

Definovanie genetickej diverzity ŽGZ pomocou genomických nástrojov



Cieľ a obsah prednášky



- Cieľ

- vysvetliť pojem genetická diverzita a zdefinovať faktory, ktoré ju ovplyvňujú
- popísať najčastejšie využívané genomické nástroje pre hodnotenie diverzity
- charakterizovať význam jednotlivých ukazovateľov vo vzťahu k udržateľnému využívaniu ŽGZ

- Obsah

- definícia genetickej diverzity
- faktory ovplyvňujúce diverzitu ŽGZ
- nástroje pre analýzu variability genómu
- homozygotnosť genómu a genomický inbríding
- väzbová nerovnováha a efektívna veľkosť populácií ŽGZ
- genetická štruktúra populácií
- vplyv selekcie na štruktúru genómu

Definícia genetickej diverzity



Genetická diverzita:

- v prípade ŽGZ súvisí najmä s rozsahom **genetickej variability** v rámci a medzi plemenami, rodinami alebo druhmi => rozmanitosť genotypov v rámci populácií a druhov, pričom zahŕňa odlišné populácie jedného druhu alebo rozdielne jedince určitej populácie.

Genetická variabilita:

- je vyjadrená najmä genetickou informáciou zakódovanou v molekulách DNA (deoxyribonukleová kyselina), prítomných v jadre bunky vo forme chromozómov a predstavuje nevyhnutný predpoklad pre udržanie evolučných procesov v rámci druhov a umožňuje prispôbenie druhu meniacim sa podmienkam prostredia.

Definícia genetickej diverzity



- Genetickú diverzitu z pohľadu molekulárnej genetiky teda môžeme chápať aj ako výsledok **variability DNA** sekvencií a environmentálnych vplyvov, pričom každý jednotlivý druh má jedinečnú DNA sekvenciu.
- **DNA variabilita** je zabezpečená najmä prostredníctvom mutácií, vyplývajúcich napríklad zo substitúcie jednotlivých nukleotidov (jednonukleotidový polymorfizmus – SNP), inzercie a delécie DNA úsekov s rozdielnou dĺžkou alebo duplikácie DNA úsekov.

Faktory ovplyvňujúce diverzitu ŽGZ



Antropogénna činnosť a environmentálne faktory

- strata pôvodných biotopov (deštrukcia, degradácia a fragmentácia biotopov)
- nadmerné využívanie prírodných zdrojov
- klimatické zmeny
- introdukcia invázných druhov
- prírodné katastrofy

Faktory ovplyvňujúce diverzitu ŽGZ



Prírodná selekcia a šľachtenie

- účinok prírodnej selekcie je výsledkom adaptácie sa jedincov na dané podmienky prostredia a v prípade voľne žijúcich zvierat aj ich schopnosti prežiť a konkurovať iným druhom vyskytujúcim sa v rovnakom ekosystéme
- zámerná selekcia reflektuje zmeny v genóme zvierat, ktoré vznikli následkom ľudskej činnosti v procese šľachtenia hospodárskych a spoločenských zvierat

Faktory ovplyvňujúce diverzitu ŽGZ



Migrácia – tok génov

- obohatenie genofondu o nové alely alebo naopak strata alel:
imigrácia alebo **emigrácia**

Genetický posun (drift)

- náhodná zmena vo frekvenciách alel - alela s nízkou frekvenciou môže byť z populácie vytlačená, ale môže sa v nej aj fixovať
- niektoré alely môžu byť z genofondu vylúčené celkom náhodne iba v dôsledku nedostatočného množstva potomkov

Nástroje pre analýzu variability genómu

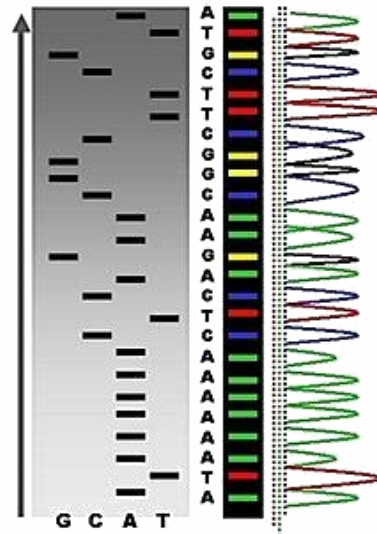


Genóm:

- haploidná chromozómová sada/kompletná sekvencia DNA

Analýza DNA:

