



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Jämförelse av metoder att mäta genetisk variation hos djurparksdjur

Linnea Rudbäck





Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för husdjursgenetik

Jämförelse av metoder att mäta genetisk variation hos djurparksdjur

Comparison of methods to measure genetic variation in zoo- animals

Linnea Rudbäck

Handledare:

Anna Johansson, SLU, Institutionen för husdjursgenetik

Examinator:

Stefan Marklund, SLU, Institutionen för husdjursgenetik

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Kandidatarbete i husdjursvetenskap

Kurskod: EX0553

Program: Agronomprogrammet - Husdjur

Nivå: Grund C (G2E)

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2010

Omslagsbild: Freepotos.com

Serienamn, delnr: Examensarbete 321

Institutionen för husdjursgenetik, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Abstract

Conservation biology is a very important area when the extinction of animals and plants is a widespread problem throughout the world. Part of the conservation work is done by breeding programs at zoos where two areas are most important for maintaining a healthy and viable population; to avoid inbreeding and maintain as much genetic variation as possible. There are several genetic methods that can be used to measure genetic variation and thereby allow the preservation of it. This study compares and discusses the differences between DNA fingerprinting, RAPD, microsatellites, mtDNA and SNPs. What information they can provide, how expensive they are, how long it takes to obtain results and problems and limitations of each approach. RAPD is a relatively inexpensive and less time-consuming method that doesn't require any previous information about the genome, however it gives a rather limited information. mtDNA is very useful to clear up taxonomic uncertainties but will only provide maternal information and can not be used for paternity determination. DNA fingerprinting requires invasive sampling and provides limited information which makes it less suitable. Microsatellites and SNPs show higher levels of genetic variation than the other methods and therefore provides more valuable information for the conservation biology but they are also more expensive and more time-consuming. SNPs provide the same statistically significant results as microsatellites, but gives higher quality information. That indicates that SNP- markers may be the most useful markers in the future when the technology has been further developed and the method more cost- efficient.

Sammanfattning

Bevarandebiologin är idag ett mycket viktigt område när utrotningen av djur och växter är ett omfattande problem i hela världen. En del av bevarandearbetet sker genom avelsprogram på djurparker där två områden är viktiga för att hålla en frisk och livskraftig population; att undvika inavel och behålla en så stor genetisk variation som möjligt. Det finns flera genetiska metoder som kan användas för att mäta genetisk variation och på så vis ge möjlighet att bevara den. Denna studie jämför och diskuterar skillnader mellan DNA- fingerprinting, RAPD, mikrosatelliter, mtDNA och SNP genom att se vilken information de kan ge, hur dyra de är, hur lång tid det tar att få fram resultat samt problem och begränsningar med de olika metoderna. RAPD är en relativt billig och mindre tidskrävande metod som inte kräver någon tidigare information om genomet men ger en ganska begränsad information. mtDNA är mycket användbart för att klara upp taxonomiska oklarheter men ger endast information om modernet och kan inte användas för faderskapsbestämning. DNA- fingerprinting kräver ett invasivt ingrepp och ger begränsad information vilket gör den mindre lämplig. Mikrosatelliter och SNP visar en överlägset högre nivå av genetisk variation än de andra metoderna och ger därför mer värdefull information till bevarandebiologin men är även något dyrare. SNP kan ge lika statistiskt säkra resultat som mikrosatelliter men ger högre kvalitet på informationen. Det indikerar att SNP- markörer kan komma att bli de mest användbara markörerna i framtiden när tekniken utvecklats ytterligare och gjort metoden mer kostnadseffektiv.

Introduktion

Djur utrotas idag i en hastighet som uppskattas vara 1000- 10000 gånger snabbare än vad som anses naturligt. En viss utrotning sker naturligt genom evolution men i dagsläget försvinner arter mycket snabbare än mängden nya arter som uppkommer. Av 45 000 utvärderade arter klassades 37% som hotade (IUCN, 2010) och det största hotet utgörs av människan (Ehrlich and Ehrlich, 1981; IUCN, 2010; Frankham et al., 2008). Detta sker bland annat genom skövling av skog och undanträngning av djur från deras naturliga levnadsplatser för att ge plats åt städer eller odling. Även miljöpåverkan, överutnyttjandet av naturens resurser och jakt bidrar till utrotningen (Vitousek et al., 1997; Tilman, 2000).

För att bevara de utrotningshotade arterna har flera åtgärder vidtagits. Ett första steg i bevarandearbetet är att klassa en art som utrotningshotad. De flesta länder har en lista över

utrotningshotade arter som ger lagligt skydd för djuret och är§ grunden i arbetet för att kunna skydda dem (Frankham et al., 2008). Djur listas som hotade i USA (US Endangered species act) när det finns i medel 1000 individer kvar och sätts då i ett bevarandeprogram (Wilcove et al., 1993). Mycket av bevarandearbetet sker genom skydd av djurens naturliga habitat i form av naturreservat, fridlysning och skydd av arten. Under det senaste decenniet har en stor vikt lagts på bevarandegenetik bland de hotade arterna och i populationer som lever i fångenskap på bland annat djurparker. Särskilt viktigt blir det i de arter som bara finns kvar i fångenskap och inte finns i det vilda eftersom det blir extra viktigt att hålla de populationerna livskraftiga. Ekonomi, ekologi och politik spelar en stor roll i bevarandearbetet men för en långsiktig bevaring är genetisk variation viktigt så att arten har möjlighet till framtida anpassning och etablering i det vilda (Hedrick, 2001). Genetisk variation innebär att individer inom en art har olika arvs massa eftersom alla ärver olika alleler från sina föräldrar. Det skiljer dock väldigt lite mellan enkla haploida kromosomuppsättningar inom samma art men det finns en viss variation. Det finns även en viss variation inom individen mellan de haploida kromosomuppsättningarna som nedärvt från föräldrarna. Genetisk variation är en förutsättning för att naturligt urval, anpassning och evolution ska äga rum (Whitlock, 2000).

