

Tema V. Conservación a nivel de genes

- Consecuencias genéticas en poblaciones pequeñas y especies amenazadas
 - Deriva génica
 - Entrecruzamiento
 - Fragmentación y flujo genético
 - Tamaño poblacional efectivo (N_e)
- Manejo genético de poblaciones en cautiverio y en jardines botánicos

- La diversidad genética es uno de los atributos más importantes de las poblaciones.
- La evaluación de la diversidad genética tiene aplicaciones importantes en la conservación de las especies.
- La baja diversidad genética conduce a un aumento en los niveles de endogamia reduciendo la adecuación de los individuos y de la población.

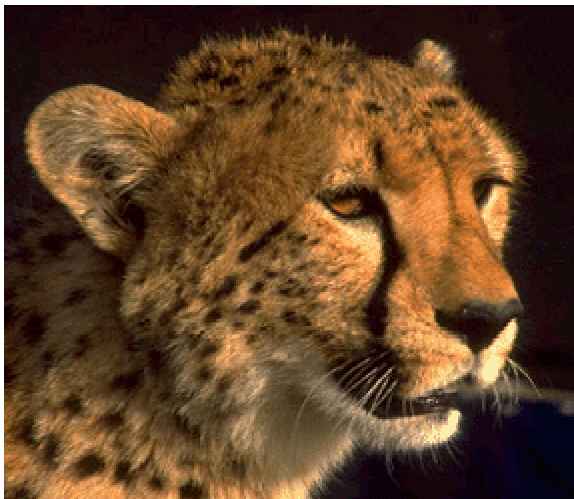
- ¿Qué es la diversidad genética?
- ¿Cuál es su origen?
- ¿Cómo la detectamos?
- ¿Cómo se mide?

Frankham, R., J. D. Ballou, D. A. Briscoe. 2004. *A primer of Conservation Genetics*. Cambridge University Press.

Freeland, J. R. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley and Sons, Ltd.

Gillespie, J. H. 1998. *Population Genetics: a concise guide*. The Johns Hopkins University Press.

González, D. 1998. Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. *Revista Mexicana de Micología* 14: 1-21.



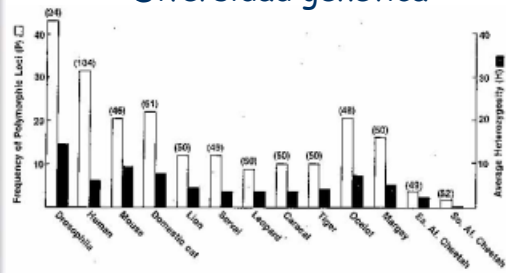
Cheetah
(*Acinonyx jubatus*)

Ejemplo clásico de la importancia de la variación genética en la sobrevivencia a largo y corto plazo.





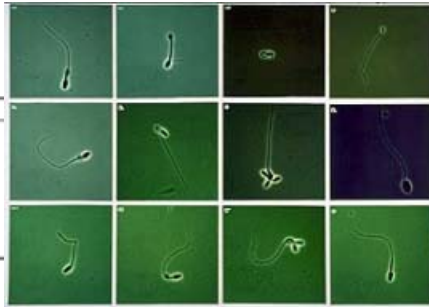
Diversidad genética



*Indicates the extent of genetic variation based on allozyme electrophoretic surveys in the east African cheetah (*A. jubatus rolandi*), the south African cheetah (*A. jubatus jubatus*), eight additional feline species (8, 13), and three nonfeline species. The asterisks parenthesized indicates the number of genetic loci that were considered in the estimate. (For a review of over 250 such electrophoretic surveys see ref. 24. Enzymes typed and procedures used are as previously described (7, 8, 13).)

Table 2. Physiological measurements where cheetahs are limited compared to other felids

Measurement
Diminished sperm count
Elevated frequency of morphological abnormalities in sperm development (~70%)
Low fecundity in captive breeding attempts throughout history
Captive population is not self-sustaining
Relatively high incidence of juvenile mortality even among unrelated parents
Increased population vulnerability to infectious disease outbreaks (notably, feline infectious peritonitis)



El interés de involucrar a la genética en la conservación surgió por el impacto adverso de la endogamia en la reproducción y sobrevivencia de las especies en poblaciones pequeñas y fragmentadas

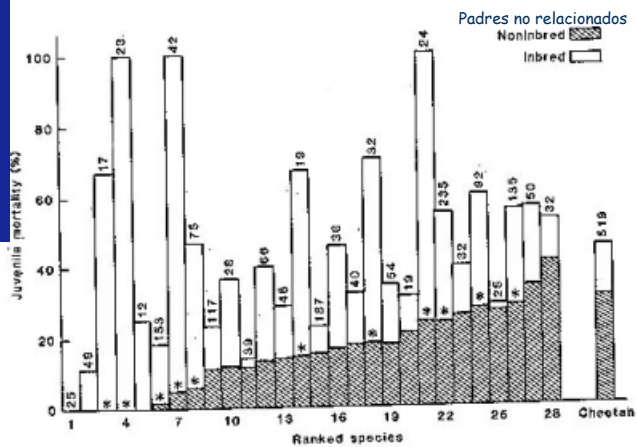


Fig. 1. Infant mortality in 29 mammalian species bred in captivity. Hatched bars are ranked frequencies of juvenile mortality among matings between unrelated parents. All wild-caught animals were considered to be unrelated. Higher values in all cases except species 25 were obtained from consanguineous (inbred) matings (open bars). Species with statistically significant inbred mortalities greater than noninbred mortalities are indicated by an asterisk. The species are (1) four-striped rat; (2) climbing rat; (3) salt desert cavy; (4) Wied's red-nosed mouse; (5) zaguatis; (6) short bare-tailed opossum; (7) scimitar-horned oryx; (8) sitatunga; (9) degu; (10) spiny rat; (11) Père David's deer; (12) punare; (13) wildebeest; (14) Indian elephant; (15) elephant shrew; (16) acouchi; (17) muntjac; (18) sable; (19) boris; (20) giraffe; (21) Eld's deer; (22) pygmy hippopotamus; (23) Grant's zebra; (24) Dorcas gazelle; (25) kudu; (26) Japanese serow; (27) reindeer; and (28) dik-dik. The cheetah data are from Table 1 and the data for the other species are from Ralls and colleagues (17). Numbers above the bars give the total number of animals considered in each species.