- genetické markery
- celogenómové sekvenovanie
- genotypizačné čipy



Nástroje pre analýzu variability genómu



Genetický marker

- akýkoľvek charakteristický znak alebo prejav organizmu, ktorý môže byť použitý na určenie špecifického chromozómu, bunky alebo jedinca
- gény, krátke DNA úseky, heterochromatínové oblasti chromozómov, prípadne iné prejavy genotypu, chromozómov alebo karyotypu
- polymorfný znak (variant), ktorý vykazuje mendelistickú dedičnosť a je vo vzťahu s genetickou variabilitou znaku (vlastnosti), ktorá je zo šľachtiteľského hľadiska významná

Nástroje pre analýzu variability genómu



Perspektívne markery produkčných vlastností organizmov

- kandidátske gény - ich rôzne alely a genotypy ovplyvňujú kvantitatívne znaky
- QTL - lokusy pre kvantitatívne vlastnosti

Nástroje pre analýzu variability genómu



DNA markery

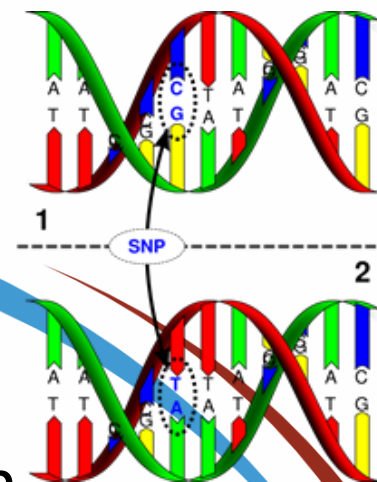
- priama schopnosť detekcie alel v sekvenciách nukleotidov
- ↑ polymorfizmus
- dominantná/kodominantná dedičnosť
- častý výskyt v genóme
- ľahké a rýchle testovanie
- vysoká reprodukovateľnosť

Nástroje pre analýzu variability genómu



SNP – jednonukleotidový polymorfizmus

- vzniká zámenou nukleotidu v DNA v určitom mieste (bodová mutácia)
- výskyt v genóme: 100-300 bp →
najčastejší typ polymorfizmov DNA
- vyskytuje sa v populácii s frekvenciou $> 1\%$
- bialelický marker
- informujú o variabilite génov v rodinách, líniách a populáciách



Nástroje pre analýzu variability genómu



Celogenómové sekvenovanie

- sekvenovanie DNA je stanovenie presného poradia jednotlivých nukleotidov v reťazci molekuly DNA, teda určenie primárnej štruktúry DNA
 - klasické metódy sekvenovania: Maxam-Gilbertová a Sangerová metóda sekvenovania
 - nové sekvenačné technológie – sekvenovanie novej generácie (NGS): Jedná sa o viacero platforiem (Illumina, Ion Torrent, 454 a ďalšie), ktoré sa líšia v technickom prístupe k sekvenovaniu, ale prinášajú porovnateľné výstupy

Nástroje pre analýzu variability genómu



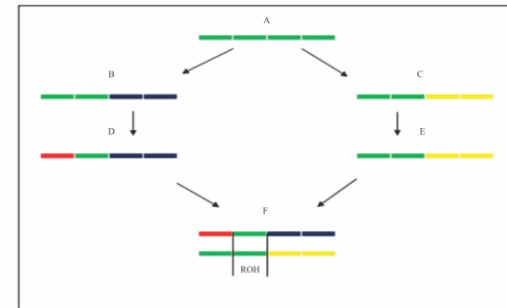
SNP čipy

- umožňujú analyzovať súčasne niekoľko tisíc SNP markerov rovnomerne distribuovaných v genóme
- dostupné pre väčšinu druhov hospodárskych a spoločenských zvierat (hovädzí dobytok, kone, ovce, kozy, ošípané, hydina, psy alebo mačky)
- v súčasnosti celosvetovo najpopulárnejší nástroj pre testovanie napr.:
 - analýza rodičovstva
 - stavu genomickej diverzity
 - predispozície jedincov a populácií
 - celogenómové asociačné štúdie
 - odhad genomických plemenných hodnôt
 -



Homozygotnosť genómu a genomický inbríding

- **autozygotnosť genómu** – všetky alely alebo chromozomálne úseky DNA, ktoré sú identické podľa pôvodu (IBD) → odvodené od spoločného predka
- **homozygotné úseky (ROH)** – genomické oblasti so špecifickým počtom za sebou idúcich homozygotných SNP markerov
- vplyv prírodnej a zámernej selekcie, rekombinácie, väzbovej nerovnováhy, mutácií....
- dĺžka ROH úsekov v genóme korešponduje so vzdialenosťou predkov v rodokmeni jedinca



Homozygotnosť genómu a genomický inbríding



Využitie skrínungu ROH úsekov:

odhad genomického inbrídingu na základe podielu homozygotných úsekov v autozomálnom genóme

testovanie vplyvu sekcie na genóm

identifikácia kauzálnych mutácií podieľajúcich sa na kontrole preferovaných znakov a vlastností