På djurparker hålls ofta djuren i små populationer vilket kan leda till en minskad genetisk variation och problem med inavel. Inavel kan bland annat orsaka sämre fertilitet, sterilitet och dödfödslar (Sedgwick, 1981). Det är därför väldigt viktigt att arbeta för att behålla så stor genetisk variation som möjligt och att hålla den genetiska sammansättningen i en djurparkspopulation så lik den vilda populationen som möjligt. Särskilt om man planerar att återföra djuren till det vilda (Lacy, 2000). Det finns numera flera olika metoder att mäta genetisk mångfald som är mycket användbara i både bevarandearbetet och forskningen (Hedrick, 1999). Det är vanligt att använda sig av molekylära markörer för att se hur djuren i en population är besläktade om de inte har stamtavlor. Detta görs för att kunna undvika inavel och sätta upp avelsprogram (Ivy et al., 2009). Några vanliga metoder att mäta genetisk variation är SNP, mikrosatelliter, DNA fingerprinting, mtDNA och RAPD.

Syftet med denna litteraturstudie är att undersöka och jämföra dessa metoder och se vilken som passar bäst för djurparkernas syfte och arbete. Detta genom att titta på hur praktiskt genomförbara metoderna är, hur dyra de är, hur lång tid det tar att få resultat, vilken typ av information man får samt vilka begränsningar det finns med respektive metod.

Genetisk variation

Den genetiska variationen i arvs massan uppstår genom mutationer som ger nya varianter av gener. De kan både tas till uttryck och synas som fenotypiska skillnader mellan individer, eller ligga dolda i form av recessiva alleler. De recessiva allelerna fungerar som en variationsreserv och kan komma till uttryck när anpassning till nya förhållanden krävs, vilket kan vara avgörande för artens fortsatta existens. Små populationer med liten genetisk variation har mindre chans att kunna anpassa sig än en stor population med stor genetisk variation (Whitlock, 2000; Frankham et al., 2008). I en grupp med stor genetisk variation är då även chansen att klara sig från ett sjukdomsangrepp större då det är större chans att någon individ är resistent mot sjukdommen eller klarar sig bättre och kan överleva (Simm, 2000; Frankham et al., 2008).

Naturligt urval i en population innebär att djur med bra gener som är bäst anpassade till en viss miljö klarar sig bättre och på så vis får större chans att para sig och föra sina gener vidare, medan djur med sämre arvs massa sällas bort. På så vis kan en art utvecklas och anpassa sig i en föränderlig miljö. På en djurpark sker inte naturligt urval på samma vis då djuren lever skyddade och blir utfodrade. Individer som inte skulle klara sig i det vilda kan fortplanta sig och sprida sina gener vidare. Det kan istället vara de individer som är minst stresståliga och

modiga som parar sig och på så vis långsamt ändrar populationen och anpassar den till fångenskap. Det kan så småningom göra att djuren kan ha svårt att klara sig i det fria (Lacy, 2000; Simm, 2000; Frankham et al., 2008). I små populationer, som det ofta är på en djurpark, kan den genetiska variationen ganska lätt minska. Detta genom att vissa alleler ökar i frekvens, andra minskar och vissa ovanligare alleler inte ärvs vidare alls, på ett slumpmässigt sätt, utan går förlorade. Alleler kan tillslut fixeras i en population så att alla individer har samma allel vilket innebär att det inte längre finns någon variation i det locus (Whitlock, 2000). Eftersom detta inte sker genom naturligt urval utan helt slumpmässigt är det helt oberoende av funktion för djuret och innebär en förlust i variation. Den genetiska uppsättningen förändras och två populationer som tidigare haft mycket lika arvs massa kan utvecklas åt två olika håll. Detta kallas genetisk drift och är en allvarlig konsekvens av små populationsstorlekar (Lande & Barrowclough, 1987).

En viktig form av genetisk variation är den som har med reproduktiv fitness att göra. Reproductiv fitness innefattar egenskaper som har med reproduktion att göra så som första kull, kullstorlek, livslängd och antal kullar. Alla dessa är kvantitativa egenskaper som både beror på gener och miljö. Den genetiska variationen i de kvantitativa egenskaperna är den viktigaste att bevara i bevarandebiologin men är även svår och tidskrävande att mäta (Frankham et al., 2008). Det finns flera olika sätt att mäta genetisk variation och nedan följer en beskrivning av de som tas upp i denna uppsats. En sammanfattning av egenskaper hos de olika metoderna finns i tabell 1.

Metoder att mäta genetisk variation

DNA fingerprinting

DNA fingerprinting består av långa repeterande tandemsekvenser i genomet som kan jämföras mellan olika individer då de har stor variation i längd. Längdvariationen sker genom mutationer som lägger till eller tar bort repetitionsenheter till sekvensen och ger varje individ sitt eget DNA fingerprint. Dessa sekvenser kallas minisatelliter och är mellan 10 till 100 baser långa. Många minisatellitloci är väldigt variabla och vissa har en heterozygoti på 90 % (är heterozygota i 90% av de inblandade loci) samt har en hög mutationshastighet (Bruford & Altmann, 1993). Fördelar med DNA fingerprinting är att den inte kräver någon tidigare kunskap om DNA-sekvensen som blir typad. Den kräver dock mycket DNA vilket gör att det krävs ett invasivt ingrepp på djuret (man måste göra ett ingrepp i kroppen). De nedärvs även dominant vilket är en nackdel. Det innebär att det inte är möjligt att avgöra om ett DNA segment kommer från en individ som är heterozygot eller homozygot för den dominant allelen. Vid dominant nedärvning ser man bara de dominant allelerna och inte de recessiva vilket ger mindre information (Frankham et al., 2008). DNA fingerprintning tekniken går relativt snabbt att ta fram och är måttligt dyr.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD är en slags PCR reaktion men som utförs lite annorlunda. I en vanlig PCR reaktion bestämmer forskaren vilken målsekvens som ska amplificeras och framställer sedan primers som fäster in vid dessa sekvenser. Sedan kan flera kopior av den önskade DNasekvensen framställas. Vid RAPD är målsekvensen okänd och forskaren eller en dator sätter ihop en godtycklig sekvens (10-20 baspar) som man sedan syntetiserar en primer efter. Sen körs en PCR reaktion och man ser om några DNA segment har amplifierats i närvaro av den godtyckliga primern (Primrose & Twyman, 2006). När man använder sig av RAPD krävs ingen tidigare information om genomet och metoden kräver inte så mycket DNA vilket gör att

