

Vybrané kapitoly genetiky pre lesníkov

NÁPLŇ A KLASIFIKÁCIA GENETIKY

Genetika je veda o dedičnosti a premenlivosti živých organizmov. Pojem premenlivosti bol zadaný v predchádzajúcej kapitole – premenlivosť je základnou vlastnosťou živých organizmov a spočíva v tom, že živé organizmy sa vyznačujú rozdielnymi vlastnosťami, sú nositeľmi rozdielných variantov jednotlivých znakov. Táto odlišnosť sa prejavuje na všetkých taxonomických úrovniach, teda aj jedinci rovnakého druhu zdieľajúci rovnaké druhové vlastnosti sa navzájom odlišujú individuálnymi vlastnosťami. Pod dedičnosťou rozumieme schopnosť organizmov produkovať potomstvo, ktoré na rovnaké podmienky reaguje rovnakým spôsobom, t.j. v rovnakých podmienkach prostredia sa bude vyznačovať podobnými individuálnymi vlastnosťami (kvalitatívnymi a kvantitatívnymi znakmi) ako jeho rodičia.

Prenos dedičnej informácie súvisí s procesmi na všetkých úrovniach organizácie živej hmoty. Jednotlivé oblasti genetiky sa zaoberajú práve týmito rôznymi úrovňami a rôznymi aspektmi týchto procesov. Molekulárna genetika (ako súčasť širšej oblasti molekulárnej biológie) rieši otázky účasti jednotlivých typov organických makromolekúl na dedičnosti a molekulárnej podstaty uloženia a zmnožovania dedičnej informácie a jej vzťahu k fenotypovým znakom, ktoré ovplyvňuje. Rieši teda otázky vzťahu medzi dedičnou informáciou a štruktúrou organickým makromolekúl, ktoré sú jej nositeľmi, a procesov, ktoré sú nutné pre vytváranie produktov dedičnej informácie. Cytogenetika sa zaoberá bunkovými štruktúrami a procesmi v rámci života bunky, ktoré súvisia s dedičnosťou (jadro a semiautonómne orgány s vlastnou dedičnou informáciou, bunkový cyklus vrátane delenia bunky). Predmetom genetiky jedinca (genetiky *sensu stricto*, teda v pôvodnom mendelovskom chápaní) sú otázky dedičnosti fenotypových znakov, teda otázka, ako sa vonkajšie vlastnosti dedia, prenášajú z rodičov na potomstvo. Mechanizmy určujúce zmeny zastúpenia génov v rámci populácií sú predmetom populačnej genetiky, ich odraz v rozdelení a vývoji hodnôt fenotypových znakov skúma kvantitatívna genetika (niekedy sú oba odbory chápané ako totožné).

Aj keď základné princípy dedičnosti sú spoločné pre všetky živé organizmy, existujú odbory genetiky zamerané na konkrétne druhy alebo vyššie taxóny (človeka, rastliny, etc.). Súvisí to najmä s rozdielnym praktickým významom rôznych aspektov dedičnosti u rôznych organizmov. V humánnej genetike je nepochybne dôležitá otázka podstaty a prenosu jednotlivých dedičných ochorení, ktorá je naopak absolútne irelevantná v genetike baktérií alebo genetiky lesných drevín.

Špecifické odbory genetiky vznikajú na rozhraní s inými vednými odbormi, predovšetkým evolučnou biológiou (evolučná genetika), ekológiou (ekologická genetika), ochranou prírody (ochranárska resp. „konzervačná“ genetika) a pod.

Samostatné odvetvie vzniklo na rozhraní molekulárnej biológie, fyziológie a genetiky, a je označované ako genomika. Predmetom genomiky je skúmanie štruktúry a funkcií genómu, teda súboru všetkých dedičných informácií v rámci živej bunky. Predmetom genomiky je skúmanie štruktúry genómu, teda „čítanie“ dedičnej informácie (sekvenovanie DNA), identifikácia génov a ďalších úsekov v genóme (štruktúrálna genomika) a identifikácia funkcií génov, teda aké molekulárne a fyziologické procesy v organizme riadia (funkčná genomika). Samostatnou oblasťou je epigenomika, ktorá sa zaoberá skúmaním chemických modifikácií molekúl nesúcich dedičnú informáciu, ktoré nemenia „poradie písmen“ v ich rámci a teda ani kvalitu produktov génov, ale ovplyvňujú mieru a čas ich expresie a teda aj výsledné fenotypové znaky. V ekologických štúdiách sa v poslednej dobe široko uplatňuje metagenomika, analýza vzoriek odobratých priamo z prostredia a obsahujúcich zmes genetického materiálu spoločenstva. Aj keď sa primárne zameriava na prokaryotické spoločenstvá (napr. bakteriálne spoločenstvo pôd), je v princípe uplatniteľná aj pri spoločenstvách vyšších organizmov.

Ako samostatný odbor sa takisto vyvinula bioinformatika, ktorá sa zaoberá spracovaním a interpretáciou obrovských objemov dát, ktoré v rámci genetického a molekulárno-biologic-

kého výskumu vznikajú.

ZÁKLADNÉ POJMY A PROCESY V GENETIKE

Vlastnosti živej hmoty

Neexistuje žiadna jednoznačná a konsenzuálne prijímaná definícia života. Zo znakov, ktorými sa vyznačuje živá hmota, sa najčastejšie uvádzajú nasledovné:

- **Organizácia.** Živé organizmy vyznačujú prísnu štruktúrou na viacerých úrovniach. Na najnižšej, bunečnej úrovni sa skladajú z veľkého množstva organických látok, ktoré v bunke vykonávajú rôzne funkcie, a sú v závislosti na týchto funkciách priestorovo organizované v rámci rôznych bunkových kompartmentov. Pri mnohobunkových organizmoch rovnako prísne pravidlá platia aj z hľadiska usporiadania buniek na vyšších úrovniach, teda na úrovni pletív či orgánov.
- **Metabolizmus.** V organizmoch prebieha neustála transformácia látok a energie, jednak formou konverzie organických či anorganických látok prijímaných z prostredia na látky bunke vlastné pri spotrebe energie (anabolizmus), jednak odbúravaním vytvorených zložitejších organických látok na jednoduchšie, resp. až na anorganické látky, čím sa energia v celkovej binácii naopak získava (katabolizmus).
- **Homeostáza.** Organizmy sú schopné udržiavať svoje vnútorné prostredie v dynamickej rovnováhe, ktorá vytvára predpoklad pre plnenie životných funkcií. V rámci určitých limitov sú schopné odchýlky od tohoto rovnovážneho stavu kompenzovať, prekročenie týchto limitov môže viesť k nevratným zmenám a následne k smrti organizmu.
- **Rast.** V dlhodobom horizonte musia byť organizmy schopné udržiavať vyššiu úroveň anabolizmu v porovnaní s katabolizmom.
- **Reprodukcia.** Vzhľadom na variabilitu prostredia sa každý organizmus (aj keby nemal inherentné mechanizmy vedúce k jeho smrti) nutne musí stretnúť s podmienkami, v ktorých nie je schopný udržať homeostázu. Predpokladom udržania života v dlhšej perspektíve je teda schopnosť produkovať nové organizmy.
- **Dráždivosť.** Organizmus musí byť schopný prijímať signály z prostredia a reagovať na ne.

Z evolučného hľadiska je vlastnosťou skôr živej hmoty ako takej než konkrétneho organizmu adaptácia, schopnosť prispôbovania. Organizmy musia byť schopné meniť svoje vlastnosti v odozve na zmeny prostredia a prenášať tieto zmeny na potomstvo.

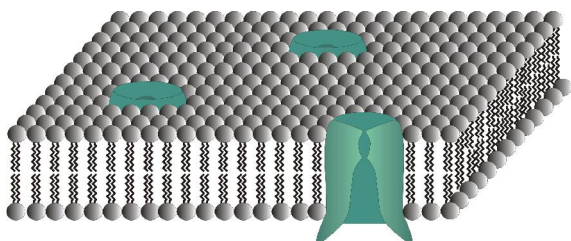
Molekulárne základy dedičnosti

Základy biochémie bunky

Ako bolo spomenuté, v bunke neustále prebieha množstvo chemických reakcií, ktoré sú podstatou života. Aby si bunka mohla zachovať vlastnosti živej hmoty, musia tieto reakcie prebiehať vysoko usporiadane. Pre splnenie tejto podmienky je nutné splnenie dvoch predpokladov: (i.) bunka musí byť priestorovo organizovaná – oddelená od vonkajšieho prostredia, prípadne aj rozdelená na uzavreté útvary (kompartmenty), medzi ktorými prebieha riadený prenos látok a energie (ii.) väčšina reakcií nemôže prebiehať spontánne, musia byť katalyzované.

Na zabezpečenie priestorovej organizácie slúžia primárne lipidy, teda estery mastných kyselín. Existuje viacero typov lipidov; jedna ich skupina, fosfolipidy má tendenciu zhlukovať sa a vytvárať ploché útvary, ktoré sú základom bunkových membrán. Membrány sú tvorené lipidovou dvojvrstvou, v ktorej hydrofóbne konce fosfolipidových molekúl (zvyšky mastných kyselín, tvorené dlhým alkylovým reťazcom) sú orientované smerom dovnútra dvojvrstvy a hydrofilné konce (fosforylovaný glycerol a karboxylový zvyšok mastnej kyseliny) sú orientované navonok, teda smerom do vodného prostredia cytoplazmy (obr. 1). Malé molekuly (voda, CO₂, O₂) sú schopné cez membrány difundovať, väčšina

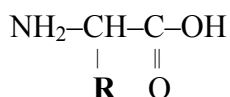
iónov a väčšie molekuly však musia byť cez membránu aktívne prenášané; prenos spravidla zabezpečujú proteínové kanály.



Obr. 1 Schéma lipidovej dvojvrstvy s proteínovým kanálom
(<http://www.sophion.dk/sophion/Membrane-channels3.jpg>)

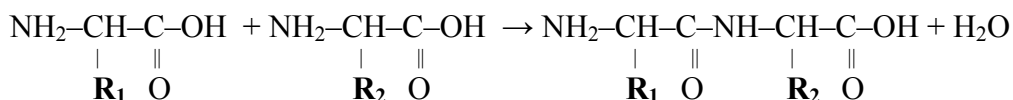
Obrovskú väčšinu katalytických funkcií vykonávajú špecializované proteíny – enzýmy. Ich názvy končia príponou –áza a sú spravidla odvodené z typu reakcie, ktorú zabezpečujú, alebo názvu substrátu, ktorý metabolizujú.

Základom proteínov (bielkovín) je vždy polypeptidový reťazec. Niekedy môžu obsahovať aj ďalšiu zložku – sacharid (glykoproteíny), lipid (lipoproteíny), hém (hemoglobín) a pod., ale väčšina je tvorená jedným polypeptidom (monoméne proteíny) alebo viacerými rovnakými či odlišnými polypeptidovými jednotkami (oligoméne proteíny). Základným stavebným kameňom polypeptidov sú aminokyseliny, teda organické kyseliny, ktoré okrem karboxylovej skupiny ($-\text{COOH}$) obsahujú aj aminoskupinu ($-\text{NH}_2$):



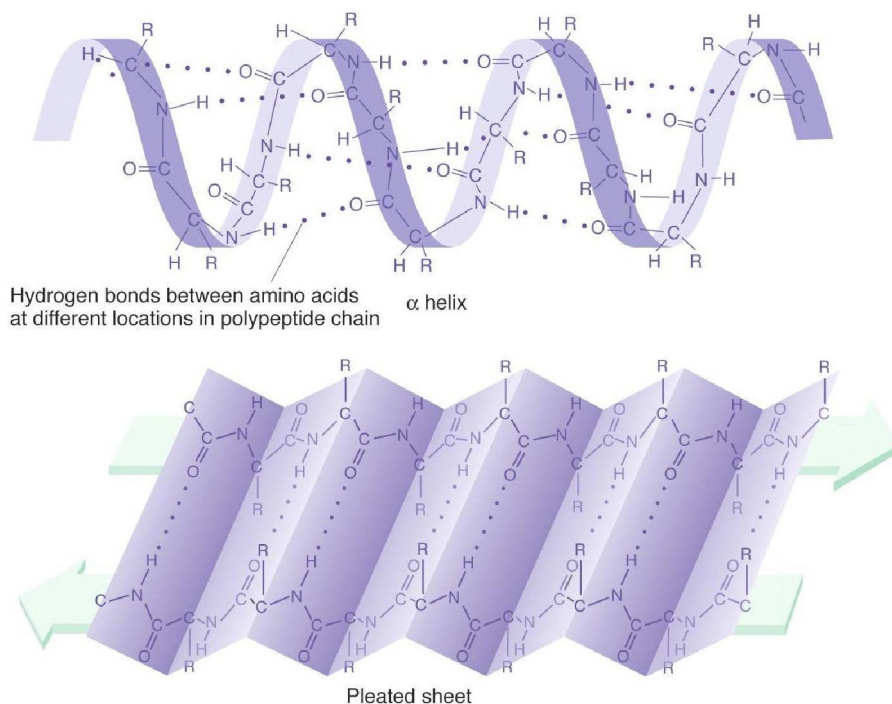
V proteínoch sa vyskytuje 20 rozličných (tzv. esenciálnych) aminokyselín, ktoré sa od seba odlišujú zvyškom (R), ktorý určuje ich chemické vlastnosti. Pri niektorých je zvyšok alifatický reťazec (alanín, leucín, izoleucín, valín), aromatický cyklus (fenylalanín, tyrozín, tryptofán) a je teda elektricky neutrálny a hydrofóbny. Úseky proteínov bohaté na tento typ aminokyselín budú vykazovať afinitu k lipidovým membránam. Pri iných je zvyšok elektroneutrálny, ale hydrofilný, pretože obsahujú hydroxylový radikál alebo amidovú skupinu (serín, treonín, asparagín, glutamín). Ďalšie aminokyseliny sa vo vodnom roztoku elektricky nabíjajú, buď negatívne odštiepením protónu z karboxylovej skupiny vo zvyšku (kys. glutámová a asparágová), alebo pozitívne naviazaním protónu na dodatočnú amino- či iminoskupinu (arginín, histidín, lyzín). Samostatnú heterogénnu skupinu tvoria ďalšie aminokyseliny so špecifickými vlastnosťami (glycín, cysteín resp. selenocysteín, prolín). Napríklad cysteín obsahuje $-\text{SH}$ skupinu, ktorá umožňuje vytvorenie veľmi pevnej kovalentnej väzby (disulfidického mostíka) medzi dvoma cysteínmi v rámci jedného polypeptidového reťazca.

Aminokyseliny sa medzi sebou viažu tzv. peptidickou väzbou medzi aminoskupinou jednej a karboxylovou skupinou ďalšej aminokyseliny:



(rovnica reakcie je samozrejme čisto schématická, v skutočnosti tvorba polypeptidov prebieha podstatne zložitejšie, vid' ďalej). Reťazec polypeptidu je lineárny, nerozvetvený, pozostáva zo za sebou radených aminokyselín. Poradie aminokyselín sa označuje ako primárna štruktúra polypeptidu. Reťazec samozrejme nie je priamy, jednotlivé jeho časti sa usporiadávajú do viacerých typov priestorovej štruktúry (sekundárna štruktúra) – najčastejšia je špirálovitá štruktúra (α -skrutkovica) alebo plochá štruktúra (β -list), ktoré sú stabilizované vodíkovými mostíkmi medzi kyslíkmi karboxylových zvyškov a vodíkmi $-\text{NH}-$ skupín (obr. 2). Nakoniec segmenty polypeptidového reťazca zaujmú niektorú zo stabilných priestorových konformácií. Priestorový trojrozmerný tvar proteínu (terciárna štruktúra) je určujúci pre jeho

funkčnosť. Utvára a stabilizuje sa striedaním úsekov s rozdielnou sekundárnou štruktúrou a vytváraním rozličných typov chemických väzieb (vodíkové mostíky, zriedkavejšie kovalentné väzby) medzi zvyškami aminokyselín v rôznych častiach reťazca. Niektoré proteíny sú schopné zaujímať viac stabilných priestorových konformácií (alosterické proteíny) a v rôznych konformáciách vykonávať rozdielne funkcie. Oligomérmne proteíny sa skladajú z viacerých polypeptidových jednotiek, ich usporiadanie sa označuje ako kvartérna štruktúra proteínu (obr. 3).



Obr. 2 Sekundárna štruktúra proteínov: α -skrutkovica (hore) a β -list (dole). (http://www.mun.ca/biology/scarr/MGA2_03-18b.html)



Obr. 3 Kvartérna štruktúra proteínov: ribulózo-5-bifosfát-karboxyláza (RuBisCO; enzým viažuci CO_2 pri fotosyntéze, zložený z 2 typov polypeptidov: 4 veľkých a 8 malých podjednotiek). (http://www.mun.ca/biology/scarr/MGA2_03-18b.html)

V dôsledku samotného metabolizmu vznikajú v bunke látky, ktoré sú schopné poškodiť biogénne molekuly a množstvo ďalších takýchto látok vniká do bunky z vonkajšieho

prostredia. Naviac je vonkajšie prostredie premenlivé a bunka naň musí reagovať. V rôznych situáciách teda potrebuje rôzne biogénne látky v rôznych množstvách a musí byť schopná nahrádzať poškodené molekuly. Okrem toho bunka musí byť schopná reprodukovať svoje štruktúry pri bunkovom delení. Keďže prevažná väčšina katalytických, signálnych a transportných funkcií v bunke je zabezpečovaná proteínmi, kompletná proteínová výbava bunke postačuje na to, aby si dokázala autonómne zosyntetizovať akékoľvek ďalšie látky, ktoré potrebuje k životu (pokiaľ ich v hotovej podobe neprijíma z vonkajšieho prostredia). Bunka teda nepotrebuje uchovávať informácie o štruktúre všetkých látok, z ktorých sa skladá, stačí jej uchovávať informáciu, na základe ktorej je schopná vytvárať všetky svoje proteíny. Uchovávanie tejto informácie je podstatou dedičnosti.

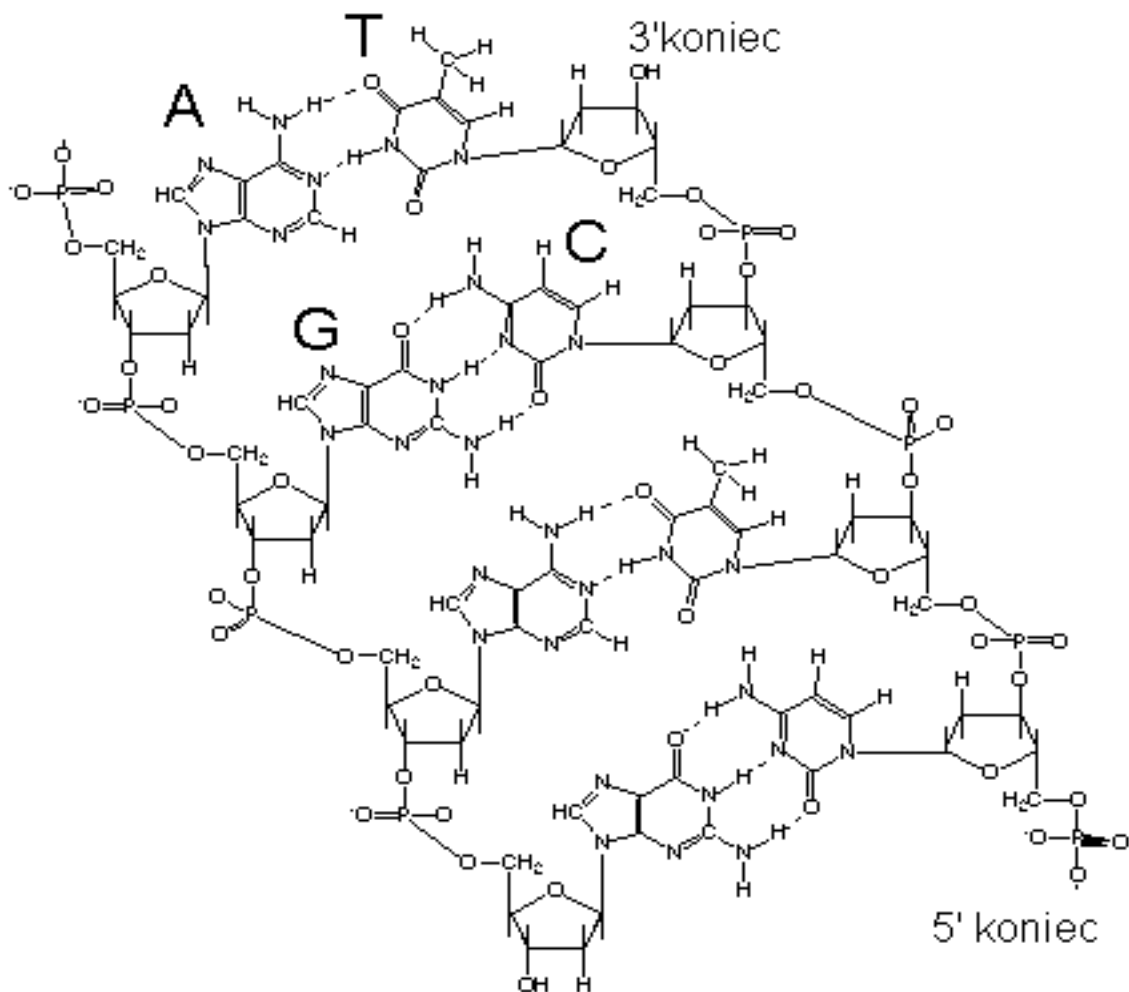
Štruktúra nukleových kyselín

Nositeľom dedičnej informácie sú u všetkých živých organizmov molekuly nukleových kyselín. U prevažnej väčšiny organizmov je to kyselina deoxyribonukleová (DNA), výnimku predstavujú retrovírusy resp. RNA-vírusy (je potrebné pripomenúť, že vírusy nevykazujú všetky znaky života, mnohí biológovia ich nepovažujú za živé organizmy), v ktorých je nositeľom dedičnosti molekula kyseliny ribonukleovej (RNA). Aj v prípade retrovírusov však dedičná informácia musí byť najprv prenesená do molekuly DNA a až následne sa môže exprimovať do fenotypových znakov.

Nukleové kyseliny sú organické makromolekuly, neporovnateľne väčšie než všetky ostatné organické polyméry živých organizmov. Najdlhšia molekula DNA genetickej výbavy človeka má celkovú dĺžku 7 cm, sumárna dĺžka 46 molekúl DNA uložených v jadre ľudskej bunky je cca 1,8 m. DNA a RNA sú nerozvetvené molekuly, pozostávajúce zo stavebných kameňov označovaných ako nukleotidy (v prípade DNA je terminologicky správny názov 2-deoxynukleotid). Nukleotid skladá z fosforylovanej pentózy (jednoduchý sacharid s 5 atómami uhlíka; pri DNA 2-deoxyribóza, pri RNA ribóza, na pozícii 5' je naviazaný fosfátový zvyšok PO_4^-) a jednej zo štyroch heterocyklických organických báz (adenín, guanín, cytozín, pri DNA tymín, pri RNA uracil) (obr. 4). Pentózofosfátové molekuly vytvárajú kostru reťazca, na ne naviazané bázy predstavujú písmená genetickej „abecedy“, ich poradie (sekvencia) na molekule DNA predstavuje zápis genetickej informácie analogicky ako je určený zápis informácie v napísanom texte poradím písmen latinskej či inej abecedy. Označovanie nukleotidov v sekvenciách je uvedené v tab. 1. Pozície, ktoré sú tzv. konzervované, t.j. v danej sekvencii sa na nich vyskytuje vždy konkrétny nukleotid, sa označujú prvými písmenami názvu bázy (A, G, C, T, U), pozície variabilné v rámci populácie, druhu alebo inak definovanej skupiny jedincov sú označované inými písmenami (tab. 1). Vo všeobecnosti spoločné označenie pre bázy, ktoré sú derivátmi purínu (dvojitý cyklus: A, G) je Pu, spoločné označenia pre deriváty pyrimidínu (jednoduchý cyklus: C, T, U) je Py. Zápis sekvencie nejakého génu alebo nekódujúceho úseku u určitej skupiny organizmov v tvare napr. 5'CGGAYTTAGVGGTCNCCTA3', znamená to, že okrem troch pozícií sú ostatné konzervované, na 5. pozícii sa vyskytuje jeden z pyrimidínových nukleotidov (C, T), na 10. pozícii sa vyskytuje adenín, cytozín alebo guanín, a na 15. pozícii sa môže vyskytovať ktorýkoľvek nukleotid (alebo nukleotid nemožno určiť). Dĺžka sekvencií DNA sa udáva v báзовých pároch (bp), teda v počte dvojíc nukleotidov. Sekvencie, ktoré sú navzájom homologické, nemusia byť úplne identické, ale majú spoločný pôvod, teda vznikli diverzifikáciou rovnakej sekvencie v genóme. Môže ísť o dve sekvencie umiestnené vo fyzicky rozdielnych molekulách DNA, ale aj o sekvencie pochádzajúce z duplikácie úseku na tej istej molekule DNA.

Tab. 1 Označovanie nukleotidov v zápise sekvencií nukleových kyselín

ozn.	Nukleotid	ozn.	nukleotid	ozn.	nukleotid
A	Adenín	R	A/G	B	C/G/T
G	guanín	Y	C/T	D	A/G/T
C	cytozín	K	G/T	H	A/C/T
T	tymín	M	A/C	V	A/C/G
U	uracil	S	G/C	N	A/G/C/T
		W	A/T		



Obr. 4 Znáozornenie chemickej štruktúry úseku molekuly DNA

V molekule pentózy je báza naviazaná na pozícii 1', fosfátový zvyšok na pozícii 5' sa naväzuje na uhlík v pozícii 3' predchádzajúceho nukleotidu (obr. 4). Molekuly nukleových kyselín sú teda priestorovo orientované. Syntéza reťazca prebieha vždy v smere 5'→3', t.j. voľné nukleotidy sa vždy naväzujú na hydroxylovú skupinu na 3' uhlíku na konci reťazca nukleovej kyseliny. Molekula DNA je vytvorená dvomi antiparalelne (protismerne) prebiehajúcimi reťazcami, ktoré sú vzájomne viazané prostredníctvom vodíkových mostíkov medzi bázami. Vzhľadom na priestorové usporiadanie elektricky nabitých funkčných skupín na molekulách báz sa vodíkové mostíky vytvárajú vždy medzi konkrétnymi dvojicami báz: adenín sa viaže s tymínom dvomi vodíkovými mostíkmi, cytozín s guanínom tromi (A=T, C≡G). Oba reťazce DNA sú teda prísne komplementárne, poradie báz v jednom z nich jednoznačne určuje poradie báz v druhom. Molekula RNA je tvorená len jedným reťazcom.

Ak sa tento reťazec ohne, nukleotidy na ňom sa tiež dostávajú do protismerného postavenia, čo rovnako ako pri dvojreťazcovej DNA umožňuje vytvorenie väzieb medzi komplementárnymi bázami na rôznych miestach toho istého reťazca ($A=U$, $C\equiv G$). Práve tvorbou týchto väzieb sa utvára trojrozmerný tvar molekuly RNA, ktorý je následne podmienkou jej funkčnosti. Všetky jednoreťazcové molekuly nukleových kyselín (RNA, jednoreťazcová DNA) majú veľmi silnú tendenciu k párovaniu nukleotidov – vodíkové väzby sa vytvárajú spontánne. Ak je dvojreťazcová DNA denaturovaná chemicky alebo vysokou teplotou (vodíkové mostíky sa narušia a reťazce sa oddelia), na opätovnú renaturáciu postačuje obnovenie normálnych podmienok. Ak komplementárny reťazec alebo jeho časť nie je k dispozícii, jednoreťazcová molekula má silnú tendenciu sa prehnúť a vytvoriť vodíkové väzby medzi komplementárnymi (teda vzájomne sa dopĺňujúcimi) miestami v rámci rovnakého reťazca, čo v prípade RNA (bolo uvedené) je podmienkou jej funkčnosti, naopak v prípade DNA jej funkčnosť (teda schopnosť uskladiť a následne exprimovať genetickú informáciu) naopak ruší. Mimoriadnu schopnosť vzájomne komplementárnych reťazcov nukleových kyselín vyhľadávať a párovať sa využívajú metódy molekulárnej biológie a genetických manipulácií.

Celková genetická informácia bunky (kódujúce aj nekódujúce úseky) sa označuje termínom genóm. Veľkosť genómu a aj počet génov v jeho rámci závisí čiastočne od komplexnosti organizmu, ale čiastočne je výsledkom evolúcie genómu, organizmy s rovnakou zložitou stavbou tela môžu mať zásadne rozdielne veľkosti genómu.

Nie všetky nukleotidy v reťazci DNA majú informačný význam. Sekvencie, ktoré sú exprimované do fenotypových znakov predstavujú u mnohobunkových eukaryotov len zlomok z celkovej dĺžky DNA. Súčasťou genómu sú predovšetkým rôzne typy repetitívnych sekvencií (sekvencií opakujúcich sa vo veľkom počte kópií). Ich podstatnú časť tvoria transponibilné elementy (transpozóny), ktoré predstavujú „molekulárne parazity“, pravdepodobne pôvodne vírusy (RNA vírusy pri retrotranspozónoch, DNA vírusy pri DNA transpozónoch), ktoré sa v priebehu evolúcie zabudovali do genómu hostiteľa. Sú schopné presúvať sa na nové miesta v genóme a zmnožovať sa a obsahujú gény, ktoré im presun a zmnožovanie umožňujú (počet transpozónových génov často násobne prevyšuje počet vlastných génov organizmu). Známym je napríklad element *mariner*, ktorý sa vyskytuje u väčšiny živočíchov vrátane človeka (v ľudskom genóme sa počet kópií odhaduje na 14000 s celkovou dĺžkou 2,6 Mbp) a dokonca aj u niektorých prvkov. Ďalšiu skupinu repetitívnych sekvencií predstavujú tandemové opakovania krátkych sekvencných motívov (minisatelity a mikrosatelity).

Na rozdiel od vodíkových mostíkov viažucich navzájom reťazce nukleových kyselín sú kovalentné väzby v rámci nukleotidov resp. medzi za sebou nasledujúcimi nukleotidmi podstatne energeticky náročnejšie a teda pevnejšie, nie je možné štiepiť ich inak ako enzymaticky. Enzýmy štiepiace nukleové kyseliny sa označujú ako nukleázy (DNáza, RNáza).

DNA môže existovať vo viacerých priestorových konformáciách, v živých bunkách je najčastejšie prítomná ako pravotočivá špirála, v ktorej sú molekuly fosforylovanej deoxyribózy orientované pozdĺž oboch vlákien, vytvárajúcich kostru tejto špirály, a nukleotidy sú usporiadané v rovine kolmej na os špirály.

Pre kopírovanie a expresiu dedičnej informácie potrebuje bunka molekulárny aparát. Jeho podstatnú časť tvoria dva typy biokatalytických molekúl: RNA a proteíny. Komplexy RNA a bielkovín sú spravidla obrovské a tvoria často útvary viditeľné mikroskopom (napr. ribozómy). Spravidla zabezpečujú fundamentálne funkcie ako je zostrih DNA a preklad (viď nižšie). Dielčie katalytické funkcie vykonávajú špecializované enzýmy. S procesmi, súvisiacimi s dedičnosťou, je spojená najmä aktivita nukleáz (enzýmy štiepiace DNA), polymeráz (enzýmy katalyzujúce syntézu reťazca nukleových kyselín), ligáz (enzýmy spájajúce prerušené miesta reťazcov DNA), topoizomeráz (enzýmy rušiacie špirálovú štruktúru DNA), helikáz (enzýmy štiepiace vodíkové mostíky medzi reťazcami DNA alebo

v DNA-RNA komplexoch) a ďalších. Niektoré molekuly RNA sú schopné tiež vykonávať katalytické funkcie (ribozýmy).

Replikácia DNA

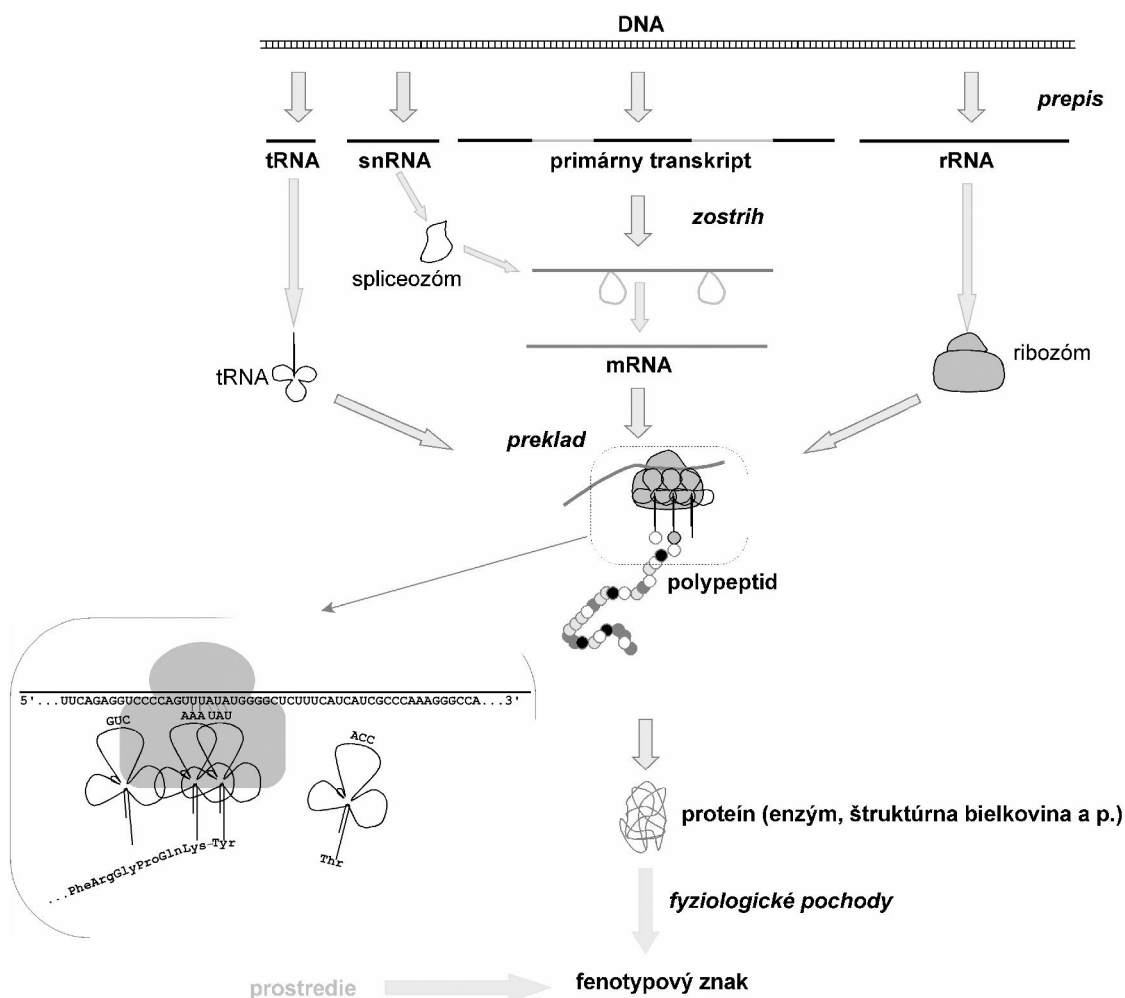
Keďže DNA predstavuje kompletný „návod“ pre všetky bunečné funkcie a (v prípade mnohobunkových organizmov) z neho vyplývajúci stavebný plán pre organizmus, musia všetky bunky obsahovať jeho identickú verziu. Mnohobunkové organizmy rastú primárne prostredníctvom delenia buniek (a jednobunkové organizmy sa touto cestou množia), preto sa pred rozdelením musia všetky molekuly DNA v materskej bunke identicky nakopírovať tak, aby dcérske bunky mohli dostať po jednej kópii. Tento proces kopírovania sa označuje termínom replikácia. Výsledkom replikácie DNA nie je dvojica molekúl originál – kópia, ale dve molekuly tvorené jedným originálnym aj jedným novo syntetizovaným reťazcom; tento mechanizmus sa označuje ako semikonzervatívna replikácia. Proces replikácie začína na špecifickom mieste chrmosómu, označovanom ako *origin* (u prokaryotov je spravidla jediný, na dlhých chromozómoch eukaryotov sú počiatkov rádovo stovky až tisíce) a riadi ho komplex enzýmov (topoizomeráza, helikáza, primáza, DNA-polymeráza, ligáza), ktorý najprv odvíja špirálovú štruktúru DNA, preruší nízkoenergetické vodíkové väzby, spájajúce oba reťazce pôvodnej molekuly DNA, na oba reťazce pripojí krátky oligonukleotid RNA označovaný ako primer (do 60 nukleotidov pri prokaryotoch, cca 10 pri eukaryotoch), ktorý slúži ako východisko syntézy druhého reťazca, a následne syntetizuje druhý reťazec postupným pripájaním nukleotidov kovalentnou väzbou odštiepením hydroxylovej skupiny na 3'-uhlíku posledného nukleotidu nového reťazca. Oba pôvodné reťazce sú navzájom komplementárne ($A=T$, $G\equiv C$) a do novovytváraných reťazcov sa takisto môžu zaradiť len nukleotidy, ktoré sú komplementárne k pôvodným. Preto týmto spôsobom vznikajú dve úplne identické molekuly, v ktorých vždy jeden reťazec je pôvodný a druhý je novo doplnený, obe sú teda spolovice originálom a spolovice kópiou. Syntéza molekuly DNA prebieha vždy v smere 5'→3', pôvodné reťazce sú však orientované protismerne. Preto môže syntéza jedného z nových reťazcov prebiehať kontinuálne od jediného primeru (*leading strand*), ale druhý reťazec je syntetizovaný v krátkych fragmentoch (Okazakiho fragmenty) v smere proti pohybu replikačnej vidlice od postupne pridávaných RNA primerov. RNA primery sú následne odbúrané exonukleázovou aktivitou DNA polymerázy, nahradené DNA nukleotidmi a fragmenty sú následne spájané ligázou (*lagging strand*).



Obr. 5 Schéma semikonzervatívnej replikácie DNA. Biely – pôvodný reťazec, čierny – novo doplnený reťazec (<http://www.genome.gov>, upravené)

Expresia génu

Gén predstavuje len úsek na molekule DNA. Ešte od čias T.H. Morgana, ktorý formuloval chromozómovú teóriu dedičnosti, sa tradovala predstava, že gény sú usporiadané za sebou bez vzájomného prekryvu. Gén bol teda považovaný nielen za funkčnú jednotku dedičnosti, ale aj za základnú štrukturálnu jednotku dedičnej matérie. Novší výskum túto predstavu spochybnil: u vírusov sa preukázalo, že gény sa môžu prekrývať, dokonca jeden gén môže byť umiestnený v rámci iného. U eukaryotov (ku ktorým patria všetky makroskopické organizmy, teda rastliny, huby a živočíchy) gény spravidla nie sú súvislé. V ich rámci sa striedajú kódujúce úseky (exóny), ktoré sú prestriedané nekódujúcimi úsekmi (intrónmi). Súčasťou génu je aj regulačná oblasť, predradená pred 5' koncom génu, ktorá určuje, kedy sa gén má začať exprimovať, a neprekladaná oblasť za 3'-koncom. Mechanizmy regulácie aktivity génov sú pri vyšších organizmoch zložité, podieľajú sa na nich napr. hormóny a iné látky.



Obr. 6 Schéma procesov spojených s expresiou génu eukaryotov

Proces od informácie uloženej v DNA po hotový produkt, ktorý určuje fenotypový znak kontrolovaný génom, sa označuje termínom expresia. Expresia génu prebieha cez dve štádiá (obr. 6). Prvým je transkripcia (prepis), t.j. prenos dedičnej informácie z DNA do molekuly RNA. Transkripcia prebieha tam, kde sú umiestnené molekuly DNA, t.j. v jadre, mitochondriách, u rastlín aj v chloroplastoch, a zabezpečuje ju enzým RNA-polymeráza, ktorý je komplexom 5 polypeptidov, z ktorých každý má pri prepise inú funkciu. Pri transkripcii sa reťazce DNA od seba odpoja (ako už bolo spomenuté, sú navzájom viazané len vodíkovými

mostíkmi, takže na ich rozpojenie nie je potrebná veľká energia) a k jednému z nich (antikódujúci reťazec) začne RNA-polymeráza pripájať komplementárne nukleotidy. Poradie nukleotidov v RNA je teda presne rovnaké ako v druhom (kódujúcom) reťazci DNA s tým rozdielom, že na mieste tymínu v kódujúcom reťazci DNA obsahuje reťazec RNA uracil. Produktom transkripcie je tzv. primárny transkript, ktorý najmä je pri eukaryotoch predmetom ďalších úprav. Primárny transkript obsahuje prepísané exóny aj intróny. Zmes primárnych transkriptov v jadre eukaryotickej bunky sa označuje ako heterogénna jadrová RNA (*heterogeneous nuclear RNA*; hnRNA).

Iniciáciu transkripcie umožňuje naviazanie sa transkripčného faktora na sekvenciu v regulačnej oblasti génu s priemernou dĺžkou okolo 10 bp (5–30 bp). Táto dĺžka sekvencie viažucej transkripčný faktor sa optimalizovala s ohľadom na potrebu špecificity (transkripčný faktor sa musí viazať výlučne v regulačnej oblasti génu, za reguláciu ktorého zodpovedá, inak by spúšťal expresiu iných génov, než je jeho úlohou) a stability (nízkej frekvencie mutácií). S narastajúcou dĺžkou viažucej sekvencie narastá špecificita (znižuje sa pravdepodobnosť, že sa rovnaká sekvencia náhodne vyskytne v genóme viackrát), ale klesá stabilita (narastá možnosť zmeny sekvencie v dôsledku mutácie a teda znemožnenia naviazania transkripčného faktora).

Zložitým procesom zostrihu sú intróny z primárneho transkriptu vystrihnuté a exóny pospájané. 5'-koniec je ukončený molekulou 7-metylgvanozínu a na 3'-koniec sa pripája polyadenylový reťazec (rádovo desiatky adenosínových nukleotidov), ktorý je „identifikačným znakom“ mediátorovej RNA (messenger RNA; mRNA). U prokaryotov (baktérie, archeobaktérie) DNA spravidla neobsahuje intróny, takže produktom transkripcie je priamo mRNA. Zostrih vykonáva útvar označovaný ako spliceozóm (z angl. *splicing* = zostrih), ktorý je zložitým komplexom proteínov a ďalšieho typu molekúl RNA, ktoré sa označujú ako malá jadrová RNA (*small nuclear RNA*; snRNA). Transkripciou sa vytvárajú aj iné funkčné molekuly RNA: transferová (transfer RNA; tRNA), ribozómová (ribosomal RNA; rRNA) a malá jadrová (small nuclear RNA; snRNA). Transkripciou vlastných úsekov DNA alebo z vystrihnutých intrónov vznikajú malé reťazce, označované ako mikroRNA (microRNA; miRNA), ktoré môžu interferovať s mRNA a zohrávajú úlohu pri regulácii aktivity génov.

Druhým štádiom expresie génu je translácia (preklad), t.j. prenos dedičnej informácie z mRNA do molekuly polypeptidu, ktorá tvorí základ bielkovinnej (proteínovej) molekuly. Molekula mRNA je prenesená cez póry jadrovej membrány do cytoplazmy, kde sa na ňu naviažu ribozomy. U prokaryotov sú lokalizované voľne v cytoplazme, u eukaryotov je väčšina naviazaná na membrány endoplazmatického retikula. Ribozóm je bunkový útvar, tvorený z cca 2/3 nukleovou kyselinou (pri eukaryotoch ide o 5 rôznych molekúl rRNA) a z 1/3 proteínmi (~50 molekúl), s dvomi podjednotkami. Veľkosť týchto podjednotiek je kvantifikovaná na základe sedimentačnej rýchlosti v Svedbergových jednotkách ($1S=10^{-13}s^{-1}$); sedimentačná rýchlosť závisí od veľkosti a tvaru, teda Svedbergove jednotky nie sú aditívne (súčet veľkostí podjednotiek nedáva veľkosť ribozómu). Mitochondrie a chloroplasty majú vlastné ribozomy, ktorých veľkosť je rovnaká ako u prokaryotov; preklad génov týchto organel prebieha priamo v nich. Pri preklade ribozóm funguje analogicky ako čítacia hlavica, ktorá číta a „prekladá“ genetickú informáciu z mRNA, ktorá sa cez ňu presúva. Po nasunutí trojice (triplet resp. kodón) nukleotidov mRNA sa na ňu pripojí molekula transferovej RNA. tRNA má štruktúru podobnú d'atelinovému trojlístku (3 unikátne sekvencie tvoriace oblúk „listov“ prestriedané vzájomne komplementárnymi sekvenciami tvoriacimi „stopky lístkov“ a „hlavnú stopku“). Na hlavnej stopke je naviazaná aminokyselina a na strednom liste trojlístka je rozoznávacia sekvencia – antikodón. Trojrozmerná štruktúra je uzavretejšia (obr. 7). Keďže vodíkové mostíky sa môžu vytvoriť len medzi komplementárnymi nukleotidmi, na kodón v mRNA sa môže napojiť len taká tRNA, ktorá má komplementárny antikodón. Ribozóm následne katalyzuje pripojenie aminokyseliny na jej stopke na vznikajúci reťazec

polypeptidu. Poradie trojíc nukleotidov (kodónov) v mRNA teda určuje poradie aminokyselín v polypeptide, tzv. primárnu štruktúru vznikajúcej bielkoviny. Znaký genetického kódu sú štyri (A, C, G, U) a ich trojica predstavuje kodón, genetický kód teda poskytuje $4^3 = 64$ možných kombinácií. Esenciálnych aminokyselín je len 21. Genetický kód je teda redundantný, viaceré triplety môžu kódovať rovnakú aminokyselinu, pričom ich počet sa môže pohybovať



Obr. 7 Dvojrozmerná a trojrozmerná štruktúra tRNA. Antikodón (rozoznávacia sekvencia tRNA) sa nachádza na strednej slučke (spodná časť obrázka), aminokyselina je viazaná na „stopku“ molekuly (www.explorebio.wikispaces.com, upravené).