Ejemplos del grado de variación genética en especies raras o en peligro

Species	Observation
Plants	
<i>Bensoniella oregona</i> (Saxifragaceae)	Complete absence of allozyme variation (24 loci) within or among populations of this endemic herbaceous perennial in southwest Oregon and northwest California
<i>Pedicularis furbishiae</i> (Scrophulariaceae)	Complete absence of allozyme variation (22 loci) within or among populations of this endangered hemiparasitic lousewort in northern Maine
<i>Howellia aquaticus</i> (Campanulaceae)	Complete absence of allozyme variation (18 loci) within or among populations of this rare and endangered aquatic plant in the Pacific Northwest
<i>Trifolium reflexum</i> (Fabaceae)	Complete absence of allozyme variation (14 loci) in the only known population of this rare native clover in Ohio [however, allozyme assays (20 loci) of an endangered congener <i>T. stoloniferum</i> did reveal low to moderate levels of genetic variation]
Animals	
<i>Bison bison</i>	Only one allozyme locus (among 24 tested) was polymorphic in a bison herd in South Dakota known to be descended from a small founder group
<i>Perameles gunnii</i>	Complete absence of allozyme variation (27 loci) within an endangered, isolated population of the eastern barred bandicoot in Australia (however, a widespread and dense population of the same species in Tasmania also lacked genetic variation at these same loci)
<i>Mustela nigripes</i>	Only one allozyme locus (among 46 tested) was polymorphic in the one known remaining population of the highly endangered black-footed ferret
<i>Strix occidentalis</i>	Complete absence of allozyme variation (23 loci) in six populations of the endangered spotted owl from Oregon and California



Qué es la conservación a nivel genético?

La disciplina que hace uso de la teoría y técnicas de la genética para **reducir el riesgo** de extinción de especies amenazadas, y a largo plazo..... conservarlas como entidades dinámicas capaces de mantenerse a través de cambios ambientales.

Se enfoca en poblaciones pequeñas o que están disminuyendo en número.

Su objetivo es conocer **aspectos genéticos** de las especies que sean **relevantes** para su manejo

Por ejemplo:

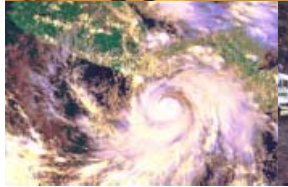
1. Los efectos de la endogamia en la reproducción y sobrevivencia
2. La pérdida de la diversidad genética y la habilidad de adaptarse en respuesta a cambios ambientales
3. La fragmentación de las poblaciones y la reducción del flujo génico
4. La deriva génica como el proceso evolutivo principal

.....

5. La acumulación de mutaciones deletéreas
6. Efecto de la adaptación al cautiverio sobre el éxito de la reintroducción
7. Las incertidumbres taxonómicas
8. La definición de las unidades de manejo dentro de las especies
9. Conocer las huellas genéticas de las especies para la ciencia forense (litigios)

Por qué es importante conservar la diversidad a nivel genético?

Necesaria para adaptarse a cambios ambientales inducidos por el hombre o por desastres naturales



Qué es?

Diversidad genética →

Es la variedad de alelos y genotipos presentes en una población; una especie o grupo de especies

polimorfismo



Se describe en términos de frecuencias alélicas, número de alelos y heterocigosidad

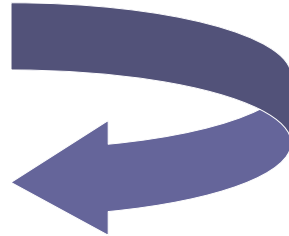
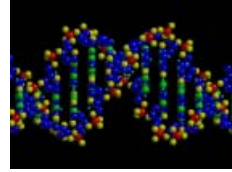
POLIMORFISMO

ORIGEN

Alteraciones en el ADN

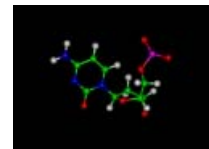
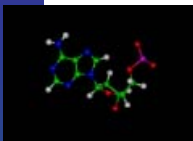
Variación genética

La materia prima de la evolución



Variación genética

A nivel de nucleótidos



indel

His Thr Phe Gly Lys Gln Gly ↓ [?] [?] [?]
 ← Leu Trp Tyr

(a) CAC ACA TTT GGA AAA CAG GGT C -- TGT GGT ATA

(b) CAC ACA TTC GGA AAA CAG GTT CTT TGT GGA ATA

His Thr **Phe** Gly Lys Gln **Val** Leu Cys **Stop** Ile

↑
Transición
sinónima

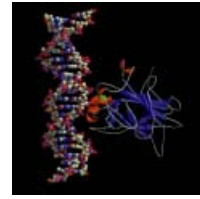
↑
Transversión
No-sinónima
(con sentido)

↑
Transversión
No-sinónima
(sin sentido)

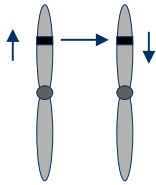
Otras fuentes:

Variación genética

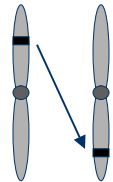
A nivel de segmentos de ADN



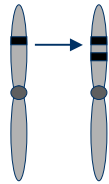
Inversión



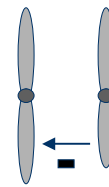
Translocación



Duplicación

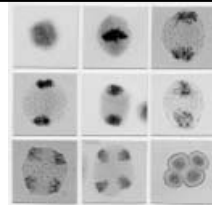


Delección

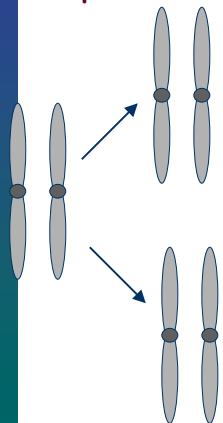


Variación genética

A nivel de cromosomas

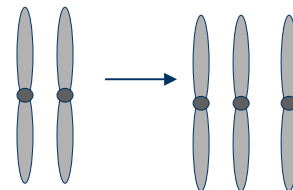


Poliploidía

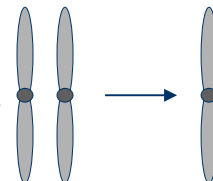


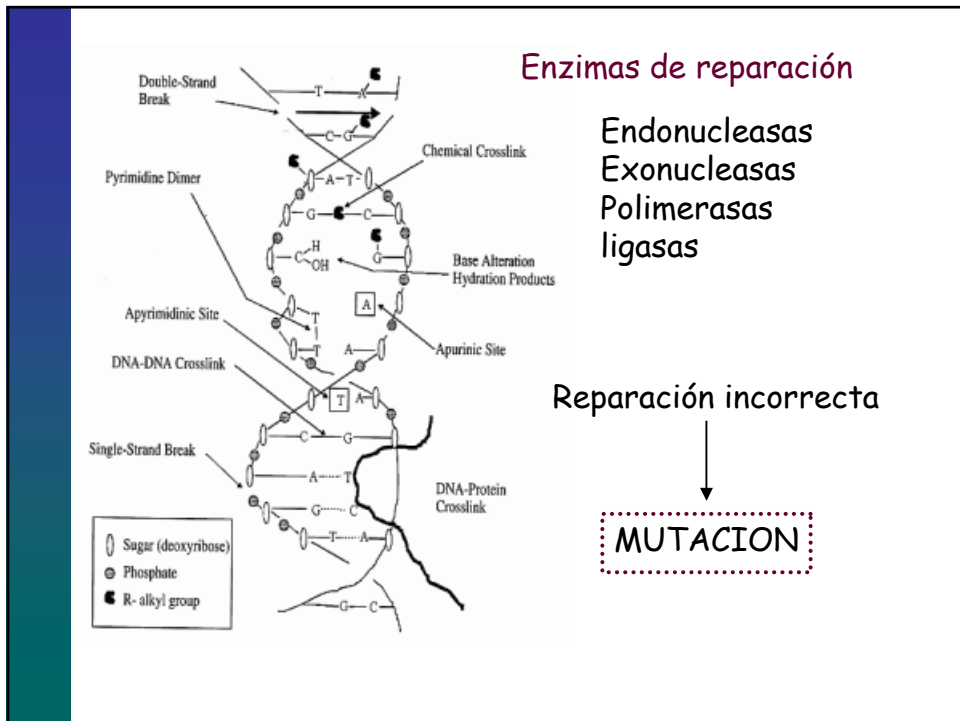
Aneuploidía

1. Trisomía



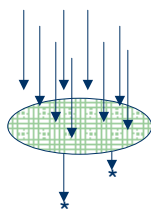
2. Monosomía





Cuál es la base de la variación genética?

- La **frecuencia** y **fijación** de las mutaciones en la población



Mutación

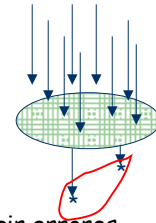


Selección y/o deriva genética

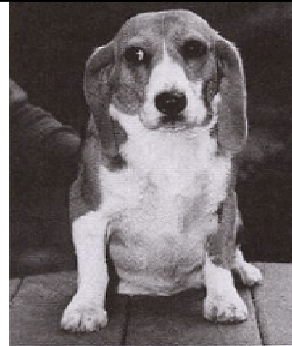


Genoma o gen muestreado

Las mutaciones que observamos:



- **Dependen del organismo**
 - Algunas ADN polimerasas son más eficientes en corregir errores
 - Hay diferencias en la reparación de genes
 - Algunos organismos tienen tasas de mutación extremadamente altas.
- **Dependen de la posición en el genoma**
 - Regiones con nucleótidos repetidos más susceptibles a errores durante la replicación ("slippage")
- **Dependen del ambiente**
 - Presencia de mutágenos



En una forma natural, la tasa de mutación es baja

Sin embargo, otros factores como el bajo número de individuos en poblaciones pequeñas promueve la fijación de mutaciones perjudiciales para la población



Técnicas para detectar la variación genética

A nivel de proteínas

- Un locus
 - Reacciones inmunológicas
 - **Electroforesis de isoenzimas**

Actualmente es fácil conocer la variación genética usando datos moleculares de muchos loci para muchos individuos y para muchas poblaciones!