det inte behövs något invasivt ingrepp. RAPD ger ett stort antal markörer som är lätta att upptäcka. De ger en ganska översiktlig information om genomet som kan användas till både identifiering av djur samt faderskapstest (Fowler et al., 1998). Det är en relativt billig metod som ger ganska snabba resultat men nedärvs dominant så man kan inte skilja heterozygota alleler från homozygota vilket ger begränsad information (Primrose & Twyman, 2006; Frankham et al., 2008).

Mikrosatelliter

Mikrosatelliter är precis som DNA fingerprints repeterande tandem sekvenser men är kortare och består bara av 1-5 baspar. De är jämnt utspridda i genomet och har ofta ett avstånd mellan varandra på mellan 5000- 50000 baspar (Morin et al., 2004). De är väldigt polymorfa på grund av det varierande antalet repeterande enheter (Buford & Wayne, 1993; Valdes et al., 1993). Mikrosatelliter har en hög mutationsfrekvens och stora populationsprov kan analyseras samtidigt genom PCR och gelelektrofores (Roy et al., 1994). Mikrosatelliter kan användas för att bestämma föräldraskap och annat släktskap hos både människa och djur. De är även mycket användbara för att kunna skilja mellan underarter och populationer inom underarter samt för att mäta genetisk variation inom populationer ((Buford & Wayne, 1993; Roy et al., 1994; Estoup et al., 1995). Detta tack vare mikrosatelliternas stora polymorfa variation och evolutionära hastighet. Det behövs inget invasivt ingrepp eftersom mikrosatellitloci är så små att de kan tas fram i PCR och det behövs så lite DNA att det räcker med hår eller avföring (Buford & Wayne, 1993; Woodruff, 1993). De nedärvs codominant (Frankham et al., 2008).

Mikrosatelliter kan ta lång tid att ta fram om man måste hitta helt nya markörer till en art man inte testat innan och det kan då bli ganska dyrt (Slate et al., 2009). Finns det redan markörer för arten går det snabbare och även billigare att använda sig av denna metod. Ofta kan även primers som hittats i en art användas till flera närbesläktade arter som till exempel mellan får och nötkreatur, mus och råttor samt chimpanse och människa (Moore et al., 1991). Det är en semi-automatisk metod med en relativt hög frekvens av felaktigheter (felfrekvens) eftersom det ger utrymme för mänskliga misstag (Hoffman et al., 2005; Pompanon et al., 2005). Eftersom den inte är helt automatisk kan det vara svårt att typa mer än 10 loci åt gången vilket gör att den inte är ideal för genkartering (Slate et al., 2009).

Mikrosatelliter har vissa begränsningar. De kan innehålla nollalleler och variabla mutationsmönster vilket kan ge tveksamma dataresultat (Kalinowski, 2002; Morin et al., 2004). En nollallel är en mutation som resulterar i att man inte får fram någon PCR produkt för den mikrosatelliten. Om man inte upptäcker nollallelen kan heterozygota individer misstolkas som homozygota i en population om det finns många nollalleler i den. Man måste därför vara försiktig med att jämföra homozygoti mellan populationer som har olika allelsammansättning (Callen et al, 1993; Buford & Wayne, 1993). Loci kan även vara ganska glesa och svåra att hitta i vissa arter (Navajas et al., 1998). Blouin et al., (1996) visade att det kan krävas väldigt många mikrosatelliter när man ska mäta släktskap mellan halvsyskon men även syskon för att få en hög statistisk säkerhet. Det kan vara både tidskrävande och dyrt.

Mitokondrie DNA

Mitokondrien innehåller DNA som kallas mtDNA. mtDNA nedärvs maternellt genom att det följer med ägget från modern till barnet och är därför väldigt bra att använda för att spåra släktskap på modernet. Genetisk variation i mtDNA kan mätas genom flera metoder som är relativt dyra och kan göras med en icke- invasiv provtagning. mtDNA har en hög mutationshastighet och är mycket variabel (Dupont, 2008). Analyser av mtDNA är den mest använda metoden för undersökningar av släktskap mellan nära besläktade arter eller mellan

populationer av samma art och används för att klara ut taxonomiska osäkerheter (Harrison R, 1989).

mtDNA kodar bara för en liten del av det totala DNAt i en organism vilket innebär att information om organismens härstamning i mtDNA kan skilja sig mycket från informationen som hittas i DNA i kärnan. Det skiljer sig även eftersom mutationer sker snabbare i mtDNA än DNA i cellkärnan vilket man måste vara medveten om (Ferris, 1983; Dupont, 2008).