Homozygotnosť genómu a genomický inbríding



Odhad koeficienta inbrídingu (McQuillan et al., 2008):

$$F_{ROH} = \frac{\sum L_{ROH}}{L_{autosome}}$$

kde $\sum L_{ROH}$ vyjadruje celkovú dĺžku ROH úsekov v genóme jedinca obsahujúceho špecifický počet za sebou idúcich homozygotných SNP markerov a $L_{autosome}$ je dĺžka autozomálneho genómu odvodená na základe fyzickej pozície testovaných SNP markerov

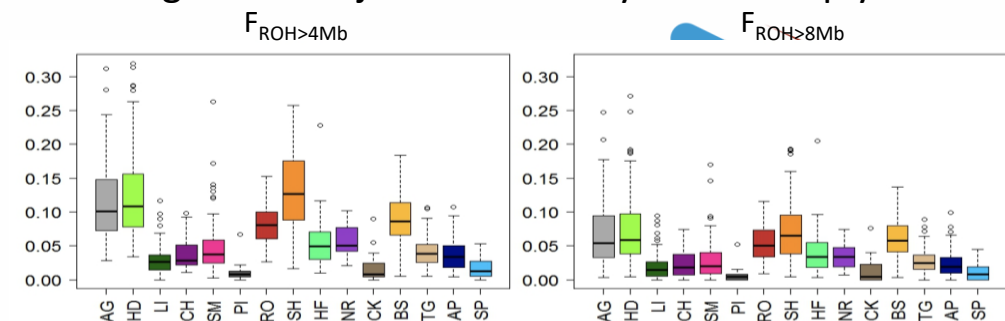
- F_{ROH} : od 0 po 1 (0 po 100%)
- v malých populáciách $\Delta F > 1\%$ (4% vo veľkých populáciách) môže viesť k signifikantnej strate diverzity a môže ovplyvniť ich dlhodobú prežiteľnosť

Najčastejšie využívané programy:

PLINK v1.9

detectRUNS (program R)

cgaTOH



Genomický inbríding odvodený od homozygotných úsekov na základe počtu generácií od spoločného predka ($F_{ROH>4Mb}$ – 12-13 generácií a $F_{ROH>8Mb}$ – 6-7 generácií) u 15 európskych plemien dobytky (Kukučková et al., 2017)

McQUILLAN, R. et al. 2008. Runs of homozygosity in European populations. In *Am J Hum Genet*, vol. 83, pp. 359-372.

KUKUČKOVÁ, Veronika - MORAVČIKOVÁ, Nina - FERENČAKOVIČ, Maja - SIMČIČ, Mojca - MÉSZÁROS, Gábor - SÖLKNER, Johann - TRAKOVICKÁ, Anna - KADLEČÍK, Ondrej - CURIK, Ino - KASARDA, Radovan. Genomic characterization of Pinzgau cattle: genetic conservation and breeding perspectives. In *Conservation Genetics*. ISSN 1566-0621, 2017, vol. 18, no. 4, s. 893-910.



Väzbová nerovnováha a efektívna veľkosť populácií ŽGZ



Väzbová nerovnováha (LD)

- nenáhodná asociácia alel v rôznych lokusoch v danej populácii
-
- vplyv rôznych faktorov: selekcia, rekombinácia, mutácie, genetický drift, systém pripravovania
- využitie LD: analýza evolučnej histórie populácií, vplyv dopadu selekcie na genóm, odhad efektívnej veľkosti populácií

Väzbová nerovnováha a efektívna veľkosť populácií ŽGZ



Väzbová nerovnováha (LD)

- najčastejšie sa vyjadruje pomocou Pearsonovho korelačného koeficienta súčinu momentov (Hill a Robertson, 1968):

$$r_{LD}^2 = \frac{(p_{AB} - p_A p_B)^2}{p_A(1 - p_A)p_B(1 - p_B)}$$

kde p_{AB} je rozdiel medzi frekvenciou gamét nesúcich alely A a B na dvoch lokusoch a p_A a p_B sú výsledné frekvencie týchto alel

- nadobúda hodnoty od 0 (väzbová rovnováha) po 1 (kompletná väzbová nerovnováha)

Väzbová nerovnováha a efektívna veľkosť populácií ŽGZ



Efektívna veľkosť populácie (N_e)

- vzťah medzi variabilitou LD a N_e sa najčastejšie používa na odhad historickej, ale aj súčasnej efektívnej veľkosti populácie $\rightarrow N_{eLD}$
- N_{eLD} reálnej populácie X s pozorovanou LD pre určitý úsek na genóme (dĺžkový interval v Mb alebo kb) je definovaná ako veľkosť hypotetickej ideálnej populácie, ktorá má v rovnovážnom stave rovnakú úroveň LD v danom úseku, aká je pozorovaná v skutočnej uzavretej populácii