A nivel de ADN

- Un locus
 - **RFLPs**
 - **Secuencias**
 - VNTRs
 - Minisatélites
 - Microsatélites
 - DGGE
 - SSCP
- Varios loci
 - Hibridación
 - **RAPDs**
 - **VNTRs**
 - Minisatélites
 - Microsatélites
 - **AFLPs**



Foto: Anne Andrich

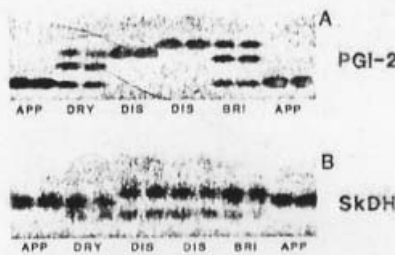
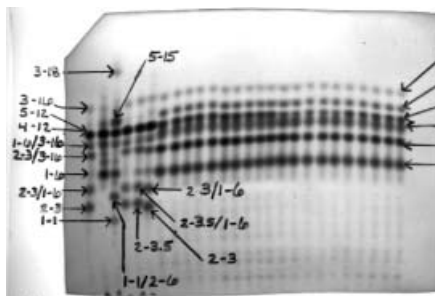


FIG. 5. Representative electrophoretic banding patterns of *Gymnocarpium appalachianum* (APP), *G. dryopteris* (DRY), *G. disjunctum* (DIS), and *G. × brittonianum* (BRI). A. PGI-2. B. SkDH.

Fosfo-glucosomerasa

Shikimate deshidrogenasa



Malato deshidrogenasa (MDH)

RFLPs

Rubus nessensis

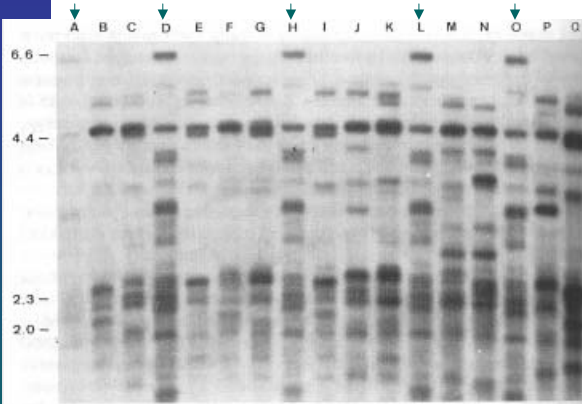


FIGURE 22. Genotypic distribution of the sexual raspberry, *Rubus idaeus*, vs. the apomictic blackberry, *R. nessensis*. DNA fragment patterns were derived from samples collected in the same location, DNA samples were digested with *Hae*III, separated on an agarose gel, Southern blotted, and hybridized with a ³²P-labeled M13 probe. Lanes B, C, E to G, I to K, M, N, P, and Q are *R. idaeus*; lanes A, D, H, L, and O are *R. nessensis*. Size markers (kb) are indicated.

RAPDs

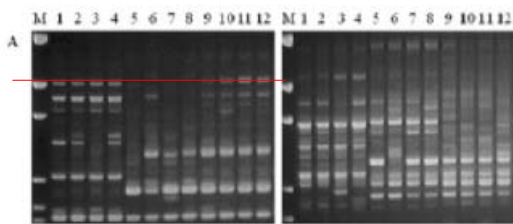


Fig. 1. Portions of two typical agarose gels showing RAPD profiles generated with primers OPC-2 (A) and OPH-13 (B). Lane M=pGEM DNA marker, lanes 1–4=*E. angustifolia*, lanes 5–8=*E. pallida*, lanes 9–12=*E. purpurea*.

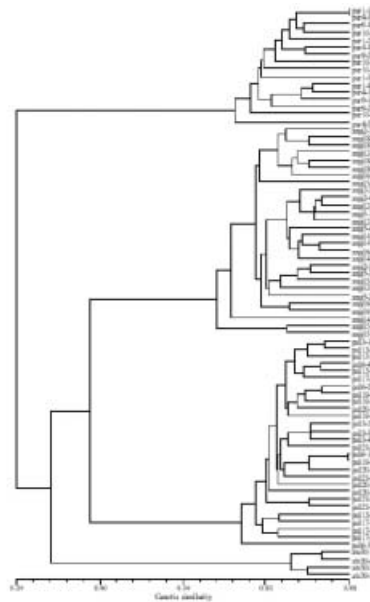


Fig. 2. Dendrogram showing the genetic relationships of 76 *Echinacea* individuals. The individuals are labeled with a species and an accession identifier, plus an individual designator.

AFLPs



* polimórficos

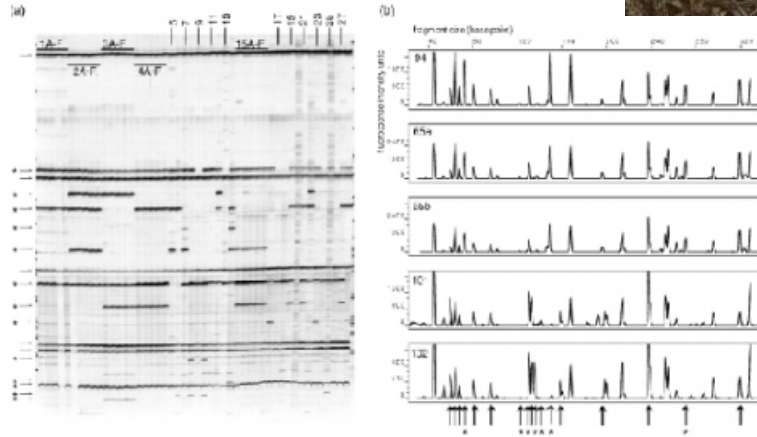
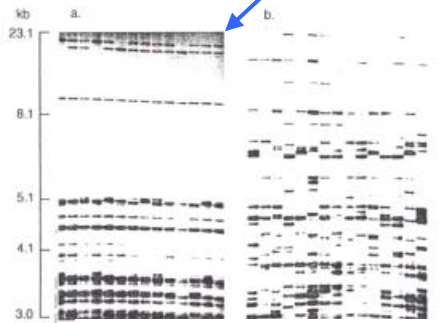


Fig. 2 (a) Amplified fragment length polymorphism gel of *Amanita muscaria* obtained using protocol 1 (radioactive labelling) with primer pair *EcoRI-AC/MseI-CAG*. A-F denote repeated extractions from the same specimen. Arrows show scored markers, * indicates polymorphic markers. (b) Electropherograms of AFLPs of *Russula crumecolor* obtained by protocol 2 (fluorescent labelling) with primer pair *EcoRI-AT/MseI-CT*. Samples 95a and 95b are repeated extractions from the same sample. 94 and 95 belong to the same gene, 101 and 102 are relatively similar to each other but different from 95/94. Arrows show marker bands which were present and scored in at least one of the samples shown, markers polymorphic in the samples shown are indicated by *.