Single nukleotid polymorfism (SNPs)

En SNP är en enbasvariation i en nukleotid i DNA sekvensen som annars är identisk. Exempelvis kan sekvensen AAGGCT ändras till ATGGCT och platsen där nukleotiderna byts ut kallas SNP (Primrose & Twyman, 2006). SNP- markörer är relativt enkla att ta fram genom PCR och det sker helt automatiskt (Slate et al., 2008). De finns med 300- 1000 baspars mellanrum vilket gör att man kan genotypa ett stort antal loci vilket är en stor fördel om man ska uppskatta heterozygoti (Morin et al., 2004; DeWoody & DeWoody, 2005). Eftersom SNP är bialleliska visar de mindre variation per locus än vad mikrosatelliter gör men det vägs upp eftersom de finns i så stort antal och är jämnt utspridda över genomet. Man får istället analysera fler SNP än mikrosatelliter för att få lika hög statistisk säkerhet, man kan analysera hundratals och tusentals loci i modellorganismerna (Kwok, 2001; Evans & Carden, 2004). SNP kan tas fram med ett icke invasivt ingrepp eftersom bara lite DNA krävs. De är relativt dyra att ta fram men är kostnadseffektiva om flera laboratorier samarbetar eller om flera arter undersöks med samma primers (Morin et al., 2004).

SNP har en relativt låg felfrekvens men det kan finnas en liten risk för under- eller överskattningar av frekvensen av SNP. Detta sker genom små skillnader som kan göras i framställningen av SNP genom olika storlek på prover, olikheter i provets sammansättning med mera (Clark et al., 2005; Slate et al. 2008). På en del laboratorier har de slutat använda mikrosatelliter och använder sig bara av SNP för att de anses bättre och mer kostnadseffektiva (Rockefeller University Genomic Research Center 2010, Mutation Analysis Facility, 2010).

Olika användningsområden

Några av de viktigaste områdena att få information om finns listade i tabell 1. Invasiv provtagning, kostnad och tid är mer praktiska detaljer som är viktiga i valet av markör. Ärftlighet som nämnts tidigare är viktigt för att veta om ett loci är heterozygot eller homozygot (Frankham et al., 2008). Taxonomisk status är viktigt för att veta om två populationer som utvecklats på olika platser i världen faktiskt har utvecklats åt så olika håll att de behöver hållas åtskilda som två olika arter. Uppskattning av effektiv populationsstorlek (N_e) är viktigt för att veta hur många djur i en population som faktiskt får avkomma för att bland annat veta hur stor en population behöver vara för att det inte ska bli inavel. Individuell identifiering, släktskap och faderskap är alla viktiga för att kunna undvika inavel och behålla en så stor genetisk variation som möjligt (Frankham et al., 2008).

Tabell 1. Egenskaper och skillnader i de olika metoderna. Tid innebär den tid det tar för att utveckla tekniken så att den kan användas för att genotypa arten. Referenser till användbarheten av SNPar för de olika områdena är följande: Effektiv populationsstorlek N_e (Nomura, 2009; Morin et al., 2004) individuell identifiering (Glover et al., 2010; Morin et al., 2004; Tokarska, 2009) taxonomisk status (Boursot & Belkhir, 2006; Adams et al., 2008) samt faderskap (Morin et al., 2004; Tokarska et al., 2009). Övrig information är hämtad och omformaterad från tabell 3.2 s. 57 och 19.1 s. 476, (Frankham et al., 2008)

	DNA				
	SNP	Mikrosatellit	fingerprinting	RAPD	mtDNA
Invasiv provtagning	Nej	Nej	Ja	Nej	Nej
Tid	Lång	Lång	Begränsad	Begränsad	Lång
Kostnad	Måttlig-hög	Måttlig	Måttlig	Låg-måttlig	Måttlig-hög
Ärftlighet	Codominant	Codominant	Dominant	Dominant	Maternell
Uppskattning av N_e	Mycket användbar	Mycket användbar	?*	Ej användbar	Mycket användbar
Individuell identifiering	Mycket användbar	Mycket användbar	Ej användbar	Användbar	Mycket användbar
Taxonomiskt status	Mycket användbar	Mycket användbar	Mycket användbar	Mycket användbar	Mycket användbar
Faderskap	Mycket användbar	Mycket användbar	Mycket användbar	Användbar	Ej användbar

* Kan användas i vissa fall

I tabell 1 kan det utläsas att SNPar och mikrosatelliter är väldigt användbara för att få fram information om alla de viktigaste områdena inom bevarandegenetiken, men de tar även lång tid att ta fram och kostar en del. DNA- fingerprints är mycket användbara till taxonomisk klassificering och faderskap men kan inte användas till att få information om de andra egenskaperna. De tar dock inte lika lång tid att använda men nedärvs dominant och kräver ett invasivt ingrepp vilket innebär begränsningar och stress för djuren. RAPD går att använda till identifiering och faderskap om än inte i samma omfattning som SNPar och mikrosatelliter, de är mycket användbara för taxonomisk klassificering men kan inte användas för uppskattning av effektiv populationsstorlek. Den är däremot relativt billig att ta fram men nedärvs dominant. mtDNA är mycket användbar för att få fram den mesta informationen men bara på den maternella sidan vilket ger begränsad information. De tar lång tid att ta fram och till en ganska hög kostnad och kan inte användas för information om faderskap.

Studier där de olika metoderna används

Ett exempel på hur mtDNA kan användas är när Templeton et al. (1987) undersökte genetisk variation hos en population Speke's gaseller (*Gazella spekei*) som hölls i fångenskap. De hittade tre variabla positioner av 41 i mtDNA vilket innebar att hela populationen härstammade från tre honor. Honorna hade tre olika haplotyper (alleler som ligger så nära att de nästan alltid nedärvs tillsammans) vilket betyder att slutsatsen kunde dras att de tre honorna inte hade samma ursprung. Sådan information är viktig för att veta att grundarna i en population inte är släkt, något man annars bara kan gissa sig till (Templeton et al., 1987).

Ivy et al. (2009) gjorde ett försök på Parmavallaby (*Macropus parma*) som är ett kängurudjur. De framställde mikrosatelliter speciellt för vallabyn och använde dem för att fastställa föräldradsdjuren i populationen och på så vis förbättra stamtavlorna. Deras resultat indikerade att mikrosatelliternas bedömningar av föräldraskap var användbara för att fastställa stamtavlor men att det inte gav så mycket information som var viktigt för bevarandet av genetisk variation och att undvika inavel eftersom djuren inte var så besläktade. Informationen de fick fram i avelsprogrammen gav liten fördel men hade säkert varit till större hjälp om djuren hade varit mer besläktade (Ivy et al., 2009).