Väzbová nerovnováha a efektívna veľkosť populácií ŽGZ



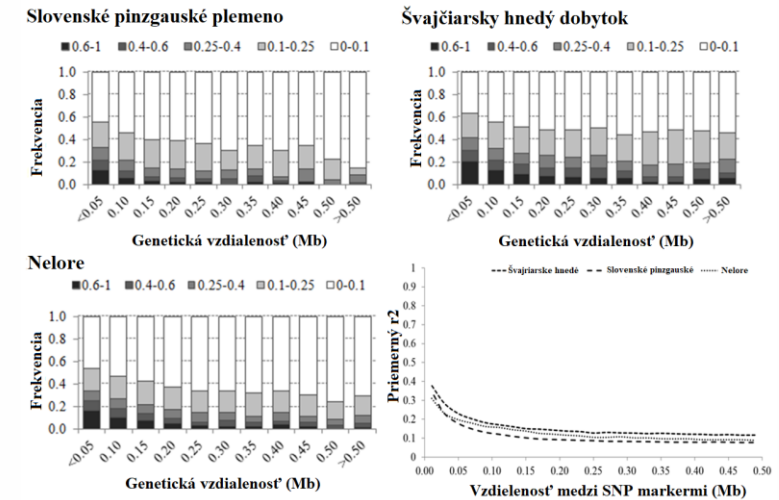
Efektívna veľkosť populácie (N_e)

- možno ju vypočítať nasledovne (Corbin et al., 2012):

$$N_{eLD} = \frac{1}{kc} \left[\frac{1}{r_{LD}^2 - \frac{1}{n_g}} - \alpha \right]$$

kde k vyjadruje model dedivosti ($k = 4$ v prípade autozomálnych lokusov), c je fyzická vzdialenosť medzi SNP markermi v Morganoch, n_g je veľkosť vzorky gamét (dvojnásobok počtu testovaných jedincov) a α je faktor zohľadňujúci pôsobenie mutácií

- historická N_{eLD} : funkcia času a fyzickej vzdialenosti medzi dvoma markermi za predpokladu konštantného lineárneho rastu N_{eLD} s časom vyjadreným minulými generáciami
- môže nadobúdať hodnoty od 0 po n
- najčastejšie využívané programy: LDNE, SneP, GONE



Porovnanie podielu markerov v rámci piatich kategórií r_{LD}^2 a historická efektívna veľkosť populácie (Kasarda et al., 2016)

CORBIN, L.J. et al. 2012. Estimation of historical effective population size using linkage disequilibrium with marker data. In *J Anim Breed Genet*, vol. 129, pp. 257-270.

KASARDA, Radovan - MORAVČIKOVÁ, Nina - MESZÁROŠ, G. - TRAKOVICKÁ, Anna - KADLEČÍK, Ondrej. Genetic divergence of cattle populations based on genomic information. In *Scientia agriculturae bohemica*. ISSN 1211-3174, 2016, vol. 47, no. 3, s. 113-117.



Genetická štruktúra populácií



- rôznorodosť populácií na vnútro aj medzipopulačnej úrovni
- genetická vzdialenosť - stupeň génovej rozdielnosti (genomickej rozdielnosti napr. vo frekvenciách alel) medzi druhmi alebo populáciami, ktorú je možné kvantifikovať na základe rôznych štatistických prístupov
- Najčastejšie využívané parametre:
 - Neiove genetické vzdialenosť a Wrightov F_{ST} index
 - analýza hlavných komponentov
 - Bayesianská analýza stupňa genetického premiešania/toku génov medzi populáciami

Genetická štruktúra populácií



Neiove genetické vzdialenosti

- predpokladá, že ak sú dve populácie vykazujúce nízke genetické vzdialenosti podobné, tak s vysokou mierou spoľahlivosti majú spoločných predkov
- možno ju vypočítať (Nei, 1972):

$$D = -\ln I ; I = \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}}$$

kde I je normalizovaná zhoda génov (alebo genetická zhoda) medzi populáciou X a Y

- nadobúda hodnoty od 0 (populácie/jedinci sú geneticky identické) po 1 (populácie /jedinci sú geneticky rozdielne)
- na výpočet možno použiť program R (balíky StAMPP, Poppr a i.)

NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. In Am Nat, vol. 106, pp. 283-285.

