

Technická univerzita vo Zvolene
Lesnícka fakulta

Genetika a šľachtenie lesných drevín

Návody na cvičenia

Dušan Gömöry – Ladislav Paule – Roman Lonaguer

Zvolen 2010

Obsah

Úvod	3
1. GENETIKA	5
1.1 Základné pojmy genetiky	5
1.2 Molekulárne a cytologické základy dedičnosti	6
1.3 Genetická analýza fenotypového znaku	18
1.4 Populačná genetica	29
1.4.1 Mechanizmy selekcie	35
1.4.2 Väzba a väzbová nerovnováha v populácii	41
1.4.3 Genetická štruktúra populácie	45
1.4.4 Systém reprodukcie a tok génov	62
1.4.5 Selekcia podmienená plodnosťou	64
1.4.6 Genetický drift, inbreeding a efektívna veľkosť populácie	66
2. ŠLAHTENIE	71
2.1 Premennivosť fenotypových znakov	71
2.2 Dedivosť a genetický zisk	77
2.3 Interakcia genotyp × prostredie	82
3. PRAKTICKÉ VYÚSTENIE GENETIKY V LESNOM HOSPODÁRSTVE	85
3.1 Lesný reprodukčný materiál	85
3.1.1 Európska a medzinárodná legislatíva súvisiaca s LRM	85
3.1.2 Slovenská legislatíva súvisiaca s LRM	87
3.1.3 Semenné sady	91
3.1.4 Provenienčný výskum ako podklad pre reguláciu prenosu LRM	94
3.2 Genetické zdroje, ich zachovanie a ochrana	97
Literatúra	101

Úvod

Návody na cvičenia z predmetu Genetika a šľachtenie lesných drevín sú určené pre študentov II. ročníka odboru Lesníctvo, ale v značnom rozsahu ich môžu využiť aj študenti odboru Aplikovaná zoológia a poľovníctvo na Lesníckej fakulte.

Skriptá pokrývajú celý rozsah cvičení z predmetu. Podrobnejšie sa venujú populačnej a kvantitatívnej genetike, pretože to sú odbory genetiky, ktoré sú v prípade lesných drevín relevantné z hľadiska väčšiny aplikácií v praxi lesného hospodárstva (šľachtenie lesných drevín, problematika lesného reprodukčného materiálu, zachovanie a ochrana genetických zdrojov lesných drevín). Pozornosť je venovaná aj pravidlám, ktorými sa riadi uznávanie zdrojov lesného reprodukčného materiálu a jeho použitie, keďže ide o vyústenie poznatkov z genetiky lesných drevín, s ktorým sa absolventi budú priamo stretávať v každodennej práci. Vzhľadom na pomerne obmedzený všeobecný rozhľad z biológie a obzvlášť z genetiky, s ktorým na LF prichádzajú viacerí absolventi stredných škôl, bolo potrebné rozšíriť teoretickú časť nad rozsah obvyklý pri návodoch na cvičenia. Základné informácie o cytologických a molekulárnych základoch dedičnosti sú nutné nielen pre pochopenie analýz genetických markérov ako základných nástrojoch hodnotenia genetickej variability, ale aj pre chápanie fungovania dedičnosti fenotypových znakov a procesov na populačnej úrovni. Dôraz je kladený na postupy riešenia zadaní, ktoré študenti počas semestra v rámci cvičení vypracovávajú.

1. GENETIKA

1.1 Základné pojmy genetiky

Genetika je veda o dedičnosti a premenlivosti živých organizmov. Pod **dedičnosťou** rozumieme schopnosť organizmov produkovať potomstvo, ktoré na rovnaké podmienky reaguje rovnakým spôsobom, t.j. v rovnakých podmienkach prostredia sa bude vyznačovať rovnakými druhovými a podobnými individuálnymi vlastnosťami (kvalitatívnymi a kvantitatívnymi znakmi) ako jeho rodičia. **Premenlivosť** je základnou vlastnosťou živých organizmov. Spočíva v tom, že jedinci rovnakého druhu, ktorí sa vyznačujú rovnakými druhovými znakmi, sa zároveň odlišujú individuálnymi vlastnosťami.

Jedinec od svojich rodičov nededí znak samotný, ale len vlohu pre jeho prejavenie, ktorá sa nazýva gén. **Gén** je fyzicky úsek na molekule **kyseliny deoxyribonukleovej (DNA)**, ktorý zodpovedá za syntézu jednej molekuly RNA, ktorá následne môže rôznym spôsobom slúžiť pri syntéze polypeptidu (mediátorová, malá jadrová, ribozómová alebo transferová RNA), alebo reguluje aktivitu iných génov (mikro RNA).

Lokalizácia DNA v rámci bunky závisí od taxonomického zaradenia organizmu. Živé organizmy sa delia na dve veľké skupiny – prokaryotické, ktoré nemajú diferencované jadro (baktérie a archebaktérie) a eukaryotické s diferencovaným jadrom, ktoré je od zvyšku cytoplazmy separované lipidovou membránou (rastliny, živočíchy, huby atď.). Za živé organizmy možno v istom slova zmysle považovať aj vírusy, hoci nevykazujú všetky znaky, ktoré sa konvenčne zvyknú považovať za kritériá života.