Fowler et al. (1998) tog fram 32 RAPD primers för att studera föräldraskap hos koalor (*Phascolarctos cinereus*). Av dessa 32 var 25 stycken direkt användbara för analys av föräldraskap och flera föräldrar kunde identifieras. Deras resultat indikerade att detta kan vara en budgetvariant för djurparker när det gäller genetiska analyser istället för att använda mikrosatelliter. Det visade att RAPD markörer effektivt kan fastställa faderskap i små grupper av koalor och i vissa fall kan avgöra båda föräldrarna med så få som 7 informativa RAPD loci. De visade även att detta är en pålitlig och billig metod för identifiering av koalor i fångenskap (Fowler et al., 1998).

Geyer et al. (1993) jämförde genetisk variation och släktskap hos 32 stycken Californiska kondorer (*Gymnogyps californianus*) genom att använda sig av DNA fingerprinting. De kunde därefter dela in kondorerna i tre undergrupper där det var en signifikant större genetisk skillnad mellan grupperna än inom dem. De kunde genom denna information undvika inavel genom att hindra parningar inom grupperna (Geyer et al., 1993).

Tokarska et al. (2009) undersökte effektiviteten av att använda sig av SNP markörer för att undersöka föräldraskap och individuell identifiering av den Europeiska bisonoxen (*Bison bonasus*). Bisonsen har hämtat sig efter en kraftig flaskhals under början av 1900-talet men populationen har väldigt liten genetisk variation och härstammar enligt stamtavlor från endast två individer. Forskarna använde sig av 17 mikrosatelliter och 960 SNPar och jämförde effektiviteten hos dessa. Både faderskapsbestämning och identifiering med hjälp av mikrosatelliter misslyckades eftersom det var för låg heterozygoti i markörerna. Dessa kan därför inte användas i populationer med så liten genetisk variation. Däremot kunde SNParna framgångsrikt identifiera djuren och bestämma faderskap. Det visade sig även att det hade räckt att använda 80- 90 SNPar för att få statistisk säkerhet. I detta försök kunde SNPar användas som redan tagits fram till domesticerad boskap (*Bos taurus*) vilket gav en lägre kostnad än mikrosatelliterna vilket indikerar att detta är en mycket effektiv och användbar metod om det finns markörer för arten. De kan även användas till populationer som genomgått en flaskhals och har en väldigt låg genetisk variation (Tokarska et al., 2009).

I ett arbete som utfördes av Morin et al. (2004) jämfördes användningen av SNPar, mtDNA och mikrosatelliter med avseende på statistisk säkerhet, analytiska metoder, teknikförbättringar och begränsningar. De kom fram till att SNPar ger likvärdiga statistiskt säkra resultat som både mikrosatelliter och mtDNA men täcker en bredare del av genomet och ger en högre kvalitet på data än de andra. De anser att SNPs är effektiva och prisvärda genetiska markörer (Morin et al., 2004).

Populationsstorlek

En viktig faktor för att kunna bevara genetisk variation är att ha en tillräckligt stor effektiv population. Det finns många olika teorier om hur stor en population behöver vara för att bevara den genetiska variationen som finns naturligt i en population. Franklin (1980) samt Lande & Barrowclough (1987) menar på att det skulle krävas en effektiv populationsstorlek på 500 djur. Denna storlek bestämdes genom att se när den additiva genetiska variansen ökar lika mycket för en kvantitativ egenskap genom mutation, som den minskar genom genetisk drift. Lande (1995) menar dock att hastigheten på större mutationer som ger genetisk variation i kvantitativa egenskaper går mycket långsammare än det totala antalet mutationer eftersom mutationer som ger stor effekt också kan vara letala för djuret. Därför bör den effektiva populationsstorleken vara ca 5000 djur för att ge normal nivå av adaptation i de kvantitativa egenskaperna hos en population. Franklin & Frankham (1998) argumenterade för att Lande (1995) som beräknade lämplig effektiv populationsstorlek till 5000 djur räknade med för låg mutationshastighet. De kom fram till att populationsstorlek på 500- 1000 djur var tillräckligt. Thomas (1990) kom fram till att det krävs en populationsstorlek på från 1000 till 10 000- tals djur. Soulé (1987) gjorde en sammanfattning över olika forskares teorier och kom fram till att det i alla fall krävs en effektiv populationsstorlek på minst 1000 djur för att ha en 95% sannolikhet för överlevnad och utan minskning i fitness på några hundra år. Det var minimigränsen.

Diskussion

Det finns många olika metoder för att mäta genetisk variation och de utvecklas ständigt. För att välja genetisk markör ska man tänka på några olika faktorer. Vad man har för utgångsmaterial för analys, om det har någon betydelse om man väljer en codominant eller dominant markör, vilken information man vill ha, kostnaden, tiden, variabiliteten och markörens biologiska egenskaper.

En djurpark har många olika slags djur och ett avelsarbete som omfattar många arter som ofta kan vara ovanliga, de är antagligen intresserade av billiga metoder som ger snabba resultat. RAPD och DNA fingerprinting kan då vara de mest lämpade metoderna eftersom de är billiga, relativt snabba och inte heller kräver någon tidigare information om artens DNA. Det behövs dock ganska mycket DNA för att kunna använda sig av DNA fingerprinting och kräver ett invasivt ingrepp (Frankham et al., 2008). Det är en stor nackdel eftersom vissa djurarter är så små att det är svårt att ta tillräckligt med blod eller annan vävnad från dem. Det innebär även alltid en stress för djuren att bli hanterade varför jag anser att denna metod är mindre lämpad för en djurpark. DNA fingerprinting kan inte heller användas för individuell identifiering (tabell 1.) vilket gör den opassande. RAPD är då ett bättre alternativ eftersom DNA kan tas från hår, avföring eller annat och inte kräver ett invasivt ingrepp (Fowler et al., 1998). RAPD ger dock även den en ganska begränsad och översiktlig information.