Black Robin



Individuos casi idénticos!



Bush Robin

MICROSATELITES

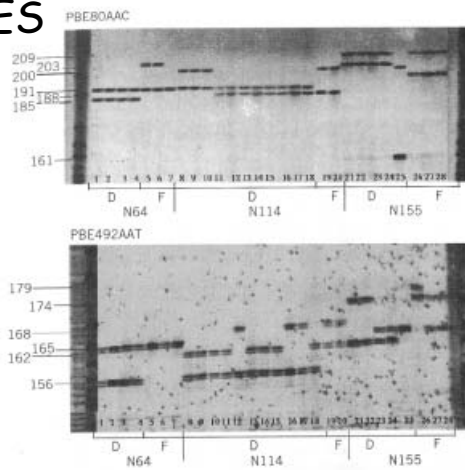
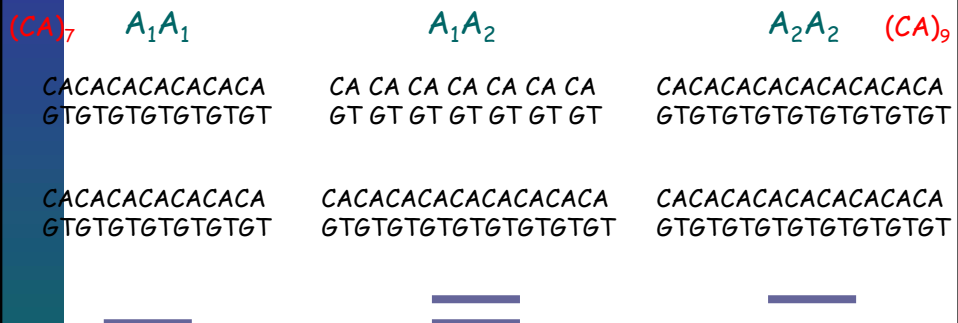
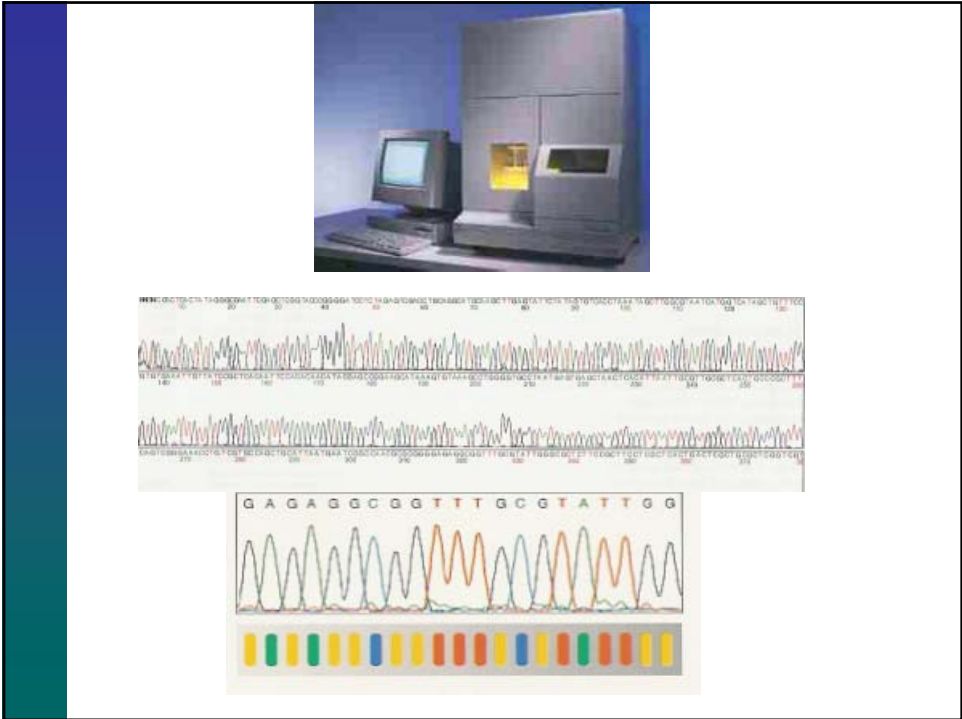
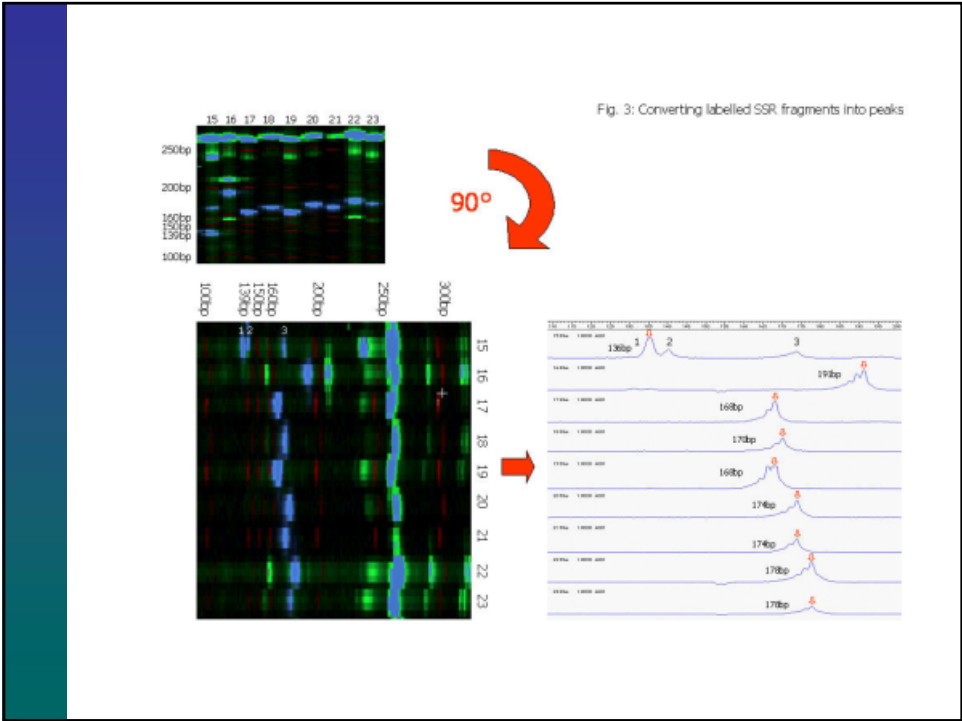


