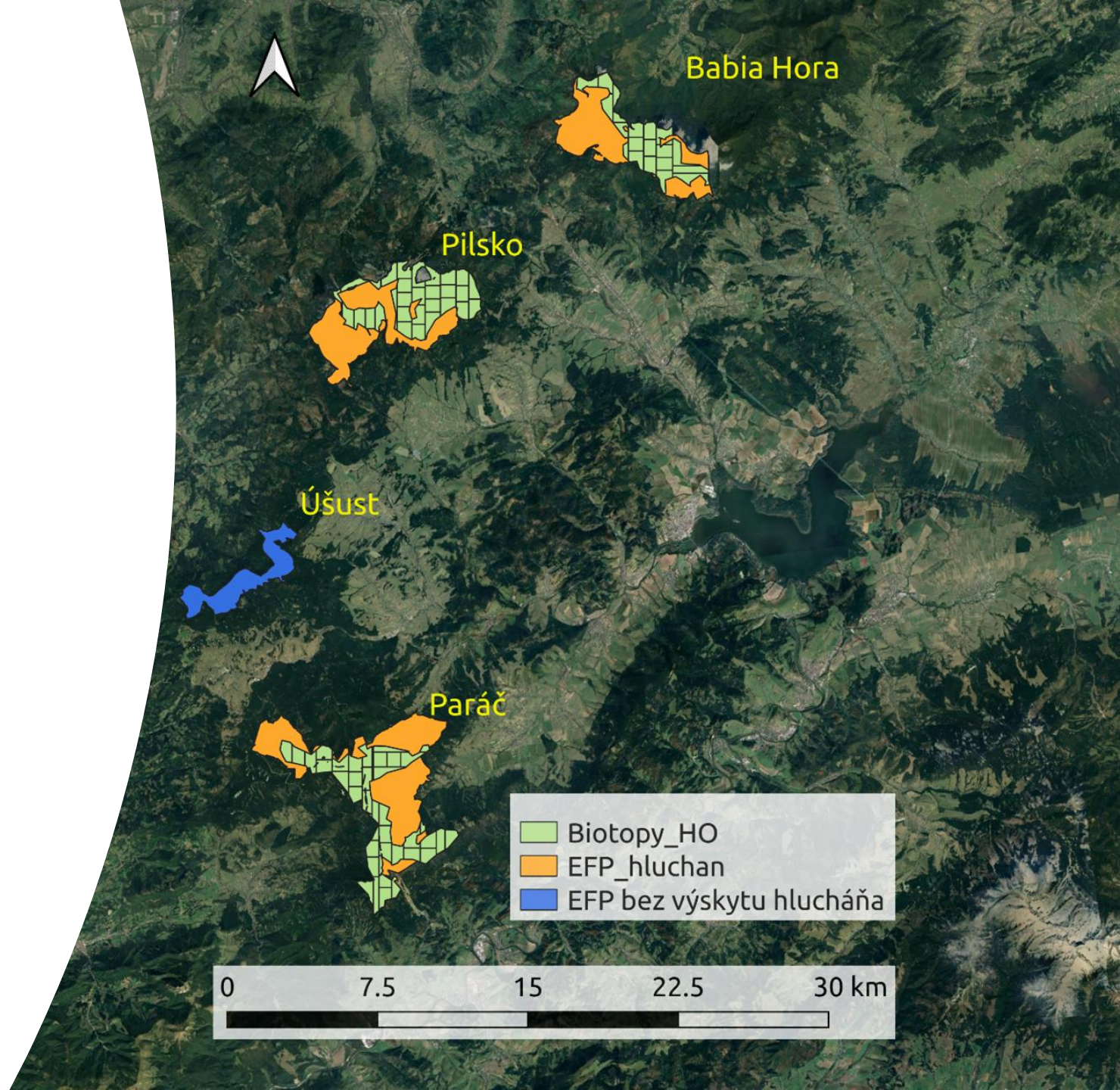


Efektívna veľkosť populácie 50/500

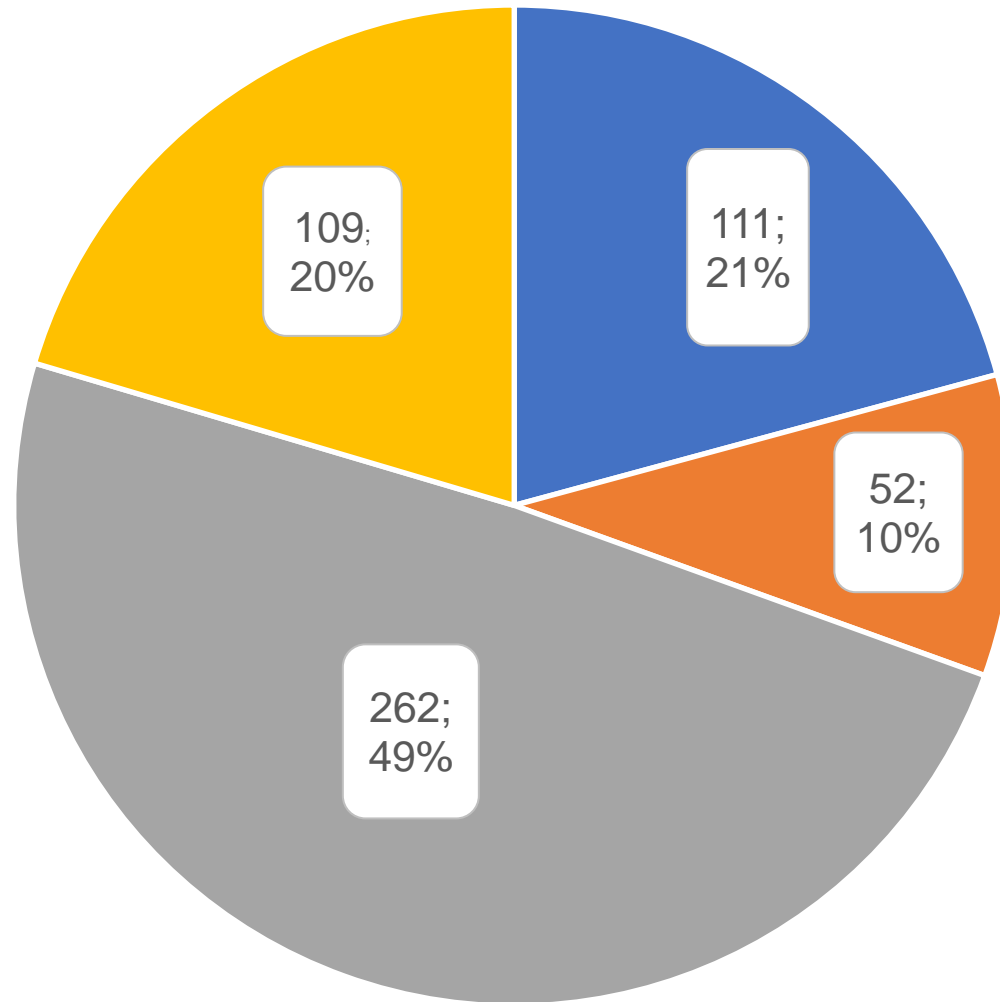
| Populácia | N | K | Ne | CI 95% | Df |
|--|---------|----|-------|---------------|-----|
| Tatry a Spišská Magura | 67 | K1 | 61.5 | 32.6 - 170.3 | 238 |
| V. Fatra, N. Tatry, Muránska Planina, Stolické a Volovské vrchy | 17 9 | K2 | 153.6 | 84.7 - 384.5 | 220 |
| Orava (K3) | 65 | K3 | 24.9 | 13.2 - 52.4 | 115 |
| Spolu | | | 240 | 130.5 - 607.2 | |