Tab. 4 Genetický kód (kodóny, zodpovedajúce aminokyseliny, ich trojpísmenové a jednopísmenové skratky)

Báza													
2.													
1.	U			C			A			G			3.
U	UUU	Fenylalanín	Phe (F)	UCU	Serín	Ser (S)	UAU	Tyrozín	Tyr (Y)	UGU	Cystein	Cys (C)	U
	UUC	Fenylalanín		UCC	Serín		UAC	Tyrozín		UGC	Cystein		C
	UUA	Leucín	Leu (L)	UCA	Serín		UAA	term		UGA	Term		A
	UUG	Leucín		UCG	Serín		UAG	term		UGG	Tryptofán		G
C	CUU	Leucín	Leu (L)	CCU	Prolín	Pro (P)	CAU	Histidín	His (H)	CGU	Arginín	Arg (R)	U
	CUC	Leucín		CCC	Prolín		CAC	Histidín		CGC	Arginín		C
	CUA	Leucín		CCA	Prolín		CAA	Glutamín		CGA	Arginín		A
	CUG	Leucín		CCG	Prolín		CAG	Glutamín		CGG	Arginín		G
A	AUU	Izoeucín	Ile (I)	ACU	Treonín	Thr (T)	AAU	Asparagín	Asn (N)	AGU	Serín	Ser (S)	U
	AUC	Izoeucín		ACC	Treonín		AAC	Asparagín		AGC	Serín		C
	AUA	Izoeucín		ACA	Treonín		AAA	Lyzín		AGA	Arginín		A
	AUG	Metionín (ini)		ACG	Treonín		AAG	Lyzín		AGG	Arginín		G
G	GUU	Valín	Val (V)	GCU	Alanín	Ala (A)	GAU	Kys. Asparágová	Asp (D)	GGU	Glycín	Gly (G)	U
	GUC	Valín		GCC	Alanín		GAC	Kys. Asparágová		GGC	Glycín		C
	GUA	Valín		GCA	Alanín		GAA	Kys. Glutámová		GGA	Glycín		A
	GUG	Valín		GCG	Alanín		GAG	Kys. Glutámová		GGG	Glycín		G

ini – iniciačný kodón začína transláciu, term – terminačný (STOP) kodón ukončuje transláciu

term terminačný kodón

kyslý zvyšok

bázický zvyšok

polárny zvyšok

nepolárny zvyšok

od 1 (napr. UGG – tryptofán) po 6 (UUPu, CUN – leucín). U mnohých tripletov rozhoduje o naviazanej aminokyseline len prvá dvojica báz (od 3'-konca), tretia báza už nemá informačný význam (tab. 4). Jeden triplet (AUG, kóduje zaradenie metionínu) je iniciačný, t.j. signalizuje

začiatok translácie. Preklad u eukaryotov vždy začína od tripletu AUG, ktorý sa nachádza najbližšie k 5'-koncu mRNA, preto polypeptidy vždy začínajú metionínom, aj keď niekedy je táto aminokyselina pri posttranslačných úpravách z reťazca odštiepená. Tri triplet (UAA, UAG, UGA) sú terminačné, signalizujú ukončenie translácie a odpojenie produkovanej molekuly polypeptidu od ribozómu.

Čítanie reťazca mRNA je nepretržité, ak teda dôjde k vsunutiu alebo vypadnutiu (inzercia/delícia) jedného alebo niekoľkých nukleotidov, zmenia sa od miesta mutácie všetky triplety a teda aj všetky aminokyseliny zaradené do polypeptidu. Ak dôjde k bodovej mutácii (zámena jedného nukleotidu za iný), zmení sa len jedna zaradená aminokyselina, aj to len v prípade, že mutácia nie je synonymná (t.j. že pôvodný a mutovaný triplet kódujú rôzne aminokyseliny). Na jednu molekulu mRNA je neviazaných spravidla niekoľko ribozómov súčasne, takže paralelne prebieha syntéza viacerých identických polypeptidových molekúl, a často (najmä pri prokaryotoch) súčasne začína aj degradácia mRNA.

Genetický kód je univerzálny, teda funguje rovnako pri všetkých organizmoch. Bolo síce identifikovaných množstvo výnimiek (napr. v mitochondriách stavovcov triplet UGA nie je terminačný ale kóduje tryptofán, naopak triplet AGA a AGG fungujú ako stop kodóny), ovšem tieto výnimky platia vždy pre celú taxonomickú skupinu a uplatňujú sa zákonite (teda triplet UGA kóduje Trp v mitochondriách vždy a v jadre nikdy). Na úrovni translácie teda nemôžu vzniknúť z rovnakej predlohy rozdielne produkty, sekvencia mRNA je vždy prekladaná rovnakým spôsobom. Variabilita však môže vzniknúť na úrovni zostrihu – z rovnakého primárneho transkriptu môžu byť vytvorené rôzne alternatívne molekuly mRNA z dôsledku zaradenia resp. vynechania konkrétnych exónov, čo vedie k vytvoreniu viacerých rozdielnych produktov (polypeptidov), odrážajúcich sa na rozdielom fenotypu buniek.

Ako bolo spomenuté, genetická informácia určuje primárnu štruktúru polypeptidu, t.j. poradie aminokyselín. Medzi aminokyselinami v rámci reťazca sa však vytvárajú chemické väzby rôznych typov, ktorými sa vytvára definitívny trojrozmerný tvar bielkovinnej molekuly. Veľmi pevná je kovalentná väzba medzi dvoma molekulami cysteínu (disulfidický mostík). Rovnako sa môže vytvárať iónová väzba medzi miestami na reťazci nabitými záporne (aminokyseliny s karboxylovým zvyškom $-\text{COOH}$, ktoré vo vodnom roztoku odštiepujú vodík a sú teda nabité záporne $-\text{COO}^-$, napr. kyselina glutámová alebo asparágová) a miestami nabitými kladne (aminokyseliny s aminoskupinou $-\text{NH}_2$, ktoré vo vodnom roztoku prijímajú vodík a sú teda nabité kladne $-\text{NH}_3^+$, napr. arginín, histidín). Ďalším typom väzieb sú hydrofóbne interakcie medzi aminokyselinami s nepolárnym alkylovým zvyškom (napr. leucín, alanín, valín, izoleucín, glycín). Možnosti pre tvorbu týchto väzieb, sú určené práve primárnou štruktúrou, ktorá teda určuje vlastnosti bielkovinnej molekuly (tvar, veľkosť, elektrický náboj vo vodnom prostredí) a tým aj jej funkčnosť.

Viacere polypeptidy podliehajú ďalším úpravám, vedúcim k syntéze výsledného proteínu. Mnohé proteíny sú oligoméry (skladajú sa z dvoch alebo viacerých polypeptidov, ktoré môžu byť produktom rovnakého génu alebo rozdielnych génov), alebo sú funkčné len po naviazaní ďalších organických molekúl (sacharidov – glykoproteíny, lipidov – lipoproteíny atď.) katiónov kovov a pod. Alternatívny zostrih, alostéria (schopnosť proteínov zaujať rôzne stabilné priestorové konformácie) a posttranslačné úpravy vysvetľujú obrovskú rozmanitosť proteínov v živých organizmoch, ktorá výrazne prevyšuje počty identifikovaných génov a ich variantov.

Bielkoviny majú v živých organizmoch rozdielne funkcie. Zrejme najvýznamnejšia je funkcia enzymatická (biokatalytická) – enzýmy riadia všetky biochemické procesy. Proteíny riadia prenos látok cez bunkové membrány, podieľajú sa na stavbe buniek rôznych typov, slúžia ako zásobné látky a pod. Od genotypu jedinca teda závisí jeho proteínová výbava, ktorá cez riadenie biochemických procesov a stavbu tela (za spolupôsobenia negenetických vplyvov – prostredia) určuje utváranie fenotypových znakov (obr. 6).

Cytologické základy dedičnosti

Štruktúra a bunkový cyklus prokaryotickej bunky

Bunka prokaryotov (archeí a baktérií) je relatívne jednoduchý útvar. Nemá diferencované jadro ani organely (v tom zmysle, ako ich má eukaryotická bunka), kruhová molekula DNA (tzv. bakteriálny chromozóm, nukleoid) je voľne uložená v cytoplazme. Okrem nej sa v bunkách prokaryotov často nachádzajú malé kruhové molekuly DNA, plazmidy, ktoré sú tiež nositeľmi dedičnej informácie. Cytoplazma nie je rozdelená na kompartmenty, je obklopená lipidovou bunkovou membránou a bunkovou stenou, ktorá je pri baktériách tvorená mureínom (peptidoglykán; komplex polysacharidov a špecifických proteínov), u archeí pseudomureínom (takisto polysacharidovo-proteínový komplex s mierne odlišnou chemickou štruktúrou).

Bunkový cyklus prokaryotov, ktoré sú spravidla jednobunkové (aj keď niektoré vytvárajú kolónie, napr. cyanobaktérie či myxobaktérie, a u niektorých dochádza v rámci kolónií aj k čiastočnej diferenciácii buniek) je relatívne jednoduchý. Prokaryotické bunky rastú až do dosiahnutia kritickej veľkosti. Následne replikujú svoju DNA: replikácia začína na špecifickom mieste na chromozóme (lokus *ori*), v ktorom je molekula DNA prichytená na plazmatickú membránu. Syntéza plazmatickej membrány prebieha paralelne s replikáciou, fosfolipidové molekuly dopĺňané medzi oba lokusy *ori* s postupujúcou replikáciou odťahujú dcérske molekuly k opačným pólom bunky. Bunka sa potom fyzicky rozdelí vytvorením deliacej priehradky (septum; bunková membrána a bunková stena). Cytokinéza začína vchĺpením plazmatickej membrány po obvode bunky, pričom novosyntetizovaný materiál septa je postupne pridávaný v rovine bunečného delenia. Tento proces sa označuje ako binárne delenie. Druhým mechanizmom je pučanie: na jednom konci materskej bunky sa vytvorí púčik, ktorý postupne narastá, a keď dorastie do veľkosti materskej bunky, oddelí sa.

Štruktúra a bunkový cyklus eukaryotickej bunky

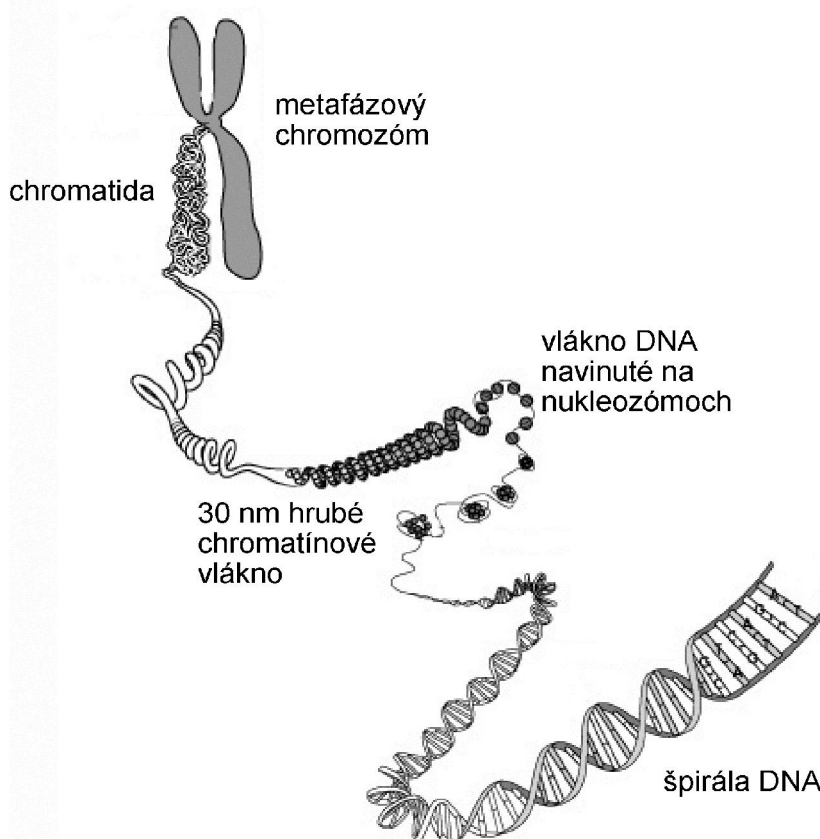
V porovnaní s prokaryotickou bunkou je bunka eukaryotov komplikovanejší a vysoko organizovaný útvar, charakterizovaný oddeleným jadrom, obsahujúcim najväčšiu časť dedičnej matérie. Je vnútorne rozdelená na kompartmenty a obsahuje množstvo organel, teda relatívne samostatných vnútrobunkových útvarov so špecializovanými funkciami. Niektoré z týchto organel sú (semi)autonómne, teda nesú vlastnú genetickú informáciu (aj keď v priebehu evolúcie sa časť génov súvisiacich s aktivitou organel presunula do jadra, t.j. existencia organel je závislá na spolupráci s jadrovými génmi) a sú schopné autoreprodukcie: nevznikajú *de novo* ale delením existujúcich organel.

Zvonku je bunka ohraničená plazmatickou membránou, na ktorú pri niektorých eurakaryotoch ešte nadväzuje bunková stena. U rastlín je bunková stena tvorená predovšetkým polysacharidmi (celulóza, hemicelulózy, pektín), v zdrevnatených častiach rastlín je prestúpená lignínom. U húb je základnou zložkou bunkovej steny chitín (s výnimkou kvasiniek, kde je tvorená polysacharidmi). Živočíšne bunky nemajú bunkovú stenu, ale často vytvárajú medzibunkovú hmotu, spravidla tvorenú proteínmi (kolagén, nektíny) s bielkovinovo-polysacharidovými komplexmi (proteoglykány).

Bunkové membrány (ako vonkajšia plazmatická membrána bunky resp. obal autonómnych organel, tak aj vnútorné membrány) sú tvorené lipidovou dvojvrstvou. Väčšina látok nie je prenášaná cez ne pasívne, ale prenos zabezpečujú proteínové kanály, ktoré sú v nich vbudované. Vnútorné membrány utvárajú bohato rozvetvený systém uzavretých útvarov (cisterien), predovšetkým Golgiho aparát, funkciou ktorého je posttranslačná úprava proteínov a iných makromolekúl, endoplazmatické retikulum (tzv. drsné, nesúce ribozómy, a hladké, podieľajúce sa na metabolizme lipidov a sacharidov a detoxikácii). Charakteristikou súčasťou rastlinných buniek sú vakuoly, centrálna vakuola niektorých typov buniek vyplňa väčšinu ich obsahu. Z endoplazmatického retikula sa odštiepujú transportné vaky slúžiace na transport

proteínov a iných látok do Golgiho aparátu alebo ich export cez bunkovú membránu (exocytózu). Bunka takisto obsahuje organely slúžiace pre odbúravanie nadbytočných látok – časť týchto procesov prebieha u rastlín v lytických vakuolách, ale časť zabezpečujú lyzozómy a peroxizómy. Súčasťou každej eukaryotickej bunky je cytoskelet, teda vláknité štruktúry tvorené špecifickými proteínmi, tvoriace vnútornú výstuž bunky a napomáhajúce pri vnútrobunkovom transporte a bunčnom delení.

Mitochondrie sú autonómne organely s vlastnou dedičnou informáciou, zabezpečujúce aerobnú respiráciu a produkujúce ATP ako hlavný zdroj energie pre biochemické procesy. Ďalšiu skupinu autonómnych organel, ktorá sa vyskytuje len v rastlinných bunkách (a u niektorých skupín jednobunkových organizmov) tvoria plastidy, predovšetkým chloroplasty, vykonávajúce fotosyntézu. Autonómne organely vznikli v evolúcii z prokaryotických endosymbiontov (α -proteobakérií v prípade mitochondrií, cyanobaktérií v prípade chloroplastov).

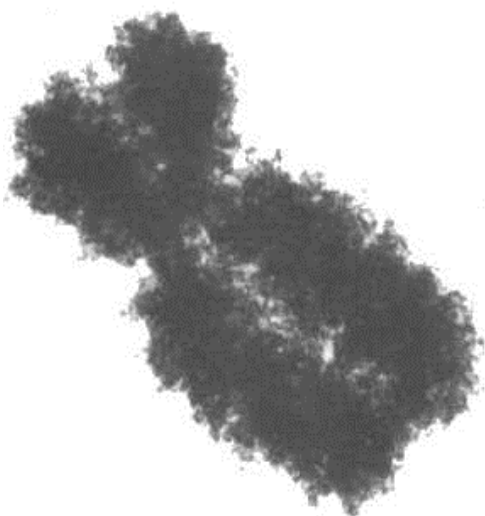


Obr. 9 Schematické znázornenie úrovní kondenzácie genetického materiálu od molekuly DNA po metafázový chromozóm (<http://www.accessexcellence.org>, upravené).

Typickým znakom eukaryotickej bunky je prítomnosť jadra ako diferencovaného útvaru, oddeleného od zvyšku bunky jadrovou membránou obsahujúceho genetický materiál. DNA v jadre eukaryotických buniek nie je uložená voľne. V predchádzajúcom texte bola spomenutá celková dĺžka DNA tvoriacej najdlhší chromozóm človeka 8,5 cm – s takouto obrovskou makromolekulou by bunkový aparát nemohol zaobchádzať. Vlákno DNA je v skutočnosti priestorovo organizované do vyšších štruktúr až po úroveň kondenzovaného chromozómu, ktorý pri bunčnom delení možno vidieť aj svetelným mikroskopom. Vlákno DNA je navinuté na malé bielkovinné komplexy, nazývané nukleozómy s priemerom 11 nm (nukleozóm je zložený histónov, čo sú malé proteínové molekuly, 8 molekúl histónov vytvára nukleo-

zóm). Nukleozómy sú následne spakované (hyperšpiralizované) do 30 nm hrubého chromatínového vlákna. Chromatínové vlákno vytvára slučky s dĺžkou cca 300 nm, v jednej slučke je cca 1000 nukleozómov. V tejto štruktúre je molekula DNA uložená v jadre v období medzi delením buniek (interfáze). Pri delení ďalej kondenzuje a ukladá sa do útvaru, ktorý má hrúbku cca 0,7 μm a dĺžku rádovo niekoľko mikrometrov (obr. 9), a ktorý označujeme termínom chromozóm. Časti DNA kódujúce aktívne prepisované gény sú spakované voľnejšie a tvoria tzv. euchromatín, naopak neaktívne časti sú tesnejšie asociované s podpornými proteínmi a tvoria heterochromatín.

Každý chromozóm má typickú štruktúru, ktorá súvisí aj so štruktúrou DNA tvoriacej jeho základ. Pre pozorovanie pod mikroskopom sa chromozómy farbja Giemsovým farbivom, ktoré sa preferenčne viaže na páry guanín-cytozín. Úseky bohaté na GC sa pri pozorovaní javia ako tmavšie pružky, úseky chudobnejšie na GC sú svetlejšie. Usporiadanie týchto pružkov pomáha pri identifikácii chromozómov. Na chromozóme sú pozorovateľné niektoré typické útvary. Konce chromozómov (teloméry) sú tvorené tandemovo opakovanými neexprimovanými sekvenciami a chránia chromozóm pred postupným odbúraním pri každej replikácii. V rámci chromozómu sa nachádza úsek označovaný ako centroméra, ktorý sa javí ako zúžené miesto (primárna konštrikcia). Pri bunkovom delení sa molekula DNA musí replikovať, chromozóm sa v tomto štádiu skladá z dvoch sesterských chromatíd, ktoré zostávajú spojené v centromére až do delenia, chromozóm má teda tvar X (obr. 10). Centroméra delí chromozóm na dve ramená, ktoré môže byť približne rovnaké (metacentrický chromozóm) alebo je centroméra umiestnená v blízkosti teloméry (akrocentrický chromozóm), prípadne na konci chromozómu (telocentrický chromozóm).



Obr. 10 Snímka metafázového chromozómu z elektrónového mikroskopu (<http://bioweb.wku.edu/courses/Biol115/wyatt/wku/mitosisa.htm>)

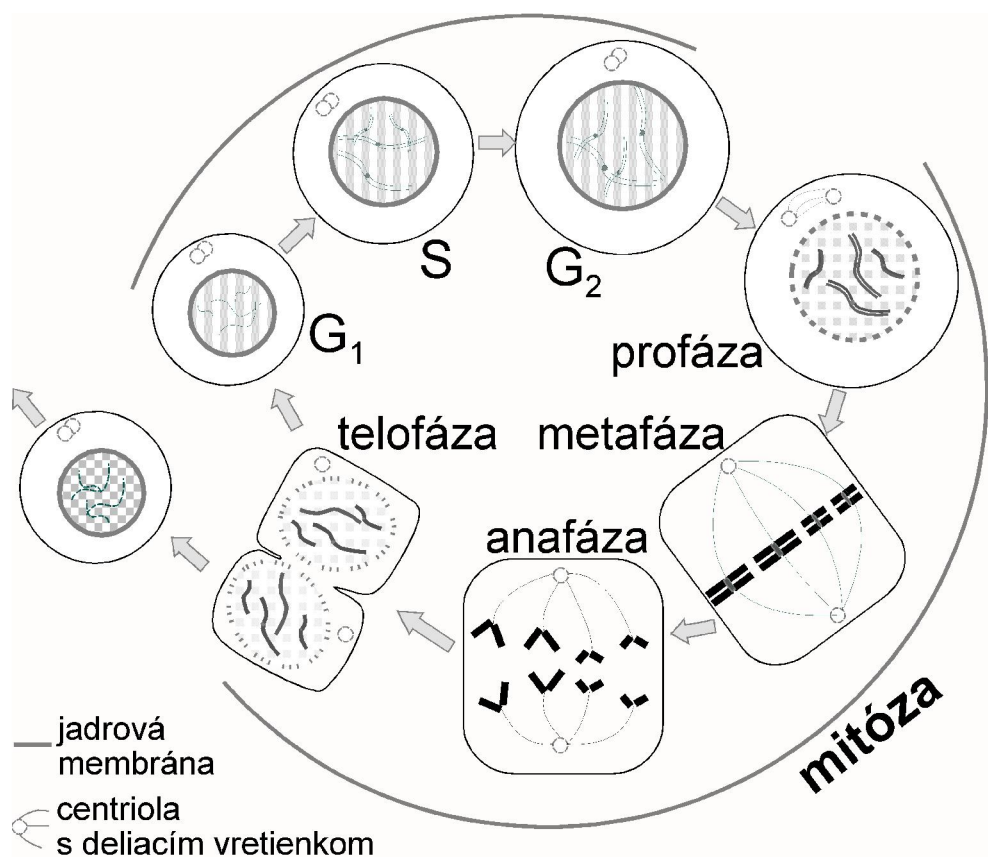
V jadre je rozoznateľný menší útvar označovaný ako jadierko. Je tvorené tandemovými opakovaniami génov pre rRNA; v tejto časti jadra dochádza k prepisu týchto génov a k formovaniu prepísanej rRNA do subjednotiek ribozómov, ktoré sú následne transportované cez póry jadrovej membrány do cytoplazmy, kde sa buď uchytávajú na membrány endoplazmatického retikula, alebo sú voľne uložené v cytoplazme.

Počet chromozómov v jadre bunky určuje jej ploidiu. Somatické (telové) bunky obsahujú za normálnych okolností dve sady chromozómov homologických chromozómov, sú tzv. diploidné. Ak kompletná sada obsahuje n chromozómov (tzv. haploidný počet), potom počet chromozómov v interkinetickej somatickej bunke je $2n$. Viaceré organizmy vykazujú odlišné

stupne ploidie, podrobnejšie popísané v kapitole *Mutácie*.

Rast organizmu je nutne spojený so zväčšovaním počtu buniek, čo si vyžaduje ich delenie, pri ktorom každá novovytvorená dcérska bunka musí získať celú a nezmenenú dedičnú informáciu, ktorá bola obsiahnutá v materskej bunke. Takéto rozdelenie dedičného materiálu zabezpečuje mechanizmus delenia, označovaný ako mitóza.

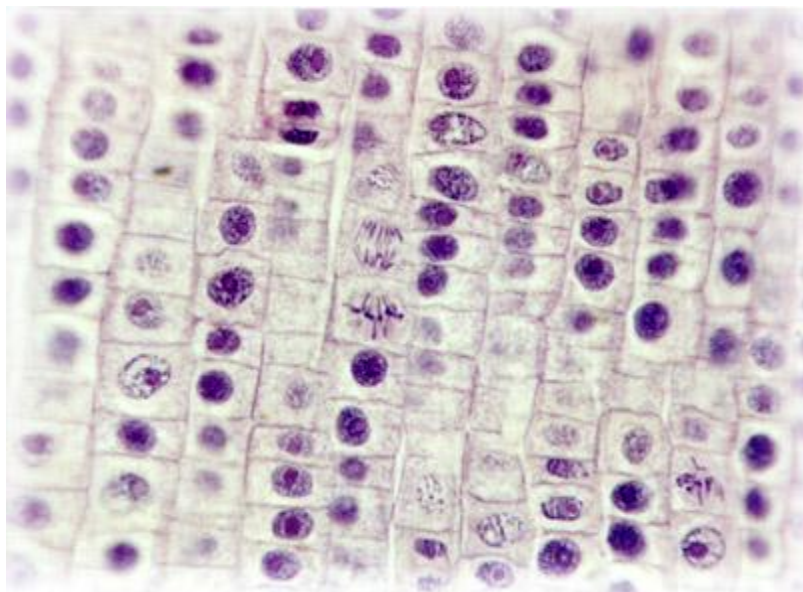
Bunka mnohobunkových eukaryotov v priebehu svojho života prechádza viacerými fázami (obr. 11). Štádium medzi dvomi mitotickými deleniami sa označuje ako interfáza alebo interkinéza. Nové bunky vzniknuté delením najprv rastú, t.j. zväčšujú svoj objem. Toto štádium sa označuje ak G_1 (z angl. *gap*, t.j. medzera). Počas G_1 sa v bunke syntetizujú nové látky, dochádza k expresii génov (predovšetkým génov kódujúcich enzýmy slúžiace pri replikácii DNA v následnej fáze) a prebieha búrlivá enzymatická aktivita nutná pre syntézu stavebných a ďalších látok nutných pre život bunky. Následne bunka vstupuje do fázy S (*synthesis*), v ktorej dochádza k syntéze nových molekúl DNA, teda k replikácii. Na konci S fázy sa každý chromozóm skladá z dvoch sesterských chromatíd. Expresia génov je utlmená s výnimkou génov pre históny, nutné pre stabilizáciu vytvorených dcérskych DNA molekúl. Ďalšou fázou interkinézy je G_2 fáza, v rámci ktorej ďalej narastá objem bunky a obnovená expresia génov opäť zabezpečuje intenzívnu enzymatickú aktivitu podmieňujúcu syntézu látok potrebných pre rast bunky. G_2 je ukončená mitózou. Schéma na obr. 11 nezodpovedá časovému rozdeleniu bunkového cyklu – mitóza v skutočnosti predstavuje časovo krátky úsek, najdlhšiu časť trávi bunka vo fáze G_1 .



Obr. 11 Schéma priebehu eukaryotického bunkového cyklu. Zobrazenie interfázových chromozómov treba brať len ako ilustračné, v skutočnosti nie sú v jadre viditeľné.

Mitotické delenie prebieha v štyroch fázach. Pred delením, v závere interfázy, musí dôjsť k replikácii molekúl DNA. Bunka je teda dočasne tetraploidná, dve nové dcérske molekuly

DNA tvoria dve chromatidy, ktoré zostávajú spojené v oblasti centroméry. V interfáze sú však chromozómy rozvinuté a nie je možné ich morfológicky rozoznať. V prvej fáze mitózy, profáze, začínajú chromozómy kondenzovať a vytvárajú sa z nich identifikovateľné útvary. Zároveň sa na póloch bunky začínajú predlžovať vlákna deliaceho vretienka. Na konci profázy sa rozpadá jadrová membrána. V metafáze sa chromozómy usporiadajú do ekvatoriálnej („rovníkovej“) roviny bunky a vlákna deliaceho vretienka sa upnú na chromatidy v mieste centroméry (primárna zúženina na chromozóme, ktorá ho delí na dve ramená). V tejto fáze sú sesterské chromatidy stále spojené v mieste centroméry a chromozómy (vytvárajúce útvar v podobe písmena X, vid' obr. 10) sú najlepšie pozorovateľné. Popis štruktúry chromozómu po histochemickom farbení sa spravidla vzťahuje práve na metafázové chromozómy. V anafáze sa vlákna deliaceho vretienka začínajú skracovať, čím ťahajú každú z dvojice sesterských chromatíd k opačnému pólu bunky. V telofáze sú kompletne sady chromozómov nahromadené každá pri opačnom póle bunky. Chromozómy sa začínajú opäť dešpiralizovať a okolo nich sa obnovuje jadrová membrána, čím je ukončené delenie jadier. Následne počas cytokinézy dochádza k deleniu cytoplazmy sformovaním deliacej priehradky medzi jadrami (lipidová membrána) a následne sformovaním bunkovej steny. Počet chromozómov v bunke počas bunkového cyklu sa teda mení $2n \rightarrow 4n \rightarrow 2n$. Autonómne sa množiace bunkové organelly u rastlín, húb aj živočíchov sa počas cytokinézy (rozdelenia buniek po ukončení mitotického delenia jadier) rozdelia do oboch dcérskych buniek náhodne, vzhľadom na veľký počet mitochondrií (v priemere 200) aj chloroplastov (20–100) v bunke sa prakticky s istotou dostanú do oboch dcérskych buniek. V nich sa ďalej množia rovnakým spôsobom ako ich prokaryotickí predchodcovia: binárnym delením alebo pučaním. Jednobunkové eukaryoty často obsahujú mitochondrie resp. chloroplasty len v jedinom exemplári, ich rozmnožovanie je synchronizované s bunkovým cyklom. U mnohobunkových organizmov v princípe neustále dochádza k deleniu alebo naopak fúzii mitochondrií, ktoré vytvárajú dynamickú tubulárnu sieť, v ktorej rovnováha medzi delením a spájaním závisí od energetických potrieb bunky v spojení s podmienkami prostredia.



Obr. 12 Snímka bunkového delenia v listovom parenchýme cibule (*Allium cepa*) (www.microscopy-uk.org.uk/mag/artaug99/mitosis.html)

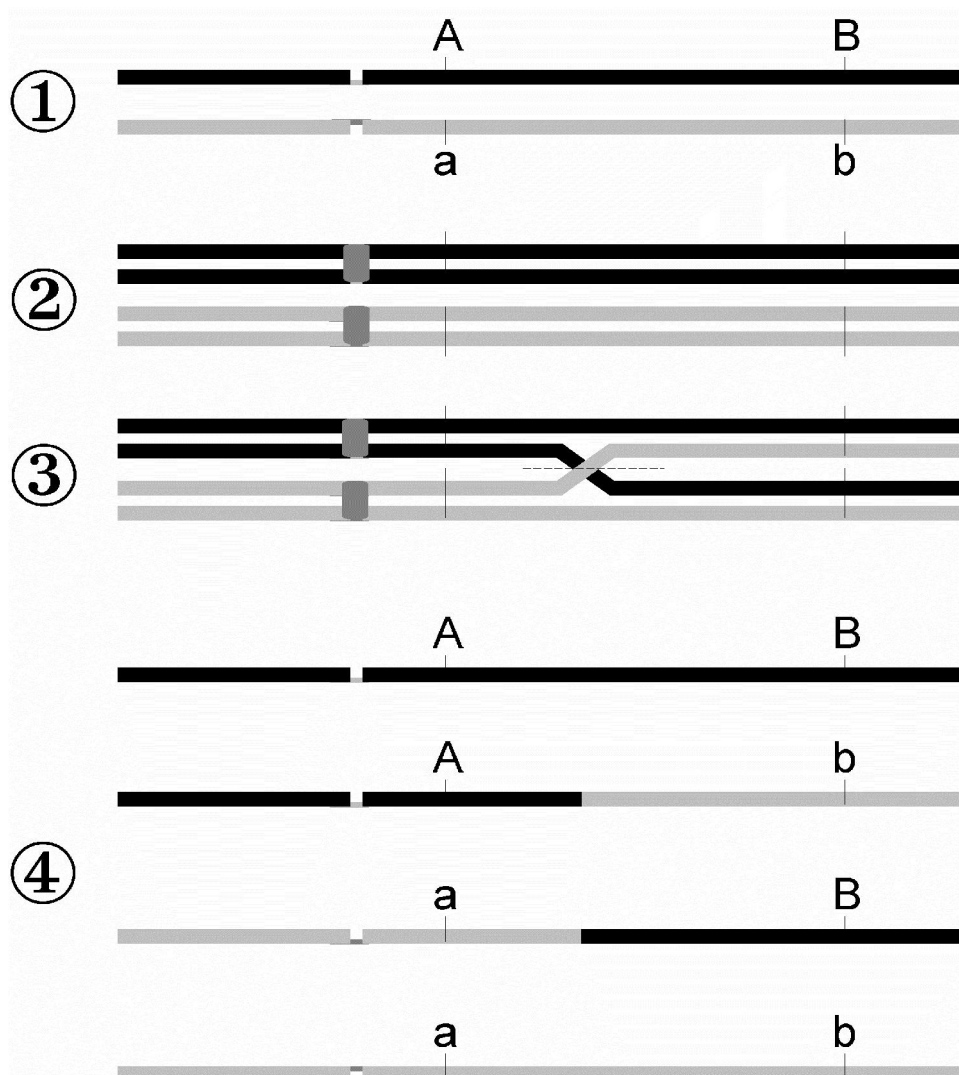
V niektorých prípadoch nedôjde po delení jadier k cytokinéze, takže vznikajú bunky s viacerými jadrami. Multinukleárne bunky sú bežné u húb, v niektorých tkanivách živočí-

chov (napr. pečeň stavovcov), ale nachádzajú sa aj v apikálnych meristémoch rastlín.

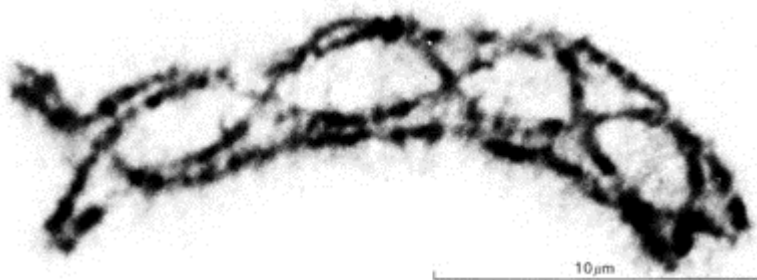
Nie všetky bunky sa trvale delia. S postupnou diferenciáciou (teda nadobúdaním špecifickej funkcie, ktorú bunka v organizme plní) sa schopnosť delenia stráca a bunka (spravidla) po ukončení G_1 nepokračuje fázou S ale vstupuje do kľudového stavu (G_0). Ten nemusí byť trvalý, niektoré bunky sú schopné vrátiť sa do fázy G_0 a následne sa opäť deliť. Pokiaľ je však bunka plne diferencovaná, pretrváva v senescentnom stave až do ukončenia svojej životnosti apoptózou, t.j. programovanou smrťou. Na rozdiel od nekrózy („násilná“ smrť bunky), pri ktorej dôjde k dezorganizovanému rozpadu bunky, pričom uvoľnený bunečný obsah môže poškodiť susedné bunky), apoptóza je zákonitým procesom, pri ktorom bunka riadene likviduje vlastné proteíny (vrátane enzýmov, ktoré by pri uvoľnení mohli spôsobiť poškodenie pletiva) a následne po rozpade plazmatickej membrány sú jej zvyšky vstrebané okolitými bunkami.

Pri vzniku gamét (pohlavných buniek) sa na rozdiel od delenia somatických buniek množstvo genetického materiálu musí zmenšiť. Ak by gaméty boli diploidné rovnako ako somatické bunky, počet chromozómov v jadre by sa každou reprodukciou exponenciálne zväčšoval ($2n \rightarrow 4n \rightarrow 8n \rightarrow 16n \rightarrow \dots$). Rozdelenie dvojice chromozómových sád (diploidného počtu) na dve haploidné sady v gamétach zabezpečuje mechanizmus delenia buniek nazývaný meióza. Meióza predstavuje sled dvoch delení jadra sa analogickým priebehom fáz ako pri mitóze, redukcia počtu chromozómov nastáva pri druhom delení. Rovnako ako pri mitotickom delení musí ešte v interkinéze dôjsť k replikácii DNA, opäť sa vytvoria dve chromatidy navzájom spojené v centromére. Profáza I je časovo predĺžená a pozostáva z piatich štádií. V leptoténe sa chromozómy kondenzujú, vytvárajú sa z nich útvary viditeľné v elektrónovom mikroskope. S pokračujúcou špiralizáciou chromozómov nastáva ďalšie štádium, zygotén, v ktorom sa homologické chromozómy navzájom párujú. Tento proces spájania chromozómov sa označuje ako synapsa, a spravidla ju zabezpečuje tvorba proteínového spojovacieho komplexu. Počas synapsy sa chromozómy zmršťujú do stále kratších a hrubších útvarov, ktoré sú viditeľné v bunke počas ďalšej fázy, pachyténu. V tomto štádiu sú už spárované chromozómy jasne rozoznateľné aj v svetelnom mikroskope, vytvárajú útvary, zložené z dvoch dvojíc sesterských chromatíd (teda z dvoch homologických chromozómov), označovaný ako bivalent (odvodené z počtu chromozómov) resp. tetráda (odvodené z počtu chromatíd). Počas pachyténu (a možno už v zygoténe) sa môžu nesesterské chromatidy prekrížiť, spojiť, a navzájom si vymeniť časti. Tento jav sa označuje anglickým termínom crossing-over (slov. prekríženie) a vedie k rekombinácii alel na rozdielnych homologických chromozómoch (ku crossing-overu môže dôjsť aj medzi sesterskými chromatidami, ale tam nemá žiadne genetické následky, keďže sesterské chromatidy sú identické, vznikli kopírovaním tej istej molekuly DNA). Prekríženie je dobre viditeľné počas ďalšieho štádia profázy I, diplo-ténu, počas ktorého sa spárované chromozómy trochu od seba oddialia, ale zostávajú spojené v miestach, v ktorých došlo ku crossing-overu a ktoré sa označujú termínom chiazma (keďže pripomínajú grécke písmeno χ – obr. 13, 14). V poslednom štádiu profázy I, v diakinéze, chromozómy naďalej kondenzujú a pohybujú sa k ekvatoriálnej rovine bunky. Jadrová membrána sa rozpadá a začína sa vytvárať deliace vretienko. V metafáze I sa páry homologických chromozómov usporiadajú do ekvatoriálnej roviny tak, že ich centroméry smerujú každá k opačnému pólu bunky. Ťahom vlákien deliaceho vretienka sa chiazmy postupne od centroméry smerom k teloméram oddeľujú, k definitívnemu rozdeleniu dôjde počas anafázy I. Priebeh telofázy I závisí od druhu, pri niektorých organizmoch deliace vretienko zanikne, obnoví sa jadrová membrána okolo oboch dcérskych jadier a chromozómy opäť dekondenzujú, pri iných sa nové jadrá nediferencujú, chromozómy sa dešpiralizujú len čiastočne, a dcérske bunky priamo vstupujú do ďalšieho delenia. V každom prípade výsledkom I. meiotického delenia je vznik dvoch dcérskych buniek, ktoré sú síce diploidné v tom zmysle, že obsahujú dve sady molekúl DNA, ale ide o dvojice sesterských chromatíd, teda identických molekúl

DNA. Meióza II má priebeh analogický ako mitóza. Počas profázy II chromozómy opäť kondenzujú a pripájajú sa k vláknam nového deliaceho vretienka, v metafáze II sa usporiadajú do novej ekvatoriálnej roviny (kolmej na pôvodnú), v anafáze II sú sesterské chromatidy priťahované každá k opačnému pólu bunky, a v telofáze II sa zhlukujú pri opačných póloch, dekondenzujú a tvorbou jadrových a následne membrán sa tvoria samostatné dcérske bunky. Počet chromozómov v bunke počas gametogenézy sa teda mení $2n \rightarrow 4n \rightarrow 2n \rightarrow 1n$. Na



Obr. 13 Schéma segregácie a rekombinácie génov pri meióze. 1) dvojica homologických chromozómov v interkinéze diploidnej zárodočnej bunky (peľová materská bunka PMC alebo materská bunka zárodočného vaku ESMC). Jedinec je heterozygotný v génoch *A* a *B*, ktoré sú vo vzájomnej väzbe: obe dominantné alely (*AB*) sa nachádzajú na jednom chromozóme, obe recesívne alely (*ab*) na druhom. Pre názornosť sú homologické chromozómy a ich časti zobrazené rôznymi farbami. 2) Bivalent tvorený duplikovanými homologickými chromozómami (4 chromatidy) počas zygoténu meiózy I. Chromatidy sú spojené v mieste centroméry. 3) Diplotén meiózy I: dve nesesterské chromatidy sa prekrížili medzi génmi *A* a *B* a vymenili si medzi sebou úseky od miesta prekríženia až po teloméry. 4) Stav po telofáze II: vznikli 4 haploidné bunky, z ktorých dve majú pôvodnú konšteláciu alel (*AB* a *ab*) a dve rekombinovanú konšteláciu alel (*Ab* a *aB*). Alely oboch génov segregujú do gamét v pomere 1:1, t.j. 50% dcérskych buniek obsahuje dominantnú alelu, 50% recesívnu.



Obr. 14 Snímka spárovaných chromozómov počas meiózy (chiazma)
(www.scilproj.org/IBHbio2knowledge.html)

rozdiel od mitózy, produktom ktorej sú dve nové geneticky identické dcérske bunky (majú rovnaký genotyp ako mala materská bunka), meiózou sa vytvárajú štyri haploidné bunky, ktoré nie sú geneticky identické (majú rozdielny haplotyp). Dvojice homologických chromozómov, ktoré nesú tie isté gény, ale môžu niesť rozdielne varianty (alely) týchto génov, sa pri meióze rozchádzajú do rôznych gamét, tento proces sa označuje ako segregácia chromozómov resp. génov pri gametogenéze (obr. 13).

Chromozóm sa pri meióze teda nerozdelí na jednotlivé úseky, zodpovedajúce jednotlivým génom, ale správa sa ako jeden celok. Gény, ktoré sa na ňom nachádzajú, sa preto nemôže voľne kombinovať, ale správajú sa ako jeden súbor. Tomuto javu hovoríme väzba génov (angl. *linkage*), a súbor génov, nachádzajúci sa na rovnakom chromozóme sa označuje ako väzbová skupina. Jedinou možnosťou, ako sa môžu génu na jednom chromozóme rekombinovať, je crossing-over. Dvojica nesesterských chromatíd sa medzi dvomi génmi môže prekrížiť aj dvakrát, v tomto prípade sa obnoví pôvodná (nerekombinovaná) konštelácia alel, takisto môže dôjsť k viacnásobným prekríženiam medzi rôznymi dvojicami nesesterských chromatíd v rámci tetrády. V každom prípade pravdepodobnosť, že medzi dvomi génmi dôjde ku crossing-overu je tým väčšia, čím ďalej od seba sa na chromozóme nachádzajú. Táto skutočnosť sa využíva pri mapovaní polohy génov na chromozómoch. Miesto na chromozóme, kde sa konkrétny gén (alebo iná nukleotidová sekvencia) nachádza, sa označuje termínom lokus.

Chromozómová sada sa naopak pri delení buniek ako celok nespráva. Heterologické chromozómy sa môžu pri tvorbe gamét dostať do dcérskych buniek v ľubovoľnej kombinácii, preto gény lokalizované na rozdielnych chromozómoch sa rekombinujú voľne. Pri diploidných organizmoch (ku ktorým patrí väčšina hospodársky významných drevín aj druhov poľovnej zveri) je teda počet možných kombinácií chromozómov v gamétach 2^n (kde n je veľkosť haploidnej chromozómovej sady). Pri buku alebo smreku, ktoré majú haploidný počet chromozómov $n = 12$, je teda aj pri zanedbaní možnosti rekombinácie génov crossing-overom možnosť vytvorenia $2^{12} = 4096$ haplotypových kombinácií v gamétach, tvorených jediným jedincom.

DEDIČNOSŤ FENOTYPOVÝCH ZNAKOV

Mendelove zákony, autozomálna dedičnosť kvalitatívnych znakov

Skutočnosť, že potomstvo je podobné svojim rodičom, bolo oddávna súčasťou ľudskej skúsenosti a predmetom záujmu prírodovedcov. Dlho však neboli známe nielen mechanizmy, ktorými sa dedenie vlastností a znakov uskutočňuje, ale aj hypotézy o dedičnosti vychádzali skôr zo zovšeobecnenia náhodných pozorovaní a často aj z naivných zjednodušujúcich predstáv, než z experimentálnych údajov. Prvým, kto vykonal systematické pokusy v tomto smere a postavil ich na solídnej štatistickej báze bol JOHANN GREGOR MENDEL, ktorý tým položil základy genetiky ako vednej disciplíny. Na základe zákonitostí, ktoré popísal vo svojom diele *Versuche über die Pflanzenhybriden* (1866), je možné na základe premenlivosti fenotypo-

vého znaku a jej charakteru vo viacerých generáciách urobiť závery o géne resp. génoch, ktoré tento znak podmieňujú. Predpokladom úspešnej genetickej analýzy je malý počet génov, ktoré znak kontrolujú, a malý resp. žiadny modifikujúci vplyv prostredia (nededičných faktorov).

Mendel vykonával svoje pokusy s rozdielnymi odrodami hrachu. Odrody poľnohospodárskych plodín sa vytvárajú dlhodobým systematickým umelým výberom, pri ktorom sa vyberajú nositelia žiadúcich vlastností a používajú pre ďalšie rozmnožovanie, zatiaľ čo jedince vykazujúce akékoľvek odchýlky od žiadúceho fenotypu sú vylúčené, čím sú z populácie vylučované aj gény podmieňujúce tieto fenotypové odchýlky. Variety sú teda geneticky značne homogénne. Mendel sledoval celkovo 7 fenotypových znakov, a na základe výsledkov kríženia medzi jedincami rodičovskej (parentálnej) generácie a krížení v následných (filiálnych) generáciách sformuloval pravidlá, ktoré popisujú dedičnosť kvalitatívnych znakov, kontrolovaných autozomálnymi génmi u diploidných, pohlavne sa množiacich organizmov, vzťahujú sa teda na lesné dreviny, poľovnú zver či človeka samotného v rovnakej miere, ako na hrach.