Vírus predstavuje vlastne len molekulu nesúcu samotnú dedičnú informáciu a bielkovinný obal. Nositeľom dedičnej informácie tu môže byť dvojreťazcová alebo jednoreťazcová molekula DNA alebo molekula RNA (zloženie a stavba nukleových kyselín viď ďalej). Na svoje rozmnožovanie a expresiu svojich génov využíva molekulárny aparát hostiteľskej bunky.

U **prokaryotov** je DNA umiestnená priamo v cytoplazme (tzv. bakteriálny chromozóm). Molekula DNA je uzavretá, schématicky sa zvykne znázorňovať ako **kruhová**. Len výnimočne sa v prokaryotických bunkách môže nachádzať lineárna (neuzavretá) molekula DNA. Okrem bakteriálneho chromozómu sa v prokaryotických bunkách zvyknú nachádzať malé kruhové molekuly DNA označované ako **plazmidy**, ktoré sú schopné samostatnej replikácie (zmnoženia) a teda dedia sa rovnako ako bakteriálny chromozóm. Často sú schopné rekombinácie (vzájomnej alebo s bakteriálnym chromozómom) a niekedy sú schopné inkorporovať svoju časť do DNA hostiteľskej bunky organizmu, ktorý baktéria infikuje (napr. Ti-plazmid *Agrobacterium tumefaciens*) čo je vlastnosť, využívaná pri genetických manipuláciách.

V **eukaryotickej** bunke sú gény lokalizované v jadre bunky, v útvaroch nazývaných **chromozómy**, ktoré predstavujú **lineárne** (len výnimočne kruhové) molekuly DNA. Somatické bunky obsahujú dve sady homologických chromozómov (**autozómov**), teda z každého jadrového génu obsahujú po dve kópie. Navzájom homologické sú chromozómy, ktoré tvoria pár – nesú rovnaké gény (aj keď nie nutne rovnaké varianty týchto génov) v rovnakom usporiadaní v rámci molekuly DNA. U niektorých organizmov (napr. cicavce, vtáky) je pohlavie určené prítomnosťou pohlavných chromozómov (**gonozómy**), ktoré nie sú úplne homologické, jeden (označovaný ako X) je dlhší a obsahuje viac génov ako druhý (chromozóm Y). Jedno z pohlaví je nositeľom dvoch chromozómov X (homogametické pohlavie: u cicavcov samičie, u vtákov samčie), druhé nesie pár XY (heterogametické pohlavie). Gény viazané na len chromozóm X a nevyskytujúce sa u chromozómu Y sa teda v genóme heterogametického pohlavia vyskytujú len v jednej kópii.

Okrem jadra sú v eukaryotickej bunke nositeľmi dedičnosti aj mitochondrie (organely zabezpečujúce aerobné dýchanie) a u zelených rastlín aj chloroplasty (organely zodpovedné za fotosyntézu). Organely obsahujú jednu alebo viac kópií rovnakej kruhovej molekuly DNA.

Jedinec ich dedí spravidla len od jedného z rodičov (väčšinou od matky, výnimočne od otca, napr. pri ihličnatých drevinách čeľade Pinaceae chloroplasty, u čeľade Taxodiaceae mitochondrie). Obidve pohlavné bunky samozrejme organely obsahujú (spravidla vo veľkom počte exemplárov), ale po oplodnení bunka organely od „nesprávneho“ rodiča zlikviduje. Napriek tomu, že bunka obsahuje rádovo stovky až desaťtisíce molekúl organelárnej DNA, spravidla sú tieto molekuly identické, teda aj somatická bunka spravidla obsahuje len po jednom variante každého mimojadrového génu. Výnimočne sa vyskytuje heteroplazmia, teda prítomnosť rozdielnych organelárnych génov v rámci jednej bunky.

Súbor všetkých génov jedinca označujeme pojmom **genotyp**. Súbor všetkých znakov jedinca (kvalitatívnych a kvantitatívnych) sa nazýva **fenotyp**. Fenotyp nie je len výsledkom uplatnenia genetickej informácie, ale aj vplyvu vonkajších podmienok, súhrnne označovaných ako **prostredie**. Fenotypový prejav konkrétneho znaku môže byť výsledkom spolupôsobenia viacerých génov (polygénny systém), rovnako jeden gén môže kontrolovať viacero fenotypových znakov (pleiotropia).