Genetická štruktúra populácií



Wrightov F_{ST} index

- indikátor intenzity fragmentácie populácie vyjadrenej poklesom heterozygotnosti v subpopuláciách v dôsledku pôsobenia genetického driftu
- možno ho vypočítať pomocou vzorca (Weir a Cockerham, 1984):

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

kde H_T vyjadruje očakávanú heterozygotnosť metapopulácie a H_S je priemerná heterozygotnosť v subpopuláciách

- nadobúda hodnoty od 0 (populácie sú geneticky identické) po 1 (populácie sú geneticky rozdielne) $\rightarrow F_{ST} > 0,25$ populácie možno považovať za geneticky diferencované
- na výpočet možno použiť program R (balíky StAMPP, Poppr a i.)

WEIR, B.S. – COCKERHAM, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. In *Evolution*, vol. 38, pp. 1358-1370.



Genetická štruktúra populácií



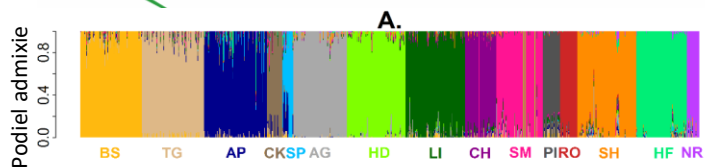
Analýza hlavných komponentov

- populárna viacrozmerná štatistická metóda, ktorá našla využitie v rôznych vedných odvetviach, vrátane populačnej genetiky
- znázornenie nadrozmerných dát, napr. genomických informácií o jedincoch alebo populáciách, v menšom počte dimenzií

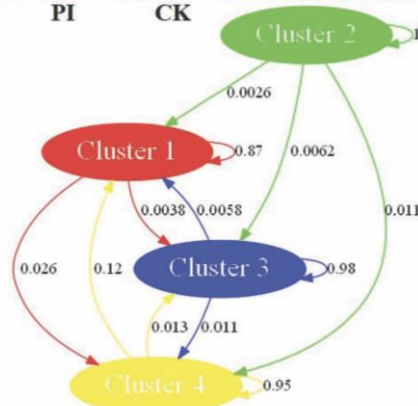
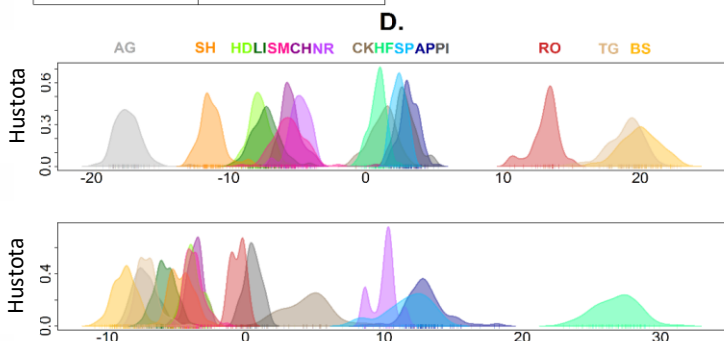
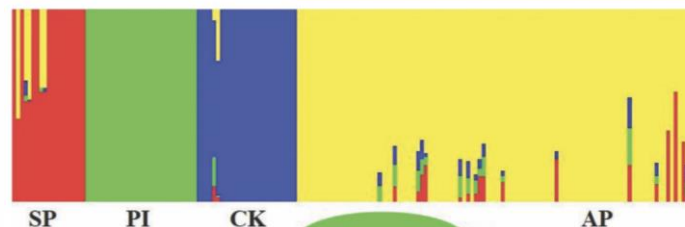
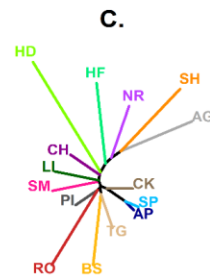
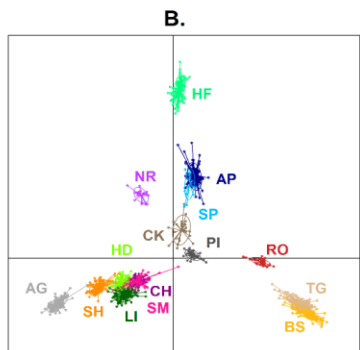
Bayesiánska analýza genetického premiešania – admixie

- admixia alebo premiešanie populácií je jav, ku ktorému môže dôjsť následkom introgresie a hybridizácie jedincov, populácií alebo druhov
- Bayesiánska štatistika - odvetvie modernej štatistiky, ktoré pracuje s podmienenou pravdepodobnosťou a umožňuje spresniť pravdepodobnosť východiskovej hypotézy v slede ako sa objavujú ďalšie relevantné skutočnosti

Genetická štruktúra populácií



Grafická vizualizácia populačnej štruktúry a genetických vzťahov medzi 15 európskymi plemenami hovädzieho dobytku (angus-AG, rakúsky pinzgauský-AP, brown swiss-BS, cika-CK, hereford-HD, holštajnský-HF, charolais-CH, limousine-LI, norwegian red-NR, piedmontese-PI, romagnola-RO, shorthorn-SH, slovenské pinzgauské-SP, simentálske-SM, tyrol grey-TG) (Kukučková et al., 2017)