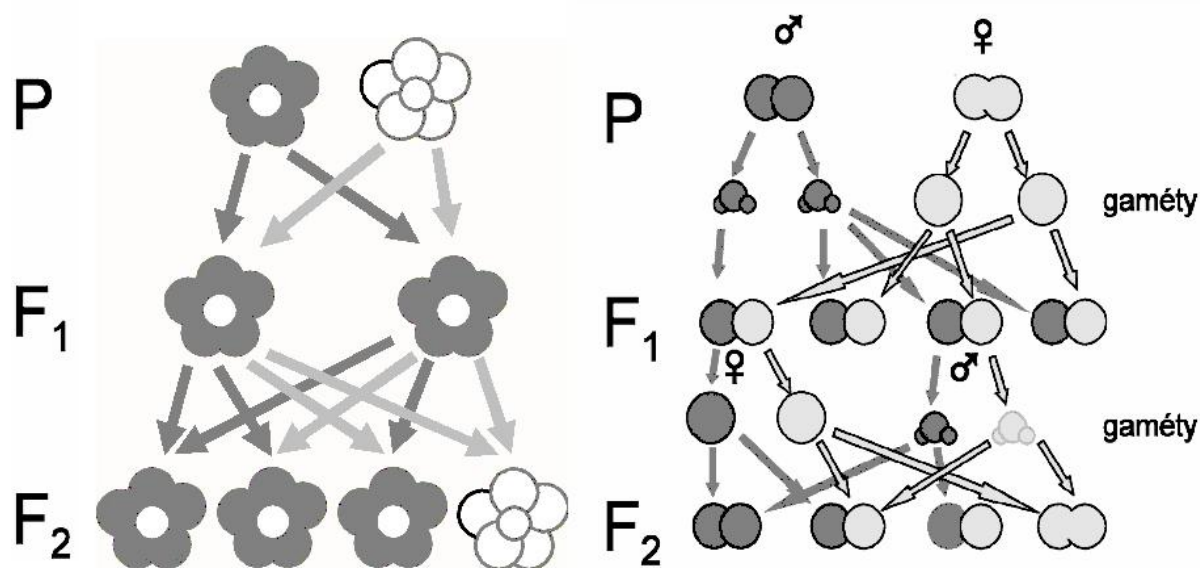
Prvé Mendlovo pozorovanie sa týka správania sa krížencov (hybridov), teda 1. filiálnej generácie (F_1). Pokiaľ krížil rodičov, odlišujúcich sa v konkrétnom fenotypovom znaku, napr. farbe kvetov, všetko potomstvo bolo rovnaké, uniformné, a podobalo sa len na jedného z rodičov. Pritom nezáležalo na tom, akú farbu kvetov mala matka a akú otec, kríženia oboma smermi (reciproké kríženia) dávali rovnaký výsledok. Variant znaku, ktorý sa u hybridov prejavil, Mendel označil ako dominantný, naopak znak, ktorý sa u žiadneho z jedincov F_1 neobjavil (aj keď jeden z rodičov bol jeho nositeľom) označil ako recesívny (z lat. *recedere* – ustúpiť). Ak napríklad krížil jedinca s červenými kvetmi a jedinca s bielymi kvetmi, všetko potomstvo bolo červenokveté, nezávisle na tom, či červenokvetá rastlina bola otcovská alebo materská. Následne Mendel sledoval prejav daného znaku v potomstve hybridov, teda v 2. filiálnej generácii (F_2). V nej sa recesívny variant znaku objavil opäť. Pri veľkom počte uskutočnených krížení a starostlivom kvantitatívnom vyhodnotení výsledkov sa ukázalo, že podiel nositeľov recesívneho znaku v F_2 dosahoval v priemere 25%. Ak by sme použili rovnaký príklad, ak boli skrížené dva červenokveté hybridy, v ich potomstve sa vždy objavila štvrtina jedincov s bielymi kvetmi, ktoré nemal ani jeden z rodičov (F_1), ale mal ich jeden z prarodičov (P) (viď obr. 15).

Mendel z týchto pozorovaní odvodil správnu teóriu dedičnosti. Na rozdiel od dovtedajších predstáv, podľa ktorých má dedičnosť kontinuálnu povahu, teda potomstvo predstavuje priemer či rôzne typy prechodov medzi vlastnosťami rodičovských jedincov, Mendel došiel k záveru, že faktory, podmieňujúce prenos dedičných vlastností musia byť diskrétné (je treba pripomenúť, že v jeho dobe o chromozómoch, DNA či ich úlohe v dedičnosti nebolo nič známe; naopak, až zverejnenie Mendlových výsledkov umožnilo klásť si otázku, ktoré bunkové štruktúry a ktoré makromolekuly sa správajú v zhode s nimi). Správne vytušil, že telové bunky organizmu vždy obsahujú dva takéto diskrétné dedičné faktory, zatiaľ čo pri vzniku pohlavných buniek musí byť tento počet redukovaný na polovicu. Termín „gén“ pre označenie týchto dedičných faktorov navrhol až dánsky botanik Johanssen v r. 1909. Jediniec, ktorý od oboch rodičov získal rovnaký variant génu (alelu), bol označený ako homozygot, nositeľ dvoch rôznych alel rovnakého génu je heterozygot.

Jednotlivé gény a ich alelické varianty nemusia byť z hľadiska fenotypu rovnocenné, fenotypový prejav závisí nielen od prítomnosti alel v genotype, ale aj od ich vzájomného vzťahu. Zhodou okolností sa u všetkých znakov, ktoré Mendel študoval u hrachu, uplatňuje úplná dominancia. Alela, ktorá sa označuje ako dominantná, sa fenotypovo prejaví vždy, ak je v genotype jedinca prítomná v homozygotnom či v heterozygotnom stave. Fenotypový prejav recesívnej alely je dominantnou alelou u heterozygota potlačený, môže sa teda prejaviť len v homozygotnom stave. Pri úplnej dominancii je teda fenotyp dominantného homozy-

gota a heterozygota totožný, odlišuje sa len fenotyp recesívneho homozygota. Pri neúplnej dominancii leží fenotypová hodnota heterozygota medzi fenotypmi oboch homozygotov (v prípade kvalitatívneho znaku sa používa aj termín intermediarita). Špecifickým prípadom neúplnej dominancie je aditivita – ak hodnota heterozygota je presne v strede medzi fenotypovými hodnotami oboch homozygotov, nie je možné rozlišovať dominantnú a recesívnu alelu, pretože žiadna z nich vo fenotype neprevažuje (nedominuje), ale jedna z alel zvyšuje fenotypovú hodnotu, druhá nie. Účinky alel sa sčítavajú. Model aditivity sa uplatňuje predovšetkým pri kvantitatívnych znakoch. Pri superdominancii heterozygot prevyšuje svojím fenotypovým prejavom fenotypové hodnoty oboch homozygotov. V prípade, že sa obe alely heterozygota prejavujú nezávisle na sebe, hovoríme o kodominancii.

Na obr. 15 je znázornené kríženie medzi dvoma jedincami, ktoré sa odlišujú farbou kvetov. Kríženie, pri ktorom sa rodičovské jedince odlišujú v jednom znaku (resp. pri ktorom sa sleduje odlišnosť len v 1 znaku) sa označuje ako monohybridné. V parentálnej generácii (označovanej P) krížime dvoch (predpokladane homozygotných) rodičovských jedincov s odlišnými variantmi znaku (červenou a bielou farbou kvetu). Potomstvo (hybridy tzv. 1. filiálnej generácie – F_1) však bude vykazovať len jeden variant znaku, všetky jedince nezávisle na ich počte budú mať červené kvety, potomstvo je teda uniformné. Obe recipročné kríženia (t.j. červenokvetý otec $\times$ bielokvetá matka aj bielokvetý otec $\times$ červenokvetá matka) dávajú pritom rovnaký výsledok (pravidlo uniformity a reciprocity). V ďalšej generácii však dochádza k fenotypovému štiepeniu, opäť sa objavujú dva varianty znaku. Ak skrížime dva červenokveté jedince F_1 , v 2. filiálnej generácii F_2 sa bude vyskytovať 75% červených jedincov a 25% bielych jedincov (pravidlo zákonitého štiepenia v potomstve hybridov).

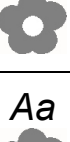
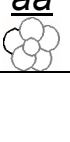


Obr. 15 Ilustrácia Mendelových pravidiel dedičnosti fenotypových znakov. Vľavo: dedičnosť farebných variantov farby samičích strobilov u smrekovca pri úplnej dominancii vloh pre tmavú (červenú) farbu, vloha pre svetlú (žltozelenú) farbu je recesívna. Vpravo: schematická ilustrácia segregácie génov pri tvorbe gamét a ich kombinácie do genotypov v jednotlivých generáciách.

Mendel formuloval svoje predstavy o dedičnosti v polemike s teóriou zmiešavania (*blending inheritance*), podľa ktorej potomstvo vykazovalo vždy priemernú fenotypovú hodnotu oboch rodičov. Mendel došiel k správne mu názoru, že dedičnosť riadia fyzické, samostatné a stále jednotky, pričom každý jedinec má dve takéto jednotky, ktoré môže byť rovnaké alebo rozdielne. Pokiaľ sú rozdielne, nemiešajú sa, nevstupujú do žiadnych vzájomných interakcií, ale zachovávajú si svoju integritu. Každá pohlavná bunka (gaméta) naopak obsahuje len

jednu čistú, nezmiešanú vlohu pre daný znak (pravidlo čistoty gamét).

Použitím dnešnej terminológie je možné sformulovať popis mechanizmu dedičnosti jednoduchšie. Rodičovské jedince v parentálnej generácii sú homozygotné. V príklade na obr. 15 je otcovský červenokvetý jedinec homozygot v dominantnej alele, t.j. má genotyp AA . Keďže na oboch chromozómoch má v géne A dominantnú vlohu, je schopný produkovať len peľové zrná s touto vlohou, teda všetky gaméty majú haplotyp A . Materský bielokvetý jedinec je homozygot v recesívnej alele (genotyp aa), analogicky je teda schopný produkovať len vajíčkové bunky s haplotypom a . Nech sa ktorákoľvek samčia gaméta skombinuje s ktoroukoľvek samičou, vždy vznikne zygot, ktorá po otcovi zdedí dominantnú vlohu (A) a po matke recesívnu (a), teda genotyp potomstva musí byť heterozygotný (Aa). Všetky jedince potomstva sú teda genotypovo uniformné, a preto musia vykazovať aj rovnaký fenotyp. V tomto prípade, keďže vloha pre červenú farbu je dominantná, budú mať všetky jedince F_1 generácie červenú farbu kvetov.

$F_1 \times F_1$		$F_1 \times P_{\text{♂}}$		$F_1 \times P_{\text{♀}}$	
F_2		B_1		B_1	
	A ●	AA 	Aa 		a ○
	a ○	Aa 	aa 		a ○

Obr. 16 Kombinačný štvorec pri monohybridnom krížení: generácia F_2 (kríženie medzi dvomi hybridmi F_1 , šedá farba) a dva typy spätných krížení, t.j. generácia B_1 (kríženie medzi hybridom F_1 a otcovským resp. materským jedincom parentálnej generácie; podčiarknuté).

Ak skrížime dva hybridné jedince (F_1) navzájom, pomery v ďalšej (F_2) generácii sa zmenia. Hybridné jedince sú heterozygoti (Aa). Pri pravidelnej segregácii v pomere 1:1 produkujú polovicu gamét (je jedno, či samčích, alebo samičích) s dominantnou vlohou (A) a polovicu gamét s recesívnou vlohou (a). Pokiaľ sa tieto gaméty párujú náhodne, je pravdepodobnosť všetkých 4 možných kombinácií rovnaká, t.j. 25% ($A_{\text{♂}} + A_{\text{♀}} \rightarrow AA$, $A_{\text{♂}} + a_{\text{♀}} \rightarrow Aa$, $a_{\text{♂}} + A_{\text{♀}} \rightarrow Aa$, $a_{\text{♂}} + a_{\text{♀}} \rightarrow aa$). Keďže vloha pre červenú farbu je dominantná, všetky jedince, ktorých genotyp obsahuje aspoň jednu dominantnú vlohu (t.j. $\frac{1}{4} AA + \frac{1}{2} Aa = \frac{3}{4} A$) budú mať červené strobily, recesívni homozygoti ($\frac{1}{4} aa$) budú mať žlté strobily. Pri spätnom krížení (*backcross*; generácia B_1) s červenokvetým otcovským jedincom parentálnej generácie bude všetko potomstvo červenokveté, pretože všetky jedince B_1 musia po otcovi zdediť dominantnú vlohu ($AA \times Aa \rightarrow 50\% AA + 50\% Aa$). Spätné kríženie hybridu F_1 s bielokvetým materským jedincem generácie P naopak vyprodukuje 50% červenokvetých a 50% bielokvetých jedincov (obr. 16). Hybrid F_1 produkuje polovicu gamét s dominantnou a polovicu s recesívnou vlohou, recesívne homozygotná matka len gaméty s recesívnou vlohou, teda len polovica potomstva zdedí dominantnú vlohu ($aa \times Aa \rightarrow 50\% aa + 50\% Aa$).

Štiepny pomer 3:1 v generácii F_2 sa uplatňuje len pri úplnej dominancii. Pokiaľ sú heterozygotné jedince fenotypovo rozoznatelné od oboch homozygotov (pri neúplnej dominancii, intermediarite alel, resp. pri superdominancii), je fenotypový štiepny pomer v F_2 generácii totožný s genotypovým, t.j. 1:2:1. V potomstve F_2 sa teda objavia tri fenotypy, 25% bude vykazovať fenotyp jedného z jedincov P generácie, 25% bude fenotyp druhého z rodičov P

generácie, a 50% fenotyp jedincov F₁ generácie.

Pri dihybridnom krížení sa sleduje dedičnosť dvoch fenotypových znakov súčasne. Aj v tomto prípade platí, že nech sú fenotypy rodičovských jedincov (P) akékoľvek, generácia F₁ bude uniformná. V ďalšej generácii dochádza v prípade úplnej dominancie v oboch génoch ku štiepeniu v pomere 9:3:3:1. V príklade na obr. 17 sa jedinci odlišujú vo farbe a tvare semien. Vlohy pre žltú farbu a guľatý tvar semien sú dominantné, vlohy pre zelené a zvráskavené semená sú recesívne. Ak v parentálnej generácii krížime jedince, ktoré sú homozygotné v génoch kontrolujúcich oba znaky (v tomto prípade otcovský jedinec je dominantný homozygot v gène pre farbu a recesívny homozygot v gène pre tvar semien, materský jedinec naopak), potomstvo F₁ bude uniformné a bude vykazovať dominantný variant v oboch znakoch (t.j. bude mať žlté guľaté semená, teda bude sa odlišovať od oboch rodičov). Po krížení dvoch jedincov F₁ medzi sebou sa v potomstve F₂ objavia 4 fenotypy. 9/16 jedincov bude mať žlté guľaté semená, rovnako ako jedince F₁ (jedince s aspoň jednou dominantnou alelou v oboch génoch, teda $A_B_$), 3/16 budú mať žlté ale zvráskavené semená, rovnako ako otcovský jedinec v parentálnej generácii (A_bb), 3/16 budú mať zelené guľaté semená, rovnako ako materský jedinec v parentálnej generácii ($aaB_$) a 1/16 bude mať zelené zvráskavené semená (nový fenotyp, ktorý sa v prechádzajúcich generáciách vôbec nevyskytol, genotypu $aabb$). Vlohy jedného alelického páru sa teda kombinujú nezávisle od vlôh druhého alelického páru. Túto skutočnosť vystihuje ďalšie z Mendlových pravidiel, pravidlo nezávislej kombinovateľnosti vlôh. Toto pravidlo pochopiteľne neplatí pre dvojice génov, lokalizované na rovnakom chromozóme. V prípade väzby sa gény nekombinujú voľne, ale len v miere rekombinácie umožnenej crossing-overom a závisiacej od ich vzájomnej vzdialenosti na chromozóme.

P		♂ <i>AAbb</i> 	×		♀ <i>aaBB</i> 
		<i>Ab</i> ●□			<i>aB</i> ○■
F ₁		<i>AaBb</i> 			

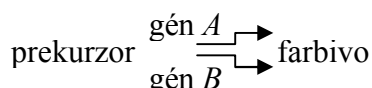
F ₁ × F ₁		♂ <i>AaBb</i> 			
		<i>AB</i> ●■	<i>Ab</i> ●□	<i>aB</i> ○■	<i>ab</i> ○□
♀ <i>AaBb</i> 	<i>AB</i> ●■	<i>AABB</i> 	<i>AABb</i> 	<i>AaBB</i> 	<i>AaBb</i> 
	<i>Ab</i> ●□	<i>AABb</i> 	<i>AAbb</i> 	<i>AaBb</i> 	<i>Aabb</i> 
	<i>aB</i> ○■	<i>AaBB</i> 	<i>AaBb</i> 	<i>aaBB</i> 	<i>aaBb</i> 
	<i>ab</i> ○□	<i>AaBb</i> 	<i>Aabb</i> 	<i>aaBb</i> 	<i>aabb</i> 

Obr. 17 Dihybridné kríženie

Štiepny pomer 9:3:3:1 v generácii F_2 pri dihybridnom krížení však platí len v prípade komplementárneho účinku génov. Účinky génov sa však môžu vzájomne ovplyvňovať. Tieto medzigénové interakcie sa označujú termínom epistáza. Predstavme si napríklad prípad, že nejaký produkt (napr. červené farbivo listu) je syntetizovaný z prekursora v dvoch krokoch:



Ak dôjde k mutácii, vedúcej k znefunkčneniu génu, v géne A , vôbec sa nevytvorí medziprodukt, teda niet z čoho syntetizovať farbivo, ak dôjde k mutácii v géne B , z medziproduktu sa nebude vytvárať farbivo. Na syntézu farbiva je teda potrebné, aby fungovali oba gény. Defektná alela sa bude správať ako recesívna (u heterozygota je jedna z dvojice alel funkčná, teda priebeh reakcie zabezpečí). Vo všetkých genotypoch, kde je prítomná aspoň jedna funkčná (teda dominantná) alela v oboch génoch ($A_B_$), môžu prebiehať oba kroky syntézy farbiva, farbivo teda v liste bude prítomné, list bude červený. Ak je jedinec recesívne homozygotný v ktoromkoľvek géne (alebo v oboch), je zablokovaný prvý alebo druhý krok syntézy (alebo oba), syntéza farbiva teda neprebieha a list zostane zelený (štiepny pomer 9:7). Opačným príkladom môže byť, ak je to isté farbivo vytvárané z jedného prekursora len v jednom kroku, ktorý ale môže prebiehať dvomi nezávislými metabolickými dráhami, riadenými dvomi génmi:



V tomto prípade bude farbivo syntetizované u každého genotypu, ktorý obsahuje aspoň jednu dominantnú alelu ktoréhokoľvek génu ($A_B_$, A_bb , $aaB_$) (štiepny pomer 15:1). Rozličné typy dvojgénovej epistázy a im zodpovedajúce štiepne pomery sú uvedené v tab. 5.

Tab. 5 Štiepne pomery pri rôznych typoch epistázy v porovnaní s komplementaritou génov

Účinok génov	Genotypy			
	A_B_	A_bb	aaB_	aabb
Komplementarita (absencia epistázy)	9	3	3	1
Dominantná epistáza	12		3	1
Recesívna epistáza	9	3	4	
Kumulatívny účinok génov	9	6		1
Dvojnásobná dominantná epistáza	15			1
Dvojnásobná recesívna epistáza	9	7		

Dedičnosť konkrétneho fenotypového znaku u konkrétneho druhu sa zisťuje genetickou analýzou. Jej cieľom je identifikovať, koľko génov kontroluje daný znak, aké alelické varianty sa u nich vyskytujú, a akým spôsobom ovplyvňujú fenotyp. Pri genetickej analýze je možné použiť viacero postupov:

- kontrolované kríženie
- analýza rodokmeňa
- analýza voľnoopeleného potomstva známeho materského jedinca (spoľahlivá genetická analýza je možná len pri neúplnej dominancii alebo kodominancii)
- paralelná analýza haploidného endospermu a diploidného embrya nahosemenných rastlín (týka sa molekulárnych alebo biochemických znakov).

Pri všetkých postupoch sa skutočné fenotypové štiepne pomery v potomstve či v rodokmeni porovnávajú s pomermi predpokladanými na základe Mendelových zákonov pomocou

štatistických testov (χ^2 -test, exaktný binomický test a pod.). Vždy sa začína od najjednoduchšej hypotézy kontroly znaku jedným génom. Pokiaľ sa túto hypotézu nepodarí potvrdiť, t.j. existujú štatisticky významné odchýlky pozorovaných štiepných pomerov od očakávaných, táto hypotéza sa zamietne a sformuluje sa nová hypotéza o kontrole znaku dvoma génmi, atď.

Pri kontrolovanom krížení medzi sebou krížime jedince rôznych alebo rovnakých fenotypov (u rastlín môžeme vykonávať aj umelé samoopelenie) a sledujeme, v akom pomere sa jednotlivé fenotypy objavujú v potomstve z kríženia. V prípade nedomestikovaných organizmov spravidla nemáme k dispozícii vysoko homozygotné čisté línie, musíme teda počítať aj s možnosťou, že jedince parentálnej generácie sú v génoch, kontrolujúcich znak, heterozygotné.

Opačný problém predstavuje identifikácia genotypu konkrétnych jedincov na základe rodokmeňa. Mnohé dedičné choroby sú podmienené defektnými alelami, ktoré majú tendenciu správať sa ako recesívne: u heterozygota je v genotype prítomná aj funkčná alela, ktorá spravidla dokáže svoj defektný náprotivok zastúpiť. Heterozygot sa teda fenotypovo (zdravotným stavom) nijako neodlišuje od homozygota s obidvomi funkčnými alelami. V prípade, že jedinec zdedí obe alely defektné, nemá k dispozícii už tretiu záložnú kópiu, ktorá by mohla defektné alely zastúpiť, dedičná choroba sa teda prejaví. Heterozygotné jedince sú teda prenášačmi dedičnej choroby, aj keď sú fenotypovo zdravé. Ich identifikácia na základe fenotypu nie je možná, ale možné je vylišiť také jedince na základe fenotypových prejavov ich predkov alebo ich potomstva.

Gonozomálna dedičnosť

Väčšina chromozómov sa v diploidnej bunke vyskytuje v pároch, v rámci ktorých sú oba chromozómy plne homologické, teda nesú tie isté gény (môže sa ale jednať o rôzne alely) v tom istom usporiadaní. Tieto chromozómy sa označujú ako autozómy. Pri mnohých organizmoch je ovšem pohlavie určené prítomnosťou špecifických pohlavných chromozómov (gonozómov), ktoré sú na rozdiel od autozómov homologické len z malej časti. V prípade cicavcov a ďalších organizmov (typ dedičnosti *Drosophila*) sa dvojica pohlavných chromozómov označuje ako chromozómy X a Y. Jedinec s konšteláciou gonozómov XY je samec (heterogametické pohlavie, vytvárajúce dva rôzne typy gamét, v tomto prípade spermii, určujúcich teda pohlavie potomstva), jedinec s konšteláciou XX je samica (homogametické pohlavie; samice cicavcov tvoria len jeden typ vajíčok). Pohlavie je určené práve prítomnosťou chromozómu Y, konkrétne je to lokus *SRY* (*sex-determining region Y*), obsahujúci gén pre kontrolu syntézy testosterónu, ktorý je pre pohlavie určujúci (t.j. pri rôznych aneuploidných konšteláciách pohlavných chromozómov práve prítomnosť chromozómu Y určuje, že jedinec bude samcom, t.j. aneuploidné jedince s konšteláciou XXY bude mať samčie pohlavie). Pri iných organizmoch môže byť situácia odlišná, pohlavie určuje počet chromozómov X (t.j. aneuploid s konšteláciou XXY bude samica). U vtákov, niektorých plazov, motýľov a ďalších organizmov (typ dedičnosti *Abraxas*) sa gonozómy označujú Z a W; naopak oproti cicavcom homogametické pohlavie je samec (ZZ), heterogametické samica (ZW). U viacerých druhov hmyzu (šváby, rovnokrídlovce, niektoré blanokrídlovce) jeden chromozóm chýba úplne: jedinec s konšteláciou XX je samica, jedinec s konšteláciou XO samec (autozómy u samca sú v pároch, ale gonozóm má len jeden: 0 znamená chýbajúci gonozóm), niektoré mory majú konšteláciu opačnú, teda ZZ je samec, Z0 samica. Typické určenie pohlavia u sociálnych blanokrídlovcov (včely, osy, mravce), ale aj niektorých vošiek, je haplodiploidné určenie: z neoplodnených vajíčok sa liahnu haploidné samce (na rozdiel od konštelácie XO majú aj autozómy len v haploidnej sade), z oplodnených samice.

V prípade cicavcov väčšina génov na chromozóme X nemá svoj náprotivok na oveľa kratšom chromozóme Y. Jedince sú teda v takomto géne hemizygotné. Táto skutočnosť ovplyvňuje aj mechanizmus dedičnosti, ktorá sa v tomto prípade neriadi Mendelovými pra-

vidlami. Potomstvo v F_1 nemusí byť uniformné a recipročné kríženia neposkytujú rovnaký výsledok.

Aj v prípade pohlavných chromozómov platí, že defektné mutácie (označujú sa X^+) majú tendenciu správať sa ako recesívne. Ak je nositeľom takejto defektnej mutácie samec, poškodenie sa u neho prejaví, keďže na chromozóme Y nemôže mať dominantnú alelu, ktorá by vplyv defektnej mutácie prekryla (genotyp X^+Y). U samice sa defektná vloha prejaví, len ak je v nej homozygotná (X^+X^+), inak je len jej prenášačkou (X^+X). V potomstve F_1 teda môžu nastať situácie, uvedené v tab. 6.

Tab. 6 Fenotypové štiepne pomery v generácii F_1 pri recesívne monogénne podmienenom dedičnom postihnutí s gonozomálnou dedičnosťou

matka		otec		potomok F_1		
genotyp	fenotyp	genotyp	fenotyp	genotyp	fenotyp	pravdepodobnosť
XX	zdravá	XY	zdravý	XX	♀ zdravá	0,5
				XY	♂ zdravý	0,5
XX^+	zdravá	XY	zdravý	XX	♀ zdravá	0,25
				XY	♂ zdravý	0,25
				XX^+	♀ zdravá	0,25
				X^+Y	♂ chorý	0,25
XX	zdravá	X^+Y	chorý	XX^+	♀ zdravá	0,5
				XY	♂ zdravý	0,5
XX^+	zdravá	X^+Y	chorý	XX^+	♀ zdravá	0,25
				XY	♂ zdravý	0,25
				X^+X^+	♀ chorá	0,25
				X^+Y	♂ chorý	0,25
X^+X^+	chorá	XY	zdravý	XX^+	♀ zdravá	0,5
				X^+Y	♂ chorý	0,5
X^+X^+	chorá	X^+Y	chorý	X^+X^+	♀ chorá	0,5
				X^+Y	♂ chorý	0,5

Pochopiteľne, v prípade, že žiadny z rodičov nie je prenášačom postihnutia ($XX \times XY$), je všetko potomstvo zdravé. Ako je však z tab. 6 viditeľné, kríženie zdravej matky a postihnutého otca dáva iný výsledok než kríženie postihnutej matky a zdravého otca (teda recipročné kríženia nie sú rovnocenné) a potomstvo v troch prípadoch nie je uniformné.

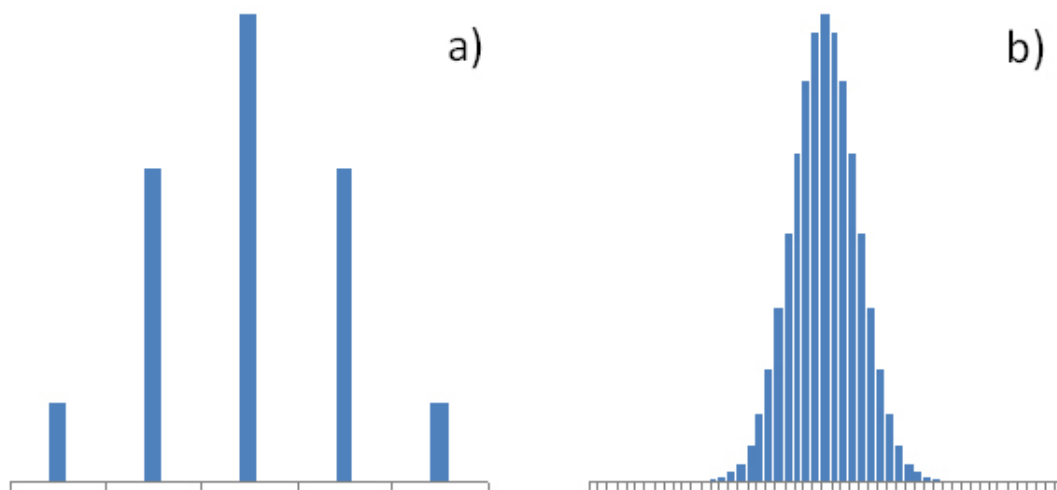
Dedičnosť kvantitatívnych znakov

Názor na vzťah medzi génom a znakom sa v priebehu vývoja genetiky menil. Pôvodný náhľad z Mendlových čias 1 gén = 1 znak sa s rozvojom biochémie zmenil na 1 gén = 1 enzým, neskôr 1 gén = 1 polypeptid, a dnes sa zdá, že už ani táto hypotéza neplatí (viď informácie o alternatívnom zostihu mRNA).

Gén môže v mnohých prípadoch súčasne ovplyvňovať viacero znakov, čo sa označuje ako pleiotropný účinok génu. Naopak, iné znaky môžu byť kontrolované polygénne, teda na kontrole sa podieľa viacero (niekedy aj niekoľko desiatok) génov, z ktorých každý prispieva svojou časťou (ktorá nemusí byť pri všetkých alelách rovnako veľká). Typická je táto situácia pri kvantitatívnych znakoch. Čím vyšší je počet kontrolujúcich génov, tým vyšší je počet genotypových kombinácií a teda aj fenotypových tried; naopak medzialelické a medzigénové interakcie počet fenotypových tried znižujú. Pri malom počte kontrolujúcich génov sa fenotypové triedy spravidla dajú rozoznať, ale s narastajúcim počtom génov sú ich hranice stále

menej zreteľné a rozdelenie fenotypových tried sa postup mení z diskrétného na spojité (obr. 18).

Genetickú analýzu kvantitatívnych znakov navyše komplikujú nerovnaké účinky rôznych génov na fenotypový znak, a takisto medzigénové a medziálelické interakcie (epistáza a dominancia). Pri kontrole znaku viac ako 3 génmi je už genetická analýza znaku značne obtiažna. Pri identifikácii génov, riadiacich kvantitatívne znaky sa spravidla vychádza z korelácií fenotypového prejavu s genotypom v konkrétnom géne. Často nie sme schopní gén priamo identifikovať, ale jeho hypotetickú existenciu postulujeme na základe korelácií s markérmí v rovnakej väzbovej skupine. Takéto hypotetické lokusy sa označujú ako QTL (*Quantitative Trait Locus*).



Obr. 18 Rozdelenie hodnôt fenotypového znaku v potomstve z kríženia dvoch úplne homozygotných rodičov pri kontrole znaku 4 génmi (a) a 40 génmi (b) pri čisto aditívnom účinku génov (žiadna dominancia ani epistáza) a rovnakom efekte alel každého génu.

GENETIKA POPULÁCIÍ

Populácia a jej štruktúra

Populácia je súbor jedincov rovnakého druhu, obývajúcich konkrétny biotop v konkrétnom čase, ktorí sú schopní sa navzájom medzi sebou krížiť. Táto definícia vyzerá jednoducho, ale vymedzenie populácie v teréne je spravidla zložité. Aj u druhov s fragmentovaným areálom si jednotlivé ostrovčeky (demy) do určitej miery môžu vymieňať gény pri reprodukcií. V praxi sa teda pojem populácia spravidla používa ako operačný koncept pre skupinu jedincov rovnakého druhu, žijúcu na konkrétnej lokalite alebo v konkrétnej oblasti – v tomto zmysle možno hovoriť o lokálnej populácii, regionálnej populácii atď.

Populáciu možno charakterizovať viacerými vlastnosťami, ktoré ovplyvňujú v značnej miere vývoj jej genetickej štruktúry. Základným populačným parametrom je veľkosť, teda počet jedincov, z ktorých sa populácia skladá. Z hľadiska je ale potrebné si uvedomiť, že nie všetky jedince prítomné v populácii sa aj musia podieľať na reprodukcií a teda v rovnakej miere odovzdávať svoju dedičnú informáciu generácii potomstva. Preto sa v populačno-genetických modeloch zohľadňuje efektívna veľkosť, ktoré prepočítava reálny počet jedincov na hypotetický počet jedincov rovnomerne sa podieľajúcich na reprodukcií. Ďalšími dôležitými vlastnosťami sú hustota (počet jedincov na jednotku plochy alebo objemu), dynamika vývoja (rast, stabilita, pokles početnosti), štruktúra (pohlavná, veková atď.) a priestorový rozptyl (zhlukovanie, náhodné rozmiestnenie, rovnomerné odstupy). Všetky tieto vlastnosti sú jednak závislé od druhu, a jednak sa môžu meniť v priebehu ontogenézy (semenáčky dre-

vín majú v prirodzenom poraste tendenciu ku zhľukovaniu v porastových medzerách, dospelé stromy sú naopak rozmiestnené spravidla rovnomerne vzhľadom na vzájomnú kompetíciu; populácia lariev hmyzu sa môže správať úplne odlišne od imág a pod.).

Vlastnosť, určujúca v najväčšej miere vývoj zastúpenia génov, genotypov a fenotypov v populácii, je systém reprodukcie, t.j. spôsob odovzdávania genetickej informácie z jednej generácie na nasledujúcu. Z hľadiska systému reprodukcie možno rozoznávať dva typy párovania. Panmixia je náhodné párovanie, pri ktorom pravdepodobnosť spojenia ktorýchkoľvek dvoch gamét je nezávislá od ich pôvodu a ich haplotypu. Pre vznik zygoty teda nie je dôležité, aké gény sú v gamétach zastúpené. Pre výber partnera pre párovanie neexistujú žiadne kritériá, je úplne náhodný. Pri výberovom párovaní (angl. *assortative mating*) naopak takéto kritériá existujú, jedince, ktoré ich spĺňajú, majú väčšiu šancu spojiť sa pri reprodukcii, než jedince, ktoré ich neplnia (napr. stromy, kvitnúce v rovnakej dobe, majú vyššiu šancu vzájomného opelenia než stromy, ktoré sú fenologicky asynchrónne). Kritériom výberu môže byť aj príbuzenstvo, príbuzenské kríženie sa označuje aj termínom inbreeding. Extrémnym prípadom príbuzenského kríženia je autogamia (samoopelenie resp. samooplodnenie). V reálnych populáciách sa samozrejme vyskytujú prechody medzi oboma extrémami.

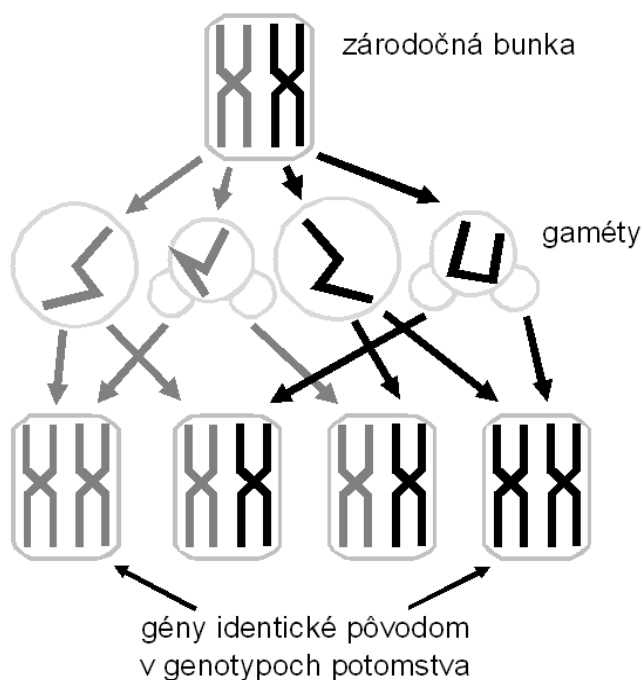
Genetickú štruktúru populácie definujú podiely jednotlivých genotypov (genotypová štruktúra) a podiely jednotlivých génov resp. ich variantov – alel (alelická štruktúra), čiže genotypové a alelické frekvencie (relatívne početnosti). Frekvencie sa dajú vyjadriť ľubovoľným spôsobom: pri známej malej veľkosti populácie aj absolútnou početnosťou, vo veľkých populáciách je zmysluplnejšie odhadovať ich relatívny podiel, t.j. vyjadrovať ich percentuálne. Z hľadiska ich použitia pre matematické operácie je najjednoduchšie ich vyjadrenie relatívnym podielom, t.j. desatinným číslom (t.j. počet jedincov genotypu AA je 20 jedincov v populácii s počtom členov 1000, čo predstavuje podiel 2%, frekvencia je $P_{AA} = 0,02$). Pri konečnom a nízkom počte jedincov v populácii a možnosti ogenotypovať všetkých z nich (čo je v praxi zriedkavá situácia) je možné určiť frekvencie genotypov presne, ale spravidla sme odkázaní na výberové postupy a odhad genotypových a alelických frekvencií z výberovej vzorky. Z praktického hľadiska sa spravidla používa bodový odhad, frekvencia genotypu A_iA_j sa dá odhadnúť ako $P(A_iA_j) = n(A_iA_j) / \sum_k \sum_l n(A_kA_l) = n(A_iA_j) / N$, kde $n(A_iA_j)$ je počet jedincov genotypu A_iA_j vo výberovej vzorke ($k, l = 1 \dots$ celkový počet alel) a N je celkový rozsah výberu (celková početnosť všetkých genotypov spolu vo výberovej vzorke). Bodový odhad frekvencie i . alely sa určí z podielov genotypov, v ktorých je daná alela zastúpená: $p(A_i) = P(A_iA_i) + \sum_j 0,5P(A_iA_j); j \neq i$ (v genotype homozygota je zastúpená len sledovaná alela, v genotype heterozygotov je to vždy jedna z dvoch, teda $1/2$). Pre určenie strednej chyby odhadu sa vychádza zo skutočnosti, že relatívne početnosti majú binomické rozdelenie. Variancia odhadu premennej s binomickým rozdelením je vo všeobecnosti $V_p = p(1 - p)/n$, stredná chyba je odmocninou variancie. Stredná chyba odhadu frekvencie genotypu A_iA_j je teda $s_{P(A_iA_j)} = \sqrt{P(A_iA_j) \cdot [1 - P(A_iA_j)] / N}$, stredná chyba odhadu frekvencie alely A_i je $s_{p(A_i)} = \sqrt{p(A_i) \cdot [1 - p(A_i)] / 2N}$ (jedince sú diploidné, teda vo výberovom súbore N genotypov je zastúpených $2N$ alel). Zo stredných chýb je následne možné určiť intervalové odhady frekvencií. Skupina tesne viazaných génov sa môže z generácie na generáciu odovzdávať spolu, tvorí tzv. haplotyp. To isté platí pre organelárnu DNA (mitochondriálnu a chloroplastovú), kde tiež nedochádza k rekombinácii a teda molekula DNA sa pri reprodukcii odovzdáva potomstvu ako celok. Pre odhady haplotypových frekvencií a ich stredné chyby platia rovnaké vzťahy ako pre genotypové frekvencie. Pri dvojiciach alebo skupinách voľne sa rekombinujúcich génov (napr. lokalizovaných na rôznych chromozómoch) platia pre odhad frekvencie kombinácie génov zákony pravdepodobnosti: frekvencia kombinácie génov v gamétach kombinácie alebo

genotypov je súčinom frekvencií génov/genotypov: $P(A_i B_k) = P(A_i) \cdot P(B_k)$; $P(A_i A_j B_k B_l) = P(A_i A_j) \cdot P(B_k B_l)$. Napríklad gén pre systém krvných skupín AB0 je lokalizovaný na chromozóme 9, gén pre Rh-faktor na chromozóme 1, kombinujú sa teda nezávisle na sebe. Ak je v konkrétnej populácii frekvencia krvnej skupiny AB (teda heterozygotov $I^A I^B$) 8% a frekvencia nositeľov Rh- (teda homozygotov rr) je 15%, frekvencia kombinácie AB- bude $0,08 \times 0,15 = 0,012$, teda 1,2% (čo zhruba zodpovedá pomerom strednej Európy).

Príbuzenstvo a príbuzenské kríženie

Príbuzenstvo je bežný hovorový pojem, ktorým sa rozumie skutočnosť, že dvaja jedinci zdieľajú spoločného predka alebo predkov. Terminológia, ktorú používame vo vzťahu k príbuzenským väzbám v ľudskej populácii, síce popisuje tieto väzby zrozumiteľnou formou (vlastný súrodenec, nevlastný súrodenec, rodič, potomok, starý rodič, strýko atď.), ale nie je jednoznačná (pojem „strýko“ sa používa ako pre matkinho/otcovho brata, teda pokrvného príbuzného, tak aj pre manžela matkinej/otcovej sestry, ktorý je so sledovaným jedincom príbuzný v sociálnom, ale nie v biologickom zmysle) a neumožňuje kvantifikáciu miery príbuznosti.

Biologická definícia príbuznosti dvoch jedincov (angl. *coancestry*) vychádza z rovnakého základu ako hovorový pojem, teda zo zdieľania spoločného predka, od ktorého jedinci zdedili časť svojej genetickej výbavy. Pochopiteľne, čím viac takýchto spoločných predkov dvaja jedinci zdieľajú a čím menej generácií ich od nich delí, tým je tento podiel spoločnej dedičnej informácie vyšší. Exaktne o možno vyjadriť mierou identity génov pôvodom (angl. *identity by descent*), teda pravdepodobnosťou, s akou je dvojica homologických génov náhodne vybraných z genómu jedincov predstavuje dve kópie toho istého génu, ktoré vznikli replikáciou úseku na rovnakej molekule DNA v genóme spoločného predka. Zohľadňuje sa len autozomálny jadrový genóm, dedený po oboch rodičoch; uniparentálne dedené mitochondriálne a chloroplastové gény predstavujú len zlomok celkovej dedičnej výbavy a je možné ich zanedbať, takisto sa neberú do úvahy gény chromozómu Y, dedené len po otcovi.



Obr. 19 Identita génov pôvodom pri samoopelení na príklade páru homologických chromozómov. Chromatidy resp. chromozómy, zobrazené rovnakou farbou, predstavujú kópie rovnakej molekuly DNA

Každá somatická bunka (vrátane zárodočných buniek, z ktorých sa tvoria gaméty) obsahuje dvojicu autozómov. Pravdepodobnosť, že dve náhodne vybrané gaméty budú obsahovať kópie rovnakého chromozómu, je teda len 50%. Koeficient príbuzenstva dvoch jedincov pochádzajúcich zo samoopelenia je teda len 0,5, nie 1, napriek tomu, že pri samoopelení otec a matka je jeden a ten istý jedinec (obr. 19). Analogicky koeficient príbuzenstva medzi plno-sesterskými príbuznými (“vlastní súrodenci”) alebo medzi rodičom a potomkom je 0,25, pri polosesterských príbuzných (“nevlastní súrodenci”, ktorí majú spoločného jedného z rodičov), druhostupňových súrodencoch (bratraci, sesternice) a vzťahu starý rodič – vnuk je 0,125, a rovnako je možné kvantifikovať mieru akéhokoľvek príbuzenského vzťahu, vyjadreného hovorovým pojmom.

Príbuzenské kríženie sa označuje termínom inbreeding. Miera inbreedingu jedinca sa meria rovnakým spôsobom ako príbuzenstvo jeho rodičov – koeficient inbreedingu jedinca je rovný koeficientu príbuznosti rodičov. Keďže v rodokmeni jedinca sa môže vyskytnúť viacero spoločných predkov jeho rodičov a každý z nich prispieva k miere inbreedingu, je možné vypočítať koeficient inbreedingu ako sumu ich príspevkov:

$$F = \sum_i 0.5^{n_i + m_i + 1} \cdot (1 + F_i)$$

kde n_i a m_i je počet generácií, ktoré delia jedinca od i . spoločného predka a F_i je koeficient inbreedingu i . spoločného predka (ak už genómy spoločných predkov samy o sebe obsahujú gény identické pôvodom, je možnosť ich odovzdania obom rodičom jedinca a teda zvyšuje sa pravdepodobný podiel IBD génov v jeho genóme).

Malá početnosť populácie logicky vedie k zvýšenému inbreedingu. Vo veľkej populácii, pokiaľ nie je priestorovo alebo inak štrukturovaná, vedie náhodný výber spravidla k voľbe nepríbuzného partnera (viď ľudská populácia v súčasnosti). Pokiaľ je však populácia početne obmedzená, vytvorí sa v nej už v priebehu generácií sieť príbuzenských vzťahov, takže jedinec v princípe nemá možnosť vybrať si partnera, s ktorým by nebol v príbuzenskom vzťahu (viď populácie malých dedín ešte v nedávnej minulosti). Medzi veľkosťou populácie a priemerným koeficientom inbreedingu pri náhodnom párovaní existuje funkčný vzťah. N jedincov obsahuje $2N$ autozómov. Pravdepodobnosť, že sa v zygotе potomstva náhodne stretnú dve repliky toho istého chromozómu je teda $1/(2N)$. Ostatných $1 - 1/(2N)$ zygot potomstva teda obdrží kópie rozdielnych chromozómov, ovšem už tieto môžu obsahovať gény identické pôvodom vďaka inbreedingu v predchádzajúcich generáciách s pravdepodobnosťou, ktorú kvantifikuje koeficient inbreedingu rodičovskej generácie. Koeficient inbreedingu v t . generácii F_t je teda súčet pravdepodobností oboch prípadov:

$$F_t = 1/(2N) + [1 - 1/(2N)] \cdot F_{t-1}$$

(vzťah vychádza z veľkosti populácie N , ktorá sa v čase nemení). Prírastok inbreedingu za jednu generáciu ($\Delta t = 1$) sa teda dá vypočítať ako:

$$\Delta F = 1/(2N)$$

Čím menšia populácia (N), tým je prírastok inbreedingu väčší, teda tým rýchlejšie sa v nej vytvára príbuzenstvo a hromadí inbreeding.