Figure 1. Trinucleotide microsatellite genotypes of *Polistes bellcosus* mothers and daughters on three colonies and two loci. Note the virtual absence of stutter bands from these trinucleotide repeats. The outside lanes are size markers from the C lane of an M13 sequence. For each colony, D indicates daughters and F indicates foundresses, or mothers. Lacking paternal genotypes, daughters cannot always be assigned unambiguously to one mother. However, it is clear from her score at PBE80AAC that daughter 25 is not the offspring of any of the foundresses on the colony. Daughter 25's score from PBE492AAT is consistent with this result, but this locus alone does not rule out any of the queens as mothers. Taken together, however, these data indicate that daughter 25 probably wandered over from another nest. (From Strassmann et al., 1995, by permission. <http://www.rice.edu/wasps>)

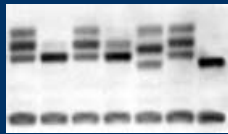
Secuencia de tres genotipos:





Descriptores básicos para cuantificar la extensión y los patrones de variación genética dentro y entre las poblaciones

Identificar genotipos



Identificar alelos



Determinar la frecuencia alélica en cada locus (frecuencia génica)



Análisis estadístico de los datos; determinar la asociación de alelos (dentro y entre loci)



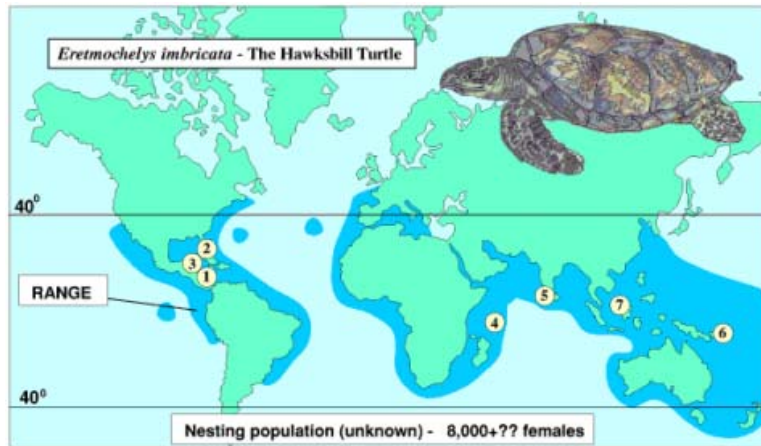
Inferencias a partir de la diversidad genética como la estructura de la población y los procesos evolutivos que la afectan (deriva genética, endogamia, flujo genético etc.)

Genética de poblaciones

...

- Estudiar las fuerzas evolutivas que resultan en cambios genéticos en las especies a través del tiempo
- Conocer y caracterizar el grado de variación genética dentro de las especies

NO es posible conocer la estructura genética de las poblaciones!

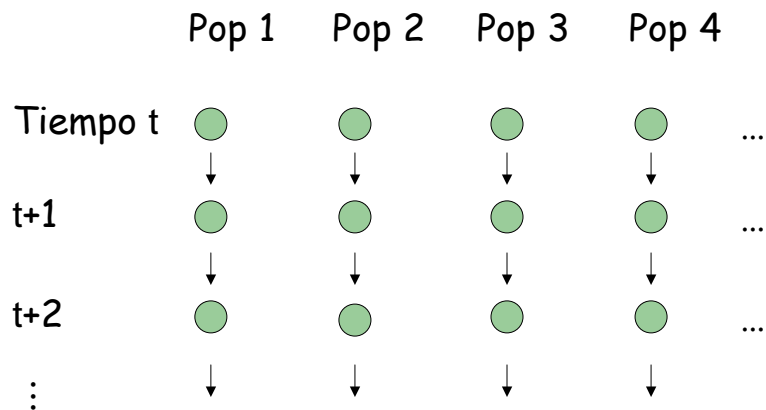


$$t_1 = x$$
$$t_2 = y$$

Cómo se investiga?

Se ignora la complejidad de las poblaciones reales y se enfoca únicamente en la variación de uno o pocos loci en un tiempo específico y en una población que se asume en equilibrio

Modelo: población ideal en equilibrio



∞ , apareamiento al azar, no migración, mutación o selección



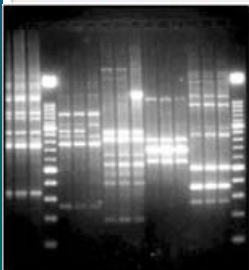
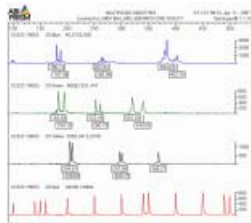
poblaciones en equilibrio Hardy-Weinberg

El modelo de la **población ideal es irreal**. Las **desviaciones significativas** en las frecuencias alélicas son una indicación de la violación de una o más de las suposiciones de este modelo. Por lo tanto, intuimos que están **actuando procesos naturales o inducidos** que afectan la población.