Ärftlighetsformen är en viktig faktor i avgörandet av vilken metod man ska använda när det gäller att mäta genetisk variation. SNP och mikrosatelliter nedärvs codominant vilket är den önskade formen då man får fram information om alla olika genotyper (Frankham et al., 2008). Mikrosatelliter och SNP ger på så vis mer information per locus än RAPD och DNA fingerprinting gör. Men RAPD och DNA fingerprinting gör det möjligt att undersöka fler loci då de övergriper många fler baspar (10-20) medan mikrosatelliter innefattar 1-5 baspar och SNP 1 baspar (Frankham et al., 2008). Codominant nedärvning ger högre kvalitet på informationen om genetisk variation då man ser både recessiva och dominant alleler vilket gör att man kan göra bättre jämförelser mellan hotade och icke hotade arter, släktskap med mera. SNP och mikrosatelliter är därför att föredra informationsmässigt framför RAPD. RAPD kan inte heller användas för att undersöka effektiv populationsstorlek i en population vilket annars kan ge värdefull information. En nackdel med mikrosatelliter och SNP är att

om det inte finns tidigare markörer för de aktuella arterna måste nya tas fram på laboratorier och testas flera gånger för att veta att de är tillräckligt variabla vilket både är dyrare och tar längre tid än RAPD. När man väl tagit fram markörer kan ofta primers som hittats i en art användas till flera närbesläktade arter som till exempel mellan får och nötkreatur, mus och råtta (Moore et al., 1991). Detta har man inte sett i användningen av minisatelliter (DNA fingerprint och RAPD). När man väl fått fram mikrosatelliter för en art ger de mycket användbar information om de områden som är viktiga för bevarandebiologin (se Tabell 1.) Man kan tänka sig att en djurpark har ganska många arter som det inte finns markörer för vilket kan bli väldigt dyrt om de ska ta fram nya till varje art. Det kan vara en faktor att ta i beaktning vid val av metod. Ett alternativ kan vara att ha ett samarbete med laboratorier vilket kan göra det billigare att ta fram markörer.

SNPar vs mikrosatelliter

Det finns olika för och nackdelar med mikrosatelliter och SNPar lite beroende på användning och djurslag. Båda metoderna kan användas för att få fram samma viktiga information (se Tabell 1.) om populationerna men med några skillnader. Generellt så krävs fler SNP-markörer än mikrosatelliter för att få fram samma information eftersom SNPar består av två alleler medans mikrosatellitloci har många (5-20) (Morin et al., 2004). SNPar ger statistiskt likvärdiga resultat som mtDNA och mikrosatelliter men täcker en större del av genomet eftersom de hittas med 300- 1000 baspars mellanrum medans mikrosatelliter hittas med 5000-50000 baspars mellanrum. Man kan då undersöka en större del av genomet och får en högre kvalitet på informationen vilket gör att detta är den bästa metoden vad gäller kvaliteten på information (Morin et al., 2004; Tokarska et al., 2009). Om det redan finns SNPar framtagna för den art man vill undersöka eller någon närbesläktad art så är det även den billigaste och mest informativa av de två metoderna. SNPar är fortfarande dyrare än mikrosatelliter att ta fram men kostnaderna sänks ju mer tekniken utvecklas och eftersom det ständigt tas fram nya SNP- markörer för flera arter kommer de snart finnas för de flesta arter. Då kommer SNPar antagligen bli den billigaste och mest användbara metoden för att mäta genetisk variation (Morin et al., 2004).

I populationer där det finns en väldigt liten genetisk variation kan det vara för lite heterozygoti för att det ska gå att använda mikrosatelliter och då kan SNPar användas istället (Tokarska et al., 2009). Så kan fallet vara på vissa djurparker där inaveln kan vara stor. En nackdel med SNPar är att de är bialleliska och därför inte kan ha en heterozygoti på över 0,5. Det är en nackdel vid bestämning av föräldrar och identitet som kräver hög statistisk säkerhet (Tokarska et al., 2009). Det finns även en liten risk för under- eller överskattningar av frekvensen av SNPar. Detta sker genom olikheter i upptäckten av SNPar genom olika storlek på prover, olikheter i provets sammansättning med mera. Detta är dock mer ett problem i undersökningar mellan arter än inom en art (Clark et al., 2005; Slate et al., 2008). Risken för felbedömningar i SNPar är dock mycket mindre än i mikrosatelliter. Metoden är inte lika automatiserad vilket ger ett större utrymme för mänskliga misstag. På grund av det och faktorn att mikrosatelliter är så polymorfa har de en högre felfrekvens än SNPar (Hoffman et al., 2005; Pompanon et al., 2005). Även detta är något att beakta vid valet mellan dessa två markörer.

mtDNA

mtDNA är mycket användbart när det gäller att klassificera en arts taxonomiska tillhörighet vilket kan vara mycket användbart på en djurpark. Där kommer djur från olika populationer och platser i världen och antas vara av samma art när de egentligen har utvecklats åt så olika håll att de behöver hållas separerade som olika arter. Eftersom mtDNA bara nedärvs

maternellt är metoden inte användbar vad gäller information om faderskap (Kalinowski, 2002; Morin et al., 2004; Dupont, 2008). Det är en stor begränsning då man för att kunna föra ett bra avelsarbete, behöver information om båda föräldrarna. En felkälla som uppkommer vid användningen av SNPar eller mikrosatelliter är nollallelerna som kan ge felaktig information om heterozygoti och göra så ett loci felaktigt tolkas som homozygot. En fördel med mtDNA är att om en mutation sker i mtDNA så finns det bara i en kopia vilket gör att man direkt ser att det uppkommit ett fel och kan bortse från det loci.