Vývoj genetickej štruktúry panmiktickej populácie (Hardy-Weinbergov zákon)

Panmixia je definovaná ako úplne náhodné párovanie, teda absencia akýchkoľvek kritérií pre výber partnera pre párovanie. Aj v panmiktických populáciách dochádza k príbuzenskému kríženiu, ale len v miere, ktorá zodpovedá „hustote“ príbuzenských vzťahov v populácii, teda podielu príbuzenských dvojíc na všetkých možných pároch jedincov opačného pohlavia v populácii.

Základnou zákonitosťou, ktorá popisuje prenos genetickej informácie medzi generáciami v panmiktickej populácii, je Hardy-Weinbergov zákon: zastúpenie jednotlivých alelických variantov (alelické frekvencie) zostáva z generácie na generáciu nezmenené, ak v

populácii nepôsobí žiadny z faktorov, ktoré tento stav môžu zmeniť: selekcia, mutácie, migrácia a genetický drift. Zároveň stačí jediná generácia náhodného párovania, aby sa ustanovili aj konštantné podiely jednotlivých genotypov, ktoré zodpovedajú binomickému (pri 2 alelách) resp. multinomickému (pri viacerých alelách) pravdepodobnostnému rozdeleniu, ktoré sa už v ďalších generáciách takisto nemenia. Panmiktická populácia je teda z genetického hľadiska v rovnováhe, nedochádza v nej k žiadnym zmenám genetickej štruktúry na úrovni jednotlivého génu. Akékoľvek zmeny sú indikátorom pôsobenia niektorého z evolučných faktorov.

Je potrebné pripomenúť, že Hardy-Weinbergov zákon popisuje idealizovaný stav populácie, vzťahuje sa na autozomálne lokusy, a *sensu stricto* platí len v efektívne nekonečne veľkých populáciách za predpokladu oddelených generácií. Drobné odchýlky od týchto podmienok (prekryv generácií, konečné ale veľké populácie) spravidla nevyvolávajú merateľné odchýlky od rovnovážneho stavu: odchýlka spôsobená nedodržaním podmienok je spravidla menšia ako výberová chyba odhadu alelických alebo genotypových frekvencií.

Hardy-Weinbergov princíp platí u všetkých diploidných, pohlavne sa množiacich organizmov, ale realizácia náhodného párovania sa u rastlín odlišuje od živočíchov. V prípade rastlín sa náhodne párujú gaméty (resp. gametofyty), teda haploidná generácia. Sporofyty papraďorastov a cievnatých rastlín sú nepohyblivé, a s nimi aj samičie gaméty, viazané na organizmus materskej rastliny. Nech je však vektor prenosu peľu akýkoľvek (vietor, hmyz, voda), peľové zrná – samčie gametofyty – sa pohybujú v priestore; pokiaľ ich výber materskej rastliny a teda aj oplodnenej samičej gaméty je náhodný, rastlinná populácia sa správa ako panmiktická. V najjednoduchšom prípade, teda v prípade génu s dvoma alelami, je možné princíp Hardy-Weinbergovho zákona popísať nasledovne:

V generácii t je v populácii sú genotypy v géne A s úplnou dominanciou zastúpené nasledovne: dominantní homozygoti AA podielom P , heterozygoti Aa podielom Q , recesívni homozygoti aa podielom Q (v prípade dvojdomých rastlín s rovnakým podielom samcov a samíc vo všetkých genotypových triedach). Pri rozmnožovaní dominantní homozygoti AA tvoria len gaméty s dominantnou alelou A . U heterozygotov Aa dochádza ku segregácii alel v pomere 1:1 (za predpokladu, že ide o autozomálny lokus), teda polovica gamét, ktoré vytvárajú, bude obsahovať dominantnú alelu A a druhá polovica recesívnu alelu a . Recesívni homozygoti aa tvoria len gaméty s recesívnou vložou a . V zmysle vzťahov uvedených v prvej podkapitole je podiel dominantnej alely v gamétach $p = P + \frac{1}{2}H$, podiel recesívnej alely $q = Q + \frac{1}{2}H$ ($p_{\delta} = p_{\varphi}$, $q_{\delta} = q_{\varphi}$). Očakávané podiely genotypov v generácii $t + 1$ možno pri náhodnom kombinovaní gamét (čo je z definície podmienka panmixie) určiť na základe kombinatoriky (obr. 20). Pravdepodobnosť vzniku dominantne homozygotného genotypu AA , t.j. prípad, ak sa do zygoty spoja dve gaméty, ktoré sú nositeľkami dominantnej alely A , je $p_{\delta} \times p_{\varphi} = p^2$. Analogicky, pravdepodobnosť vzniku recesívne homozygotného genotypu aa je $q_{\delta} \times q_{\varphi} = q^2$. Pravdepodobnosť spojenia dvoch genotypovo rozdielnych gamét s alelami A a a do heterozygotnej zygoty Aa je $p_{\delta} \times q_{\varphi} + p_{\varphi} \times q_{\delta} = 2pq$ (obr. 20). Rozdelenie frekvencií genotypov v následnej generácii ($t + 1$) je teda binomické: $p^2 AA : 2pq Aa : q^2 aa$.

Keď jedinci generácie $t + 1$ dorastú do reprodukčného veku, začnú vytvárať haploidné gaméty. Podľa rovnakej logiky, akú sme uplatnili v generácii t , dominantní homozygoti AA , zastúpení v populácii podielom p^2 , tvoria len gaméty s dominantnou alelou A , heterozygoti Aa , ktorí sú v populácii zastúpení podielom $2pq$, gaméty s dominantnou a recesívnou vložou v pomere 1:1, recesívni homozygoti len gaméty s recesívnou alelou a . Podiel gamét s dominantnou alelou teda bude $p^2 + \frac{1}{2} \cdot 2pq = p^2 + pq = p(p + q)$ a podiel gamét s recesívnou alelou $q^2 + \frac{1}{2} \cdot 2pq = q^2 + pq = q(p + q)$. Ak sú v populácii zastúpené len alely A a a , súčet ich frekvencií je 100%, teda $p + q = 1$, čoho dostávame opäť frekvencie $p \times 1 = p$; $q \times 1 = q$.

		♂	
		$p A$	$q a$
♀	$P A$	$p \times p$ $= p^2$ AA	$p \times q$ $= pq$ Aa
	$Q a$	$q \times p$ $= pq$ Aa	$q \times q$ $= q^2$ aa

Obr. 20 Očakávané podiely potomstva pri náhodnom párovaní gamét

Tab. 7 Schéma zmien alelických a genotypových frekvencií v panmiktickej rastlinnej populácii.

Generácia	Genotypové frekvencie				Frekvencie alel v gamétach		
	AA	Aa	aa	Spolu	A	a	Spolu
0	P	H	Q	1			
					$p = P_{(AA)} + \frac{1}{2}H_{(Aa)}$	$q = \frac{1}{2}H_{(Aa)} + Q_{(aa)}$	1
1 produkované gaméty	p^2 ↓ 100% A	$2pq$ ↓ 50% A + 50% a	q^2 ↓ 100% a	1			
					$P_{(AA)} + \frac{1}{2}H_{(Aa)} =$ $p^2_{(AA)} + \frac{1}{2} 2pq_{(Aa)} =$ $= p^2 + pq$ $= p(p + q) = p$	$Q_{(aa)} + \frac{1}{2}H_{(Aa)} =$ $q^2_{(aa)} + \frac{1}{2} 2pq_{(Aa)} =$ $= q^2 + pq$ $= q(p + q) = q$	1
2	p^2	$2pq$	q^2	1	...		

Pre prehľadnosť je možné celý mechanizmus popísať tabelárnou formou (tab. 7).

V prípade živočíchov (prínajmenšom väčšiny živočíchov, ktoré sú predmetom záujmu terestrickej ekológie) by takýto popis bol krajným zjednodušením. V tomto prípade pohyblivé štádium predstavujú spravidla diploidné dospelé organizmy, a aj keď rozmnožovanie nie je nutne spojené s kopuláciou, k spojeniu samčích a samičích gamét dochádza v mieste, ktoré je dané pozíciou samčieho a samičieho jedinca. To, čo sa páruje, sú teda dospelé jedince s konkrétnymi genotypmi, nie haploidné gaméty. Aj tu však platí, že pravdepodobnosť párovania dvoch genotypov je úmerná ich zastúpeniu v populácii (t.j. očakávaná frekvencia pohlavného spojenia dvoch genotypov je rovná súčinu ich frekvencií v populácii; obr. 21).

Pri popise panmixie v živočíšnej populácii a odhade očakávaných podielov alel a genotypov je potrebné zohľadniť zastúpenie genotypov v rodičovskej generácii a genotypové štiepne pomery pri jednotlivých typoch kríženia (tab. 8).

Ako pri rastlinách (tab. 7), tak aj pri živočíchoch (tab. 8) je zrejmé, že stačí jedna generácia náhodného kríženia, a v populácii sa nezávisle na východiskových frekvenciách

		♂		
		<i>P AA</i>	<i>H Aa</i>	<i>Q aa</i>
♀	<i>P AA</i>	P^2 $AA \times AA$ 1,0 AA	PH $AA \times Aa$ 0,5 AA + 0,5 Aa	PQ $AA \times aa$ 1,0 Aa
	<i>H Aa</i>	PH $Aa \times AA$ 0,5 AA + 0,5 Aa	H^2 $Aa \times Aa$ 0,25 AA + 0,5 Aa + 0,25 aa	QH $Aa \times aa$ 0,5 Aa + 0,5 aa
	<i>Q aa</i>	PQ $aa \times AA$ 1,0 Aa	QH $aa \times Aa$ 0,5 Aa + 0,5 aa	Q^2 $aa \times aa$ 1,0 aa

Obr. 21 Pravdepodobnosti vzniku jednotlivých genotypových rodičovských kombinácií a zastúpenie genotypov v ich potomstve

genotypov (P , H , Q) ustáli konštantná genotypová štruktúra, v prípade bialelického lokusu podiel p^2 homozygotov AA , $2pq$ heterozygotov Aa a q^2 homozygotov aa . Túto štruktúru však možno rozšíriť na gén s ľubovoľným počtom alel: frekvencia ľubovoľného homozygota A_iA_i je p_i^2 , frekvencia ľubovoľného heterozygota A_iA_j je $2p_ip_j$. Takisto sa v populácii udržiava konštantná alelická štruktúra, alelické frekvencie takisto zostávajú nemenné. Táto konštantnosť alelickej a genotypovej štruktúry je dôvodom, prečo sa panmixia spravidla berie ako štandard, voči ktorému sa porovnáva genetická štruktúra reálnej populácie. Predpokladom absencie zmien je, že párovanie v populácii je náhodné (teda neexistuje žiadna preferencia pri výbere partnera), všetky genotypy sú rovnako životaschopné a rovnako plodné (t.j. v populácii neprebíha žiadna selekcia), že nedochádza k zmenám identity génov (mutáciám), k prenosu génov z iných populácií (migrácii) a že populácia je dostatočne veľká na to, aby odolávala náhodným zmenám (genetickému driftu), pretože len vo veľkej populácii sa skutočné podiely genotypov približujú očakávaniam založeným na binomických (multinomických) pravdepodobnostiach.

Komplikovanejšia je situácia v prípade gonozomálnych génov. Ak sa jedná o gén, lokalizovaný v heterologickej časti pohlavného chromozómu Y , dedí sa výlučne otcovi (v prípade cicavčieho typu dedičnosti pohlavia), a pri absencii evolučných mechanizmov zostáva jeho frekvencia konštantná. Pri gène viazanom na chromozóm X sa môže dediť od oboch rodičov (obr. 22).

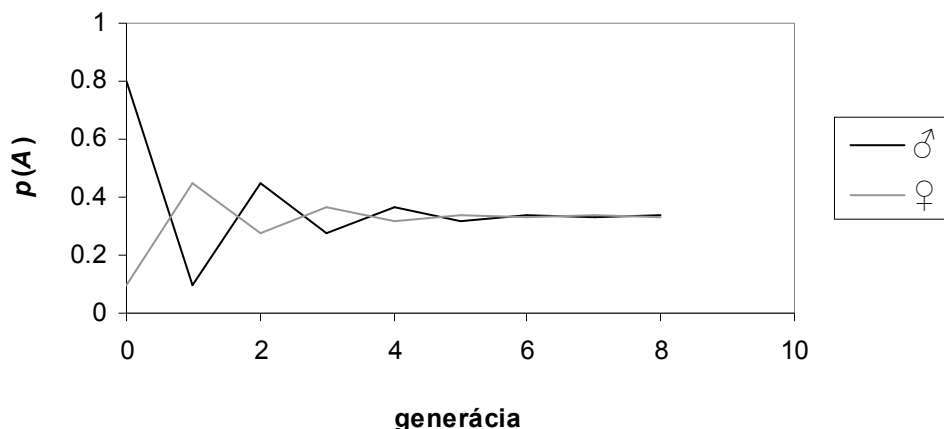
Gény viazané na chromozóm X sa vyskytujú u homogametického pohlavia (v prípade cicavcov samice) v 2 exemplároch, zatiaľ čo u heterogametického pohlavia len v jednom, teda samice prispievajú k frekvencii génu v populácii dvomi tretinami, samce jednou

Tab. 8 Schéma zmien alelických a genotypových frekvencií v panmiktickej živočíšnej populácii.

		Genotypové frekvencie rodičov			Alelické frekvencie	
		AA	Aa	aa	A	a
Generácia 0		P	H	Q	p=P+H/2	q=Q+H/2
Kríženie	Frekv	Genotypové frekvencie potomstva				
AA × AA	P ²	P ²	0	0		
AA × Aa	2PH	½ 2PH	½ 2PH	0		
AA × aa	2PQ	0	2PQ	0		
Aa × Aa	H ²	¼ H ²	½ H ²	¼ H ²		
Aa × aa	2QH	0	½ 2QH	½ 2QH		
aa × aa	Q ²	0	0	Q ²		
Σ		P ² +PH+¼H ² =(P+½H) ² =p²	PH+2PQ+QH+½H ² =2(P+½H)(Q+½H) =2pq	Q ² +QH+¼H ² =(Q+½H) ² =q²	p²+½·2pq =p²+pq=p	q²+½·2pq =q²+pq=q
Generácia 1						
Kríženie	Frekv	Genotypové frekvencie potomstva				
AA × AA	p ² ·p ²	p ⁴	0	0		
AA × Aa	2(p ² ·2pq)	2p ³ q	2p ³ q	0		
AA × aa	2(p ² ·q ²)	0	2p ² q ²	0		
Aa × Aa	2pq·2pq	P ² q ²	2p ² q ²	p ² q ²		
Aa × aa	2(2pq·q ²)	0	2pq ³	2pq ³		
aa × aa	q ² ·q ²	0	0	q ⁴		
Σ		p ⁴ +2p ³ q+p ² q ² =p ² (p ² +2pq+q ²) =p ² ·1 =p²	2(p ³ q+2p ² q ² +pq ³) =2pq(p ² +2pq+q ²) =2pq·1 =2pq	p ² q ² +2pq ³ +q ⁴ =q ² (p ² +2pq+q ²) =q ² ·1 =q²	p²+½·2pq =p²+pq=p	q²+½·2pq =q²+pq=q
Generácia 2						
...						

		♂	
		R A0	S a0
♀	P AA	PR ♀AA×♂A0 0,5♀AA+0,5♂A0	PS ♀AA×♂a0 0,5♀Aa+0,5♂A0
	H Aa	HR ♀Aa×♂A0 0,25♀AA+0,25♀Aa +0,25♂A0+0,25♂a0	HS ♀Aa×♂a0 0,25♀Aa+0,25♀aa +0,25♂A0+0,25♂a0
	Q aa	QR ♀aa×♂A0 0,5♀Aa+0,5♂A0	QS ♀aa×♂a0 0,5♀aa+0,5♂a0

Obr. 22 Pravdepodobnosti vzniku jednotlivých genotypových rodičovských kombinácií a zastúpenie genotypov v ich potomstve pri gonozomálnych génoch



Obr. 23 Vývoj frekvencie alely viazanej na X chromozóm u samcov a samíc v panmiktickej populácii.

treťou. Ak pri bialelickom lokuse budú genotypové frekvencie u samíc P homozygotov AA , H heterozygotov Aa a Q homozygotov aa , zatiaľ čo frekvencia hemizygotov A bude R a hemizygotov a bude S , potom frekvencia alely A u samíc je $p_f = P + H/2$, u samcov $p_m = R$ (analogicky $q_f = Q + H/2$; $q_m = S$). Vzhľadom na rozdielny príspevok samíc a samcov k alelickým frekvenciám bude zastúpenie alely A v celej populácii

$$p = \frac{2}{3} p_f + \frac{1}{3} p_m = \frac{1}{3}(2p_f + p_m) = \frac{1}{3}(2P + H + R)$$

(analogicky $q = \frac{1}{3}(2Q + H + S)$).

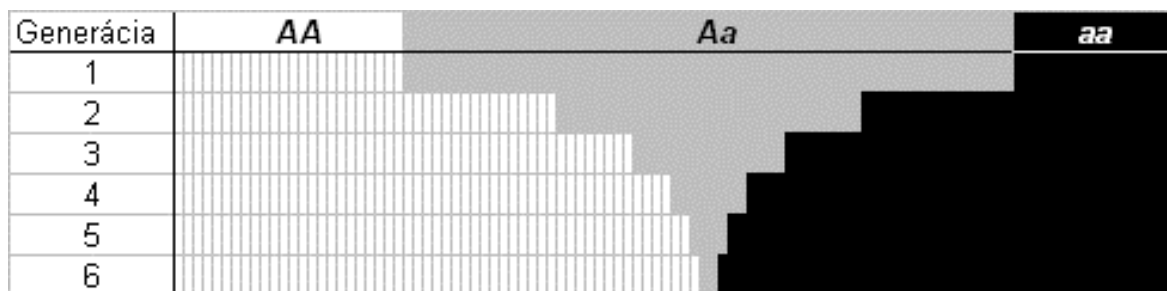
Samce s chromozómovou konšteláciou XY dedia chromozóm X od matky a Y od otca. Gény viazané na gonozóm X teda môže zdediť len od matky, teda frekvencia alely v samčom potomstve je rovná frekvencii u samíc v rodičovskej generácii ($p'_m = p_f$, $q'_m = q_f$). Samice (XX) získavajú jeden chromozóm X od matky, druhý od otca, teda nezávisle na pomere pohlaví frekvencia alely v samičom potomstve je priemerom frekvencií v oboch pohlaviach rodičovskej generácie ($p'_f = \frac{1}{2}(p_f + p_m)$; $q'_f = \frac{1}{2}(q_f + q_m)$). Priemerná frekvencia sa teda nemení, ale frekvencia v rámci pohlaví osciluje okolo rovnovážnej frekvencie a pomerne rýchlo sa k nej približuje (obr. 23).

Rovnaké vzťahy samozrejme platia pri nielen pri určení pohlavia typu *Drosophila* (XY), ale pri všetkých typoch dedičnosti pohlavia, u ktorých o pohlaví rozhodujú nehomologické pohlavné chromozómy alebo absencia pohlavného chromozómu (ZW , $X0$, $Z0$, haplodiploidné určenie).

Vývoj genetickej štruktúry autogamnej populácie

Autogamia je extrémnym prípadom príbuzenského kríženia, keď sa jedinec kríži sám so sebou (pochopiteľne, možná je len pri hermafroditných organizmoch). Vývoj genetickej štruktúry autogamnej populácie je odlišný od prípadu panmixie. Opäť, ilustrácia na príklade bialelického lokusu s úplnou dominanciou: v prvej generácii je zastúpených P dominantných homozygotov AA , H heterozygotov Aa a Q recesívnych homozygotov aa . V populácii prebieha pri rozmnožovaní výlučne samoopelenie, t.j. každý jedinec sa kríži len so sebou samým. U homozygotov samoopelenie produkuje vždy homozygotné potomstvo rovnakého genotypu. U heterozygotov však dochádza k štiepeniu v zmysle Mendelových zákonov: keďže heterozygot produkuje dva typy samčích aj samičích gamét (gaméty s dominantnou a s recesívnou vlohou) a gaméty sa do genotypov potomstva kombinujú náhodne, tento typ samoopelenia produkuje štvrtinu dominantných homozygotov, štvrtinu recesívnych homozygotov a len polovicu heterozygotného potomstva. Aj keď alelická štruktúra populácie zostáva rovnaká, genotypová štruktúra sa na rozdiel od panmixie mení. Podiel heterozygotov expo-

nenciálne klesá vždy na polovicu podielu v predchádzajúcej generácii (obr. 24). Populácia sa rozpadá na zmes homozygotných čistých línií.



Obr. 24 Schéma vývoja genotypovej štruktúry populácie obligátorne autogamného organizmu

Tab. 9 Vývoj genotypovej štruktúry populácie obligátorne autogamného organizmu

	Genotypové frekvencie		
	AA	Aa	aa
Generácia 0	P	H	Q
Gaméty	1,0 A	0,5 A + 0,5 a	1,0 a
Genotypy potomstva	P AA	$H/4$ AA + $H/2$ Aa + $H/4$ aa	Q aa
Generácia 1	$P + H/4$	$H/2$	$Q + H/4$
Gaméty	1,0 A	0,5 A + 0,5 a	1,0 a
Genotypy potomstva	$P + H/4$ AA	$H/8$ AA + $H/4$ Aa + $H/8$ aa	$Q + H/4$ aa
Generácia 2	$P + 3/8 H$	$H/4$	$Q + 3/8 H$
Gaméty	1,0 A	0,5 A + 0,5 a	1,0 a
Genotypy potomstva	$P + 3/8 H$ AA	$H/16$ AA + $H/8$ Aa + $H/16$ aa	$Q + 3/8 H$ aa
Generácia 3	$P + 7/16 H$	$H/8$	$Q + 7/16 H$
...	...	...	...

Efektívna veľkosť populácie

Vo všetkých modeloch vzťahov medzi veľkosťou populácie a inými parametrami (napr. koeficientom inbreedingu) použitie nominálnej veľkosti (teda skutočného počtu jedincov) predpokladá, že všetky jedince odovzdávajú pri reprodukcií gény potomstvu v rovnakej miere. Tento predpoklad zodpovedá realite len výnimočne. Pokiaľ je podiel na tvorbe potomstva nerovnaký, je potrebné nahradiť veľkosť populácie N tzv. efektívnou veľkosťou populácie N_e . Koncept efektívnej veľkosti (efektívneho počtu) zahŕňa dva komponenty: koncept idealizovanej populácie (ktorou je najčastejšie izolovaná, náhodne sa párujúca populácia s oddelenými generáciami, v ktorej neprebíha žiadny výber a nedochádza v nej k mutáciám génov) a koncept parametra, v ktorom sa správanie reálnej populácie porovnáva s idealizovanou. Efektívna veľkosť teda určuje početnosť panmiktickej populácie, ktorá by pri náhodnom krížení vykazovala rovnakú mieru inbreedingu resp. rovnakú variáciu alelických frekvencií (t.j. rovnakú mieru genetického driftu, vid' nižšie) ako hodnotená reálna populácia. Vo vzťahoch pre výpočet prírastku inbreedingu či variácie génových frekvencií by teda správne veľkosť populácie N mala byť nahradená efektívnou veľkosťou N_e .

Odchýlky od ideálne panmiktického párovania, spôsobujúce posun efektívnej veľkosti populácie oproti skutočnému počtu reproduktujúcich sa jedincov, môžu byť dôsledkom viacerých faktorov. V populáciách s oddelenými pohlaviami môže byť nevyvážený podiel samcov a samíc. Je potrebné pripomenúť, že nech je ich pomer akýkoľvek, k tvorbe potomstva

prispievajú obe pohlavia rovnakou mierou, teda ich príspevok k variancii alelických frekvencií musí byť braný rovnakou váhou. Keďže prírastok inbreedingu je úmerný polovici prevrátenej hodnoty veľkosti populácie ($\Delta F = 1/2N_e$), efektívna početnosť sa odvodzuje z dvojnásobku harmonického priemeru početností oboch pohlaví (za predpokladu rovnakej reprodukčnej schopnosti jedincov):

$$N_e = 2 \left[\left(\frac{1}{N_{\sigma}} + \frac{1}{N_{\varphi}} \right) / 2 \right]^{-1} = \frac{4N_{\sigma}N_{\varphi}}{N_{\sigma} + N_{\varphi}}$$

Takisto môže dochádzať ku kolísaniu početnosti populácie v rôznych generáciách. Efektívna veľkosť je opäť odvodená z harmonického priemeru veľkostí populácie v jednotlivých generáciách:

$$N_e = \left[\left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} + \dots + \frac{1}{N_t} \right) / t \right]^{-1}$$

Najbežnejšou príčinou odchýlky od idealizovaného stavu populácie je nerovnaká veľkosť potomstva (spôsobená rozdielmi v plodnosti jedincov alebo životaschopnosti ich potomstiev). Ak sa má populácia udržiavať v konštantnej veľkosti, v každej generácii musia prežiť v priemere 2 potomkovia každého rodičovského páru. Pri takejto veľkosti potomstva je efektívna veľkosť populácie rovná

$$N_e = \frac{4N - 2}{\sigma_n^2 + 2}$$

kde σ_n^2 je variancia veľkostí potomstiev.

MIKROEVOLÚCIA

Genetická štruktúra populácií (alelická, genotypová, haplotypová) sa z generácie na generáciu môže meniť. Ak sú dve populácie navzájom reprodukčne izolované, teda nevymieňajú si pri reprodukcii navzájom gény, ich genetické štruktúry budú s postupom času divergovať. V dôsledku toho sa postupne bude meniť aj ich fenotypová štruktúra až natolko, že ich botanik alebo zoológ zaradí k rozdielnym taxónom. Rýchlosť procesu akumulácie zmien nemusí byť v čase konštantná. V jeho rámci môže dôjsť k nárazovej reorganizácii genómu napríklad masívnym zvýšením frekvencie mutácií po prírodnej katastrofe, zmenou ploidie, zmenou chromozómovej štruktúry, u eukaryotov hybridizáciou, u prokaryotov horizontálnym transferom génov, inkorporáciou genómu endosymbiontov (cyanobaktérie zmenené na chloroplasty, α -proteobaktérie zmenené na mitochondrie) alebo endoparazitov (*Wolbachia*) a pod. Nič to nemení na skutočnosti, že je tento proces spravidla postupný, a preto označovaný ako evolúcia.

Evolučná biológia spravidla rozlišuje medzi mikroevolúciou, teda procesom postupných zmien zastúpenia génov (alelických frekvencií) v rámci populácie, vedúcim k vzniku nových línií, variet až druhov, a makroevolúciou, ako procesom zásadných zmien dedičného materiálu, sprevádzaných zmenou stavebných plánov tela a vedúcim k vzniku vyšších taxónov. Rozdielna je aj časová mierka oboch procesov (aj keď v prípade evolúcie skôr možno hovoriť o komplexoch procesov): mikroevolúcia uvažuje v mierke generácií, makroevolúcia v mierke geologických období.

Biologická realita je spravidla príliš komplexná na to, aby boli synteticky popísané všetky jej aspekty. Populačná genetika preto stavia na modeloch popisujúcich správanie sa populácie pod vplyvom konkrétnych evolučných procesov. Aj keď tieto modely zjednodušujú biologickú skutočnosť, umožňujú pochopiť, ako rozdielne evolučné mechanizmy a faktory ovplyvňujú genetickú a následne fenotypovú štruktúru. V tomto zmysle poskytujú referenčný

štandard, voči ktorému sa porovnáva správanie konkrétnej reálnej populácie alebo súboru populácií.

Mutácie ako zdroj dedičnej premenlivosti

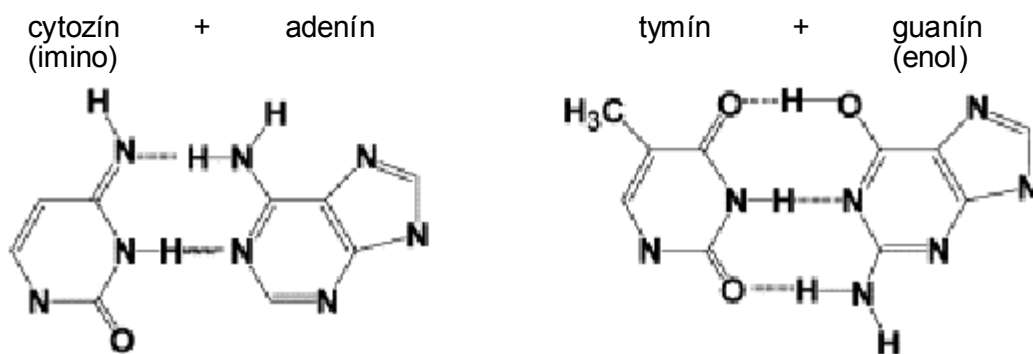
Dedičná premenlivosť vzniká dvomi mechanizmami. Jedným z nich je vytváranie nových kombinácií existujúcich génov, proces označovaný ako rekombinácia. Dochádza k nemu jednak v dôsledku náhodnej segregácie chromozómov do novovytváraných gamét v priebehu ich tvorby meiotickým delením zárodočných buniek, jednak vytváraním nových kombinácií alel v rámci rovnakého chromozómu, teda nových haplotypov, procesom crossing over (viď podkap. *Štruktúra a bunkový cyklus eukaryotickej bunky*). Segregácia a rekombinácia však len novým spôsobom organizujú existujúce alely. Nejedná sa o evolučné procesy: genetická informácia sa v ich dôsledku v skutočnosti nemení, len sa pri zámene generácií vždy usporiada novým spôsobom, ktorý je ovšem náhodný, neumožňuje žiadne smerovanie. Z hľadiska evolúcie dôležitejším zdrojom genetickej premenlivosti je zmena genetickej informácie z hľadiska jej kvality (vznik nových alel) alebo kvantity (zmnoženie alebo úbytok nukleotidov alebo celých DNA molekúl), označovaná termínom mutácia.

Mutácie môžu ovplyvniť genetický materiál v rozdielnom rozsahu. Fenotypový efekt mutácie nemusí byť nutne úmerný jej rozsahu. Zmena jediného nukleotidu môže v závislosti na kontexte genómu ovplyvniť fenotypový prejav drastickejšie než zmnoženie celej chromozómovej sady. Miera ovplyvnenia genetickej výbavy je základom pre klasifikáciu mutácií.

Génové mutácie

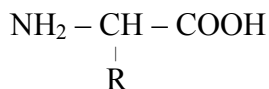
Génové mutácie zasahujú jeden alebo niekoľko nukleotidov v rámci jedného génu, menia teda kvalitu génu. Zmena sekvencie môže spočívať v zmene kvality jedného alebo viacerých nukleotidov, alebo v zmene ich kvantity (prírastok alebo úbytok počtu nukleotidov, teda dĺžky sekvencie génu).

Zámena jedného nukleotidu za iný je označovaná ako bodová mutácia alebo substitúcia. Bodové mutácie sa rozlišujú na tranzície (zámena purínovej bázy za purínovú, teda $A \leftrightarrow G$, alebo pyrimidínovej za pyrimidínovú, teda $C \leftrightarrow T$; tento typ substitúcií je častejší) a transverzie (zámena purínovej bázy za pyrimidínovú alebo naopak, teda $C/T \leftrightarrow A/G$; zriedkavejší typ substitúcie). Takáto zámena môže nastať aj spontánne v dôsledku tautómérie, teda schopnosti organických báz zaujať rôzne priestorové konformácie spojené s presunom elektrického náboja a teda aj párovacej schopnosti. Guanín v normálnej ketoforme (obr. 25) sa páruje s cytozínom, zriedkavejšia enolforma sa páruje s tymínom. Cytozín v zriedkavejšej iminoforme sa páruje s adenínom. Bodové mutácie môžu byť spôsobené aj mutagénymi analógmi báz (5-bromouracil, 2-aminopurín) spôsobujúcimi častejšiu tvorbu tautomérických izoforiem, alkylačnými činidlami (yperit, alkylsulfáty) spôsobujúcimi alkyláciu báz a následné chybné párovanie, alebo dusitanmi a reaktívnymi formami kyslíka (peroxidy,



Obr. 25 Zriedkavé tautoméry báz spôsobujúce chybné párovanie

superoxid, ozón) spôsobujúcimi oxidačnú deamináciu adenínu, guanínu a cytozínu. Bodové mutácie spravidla zasahujú jediný nukleotid a môžu eventuálne viesť k zmene jednej aminokyseliny zaradovanej do polypeptidového reťazca. Ich dopad na fenotyp je ťažko odhadnúť. Veľkú časť z nich predstavujú synonymné mutácie (angl. *synonymous mutation*), ktoré nemenia štruktúru produkovaného polypeptidu. Ako bolo uvedené, genetický kód je degenerovaný, jedna aminokyselina je spravidla kódovaná 2–6 tripletmi. Zmena bázy na 3. pozícii spravidla nemení zmysel kodónu, teda znamená zaradenie rovnakej aminokyseliny do polypeptidového reťazca. V niektorých prípadoch mutácia mení zmysel kodónu (angl. *missense mutation*). Nie vždy takáto mutácia mení funkciu polypeptidu (viď príklad). Aminokyseliny možno v princípe klasifikovať podľa zvyšku. Všetky esenciálne aminokyseliny majú rovnaký typ štruktúry:



odlišujú sa len zvyškom (R), ktorý môže byť kyslý (spravidla obsahuje ďalšiu karboxylovú skupinu), zásaditý (ďalšia aminoskupina), elektricky neutrálny, ale polárny a teda hydrofilný (–OH alebo –SH skupina) alebo nepolárny a hydrofóbny (alifatický alebo aromatický homocyklický reťazec) (viď tab. 4 *Genetický kód*). Pokiaľ má zvyšok pôvodnej aminokyseliny rovnaké vlastnosti ako zvyšok aminokyseliny u mutovanej alely, spravidla nedôjde k zmene funkcie polypeptidu. Naopak, ak sa obe aminokyseliny zásadne chemicky odlišujú, môže sa zmeniť terciárna (3D) štruktúra proteínu, jeho afinita k lipidovým membránam, v prípade enzýmu optimum jeho fungovania (teplota, pH) atď. Mutovaný polypeptid môže dokonca nadobudnúť úplne novú funkciu. Bodové mutácie touto cestou prispievajú k tvorbe novej užitočnej genetickej premenlivosti. Pochopiteľne, efekt môže byť aj opačný, teda že mutovaný polypeptid stratí schopnosť plniť akúkoľvek funkciu. Nakoniec, dôjsť môže aj k zamene funkčného tripletu za niektorý z terminačných kodónov (*nonsense mutation*).

Zatiaľ čo bodová mutácia postihuje len jednu aminokyselinu, vsunutie alebo vypadnutie nukleotidov (inzercia alebo delécia) spôsobujú posun čítacieho rámca; takéto mutácie sa označujú ako posunové (angl. *frameshift mutation*). Spravidla nevieme určiť, ktorá z alel je pôvodná a ktorá mutovaná, preto sa ako skratka často používa termín indel (insertion/deletion). V dôsledku posunu čítacieho rámca sa menia všetky aminokyseliny od miesta mutácie po koniec reťazca, a neočakávaný výskyt terminačného kodónu môže reťazec skrátiť (s menšou pravdepodobnosťou možne nastať to, že zrušenie terminačného kodónu naopak reťazec predĺži). V každom prípade je polypeptidový reťazec produkovaný mutovaným génom spravidla nefunkčný. To platí aj v prípade vypadnutia alebo vsunutia jedného alebo niekoľkých celých tripletov; identita aminokyselín sa síce nemení, ale posunutie ich polohy môže zmeniť výslednú 3D štruktúru proteínu.

Génové mutácie vznikajú s vysokou frekvenciou aj pri replikácii, chybovosť DNA polymerázy je rádovo 1 na 10^4 až 10^5 nukleotidov. Pri celkovej veľkosti genómu rádovo miliardy až desiatky miliárd básových párov (tab. 2) to predstavuje rádovo desaťtisíce až stotisíce chybných nukleotidov na každé bunkové delenie. Ďalšie chyby vznikajú pôsobením exogénnych faktorov (viď vyššie). Bunky si preto vytvárajú reparačné mechanizmy na vyhľadávanie a odstraňovanie týchto chýb. Ich fungovanie závisí od typu chyby. Časť chýb je odstránená priamo DNA polymerázou vďaka jej aktivite kontroly správnosti párovania (*proofreading*: identita pridaného nukleotidu v novo syntetizovanom reťazci je kontrolovaná oproti templátovému reťazcu jedným z polypeptidov komplexu DNA polymerázy III, v prípade chybného párovania je nukleotid odstránený a nahradený správnym). Ďalšie mechanizmy fungujú po ukončení replikácie. Pyrimidínové diméry (kovalentné väzby medzi susediacimi cytozínmi alebo tymínmi) vznikajúce v dôsledku UV-B ožiarovania sú odstraňované fotoreaktiváciou: špecifický enzým aktivovaný viditeľným svetlom tieto väzby

Príklad: Hypotetický gén, kódujúci polypeptid, má sekvenciu

```
0           1           2           3           4           5
12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789
3' ...TTTACAGTCCATTTCGACTTAGGGGCTAAGGTACCTGGAGCCACGTTTGGGTTCATCCAG...5'
5' ...AAATGTCAGGTAAGCTGAATCCCCGATTCCATGGACCTCGGGTGCAAACCCAGTAGGTC...3'
```

a) Do akej sekvencie aminokyselín v polypeptide sa tento gén bude exprimovať, ak prepisovaný je očíslovaný reťazec (začínajúci zľava 3'-koncom), sekvencia DNA neobsahuje intróny a prepis začína od pozície 0?

b) Ako sa zmení sekvencia aminokyselín v polypeptide, ak dôjde v pozícii 23 k zámene báze GC za TA (bodová mutácia) a s akými následkami?

c) Ako sa zmení sekvencia aminokyselín v polypeptide, ak dôjde v pozícii 43 k zámene báze AT za CG (bodová mutácia) a s akými následkami?

d) Ako sa zmení sekvencia aminokyselín v polypeptide, ak dôjde v pozícii 18 k zámene báze TA za CG (bodová mutácia) a s akými následkami?

e) Ako sa zmení sekvencia aminokyselín v polypeptide, ak dôjde v pozícii 22 k delecii báze GC (posunová/frameshift mutácia) a s akými následkami?

Riešenie:

a) Pri transkripcii sa do reťazca primárneho transkriptu (v tomto prípade totožného s reťazcom mRNA, keďže v tejto časti sekvencie nie sú prítomné intróny) zaraďujú nukleotidy komplementárne k prepisovanému reťazcu DNA:

```
0           1           2           3           4           5
12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789
DNA:  3' TTTACAGTCCATTTCGACTTAGGGGCTAAGGTACCTGGAGCCACGTTTGGGTTCATCCAG5'
mRNA: 5' AAATGTCAGGTAAGCTGAATCCCCGATTCCATGGACCTCGGGTGCAAACCCAGTAGGTC3'
```

Iničiačný kodón je AUG, pričom iniciácia začína od výskytu tohoto tripletu najbližšieho od konca 5'. V tomto prípade sa triplet AUG nachádza od pozície 3. Od tejto pozície sa teda odvíjajú triplety, na základe ktorých sa zaraďujú aminokyseliny.

```
0           1           2           3           4           5
12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789
mRNA:  5' AAATGTCAGGTAAGCTGAATCCCCGAUUCCCAUUGGACCUCGGGUGCAAACCCAGUAGGUC3'
polypeptid: MetSerGlyLysLeuHisProArgPheHisGlyProArgValGlnThrGlnSTOP
```

keďže na pozícii 54 je triplet UAG, ktorý je terminačným kodónom, na tomto mieste sa syntéza polypeptidu ukončí. Podčiarknuté sú aminokyseliny, ktoré sú postihnuté mutáciami podľa bodov b), c) a d).

b) Ak dôjde k bodovej mutácii v pozícii 23, pri ktorej sa zamení guanozín v prepisovanom reťazci DNA za tymidín, v reťazci mRNA bude v tejto pozícii zaradený nukleotid s bázou komplementárnou k tymínu, teda adenínom. Sekvencia mRNA a zodpovedajúca sekvencia aminokyselín v polypeptide

pokračovanie
bude nasledovná

	0	1	2	↓	3	4	5
	12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789						
mRNA:	5'	AAAUGUCAGGUAAGCUGCAU	CC	ACGAU	UCCAUGGACCUCGGGUGCAAACCCAGUAGGUC3'		
polypeptid:		MetSerGlyLysLeuHis	Pro	ArgPheHisGlyProArgValGlnThrGln	STOP		

Triplet CCA kóduje rovnako ako pôvodný triplet CCC prolín. Jedná sa teda o synonymnú mutáciu, pri ktorej sa sekvencia aminokyselín žiadnym spôsobom nemení, teda takáto mutácie nemôže mať žiadne fenotypové následky.

c) Ak dôjde v pozícii 43 k zámene adenozinu v prepisovanom reťazci DNA za cytidín, v reťazci mRNA bude v tejto pozícii zaradený opäť nukleotid s bázou komplementárnou ku guanínu, teda cytozínom. Sekvencia mRNA a zodpovedajúca sekvencia aminokyselín v polypeptide bude nasledovná

	0	1	2	3	4	↓	5
	12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789						
mRNA:	5'	AAAUGUCAGGUAAGCUGCAUCCCCGAU	UCCAUGGACCUCGGG	CGC	CAAACCCAGUAGGUC3'		
polypeptid:		MetSerGlyLysLeuHisProArgPheHisGlyProArg	Ala	GlnThrGln	STOP		

Triplet GUG, kódujúci valín, sa teda zmení na triplet GCG, kódujúci alanín. Valín aj alanín sú však aminokyseliny s rovnakými vlastnosťami, obe majú alkylový hydrofóbny a nepolárny zvyšok (Ala: $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, Val: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), teda vlastnosti a štruktúra vytváraného polypeptidu sa s najväčšou pravdepodobnosťou nezmenia.

d) Ak dôjde v pozícii 18 k zámene tymidínu v prepisovanom reťazci DNA za cytidín, v reťazci mRNA bude v tejto pozícii zaradený nukleotid s bázou komplementárnou ku cytozínu, teda guanínom. Sekvencia mRNA a zodpovedajúca sekvencia aminokyselín v polypeptide bude nasledovná

	0	1	↓	2	3	4	5
	12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789						
mRNA:	5'	AAAUGUCAGGUAAGCUG	GAU	CCCCGAU	UCCAUGGACCUCGGGUGCAAACCCAGUAGGUC3'		
polypeptid:		MetSerGlyLysLeu	Asp	ProArgPheHisGlyProArgValGlnThrGln	STOP		

Triplet CAU, kódujúci histidín, sa teda zmení na triplet GAU, kódujúci kyselinu asparágovú. Zatiaľ čo histidín je aminokyselina so zvyškom obsahujúcim aminoskupinu, a teda vo vodnom roztoku sa nabíja kladne, kyselina asparágová obsahuje ďalší karboxylový zvyšok, vo vodnom roztoku teda odštiepuje protón a nabíja sa záporne. Aj keď obidve aminokyseliny majú polárny a teda hydrofilný zvyšok, elektrický náboj vytváraného polypeptidu sa zmení o 2 jednotky. Takáto zmena môže viesť k zmene funkcie proteínu, touto mutáciou môže teda vzniknúť nová alela.

e) Ak dôjde v pozícii 22 k delecii báze páru GC, v reťazci mRNA vypadne nukleotid zaradený pôvodne v tejto pozícii a teda od nej dôjde k posunu celého čítacieho rámca. Sekvencia mRNA a zodpovedajúca sekvencia aminokyselín v polypeptide bude nasledovná

	0	1	2	↓	3	4	5
	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678						
mRNA:	5'	AAAUGUCAGGUAAGCUGCAUCCCCGAU	UCCAUGGACCUCGGGUGCAAACCCAGUAGGUC.3'				
polypeptid:		MetSerGlyLysLeuHis	ProAspSerMetAspLeuGlyCysLysProSerArgSer...				

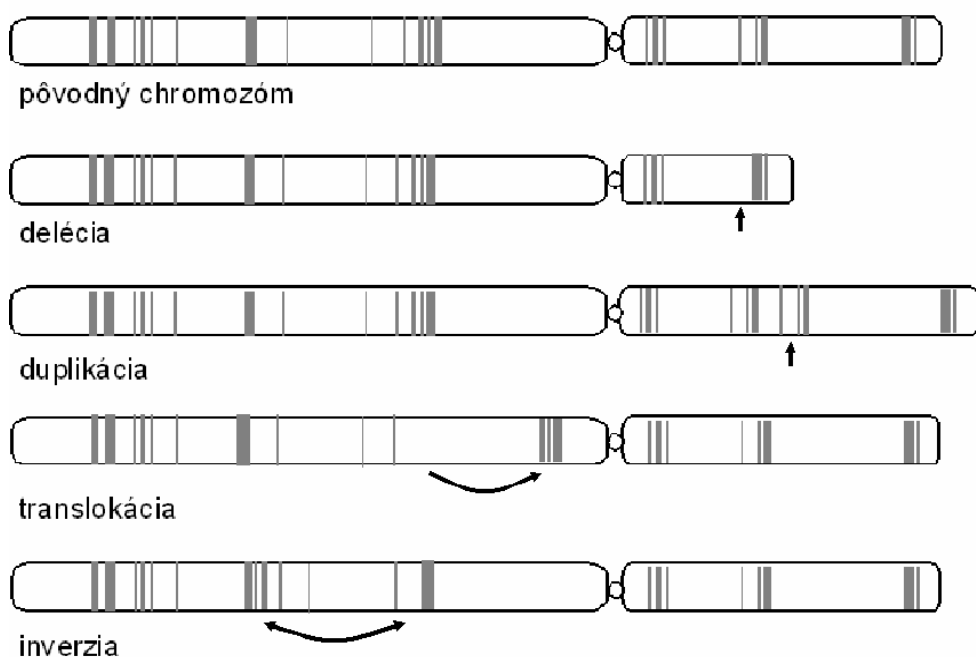
Začínajúc 7. aminokyselinou sa všetky až do konca reťazca môžu zmeniť (v tomto prípade nedošlo k zmene prolínu preto, lebo k mutácii došlo na 3. pozícii tripletu). Navyše, tým, že sa posunul čítací rámec, zanikol terminačný kodón na pozícii 54, teda syntéza polypeptidu pokračuje až kým sa náhodne v mRNA nevyskytne niektorý z terminačných kodónov, vytvorený polypeptid bude teda oveľa dlhší než pôvodný. Je veľmi málo pravdepodobné, že by takýto polypeptid bol schopný plniť nielen pôvodnú funkciu, ale akúkoľvek biologickú funkciu. Alela, vznikajúca takouto mutáciou teda vytvára nefunkčný produkt, a ak ide o gén kódujúci životne dôležitý proces (napríklad rozklad peroxidických väzieb), je takáto alela **letálna**.