Analýza admixie a toku génov medzi 4 plemenami (SP: slovenské pinzgauské Cluster 1, PI: piedmontese Cluster 2, CK: cika Cluster 3, AP: rakúske pinzgauské Cluster 4) (Kukučková et al., 2018)

KUKUČKOVÁ, Veronika - MORAVČIKOVÁ, Nina - FERENČAKOVIČ, Maja - SIMČIČ, Mojca - MÉSZÁROS, Gábor - SÖLKNER, Johann - TRAKOVICKÁ, Anna - KADLEČÍK, Ondrej - CURIK, Ino - KASARDA, Radovan. Genomic characterization of Pinzgau cattle: genetic conservation and breeding perspectives. In *Conservation Genetics*. ISSN 1566-0621, 2017, vol. 18, no. 4, s. 893-910.

KUKUČKOVÁ, Veronika - MORAVČIKOVÁ, Nina - CURIK, Ino - SIMČIČ, Mojca - MÉSZÁROS, Gábor - KASARDA, Radovan. Genetic diversity of local cattle. In *Acta Biochimica Polonica*. ISSN 0001-527X, 2018, vol. 65, iss. 3, s. 421-424.



Vplyv selekcie na štruktúru genómu



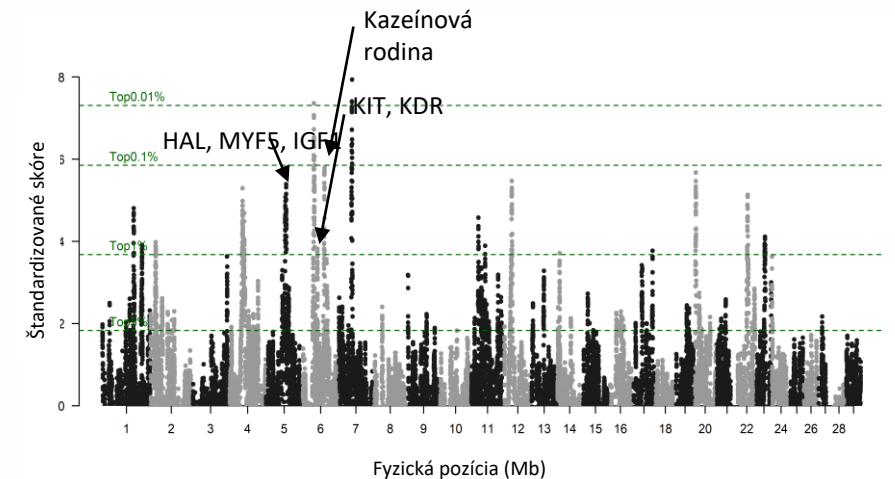
- kvantifikácia aj bez prístupu k fenotypovým informáciám
- identifikácia tzv. selekčných signálov
- závisí od intenzity selekcie, dĺžky jej pôsobenia na genóm, rekombinačnej rýchlosti...
- dva základné prístupy:
 - medzipopulačné/medziplenné rozdiely
 - vnútrapopulačné rozdiely

Vplyv selekcie na štruktúru genómu



Medzipopulačné/medziplémenné rozdiely

- celogenómový skríning Wrightovho F_{ST} indexu
- analýza variability vo väzbovej nerovnováhe
- analýza hlavných komponentov
- integrované skóre haplotypov
- na výpočet možno použiť programy: PLINK v1.9, varLD, pcadapt, rehh...