Populationsstorlek

När ett djur blir listat som utrotningshotat finns det ofta inte mer än 1000 individer kvar (Wilcove et al., 1993). Många forskare anser att det krävs många fler djur än så för att behålla en långsiktig genetisk livskraftighet och tillräcklig evolutionär potential i en population (Thomas, 1990; Lande, 1995). Den effektiva populationsstorleken är cirka hälften till en fjärdedel så stor som populationsstorleken och den effektiva populationsstorleken varierar även i olika populationer och mellan arter (Lande, 1995; Frankham, 2008). Med avseende på detta anser jag att olika djurarter borde bevaras vid olika antal individer beroende på de olika effektiva populationsstorlekarna i de aktuella arterna. Överlag borde de bevaras vid ett större antal resterande djur så att de har en chans att inte bara återhämta sig utan även kunna utvecklas evolutionärt och anpassa sig i en föränderlig miljö. Flera studier visar på att skyddet av hotade djur och bevarandearbete sätts igång för sent för de flesta arterna och om det skulle sättas igång tidigare skulle det öka chansen för återhämtning (Wilcove et al., 1993).

Slutsats

Vilken metod man ska använda får väljas utifrån den information som behövs samt vilka förutsättningar som finns för en art. Finns det inga SNP- eller mikrosatellit markörer framtagna för en art är det ett tidskrävande och kostsamt arbete att ta fram vilket inte känns som att en djurpark har resurser eller möjlighet att göra. Då kan istället RAPD metoden vara ett bra alternativ. Den ger en lite mer översiktlig information om vilka som är närmare släkt med varandra och kan även användas för identifiering och faderskapsbestämning och därmed kunna utveckla avelsprogrammen (Fowler et al., 1998). För att kunna bedriva ett riktigt bra avelsarbete kan det dock krävas lite mer informativa markörer. Då är SNPar och mikrosatelliter överlägsna och särskilt om det redan finns markörer framtagna. Mikrosatelliter har länge varit den dominerande markören för populationsstudier (Tokarska et al., 2009; Glover et al., 2010) men SNPar kan komma att bli de mest användbara markörerna i framtiden då de är mer kostnadseffektiv, ger information av högre kvalitet och är statistiskt lika säkra som mikrosatelliter (Morin et al., 2004). Om man bara söker information om taxonomisk tillhörighet kan mtDNA med fördel användas men kan inte användas för att få fram så mycket annan information. Metoder som visar en högre nivå av genetisk variation ger mer värdefull information till bevarandebiologin och kan bidra till arbetet att rädda utrotningshotade djur.

Referenser

- Adams, R. P., Morris, J. A., Schwarzbach, A. E. 2008. Taxonomic affinity of Rushforth's bhutan juniper and *juniperus indica* using SNPs from nrDNA and cp trnC-trnD, terpenoids and RAPD data. *Phytologia* 90, 233-245.
- Blouin, M. S., Parsons, M., Lacille, V., Lotz, S. 1996. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology* 5, 393–401.
- Boursot, P., Belkhir, K. 2006. Mouse SNPs for evolutionary biology: Beware of ascertainment biases. *Genome Research* 16, 1191-1192.
- Bruford, M. W., Altmann, J. 1993. DNA fingerprinting and the problems of paternity determination in an inbred captive population of guinea baboons (*papio hamadryas papio*). *Primates* 34, 403-411.
- Bruford, M. W., Wayne, R. K. 1993. Microsatellites and their application to genetics studies, *Current Opinions in Genetics and Development* 3, 939–943.
- Callen, D. F., Thompson, A. D., Shen, Y., Phillips, H. A., Richards, R. I., Mulley J. C., Sutherland G. R. 1993. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *The American Journal of Human Genetics* 52, 922-927.
- Clark, A. G., Hubisz, M. J., Bustamante, C. D., Williamson, S. H., Nielsen, R. 2005. Ascertainment bias in studies of human genome-wide polymorphism. *Genome research* 15, 1496- 1502.
- DeWoody, Y. D., DeWoody, J. A. 2005. On the Estimation of Genome-wide Heterozygosity Using Molecular Markers. *Journal of Heredity* 96, 85–88.
- Dupont, L. 2008. Perspectives on the application of molecular genetics to earthworm ecology. *Pedobiologia* 52, 191- 205.
- Ehrlich, P. R., Ehrlich, A. H. 1981. *Extinction: causes and consequences of the disappearance of species*. Random House: New York, USA.
- Estoup, A., Garnery, L., Solignac, L., Cornuet, J. 1995. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: Hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics* 140, 679-695.
- Evans, D. M., Carden, L. R. 2004. Guidelines for Genotyping in Genomewide Linkage Studies: Single-Nucleotide–Polymorphism Maps Versus Microsatellite Maps. *The American Journal of Human Genetics* 75, 687-692.
- Ferris, S. D., Sage, R. D., Huang, C., Nielsen, J. T., Ritte, U., Wilson, A. C. 1983. Flow of mitochondrial DNA across a species boundary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2290-2294.
- Fowler, E. V., Houlden, B. A., Sherwin, W. B., Hoeben, P., Timms, P. 1998. Genetic variation in captive koalas (*phascogale cinereus*): parentage determination and individual identification. *Biochemical Genetics* 36, 193- 206.
- Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. 2008. *Introduction to Conservation Genetics*. University Press, Cambridge, England.