Chromozómové mutácie

Chromozómové mutácie postihujú väčší úsek chromozómu, spravidla obsahujúci niekoľko génov. V tomto prípade sa teda nejedná o zmenu kvality, alebo o zmenu kvantity alebo usporiadania génov. Dlhší úsek môže vypadnúť (delécia); v tomto prípade môžu byť niektoré funkcie organizmu narušené stratou génov (najmä ak ide o gény existujúce v jedinej kópii

v genóme; viaceré závažné geneticky podmienené ochorenia u človeka sú spôsobené deléciou častí chromozómov, napr. Williamsov alebo Jacobsenov syndróm). Naopak, časť chromozómu môže byť zduplikovaná, takýto úsek sa potom vyskytuje na jednom a tom istom chromozóme dvakrát. Najjednoduchšie sa duplikujú tandemové opakovania génov, t.j. ak sa úsek už vyskytuje vo viacerých kópiách, ľahko k nim pribudne alebo ubudne ďalšia: v takýchto segmentoch môžu sa homologické chromozómy pri meióze (synapse) chybné párovať a následne môže dôjsť k nereciprokej translokácii, pri ktorej je nespárovaný úsek vystrihnutý z jedného chromozómu a vložený do druhého. Opakovanými duplikáciami vznikajú génové rodiny (*gene families*). Génová dávka, teda počet kópií génu v genóme, môže spoluurčovať biochemickú funkčnosť génu. Génová mutácia môže poškodiť regulačnú oblasť niektorého z génov génovej rodiny – v tomto prípade sa životaschopnosť organizmu nemusí vôbec zmeniť, keďže má k dispozícii rezervné kópie génu. Takéto sekvencie a chromozómy, ktoré ich nesú, nie sú teda vylučované prírodným výberom; štrukturálna časť génu teda zostáva súčasťou genómu, aj keď nefunguje. Takéto úseky sa označujú ako pseudogény. Duplikované gény tiež predstavujú surovinu pre evolúciu. Ak má organizmus k dispozícii viac kópií niektorého génu sa bodová mutácia spôsobí v jednom z nich zmenu funkcie alebo nadobudnutie úplne novej funkcie (a teda stratu tej pôvodnej), organizmus zostáva životaschopný a nový gén môže prispieť k zmene jeho fenotypu.

Zmena pozície génu alebo úseku na chromozóme sa označuje ako translokácia. Jedným z jej typov je reciproká translokácia, pri ktorej si dva chromozómy vymenia medzi sebou svoje časti. Tento typ mutácií je možné rozoznať počas zygoténu meiózy vďaka vytvoreniu synapsy v tvare kríža, pozostávajúcej zo štyroch chromozómov (namiesto dvoch), ktoré sú spárované vo svojich homologických úsekoch. Pri transpozícii je úsek DNA vystrihnutý zo svojej pozície a vložený na inú na rovnakom chromozóme. Translokácie sú najčastejšie dôsledkom aktivity transponibilných elementov (transpozónov), „molekulárnych parazitov“, ktoré sa v genóme často množia v obrovskom rozsahu (viď tab. 3). Samy o sebe nemusia ohrozovať životaschopnosť organizmu, ale predstavujú evolučný balast a zväčšujú genóm, takže zväčšujú nároky na zdroje a energiu pri každom bunčnom delení.



Obr. 26 Typy chromozómových mutácií

Ďalším typom chromozómovej mutácie je inverzia, pri ktorej je segment chromozómu vystrihnutý a vložený na rovnaké miesto s opačnou orientáciou. Rozsiahlu inverziu obsahuje chloroplastový genóm: okrem dvoch úsekov obsahujúcich neopakované gény (LSC a SSC segment) obsahuje dva oproti sebe postavené dlhé invertované úseky, ktoré predstavujú svoj vzájomný zrkadlový obraz.

Preusporiadanie genómu v dôsledku inverzie alebo translokácie nemusí nutne znížovať životaschopnosť organizmu ani pri veľkom rozsahu, ale môže viesť k reprodukčnej izolácii mutanta od zvyšku populácie, pretože mení pozíciu homologických úsekov a tým sťažuje párovanie chromozómov pri meióze. Rekombinácia pôvodných a mutovaných chromozómov (ak je vôbec možná) môže navyše vyvolávať rozsiahle delécie dlhých úsekov a stratu génov; takéto rekombinované chromozómy sú spravidla nefunkčné a spôsobujú stratu životaschopnosti.

Dvojreťazcové zlomy (teda prerušenie oboch reťazcov DNA na rovnakom mieste; prerušené úseky nie sú ničím spojené) vedú ku chromozómovým zlomom (teda rozpadu chromozómu na dve samostatné časti). Spravidla vedú k závažným poruchám funkcie organizmu, pretože len jeden z úsekov má centroméru a teda normálne funguje pri bunечnom delení. Homologické chromozómy alebo sesterské chromatidy sa môžu aj spojiť (fúzia chromozómov). Takéto chromozómy dokážu normálne fungovať len ak si zachovávajú len jednu centroméru; dicentrické chromozómy nie sú schopné normálnej migrácie počas mitózy. Špecifickým typom fúzie chromozómov je Robertsonovská translokácia, pri ktorej sa spájajú dva akrocentrické chromozómy za vzniku jedného metacentrického chromozómu.

Genómové mutácie

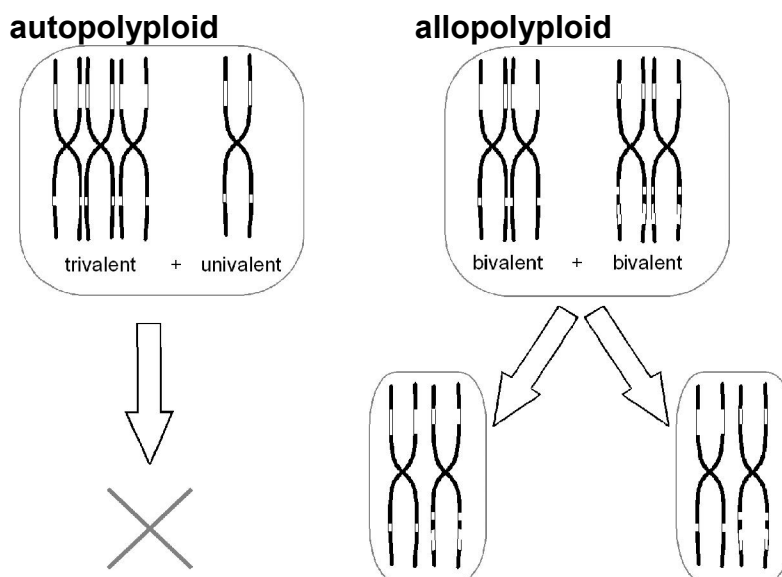
Genómové mutácie postihujú celé chromozómy resp. celé chromozómové sady, menia ich počet a tým zásadne menia veľkosť genómu. Vznikajú v dôsledku nepravidielnosti bunkového delenia, ak sa chromozómy nerozídu správne do dcérskych jadier. Rozlišuje sa aneuploidia, ak sa konkrétny chromozóm nachádza v bunke v jednej alebo troch kópiách namiesto v dvoch, a euploidia (polyploidia), pri ktorej je znásobená celá chromozómová sada. Poruchy bunkového delenia môžu byť napríklad vyvolané kolchicínom alebo nízkymi teplotami, ktoré blokujú tvorbu deliaceho vretienka. Preto sa polyploidia u rastlín častejšie vyskytuje vo vysokých zemepisných šírkach či nadmorských výškach, kde teploty často klesajú k nízkym hodnotám počas obdobia kvitnutia. Na rozdiel od živočíchov, kde sa línia zárodočných buniek (germinálna línia) oddeľuje od somatických buniek veľmi skoro počas ontogenézy (ešte v embryonálnom štádiu), u rastlín tieto bunkové línie oddelené nie sú. Klon polyploidných buniek teda môže vytvárať reprodukčné orgány, ktoré produkujú gaméty s vyšším než haploidným počtom chromozómov.

Pri aneuploidii jedná kópia chromozómu buď chýba (monozómia) alebo je navyše (trizómia). U živočíchov je aneuploidia spravidla letálna alebo vedie k závažným vývojovým poruchám; mnohé geneticky podmienené choroby u človeka súvisia so zmenou počtu chromozómov (trizómia má fatálne následky už v embryonálnom štádiu v prípade 16 z 22 autozómov u človeka, pri 4 má plod výnimočne šancu dožiť sa pôrodu, a len pri chromozómoch 9 a 21 je jedinec životaschopný, aj keď postihnutý – trizómia chromozómu 21 spôsobuje Downov syndróm; monozómia je vždy letálna). Rastliny tolerujú aneuploidiu podstatne lepšie, nie vždy má zmena počtu chromozómov aj dopad na fenotyp.

Polyploidia je u živočíchov výnimočná, u rastlín naopak pomerne bežná, mnohé rastlinné rody obsahujú sériu druhov s rozdielnymi stupňami ploidie. Takisto vysoký počet chromozómov niektorých rodov (*Tilia*, $n=81$) naznačuje ich polyploidný pôvod. Chromozómové sady polyploidov nemusia byť identické pôvodom. Pri autopolyploidii bunky obsahujú nadbytočné sady plne homologických chromozómov, spravidla v dôsledku absencie delenia jadra alebo cytokinézy. Autopolyploidy sú spravidla sterilné v dôsledku nepravidielného párovania

chromozómov počas meiózy: namiesto bivalentov sa vytvárajú trivalenty a univalenty (teda trojica homologických chromozómov a jeden zostávajúci navyše) a chromozómy nese segregujú pravidelne do gamét. Pokiaľ sa rozmnožujú nepohlavnou cestou (apomikticky), môže akumulácia mutácií (najmä reorganizácia chromozómov translokáciami a inverziami) znížiť stupeň homológie a tým eliminovať problémy s párovaním chromozómov. V tomto prípade sa môže obnoviť schopnosť pohlavného rozmnožovania.

Allopolyploidia (alloploidia) je spojená s hybridizáciou. Homoploidné hybridy (vznikajúce spojením páru gamét, pochádzajúcich od rodičov patriacich k rozdielnym druhom, do diploidnej zygoty) sú často sterilné, ak chromozómy všetkých párov nie sú dostatočne homologické (častý prípad, ak sú rodičovské druhy fylogeneticky vzdialené). Diploidizácia prostredníctvom mitózy, za ktorou nenasleduje cytokinéza, vedie v tomto prípade k prítomnosti dvoch sád perfektne homologických chromozómov (keďže každá dvojica je tvorená replikovanými molekulami DNA, teda sú absolútne zhodné), čo umožňuje pravidelnú ich segregáciu do gamét. Druhou, menej častou možnosťou je, že rodičovské druhy produkujú neredukované diploidné gaméty, ktoré sa spájajú do tetraploidnej zygoty. Keďže chromozómy pochádzajúce od rôznych rodičov nie sú plne homologické a majú rozdielnu štruktúru, z funkčného hľadiska sa takéto jedince správajú ako diploidy (sú označované ako amfidiploidy) a sú spravidla plne fertílne. Tento proces sa môže opakovať aj viackrát a môže sa na ňom zúčastňovať viac rodičovských druhov ako dva. Trojité hybridy boli identifikované napr. v rode *Sorbus* a iných rodoch čeľade ružovitých. Najlepším príkladom je však pšenica (*Triticum aestivum*): súčasné najbežnejšie používané kultivary sú hexaploidné a obsahujú tri rozličné genómy, vznikli najprv spontánnou hybridizáciou *Triticum urartu* × *Aegilops speltoides* (= *Triticum durum*) a tento tetraploid sa následne spontánne krížil s *Aegilops tauschii*.



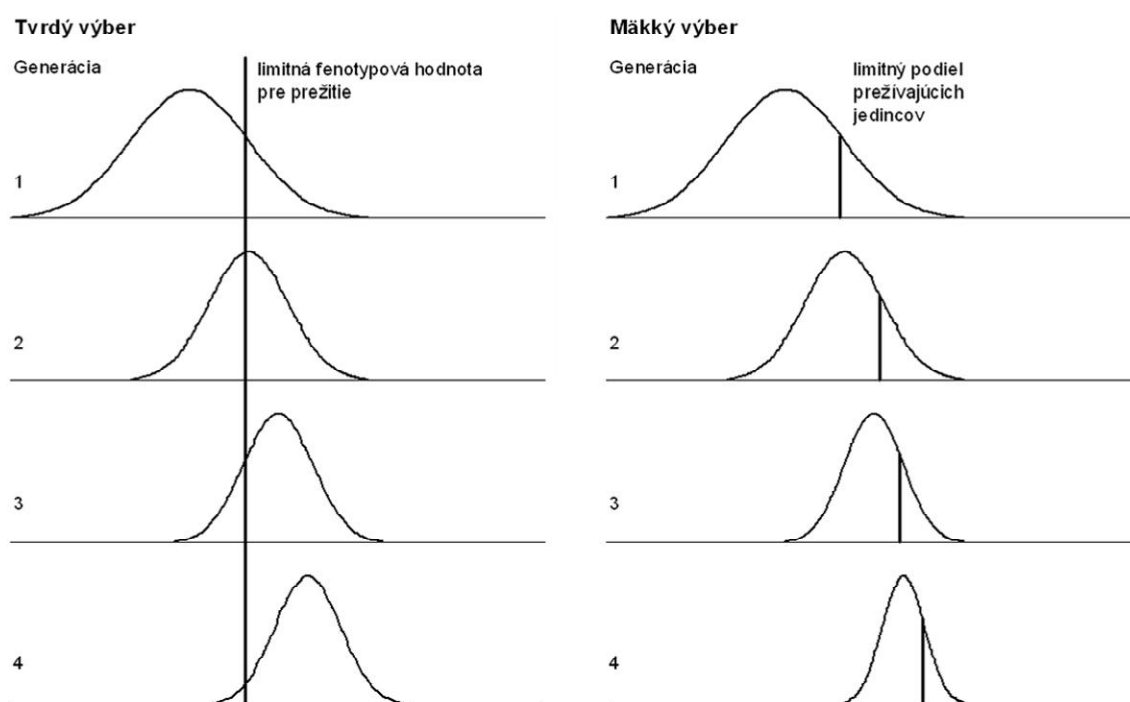
Obr. 27 Schéma párovania chromozómov autopolyploida a allopolyploida pri meióze a tvorby gamét. Svetlou farbou sú označené úseky na chromozóme, ktoré u rôznych rodičovských druhov nie sú homologické. Allopoloid sa správa ako funkčný diploid.

Selekcia

Definícia selekcie, fitness

Alely polymorfného génu prítomné v populácii nemusia byť pri reprodukcií odovzdávané generácii potomstva v rovnakej miere. Nositelia rôznych genotypov sa môžu odlišovať šancou dožiť sa veku dospelosti (definovaného ako vek, keď nadobudnú schopnosť rozmnožovania), alebo, ak sa im podarí tento vek dosiahnuť, svojou reprodukčnou schopnosťou. Tá

nemusi byť definovaná len schopnosťou produkovať gaméty ako takou, ale aj schopnosťou gamét spájať sa do zygót, načasovaním ich tvorby s porovnaním s zvyškom populácie atď. Oba tieto faktory, teda životaschopnosť a plodnosť genotypu, určujú jeho schopnosť odovzdávať gény generácii potomstva, ktorá sa označuje ako biologická zdatnosť (ang. *fitness*). Rozdiely v biologickej zdatnosti sú základom prírodného výberu (selekcie). Na rozdiel od všeobecného laického chápania výberu, ktorý definuje výber ako rozdielne prežívanie jedincov, prírodný výber sa vzťahuje na gén, a spočíva v rozdielnej miere resp. rozdielnej pravdepodobnosti, s akou je konkrétny variant génu (alela) odovzdávaný pri reprodukcii do následnej generácie. Predmetom selekcie môže byť v princípe akýkoľvek znak, ktorý súvisí s biologickou zdatnosťou. Jej dôsledkom je, že priemerná hodnota takéhoto znaku sa z generácie na generáciu posúva smerom k priaznivejším hodnotám. Tento proces sa označuje ako adaptácia.



Obr. 28 Schéma pôsobenia tvrdého a mäkkého výberu

Z hľadiska mechanizmu výberu, jeho biologického a ekologického základu, je potrebné rozlišovať dva typy výberu. Pri tvrdéj selekcii (*hard selection*) je pre prežitie jedinca resp. jeho uplatnenie v reprodukcii nutné dosiahnuť určitú kritickú hodnotu znaku súvisiaceho s biologickou zdatnosťou. Ak jedinec túto hodnotu nedosiahne alebo prekročí (v závislosti na tom, či ide o minimum alebo maximum daného znaku), znemožní mu to dožitie sa dospelosti alebo reprodukciu. Mäkký výber (*soft selection*) nezohľadňuje konkrétnu hodnotu znaku, ale eliminuje z populácie konkrétny konštantný podiel jedincov s najhoršími hodnotami znaku. V tomto prípade o prežití či reprodukcii nerozhoduje absolútna hodnota znaku, ale hodnota relatívna voči populačnému priemeru. Mäkký výber (napriek svojmu označeniu) je vo všeobecnosti efektívnejším selekčným mechanizmom, pretože neumožňuje populácii vyhnúť sa selekcii. Pokiaľ sa v dôsledku tvrdého výberu hodnota znaku v populácii posunie nad kritickú hranicu, výber v populácii prestáva pôsobiť, pretože všetky jedince v nej spĺňajú selekčné kritérium (obr. 28; tvrdý výber v princípe prestáva po 4. generácii pôsobiť). Mäkký výber však nepozná žiadny limit ani žiadnu cieľovú hodnotu, z populácie trvale vylučuje „najhoršie“ genotypy a teoreticky pôsobí až do úplného vyčerpania genetickej premenlivosti. Obr. 28 treba samozrejme chápať ako schematický; proces výberu je deterministický len do

určitej miery, limit ako pri tvrdom, tak aj pri mäkkom výbere nie je v skutočnosti pevná hranica rozhodujúca o prežití či neprežití, priblíženie sa k tomuto limitu len zásadne mení pravdepodobnosť prežitia.

Biologická zdatnosť však môže závisieť od zastúpenia alely resp. genotypu v populácii (*frequency-dependent selection*). Škodcovia alebo patogénne organizmy, ktoré sa adaptujú na genotyp hostiteľskej rastliny (genotypy sa môžu odlišovať chemickým zložením, obrannými mechanizmami a množstvom ďalších vlastností, ktorým sa patogény musia prispôbovať), môžu preferovať najčastejší genotyp v populácii, pretože poskytuje najprístupnejší zdroj; ak sa populácia škodcu adaptuje na tento zdroj, najčastejší genotyp začne byť jej pôsobením potláčaný, teda jeho frekvencia bude postupne klesať a v populácii prevládne iný genotyp, ktorý si časom pritiahne pozornosť škodcu. Frekvencie genotypov teda oscilujú okolo rovnovážnej hodnoty; tento mechanizmus sa označuje ako negatívna spätná väzba. V inom prípade môžu napríklad opel'ovače preferovať najčastejšiu farbu alebo vôňu kvetov a teda zvyšovať frekvenciu genotypov, ktoré ich určujú. V tomto prípade frekvencia najčastejšieho genotypu ďalej narastá, ide o mechanizmus pozitívnej spätnej väzby.

Mechanizmy selekcie v panmiktickej populácii

Dopady selekcie na alelickú a genotypovú štruktúru populácie boli tradične sú najlepšie preštudované v vo veľkých panmiktických populáciách s oddelenými generáciami, vystavených tvrdej selekcii.

Priemerná biologická zdatnosť populácie sa dá odvodiť od frekvencií a fitness genotypov, ktoré sú v nej zastúpené: ak je v populácii alela A_i zastúpená podielom $p(A_i)$ a fitness genotypu A_iA_i je $W(A_iA_i)$, priemerná biologická zdatnosť populácie sa dá odvodiť ako

$$\bar{W} = \sum_i p(A_i)^2 W(A_iA_i) + 2 \sum_i \sum_{j < i} p(A_i) p(A_j) \cdot W(A_iA_j)$$

Z čoho vyplýva, že očakávaná frekvencia génu A_i v potomstve po náhodnom párovaní v rodičovskej generácii bude

$$p'(A_i) = \left(p(A_i)^2 W(A_iA_i) + 0.5 \cdot 2 \sum_{j \neq i} p(A_i) p(A_j) \cdot W(A_iA_j) \right) / \bar{W}$$

$$= p(A_i) \left(p(A_i) W(A_iA_i) + \sum_{j \neq i} p(A_j) \cdot W(A_iA_j) \right) / \bar{W}$$

Pre zjednodušenie výpočtov sa biologická zdatnosť nahrádza selekčným koeficientom, ktorý vyjadruje silu selekčného tlaku voči jednotlivým genotypom v porovnaní s genotypom s najvyššou biologickou zdatnosťou (ktorý teda selekcii vystavený nie je):

$$s(A_iA_i) = 1 - W(A_iA_i) / W_{max}.$$

Selekčný koeficient genotypu sa teda pohybuje v intervale /0, 1/ a vyjadruje podiel jedincov genotypu, ktorý za jednu generáciu z populácie vypadne (teda nedožije sa dospelosti alebo sa nezúčastní reprodukcie). Pre najzdatnejší genotyp nadobúda hodnotu 0, pre úplne neplodný alebo neživotaschopný genotyp nadobúda hodnotu 1.

Výsledok selekcie možno merať zmenou zastúpenia génu za 1 generáciu. Smer a rýchlosť vývoja frekvencie alely vystavenej selekcii pochopiteľne závisí od fenotypového účinku génu (úplná, neúplná dominancia, superdominancia, aditivita) a od alelickej štruktúry rodičovskej generácie. V princípe možno odvodiť zmeny frekvencie selektovaného génu aj pre multialelický lokus, ale jednoduchším riešením je sledovať selektovanú alelu v porovnaní s celým komplementom (t.j. všetky zostávajúce varianty brať ako jednu alelu s jednou priemernou biologickou zdatnosťou). Rýchlosť zmien je vo všetkých modeloch funkciou východiskovej frekvencie génu vystaveného selekčnému tlaku q a selekčným koeficientom jednotlivých genotypov s .

Škodlivé gény (vrátane letálnych génov, teda génov spôsobujúcich smrť svojho nositeľa) všeobecne majú tendenciu správať sa ako recesívne. Diploidná bunka obsahuje dve kópie každého autozomálneho génu. Ak je jedna z týchto kópií poškodená (neexprimuje sa, alebo

vytvára nefunkčný proteín), bunka má stále k dispozícii „rezervnú“ kópiu, ktorá sa exprimuje do žiadaného produktu. Nositeľ jednej defektnej kópie sa teda fenotypovo (ani zdatnosťou) nemusí nijako líšiť od jedinca s obidvomi funkčnými alelami. Postihnutý je len jedinec, ktorý má obe alely defektné. V takomto gène sa teda uplatňuje úplná dominancia: prežívajúceho (teda dominantného) homozygota nemožno fenotypovo odlíšiť od heterozygota (ich selekčné koeficienty sú teda nulové: $s_{AA} = s_{Aa} = 0$), len postihnutý (recesívny) homozygot je fenotypovo odlišný (znížená alebo nulová životaschopnosť alebo plodnosť; $s_{aa} = s > 0$). Zmena frekvencie recesívneho škodlivého génu sa jednu generáciu je

$$\Delta q = -s(1-q)q^2/(1-sq^2).$$

V prípade letálneho génu sú recesívne homozygoty v každej generácii úplne eliminované; pre $s_{aa} = 1$ sa tento vzťah zjednoduší na $\Delta q = -q^2/(1+q)$.

Ako vyplýva z týchto vzťahov, silná selekcia pri vysokej východiskovej frekvencii nevýhodného génu vyvolávajú jeho rýchly úbytok z populácie. Recesívne gény podmieňujú celý rad dedičných chorôb (u človeka cystická fibróza, spinálna svalová atrofia, G6PDH deficiencia atď.), často podmieňujú odumretie organizmu už v embryonálnom štádiu (u človeka sú považované za hlavnú príčinu spontánnych potratov v prvom trimestri, u rastlín za hlavnú príčinu výskytu prázdnych semien).

Aj keď menej často, nevýhodné gény môžu byť aj dominantné. Pokiaľ mutácia spôsobí, že produkt novej alely naruší fungovanie organizmu, tak k tomuto narušeniu dôjde aj v prípade, ak je v genotype prítomná len jedna kópia novej alely – heterozygot aj homozygot v novej alele trpia postihnutím v rovnakej miere, a naopak recesívny homozygot má vyššiu fitness ($s_{AA} = s_{Aa} = s > 0$, $s_{aa} = 0$). Ak je dominantný gén letálny, je z populácie eliminovaný hneď v nasledujúcej generácii, pretože žiadny z jeho nositeľov (heterozygot ani homozygot) sa dospelosti nedožije. Ak letálny nie je, jeho zastúpenie klesá resp. frekvencia výhodnej recesívnej alely stúpa rýchlosťou $\Delta q = s(1-q)q^2/(1+s+sq^2)$ za generáciu. Opäť existuje rad príkladov dedičných chorôb človeka s týmto pozadím (neurofibromatóza, Huntingtonova chorea atď.).

V prípade aditivity sa fenotypové účinky alel sčítavajú, z čoho vyplýva, že heterozygotný nositeľ jednej nevýhodnej alely je z populácie vylučovaný s polovičnou pravdepodobnosťou oproti homozygotnému nositeľovi dvoch nevýhodných alel: $s_{AA} = 0$, $s_{Aa} = s/2$, $s_{aa} = s$. Frekvencia nevýhodného génu v tomto prípade klesá rýchlosťou $\Delta q = -sq(1-q)/[2(1-sq)]$ za generáciu.

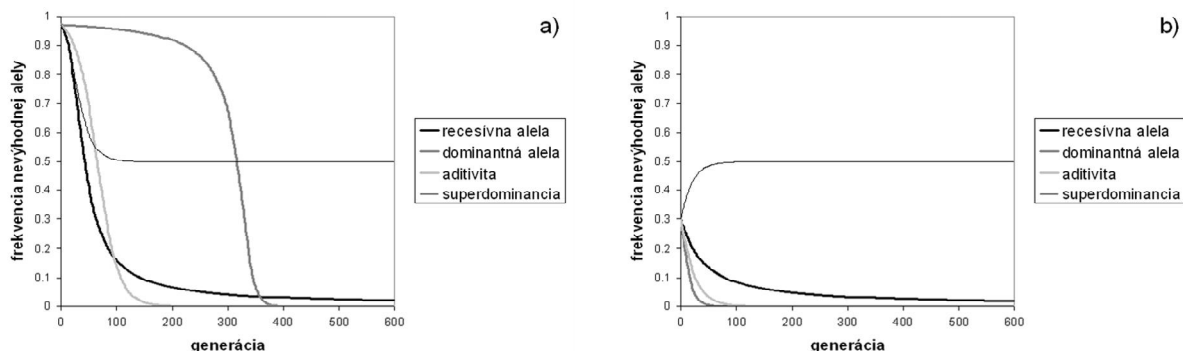
Poslednou možnosťou je superdominancia, pri ktorej zdatnosť heterozygota prevyšuje fitness oboch homozygotov: $s_{Aa} = 0$, $s_{AA} = s_1$, $s_{aa} = s_2$. Vývoj alelickej frekvencie závisí od vzájomného pomeru selekčných tlakov oproti obom homozygotom:

$$\Delta q = q(1-q)[s_1(1-q) - s_2q]/[1 - s_1(1-q)^2 - s_2q^2]$$

Pri všetkých ostatných mechanizmoch selekcia vedie v konečnom dôsledku k eliminácii jednej alely a fixácii druhej. Selekcia v prospech heterozygotov je výnimkou, vedie k ustanoveniu rovnovážnej frekvencie $q_{eq} = s_1/(s_1 + s_2)$. Dobrým príkladom tohoto typu selekcie je výskyt recesívne letálnej kosáčikovitej anémie. Ide o dedičnú chorobu človeka, spôsobenú bodovou mutáciou v β -globínovom reťazci hemoglobínu. Homozygoti trpia ťažkou anémiou s vysokou mortalitou. Heterozygoti sú rezistentní voči malárii a klinické prejavy anémie sú u nich veľmi mierne; v porovnaní so zdravými jedincami sú nimi mierne znevýhodnení, ale rezistencia voči potenciálne fatálnej parazitárnej chorobe (ktorou malária nepochybne je) im v oblastiach z vysokým výskytom malárie poskytuje nespochybniteľnú výhodu, majú teda najvyššiu výslednú biologickú zdatnosť v porovnaní s homozygotnými genotypmi.

Heterozygoty môžu byť samozrejme aj znevýhodnené oproti obom homozygotom. Matematický model v tomto prípade predpokladá ustanovenie rovnakej rovnovážnej frekvencie, ako pri zvýhodnení heterozygotov. Táto rovnováha je však extrémne labilná, akékoľvek

náhodné vychýlenie v prospech jedného z homozygotov spôsobí, že druhý je z populácie rýchlo eliminovaný.



Obr. 29 Zmena frekvencie znevýhodnenej alely v závislosti na východiskovej frekvencii a mode dedičnosti. a) $q=0,97$, b) $q=0,3$.

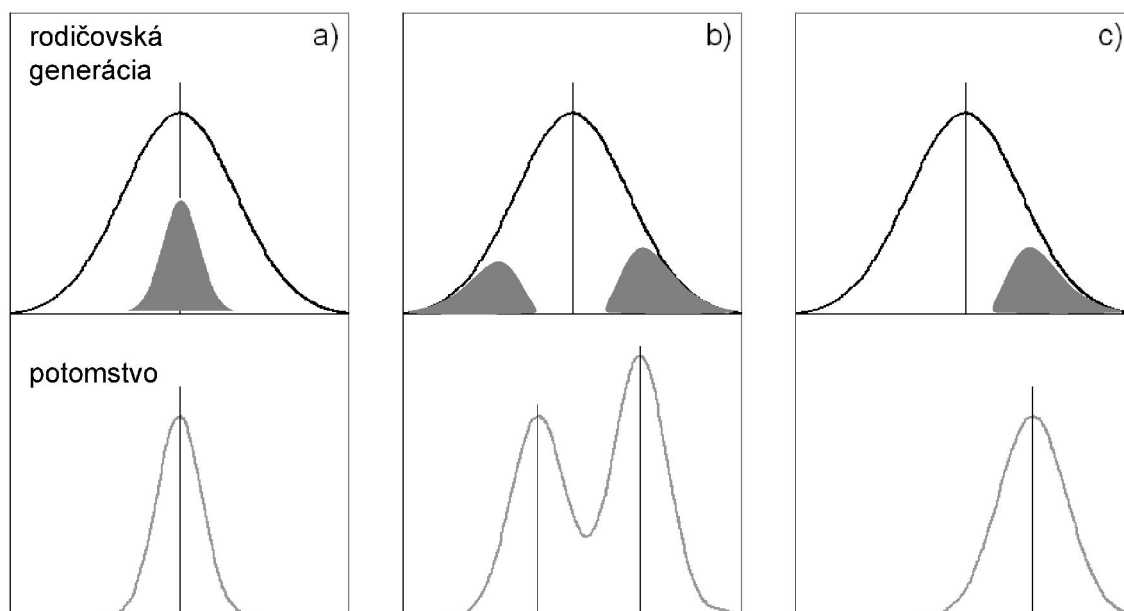
Ako je viditeľné z obr. 29, osud alely vystavenej selekcii závisí od jej východiskovej frekvencie. Teoreticky je nevýhodný gén z populácie vytlačený v každom prípade (s výnimkou superdominancie). Ak je východiskové zastúpenie nízke, najrýchlejšie z populácie vymizne dominantná alela, pri vysokej východiskovej frekvencii je alela najrýchlejšie vytlačená pri čistej aditivite. V prípade, že nevýhodný gén je recesívny, úbytok je najprv rapídny, ale neskôr sa výrazne spomalí a nevýhodná alela sa v dostatočne veľkej populácii môže udržať po množstvo generácií. Toto platí dokonca aj pre recesívne letálne gény, vďaka čomu sa gény vedúce k tomuto typu dedičných porúch v ľudskej populácii udržiavajú prakticky permanentne.

Stabilizačný, disruptívny, usmernený výber

Predmetom výberu je vždy fenotyp jedinca, nie jeho gény. Aj v prípade letálnych génov jedinca nezabíja dedičná informácia v jeho genóme, ale klinické prejavy choroby, ktorú gén spôsobuje. Je dôležité uvedomiť si, že selekcia proti génom je vždy sprostredkovaná fenotypom, pretože biologická zdatnosť je komplexný fenomén (fitness ako takú nemožno považovať za znak, ale je založená na množstve morfologických či fyziologických znakov, z ktorých každý môže mať vlastný dedičný základ), z čoho vyplýva, že je z princípu polygénna. Selekcia vďaka svojmu dopadu na rozdelenie akéhokoľvek znaku podieľajúceho sa na biologickej zdatnosti môže teda mať dopad na viacero génov súčasne.

V populácii môže prírodný výber preferovať či naopak potláčať nositeľov rôznych fenotypov v závislosti na biologickom mechanizme, ktorým pôsobí. V princípe možno z tohoto hľadiska rozlišovať tri typy selekcie. Pri stabilizačnom výbere (obr. 30) majú vyššiu šancu na prežitie a reprodukciu jedince s hodnotami znaku blízko priemeru populácie. Alely podmieňujúce extrémne hodnoty znaku (vysoké alebo nízke) sú z populácie odstraňované, v dôsledku čoho premenlivosť z generácie na generáciu klesá, aj keď populačný priemer zostáva rovnaký. Príkladom môže byť selekcia na pôrodnú hmotnosť u cicavcov: primálne mláďatá v prírode neprežijú, pôrod priveľkých mláďat neprežije ich matka. Naopak, pri disruptívnom (divergentnom) výbere sú potláčané priemerné jedince a vyššiu šancu na prežitie a rozmnoženie majú oba extrémny, čím sú preferované aj gény, ktoré extrémne prejavy podmieňujú. Šírka premenlivosti v takejto populácii z generácie na generáciu narastá, môže sa dokonca vytvoriť dvojvrcholové rozdelenie znaku. Najčastejšou príčinou je heterogénne prostredie, v ktorom sú rôzne segmenty populácie vystavené rôznym (niekedy až opačným) selekčným tlakom. Pokiaľ tok génov nedokáže efektívne pôsobiť proti disruptívnej selekcii, môže rôzne segmenty populácie ďalej divergovať a vyvinúť sa na samostatné taxóny.

Posledným typom je usmernený výber, pri ktorom je vysoká biologická zdatnosť podmienená jedným z extrémov, teda vysokou (lebo naopak nízkou) hodnotou znaku. Pri tomto type selekcie sa priemerná hodnota znaku v populácii postupne posúva smerom k preferovaným hodnotám, premenlivosť postupne klesá.



Obr. 30 Zmena rozdelenia fenotypového znaku, podliehajúceho selekcii, pri stabilizačnom (a), disruptívnom (b) a usmernenom (c) výbere. Šedou farbou sú znázornené prežívajúce a množiace sa jedince.

Genetický drift

Náhodné procesy v populácii

Osudom väčšiny nových alel v populácii je vymiznutie, nezávisle na ich adaptívnej hodnote. Príčinou sú zákony pravdepodobnosti. Ak heterozygot, ktorý je nositeľom novej mutácie, produkuje k úspešných (realizovaných) gamét (teda gamét, ktoré sa uplatnili v genotypoch potomstva), pravdepodobnosť, že v potomstve sa nová mutácia neobjaví (teda že potomstvu odovzdá vždy druhú alelu) vyplýva z binomického rozdelenia a je $(1/2)^k$. V nekonečnej populácii sa pravdepodobnosť, že počet nositeľov novej alely klesne na nulu, riadi Poissonovým rozdelením a bude

$P_k = \left(\frac{2^k}{k!}\right) e^{-2} \left(\frac{1}{2}\right)^k$ pre počet potomkov k . Celková pravdepodobnosť, že nová mutácia v priebehu jednej generácie vypadne je daná sumou pravdepodobností

pre všetky možné počty potomkov od 0 po nekonečno: $P = \sum_0^{\infty} P_k = \sum_0^{\infty} \left(\frac{2^k}{k!}\right) e^{-2} \left(\frac{1}{2}\right)^k$. Bolo

by možné dokázať, že tento výraz po úprave dáva $P = e^{-1} = 0.368$. Kumulatívna pravdepodobnosť straty alely v generácii t je $P_t = e^{P_{t-1}-1}$, čo sa pre vysoký počet generácií blíži k hodnote 1 (po 18 generáciách táto pravdepodobnosť presiahne 90%). Je potrebné pripomenúť, že ak alela raz z populácie vypadne, môže sa v nej nanovo objaviť len vďaka novej náhodnej mutácii, čo je málo pravdepodobný jav. Táto úvaha nutne vedie k záveru, že po dostatočnom počte generácií z populácie vypadne akákoľvek novovytvorená alela. Pochopiteľne, uvedené hodnoty sa vzťahujú len na neutrálne alely, ktoré nepodliehajú prírodnému výberu; selekcia preferujúca alebo naopak odstraňujúca novú alelu tento proces brzdí alebo

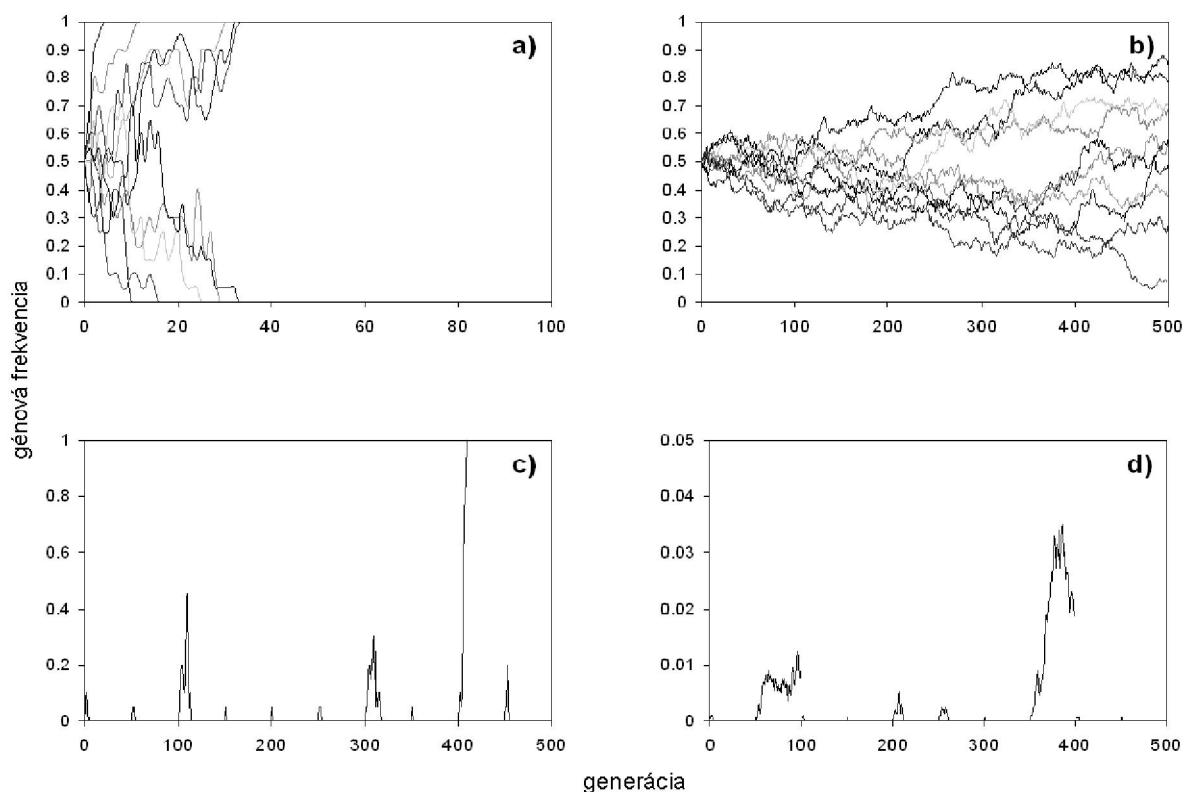
naopak urýchľuje.

Realita nie je až natoľko tristná, a to aj s ohľadom na skutočnosť, že reálne populácie nie sú nekonečné. Stochastický element v určení zmien génových frekvencií je tým výraznejší, čím je populácia menšia.

V diploidnej populácii konečnou veľkosťou N (obsahujúcej $2N$ kópií každého génu) je binomická pravdepodobnosť, že alela obsiahnutá v podiele p sa v potomstve objaví v n kópiách je

$$P(n) = \binom{2N}{n} p^n (1-p)^{2N-n}$$

Extrémny príklad pre ilustráciu, čo z tohoto vzťahu vyplýva: v populácii pozostávajúcej z 2 jedincov ($2N=4$), má alela zastúpená 2 kópiami ($p=0.5$; jeden z rodičov je homozygot v tejto alele alebo obaja sú heterozygoti) pravdepodobnosť 6.25%, že v potomstve nebude zastúpená, pravdepodobnosť 25%, že sa v potomstve objaví v 1 alebo 3 kópiách, pravdepodobnosť 37.5%, že sa jej zastúpenie nezmení, a pravdepodobnosť 6.25, že bude v populácii fixovaná (t.j., že sa jej zastúpenie zvýši na 100%). Znamená to, že pravdepodobnosť zachovania pôvodnej alelickej štruktúry (0.375) je menšia, než pravdepodobnosť zmeny (celkovo 0.625). Tento proces náhodných fluktuácií v zastúpení génov, ktorý v konečnom dôsledku nutne vedie k vymiznutiu alebo fixácii alely, sa označuje ako genetický drift. Variancia zmien alelických frekvencií závisí od východiskového zastúpenia génu a veľkosti populácie: $\sigma_{\Delta p}^2 = p(1-p)/N$; k najväčším zmenám dochádza v malých populáciách so zastúpením génu okolo 0,5.



Obr. 31 Simulácia zmien zastúpenia alely v populácii v dôsledku genetického driftu. Etablovaná alela s intermediárnou frekvenciou $q_0 = 0,5$: a) veľkosť populácie $N_e = 10$, b) veľkosť populácie $N_e = 1000$. Novovznikajúca mutácia (raz za 50 generácií): c) veľkosť populácie $N_e = 10$, d) veľkosť populácie $N_e = 1000$.

Dopady driftu na alelickú štruktúru ilustruje obr. 31. V malých populáciách sú aj alely s frekvenciou blízkou 50% dotlačené k fixácii alebo vymiznutiu behom pár generácií. Nové mutácie spravidla vymiznú rýchlo z genofondu populácie. Samozrejme, občas sa môže stať, že zastúpenie novej alely náhodne stúpne a alela sa stane normálnou súčasťou genofondu, dokonca môže byť fixovaná. Vo veľkej populácii sa alely s intermediárnymi frekvenciami spravidla v populácii udržia, ale časom ich zastúpenie kolíše a v rozdielnych subpopuláciách sa môže vyvinúť rozdielnymi smermi. Naopak, nové mutácie vo veľkej populácii majú minimálnu šancu na udržanie. Pravdepodobnosť vymiznutia novej mutácie po 1 generácii (odvodená z binomického rozdelenia) v populácii s 1000 jedincami je až 36,8%. Aj ak ide o výhodnú dominantnú alelu, selekcia spravidla nestačí na zvýšenie jej frekvencie. Väčšina mutácií je teda genofondu vytlačených behom niekoľko generácií, nezávisle na tom, či sú výhodné, neutrálne alebo škodlivé.

Efekt zahrdlenia, efekt zakladateľa

Náhodné posuny alelickej štruktúry sú v princípe spojené s dvomi mechanizmami. Prvý sa označuje ako zahrdlenie (angl. *bottleneck*): početnosť pôvodne veľkej populácie poklesne v dôsledku prírodnej katastrofy alebo činnosti človeka. Druhou možnosťou je vznik novej subpopulácie z malej skupiny kolonistov (v extrémnom prípade z jediného obojpohlavného a autokompatibilného jedinca) počas expanzie areálu druhu. Keďže kolonisti obsahujú len malú náhodnú vzorku genofondu pôvodnej populácie, alelické frekvencie novej subpopulácie sa môže od zdroja zásadne odlišovať; tento mechanizmus sa označuje ako efekt zakladateľa (angl. *founder effect*). Oba procesy ovplyvňujú rozdelenie alelických frekvencií v populácii: tzv. minorpolymorfizmy (zriedkavé alely) sa spravidla strácajú, pretože majú menšiu šancu byť zastúpené v genotypoch prežívajúcich resp. zakladajúcich jedincov. Naopak majorpolymorfizmy (časté alely) nie sú spravidla driftom zásadnejšie postihnuté, najmä ak sa v dôsledku obsadenia uvoľnenej ekologickej niky pôvodná veľkosť populácie rýchlo obnoví. Zahrdlenie aj efekt zakladateľa teda primárne redukovujú počet alel v populácii, ale nepostihujú génovú diverzitu.