Podrobný opis metodiky

- Babia hora
- Pilsko
- Paráč,



Zber 534 vzoriek podľa záujmových skupín



■ Lesy SR

■ urbáre

■ ŠOP SR

■ dobrovoľníci

Genetický monitoring hlucháňa na Hornej Orave

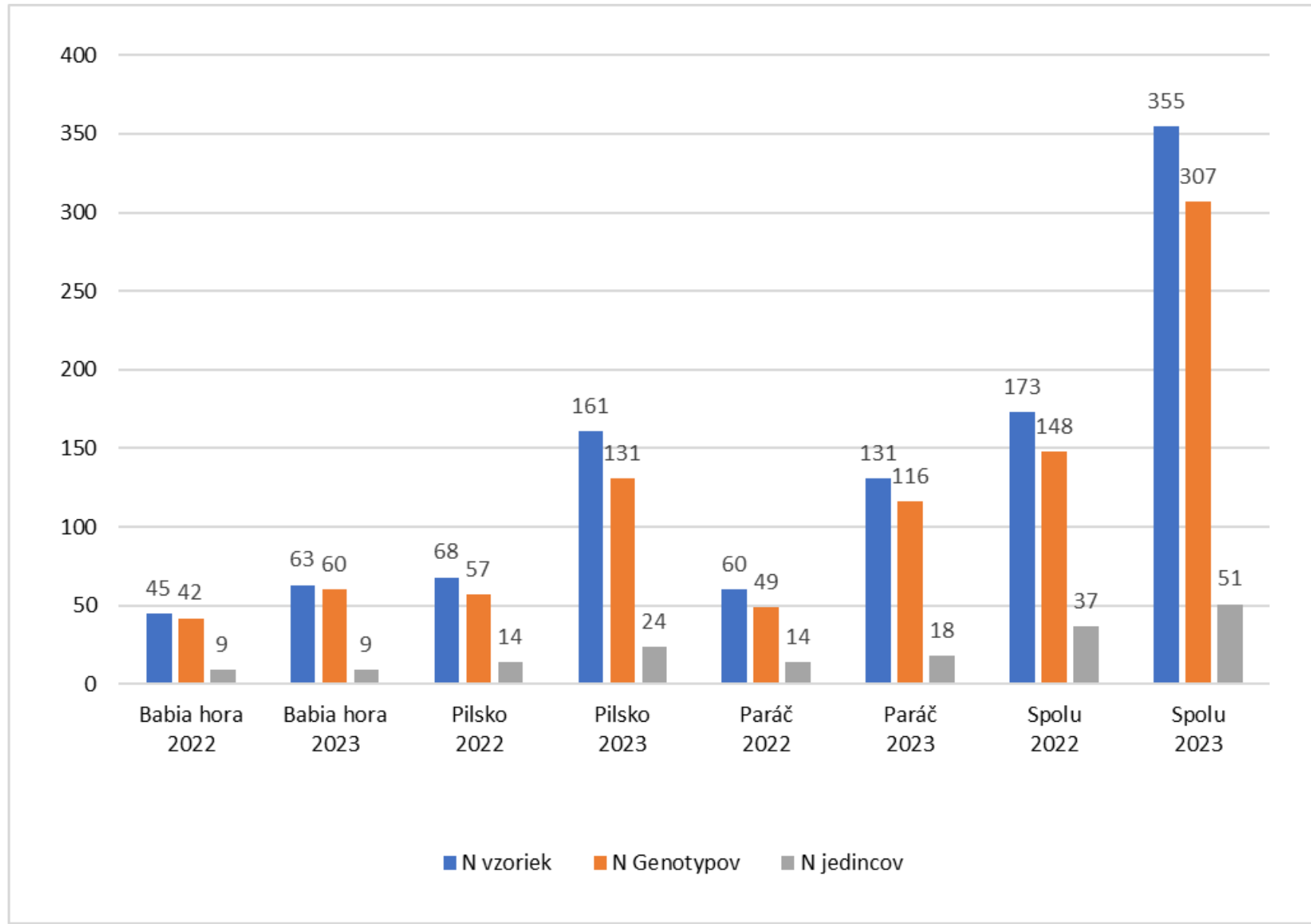
odhad početnosti

*stanovenie parametrov
genetickej premenlivosti*

*zhodnotenie prepojenosti
populácií*

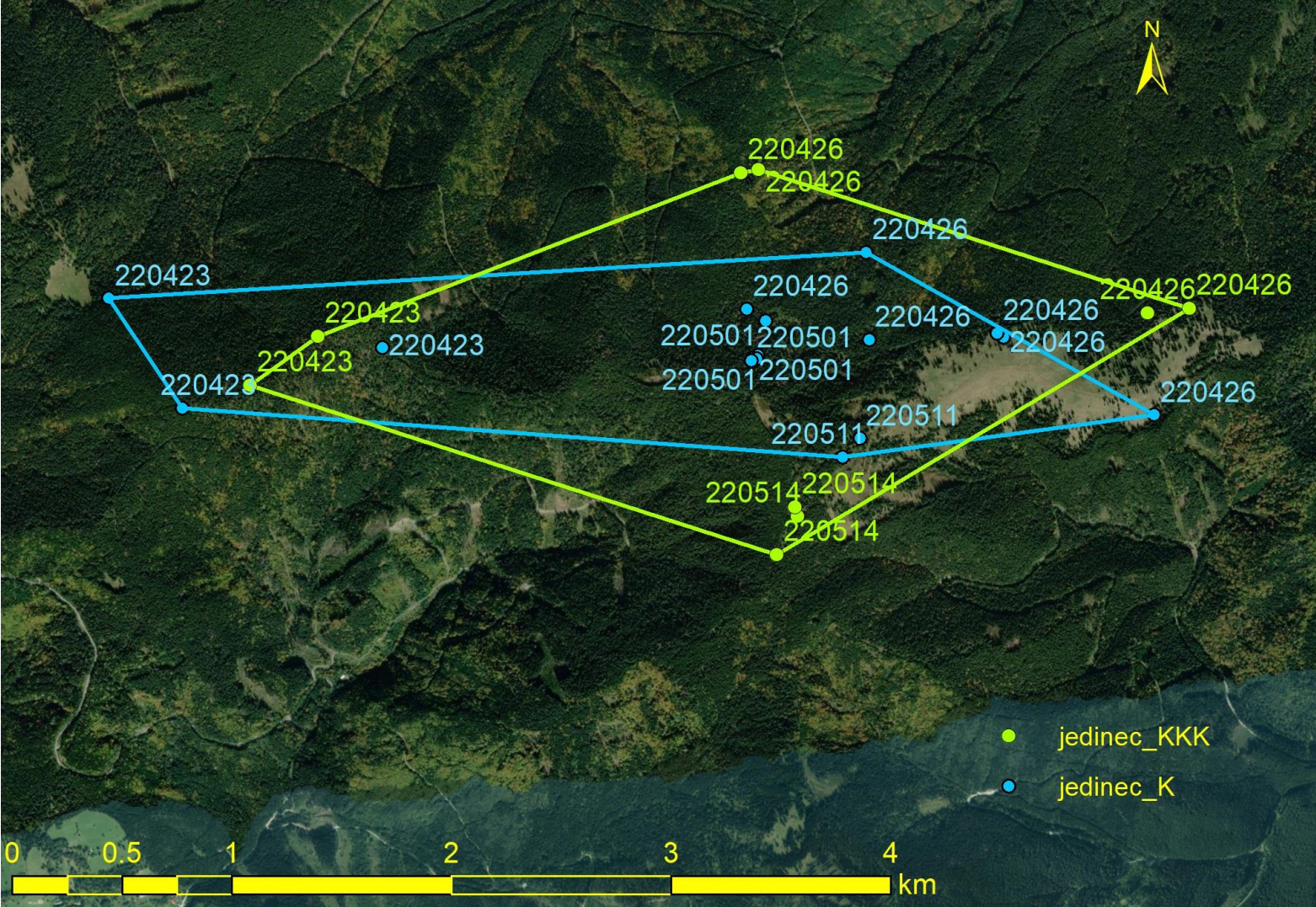
- Časová a priestorová **uzavretosť** populácie (5km)
- **bez prírastku** novej generácie jedincov, aj preto je zber realizovaný v zimných a jarných mesiacoch
- prevládajúce stabilné **suché mrazivé počasie**
- potreba **viacnásobnej genetickej identifikácie**
- potrebné je zaznamenávať **GPS koordináty** pre krajinárske analýzy
- **jedinca** v priestore, založená na princípoch SCR (spatial capture-recapture)

Prehľad počtu kusov zozbieraných vzoriek, identifikovaných genotypov a jedincov zo zozbieraných vzoriek v sezónach 2022-2023.