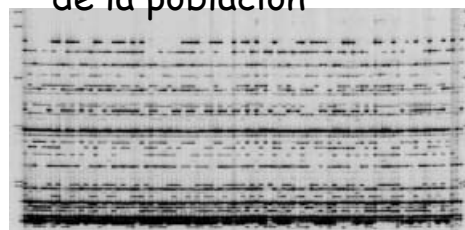
Procesos evolutivos

Flujo genético	Movimiento de nuevos alelos en las poblaciones
Deriva génica	Cambios en la frecuencia alélica debidos al azar
Mutación	Cambios al azar en el ADN
Recombinación	Rearreglo de los alelos asociado con meiosis y/o mitosis
Selección	Cambios en las frecuencias alélicas debido a diferencias en la reproducción y sobrevivencia

Cómo se descubren los procesos que están afectando a la población?



Explorando la constitución genética de los individuos de la población

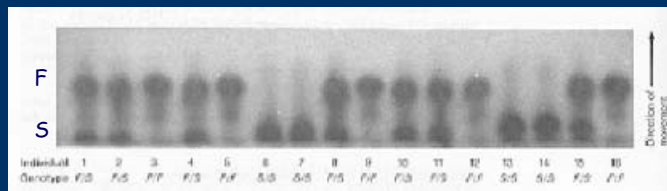


```
GCGGCCCA TCAGGTAGTT GGTGGCCCGT
GCGGCCCA TCAGGTAGTT GGTGG---GT
GCGTTCCA TCAGCTGGTT GGTGGCCCCT
GCGTCCA TCAGCTAGTT GGTGGCCCGT
GCGGCGCA TTAGCTAGTT GGTGA---GT
```



Eider ducks

glucose phosphate isomerase



	genotipos			
	FF	FS	SS	Total
observados	37	24	6	67
Frecuencias genotípicas (proporción)	0.552	0.358	0.090	1.00

Frecuencia alélica 2 alelos **p y q** diploides

Cada homocigoto porta 2 copias del mismo alelo

$$P(A) = [2(AA) + (Aa)]/2n$$

Cada individuo porta 2 alelos por locus

	genotipos			
	FF	FS	SS	Total
observados	37	24	6	67
Frecuencia alélica	2 alelos	p y q	diploides	
$p = \frac{(2 \times FF) + FS}{2 \times \text{total}}$	$p = \frac{(2 \times 37) + 24}{2 \times 67} = 0.73$			
	$q = 0.27$			

Diversidad alélica (A) =
promedio del número de alelos por locus

$$A = \frac{(2 + 3 + 2 + 1 + 1 + 1 + 1 + 1 + 1 + 1)}{10} = 1.4$$

Es la suma de todos los alelos detectados en todos los loci, divididos por el número total de loci

alozimas

	genotipos			
	FF	FS	SS	Total
observados	37	24	6	67

Heterocigosidad observada (H_o): $24/67 = 0.36$

Entre poblaciones:

Heterocigosidad promedio (H)

Ej:

$$H = \frac{(0.36 + 0.2 + 0.1 + 0.0 + 0.1 + 0.0 + 0.08)}{7} = 0.12$$

Frecuencias genotípicas esperadas

∞ , apareamiento al azar, no migración, mutación o selección \rightarrow poblaciones en equilibrio Hardy-Weinberg

	♀	A_1	A_2	
		p	q	
A_1	p	p^2	pq	$A_1 A_1$ $2A_1 A_2$ $A_2 A_1$ $A_2 A_2$
♂		$A_1 A_1$	$A_1 A_2$	$p^2 + 2pq + q^2 = (p + q)^2 = 1$
A_2	q	pq	q^2	
		$A_2 A_1$	$A_2 A_2$	

Si la frecuencia de los alelos A_1 y A_2 es 0.9 y 0.1

Las frecuencia genotípicas esperadas en equilibrio Hardy-Weinberg son:

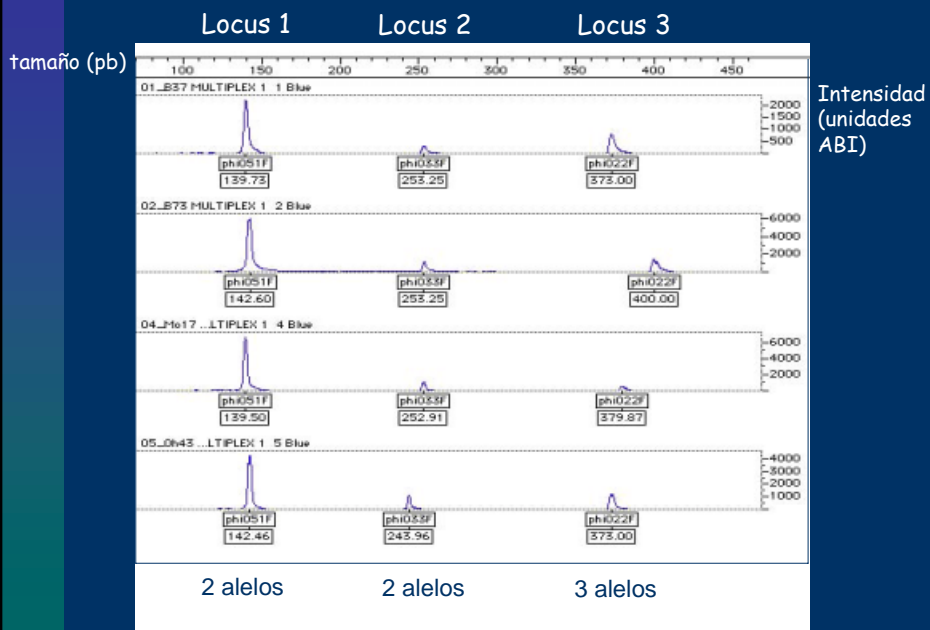
$$0.9^2 + 2 \times 0.9 \times 0.1 + 0.1^2 = 1.0$$