Migrácia a tok génov

Mechanizmy migrácie

Migrácia ako prenos génov v širokom zmysle slova zahŕňa dva procesy: kolonizáciu, teda expanziu areálu spojenú so šírením druhu na lokality, na ktorých sa predtým nevyskytoval, a tok génov, teda prenos génov medzi už existujúcimi, etablovanými populáciami. Gény sa pochopiteľne nedokážu šíriť samotné, ich šírenie prebieha vďaka pohybu ich nositeľov. K toku génov teda dochádza len vtedy, ak sa migranti krížia s jedincami lokálnej populácie.

Rastliny môžu migrovať vo všetkých štádiách životného cyklu, teda ako gametofyty aj ako sporofyty. U vyšších rastlín (papraďorasty a cievnaté rastliny) je gametofyt redukovaný na útvar pozostávajúci z niekoľko málo buniek. Peľové zrná, predstavujúce samčí gametofyt, sú spravidla vysoko pohyblivé a môžu byť prenášané rôznymi vektormi. Väčšina drevín a veľká časť bylinných druhov (predovšetkým trávy) je vetroopelivých. Opeľovanie hmyzom je u drevín zriedkavejšie, ale bežné u bylín. Viaceré druhy kombinujú oba mechanizmy (napr. rody *Salix*, *Tilia*). Opeľovanie vodou je podstatne zriedkavejšie, v strednej Európe obmedzené na niektoré vodné rastliny, napr. rod *Potamogeton*. Sporofyt môže byť prenášaný v embryonálnom štádiu (migrácia semien), ale aj v dospelom štádiu vegetatívnym šírením. Semená využívajú širšie spektrum vektorov prenosu v porovnaní s peľom. Druhy s malými a ľahkými semenami sú spravidla anemochórne, teda šírené vetrom. Semená vodných rastlín a rastlín v blízkosti tokov môžu byť šírené vodou. Mnohé rastliny sú závislé na šírení semien živočíchmi. Pri viacerých druhoch sú plody konzumované vtákmi a po prechode tráviacim traktom vylúčené s trusom. Vtáky a hlodavce semená prenášajú a niekedy skladujú (sojka,

orešnica atď.). Semená alebo plody môžu byť adaptované na prichytenie sa o kožušinu zvierat. Špecifický spôsob rozptylu semien sa vyvinul u tzv. stepných bežcov: po dozretí semien sa nadzemná časť rastliny odlomí, a pri unášaní vetrom sa semená postupne uvoľňujú. Pri vegetatívnom (asexuálnom) šírení sa gény rastlín prenášajú časťami spojenými alebo oddelenými od materskej rastliny. Dreviny sa môžu šíriť koreňovými výmladkami (osika, čerešňa), u bylenných druhov (najmä klonálnych tráv) sa môžu tvoriť rizómy, nadzemné poplazy, u drevín môžu zakoreniť konáre, dotýkajúce sa povrchu pôdy (kry, smrek). Zakoreniť môže aj oddelený konár, transportovaný napríklad riekou, ak je schopný utvárať adventívne korene (topole). Teoreticky, hľuzy, cibulky a podobné orgány môžu prežiť prenos v tráviacom trakte živočíchov, aj keď takýto mechanizmu zrejme nebude častý.

Tok génov prostredníctvom peľu je pri rastlinách najbežnejším a najefektívnejším mechanizmom, keďže peľové zrná sú produkované spravidla vo veľkom množstve a prenášané často na veľké vzdialenosti, najmä pri vetroopelivých druhoch. Rozptyl semien je efektívnym mechanizmom kolonizácie, ale k toku génov medzi existujúcimi populáciami spravidla prispieva v podstatne menšej miere. Pravdepodobnosť, že prenesené semeno vyklíči, etabluje sa a dorastie do dospelosti v už existujúcej populácii, v ktorej je takýto jedinec vystavený masívnej kompetícii miestnych jedincov, je pomerne nízka, najmä u druhov tvoriacich veľké populácie s vysokou hustotou. Vegetatívne šírenie v dospelom štádiu sa obvykle uskutočňuje na malé vzdialenosti, aj keď pri niektorých druhoch môže byť masívne a rozsahom prevyšovať pohlavné rozmnožovanie (napr. klonálne travy).

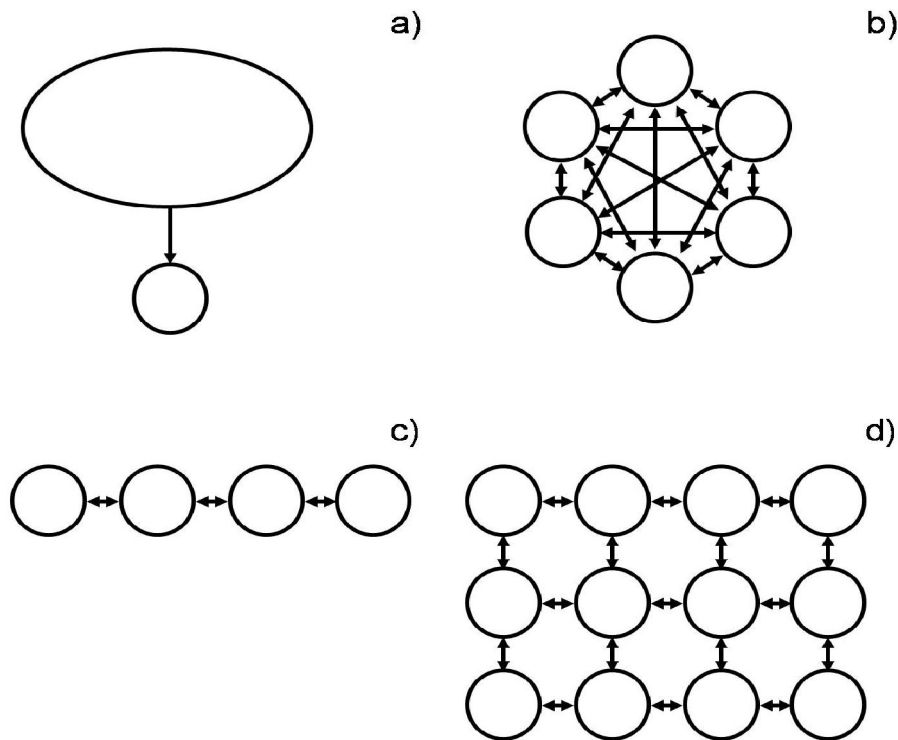
Pri väčšine živočíchov je poradie efektívnosti mechanizmov toku génov presne opačné. Najbežnejší mechanizmus, uplatňujúci sa aj na najväčšie vzdialenosti, je prechod dospelých jedincov z jednej populácie o druhej (zároveň ide o mechanizmus kolonizácie). Migrácia v embryonálnom štádiu je zriedkavejšia, môže sa uplatniť len pri skupinách živočíchov, kde sú vajíčka samostatným organizmom a sú schopné prinajmenšom krátkodobo prežiť transport (ikry rýb, vajíčka hmyzu a pod.). Prenos v haploidnom štádiu (spermie) s výnimkou najprimitívnejších skupín živočíchov prakticky neprichádza do úvahy.

Modely migrácie

Intenzita a smer toku génov medzi subpopuláciami sa môže líšiť v závislosti na vzdialenosti, geografických prekážkach, časovému posunu kvitnutia a pod. Preto pre odhad dopadu toku génov na genetickú štruktúru používa populačná genetika zjednodušené modely. Pre diskrétne subpopulácie oddelené fyzickou bariérou (t.j. fragmentovanú populáciu) boli vypracované tri základné modely, ktoré sa pre svoju jednoduchosť obvykle používajú aj v kontinuálnych populáciách, kde ostré hranice medzi subpopuláciami neexistujú a pojem subpopulácia sa používa len ako pracovný koncept. Kontinentálno-ostrovný model (angl. *continent-island model*) sa vzťahuje na malú subpopuláciu oddelenú od veľkej populácie (napr. ostrov oddelený od kontinentu). Tok génov je v tomto prípade v princípe jednosmerný, migrácia z ostrova na pevninu je zanedbateľná a nie je nutné s ňou uvažovať. Ostrovný model (angl. *island model*) uvažuje s populáciou rozdelenou na subpopulácie s rovnakou resp. porovnateľnou veľkosťou, ktoré si navzájom vymieňajú migrantov náhodne v rovnakej miere *m* jedincov na generáciu medzi ktoroukoľvek dvojicou subpopulácií. Krokový model (angl. *stepping-stone model*) predpokladá, že migranti prichádzajú len zo susedných subpopulácií, čo je prípad najmä organizmov s nízkou migračnou schopnosťou. Pôvodný lineárny krokový model, ktorý sa vzťahuje napr. na rastliny pozdĺž vodných tokov, pobreží, horských masívov a pod., bol neskôr rozšírený na dvojrozmerný model (obr. 32).

Kontinuálnu populáciu nemožno rozdeliť na diskrétne subpopulácie spôsobom, ktorý by mal biologické zdôvodnenie. Aj v tomto prípade však platí, že jedince oddelené väčšou vzdialenosťou si spravidla pri reprodukcii vymieňajú gény menej často než jedince vzájomne blízke. Tento jav sa označuje ako izolácia vzdialenosťou (angl. *isolation by distance*). Model

izolácie vzdialenosťou vychádza z podobného základu ako krokový model v tom zmysle, že genetická korelácia medzi jedincami (teda podiel spoločných génov) klesá s narastajúcou vzdialenosťou medzi nimi.



Obr. 32 Schematické znázornenie modelov toku génov vo fragmentovanej populácii: a) kontinentálno-ostrovny model, b) ostrovny model, c) jednorozmerný krokový model, d) dvojrozmerný krokový model

Reprodukčná izolácia

Pod izoláciou sa rozumie nemožnosť alebo neschopnosť dvoch jedincov vyprodukovať životaschopné a plodné potomstvo. Samotná schopnosť dvoch jedincov navzájom sa krížiť ešte neznamená, že ich potomstvo nebude zákonite slepou uličkou evolúcie.

Mechanizmy reprodukčnej izolácie súvisia v princípe so štyrmi faktormi: priestorom, časom, správaním a dedičnosťou. S priestorovými prekážkami je viazaná geografická izolácia: subpopulácie sú oddelené fyzickou prekážkou (more, horstvo, nížina a pod.), ktorá bráni toku génov. Vzdialenosť v tomto prípade nie je primárnym faktorom: populácie pstruha v dvoch potokoch, z ktorých jeden je v povodí Váhu a druhý v povodí Dunajca, môže oddeľovať vzdušná vzdialenosť pár kilometrov, ale vzhľadom na rozdielne úmoria je migrácia z jednej do druhej fyzicky nemožná (relatívne; ikry môže byť prenesené na perí alebo končatinách vodných vtákov). Druhým faktorom je vzdialenosť samotná, ktorá hrá rolu aj v kontinuálnych populáciách: buk v Malých Karpatoch neoddeľuje od buka na Vihorlate žiadna geografická prekážka, medzi týmito pohoriami je areál buka takmer súvislý, ale pravdepodobnosť doletu peľu medzi nimi je prakticky nulová (viď izolácia vzdialenosťou).

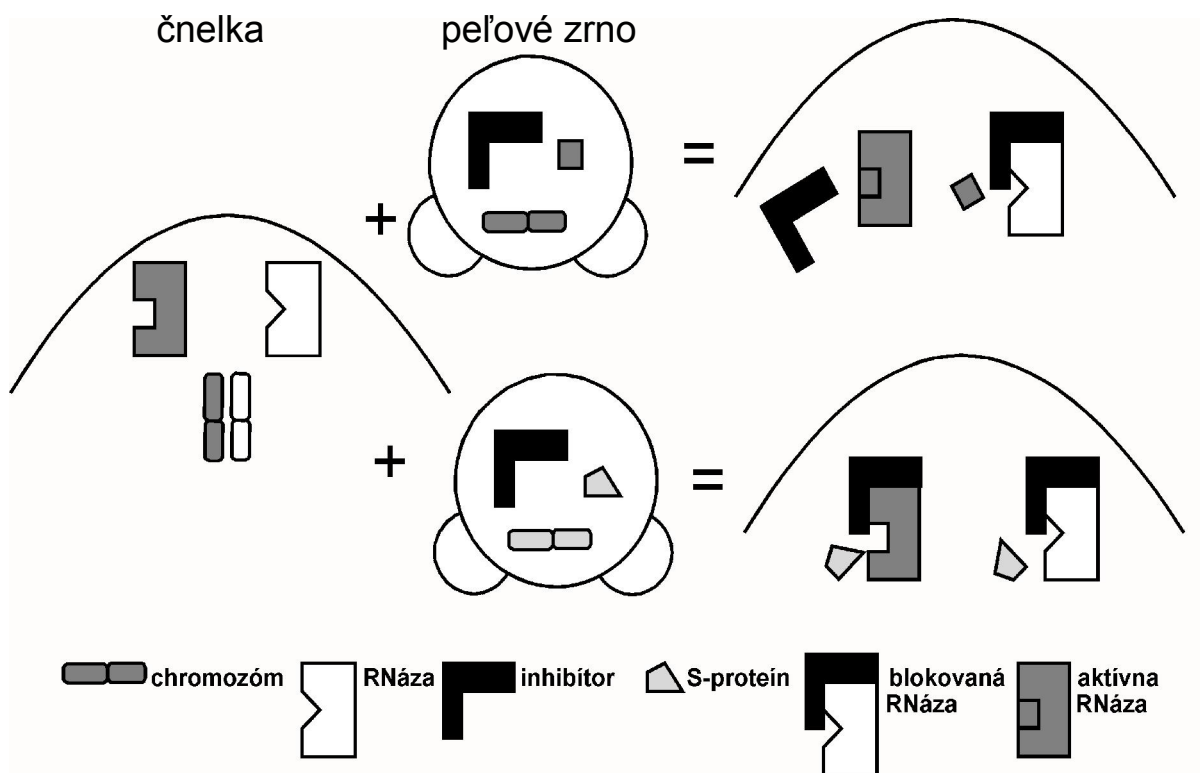
Ďalším faktorom izolácie je čas, kedy sa reprodukcia uskutočňuje. Populácie sa odlišujú dobou kvitnutia v prvom rade v dôsledku rozdielov v nadmorskej výške (výšková izolácia) – doba kvitnutia je závislá na klimatických pomeroch a s rastúcou nadmorskou výškou sa postupne oneskoruje. Aj pri malých fyzických vzdialenostiach je teda prenos génov limitovaný časovou synchronizáciou kvitnutia (aj ak je peľ vetrom prenesený do subpopulácie vo väčšej nadmorskej výške, nie sú tam ešte k dispozícii receptívne samičie kvety, ktoré

by mohol oplodniť, a vice versa), ide teda o mechanizmus analogický izolácii vzdialenosťou a najlepšie ho možno modelovať krokovým modelom migrácie. Načasovanie kvitnutia je však okrem klímy determinované aj geneticky, dva jedince môžu kvitnúť v rozdielnom čase aj ak sa nachádzajú pár metrov od seba. V tomto prípade sa používa termín fenologická izolácia.

V prípade živočíchov je párenie nutne spojené s rozoznávaním vhodného partnera, ktoré môže byť založené na rozličných typoch stimulov: vizuálnych (špecifický typ správania, „tance“, predvádzanie peria u vtákov a pod.), zvukových (spev vtákov, zvukové signály hmyzu) či chemických (feromóny). Primárne tieto mechanizmy fungujú na úrovni druhu, ale rituály párenia či iné typy správania sa môžu odlišovať aj na vnútrodruhovej úrovni. Tento typ izolácie sa označuje ako behaviorálna alebo etologická izolácia. U niektorých druhov živočíchov (článkonožce) sa vyvinuli mechanizmy morfologickej izolácie: kopulačné orgány majú špecifický tvar a fungujú na princípe zámku a kľúča, takže pre nekompatibilné jedince existuje mechanická zábrana párenia. Aj samotná fenotypová rozdielnosť rodičov (napr. telesná veľkosť) môže fakticky brániť vzájomnému kríženiu (aj keby sme uskutočnili umelé oplodnenie čivavy bernardínom, je málo pravdepodobné, že by matka dokázala plod vynosiť až do vrhu).

Poslednú skupinu prekážok párovania predstavujú genetické mechanizmy, ktoré možno rozdeliť na prezygotické (faktory znižujúce pravdepodobnosť vytvorenia hybridnej zygoty, teda pôsobiace pred jej vznikom) a postzygotické (faktory znižujúce pravdepodobnosť, že sa existujúca hybridná zygota vyvinie na životaschopného a plodného dospelého jedinca, teda pôsobiace po vzniku zygoty).

V prípade rastlín je najčastejším dôvodom vzájomnej nekrížiteľnosti (teda prezygotického mechanizmu) niektorý z mechanizmov autoinkompatibility. Predovšetkým krytosemenné rastliny si v priebehu evolúcie vytvorili mechanizmy brániace samoopeleniu (ako procesu vedúcemu spravidla k postihnutému potomstvu). Tieto mechanizmy sú spravidla pod genetickou kontrolou skupiny génov lokalizovaných v tesnom susedstve na jednom lokuse (*S*-lokus), tvoriacich jednu väzbovú skupinu. Rozlišuje sa gametofytická (rozšírenejšia, uplatňuje sa napr. u druhov čeľade Rosaceae a v rode *Corylus*) a sporofytická autoinkompatibilita (uplatňuje sa napr. v čeľadiach Betulaceae, Ulmaceae, Tiliaceae). V prípade gametofytickej autoinkompatibility je *S*-lokus spravidla v rámci populácie vysoko polymorfný (rádovo desiatky alel). Produktom *S*-lokusu sú tri proteíny: v čnelke materskej rastliny je to RNáza (RNA nukleáza; enzým odbúravajúci RNA), v peľovom zrne inhibítor RNázy a *S*-proteín. Pokiaľ haploidné peľové zrno nesie rovnakú alelu v *S*-lokuse ako je jedna z alel diploidnej materskej rastliny, *S*-proteín je kompatibilný s RNázou, viaže sa na ňu a tým zabráni je zablokovaniu inhibítorom. RNáza zostáva aktívna a odbúrava molekuly RNA v rastúcom peľovom vrecúšku, čím bráni expresii génov peľu a teda aj syntéze bielkovín, ktoré sú pre rast a normálne fungovanie peľového vrecúška nevyhnutné. Rast peľového vrecúška je tým zablokováný a nemôže dôjsť k oplodneniu (obr. 33). Pre oplodnenie je teda v tomto prípade rozhodujúci haplotyp peľového zrna (samčieho gametofytu): kríženie dvoch jedincov nezdieľajúcich žiadnu alelu v *S*-lokuse ($S_1S_2 \times S_3S_4$) je úspešné vždy, kríženie jedincov zdieľajúcich jednu alelu je úspešné v polovici prípadov ($S_1S_2 \times S_1S_3 \rightarrow S_2S_3$; peľové zrno s haplotypom S_1 neklíčia), kríženie jedincov zdieľajúcich obe alely je vždy neúspešné ($S_1S_2 \times S_1S_2 \rightarrow \emptyset$; peľové zrno s haplotypom S_1 ani S_2 neklíčia). Mechanizmy sporofytickej autoinkompatibility sú komplikovanejšie a nie sú úplne preštudované. Takisto je kontrolovaná jedným lokusom, a pre jej spustenie je rozhodujúci diploidný genotyp otcovského jedinca (sporofytu). Otcovská rastlina s genotypom S_1S_2 sa teda vôbec nekríži nielen s materskou rastlinou rovnakého genotypu, ale ani s genotypmi S_1S_x a S_2S_x . Len kríženie s genotypom S_xS_y bude úspešné ($x, y \neq 1, 2$). Pre upresnenie je potrebné uviesť, že tento popis platí len v prípade kodominancie *S*-alel, v prípade dominancie sú pomery komplikovanejšie.



Obr. 33 Schéma fungovania gametofytickej autoinkompatibilitity. Rovnaké farby chromozómu, RNázy a S proteínu znamenajú rovnakú alelu *S*-lokusu. Aktívna RNáza (hore) odbúrava RNA peľového vrecúška a bráni jeho prerasteniu k vajíčku.

Postzygotické mechanizmy sa spúšťajú po oplodnení. Z časového hľadiska prvým možným mechanizmom je odumretie zygoty alebo embrya. Jeho príčiny môžu byť rozmanité: rozdielny počet chromozómov u rodičov (aj keď u viacerých krytosemenných rastlín rozdiely v ploidii síce spôsobujú odumretie endospermu, ale inak nemajú žiadny negatívny dopad), prítomnosť recesívnych letálnych alel, prípadne cytonukleárna inkompatibilita, teda nezhoda medzi jadrovými a organelárnymi génmi (je treba pripomenúť, že aj keď pôvod mitochondrií a chloroplastov je endosymbiotický, teda na začiatku išlo o baktérie s kompletným genómom, v súčasnosti tieto organely nie sú plne autonómne, teda mnohé ich gény sa presunuli do jadra; ich normálne fungovanie si vyžaduje kompatibilitu s jadrovým genómom). Neživotaschopnosť hybridov v neskorších štádiách ontogenézy môže byť spôsobená autoimunitným syndrómom označovaným ako hybridná nekróza: produkty konkrétnych génov pochádzajúcich od jedného z rodičov môžu byť organizmom chybné identifikované ako cudzie a patogénne a tým vyvolajú postupnú apoptózu v rastlinných pletivách. Sterilita hybridov je najčastejšie spojená s chromozómovými mutáciami: rozsiahlejšie translokácie alebo inverzie môžu brániť normálnemu párovaniu chromozómov počas meiózy (synapse) a tým brániť vzniku funkčných gamét. Posledný mechanizmus sa označuje ako hybridný rozpad: aj keď hybridy F_1 generácie sú životaschopné aj plodné, spätné krížence (B_1) alebo F_2 generácia môžu byť neživotaschopné. Jednou z príčin hybridného rozpadu môže byť rozpad koadaptovaných génových komplexov (viď ďalej), druhou aj samotná rekombinácia chromozómov pri meióze. Pri hybridoch generácie F_1 genóm vždy obsahuje kompletnú sadu chromozómov od každého rodiča. V následných generáciách sa však do zygoty môže dostať jeden chromozómový pár od jedného a druhý od druhého z rodičov, pričom kompatibilita medzi produktmi ich génov v zmysle schopnosti plniť svoju funkciu nemusí byť zaručená, pretože funkčnosť proteínov často závisí od ich vzájomných interakcií.

Interakcie medzi evolučnými mechanizmami, genetická homeostáza

Na rozdiel od všeobecne rozšírených predstáv prirodzeným stavom prírody nie je rovnováha a harmónia, práve naopak. Obvykle preceňovaná úloha prírodného výberu vedie k predstave, že pre každý znak existuje gén alebo gény, a fenotyp nezodpovedajúci aktuálnemu prostrediu je dôsledkom toho, že jedinec nesie nevhodné varianty týchto génov. Výber, umožňujúci prežiť a rozmnožiť sa len najlepšie adaptovaným genotypom by potom logicky mal viesť k tomu, že v priebehu niekoľkých generácií „nevhodné“ gény z populácie vypadnú. Evolučné mechanizmy ovšem ovplyvňujú genetickú štruktúru populácie vo vzájomných interakciách a vzájomnej synergii. Vo všeobecnosti možno povedať, že mutácie a tok génov vedú k nárastu genetickej variability v populácii, naopak selekcia a drift vedú k jej redukcii. Toto všeobecné konštatovanie sa vzťahuje aj na tú časť genetickej premenlivosti, ktorá má adaptívny význam. Ako bolo konštatované, nové mutácie sú spravidla z genofondu populácie vytlačené, aj keď sú pre svojho nositeľa v danom prostredí výhodné; naopak, škodlivé mutácie sa vďaka náhodným procesom môžu najmä v malých populáciách udržať a v krajnom prípade aj ohroziť ich existenciu. Tok génov tým, že do genofondu populácie trvale vnáša gény výhodné v inom kontexte prostredia (čím „rozrieduje“ lokálny genofond) predstavuje v konkrétnej subpopulácii protiváhu lokálnej adaptácie prírodným výberom a stabilizuje genetickú štruktúru populácie ako celku.

Efektívnosť prírodného výberu sa v populácii mení aj v dôsledku mechanizmov spojených s organizáciou genómu. Gény, kontrolujúce navzájom prepojené biochemické funkcie majú tendenciu preskupovať sa v rámci genómu a sústrediť sa v jednej väzbovej skupine, pretože výber uprednostňuje jedincov vybavených komplexom navzájom kompatibilných alel. Touto cestou vznikajú koadaptované génové komplexy. Niekedy je aktivita celého komplexu riadená spoločnou predradenou regulačnou oblasťou, v tomto prípade sa takýto komplex označuje ako supergén (príkladom môže byť *S*-lokus, viď vyššie). Pri medzidruhovej alebo geograficky vzdialenej hybridizácii môže u F_1 hybridov dôjsť k rekombinácii génov v rámci týchto komplexov, čím sa na jeden chromozóm dostanú vzájomne nekompatibilné alely (resp. alely kódujúce vzájomne nekompatibilné proteíny). V dôsledku toho sa v ďalších generáciách znižuje životaschopnosť jedincov (hybridný rozpad).

Schopnosť populácie odpovedať na prirodzený alebo umelý selekčný tlak nie je neobmedzená. Často sa stáva, že po pár generáciách populácia prestane reagovať na výber úplne a napriek selekčnému tlaku si udržiava konštantnú genetickú štruktúru. Tento stav sa označuje ako genetická homeostáza. Jednou z jej príčin, aj keď zriedkavou, môže byť vyčerpanie genetickej variability, t.j. úplné vytlačenie alel nevhodných v danom kontexte prostredia z genofondu populácie. Častejším dôvodom sú epistatické interakcie medzi génmi či pleiotropné účinky génov, ktoré sú vystavené selekčnému tlaku. Zvýšenie frekvencie konkrétnej alely môže vyvolať zlepšenie priemernej hodnoty jedného znaku, ktoré je ale sprevádzané zhoršením iného znaku alebo znakov. Výsledný dopad na biologickú zdatnosť jedincov aj priemernú biologickú zdatnosť populácie môže byť neutrálny, niekedy dokonca negatívny. Existencia koadaptovaných génových komplexov takisto tlmí odozvu na selekčný tlak, pretože akákoľvek zmena konštelácie génov nutne vedie k zníženiu biologickej zdatnosti. V týchto prípadoch si populácia síce zachováva variabilitu, ale tá je viazaná v génových komplexoch a nemôže byť využitá pre adaptáciu. Ako bolo demonštrované v kapitole *Selekcia*, ďalším zdrojom homeostázy môže byť superdominancia (teda vyššia priemerná biologická zdatnosť heterozygotov), ktorá tiež vedie k ustáleniu rovnováhy. Tento mechanizmus nemusí byť výnimočný – vysoko heterozygotné jedince sa vyznačujú vyššou vnútornou genetickou variabilitou, produkujú širšiu paletu proteínov, a preto môžu byť schopné lepšie odolávať fluktuáciám podmienok prostredia. Táto skutočnosť môže byť obzvlášť významná pre dlhožijúce organizmy, ktoré sú v priebehu ontogenézy vystavené kolísaniu prostredia a vzhľadom na neskorý nástup plodnosti naň nemôžu pružne reagovať adaptáciou prírodným

výberom. Zvýhodnenie heterozygotov udržiava polymorfizmus populácie a vedie k zastúpeniu alel, ktoré sa udržiava na intermediárnych hodnotách.

GENETICKÁ VARIABILITA

Pojem genetickej premenlivosti bol spomínaný a čiastočne vysvetlený v úvodných kapitolách. Je potrebné pripomenúť, že tento pojem vždy vzťahuje na populáciu, nie jedinca. Používa sa ovšem v dvoch zmysloch – jednak pre označenie tej časti variability fenotypových znakov, ktorá je podmienená geneticky (teda skutočnosťou, že rôzne jedince majú rôzny genotyp), a jednak pre popísanie skutočnosti, že v populácii sa nachádzajú nositelia rôznych genetických typov (alel, haplotypov, genotypov). Táto kapitola je venovaná druhému z týchto dvoch konceptov genetickej variability. Aj tento koncept má však niekoľko aspektov. Z hľadiska popisu a kvantifikácie genetickej premenlivosti nás môže zaujímať, aký je celkový počet genetických typov zastúpených v populácii, bez ohľadu na ich početnosť; tento aspekt sa označuje ako genetická multiplicita resp. alelická (haplotypová, genotypová) bohatosť populácie. Druhým aspektom je charakter rozdelenia frekvencií genetických typov, ktorý berie do úvahy nielen ich celkový počet, ale aj rovnosť ich zastúpenia; tento aspekt popisuje rozmanitosť, rôznorodosť v zastúpení genetických typov a označuje sa termínom genetická diverzita. Posledným aspektom sú rozdiely medzi populáciami, teda miera, v akej sa populácie navzájom odlišujú zastúpením genetických typov; označuje sa termínom genetická diferenciácia.

Pri použití akéhokoľvek nástroja na identifikáciu genotypov analýza vychádza z výberových vzoriek. Výber sa uskutočňuje dvomi smermi – z populácie je vybraná vzorka N jedincov a z genómu je vybraný súbor M markérových génov. Výsledkom analýzy je matica genotypov rozmerov $N \times M$. Základnou východiskovou charakteristikou genetickej štruktúry sú genotypové a alelické frekvencie (podiele, v akých sú zastúpené jednotlivé genotypy a alely). V prípade kodominantných markérov, u ktorých sa všetky homozygotné a heterozygotné genotypy dajú navzájom rozoznať, genotypovú frekvenciu možno odhadnúť ako podiel jedincov daného genotypu z celkového počtu jedincov výberovej vzorky:

$$P(A_i A_j) = P_{ij} = N(A_i A_j) / N.$$

Frekvenciu alely A_i je možné odhadnúť ako

$$p(A_i) = p_i = [N(A_i A_i) + \frac{1}{2} \sum_{j \neq i} N(A_i A_j)] / N$$

(P_{ij} – frekvencia genotypu $A_i A_j$, p_i – frekvencia alely A_i , $N(A_i A_j)$ – počet jedincov genotypu $A_i A_j$, N – celkový počet jedincov vo výberovej vzorke).

Genetické a génové markéry

Pre popis a kvantifikáciu genetickej premenlivosti v rámci populácie a charakteru genetickej variability medzi populáciami potrebujeme znaky, u ktorých z ich fenotypového prejavu sme schopní odvodiť ich genotyp. Takéto znaky nazývame genetickými markérm. Ide o fenotypové znaky, ktoré nie sú ovplyvnené prostredím (resp. vplyv prostredia je len minimálny), t.j. sú prakticky úplne kontrolované geneticky. Z hľadiska hodnotenia genetickej premenlivosti sú najdôležitejšou podskupinou genetických markérov tzv. génové markéry: znaky, ktoré majú jednoduchú genetickú kontrolu (malý počet génov, v ideálnom prípade len jeden), ktorú je možné metódami genetickej analýzy určiť, t.j. každému fenotypu sme schopní jednoznačne priradiť genotyp. Spôsob dedičnosti má pre použiteľnosť génových markérov rozhodujúci význam, v prípade úplnej dominancie (dominantný homozygot a heterozygot nie sú fenotypovo rozlíšiteľní) sú možnosti použitia markéra obmedzené, naopak výhodná je neúplná dominancia alebo kodominancia alel.

Podľa charakteru možno genetické markéry klasifikovať na:

- morfologické (u drevín najčastejšie morfologické odchýlky v tvare a farbe listov či kvetov/strobilov, habite, u živočíchov albinizmus a pod.)

- biochemické
 - sekundárne metabolity (monoterpény, sesquiterpény, fenolické látky)
 - zásobné bielkoviny
- molekulárne
 - proteínové
 - izoenzýmy
 - krvné skupiny
 - DNA markéry
 - založené na reštrikčných fragmentoch
 - založené na amplifikácii PCR

Z uvedených skupín predovšetkým molekulárne markéry spĺňajú požiadavky použiteľnosti na väčšinu praktických účelov, dnešný genetický výskum a expertná činnosť sa spoliehajú primárne na tento typ markérov. Techniky analýzy génových markérov sú podrobnejšie popísané v návodoch na cvičenia (Gömöry a Longauer 2013), tu sa obmedzíme len na základnú informáciu.

Izenzýmy sú rôzne molekulárne formy toho istého enzýmu. Enzýmy ako bielkovinné molekuly predstavujú priamy produkt transkripcie a translácie genetickej informácie, vzťah medzi primárnou štruktúrou enzýmu a poradím nukleotidov v kódujúcej časti DNA je bezprostredný. Ak dôjde v štruktúre génu k mutácii, zmení sa jedna alebo niekoľko aminokyselín v produkovanom enzýme (pokiaľ nejde o synonymnú mutáciu). Od primárnej štruktúry enzýmu (poradia aminokyselín) závisia ďalšie vlastnosti – výsledný trojrozmerný tvar enzýmovej molekuly (terciárna štruktúra), jej veľkosť, počet a typ funkčných skupín ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$) na jej povrchu a teda aj jej povrchový elektrický náboj vo vodnom prostredí v závislosti na pH roztoku. Na základe týchto vlastností je možné pôvodnú a mutovanú enzýmovú molekulu od seba odlíšiť elektroforeticky, t.j. separáciou v elektrickom poli. Extrakt z rastlinného pletiva sa vloží do škrobového alebo polyakrylamidového gélu s konkrétnym pH a pripojí sa na jednosmerný elektrický prúd. Po ukončení migrácie sa prúd vypne a gél sa vloží do farbiaceho roztoku, obsahujúceho substrát, na ktorý zisťovaný enzým pôsobí, kofaktory nutné pre priebeh biochemickej reakcie ktorú enzým katalyzuje (NAD, NADP, ATP, Mg^{2+} a pod.) a farbivá reagujúce s produktmi reakcie. V miestach, kde sa v géle molekuly enzýmu nachádzajú, prebehne reakcia a dôjde k vyzrážaniu farbiva, teda tieto miesta sa na géle prejavajú ako farbené pružky – každý pružok zodpovedá jednej frakcii enzýmu. Genetická interpretácia zymogramu sa hľadá metódami genetickej analýzy. V najjednoduchšom prípade (monomérny enzým produkováný len 1 génom) každý pružok zodpovedá jednej alele génu, ktorý kontroluje syntézu enzýmu. Počet alelických variant sa pri izoenzýmoch pohybuje spravidla v rozmedzí 1–4 (výnimočne nad 10) alel na populáciu. Počet izoenzýmových génov, ktoré je možné v pletivách drevín identifikovať (t.j. enzýmy je možné extrahovať bez straty biochemickej aktivity, separovať a farbiť) je spravidla 10–20.

DNA markéry vychádzajú priamo z analýzy molekuly DNA, ktorá je nositeľkou dedičnej informácie. Môžu byť založené na dvoch metodických postupoch:

- reštrikčná analýza (RFLP – *restriction fragment length polymorphism*) – rozdelenie molekuly DNA na definované úseky pomocou špecifických enzýmov. Reštrikčné endonukleázy (reštriktázy) sú bakteriálne enzýmy, ktoré vyhľadávajú na molekule DNA konkrétnu sekvenciu nukleotidov, a pokiaľ ju nájdú, molekulu DNA rozdelia (napr. endonukleáza *EcoRI*, izolovaná z črevnej baktérie *Escherichia coli*, vyhľadáva sekvenciu $\text{G}\downarrow\text{AATTC}/\text{CTTAA}\downarrow\text{G}$ a delí molekulu DNA na oboch komplementárnych reťazcoch medzi guanínom a adenínom). Názov konkrétnej endonukleázy je odvodený od skratky rodového a druhového názvu baktérie (*Eco* = *Escherichia coli*), prípadne konkrétneho bakteriálneho kmeňa, z ktorého bola reštriktáza izolovaná (kmeň **R**), a číslované sú rímskymi číslami v poradí, ako boli popísané (poradové číslo **I**). Existujú 3 typy reštrikčných

endonukleáz, pre účely molekulárnej biológie aj génového inžinierstva sa najčastejšie využívajú endonukleázy typu II, ktoré vyhľadávajú konkrétny sekvenčný motív a reťazec DNA prerušia v jeho rámci. Väčšina endonukleáz vyhľadáva tzv. palindromické sekvencie, t.j. motívy, ktoré sú v smere čítania (5'→3') identické (napr. spomínaná endonukleáza *EcoRI* vyhľadáva sekvenciu 5'GAATTC3', t.j. komplementárna sekvencia v druhom reťazci 3'CTTAAG5' je v smere čítania 5'→3' (t.j. odzadu) identická). Niektoré z endonukleáz prerušujú obe vlákna DNA na rovnakom mieste, teda vytvárajú tzv. hladký koniec (*blunt end*), iné prerušujú vlákna DNA na rozdielnych miestach, na konci teda vytvárajú jednoreťazcový previs (*overhang*). Enzýmy, schopné spájať prerušenia na reťazci DNA (ligázy) vyžadujú práve previs (táto vlastnosť sa využíva napr. pri vkladaní fragmentov DNA pri génových manipuláciách). Stríhaním restriktívnymi endonukleázami sa celý reťazec DNA rozdelí na fragmenty, ktoré je možné separovať elektroforeticky a následne farbiť rôznymi technikami. Dĺžka fragmentov sa meria počtom bázových párov (bp).

Pri jadrovej DNA je množstvo fragmentov získaných štiepením ktoroukoľvek z možných endonukleáz veľmi veľké, pričom závisí od dĺžky sekvenčného motívu. Čisto štatisticky, pri dĺžke n nukleotidových párov v sekvenčnom motíve endonukleáza strihá v priemere každých 4^n nukleotidov (t.j. endonukleáza *EcoRI*, u ktorej je vyhľadávaný motív 6-bázový, vytvára fragmenty s priemernou dĺžkou $4^6 = 4096$ fragmentov). Pri celkovej dĺžke genomickej DNA drevín meranej v miliardách nukleotidov teda jedna analýza produkuje rádovo milióny fragmentov, ktoré po elektroforéze nie je možné ich navzájom odlíšiť (na géle sa nachádzajú husto pri sebe, takže vytvárajú jednoliaty vyfarbený pás. Preto sa na identifikáciu konkrétnych génov používa tzv. Southernova hybridizácia (DNA sa po elektroforéze preniesie z gélu na nylonovú membránu, denaturuje vysokou teplotou a následne hybridizuje s rádioaktívne značenou jednoreťazcovou známou sekvenciou. Značená DNA sa naviaže len na tie fragmenty, na ktorých sa nachádza komplementárna sekvencia. Hybridizované fragmenty sa dajú identifikovať autorádiograficky).

- amplifikácia – zmnoženie úsekov DNA metódou PCR (*polymerase chain reaction* – polymerázová reťazová reakcia). PCR vlastne kopíruje mechanizmus replikácie DNA. Táto metóda predstavuje cyklické opakovanie troch reakcií: denaturácie DNA vysokou teplotou (*denaturation*; rozdelenie dvojitého reťazca na dve jednoreťazcové molekuly pri cca 95 °C), pripojenie dvojice oligonukleotidov, tzv. primery, s dĺžkou cca 10–20 bp (*annealing*; pri teplote ~45–60 °C, optimálna teplota závisí od dĺžky a zloženia primerov), a syntéza komplementárneho reťazca (*extension*; 72 °C, čo je optimálna “pracovná” teplota termostabilnej DNA polymerázy). Táto trojica reakcií sa cyklicky opakuje cca. 40–60-krát. Reakčná zmes teda okrem analyzovanej DNA (tzv. templát) a primerov musí obsahovať voľné nukleotidy (presnejšie deoxynukleozidtrifosfáty – dATP, dTTP, dGTP, dCTP) a DNA polymerázu, ktorá ovšem musí byť schopná uchovať si aktivitu aj po zahriatí na teplotu blízku bodu varu počas denaturačného kroku. Najčastejšie sa pre tento účel používa termostabilná *Taq*-polymeráza, izolovaná z archebaktérie *Thermus aquaticus*, žijúcej v horúcich prameňoch. Primery sa na denaturovanom reťazci DNA pripoja na miesta s komplementárnym poradím nukleotidov a od týchto miest sa jedným smerom (5' → 3', t.j. na –OH skupinu na 3'-konci posledného nukleotidu primera) začne dopĺňať druhý reťazec. Od druhého cyklu týmto spôsobom exponenciálne narastá počet fragmentov s dĺžkou zodpovedajúcou vzdialenosti medzi dvomi komplementárnymi miestami. Fragmenty je opäť možné separovať elektroforézou a identifikovať farbivami, ktoré sa viažu na DNA.

Ako bolo spomenuté, pre separáciu fragmentov DNA sa používa pohyb v elektrickom poli, čiže elektroforéza. Zdrojom elektrického náboja nukleových kyselín a oligonukleotidov vo vodnom prostredí sú voľné elektrónové páry na atónoch dusíka a kyslíka v heterocyklických bázach nukleotidov (A, T, G, C). Sumárny náboj dvojice A=T a G≡C je prakticky rov-

naký, takže náboj pripadajúci na jednotku dĺžky DNA fragmentu je v podstate konštantný nezávisle na sekvencii. Fragmenty sú teda pri pohybe triedené podľa dĺžky, dlhšie fragmenty sa cez póry gélu predierajú menšou rýchlosťou ako kratšie.

Ako gélový nosič sa pri DNA používa najčastejšie agaróza alebo polyakrylamid. Agaróza je vhodným médiom pre rýchle a hrubšie analýzy, keďže separácia v nej je menej dokonalá. Je možné ju použiť aj pre rutinné analýzy, pokiaľ rozdiely vo veľkosti medzi fragmentmi, ktoré sú predmetom záujmu, sú veľké (viac ako 10 bp). Pre jemnejšie analýzy sa ako gélový nosič používa elektroforéza v polyakrylamidovom géle (PAGE). DNA je možné aj farbiť fluorescenčnými farbivami alebo striebrom. Veľmi efektívna je separácia fragmentov DNA v automatických DNA-sekvenátoroch. Elektroforéza tu neprebíha na plochom géle, ale v dlhých kapilárach naplnených polyakrylamidovým gélom. Pri PCR sa používajú značené primery (oligonukleotidy s naviazaným farbivom) a farbivo je vybudzované laserovým lúčom.

Oproti iným typom markérov majú DNA markéry tú výhodu, že pre konkrétny účel možno vybrať konkrétny markér, ktorého vlastnosti sa preň najlepšie hodia. Rôzne molekuly DNA a ich rôzne segmenty sa odlišujú spôsobom dedičnosti (biparentálna, maternálna, paternálna), mierou polymorfizmu, ktorá sa odvíja od rýchlosti mutácií, adaptívnym významom a pod. Kombináciou horeuvedených základných postupov analýzy DNA možno vybrať markér alebo skupinu markérov, optimálne slúžiacich k definovanému účelu.

Ako bolo spomenuté, len malú časť DNA eukaryotov tvoria sekvencie, zodpovedajúce funkčným génom, teda kódujúce nejaký funkčný produkt (polypeptid, tRNA, rRNA, snRNA). Značnú časť genómu predstavujú nekódujúce sekvencie, ktoré spravidla vykazujú väčšiu premenlivosť. Ich funkcia nie je objasnená, môžu sa podieľať na regulácii génovej aktivity či stabilizácii štruktúry chromozómu. Je však možné, že viaceré takéto sekvencie žiadnu funkciu nemajú a predstavujú len balast evolúcie. Mutácie, ktoré sa v nich hromadia, neovplyvňujú životaschopnosť jedincov a nie sú z populácií vylučované prirodzeným výberom. K nekódujúcim sekvenciám patria predovšetkým intróny a spacers, čo sú úseky oddeľujúce gény. Ďalšiu skupinu tvoria tzv. pseudogény, teda gény, ktoré v dôsledku mutácie v regulačnej oblasti stratili schopnosť expzie. Veľkú časť DNA tvoria repetitívne (opakujúce sa) sekvencie. K nim patria tandemové opakovania dlhších úsekov cca 20 báz (VNTR – variable number of tandem repeats; minisatelity), ktoré sa vyskytujú predovšetkým v oblasti centroméry a telomér. Vykazujú vysokú variabilitu a dajú sa veľmi výhodne využiť pre identifikáciu jedincov (napr. sú využívané pre súdnolekárske účely na identifikáciu jedincov). Druhú skupinu tvoria tzv. mikrosatelity (SSR – simple sequence repeats), t.j. tandemové opakovania krátkeho motívu cca. 1–6 báz, ktoré sa vyskytujú nielen v jadrovej, ale aj v mitochondriálnej a chloroplastovej DNA. Jednotlivé “alely” sa u týchto markérov odlišujú počtom opakovaní motívu, a tiež vykazujú veľkú variabilitu (nezriedka 15–30 alel v populácii), takže je možné ich využiť najmä pre sledovanie toku génov a systému párenia. Ich nevýhodou sú vysoké iníciačné náklady pre konštrukciu týchto markérov (identifikáciu okrajových sekvencií pre definovanie primerov).

Pre štúdie vyžadujúce veľký súbor analyzovaných génov dobre pokrývajúci celý jadrový genóm bol vyvinutý typ markérov označovaný RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) založený na PCR technológii, založený na použití krátkych náhodných primerov. Polymorfizmus (teda rozdiely medzi jedincami) pri RAPD vyplýva buď z rozsiahlejších posunových mutácií (insercií/delécií) medzi dvomi komplementárnymi miestami pre primer alebo v mutácii v komplementárnom mieste, ktorá spôsobí, že primer nie je schopný spárovať sa s templátovým reťazcom a teda namiesto dvoch krátkych reťazcov vznikne jeden dlhší. RAPD sú dominantné markéry, na základe prítomnosti konkrétneho fragmentu sa nedá určiť, či sa nachádza na oboch homologických chromozómoch (homozygot) alebo len na jednom (heterozygot). Ďalšou nevýhodou RAPD je slabá reprodukovateľnosť, metodika používaná v

jednom laboratóriu sa nedá spoľahlivo zopakovať v inom.

Ako zdokonalenie RAPD bola vyvinutá metóda AFLP (*amplified fragment length polymorphism* – polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov), ktorá takisto umožňuje mapovať variabilitu veľkého počtu lokusov dobre reprezentujúcich celý jadrový genóm. Je založená na kombinácii restriktívnej analýzy a PCR amplifikácie: templátová DNA sa štiepi na fragmenty dvojicou endonukleáz vytvárajúcich previs, následne sa pomocou DNA ligázy na jeden aj druhý koniec týchto fragmentov pripoja adaptéry, teda krátke oligonukleotidy so známou sekvenciou a komplementárnym previsom, a fragmenty sa namnožia PCR (sekvencie primerov = sekvencie adaptérov + previs). AFLP sú takisto dominantné markéry, ale technika je vysoko reprodukovateľná.