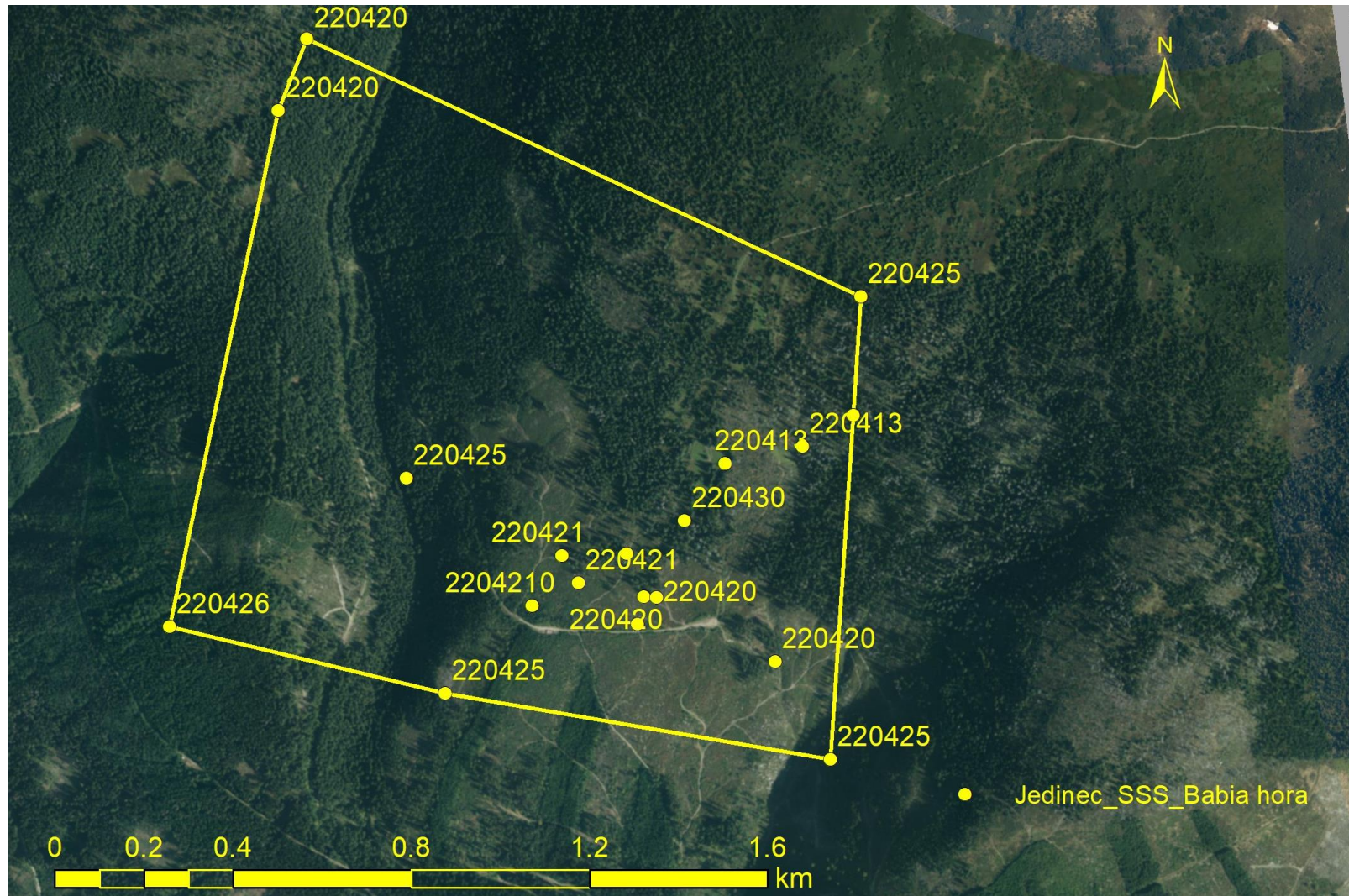


| Populácia hlucháňa | Rok | N vzoriek | N % zo všetkých vzoriek | N Genotypov | Úspešnosť genotypovania [%] | N jedincov | Úspešnosť identifikácie jedinca zo vzoriek [%] | Úspešnosť identifikácie jedinca z genotypov [%] | Počet vzoriek na jedného jedinca |
|--------------------|------|-----------|-------------------------|-------------|-----------------------------|------------|--|---|----------------------------------|
| Babia hora | 2022 | 45 | 26.01 | 42 | 93.33 | 9 | 20.00 | 21.43 | 5.00 |
| | 2023 | 63 | 17.75 | 60 | 95.24 | 9 | 14.29 | 15.00 | 7.00 |
| Pilsko | 2022 | 68 | 39.31 | 57 | 83.82 | 14 | 20.59 | 24.56 | 4.86 |
| | 2023 | 161 | 45.35 | 131 | 81.37 | 24 | 14.91 | 18.32 | 6.71 |
| Paráč | 2022 | 60 | 34.68 | 49 | 81.67 | 14 | 23.33 | 28.57 | 4.29 |
| | 2023 | 131 | 36.90 | 116 | 88.55 | 18 | 13.74 | 15.52 | 7.28 |
| Spolu | 2022 | 173 | NA | 148 | 85.55 | 37 | 21.39 | 25.00 | 4.68 |
| | 2023 | 355 | NA | 307 | 86.48 | 51 | 14.37 | 16.61 | 6.96 |

Domovské okrsky vybraných jedincov na Parači s dátumami zberu (rok, mesiac, deň)



Domovské okrsky jedinca „sss“ na Babej hore s dátumami zberu (rok, mesiac, deň)



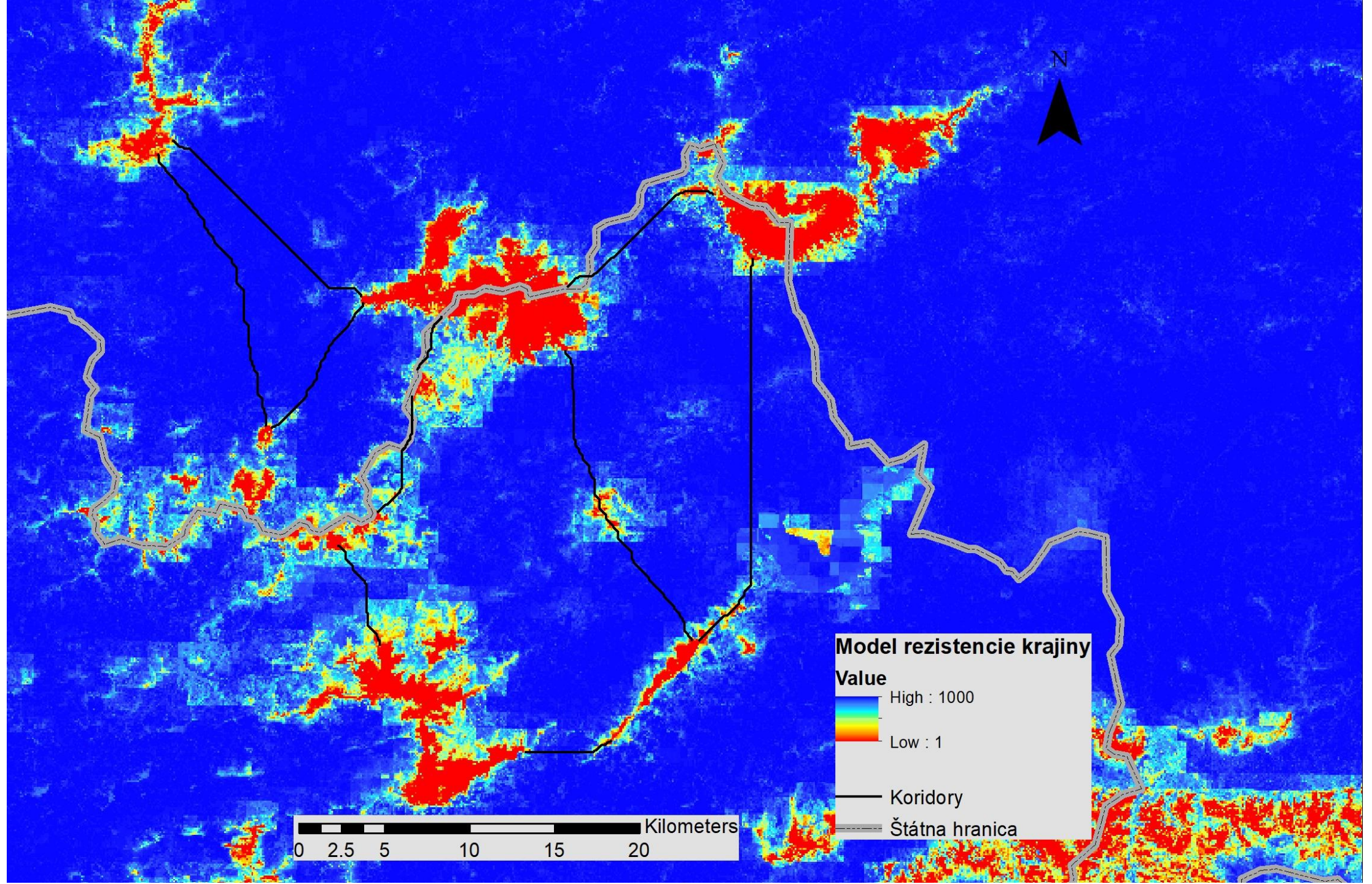
Krajinárske modelovanie biotopov zo 696 GPS bodov