Las frecuencias observadas se comparan con las esperadas bajo EHW

	genotipos			
	FF	FS	SS	Total
Observados	37	24	6	67
	p^2	$2pq$	q^2	1.00
Frecuencias esperadas	0.73^2	$2 \times 0.73 \times 0.27$	0.27^2	1.00
observadas	0.552	0.356	0.090	1.00
Genotipos esperados (Frecuencias esperadas X 67)	35.7	26.4	4.9	67

Esta en equilibrio!

SSRs de maiz



Cuando hay más de dos alelos (microsatélites Tarr et al, 1998):

primer A_1
→ ...GATAGCTT**GAGAGAGAGAGAG**CTATTG...
...CTATCGAA**CTCTCTCTCTCT**GATAAC... ←

A_2
→ ...GATAGCTT**GAGAGAGAGAGAG**CTATTG...
...CTATCGAA**CTCTCTCTCTCT**GATAAC... ←

A_3
→ ...GATAGCTT**GAGAGAGAGAGAG**CTATTG...
...CTATCGAA**CTCTCTCTCTCT**GATAAC... ←

Cuando hay más de dos alelos (microsatélites Tarr et al, 1998):

Heterocigosidad esperada

$$H_e = 1 - \sum p_i^2 \quad p_i \text{ es la frecuencia del alelo } i^{\text{th}}$$

Tres alelos en un locus

$$H_e = 1 - [(p_1)^2 + (p_2)^2 + (p_3)^2]$$

$$H_e = 1 - [(0.364)^2 + (0.352)^2 + (0.284)^2]$$

$$H_e = 0.663$$

$$H_o = 0.456$$

No esta en equilibrio!

Las **desviaciones** a las frecuencias genotípicas esperadas bajo el HWE, nos permiten detectar endogamia, fragmentación de las poblaciones, migración, selección, etc.

Análisis básico de la diversidad genética

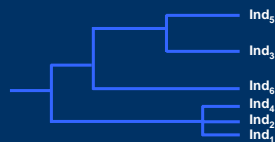
1. Descripción de la variación dentro y entre poblaciones

M a t r i z d e d a t o s	Individuos					
	1	0	1	1	0	1
	1	0	0	0	1	1
	0	1	1	0	1	0
	1	0	0	0	1	1
	0	0	1	1	0	0
	1	1	1	0	0	0
	1	0	1	0	1	1

2. Cálculo de relaciones genéticas entre individuos o poblaciones

	01	02	03	04	05	06
01	0					
02	0.56	0				
03	0.33	0.33	0			
04	0.47	0.26	0.50	0		
05	0.32	0.43	0.37	0.28	0	
06	0.33	0.56	0.56	0.37	0.46	0

3. Expresión de las relaciones



AMOVA (Excoffier et al, 1992)

Análisis jerárquico de varianza. Separa y prueba niveles de diversidad genética

- Diversidad entre grupos de poblaciones
- Diversidad entre las poblaciones dentro de grupos
- Diversidad entre los individuos dentro de una población

Efectos inmediatos en poblaciones pequeñas

1. Disminución del promedio de heterocigosidad
2. La transmisión de algunos alelos no es al azar
3. Hay endogamia

50 = alto riesgo
250 = riesgo
1000 = vulnerable



Algunas especies han sufrido una reducción en su tamaño (cuello de botella) pero se han recuperado en número

Mauritius kestrel



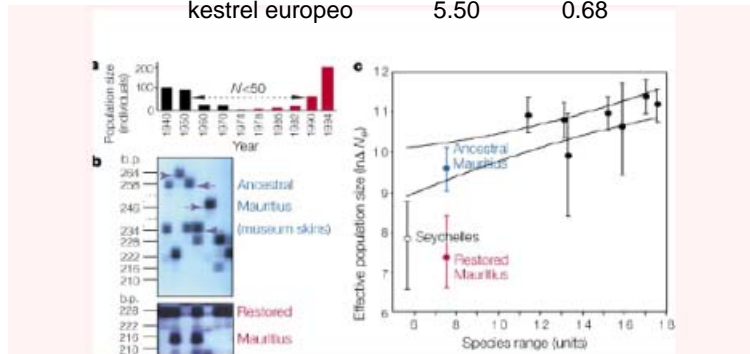
de un par a 400-500 individuos

elephant seals



de 20-30 individuos a más de 150,000

Especies	A	H _o
Amenazadas		
Mauritius kestrel		
Restaurado	1.41	0.10
Pieles de museo	3.10	0.23
No amenazadas		
kestrel europeo	5.50	0.68



a. Key population size across the bottleneck records from Mauritius natalata (black bars) and the Mauritius Wildlife Foundation (red bars); data estimated at 4-year intervals. b. Hexanucleotide microsatellite genotypes of Mauritius kestrel museum skins (top) include a mixture of alleles unique to the ancestral population (arrows) and those found in the restored population (bottom). c. The relationship between estimates of effective population size and species range. The 95% confidence limits are shown for the linear regression through all species, including the restored Mauritius (red) and Seychelles (white) population. Points show modal N_e values estimated using the likelihood function for the β -allele model; error bars show the 95% credible interval.