V prípade, ak sa ktorýkoľvek RAPD či AFLP fragment pri štúdiu ukáže ako zaujímavý (napr. jeho výskyt vykazuje koreláciu s faktormi prostredia alebo s dôležitým fenotypovým znakom a pod.), je možné ho z gélu izolovať a sekvenovať, teda určiť poradie nukleotidov v ňom, na základe sekvencie zadefinovať primery špecifické pre tento fragment a následne študovať len variabilitu tohoto konkrétneho úseku DNA. Tento typ markéra sa označuje ako SCAR (*sequence-characterized amplified region*), a je kodominantný.

Pre niektoré účely (predovšetkým pre rekonštrukciu migrácie a kolonizácie, sledovanie toku génov a pod.) sa s výhodou používajú fragmenty mimojadrovej, t.j. chloroplastovej a mitochondriálnej DNA, ktorá má uniparentálnu dedičnosť (spravidla po matke, výnimočne po otcovi, napr. cpDNA v čeľadi Pinaceae). Molekuly organelárnej DNA sa nerekombinujú, haplotyp sa zásadne dedí ako celok. Sekvencie v mtDNA a cpDNA sú spravidla vysoko konzervatívne, teda identické aj pri taxonomicky veľmi rozdielnych organizmoch. Keďže organelárny genóm je neporovnateľne menší v porovnaní s jadrovým, pri analýze organelárnej DNA možno kombinovať PCR a RFLP analýzu: použitím špecifických primerov sa amplifikuje príslušný úsek cpDNA alebo mtDNA, a pokiaľ nevykazuje premenlivosť (t.j. u rôznych organizmov má rovnakú dĺžku), možno polymorfizmus v jeho rámci hľadať jeho štiepením restriktívnou endonukleázou.

Separácia fragmentov DNA gélovou elektroforézou je založená na ich rozdielnej veľkosti, nie je teda schopná identifikovať bodové mutácie, pri ktorých sa nemení veľkosť fragmentu, ale len konkrétna báza v jeho rámci. Jednotlivé alely (najmä alely funkčných génov, teda úsekov DNA exprimovaných do RNA alebo do bielkoviny) sa však často odlišujú práve bodovými mutáciami. Pre identifikáciu takýchto polymorfizmov jednotlivých nukleotidov (SNP; *single nucleotide polymorphism*) sa dajú použiť viaceré metódy, pomerne jednoduchou a lacnou možnosťou sú polymorfizmy konformácie jednoreťazcovej DNA (SSCP; *single-strand conformation polymorphisms*). Táto metóda využíva skutočnosť, že jednoreťazcové molekuly nukleových kyselín majú veľmi silnú tendenciu k párovaniu komplementárných báz. Jednoreťazcová molekula nezostáva v lineárnej forme, ale poprehýba sa a vytvorí trojrozmerný útvar stabilizovaný vodíkovými väzbami medzi nukleotidmi v rámci rovnakého reťazca. Jej trojrozmerný tvar je teda závislý na sekvencii báz, stačí aj jedna zámena bázy na to, aby výsledný tvar bol odlišný. Rýchlosť pohybu takýchto molekúl pri elektroforéze je od tvaru závislá (čím bližšie ku guľovitému tvaru, tým je pohyblivosť vyššia). Pri SSCP sa konkrétny úsek DNA namnoží PCR, fragmenty sa denaturujú (teda rozdelia na dvojice jednoreťazcových molekúl) vysokou teplotou a formaldehydom, a následne za normálnych nedenaturujúcich podmienok separujú elektroforézou. Počas migrácie jednoreťazcové molekuly zaujmú trojrozmernú konformáciu, ktorá ovplyvňuje ich mobilitu v géle.

Často je dôležité poznať priamo sekvenciu báz v konkrétnom úseku DNA. Pre sekvenovanie (teda určenie poradia báz) sa dnes najčastejšie využívajú postupy založené na PCR, predovšetkým Sangerova metóda ukončovania reťazca dideoxynukleotidmi (*chain-termination method*). Sekvenovanie využíva skutočnosť, že pri replikácii DNA (t.j. aj pri PCR) DNA-polymeráza pracuje vždy smerom 5'→3', teda voľné nukleotidy vždy pripája na –OH sku-

pinu na 3' uhlíku deoxyribózy posledného nukleotidu. Ak teda reakčná zmes pre PCR obsahuje aj 2'3'-dideoxynukleotidy, po ich zaradení sa ďalšie predlžovanie reťazca zastaví. Keďže DNA-polymeráza „siahla“ po jednotlivých nukleotidoch náhodne, je dielom náhody, v ktorom štádiu siahne po 2'-deoxynukleotide (ktorý umožní ďalšie predlžovanie reťazca) a kedy po 2'3'-dideoxynukleotide (ktorý predlžovanie zastaví). Pri vhodnej koncentrácii dideoxynukleotidov sa teda budú vytvárať reťazce rozličných dĺžok, ktoré sú vždy ukončené dideoxynukleotidom. Klasický Sangerov postup využíval rádioaktívne značené dideoxynukleotidy alebo značené primery, vyžaduje teda 4 PCR (každú s pridaním iného dideoxynukleotidu), po ktorých boli fragmenty separované a identifikované autorádiograficky. V súčasnosti sa využívajú automatické prístroje (DNA-sekvenátory), ktoré pracujú na mierne odlišnom princípe. Dideoxynukleotidy sú značené každý iným farbivom, ktoré je vybudzované laserovým lúčom. PCR sa teda robí naraz (reakčná zmes obsahuje všetky 4 typy rôzne farebne značených dideoxynukleotidov), fragmenty sú následne separované elektroforézou (staršie sekvenátory používali ploché gély, v moderných prístrojoch je elektroforéza robená v kapilárach) a identita dideoxynukleotidu, ktorý ukončuje každý fragment, je identifikovaná na základe farebného signálu.

Pre potreby sekvenovania celých genómov alebo ich rozsiahlych častí je sekvenovanie Sangerovou metódou príliš pomalé, drahé a pracovne náročné. Preto sa objavili metódy druhej generácie (*next-generation sequencing*; NGS), ktoré umožňujú v jednom behu analýzy paralelne sekvenovať rádovo milióny až stá milióny krátkych úsekov, ktoré sa následne zostavili do súvislej sekvencie (*alignment*), aj keď chybovosť týchto postupov je zákonite vyššia v porovnaní so Sangerovou metódou. Jedným z možných postupov NGS je sekvenovanie syntézou, napríklad tzv. pyrosekvenovanie (*pyrosequencing*), ktoré je založené na detekcii aktivity DNA-polymerázy chemoluminiscenciou. Zaradenie konkrétnej bázy je identifikované na základe uvoľneného pyrofosfátu, slúžiaceho ako zdroj energie pre luminiscenčnú reakciu, vyvolávajúcu svetelný záblesk detekovaný CCD kamerou. Ďalším postupom je sekvenovanie syntézou využívajúce reverzibilné terminátory reťazca (napr. technológia Illumina). Reakčná zmes obsahuje dNTP s naviazaným fluorescenčne značeným terminátorom blokujúcim ďalšie predlžovanie reťazca. Po zabudovaní takéhoto nukleotidu sa zaznamená jeho fluorescenčný signál a následne je terminátor odbúraný, čo umožní predĺženie reťazca zabudovaním ďalšieho nukleotidu. Všetky spomínané metódy vyžadujú zastavenie reakcie po zabudovaní nukleotidu, výmenu reaktantov a prípadnú deaktiváciu nadbytočných fluorescenčných značiek. Ide o metódy, ktoré sú v porovnaní so Sangerovou metódou podstatne rýchlejšie a v prepočte na 1 bázu aj podstatne lacnejšie. Umožňujú sekvenovať veľké množstvo DNA, dokonca aj celé genómy vyšších organizmov.

V súčasnosti sú vyvíjané metódy tretej generácie, ktoré na určovanie poradia báz využívajú jednotlivé molekuly DNA bez nutnosti zastavenia procesu medzi jednotlivými krokmi detekcie. Patria sem metódy sekvenovania pomocou nanopórov, využívajúce prechod fragmentov DNA cez nanopóry membrán a poradie báz detekujú na základe ich vplyvu na elektrické pole, priame zobrazovanie pomocou pokročilých mikroskopických techník (elektrónová mikroskopia, skenovacia tunelová mikroskopia) a ďalšie techniky, ktoré by v budúcnosti mohli podstatne rozšíriť možnosti analýzy genómov.

Dodnes boli kompletne sekvenované genómy veľkého počtu druhov. Pochopiteľne, sekvenovanie postupovalo od malých genómov smerom k veľkým: prvým bol v r. 1977 genóm bakteriofága Φ-X174 (5,386 bp), prvý prokaryotický genóm (teda genóm živého organizmu *sensu stricto*) bol genóm baktérie *Haemophilus influenzae* (1995; 1,83 Mbp), prvý sekvenovaný eukaryotický genóm patrila kvasinke *Saccharomyces cerevisiae* (1996; 12,1 Mbp), sekvenovanie genómu človeka bolo ukončené v r. 2006 (3,2 Gbp). Počty kompletne sekvenovaných genómov sa v súčasnosti počítajú na tisíce (aj keď väčšinou ide o vírusy a prokaryoty, teda baktérie a archeobaktérie) a koncentrujú sa najmä na modelové organizmy (z

rastlín *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa*, *Oryza sativa*, zo živočíchov *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*). Sekvenovanie však postupuje aj k obrovským genómom (*Picea abies* 19,6 Gbp; 2013).

Údaje získané sekvenovaním sú ukladané v databázach. V súčasnosti najznámejšia a najpoužívanejšia je databáza GenBank (nemýliť si s génovými bankami, kap. *Genetické zdroje*), ktorá spája databázy troch najväčších laboratórií, zaoberajúcich sa touto problematikou: European Laboratory of Molecular Biology (EMBL), National Center for Biotechnology Information (súčasť National Institute of Health, NIH, USA) a DNA DataBank of Japan (DDBJ). Prenos údajov medzi týmito tromi databázami sa deje denne. Údaje v GenBank sú verejne prístupné. Pri sekvenovaní ktoréhokoľvek úseku DNA je možnosť hľadať homologické sekvencie v GenBank pomocou nástroja BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), ktorý umožňuje identifikovať sekvencie v referenčných genómoch s maximálnou zhodou (pod referenčným genómom sa rozumie sekvencia uznaná ako reprezentatívny súbor génov konkrétneho modelového druhu; nepredstavuje genóm konkrétneho jedinca, ale mozaiku úsekov od viacerých donorov). Mnohé sekvencie v GenBank sú anotované, teda je im priradená biologická informácia. Anotácia genómu spočíva v troch krokoch: identifikácii nekódujúcich úsekov, identifikácia kódujúcich častí (génov) a priradenie biologickej funkcie týmto úsekom. Čiastočne je možné využitím nástrojov bioinformatiky vykonávať ju automatizovane (využitím BLAST na hľadanie podoností v známych genómoch), ale prípadné rozpory je možné redigovať v databázach manuálne. Anotácia zahŕňa dva prvky: štrukturálnu anotáciu (identifikácia a lokalizácia exónov, popis štruktúry génu, identifikácia a lokalizácia regulačných oblastí génu) a funkčnú anotáciu (určenie biochemickej a následne biologickej funkcie génu, identifikácia interakcií s inými génmi a mechanizmu regulácie génovej aktivity). Pochopiteľne, identifikácia homológie sledovanej sekvencie v skúmanom organizme s anotovanou sekvenciou v referenčnom genóme nie je zárukou, že produkovaný proteín vykonáva v skúmanom druhu rovnakú funkciu a ovplyvňuje rovnaké fenotypové znaky ako homologický proteín referenčného modelového druhu. Databáza je dostupná cez <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

Genetická multiplicita

Najjednoduchšou mierou genetickej multiplicity je celkový počet alel, resp. priemerný počet alel pripadajúci na 1 lokus (n_a). Pokiaľ je populácia v danom gène monomorfná (t.j. nie je v ňom pozorovateľná variabilita) počet alel (aj počet genotypov) nadobúda minimálnu hodnotu, teda $n_a = 1$, pri polymorfných lokusoch je počet pozorovaných alel (a následne aj počet pozorovaných genotypových kombinácií) vyšší. Problémom takéhoto hodnotenia je, že výberová vzorka nemusí zachytiť všetky typy, ktoré sa v populácii vyskytujú. Šanca, že konkrétna alela bude zastúpená vo výberovej vzorke, je tým menšia, čím je alela zriedkavejšia, t.j. čím nižšia je jej frekvencia. Nie je teda možné priamo porovnávať počty alel medzi vzorkami, ktoré majú podstatne rozdielny rozsah. Keďže analogický problém je v ekológii pri hodnotení druhovej bohatosti spoločenstiev, bol vyvinutý prepočet počtu zachytených typov na rovnaký rozsah výberu, ktorý bol následne adaptovaný pre hodnotenie alelickej bohatosti populácie (Petit et al. 1998):

$$A[g] = \sum_i \left\{ 1 - \left[\frac{\binom{N - n_i}{g}}{\binom{N}{g}} \right] \right\} = \sum_i \left(1 - \prod_{k=0}^{g-1} \frac{N - n_i - k}{N - k} \right)$$

kde $A[g]$ je počet alel, ktoré možno očakávať v súbore g génov (t.j. $g/2$ diploidných jedincov), ak n_i je počet zachytených výskytov i . alely v celkovej vzorke $N = \sum_i n_i$ ($g < N$). Ako spoločný rozsah výberu pre všetky vzorky, na ktorý sa prepočet vykonáva (g) sa spravidla volí veľkosť najmenšej populačnej vzorky.

Genetická diverzita a genotypová štruktúra

Pod genetickou diverzitou rozumieme rôznorodosť zastúpenia genetických typov. Každá miera diverzity má dva komponenty, reflektuje bohatosť (angl. *richness*) aj vyrovnanosť (angl. *evenness*) zastúpenia typov. Existuje veľké množstvo rôznych indexov diverzity. Z praktického hľadiska sa javia ako optimálne tie, ktoré sú vyjadrované analogickým spôsobom ako multiplicita, teda počtom typov. Z indexov používaných v ekológii má túto vlastnosť skupina tzv. Hillových indexov, ktoré sa dajú odvodiť zo spoločného vzorca

$$v_a = \left(\sum_{i=1}^A p_i^a \right)^{1/(1-a)}$$

kde p_i je frekvencia i . typu (v prípade genetickej diverzity i . alely) a A je celkový počet nájdených typov (napr. alel). Hillov vzorec je univerzálny v tom, že má matematicky definovateľný vzťah prakticky ku všetkým indexom diverzity bežne používaným v synekológii či populačnej genetike. Veľkosť koeficienta a určuje dôraz indexu na jednotlivé komponenty diverzity: pri nízkej hodnote a index kladie dôraz na bohatosť, pri vysokej na vyrovnanosť. Ako optimálna hodnota sa javí $a = 2$. Index v_2 sa označuje aj ako efektívny počet alel:

$$n_e = 1 / \sum_i p_i^2$$

Alelická diverzita sa odráža v genotypovej štruktúre, predovšetkým v heterozygotnosti, t.j. podiele heterozygotných genotypov v populácii. Heterozygotnosť predstavuje vlastne mieru variability v rámci genotypov jedincov (teda najnižšiu možnú úroveň genetickej variability). Aktuálny podiel heterozygotov sa označuje ako pozorovaná heterozygotnosť a dá sa jednoducho odhadnúť na základe genotypových frekvencií:

$$H_O = \sum_{i < j} N(A_i A_j) / N = \sum_{i < j} P(A_i A_j) = \sum_{i < j} P_{ij}$$

teda ako podiel počtu heterozygotov ($N(A_i A_j)$, $i < j$) z celkového počtu analyzovaných genotypov (N) resp. ako suma frekvencií heterozygotov (P_{ij}).

Skutočný podiel heterozygotov môže byť odlišný od podielu, očakávaného pri ideálnej panmixii. Ako už bolo spomenuté v kapitole *Genetika populácií*, pri panmiktickej rovnováhe je alelická aj genotypová štruktúra populácie konštantná, nemení sa z generácie na generáciu, preto sa panmixia zvykne využívať ako referenčný stav, štandard, voči ktorému sa porovnáva štruktúra či správanie reálnej populácie. Zastúpenie jednotlivých genotypov v rovnovážnej populácii možno odvodiť z alelických frekvencií na základe Hardy-Weinbergovho zákona: $P'_{ii} = p_i^2$, $P'_{ij} = 2p_i p_j$, $i \neq j$ (P'_{ij} je očakávaná frekvencia genotypu $A_i A_j$). Rovnovážna, očakávaná heterozygotnosť je vlastne súčet očakávaných frekvencií všetkých heterozygotných genotypov: $H_E = \sum_{i < j} P'_{ij}$. Z praktického hľadiska je ovšem jednoduchšie vypočítať ju ako:

$$H_E = 1 - \sum_i p_i^2$$

keďže očakávaná frekvencia homozygotného genotypu je štvorcem frekvencie príslušnej alely. Tento vzorec však pri malých výberových vzorkách poskytuje vychýlený (podhodnotený) odhad očakávanej heterozygotnosti populácie, takže sa používa v upravenom tvare:

$$H_E = (1 - \sum_i p_i^2) \cdot 2N / (2N - 1)$$

Pozorovaná heterozygotnosť teda popisuje skutočný stav, je charakteristikou genotypovej štruktúry existujúcej populácie. Očakávaná heterozygotnosť naopak kvantifikuje potenciál populácie pre tvorbu heterozygotov v ďalšej generácii za predpokladu panmixie, je charakteristikou alelickej štruktúry existujúcej populácie a odráža genetickú diverzitu. Diverzita závisí nielen od počtu alel v danom géne, ale aj od ich frekvencií – čím viac alel sa v populácii vyskytuje, a čím rovnomernejšie sú zastúpené, tým je genetická rôznorodosť populácie vyššia. Efektívny počet alel kvantifikuje, koľkým rovnomerne zastúpeným alelám zodpovedá skutočný počet alel, ktoré sa v populácii vyskytujú. Medzi efektívnym počtom alel a očakávanou heterozygotnosťou existuje matematický aj logický vzťah – čím viac alel sa v populácii

cii efektívne nachádza (t.j. v číom väčšom počte a čím rovnomernejšie sú zastúpené), tým vyšší bude počet ich kombinácií v gamétach a tým väčší je potenciál pre tvorbu heterozygotných (vo všeobecnosti vitálnejších) genotypov.

Mieru odchýlky genotypovej štruktúry populácie od panmiktickej (Hardy-Weinbergovskej) rovnováhy kvantifikuje index fixácie:

$$F = 1 - H_O/H_E$$

Pokiaľ je v populácii deficit heterozygotov oproti rovnovážnemu stavu (napr. v dôsledku príbuzenského kríženia), je index fixácie kladný ($F > 0$), pri nadbytku heterozygotov (napr. po selekcii v prospech heterozygotov) je naopak záporný ($F < 0$).

Genetická diferenciácia

Pre posudzovanie rozdielov alelickej štruktúry medzi dvoma populáciami slúžia genetické vzdialenosti. Existuje celý rad mier genetickej podobnosti či nepodobnosti, najčastejšie sa používa genetická vzdialenosť podľa Neia:

$$D = -\ln\left(J_{xy} / \sqrt{J_x J_y}\right)$$

kde: $J_x = \sum_i p_{xi}^2$ (očakávaná homozygotnosť v populácii x)

$$J_y = \sum_i p_{yi}^2 \text{ (očakávaná homozygotnosť v populácii } y \text{)}$$

$$J_{xy} = \sum_i p_{xi} p_{yi}$$

(p_{xi} a p_{yi} sú alelické frekvencie i . alely v populáciách x a y). Podobne ako pri heterozygotnosti, pre získanie nestranného odhadu genetickej vzdialenosti je potrebné zohľadniť rozsah výberu:

$$J_x = \sum_i p_{xi}^2 \cdot 2N_x / (2N_x - 1)$$

$$J_y = \sum_i p_{yi}^2 \cdot 2N_y / (2N_y - 1).$$

Ďalší z často používaných indexov nepodobnosti genetickej štruktúry, genetická vzdialenosť podľa Gregoria, je jednoducho sumou absolútnych hodnôt rozdielov vo frekvenciách jednotlivých alel medzi populáciami.

$$d_0 = \frac{1}{2} \sum_i |p_{xi} - p_{yi}|$$

Koncept genetickej vzdialenosti v princípe možno aplikovať aj na úroveň jedinca, keďže aj v tomto prípade sa dajú kvantifikovať alelické „frekvencie“: u homozygota $A_i A_i$ je frekvencia A_i rovná 100%, u heterozygota $A_i A_j$ 50%, vo všetkých ostatných prípadoch 0%. V mnohých prípadoch, najmä pri použití dominantných alebo uniparentálnych DNA markerov, však nie sme schopní identifikovať genotypy a DNA profil poskytuje len súbor fragmentov, ktoré u konkrétneho jedinca môžu byť prítomné alebo neprítomné (RAPD, AFLP, cyDNA RFLP profily a pod.). Na kvantifikáciu rozdielov medzi jedincami sa tu dá využiť Tanimotov index:

$$D_T = 1 - \frac{N(x \wedge y)}{N(x \vee y)}$$

kde $N(x \wedge y)$ je počet fragmentov, ktoré sa vyskytujú súčasne u jedincov x aj y , a $N(x \vee y)$ je počet fragmentov, ktoré sa vyskytujú aspoň u jedného z jedincov x a y .

Genetická vzdialenosť sa vždy vzťahuje na dvojicu populácií. Predmetom genetického screeningu však spravidla bývajú rozsiahle súbory rádovo desiatok, niekedy stoviek populácií. V mnohých prípadoch nás zaujíma diferenciácia konkrétnej populácie oproti ostatným ako celku, resp. rozdiely v miere diferenciácie v rôznych súboroch populácií ako celkoch. Pre kvantifikáciu diferenciácie konkrétnej k . populácie oproti komplementu (teda zostávajúcim populáciám v súbore) možno použiť charakteristiku:

$$D_k = \frac{1}{2} \sum_i |p_{ik} - \bar{p}_{ik}|$$

kde $\bar{p}_{ik}$ je priemer frekvencií i . alely vo všetkých ostatných populáciách v súbore okrem k .

vážený veľkosťou populácií (resp. veľkosťou výberových vzoriek).

Miera diferenciácie v rámci celého súboru sa potom dá odvodiť ako priemer diferenciácií D_k cez všetky subpopulácie, opäť vážený veľkosťou subpopulácií:

$$\delta = \sum_k c_k D_k$$

kde c_k je relatívna veľkosť k . subpopulácie (podiel počtu jedincov patriacich ku k . subpopulácii zo všetkých analyzovaných jedincov).

Častejšie používanou mierou diferenciácie v rámci súboru populácií je Wrightova F -štatistika. V najjednoduchšom prípade sa pre bialelický lokus dá vyjadriť ako:

$$F_{ST} = \sigma_p^2 / [p_T(1 - p_T)]$$

kde σ_p^2 je variancia alel (v prípade bialelického lokusu je logicky rovnaká pre obe alely, keďže frekvencia jednej je doplnkom do 1 k frekvencii druhej) medzi subpopuláciami a p_T je priemerná frekvencia alely v celom súbore (z čoho vyplýva, že $p_T(1 - p_T)$ je variancia frekvencie alely v celom súbore). Analýza variance umožňuje rozšíriť túto štatistiku aj na prípad viac než dvoch alel a väčšieho počtu lokusov.

Ako technicky jednoduchšia náhrada F_{ST} sa dá použiť štatistika G_{ST} , ktorú možno odvodiť z očakávaných heterozygotností:

$$G_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

kde H_T je očakávaná heterozygotnosť celého súboru, vypočítaná na základe priemerných alelických frekvencií, a H_S je priemer očakávaných heterozygotností jednotlivých subpopulácií.

F_{ST} aj G_{ST} berú jednotlivé alely sledovaných génov ako kvalitatívne stavy, ktoré sú navzájom rozdielne v rovnakej miere (t.j. rozdiel medzi alelou A_1 a A_2 je rovnaký ako medzi A_1 a A_5). V konkrétnych prípadoch je pri kvantifikácii diferenciácie potrebné zohľadniť aj rozdiely medzi alelami. Pokiaľ interpretujeme diferenciáciu medzi populáciami ako výsledok evolučného procesu, teda jednotlivých mechanizmov, ktoré vedú k zmenám v zastúpení génov v populáciách (selekcia, drift, migrácia), je potrebné zohľadniť skutočnosť, že na prechod stavu konkrétneho génu medzi jednotlivými alelickými stavmi môže byť potrebný rozdielny počet mutačných krokov. Rozdiely v počte alebo kvalite v sekvenciách nukleotidov v DNA alebo v sekvenciách aminokyselín ich proteínových produktov, pokiaľ sú známe, možno použiť pri kvantifikácii diferenciácie:

$$N_{ST} = \sum_i \sum_j \pi_{ij} \text{cov}(p_i p_j) / \sum_i \sum_j \pi_{ij} p_{Ti} p_{Tj}$$

kde $\text{cov}(p_i p_j)$ je kovariancia frekvencií i . a j . alely cez všetky populácie, π_{ij} je miera rozdielu medzi i . a j . alelou (počet rozdielnych nukleotidov alebo aminokyselín, počet mutačných krokov (substitúcií, insercií/delécií) potrebný na prechod medzi i . a j . alelou a pod.), a p_{Ti} resp. p_{Tj} sú priemerné frekvencie i . a j . alely v celom súbore populácií.

PREMENLIVOSŤ A JEJ KOMPONENTY

Premenlivosť a jej meranie

Ako je uvedené v úvodných kapitolách, premenlivosť spočíva na najnižšej (individuálnej) úrovni vo vzájomnej odlišnosti jedincov v individuálnych znakoch a vlastnostiach, a patrí k základným charakteristikám živej hmoty. Fenotyp jedinca je výsledkom realizácie jeho genotypu (súboru dedičných vlôh) v konkrétnych podmienkach prostredia. Fenotypová premenlivosť má teda dve zložky – premenlivosť podmienenú geneticky (vyplývajúcu z odlišnosti genotypov u rôznych jedincov) a premenlivosť podmienenú prostredím (vyplývajúcu z variability podmienok prostredia, v ktorých sa rôzne jedince vyskytujú).

Mendelove zákony popisujú dedičný prenos diskretných kvalitatívnych znakov. Jedinec má kvety biele alebo fialové, semená hladké alebo zvráskavené, internódiá dlhé alebo krátke atď. Pri tomto hodnotení sú hodnoty znaku rozdelené do diskretných tried a hoci variabilita v rámci triedy je zanedbaná, neznamená to, že neexistuje. Označenie internódií ako „dlhé“ neznamená, že sú všetky presne rovnako dlhé. Aj u znakov, ktoré na prvý pohľad vyzerajú

ako typicky kvalitatívne, existuje možnosť hodnotiť ich kvantitatívne – pri farbe kvetu by bolo možné merať priemernú sýtosť fialového zafarbenia analýzou obrazu, alebo merať množstvo kvetného pigmentu. Rozdiely v rámci tried sú aj u takýchto znakov podmienené variabilitou podmienok prostredia, ktorým sú vystavené. Pri znakoch s jednoduchou monogénnou dedičnou kontrolou však tieto rozdiely nestierajú hranice fenotypových tried, tieto hranice zostávajú jasne identifikovateľné. V prípade polygénnej kontroly znaku, alebo ak je znak vo výraznej miere ovplyvnený prostredím, sa však hranice fenotypových tried stierajú a znak nadobúda kontinuálne rozdelenie.

Určenie fenotypu dedičnými vlohami a prostredím samozrejme nie je deterministický proces. Najmä v prípade polygénnych znakov ide o kaskádu biochemických a fyziologických procesov, z ktorých každý je riadený iným génom. Regulácia aktivity týchto génov môže závisieť od stimulov z prostredia a zmena aktivity jedného z nich môže „prepnúť“ celú kaskádu na alternatívnu dráhu. Jeden a ten istý genotyp teda môže byť schopný exprimovať sa do viacerých výrazne odlišných fenotypov v závislosti na prostredí. Tento jav sa označuje ako fenotypová plasticita. Klasickým prípadom jej prejavu v morfológii je tvar listov u vodných druhov iskerníkov (podrod *Batrachium*), kde ponorené listy sú niťovité, zatiaľ čo plávajúce listy sú dľaňovito laločnaté. Fenotypová plasticita sa však môže prejavovať aj v rastových, fyziologických, biochemických a ďalších znakoch, a v prípade dlhožijúcich organizmov môže byť jednou zo stratégií, ako sa vyrovnávať s kolísaním prostredia počas ontogenézy.

Na popis priemerných fenotypových hodnôt a fenotypovej premenlivosti sa používajú bežné štatistické charakteristiky. Vzhľadom na to, že pri praktickom hodnotení premenlivosti fenotypových znakov pracujeme takmer výlučne s výberovými súbormi, sú uvedené vzorce pre bodový nestranný odhad jednotlivých charakteristík a interval spoľahlivosti pre aritmetický priemer.

Aritmetický priemer: $\bar{x} = \sum_i x_i / n$

Rozptyl (variancia): $s_x^2 = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} = \left(\frac{\sum_i x_i^2}{n} - \bar{x}^2 \right) \cdot \frac{n}{n - 1}$

Smerodajná odchýlka: $s_x = \sqrt{s_x^2}$

Variačný koeficient: $s_{x\%} = 100\% \cdot s_x / \bar{x}$

Stredná chyba priemeru: $s_{\bar{x}} = s_x / \sqrt{n}$

95% interval spoľahlivosti: $95\% IS = \bar{x} \pm t_{0,05} \cdot s_{\bar{x}}$

(x_i je fenotypová hodnota i . jedinca, n rozsah výberu, $t_{0,05}$ kritická hodnota Studentovho t rozdelenia pre $\alpha=0,05$ a $n - 1$ stupňov voľnosti).

Zložky fenotypovej premenlivosti

Miera a charakter premenlivosti fenotypového znaku, rozdelenie početnosti podľa fenotypových tried, závisia nielen na počte génov, ktoré daný znak kontrolujú, a ich alelických frekvencií, ale aj na interakciách medzi alelami v rámci génu (dominancia, superdominancia) resp. interakciách medzi génmi (epistáza). Geneticky podmienenú premenlivosť znaku teda možno rozdeliť na zložku aditívnu, dominančnú a epistatickú. Aditívny komponent je základnou zložkou premenlivosti, je podmienený aditívnym účinkom alel, ktoré sa podieľajú na kontrole znaku. Predpokladá lineárny vzťah (priamu úmeru) medzi fenotypovou hodnotou jedinca a počtom alel zvyšujúcich hodnotu znaku v jeho genotype:

$$P_{Aa} = \frac{1}{2}(P_{AA} + P_{aa})$$

Komponent dominančný predstavuje sumu odchýliek od tohoto lineárneho vzťahu, ktoré sú podmienené úplnou resp. neúplnou dominanciou či superdominanciou

$$P_{Aa} > \frac{1}{2}(P_{AA} + P_{aa})$$

Epistatická zložka predstavuje sumu odchýliek od tohoto lineárneho vzťahu, ktoré sú podmienené epistázou, t.j. nadradenosťou jedného génu inému (napr. ak gén B je epistaticky nadradený génu A , potom $P_{_B} > P_{A_{bb}} > P_{aabb}$).

Premenlivosť podmienená prostredím môže byť modifikačná (spôsobená trvalými modifikujúcimi vplyvmi prostredia na fenotypový znak) a fluktučná (spôsobená náhodnou variabilitou prostredia).

Hodnotenie zložiek premenlivosti vždy vychádza z experimentu. Ak sledujeme unikátne genotypy v ich pôvodnom prostredí, nie je možné z ich fenotypových prejavov odvodiť, nakoľko sa na fenotype podieľa dedičnosť a nakoľko prostredie. Hodnotenie vychádza z rôznych typov biologických pokusov (presadzovacie pokusy, testy potomstiev), v ktorých sú príbuzné a teda geneticky podobné skupiny jedincov (klony, plnosesterské či polosesterské potomstvá, populácie) opakovane testované v rôznych prostrediach (testovacie plochy, chovné podmienky). Najjednoduchší model, z ktorého genetika kvantitatívnych znakov vychádza, je lineárny aditívny vzťah medzi fenotypovou hodnotou, vplyvom genotypu a vplyvom prostredia:

$$P_{ij} = G_i + E_j + \varepsilon_{ij}$$

t.j. fenotypová hodnota konkrétneho znaku (napr. výšky, dátumu rašenia, uhla vetvenia, obsahu chlorofylu a pod.) i . jedinca v j . prostredí (P_{ij}) je daná genotypovou hodnotou (príspevkom i . genotypu k veľkosti fenotypového znaku; G_i), odchýlkou od tejto hodnoty, ktorá je vyvolaná j . prostredím, t.j. testovacou plochou (E_j) a reziduálnu zložku ε_{ij} spôsobenú variabilitou mikrostanišťa v rámci testovacej plochy. Inými slovami, podľa tohoto modelu genotyp prispieva ku fenotypovej hodnote daného znaku nezávisle na prostredí, t.j. vo všetkých prostrediach rovnako, a naopak, konkrétne prostredie vyvolá pri všetkých genotypoch rovnakú reakciu.

V skutočnosti sú mnohé rastlinné či živočíšne populácie špecializované na konkrétne podmienky prostredia, a na prenos do iného prostredia reagujú ináč, než by zodpovedalo všeobecnému trendu. Tento jav sa označuje ako interakcia genotypu a prostredia ($G \times E$ interakcia), takže uvedený model by mal byť rozšírený na

$$P_{ij} = G_i + E_j + GE_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

kde GE_{ij} je odchýlka vyvolaná špecifickou reakciou i . genotypu v j . prostredí. $G \times E$ interakcia však vnáša do modelu komplikácie ako z hľadiska matematického, tak aj z hľadiska interpretácie a aplikácie výsledkov šľachtiteľských experimentov, preto sa s ňou často v praxi neuvažuje.

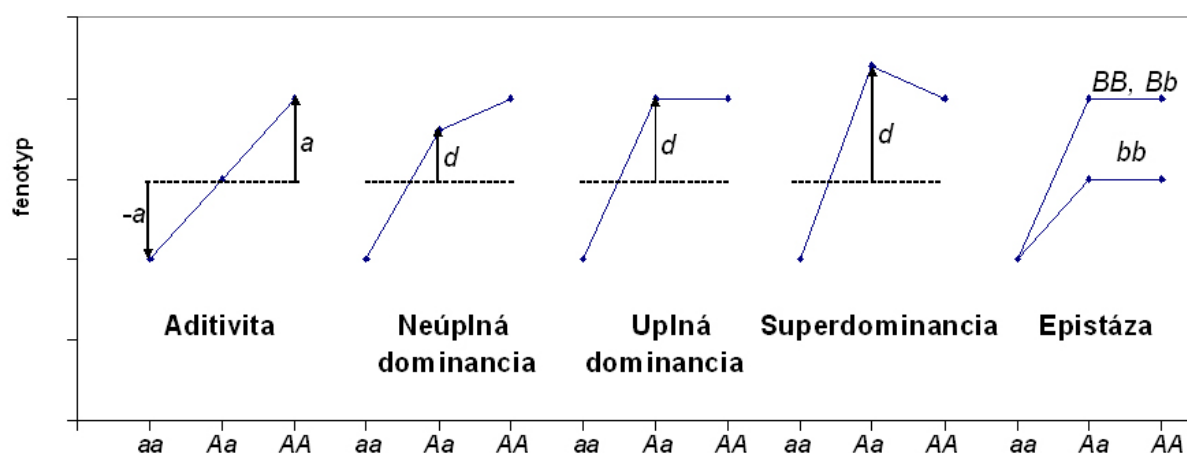
Hodnota i . genotypu G_i má niekoľko komponentov:

$$G_i = A_i + D_i + I_i$$

kde A_i je aditívna zložka (vyplývajúca z aditívneho účinku génov resp. alel, vid' kap. *Mendelove zákony*), D_i je odchýlka od aditivity spôsobená dominanciou a I_i je odchýlka spôsobená medzigénovými interakciami, teda epistázou.

Odvoodenie veľkosti týchto odchýlok a komponentov variancie znaku, ktoré z nich vyplývajú, vyžaduje definovanie fenotypových hodnôt pre jednotlivé genotypy. Za predpokladu, že fenotypová hodnota nie je ovplyvnená prostredím ($E = 0$, t.j. $P = G$), obr. 34 ilustruje aditívne a neaditívne efekty rôznych genotypov na hodnotu fenotypového znaku. Ak prítomnosť alely A zvyšuje fenotypový znak o hodnotu $+a$ a prítomnosť alely a ju v rovnakej miere znižuje, genotypová hodnota homozygota AA bude predstavovať $+a$ genotypová hodnota genotypu aa bude $-a$. Genotypová hodnota heterozygota Aa je d , pričom hodnota d vyjadruje mieru dominancie. Pri aditivite génov (t.j. absencii dominancie) je $d = 0$, t.j. genotypová hodnota heterozygota Aa je presne v strede medzi homozygotmi AA a aa . Genotypová hodnota jedinca (t.j. príspevok jeho genotypu k hodnote fenotypového znaku) teda závisí od len počtu alel A prítomných v genotype, každá alela A zvyšuje fenotypovú hodnotu o $+a$ oproti jedin-

com genotypu aa , účinky alel sa teda jednoducho sčítajú (odtiaľ názov aditivita). V prípade dominance $d \neq 0$, t.j. heterozygot Aa odlišuje od priemeru oboch homozygotov. Ak $d < a$, ide o neúplnú dominanciu, pre $d = a$ (t.j. heterozygot je fenotypovo totožný s homozygotom AA) o úplnú dominanciu, pre $d > a$ (t.j. heterozygot fenotypovo prevyšuje oboch homozygotov) o superdominanciu. Pri epistáze prichádza do úvahy veľké množstvo rôznych medzigénových interakcií, prípad na obr. 34 je len jedným z nich. V tomto prípade, ak gén B je epistaticky nadradený génu A , vplyv génu A na fenotypovú hodnotu sa prejaví len v prípade, ak je jediniec recesívny homozygot bb . Genotypová hodnota jedincov BB a Bb nezávisí od genotypu v géne A . Namiesto štyroch hodnôt fenotypového znaku, ktoré by sa objavili pri nezávislosti génov A a B a úplnej dominancii je teda možné pozorovať len tri (pre skupiny genotypov $aabb$, A_bb , $__B_$).



Obr. 34 Hodnoty fenotypového znaku u jednotlivých genotypov v bialelickom lokuse pri jednotlivých typoch interakcie medzi alelami resp. génmi pri absencii vplyvu prostredia ($E=0$).

Ak stredovú hodnotu medzi obidvoma homozygotmi označíme x' , potom priemernú hodnotu fenotypového znaku v rovnovážnej populácii možno vypočítať z frekvencií a genotypových hodnôt jednotlivých genotypov. Genotypová hodnota homozygota AA bude $x'+a$, homozygota aa bude $x'-a$, a heterozygota Aa bude $x'+d$. V panmiktickej populácii bude teda zastúpenie jednotlivých fenotypov zodpovedať hodnotám podľa tab. 10.

Tab. 10 Hodnoty fenotypového znaku, zodpovedajúce jednotlivým genotypom, a ich zastúpenie v panmiktickej populácii

Genotyp	Frekvencia	Genotypová hodnota	Početnosť
AA	p^2	$x'+a$	$p^2(x'+a) = x'p^2 + ap^2$
Aa	$2pq$	$x'+d$	$2pq(x'+d) = x'2pq + 2pqd$
aa	q^2	$x'-a$	$q^2(x'-a) = x'q^2 - aq^2$
Suma	1		$x'(p^2+2pq+q^2) + a(p^2-q^2) + 2pqd =$ $= x'(p+q)^2 + a(p+q)(p-q) + 2pqd =$ $= x' + a(p-q) + 2pqd$

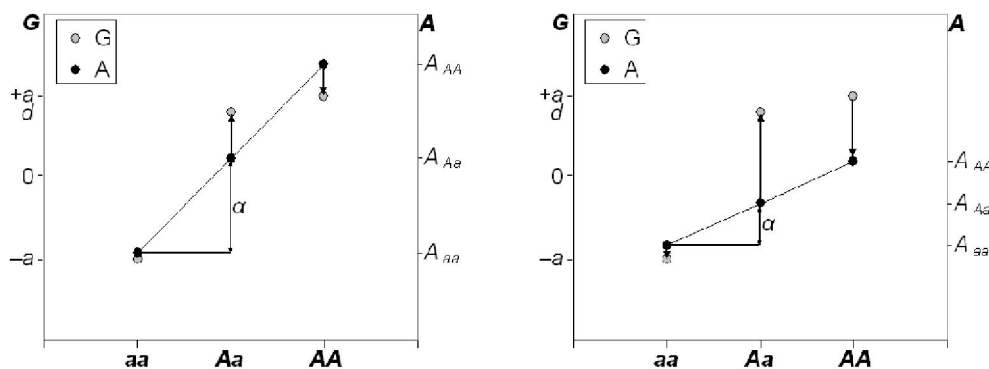
pre bialelický
lokus platí
 $p+q=1$

Keďže rodičia pri pohlavnom rozmnožovaní odovzdávajú potomstvu gény, nie genotypy, pre priemernú fenotypovú hodnotu potomstva sú určujúce priemerné efekty génov rodičov. Hodnotu jedinca z hľadiska šľachtienia určuje priemerná výkonnosť jeho potomstva. Aditívnu hodnotu (*breeding value*) je teda možné priamo merať: ako konkrétneho rodiča krížime s ďalšími jedincami náhodne vybranými z populácie, aditívna hodnota (A) predstavuje

dvojnásobok rozdielu medzi priemerom potomstva a priemerom populácie (len polovica génov potomstva pochádza od testovaného rodiča, preto dvojnásobok). Aditívna hodnota teda nie je výlučne vlastnosťou jedinca, ale je zároveň závislá na populácii, v ktorej sa jedinec vyskytuje. Možno ju vyjadrovať aj v absolútnych jednotkách (t.j. v jednotkách, v akých je meraný fenotypový znak), ale z matematického hľadiska je praktickejšie vyjadrovať ju odchýlkou od populačného priemeru.

Rozdiel medzi aditívnou hodnotou a genotypovou hodnotou predstavuje odchýlku, spôsobenú dominanciou (D ; *dominance deviation*): $G = A + D$ (obr. 35). Priamo je merateľná rozdielom medzi fenotypom jedinca a priemernou fenotypovou hodnotou jeho potomstva, ak je testované v rovnakom prostredí (za predpokladu monogénnej kontroly znaku, alebo vylúčenia premenlivosti v ďalších génoch, ktoré znak kontrolujú). Odchýlky podmienené dominanciou sú spôsobené efektom kombinácie konkrétnej dvojice génov, ktorá sa môže fenotypovo prejavovať inak než jednoduchý súčet efektov oboch génov.

Rovnako ako aditívne hodnoty aj odchýlky podmienené dominanciou sú závislé od kontextu populácie, ktorej je testovaný jedinec členom. Z obr. 35 vyplýva, že pokiaľ sa zmení zastúpenie génov v populácii, posunú sa pri nezmenených genotypových hodnotách aditívne hodnoty (ležiace na priamke) a teda aj dominantné odchýlky (vyjadrené šípkami). Zároveň z toho vyplýva, že nezávisle na veľkosti medzialelických či medzigénových interakcií je vždy určitá časť premenlivosti aditívna, t.j. prístupná pre selekciu. V priebehu viacerých generácií systematickej selekcie sa však táto aditívna variabilita môže vyčerpávať (t.j. frekvencie génov sa posunú v prospech tých alel, ktoré sú v daných podmienkach alebo pri umelom výbere z hľadiska požiadaviek človeka výhodné), a teda odozva populácie na prirodzený alebo umelý vyber sa môže zmenšovať aj úplne zastaviť. Na druhej strane veľkosť dominantných odchýlok je závislá len na miere dominancie d , nie je závislá na aditívnych hodnotách. Pre $d = 0$ sú teda genotypové a aditívne hodnoty totožné.



Obr. 35 Genotypové (G) a aditívne (A) hodnoty hypotetického fenotypového znaku jednotlivých genotypov v bialelickom lokuse v panmiktickej populácii s alelickými frekvenciami $p(A) = 0,4$ (vľavo) a $p(A) = 0,8$ (vpravo) pri hodnotách $a = 1$ a $d = 0,8$. Šípky vyjadrujú veľkosť odchýlky podmienenej dominanciou.

Rovnakým spôsobom by bolo možné odvodiť aj veľkosť odchýlky spôsobenej interakciou medzi génmi, epistázou (I ; *interaction deviation*), t.j. ako rozdiel medzi genotypovou hodnotou jedinca a genotypovými hodnotami, ktoré možno pripísať účinkom jednotlivých génov, medzi ktorými existuje epistatická interakcia. Celková genotypová hodnota jedinca je teda súčtom všetkých troch zložiek: $G = A + D + I$, kde A je suma aditívnych hodnôt pripísateľná jednotlivým alelám, D je suma odchýliek spôsobených dominanciou (vyplývajúca z konkrétnej kombinácie alel v rámci rovnakého génu) a I je efekt epistatickej interakcie (vyplývajúca z konkrétnej kombinácie alel rôznych génov).