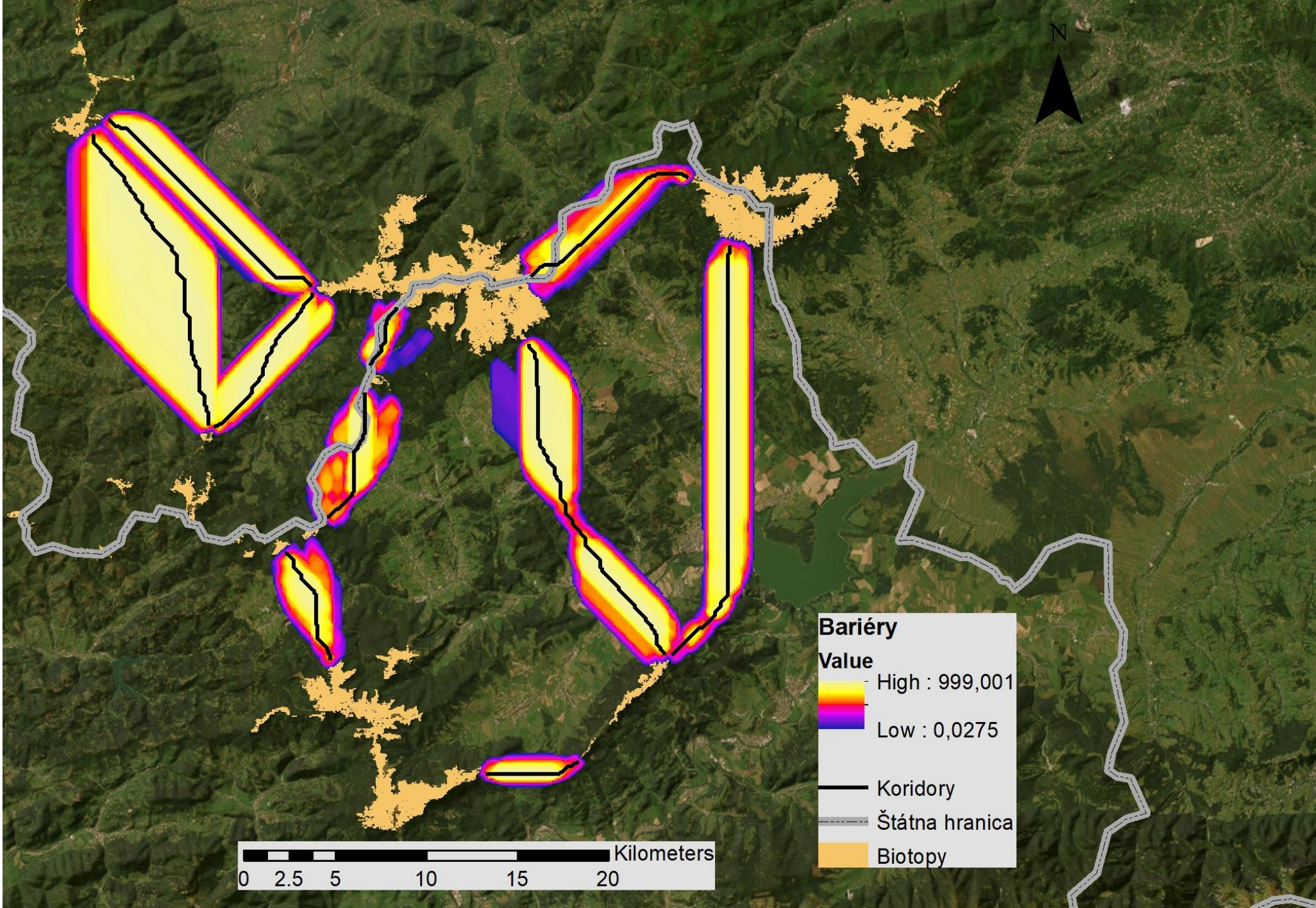
Environmentálna premenná

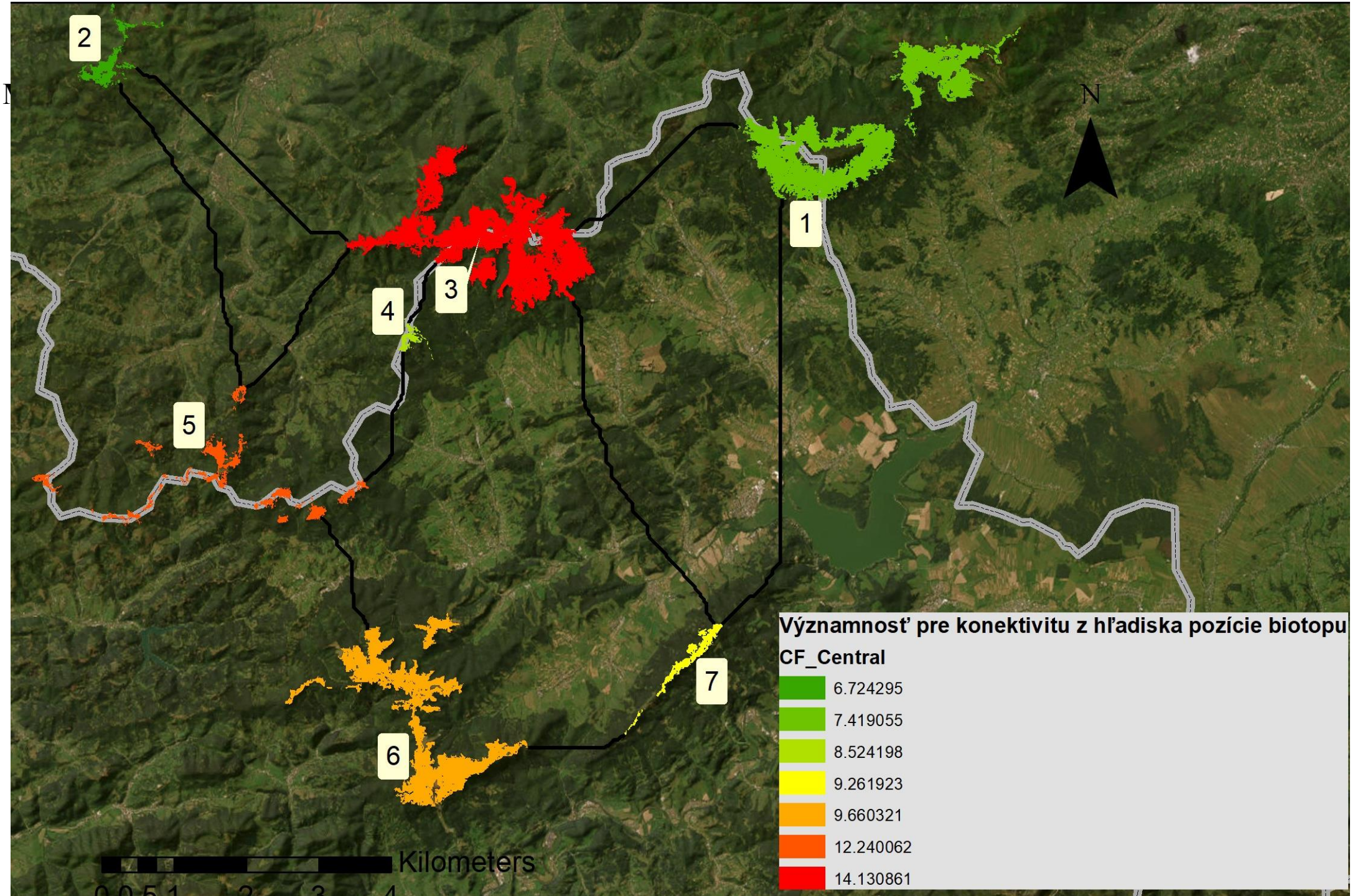
- nadmorská výška
 - orientácia svahu
 - sklon svahu
 - Hrebeňové a údolné formy, zohľadňuje nadmorskú výšku v kontraste k jej priemeru
 - jesenná priemerná teplota
 - jarná priemerná teplota
 - krajinná pokrývka
-