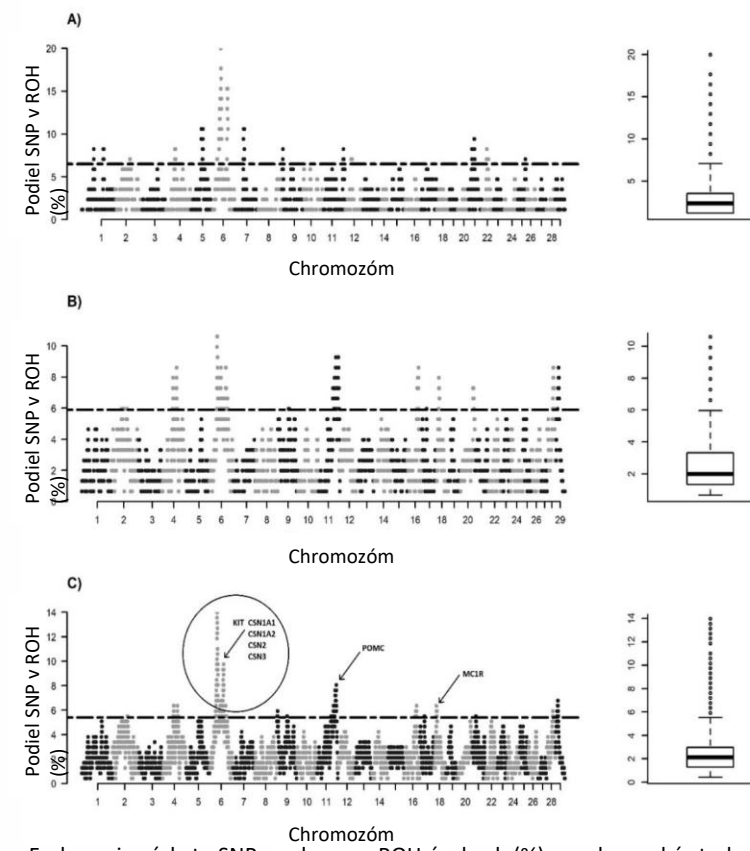
Rozdiely vo väzbovej nerovnováhe v genome slovenského pinzgauského a slovenského strakatého plemena (Moravčíková et al., 2019)

Vplyv selekcie na štruktúru genómu



Vnútropopulačné rozdiely

- distribúcia homozygotných úsekov v genóme
- úroveň väzbovej nerovnováhy
- integrované skóre haplotypov
- na výpočet možno použiť programy: PLINK v1.9, detectRUNS, rehh...



Frekvencia výskytu SNP markerov v ROH úsekoch (%) pre slovenské strakaté (A) a slovenské pinzgauské plemeno (B) a výskyt SNP markerov v ROH v rámci genómu oboch plemien (C) (Kasarda et al., 2018)

KASARDA, Radovan - MORAVČÍKOVÁ, Nina - KADLEČÍK, Ondrej - TRAKOVICKÁ, Anna - CANDRÁK, Juraj. The impact of artificial selection on runs of homozygosity in Slovak Spotted and Pinzgau cattle. In *Slovak journal of animal science*. ISSN 1337-9984, 2018, vol. 51, no. 3, s. 91-103.

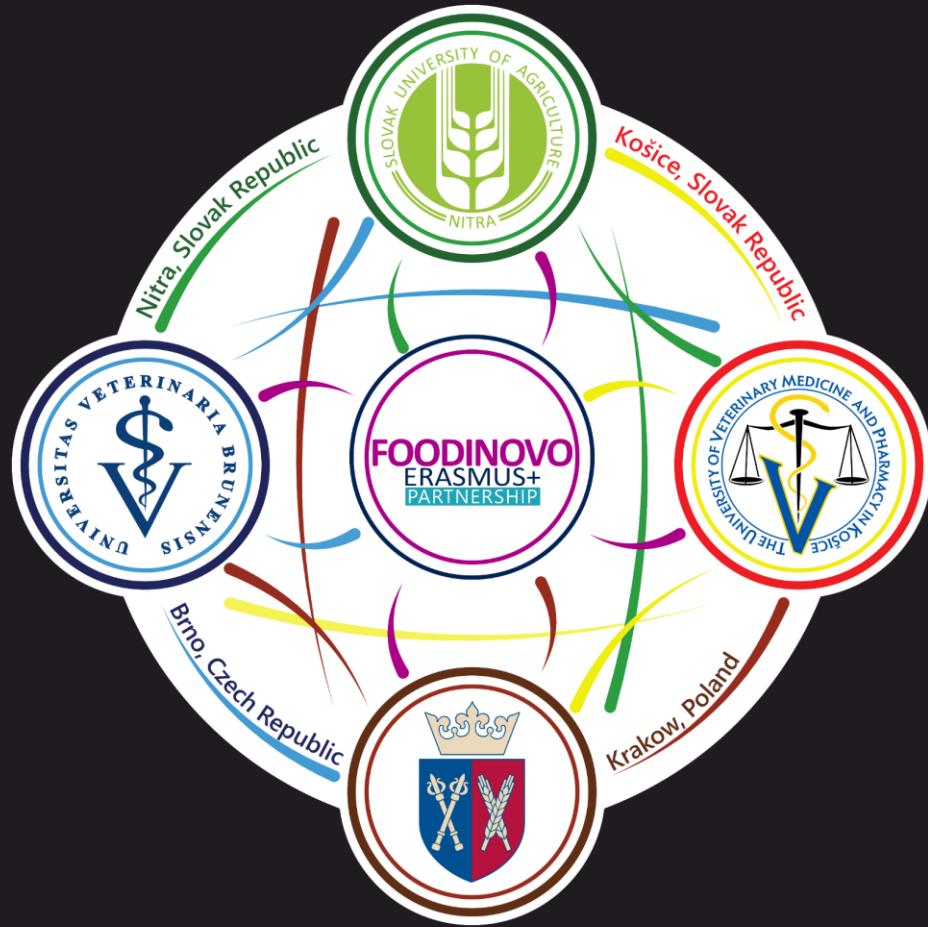




Ďakujem za pozornosť!