Dedivosť

Analogické vzťahy, ako sa uplatňujú pri hodnotení fenotypových znakov konkrétnych jedincov, je možné uplatniť aj pri hodnotení ich premenlivosti. Ako je známe zo štatistiky, rozptyl (variancia) súčtu hodnôt dvoch znakov sa rovná súčtu ich rozptylov a dvojnásobku ich kovariancie. Ak teda pre fenotypovú hodnotu platí, že je súčtom hodnoty podmienenej genotypom a hodnoty podmienenej prostredím ($P = G + E$), tak pre fenotypovú varianciu musí platiť:

$$V_P = V_G + V_E + 2 \text{Cov}_{GE}$$

kde V_P je celková fenotypová variancia (rozptyl; $V \equiv s^2$; variancia hodnôt fenotypového znaku u jedincov populácie), V_G je variancia podmienená genotypom (t.j. variancia genotypových hodnôt jedincov populácie), V_E je variancia podmienená prostredím a Cov_{GE} je kovariancia genotypu a prostredia (nie je totožná s $G \times E$ interakciou!), ktorá vzniká vtedy, ak v dôsledku nesprávneho usporiadania biologického pokusu nie sú vplyvy genotypu a prostredia nezávislé (napr. ak pri výsadbe nezabezpečíme jedincom dostatočný rastový priestor, rozdiely v raste budú podmienené nielen genotypom, ale aj kompetíciou, t.j. pomalšie rastúce genotypy budú v raste navyše spomaľované aj zatienením rýchlejšie rastúcimi susedmi). Aditívna (A) a neaditívne (D , I) zložky genotypovej hodnoty jedinca sú navzájom nezávislé, preto pre ich variancie platí:

$$V_G = V_A + V_{NA} = V_A + V_D + V_I$$

Opäť platí, že komponenty variancie závisia výlučne od príslušného typu dedičnosti znaku: aditívna variancia závisí len od aditívnych hodnôt, variancia podmienená dominanciou výlučne od dominantných odchýlok. Oba komponenty variancie však zároveň závisia na genetickej štruktúre populácie, maximálnu hodnotu dosahujú pri $p = q = 0,5$. Ak sa alelická štruktúra populácie v dôsledku či už prírodného výberu alebo šľachtenia posúva smerom k vyššiemu zastúpeniu zvýhodnených alel, genetická variancia (jej aditívna aj dominantná zložka) sa znižuje a tým sa znižuje aj odozva populácie na selekciu.

Keďže jednotlivé komponenty variancie sa jednoducho sčítavajú, má zmysel pýtať sa, akú časť z celkového súčtu každý z nich predstavuje. Podiel genotypovej premenlivosti (meranej varianciou) na celkovej fenotypovej premenlivosti daného znaku nazývame dedivosťou (heritabilitou) znaku, a určuje, nakoľko je variabilita znaku podmienená dedične, teda nakoľko sa vlastnosti rodičov (dané nielen geneticky, ale aj ovplyvnené prostredím, v ktorom sa rodičia vyskytujú) budú prenášať na ich potomstvo:

$$H^2 = V_G / V_P$$

Symbol H^2 sa používa preto, lebo ide o podiel rozptylov, ktoré sa počítajú so sumy štvorcov odchýlok hodnôt od aritmetického priemeru, H^2 je teda symbolom pre dedivosť samotnú, nie pre jej druhú mocninu. Tento typ dedivosti sa označuje ako dedivosť v širšom zmysle (broad-sense heritability).

Podiel aditívnej genotypovej variancie ku celkovej fenotypovej variancii sa označuje ako dedivosť v užšom zmysle (narrow-sense heritability):

$$h^2 = V_A / V_P$$

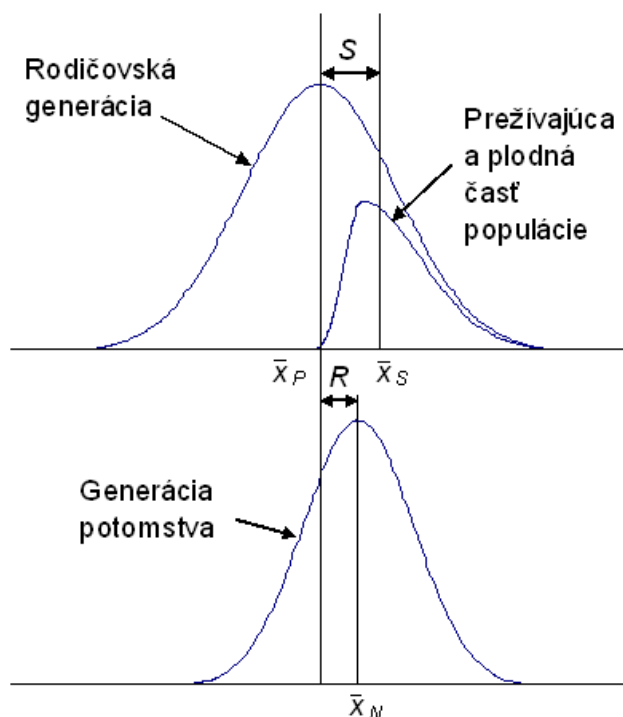
Dôvodom pre definovanie dedivosti v užšom zmysle ako samostatného parametra je skutočnosť, že pri pohlavnom rozmnožovaní genotypy (teda konkrétne kombinácie alel) rodičovskej generácie zanikajú a v potomstve sa vytvárajú kombinácie nové. Pokiaľ je populácia panmiktická, alelické frekvencie v potomstve sú totožné s alelickou štruktúrou rodičovskej generácie (viď Hardy-Weinbergov zákon). Pokiaľ však aj rodičovská generácia nevznikla náhodným párovaním, genotypové frekvencie sa zmeniť môžu. Aditívna časť genetickej premenlivosti sa teda zachová, sumárne efekty jednotlivých alel zostanú aj v následnej generácii rovnaké, naopak, odchýlky podmienené medzialelickými či medzigénovými interakciami (teda závislé na konkrétnych kombináciách alel) zanikajú a utvárajú sa nové. Efekty podmienené aditivitou teda možno do ďalšej generácie predikovať, neaditívne efekty nie.

Odozva na selekciu

Ako už bolo povedané, od dedivosti, teda miery genetickej podmienenosti fenotypového znaku, závisí odozva na selekciu v ďalšej generácii, teda posun rozdelenia početností vo fenotypových triedach v potomstve selektovanej časti populácie oproti rodičovskej generácii. Tento posun sa spravidla meria rozdielom priemerných hodnôt znaku (aritmetických priemerov).

Opäť je potrebné zdôrazniť, že kritériom výberu, či už prirodzeného alebo umelého, je vždy fenotyp jedinca. Príroda ani človek nevyberajú jedincov podľa genotypu, pretože ten nepoznajú. V prípade umelého výberu spravidla nepoznáme ani len genetickú kontrolu znaku, ktorý je predmetom nášho záujmu, t.j. nevieme, koľko génov daný znak kontroluje a ktoré to sú, kde v genóme sú lokalizované.

Kritériom výberu je znak samotný, t.j. vyselektovanú časť základnej populácie predstavujú jednoducho jedinci s optimálnou (spravidla najvyššou alebo najnižšou) hodnotou znaku, ktorý sa podieľa na biologickej zdatnosti alebo je kritériom šľachtenia. V prípade prirodzeného výberu sú to len tieto jedince, ktoré sa dožijú dospelosti a budú schopné sa rozmnožovať. Rozdiel medzi priemerom hodnoty znaku v základnej populácii a v selektovanej (teda prežívajúcej a rozmnožujúcej sa) časti populácie sa nazýva selekčný rozdiel alebo selekčný diferenciál: $S = \bar{X}_S - \bar{X}_P$. Nie je možné očakávať, že sa celý selekčný rozdiel prenesie do ďalšej generácie, t.j. že priemer znaku v ďalšej generácii sa od priemeru rodičovskej generácie bude odlišovať o rovnakú hodnotu ako rodičovské jedince. Pretože kritériom výberu je fenotyp, ktorý závisí nielen od dedičných faktorov, ale aj od prostredia, medzi prežívajúcimi jedincami nutne budú zastúpené aj také, ktorých vynikajúci fenotyp nie je spôsobený príspevkom genotypu, ale je dôsledkom zvýhodnených podmienok prostredia (napr. stromy, ktorých susedia boli v mladšom veku poškodené zverou, sú zvýhodnené v kompetícii), t.j. nededičných faktorov, pričom podiel týchto jedincov bude tým vyšší, čím viac je daný znak determinovaný prostredím. Zlepšenie priemernej hodnoty potomstva selektovaných jedincov oproti priemeru rodičovskej generácie, t.j. odozva na selekciu, je teda úmerné selekčnému rozdielu (čím viac selektované jedince fenotypovo predstihujú priemer celej rodičovskej generácie, tým väčší efekt môžeme očakávať) a dedivosti (čím viac je znak podmienený geneticky, tým väčšia časť selektovaných jedincov bude fenotypovo nadpriemerná vďaka genotypu, a teda bude schopná svoje vlastnosti prenášať na potomstvo). Odozva na selekciu teda predstavuje rozdiel medzi potomstvom jedincov, ktoré boli vyselektované na základe ich fenotypu, a hypotetickým potomstvom jedincov, ktoré by boli náhodne vybrané zo zdrojovej populácie, a ktorých fenotypový priemer by sa rovnal priemeru zdrojovej populácie (pochopteľne o „zlepšení“ možno hovoriť len v kontexte podmienok prostredia, ktorým je populácia vystavená, teda v kontexte konkrétneho selekčného tlaku) (obr. 36).



Obr. 36 Schéma určenia odozvy na selekciu

Selekčný diferenciál je možné odvodiť z veľkosti variability znaku v zdrojovej populácii (meranej smerodajnou odchýlkou znaku resp. variačným koeficientom) a intenzity selekcie, ktorá je meraná hodnotou odchýlky od priemeru zodpovedajúcou príslušnému kvantilu pravdepodobnostného rozdelenia: $S = i \cdot s_x$. Spravidla vychádzame z predpokladu, že kvantitatívny znak má v populácii normálne rozdelenie (t.j. rozdelenie zodpovedajúce Gaussovej krivke). Pri normálnom rozdelení platí, že v intervale $\bar{x} \pm s_x$ sa nachádza 68% hodnôt, mimo tohto intervalu sa teda nachádza 32% hodnôt, z toho 16% nad jeho hornou hranicou a 16% pod jeho spodnou hranicou. Ak teda preživa a rozmnožuje sa 16% najlepších jedincov, limit selekcie sa nachádza za hranicou $\bar{x} + 1 \cdot s_x$, intenzita selekcie je teda rovná $i = 1$.

Pri organizmoch s krátkou generačnou dobou možno odozvu na selekciu priamo merať: $R = \bar{X}_N - \bar{X}_P$. Pri dlhožijúcich organizmoch sme však odkázaní na predikciu genetického zisku na základe selekčného rozdielu a dedivosti. Vo všeobecnosti sa v evolučnej biológii pri predikcii vývoja populácie vychádza z toho, že potomstvo vzniká náhodným krížením v rodičovskej generácii. Genotypy potomstva sú oproti genotypom rodičovských jedincov (selektovanej časti populácie) nanovo usporiadané náhodným spôsobom, pretože pri generatívnom množení dochádza k segregácii a rekombinácii alel. Odchýlky podmienené dominanciou alebo epistázou sa teda v potomstve objavia iba v miere úmernej zastúpeniu alel. V odozve na selekciu sa preto uplatňuje len aditívna zložka genotypovej premenlivosti, preto pre predikciu odozvy musí byť použitá dedivosť v užšom zmysle:

$$R = S \cdot h^2$$

Pri umelom výbere (šľachtení) však môže nastať aj odlišná situácia: ak je potomstvo získavané spôsobom, pri ktorom poznáme oboch rodičov (zámerné kríženie u živočíchov, hromadné kontrolované opelenie (*mass controlled pollination*) pri lesných drevinách a pod.), v odozve na selekciu (označovanej v tomto prípade ako genetický zisk) sa uplatnia všetky komponenty genotypovej premenlivosti, aditívne aj neaditívne, preto pre predikciu odozvy môžeme použiť dedivosť v širšom zmysle:

$$R = S.H^2$$

Pri vegetatívnom (klonálnom) rozmnožovaní rastlín sú genotypy rodičovských jedincov presne kopírované, v potomstve sa zachováva špecifické usporiadanie alel v genotypoch, ktoré môže podmieňovať odchýlky spôsobené dominanciou alebo epistázou, teda teoreticky by odozva na selekciu mala zodpovedať dedivosti v širšom zmysle. Vegetatívne rozmnožovanie je však spojené s fyziologicky podmienenými rozdielmi, klony predstavujú ontogeneticky starší materiál oproti semenáčikom, teda aj z hľadiska vlastností, ktoré sú predmetom výberu, sa môžu správať odlišne. Preto sa pre stanovenie odozvy na selekciu vychádza z dedivosti, zisťovanej klonálnymi testmi, ktorá môže byť odlišná od dedivosti v širšom zmysle (klonálna dedivosť; *clonal heritability*).

Interakcia genotyp $\times$ prostredie

Niektoré genotypy reagujú na podmienky konkrétneho prostredia inak, než by zodpovedalo všeobecnému trendu. Správanie sa konkrétneho genotypu v konkrétnych podmienkach prostredia (P) nezodpovedá očakávaniu, ktoré vyplýva zo všeobecnej výkonnosti daného genotypu (G) a všeobecnej vhodnosti daného prostredia (E). Tento jav označujeme ako interakcia genotypu a prostredia ($G \times E$ interakcia).

Hodnotenie $G \times E$ interakcie vychádza zo základného štatistického modelu kvantitatívnej genetiky: ak je m genotypov vysadených na n lokalitách v r opakovaníach, fenotypová hodnota má nasledujúce zložky:

$$P_{ijk} = \mu + G_i + E_j + GE_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

kde P_{ijk} je fenotypová hodnota k . jedinca i . genotypu v j . prostredí, μ je priemerná fenotypová hodnota všetkých jedincov na všetkých lokalitách, G_i je priemerný efekt i . genotypu cez všetky lokality, E_j je priemerný vplyv j . prostredia, GE_{ij} je odchýlka vyvolaná interakciou i . genotypu a j . prostredia a ε_{ijk} je reziduálna odchýlka, vyvolaná neidentifikovateľnými faktormi (chyba merania, heterogenita prostredia v rámci lokality a pod.).

Existenciu $G \times E$ interakcie je možné testovať dvojfaktorovou analýzou variancie. Táto metóda však umožňuje len otestovať, či vplyv $G \times E$ interakcie na fenotypovú hodnotu vôbec existuje (či je štatisticky významný, t.j. či jeho existenciu môžeme predpokladať aspoň s pravdepodobnosťou 95%) a poskytuje kvantitatívny odhad podielu fenotypovej variancie viazanej na efekt $G \times E$ interakcie. Potvrdená existencia $G \times E$ interakcie však vyvoláva ďalšie otázky: Existuje v $G \times E$ interakcii biologicky interpretovateľný a teda prakticky aplikovateľný trend? Ako sa jednotlivé genotypy odlišujú v reakcii na zmenu prostredia?

V odpovedi na tieto otázky sa využíva regresná analýza. Pokiaľ kvantifikujeme klimatické, pôdne a iné vlastnosti prostredia na jednotlivých lokalitách pomocou kvantitatívnych charakteristík, môžeme použiť regresný model závislosti efektu $G \times E$ interakcie na týchto charakteristikách:

$$GE_{ij} = \sum_l \beta_{il} x_{jl} + \varepsilon_{ij}$$

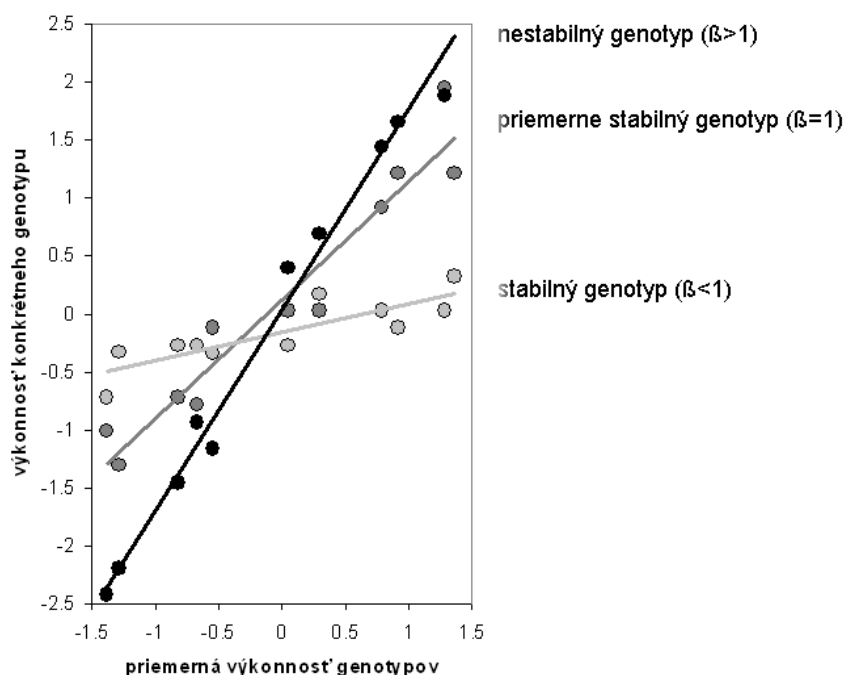
kde x_{jl} je hodnota l . charakteristiky prostredia na j . lokalite, β_{il} je parciálny regresný koeficient $G \times E$ efektu i . genotypu na x_{jl} a ε_{ij} je reziduálna chyba. Výhodou tohoto prístupu je možnosť identifikácie vplyvu špecifických vlastností prostredia na fenotypovú reakciu jednotlivých genotypov. Jeho problematickou stránkou je nutnosť merať veľké množstvo charakteristík prostredia, z ktorých väčšina je pravdepodobne irelevantná.

Vhodným východiskom je Finlay-Wilkinsonova metóda hodnotenia $G \times E$ interakcie (*joint regression analysis*), použiteľná pri fenotypových znakoch, ktoré sú zložkou biologickej zdatnosti. Pri tomto postupe je priemerná fenotypová hodnota všetkých genotypov na konkrétnej lokalite použitá ako charakteristika prostredia tejto lokality. Pokiaľ vychádzame z predpokladu, že testované genotypy predstavujú náhodný výber z jedincov danej dreviny, potom platí, že čím vyššiu fenotypovú hodnotu zastúpené genotypy na jednotlivých lokalitách v priemere dosahujú, tým je pravdepodobne prostredie danej lokality pre testovanú drevinu

vhodnejšie. Regresný model možno v tomto prípade modifikovať nasledovne:

$$GE_{ij} = \beta_i (\mu_j - \mu) + \varepsilon_{ij}$$

kde μ_j je priemerná fenotypová hodnota všetkých genotypov na j . lokalite, ε_{ij} je reziduálna chyba a regresný koeficient β_i vyjadruje stabilitu i . genotypu. Ak $\beta_i = 1$, znamená to, že daný genotyp reaguje na prenos do iného prostredia rovnako ako priemer všetkých testovaných genotypov, t.j. v súlade s očakávaným všeobecným trendom. Ide teda o genotyp, u ktorého je $G \times E$ interakcia nulová. V prípade, že $\beta_i > 1$, genotyp na prenos do lepších podmienok prostredia reaguje výraznejším zlepšením fenotypovej hodnoty, než je u danej dreviny bežné, naopak, v horších podmienkach prostredia zaostáva výraznejšie než iné genotypy, teda ide o podpriemerne stabilný genotyp. Ak $\beta_i < 1$, genotyp vykazuje naopak nadpriemernú stabilitu, t.j. jeho fenotypová hodnota závisí na podmienkach prostredia menej, než je u danej dreviny bežné (obr. 37).



Obr. 37 Ilustrácia hodnotenia stability genotypov ($G \times E$ interakcie) Finlay-Wilkinsonovou metódou

GENETICKÉ ZDROJE A ICH ZACHOVANIE

Genofond a genetické zdroje

Pod pojmom genofond rozumieme súhrn všetkých genetických informácií (génov a ich alelických variantov) konkrétneho rastlinného alebo živočíšneho druhu. Niekedy, najmä pri rastlinách, ktoré sa rozmnožujú aj vegetatívne, je tento pojem rozšírený aj na súhrn genotypov, t.j. konkrétnych kombinácií alel u jedincov druhu.

Rovnako, ako je možné hovoriť o genofonde druhu, je možné použiť tento pojem aj pre súhrn genetických informácií resp. genotypov konkrétnej populácie. Jednotlivé varianty génov nie sú rovnomerne zastúpené v celom areáli druhu. Jednotlivé populácie sa od seba odlišujú genetickou štruktúrou v dôsledku adaptácie na podmienky prostredia konkrétneho stanovišťa prostredníctvom prírodného výberu, a v dôsledku rozdielnych migračných ciest a ďalších okolností počas rekolonizácie súčasného areálu v poľadovom období.

Užitočnosť ktorejkoľvek alely nie je možné hodnotiť apriórne. Alely, ktoré sa ukazujú ako nevhodné, či dokonca letálne v určitých podmienkach, môžu svojim nositeľom v iných

podmienkach prinášať selektívne zvýhodnenie. Exemplárnym príkladom je alela spôsobujúca kosáčikovitú anémiu (kap. *Selekcia*), ktorá ale zároveň poskytuje svojim nositeľom rezistenciu voči malárii. Ale nie je nutné zachádzať k takýmto extrémnym prípadom, aj dva genotypy, ktoré sa v súčasnosti javia ako úplne ekvivalentné, sa môžu odlišovať v odolnosti voči novým, doteraz neexistujúcim stresovým faktorom (nové patogénne organizmy, škodcovia, nový typ imisíí a pod.). Snahou človeka teda musí byť udržať genofond pokiaľ možno v celej jeho šírke a geografickej štruktúre.

Pojem genetické zdroje je často stotožňovaný s pojmom genofond, ale správnejšie by sa mal vzťahovať na organizmy samotné. Ak genofond je súbor génov, genetický zdroj je súbor ich nositeľov. Pod genetickými zdrojmi rozumieme teda konkrétne jedince, a ich súbory vzniknuté prirodzene (lokálne prirodzené subpopulácie) alebo umelo vytvorené človekom (botanické a zoologické záhrady, archívy biologického materiálu, pokusné plochy a pod.).

Podľa Dohody o biologickej rozmanitosti biologické zdroje predstavujú „organizmy alebo ich časti, populácie alebo akékoľvek iné biotické súčasti ekosystémov s aktuálnym alebo potenciálnym využitím resp. hodnotou pre ľudstvo“. Pre genetické zdroje uvádza konvencia stručnejšiu definíciu: „genetický materiál (akýkoľvek materiál rastlinného, živočíšneho, mikrobiálneho či iného pôvodu, obsahujúci funkčné jednotky dedičnosti), ktorý obsahuje gény so súčasnou či potenciálnou hodnotou pre ľudí“. Obe definície teda zdôrazňujú aspekt využiteľnosti génov či biologického materiálu pre praktické (skôr by bolo možné povedať hospodárske) účely. Na jednej strane je to logické, pretože problematika genetických zdrojov sa prioritne zameriava na organizmy priamo alebo nepriamo využívané v poľnohospodárstve, na druhej strane takéto poňatie koncepcie biologických a genetických zdrojov ignoruje inherentné hodnoty prírody ako takej. Konvencia kladie veľký dôraz na trvale udržateľné využívanie (definované ako „využívanie zložiek biologickej rozmanitosti takým spôsobom a v takej miere, ktorá nevedie k poklesu biologickej rozmanitosti v dlhodobej perspektíve a teda udržiava jej potenciál pre plnenie potrieb súčasnej a budúcich ľudských generácií“), takže stále berie človeka ako referenčný štandard, ktorým pomeriava prírodné hodnoty. V úzkom utilitárnom chápaní sa teda pojem „genetické zdroje“ vzťahuje na organizmy priamo hospodársky využívané človekom (poľnohospodárske plodiny a ich divorastúci príbuzní, hospodárske lesné dreviny, hospodárske zvieratá, priemyselne využiteľné mikroorganizmy). Širšie chápanie tohoto termínu berie do úvahy hodnotu prírody ako takej pre človeka (keďže človeka berie ako súčasť ekosystému Zeme) a teda rozširuje ho aj na organizmy, ktoré človek priamo hospodársky nevyužíva, ale ktoré takisto prispievajú k dlhodobej existencii ľudskej spoločnosti.

Podľa miery narušenia pôvodnej genetickej štruktúry rozlišujeme genetické zdroje:

- **primárne** – nenarušené činnosťou človeka
- **sekundárne** – zdroje, ktorých genetická štruktúra je ovplyvnená hospodárením alebo inou ľudskou činnosťou
- **terciárne** – syntetické, človekom vytvorené populácie

Genetické zdroje môžu byť ohrozené prírodnými faktormi (choroby charakteru epidémií, ohrozujúce existenciu celého druhu, napr. grafioza brestov, abiotické a biotické škodlivé činitele, ohrozujúce lokálne populácie) a činnosťou človeka (nevhodné hospodárske postupy, imisie a pod.). Motiváciou pre špecifické programy zamerané na ich zachovanie je najmä skutočnosť, že moderné poľnohospodárstvo využíva obmedzený sortiment plodín, naviac spravidla s úzkou genetickou základňou, čo je v ostrom kontraste s veľkým počtom geneticky diferencovaných lokálnych rás a odrôd, ktoré boli hospodársky využívané ešte pred pár generáciami. Prax ukázala, že poľnohospodárske variety s úzkou genetickou bázou sú mimoriadne ohrozené systematicky sa objavujúcimi novými patogénmi a inými škodlivými činiteľmi. Jedinou prakticky aplikovateľnou cestou pre šľachtiteľov aj dnes zostáva hľadanie génov pre rezistenciu v starších odrodách a divorastúcich populáciách. Ani pokročilé technológie gene-

tických manipulácií nedokážu nahradiť prirodzenú premenlivosť ako zdroj génov a komplexov vzájomne interagujúcich génov pre odolnosť voči novým zdrojom rizík.

Pre zachovanie genofondu je základným ukazovateľom minimálna veľkosť životaschopnej populácie (angl. *minimum viable population*; MVP), ktorá je výsledkom analýzy životaschopnosti populácie (angl. *population viability analysis*; PVA). MVP predstavuje spodnú hranicu početnosti, ktorá umožňuje populácii prežiť v prirodzených podmienkach tak, aby nebola ohrozená vyhynutím v dôsledku prírodných katastrof alebo náhodných faktorov súvisiacich s demografickými a genetickými procesmi alebo kolísaním podmienok prostredia. Spravidla sa táto koncepcia vzťahuje na divožijúce či divorastúce populácie, ale v princípe nič nebráni jej použitiu aj pre populácie existujúce pod kuratelou človeka. MVP je spravidla kvantifikovaná ako veľkosť populácie, ktorá s definovanou pravdepodobnosťou (spravidla 50–95%) zaistí ďalšiu existenciu populácie po definovanú dobu (definovanú časom alebo počtom generácií). Analýza životaschopnosti populácie vychádza z dostupných údajov o populácii, spravidla pozorovania prítomnosti/neprítomnosti na lokalitách, údajov o početnosti v priebehu niekoľkých rokov, zriedkavejšie podrobnejších demografických údajov (pochopteľne, čím presnejšie a podrobnejšie sú vstupné údaje, tým spoľahlivejšia je predikcia prežitia populácie). Ďalším typom vstupných údajov sú informácie o podmienkach prostredia, prípadne predikcia ich ďalšieho vývoja (napr. modely klimatickej zmeny). PVA následne využíva demografické modely pre odhad budúceho vývoja populácie s využitím simulačných a randomizačných algoritmov. Odhad MVP vychádza z opakovania simulácií rádovo stovky až tisíce krát. Pravdepodobnostné rozdelenie odhadov budúcej početnosti je spravidla výrazne ľavostranne asymetrické (spravidla je modelované lognormálnym rozdelením) a umožňuje modelovať čas do vymiznutia populácie (angl. *time to extinction*). Z hľadiska genetických rizík odhad MVP spravidla zohľadňuje riziko akumulácie inbreedingu (a z neho vyplývajúcej narastajúcej inbrednej depresie, znižujúcej biologickú zdatnosť členov populácie) a genetických efektov zahrdlenia, teda genetického driftu. Odhady MVP sa líšia podľa taxonomických a bionomických skupín organizmov, rádovo sa však pohybujú v tisícoch jedincov.

Metódy zachovania a záchrany genetických zdrojov

Genetické zdroje chrániť a zachovávať v mieste ich prirodzeného výskytu, t.j. *in situ*. Pokiaľ existuje riziko zániku lokálnych populácií alebo hospodársky cenných genotypov, alebo pokiaľ je to technicky jednoduchšie, existuje možnosť ich ochrany *ex situ*, t.j. ich evakuácie mimo priamo ohrozených miest. Miera, v akej sa využíva jedna alebo druhá skupina metód, výrazne závisí od toho, o ktorú skupinu organizmov sa jedná. Ako už bolo uvedené, programy zachovania genetických zdrojov sa primárne orientujú na organizmy priamo hospodársky využívané človekom, ovšem aj u nich sa miera ich domestikácie resp. aktuálneho zasahovania človeka do ich populácií môže výrazne odlišovať.

U domestikovaných druhov, najmä u poľnohospodárskych plodín, predmetom záujmu nemusia byť len tieto druhy ako také, ale často aj populácie ich divožijúcich príbuzných. U druhov s nízkym stupňom domestikácie (napr. lesných drevín) sú predmetom záujmu opäť primárne prirodzené populácie. Optimálne je, ak ich dokážeme chrániť *in situ*. Existujú na to ako všeobecné, tak aj špecifické nástroje. K všeobecným nástrojom patria predovšetkým nástroje ochrany prírody. V chránených územiach, najmä v prípade bezzásahového režimu (národné prírodné rezervácie), sa populácie majú možnosť adaptovať na meniace sa prostredie prírodným výberom a epigenetickými mechanizmami. Prirodzené mechanizmy reprodukcie dovoľujú najširšie možné zapojenie členov populácie do reprodukčných procesov, čo maximalizuje šancu, že aj zriedkavé alelické varianty prítomné v genotypoch populácie sa odovzdajú následnej generácii. Z hľadiska lesného hospodárstva je najdôležitejšia a zároveň najproblematickejšia ochrana sekundárnych genetických zdrojov, t.j. obhospodarovaných

lesných porastov. Pre ich ochranu *in situ* slúžia predovšetkým génové základne resp. génové rezervácie (*gene reserves*). V zmysle zákona č. 217/2004 Z.z. resp. 138/2010 Z.z. pod génovou základňou rozumieme komplex porastov obhospodarovaný s prioritou zachovania genofondu drevín, pre ktoré bola zriadená. Génová základňa by mala obsahovať predovšetkým pôvodné, autochtónne porasty. V odôvodnených prípadoch je však možné vyhlásiť za GZ aj nepôvodné porasty, pokiaľ sú dobre adaptované na lokálne podmienky prostredia. V GZ by vekové triedy mali byť rovnomerne zastúpené. Táto podmienka si vyžaduje dostatočnú rozlohu GZ, v súčasnosti sa pri hlavných drevinách za minimálnu rozlohu považuje 100 ha. Pri zriedkavých drevinách je prípustná aj menšia rozloha. V našich podmienkach sa špecifický režim hospodárenia vzťahuje len na GZ samotnú, v zahraničí býva spravidla tvorená jadrom (*core zone*), ktoré je chránené ochranným pásmom (*buffer zone*). Obhospodarovanie porastov v GZ sa zameriava na dosiahnutie prirodzenej obnovy dreviny, pre ktorú bola zriadená. Ak sa nepodari dosiahnuť prirodzenú obnovu, umelá obnova je prípustná len reprodukčným materiálom, pochádzajúcim z GZ. Koncepcia génových rezervácií je v princípe použiteľná pri ľubovoľných organizmoch, ale vo väčšom rozsahu sa využíva len pri drevinách. Za určitú formu ochrany genetických zdrojov *in situ* možno považovať aj ďalšie zdroje reprodukčného materiálu drevín, ako sú uznané porasty (t.j. porasty, v ktorých je vzhľadom na ich fenotypovú kvalitu povolený zber semien), v ktorých je obhospodarovanie rovnako zamerané na dosiahnutie prirodzenej obnovy.

Niektoré populácie sú na svojich pôvodných stanovištiach extrémne ohrozené a ich zachovanie (v tomto prípade možno hovoriť doslova o záchrane) si vyžaduje premiestnenie mimo ohrozenia. Navyše, v prípade poľnohospodárskych plodín a hospodárskych zvierat, ktoré sú predmetom domestikácie a šľachtenia už po tisíce rokov, sa programy zachovania genofondu zameriavajú prednostne na terciárne genetické zdroje (ťažko tu aj hovoriť o iných kategóriách genetických zdrojov), ktoré existujú takmer výlučne *ex situ*. To isté sa samozrejme týka priemyselne využívaných húb a mikroorganizmov.

Hlavným typom *ex situ* opatrení sú génové banky, čiže zariadenia, v ktorých sú uchovávané organizmy alebo ich časti, použiteľné pre ďalšie rozmnožovanie. Konkrétny uskladnený materiál môže byť rozdielny, sú naň v princípe len dve požiadavky – aby bolo možné uskladňovať ho dlhodobo (rádovo roky až desiatky rokov) bez straty životaschopnosti, a aby umožňoval po ukončení skladovania prenos génov do následnej generácie.

V prípade rastlín najčastejším typom materiálu uskladňovaným v génových bankách sú semená. U mnohých rastlín je možné uchovávať ich v špecifických podmienkach (spravidla vysušené na optimálnu vlhkosť a zmrazené) na pomerne dlhú dobu. V génovej banke poľnohospodárskych plodín, ktorú spravuje Centrum výskumu rastlinnej výroby (CVRV) v Piešťanoch, sú semená uskladňované pri $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ na plánovanú dobu minimálne 50 rokov. Uskladnené vzorky sú rozdelené na aktívnu kolekciu, ktoré je obmieňaná rýchlejšie a uskladňovaná pri vyšších teplotách ($0\text{--}4\text{ }^{\circ}\text{C}$) a základnú kolekciu, okrem toho je vytvorená aj rezervná bezpečnostná kolekcia v ČR (VÚRV Praha-Ruzyně). Pri lesných drevinách funkciu génovej banky zabezpečuje OZ Semenoles podniku Lesy SR, š.p. v Liptovskom Hrádku, ktorý časť svojich skladovacích kapacít vyčlenil pre tento účel.

V génovej banke je možné uskladňovať aj peľ. Opäť pri vysušení na optimálnu teplotu a hlboko zmrazený je možné uchovať peľ bez podstatnej straty klíčivosti na takmer neobmedzenú dobu.

Pri viacerých kultúrnych plodinách prichádza do úvahy aj metóda explantátových kultúr; rastliny sú v podmienkach *in vitro* systematicky prenášané vždy na nové živné médium. Pri niektorých druhoch (vrátane lesných drevín) je schodnou cestou kryokonzervácia: pletivová kultúra alebo somatické embryo sú pri extrémne nízkych teplotách (tekutý dusík, $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) uskladniteľné opäť takmer neobmedzene.

V prípade živočíchov najčastejšie uchovávaným typom materiálu sú hlbokozmrazené

spermie, u cicavcov prichádza do úvahy aj skladovanie embryí, prípadne oocytov (tekutý dusík).

Bežnou a široko využívanou formou zachovania genofondu je chov resp. pestovanie v zoológických a botanických záhradách, arborétach a pod. Táto forma má samozrejme svoje limity, nutnou podmienkou je udržanie dostatočne veľkej reprodukčnej populácie a zaistenie toku génov (ktorý v tomto prípade musí zaistiť človek). Často tu chýba spoľahlivá informácia o geografickom pôvode materiálu, ale najmä pri kriticky ohrozených druhoch môžu významne napomôcť ich záchrane.

Najmä u rastlín možno využiť rozmanité typy zbierok genetického materiálu a reprodukčných výsadiieb. V prípade lesných drevín sú široko využívané klonové archívy, v ktorých sú zakonzervované genotypy výberových stromov, t.j. hospodársky najcennejších jedincov. Aj semenné sady, obsahujúce takisto kópie výberových stromov, ale slúžiace primárne pre produkciu semena, môžu byť využité ako zdroj genofondu pre praktické účely. Semenné porasty naopak kopírujú genofond hospodársky najcennejších populácií (tzv. uznaných porastov).

Špecifickú formu terciárnych genetických zdrojov predstavujú pokusné výsadby – presadzovacie pokusy, testy potomstiev a pod., ktoré sú zakladané primárne s iným cieľom, ale v konkrétnych prípadoch môžu poslúžiť pre rekonštrukciu genofondu vybraných populácií alebo súborov jedincov alebo genotypu vybraných jedincov (klonové testy).

Inštitucionálne a právne rámce ochrany genetických zdrojov

Inštitucionálne zastrešuje problematiku ochrany genetických zdrojov v celosvetovom meradle konzorcium CGIAR (*Consultative Group on International Agricultural Research*), fungujúce ako globálne partnerstvo organizácií zaoberajúcich sa problematikou poľnohospodárstva a potravinárstva. Zahŕňa 15 členských centier, ale úzko spolupracuje s rádovo stovkami ďalších partnerských inštitúcií, najmä národných či medzinárodných výskumných ústavov, univerzít, NGO a so súkromným sektorom. Hlavnými úlohami CGIAR je identifikácia významných problémov globálneho rozvoja, k riešeniu ktorých môže dopomôcť veda, zhromažďovanie a diseminácia informácií o týchto problémoch, vývoj vedeckých a výskumných programov pre ich riešenie, monitoring a evaluácia, uchovávanie, vyhodnocovanie a zdieľanie genetických zdrojov, posilňovanie kompetencií a vedomostí v poľnohospodárskom výskume v celosvetovom merítku. Ochrana genetických zdrojov je samozrejme len jednou z aktivít (aj keď jednou z najvýznamnejších), ktorým sa konzorcium venuje. Jedným z členov konzorcia CGIAR je Biodiversity International (bývalý Medzinárodný ústav pre rastlinné genetické zdroje; *International Plant Genetic Resources Institute*; IPGRI) so sídlom v Ríme, ktorý je z hľadiska Európy najrelevantnejšou organizáciou. Významné aktivity v oblasti zachovania genofondu vykonáva aj Organizácia spojených národov pre poľnohospodárstvo a potravinárstvo (*Food and Agriculture Organization*; FAO) a Medzinárodný fond pre poľnohospodársky rozvoj (*International Fund for Agricultural Development*; IFAD).

Ako bolo spomenuté, v širšom chápaní sa pod genetickými zdrojmi rozumejú nielen zdroje pre hospodárske využitie, ale nositelia genetickej diverzity ako takej. Preto je okrem špecializovaných inštitúcií ochrana genetickej diverzity predmetom záujmu aj inštitúcií, ktoré sa zaoberajú ochranou prírody. Svetová únia ochrany prírody (*International Union for the Conservation of Nature*, IUCN) definuje ako cieľ ochrany prírody „udržanie existujúcej genetickej diverzity a životaschopných populácií pre udržanie biologických interakcií, ekologických procesov a funkcií“.

Problematiky genetických zdrojov sa dotýka celý rad medzinárodnoprávných noriem a dohôd. Z tých, ktoré sú relevantné pre Európu, je najvýznamnejšou už spomínaná Dohoda o biologickej rozmanitosti (*Convention on Biological Diversity*, CBD), prijatá v rámci Konfe-

rencie Spojených národov o životnom prostredí a rozvoji (UNCED) v Rio de Janeiro v roku 1992. Na summite sa nepodarilo dosiahnuť spoločnú dohodu, týkajúcu sa špecificky problematiky lesov, ale účastníci prijali aspoň právne nezáväzné Prehlásenie o princípoch pre globálny konsenzus o obhospodarovaní a trvalo udržateľnom rozvoji všetkých typov lesov (*Statement of Principles for a Global Consensus on the Management and Sustainable Development of All Types of Forests*, skratene *Statement of Forest Principles*), ktoré uznalo dôležitosť lesov ako bohatého zdroja biologickej rozmanitosti a biologických zdrojov a zdrojov genetického materiálu pre biotechnologické produkty. Problematiku ochrany rastlín v rámci CBD rieši Globálna stratégia pre ochranu rastlín (*Global Strategy for Plant Conservation*, GSPC), prijatá 187 krajinami v roku 2002 a revidovaná v r. 2010. Ako neformálny a právne nezáväzný dokument nadväzujúci na GSPC bola v roku 2000 prijatá Medzinárodná agenda pre botanické záhrady v ochrane prírody (*International Agenda for Botanic Gardens in Conservation*), ku ktorej pristúpilo vyše 500 botanických záhrad a arborét z celého sveta (zo Slovenska Arborétum Mlyňany), a ktorá ako jeden z hlavných bodov svojej stratégie zdôrazňuje zachovanie genetickej diverzity rastlín ako cestu k zabráneniu straty druhov a ochudobnenia biologickej diverzity.

Právne záväznou normou je Medzinárodná dohoda o rastlinných genetických zdrojoch pre potravinárstvo a poľnohospodárstvo (*International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture*, ITPGRFA), prijatá na konferencii FAO v roku 2001. K jej cieľom patrí aj zachovanie a trvalo udržateľné využívanie genetických zdrojov rastlín pre pôdohospodárstvo a výrobu potravín, a spravodlivé a rovnomerné využívanie úžitku, vyplývajúceho z ich využívania v súlade s Dohodou o biologickej diverzite.

Pre ochranu genetických zdrojov lesných drevín v európskych krajinách vrátane Slovenska sú z právne nezáväzných noriem najdôležitejšie tie, ktoré vyplývajú z rezolúcií Medzinárodných konferencií o ochrane lesov v Európe (*Ministerial Conferences on the Protection of Forests in Europe*, MCPFE), keďže napriek nezáväznosti sú všeobecne akceptované. Proces ministerských konferencií zahŕňa 45 európskych krajín, pozorovateľov z 13 mimoeurópskych štátov, vrátane najdôležitejších partnerov z OECD (USA, Kanada, Japonsko, Austrália, Nový Zéland) a najväčších rozvojových krajín (Čína, India, Brazília), a 29 pozorovateľských organizácií (FAO, UNDP, UNECE, IUFRO, IUCN, ITTO, IPGRI, ale aj Greenpeace, WWF a iné). Pre problematiku zachovania a ochrany lesných genetických zdrojov je významná predovšetkým rezolúcia č. 2 prvej ministerskej konferencie, ktorá sa konala v roku 1990 v Štrasburgu (S2). Pre implementáciu tejto rezolúcie bol zriadený program EUFORGEN, ktorého zastrešujúcou inštitúciou je Biodiversity International. K cieľom programu EUFORGEN patrí výmena údajov a informácií, vývoj spoločných stratégií zachovania a ochrany genetických zdrojov, vypracovávanie technických smerníc a databáz, zvyšovanie verejnej informovanosti o tejto problematike. Štvrtá ministerská konferencia, ktorá sa konala vo Viedni v roku 2003 pod spoločným predsedníctvom Rakúska a Poľska (*Living Forest Summit*) prijala deklaráciu, ktorá zdôrazňuje úlohu lesov ako základu pre udržanie života na Zemi. Z výstupov viedenskej konferencie je pre problematiku LRM najdôležitejšia rezolúcia 4 o zachovaní a podpore biologickej diverzity lesov v Európe. Okrem iných záväzkov kladie rezolúcia V4 dôraz na obnovu biologickej rozmanitosti v degradovaných lesoch, podporu domácich druhov drevín a ochranu pred negatívnymi vplyvmi inváznych drevín, podporuje zachovanie lesných genetických zdrojov ako integrálnu súčasť trvalo udržateľného lesného hospodárstva a odporúča pokračovanie celoeurópskeho procesu v tejto oblasti.

V prípade živočíchov bol v roku 2007 takisto prijatý Globálny akčný plán pre živočíšne genetické zdroje (*Global Plan of Action for Animal Genetic Resources*) a analogicky k agende botanických záhrad aj Svetová stratégia ochrany pre zoologické záhrady a akváriá (*World Zoo and Aquarium Conservation Strategy*) na základe iniciatívy IUCN a Medzinárodnej únie riaditeľov zoologických záhrad (IUDZG; 2003, revízia 2005 a 2009).

Stratégia v rámci problematiky manažmentu populácií divožijúcich zvierat rieši aj otázky zachovania genetickej diverzity.

Z hľadiska vnútroštátnej legislatívy rieši problematiku genetických zdrojov špecificky zákon č. 215/2001 Z.z. o ochrane genetických zdrojov rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo a zákon 138/2010 Z.z. o lesnom reprodukčnom materiáli. V prípade živočíchov a ostatných organizmov nie je k dispozícii špecializovaná legislatíva, ale problematika ochrany genetických zdrojov je riešená inými normami týkajúcimi sa poľnohospodárstva či biotechnológií.

Biodiverzita vrátane genetickej diverzity je z právneho hľadiska chápaná ako verejný statok, teda vlastnícke práva k nej nie sú exkluzívne (nikoho nemožno vylúčiť z prístupu k nej), a prístup k nej nie je konkurenčný, teda, teda využívanie takýchto statkov jednými osobami nezmenšuje úžitok, ktorý z nich majú iné osoby. Pre genetické zdroje to už neplatí, resp. určite nie v plnom rozsahu, a ich právny status je predmetom trvalých právnych sporov. Akýkoľvek genetický materiál využiteľný ako genetický zdroj (teda zdroj nových poľnohospodárskych odrôd, liekov či biotechnologických produktov) je vždy územne lokalizovaný a teda jeho využitie je vždy (prinajmenšom do sitej miery) ovplyvnené subjektom, ktorý nad daným územím vykonáva politickú moc alebo k nemu má vlastnícke práva. Vo všeobecnosti sa vychádza z toho, že genetická informácia obsiahnutá v akomkoľvek materiáli je verejným zdrojom. Na druhej strane, produkty, ktoré sú z nej odvodené (plemená či odrody, kmene mikroorganizmov, enzýmy, biologicky aktívne látky a iné bioprodukty) môžu byť súkromným vlastníctvom a predmetom obchodu a patentovej ochrany, čím sa aj genetická informácia samotná stáva predmetom práva.

Je istým paradoxom, že tropické krajiny, na území ktorých sa väčšina prakticky relevantných genetických zdrojov nachádza, spravidla nedokážu chrániť svoje práva intelektuálneho vlastníctva a neraz sa k nim produkty, založené na genetických zdrojoch z ich územia, vracajú z rozvinutých krajín vo forme tovaru. Samostatným problémom je trvalá udržateľnosť využívania genetických zdrojov a využívania biologickej diverzity. Napriek nastaveným inštitucionálnym rámcom sa dá očakávať postupná modifikácia a adaptácia právnych rámcov tejto problematiky.