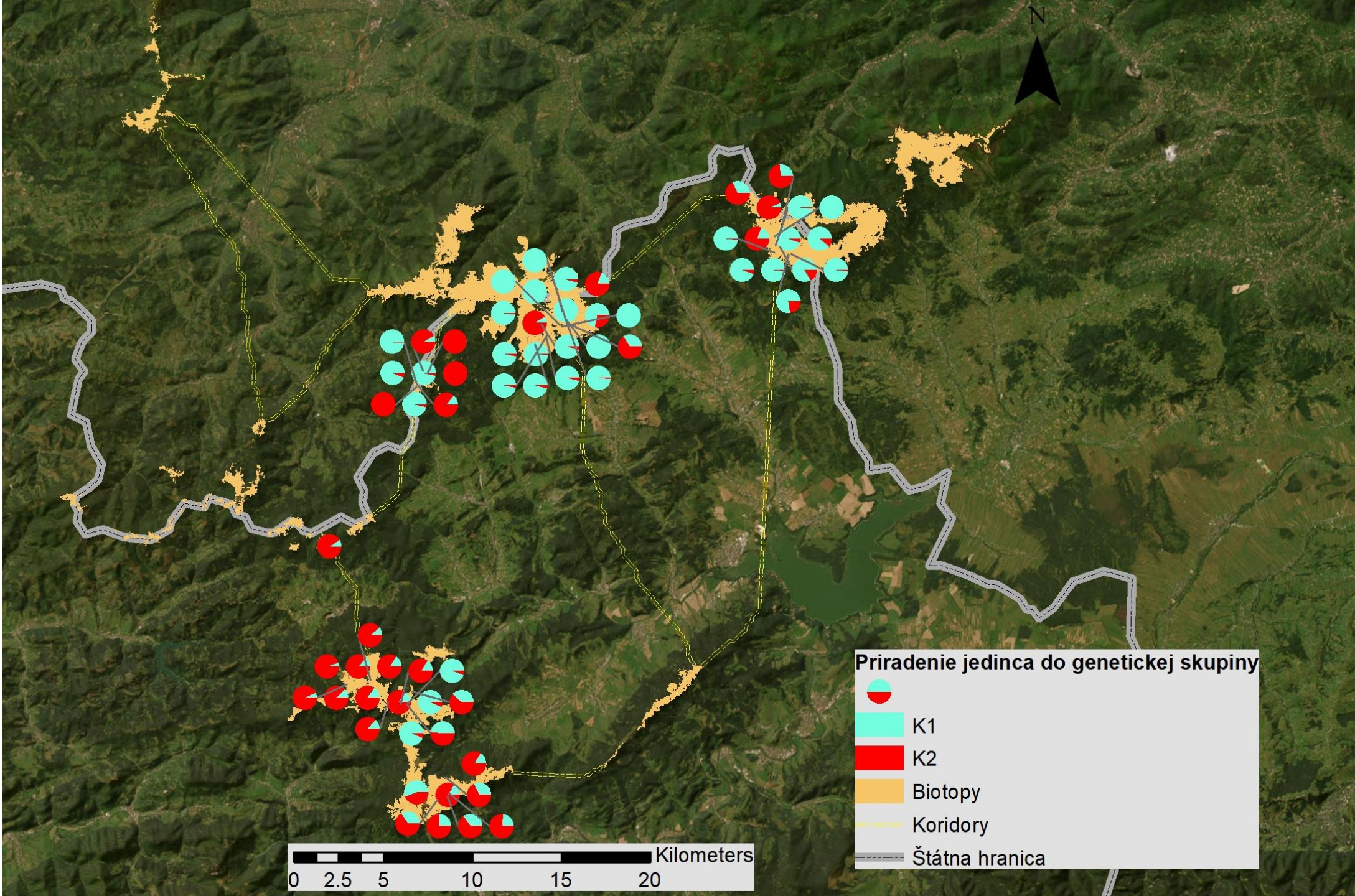
Environmentálna premenná

- nočné osvetlenie
 - EVI vegetačný faktor: median vegetačnej sezóny
 - NDVI vegetačný faktor: median vegetačnej sezóny
 - NDVI vegetačný faktor: 5ty percentil vegetačnej sezóny
 - NDVI vegetačný faktor: 95ty percentil vegetačnej sezóny
 - NDVI vegetačný faktor:: štandardizovaná odchýlka vegetačnej sezóny
 - výška vegetácie
-









Priradenie jedinca do genetickej skupiny



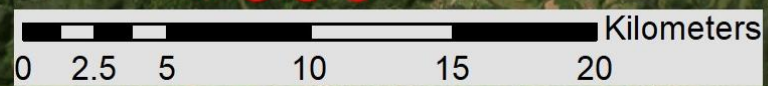
K1

K2

Biotopy

Koridory

Štátna hranica



Genetická premenlivosť

| | N | NA | AR | AR _{Priv} | Ho | H _E | F _{IS} | CI 95% | NE | CI 95% |
|------------|----|---------------|---------------|--------------------|---------------|----------------|-----------------|----------------|------|------------|
| Babia hora | 14 | 4.07 ±0.57 | 4.11 ±0.57 | 0.28 ±0.36 | 0.56 ±0.18 | 0.6 ±0.11 | 0.10 | (-0.08 - 0.18) | 10 | (2.1-∞) |
| Pilsko | 29 | 4.45 ±0.96 | 4.17 ±0.95 | 0.13 ±0.18 | 0.55 ±0.14 | 0.59 ±0.11 | 0.09 | (-0.01 - 0.14) | 8.8 | (3-22.3) |
| Paráč | 23 | 4.40 ±1.41 | 4.39 ±1.32 | 1.42 ±0.72 | 0.64 ±0.15 | 0.61 ±0.12 | -0.03 | (-0.15 - 0.05) | 16.8 | (7.4-62.4) |

Odhad početnosti metódou viacnásobých odchyto v priestore

Podmienky:

Uzavretosť populácie = minimálna imigrácia aj emigrácia

Obdobie zberu rozdelené do ôsmich 7-dňových period

Viac záchyto rovnakého jedinca v jednej 7-dňovej perióde sa považuje iba za 1 udalosť,

Pre viacnásobné záchyty je ideálne zachytiť rovnakého jedinca v o všetkých štyroch periódach

| Dátum (DMR) | ID jedinca | ID intervalu |
|-------------|---------------|--------------|
| 3/8/2023 | 3,4 | |
| 3/9/2023 | | |
| 3/10/2023 | | 1 |
| 3/11/2023 | | |
| 3/12/2023 | 1,2 | |
| 3/13/2023 | | |
| 3/14/2023 | | |
| 3/15/2023 | | |
| 3/16/2023 | | |
| 3/17/2023 | 10 | |
| 3/18/2023 | 3,4,5,6,22 | 2 |
| 3/19/2023 | 2,3,6,7,8,9 | |
| 3/20/2023 | | |
| 3/21/2023 | 7,11,12,13,14 | |
| 4/26/2023 | | |
| 4/27/2023 | 5,3 | |
| 4/28/2023 | | |
| 4/29/2023 | 3,4,26,27 | 8 |
| 4/30/2023 | 3,5 | |
| 5/1/2023 | | |
| 5/2/2023 | | |

Uzavretosť populácie

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|
| _1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| _2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| _3 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| _4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| _5 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| _6 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| _7 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| _8 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| _9 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| _10 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| _11 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| _12 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| _26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| _27 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| _28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

Pomer pohlavia v populáciách

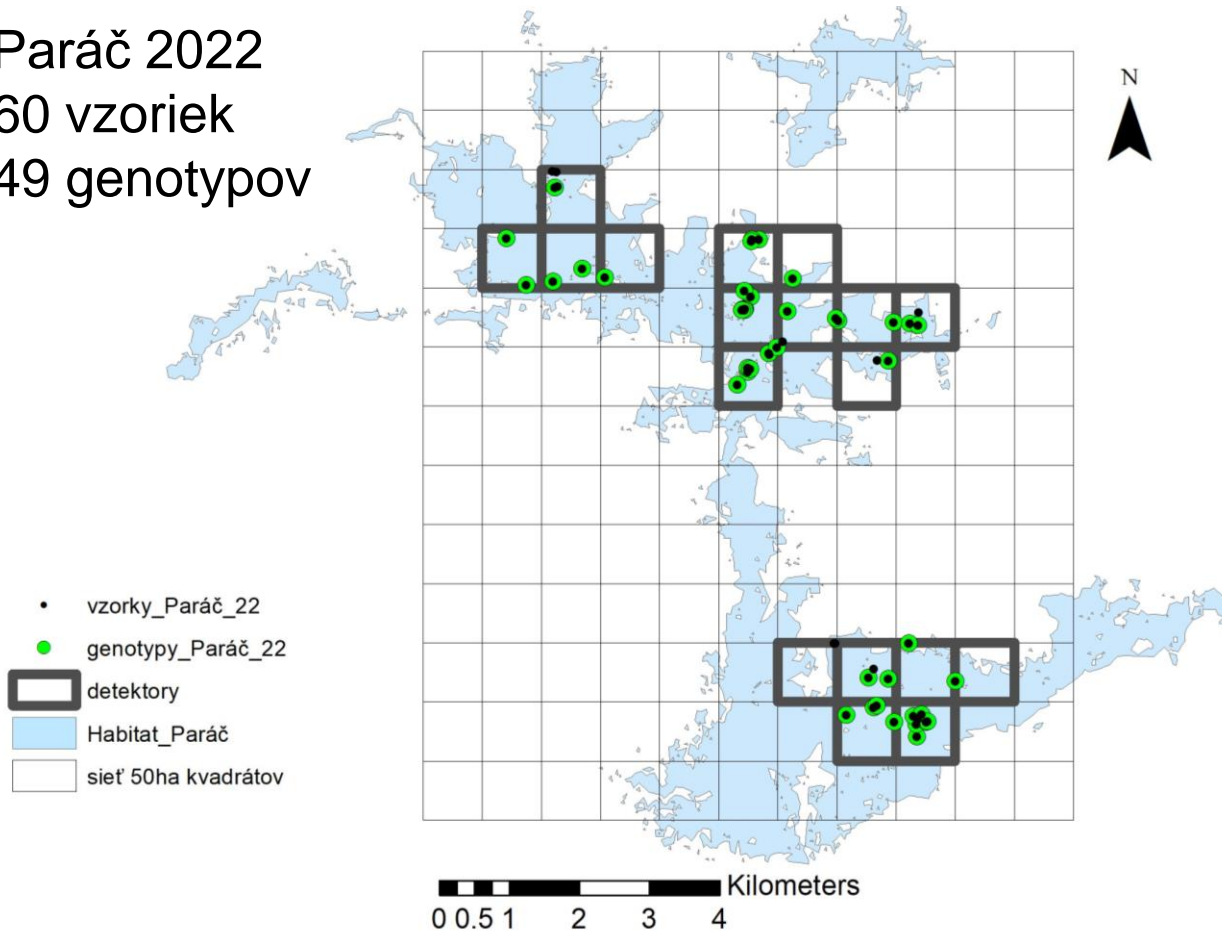
| Populácia | Sezóna | neidentifikované | Kohúty | Sliepky | Kohúty | Sliepky |
|------------|--------|------------------|--------|---------|--------|---------|
| Babia hora | 2022 | 2 | 3 | 2 | 1.00 | 0.67 |
| | 2023 | 0 | 4 | 5 | 1.00 | 1.25 |
| | spolu | 2 | 7 | 7 | 1.00 | 1.00 |
| Pilsko | 2022 | 1 | 9 | 4 | 1.00 | 0.44 |
| | 2023 | 0 | 15 | 9 | 1.00 | 0.60 |
| | spolu | 1 | 24 | 13 | 1.00 | 0.54 |
| Paráč | 2022 | 3 | 8 | 3 | 1.00 | 0.38 |
| | 2023 | 1 | 11 | 6 | 1.00 | 0.55 |
| | spolu | 4 | 19 | 9 | 1.00 | 0.47 |