Doc. Ing. Nina Moravčíková, PhD.
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
Ústav výživy a genomiky
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra
Slovensko
nina.moravcikova@uniag.sk





Funded by the European Union. Views and opinions expressed are however those of the author(s) only and do not necessarily reflect those of the European Union or the European Education and Culture Executive Agency (EACEA). Neither the European Union nor EACEA can be held responsible for them.

Financované Európskou úniou. Vyjadrené názory a postoje sú názormi a vyhláseniami autora(-ov) a nemusia nevyhnutne odrážať názory a stanoviská Európskej únie alebo Európskej výkonnej agentúry pre vzdelávanie a kultúru (EACEA). Európska únia ani EACEA za ne nepreberajú žiadnu zodpovednosť.

FOODINOVO | 2020-1-SK01-KA203-078333

Spolufinancované z programu Európskej únie Erasmus+



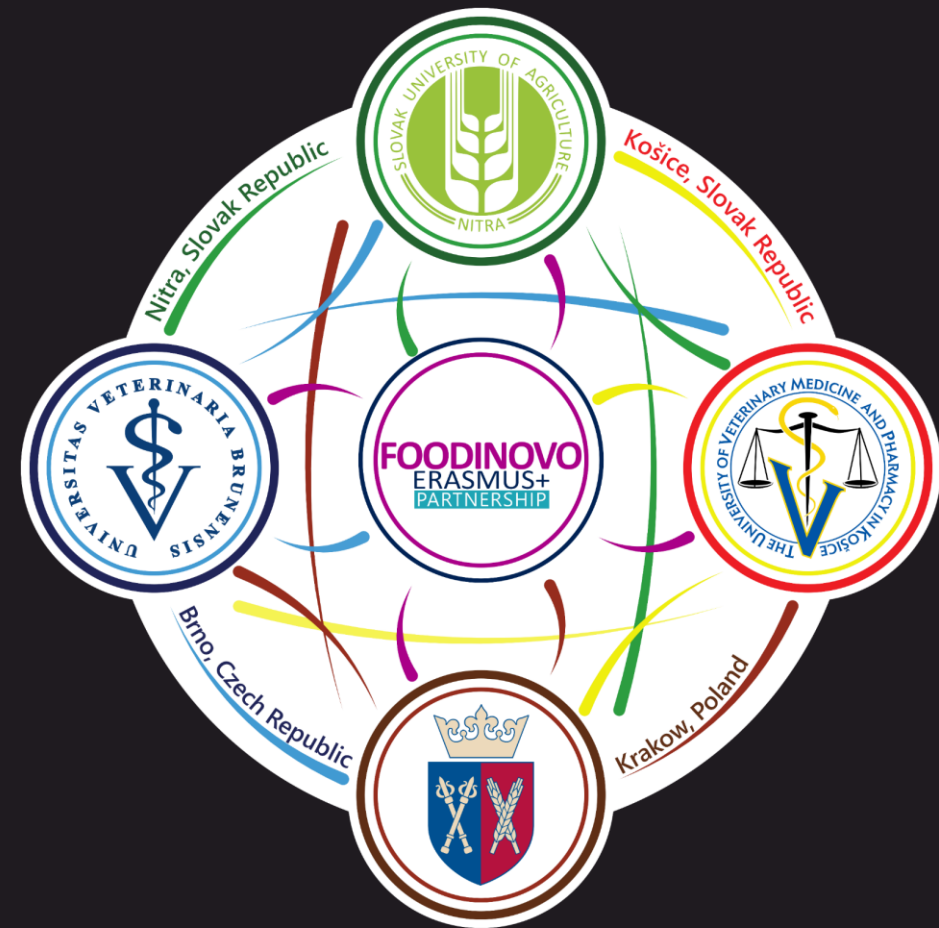
Co-funded by the Erasmus+ Programme of the European Union



This work was co-funded by the Erasmus+ Programme of the European Union
Innovation of the structure and content of study programs profiling food study fields with a view to digitizing teaching

Táto publikácia bola spolufinancovaná programom Európskej Únie Erasmus+
Inovácia štruktúry a obsahového zamerania študijných programov profilujúcich potravinárske študijné odbory s ohľadom na digitalizáciu výučby

FOODINOVO | 2020-1-SK01-KA203-078333



Spolufinancované z programu Európskej únie Erasmus+



Co-funded by the Erasmus+ Programme of the European Union