- Franklin, I. R. 1980. Evolutionary changes in small populations. In: conservation biology: an evolutionary – ecological perspective, 135-149.
- Franklin, I. R., Frankham, R. 1998. How large must populations be to retain evolutionary potential? *Animal conservation* 1, 69-73.
- Free photos. Maj 2010. www.freephotos.com/?photoid=16771&action=viewphoto
- Geyer, C. J., Ryder, O. A., Chemnick, L. G., Thomson, E., A. 1993. Analysis of relatedness in the California condors, from DNA fingerprints. *Molecular Biology evolution* 10, 571-589.
- Glover, K. A., Hansen, M. M., Lien, S., Als, T. D., Hoyheim, B., Skaala, Ö. 2010. A comparison of SNP and STR loci for delineating population structure and performing individual genetic assignment. *BioMed central* 11, 1-12.
- Harrison, R. G. 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in ecology and evolution* 4, 6-11.
- Hedrick, P.W. 1999. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53, 313–318.
- Hedrick, P.W. 2001. Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology & Evolution* 16, 629–636.
- Hoffman, J. I., Amos, W. 2005. Microsatellite genotyping errors: detection approaches of common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology* 14, 599-612.
- International Union for Conservation of Nature. IUCN. Mars 2010. http://www.iucn.org/about/work/programmes/species/red_list/about_the_red_list/, Wildlife in a changing world. An analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened species. <http://data.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/RL-2009-001.pdf>
- Ivy, A. J., Miller, A., Lacy, R. C., Dewoody, J. A. 2009. Methods and prospects for using molecular data in captive breeding programs: An empirical example using Parma wallabies (*Macropus parma*). *Journal of Heredity* 100, 441–454.
- Kalinowski, S.T. 2002. How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? *Heredity* 88, 62-65.
- Kwok P-Y. 2001. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annual review of genomics and human genetics* 2, 235–258.
- Lacy, R. C. 2000. Should we select genetic alleles in our conservation breeding programs? *Zoo Biology* 19, 279–282.
- Lande, R. 1995. Mutation and conservation. *Conservation Biology* 9, 782- 791.
- Lande, R., Barrowclough, G. F. 1987. Effective population size, genetic variation and their use in population management. In: *Viable populations for conservation* (ed. Michael E. Soulé), 87- 95 Cambridge university Press, UK.
- Moore, S. S., Sargeant, L. L., King, T. J., Matticks, S., Georges, M., Hetzel, D. J. 1991. The Conservation of Dinucleotide Microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* 10, 654-660.

- Morin, P. A., Luikart, G., Wayne, R. K. and “the SNP workshop group”. 2004. Trends in evolution and ecology 19, 208- 216.
- Mutation Analysis Facility (MAF). April 2010.
<http://ki.se/content/1/c4/13/72/Genotyping%20fees%20MAF%20valid%20from%202007-07-01.pdf>
- Navajas, M. J., Thistlewood, H. M. A., Lagne, J., Hughes, C. 1998. Microsatellite sequences are underrepresented in two mite genomes. Insect Molecular biology 7, 249–256.
- Nomura, T. 2009. Interval Estimation of the Effective Population Size from Heterozygote-Excess in SNP Markers. Biometrical Journal 51, 996-1016.
- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E., Taberlet, P. 2005. Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. Nat Rev Genet 6: 847-859.
- Primrose, S. B., Twyman, R. M. 2006. Mapping and sequencing genomes. In: Principles of gene manipulation and genomics (eds. S. B. Primrose, R.M. Twyman), 351. Blackwell Publishing. UK.
- Rockefeller universitet. April 2010. <http://www.rockefeller.edu/genomics/microsatellite.php>
- Roy, M. S., Girman, D. J., Taylor, A. C., Wayne, R. K. 1994. The use of museum specimens to reconstruct the genetic variability and relationships of extinct populations. Experientia 50, 551- 557.
- Sedgwick, C. J. 1981. *Pectus excavatum* in a douc langur (*Pygathrix nemaeus*): One reason for managing genetic variation in zoo animal breeding programs. The journal for zoo animal medicine 12, 124-127.
- Simm, G. 2000. Genes, genetic codes and genetic variation. In: Genetic improvement of cattle and sheep, 25-26. Farm press. Tonbridge, UK
- Slate, J., Gratten, J., Beraldi, D., Stapley, J., Hale, M.C., Pemberton, J. M. 2008. Gene mapping in the wild with SNPs: guidelines and future directions. Genetica. Springer Netherlands. 136, 97–107.
- Soulé, M. E. 1987. Where do we go from here? In: Viable Populations for Conservation (ed. M. Soule) 175- 183. Cambridge University Press, England.
- Templeton, A. R., Davis, S. K., Read, B. 1987. Genetic variability in a captive herd of Speke's gazelle (*Gazella spekei*). Zoo Biology 6, 305-313.
- Thomas, C. D. 1990. What do real population dynamics tell us about minimum viable population sizes? Conservation Biology 4, 323-327.
- Tilman, D. 2000. Causes, consequences and ethics of biodiversity. Nature 40, 208–211.
- Tokarska, M., Marshall, T., Kowalczyk, R., Wo´jcik, J. M., Pertoldi, C., Kristensen, T. N., Loeschcke, V., Gregersen, V. R., Bendixen, C. 2009. Effectiveness of microsatellite and SNP markers for parentage and identity analysis in species with low genetic diversity: the case of European bison. Heredity 103, 326–332
- Valdes, A. M., Slatkin, M., Freimer, N. B. 1993. Allele Frequencies at Microsatellite Loci: The Stepwise Mutation Model Revisited. Genetics 133, 737-749.

- Vitousek, P. M., Mooney, H. A., Lubehenco, J., Melillo, J. M. 1997. Human domination of Earth's ecosystems. *Science* 277, 494–499.
- Whitlock, M. C. 2000. Fixation of new alleles and the extinction of small populations: drift load, beneficial alleles, and sexual selection. *Evolution* 54, 1855–1861.
- Wilcove, D. S., McMillan, M., Winston, K. C. 1993. What Exactly Is an Endangered Species? An Analysis of the U.S. Endangered Species List: 1985- 1991. *Conservation Biology* 7, 87-93.
- Woodruff, D. S. 1993. Non- invasive genotyping of primates. *Primates* 34, 333-346