Zhodné genotypy jedincov zachytených v roku 2022 a v roku 2023 v EFP

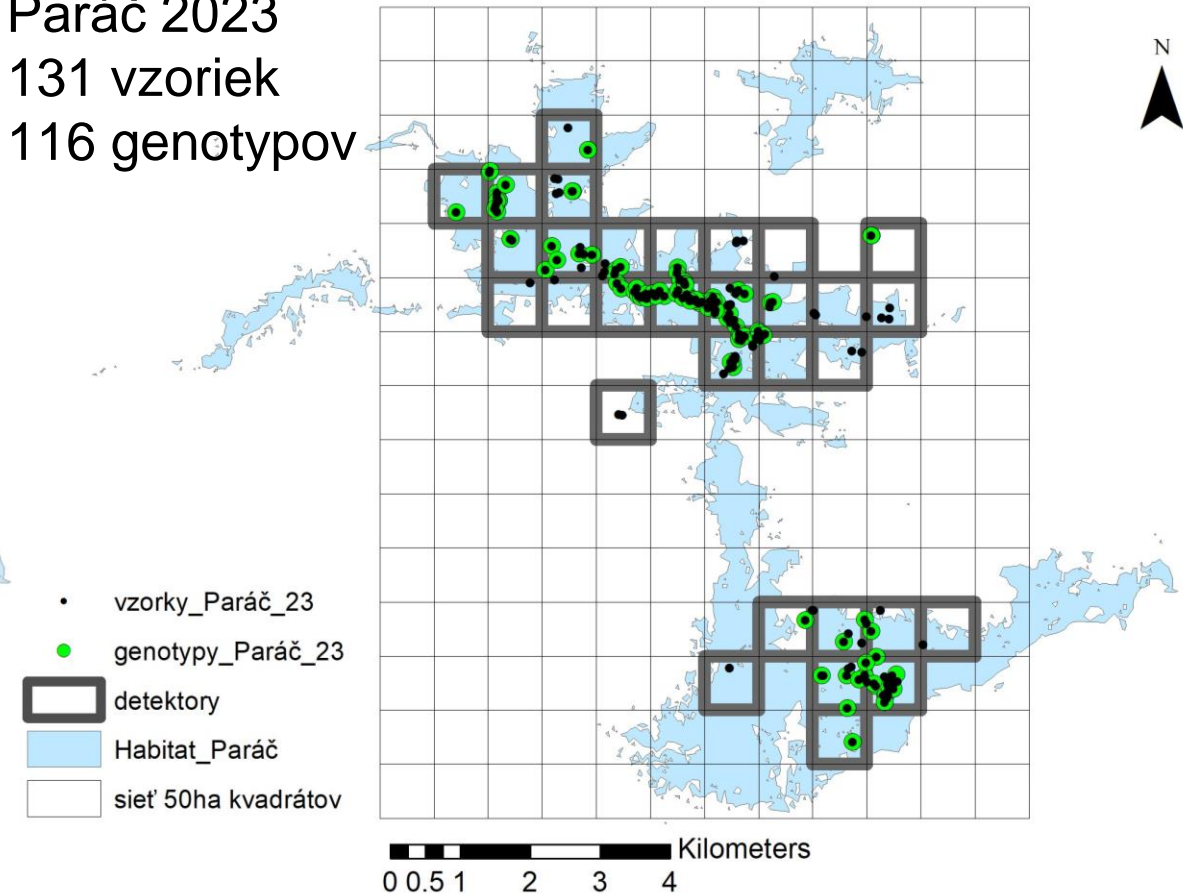
| Populácia | ID jedinca 2022 | ID jedinca 2023 | Skóre | Počet alel v genotype | Zhoda alel |
|-------------------------|-----------------|-----------------|---------|--------------------------|------------|
| Babia hora (3 z 7/9) | T4306_SSS | OB4953_2SSS | 100.00% | 18 | 18 |
| | T4312_MMM | OB5210_6 | 100.00% | 18 | 18 |
| | T4331SS | OB4620_3 | 100.00% | 18 | 18 |
| Pilsko (7 zo 17/24) | T4345D | OB4721_13 | 100.00% | 18 | 18 |
| | T4346QQQ | OB4621_4 | 100.00% | 18 | 18 |
| | T4352VV | OB4631_8 | 100.00% | 18 | 18 |
| | T4423A | OB4994_15 | 100.00% | 18 | 18 |
| | T4433WWW | OB4722_14 | 100.00% | 18 | 18 |
| | T4438RRR | OB4668_11 | 100.00% | 18 | 18 |
| | T4356TTT | OB4569_2 | 100.00% | 18 | 18 |
| Paráč (7 z 14/18) | T4163CCC | OB4560_1 | 100.00% | 18 | 18 |
| | T4413K | OB464_15 | 100.00% | 18 | 18 |
| | T4400GGG | OB4772_2 | 100.00% | 18 | 18 |
| | T4401HH | OB4566_18 | 100.00% | 18 | 18 |
| | T4407KKK | OB4638_3 | 100.00% | 18 | 18 |
| | T4402_59 | OB4771_7 | 100.00% | 18 | 18 |
| | T4255_26 | OB5055_12 | 100.00% | 18 | 18 |

| | ROK | NS | Abun- dancia | SD | CI 95% | Denzita ind/km ² | SD | CI 95% | Výmera biotopu | Abundancia v EFP (CI95%) |
|-------|------|----|-----------------|-------|---------|--------------------------------|-------|-------------|-----------------------|-----------------------------|
| Paráč | 2022 | 14 | 18,64 | ±3,39 | (14-25) | 1,21 | ±0,22 | (0,91-1,62) | 21,82 km ² | 26,40 (19,86–38,35) |
| | 2023 | 17 | 18,37 | ±1,33 | (17-21) | 1,05 | ±0,08 | (0,97–1,20) | | 22,91 (19,86–26,18)* |

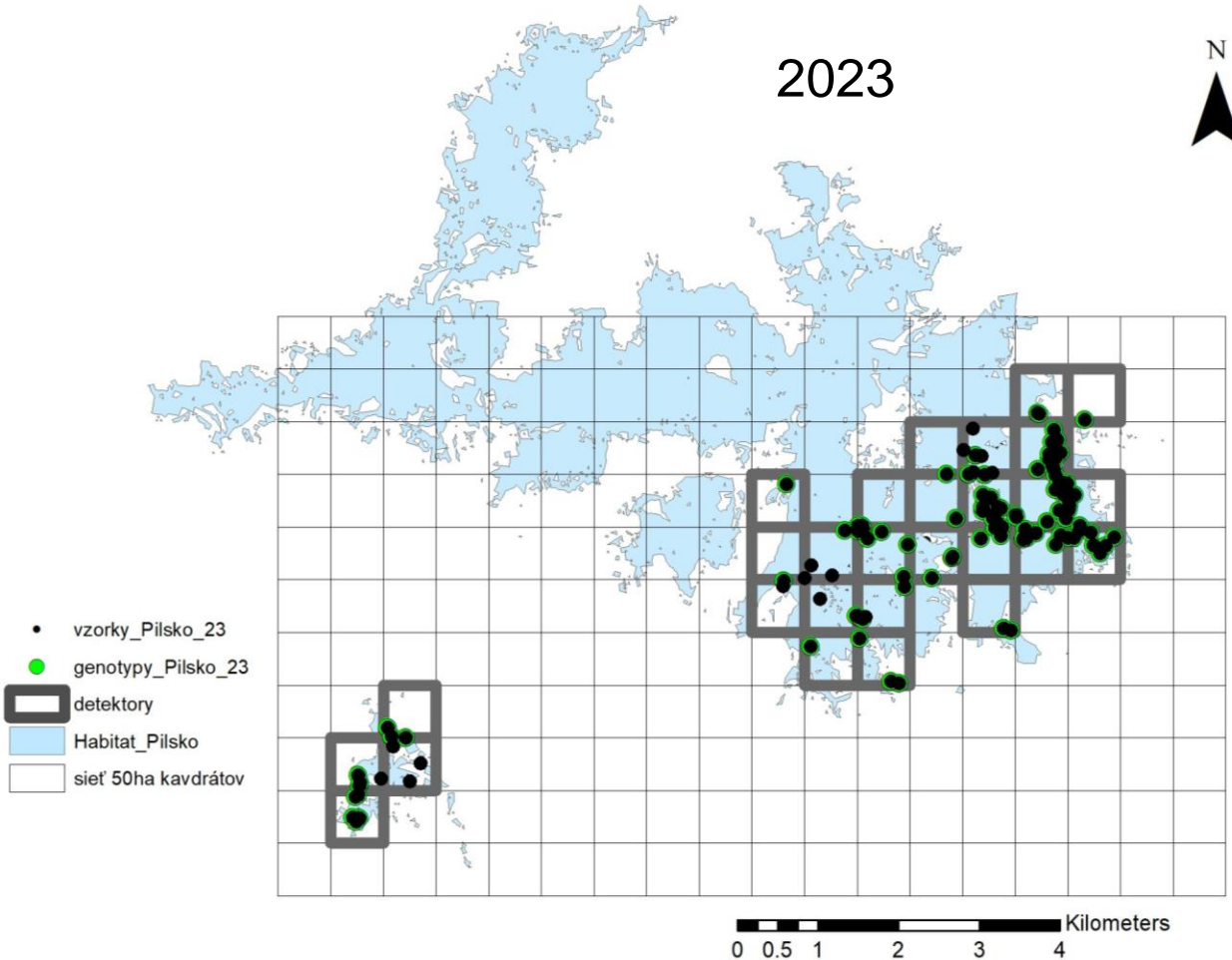
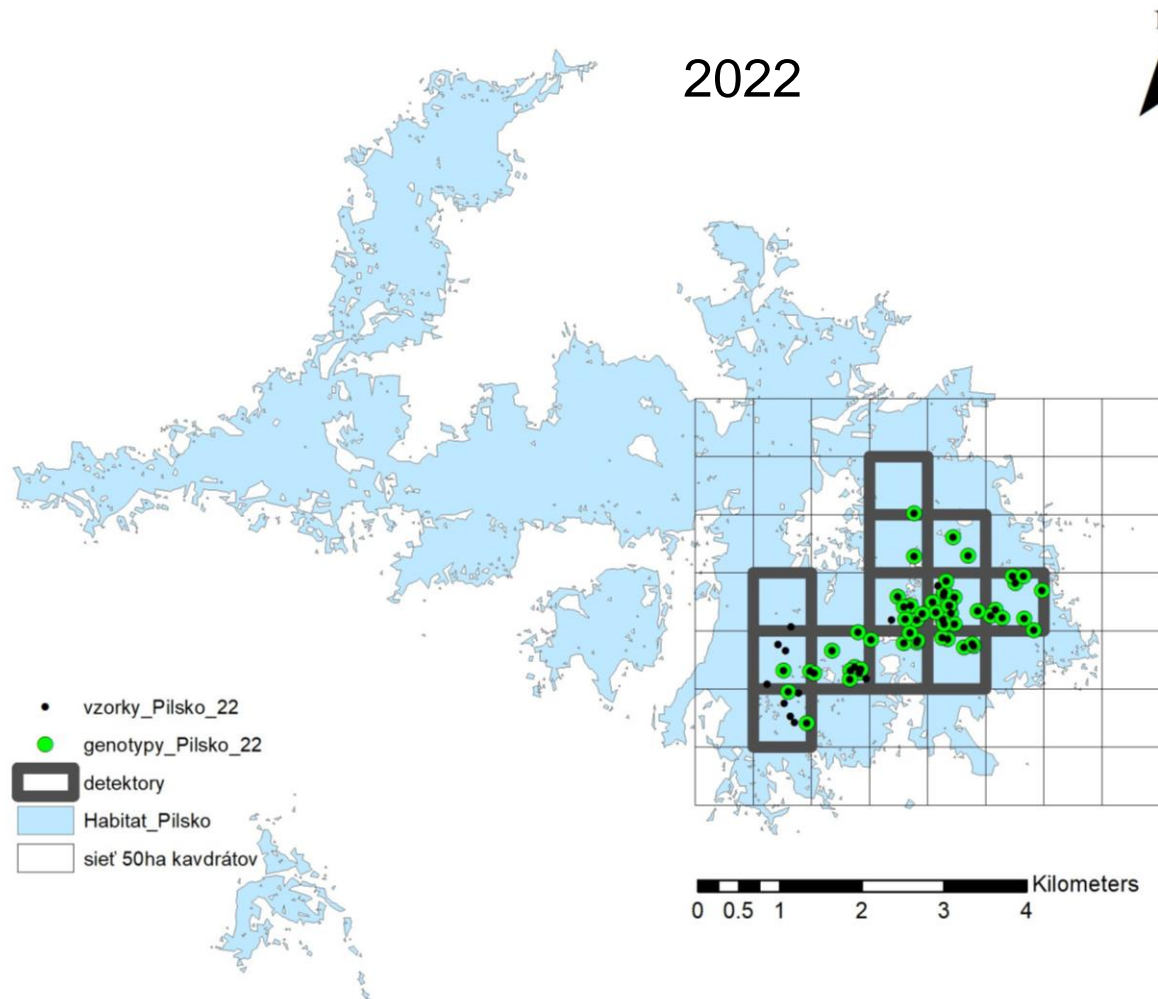
Paráč 2022
60 vzoriek
49 genotypov



Paráč 2023
131 vzoriek
116 genotypov

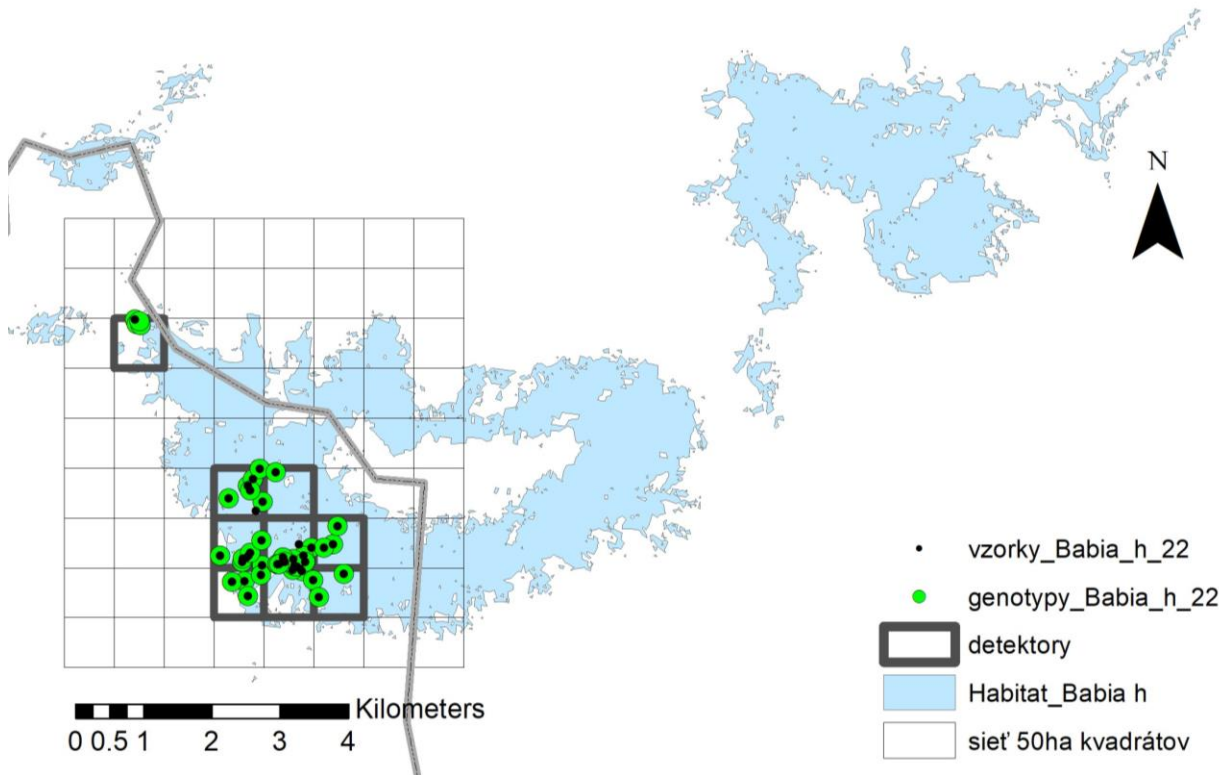


| Populácia | ROK | NS | Abundancia | SD | CI 95% | Denzita ind/km ² | SD | CI 95% | Výmera biotopu | Abundancia v EFP (CI95%) |
|-----------|------|----|------------|-------|---------|-----------------------------|-------|-------------|-----------------------|--------------------------|
| Pilsko | 2022 | 14 | 14,16 | ±1,30 | (13-17) | 1,24 | ±0,11 | (1,14-1,49) | 35,05 km ² | 43,46 (39,96–52,20) |
| | 2023 | 24 | 24,11 | ±1,14 | (23-26) | 1,54 | ±0,07 | (1,43–1,63) | | 63,09 (60,64–67,65)* |

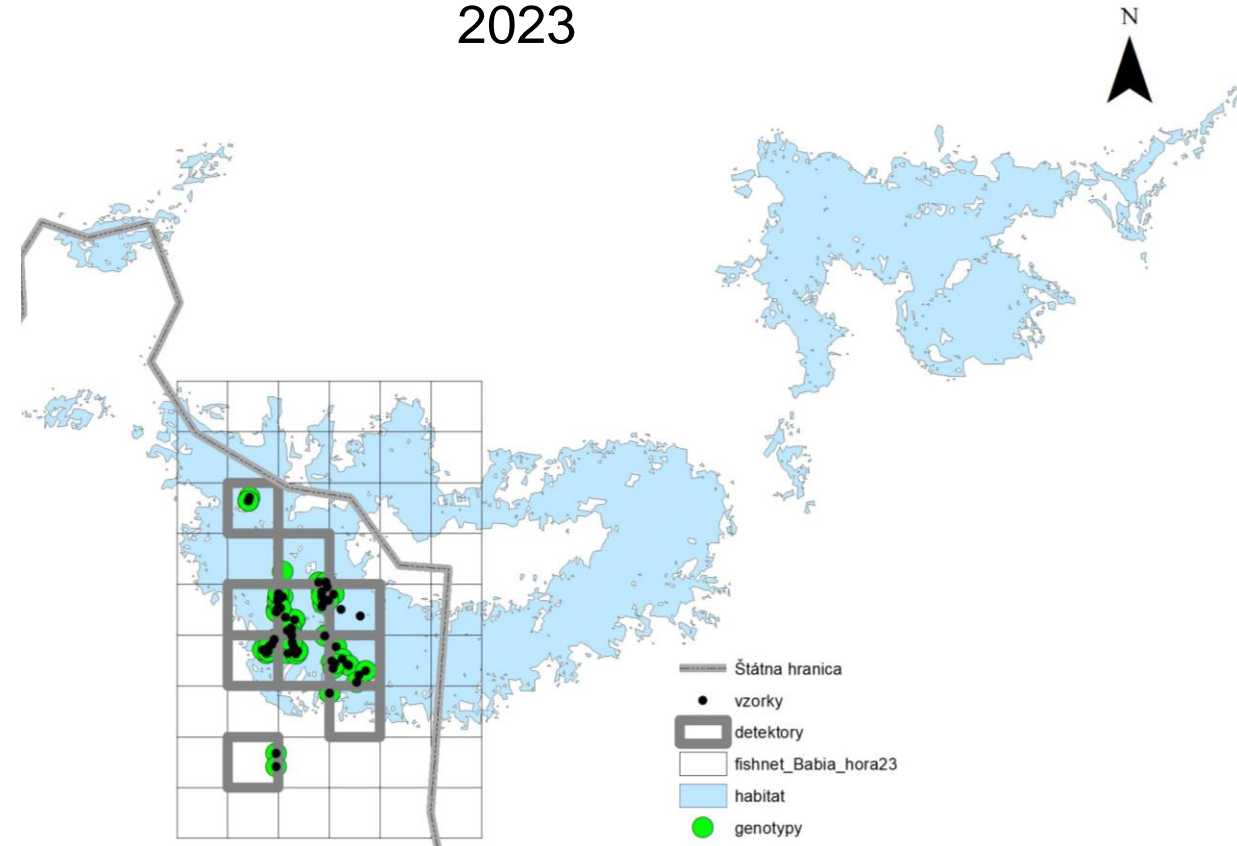


| | ROK | NS | Abun- | | | Denzita | | | Výmera biotopu | Abundancia v EFP (CI95%) |
|------------|------|----|--------|-------|---------|---------------------|-------|-------------|-----------------------|-----------------------------|
| | | | dancia | SD | CI 95% | ind/km ² | SD | CI 95% | | |
| Babia hora | 2022 | 9 | 11,05 | ±1,98 | (9-15) | 1,31 | ±0,24 | (1,07-1,78) | 28,96 km ² | 37,94 (30,98-51,55) |
| | 2023 | 9 | 11,96 | ±1,17 | (11-14) | 1,51 | ±0,14 | (1,39-1,79) | | 43,72 (40,25-51,83)* |

2022



2023



Odhad abundancie a denzity

| | ROK | NS | Abun- | | | Denzita | | | Výmera biotopu | Abundancia v EFP (CI95%) |
|------------|------|----|--------|-------|---------|---------------------|-------|-------------|-----------------------|-----------------------------|
| | | | dancia | SD | CI 95% | ind/km ² | SD | CI 95% | | |
| Babia hora | 2022 | 9 | 11,05 | ±1,98 | (9-15) | 1,31 | ±0,24 | (1,07-1,78) | 28,96 km ² | 37,94 (30,98-51,55) |
| | 2023 | 9 | 11,96 | ±1,17 | (11-14) | 1,51 | ±0,14 | (1,39-1,79) | | 43,72 (40,25-51,83)* |
| Pilsko | 2022 | 14 | 14,16 | ±1,30 | (13-17) | 1,24 | ±0,11 | (1,14-1,49) | 35,05 km ² | 43,46 (39,96–52,20) |
| | 2023 | 24 | 24,11 | ±1,14 | (23-26) | 1,54 | ±0,07 | (1,43–1,63) | | 63,09 (60,64–67,65)* |
| Paráč | 2022 | 14 | 18,64 | ±3,39 | (14-25) | 1,21 | ±0,22 | (0,91-1,62) | 21,82 km ² | 26,40 (19,86–38,35) |
| | 2023 | 17 | 18,37 | ±1,33 | (17-21) | 1,05 | ±0,08 | (0,97–1,20) | | 22,91 (19,86–26,18)* |

Odporúčania

- Zbierať čerstvé vzorky
- Nezbierať zbytočne veľké množstvo vzoriek na malej ploche, ale vo vzájomnej vzdialenosti aspoň 25m
- Zaznamenávať koordináty a prejdené trasy
- Včasné doručenie do laboratória
- Potreba nastavenia systematického monitoringu genetickej premenlivosti (10-15 jedincov za EFP ročne).

Spolupracovali



Peter Smolko, TUZVO
(štatistické analýzy)



Jakub Kubala, TUZVO
(modely početnosti SCR)



Diana Krajmerová, TUZVO
(fragmentačná analýza, genotypovanie)



Gabriela Arendášová, TUZVO
(extrakcia DNA)



Róbert Pazúr, SAV
(modelovanie biotopov)



Matúš Búci, SAV
(extrakcia DNA)



Ďakujem za pozornosť

Peter Klinga, Lesnícka Fakulta, TUZVO, peter.klinga@gmail.com,

0948 474 975, <https://kf.tuzvo.sk/sk/peter-klinga-homepage>