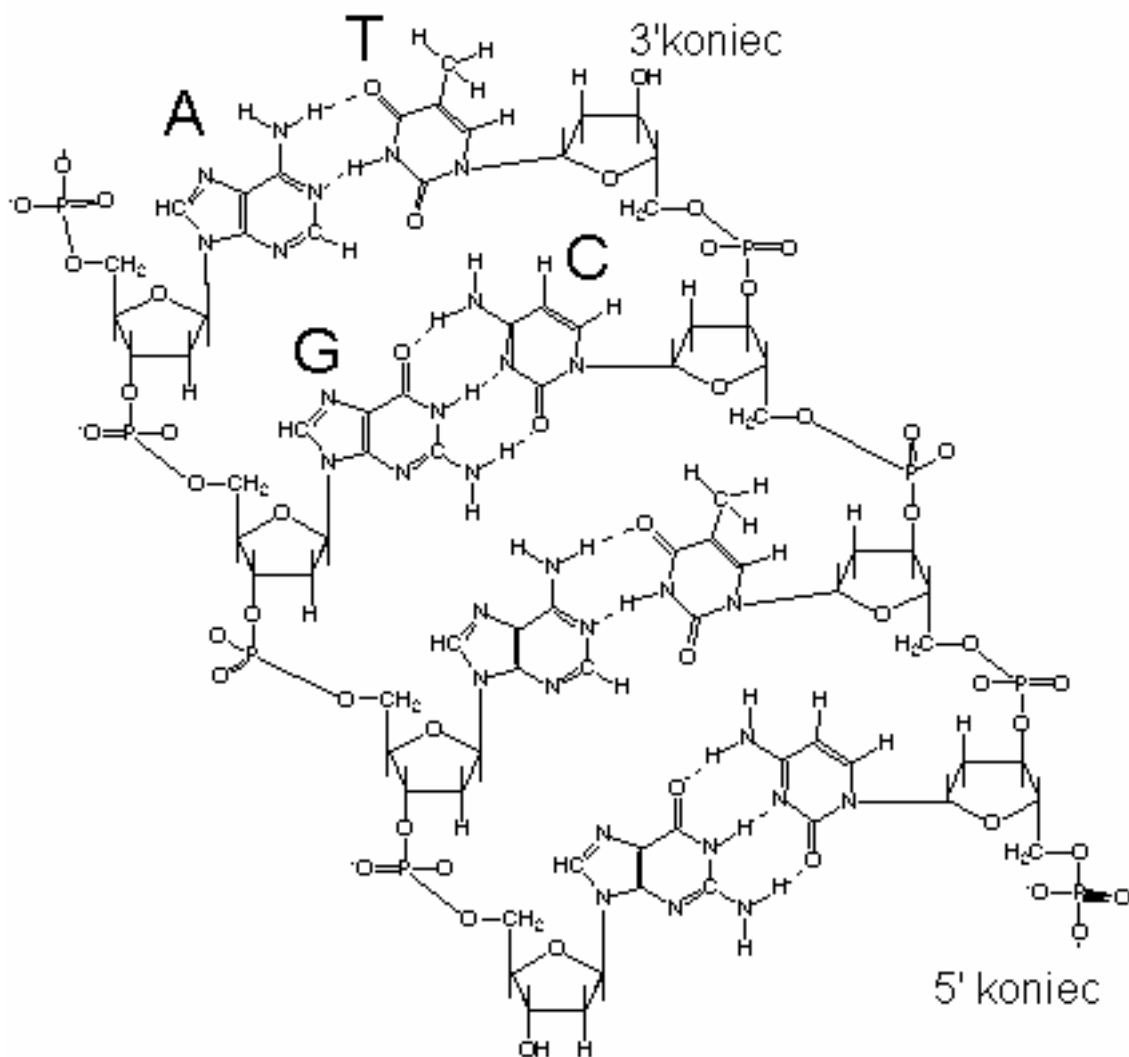
Mnohé gény existujú vo viacerých variantách, ktoré označujeme ako **alely**. Pokiaľ jedinec zdedil od oboch rodičov rovnakú alelu jadrového génu, je označovaný ako **homozygot** v danom géne. Ak získal od rodičov dve rozdielne alely, je v danom géne **heterozygotný**. Gény lokalizované na gonozóme X nemusia mať svoj homologický náprotivok na chromozóme Y, v takomto géne je jedinec **hemizygotný**.

1.2 Molekulárne a cytologické základy dedičnosti

Nositeľom dedičnej informácie sú u všetkých živých organizmov molekuly kyseliny deoxyribonukleovej (DNA). Jedinou výnimkou sú RNA-vírusy (pokiaľ vírusy považujeme za živé organizmy), v ktorých je nositeľom dedičnosti molekula kyseliny ribonukleovej (RNA). Nukleové kyseliny sú organické makromolekuly, neporovnateľne väčšie než ktorékoľvek iné molekuly v bunke. Celková dĺžka 46 molekúl DNA uložených v jadre človeka je cca 1,8 m. DNA a RNA sú nerozvetvené molekuly, ktoré sa skladajú zo stavebných kameňov označovaných ako **nukleotidy** (v prípade DNA je terminologicky správny názov 2-deoxynukleotid). Nukleotid má 3 zložky: molekulu pentózy (jednoduchý sacharid s 5 atómami uhlíka; pri DNA **2-deoxyribóza**, pri RNA **ribóza**), **zvyšok kyseliny fosforečnej** (PO_4^-) a jednu zo štyroch heterocyklických organických báz (**adenín**, **guanín**, **cytozín**, pri DNA **tymín**, pri RNA **uracil**). Práve poradie (sekvencia) organických báz na molekule DNA určuje genetickú informáciu, rovnako ako poradie písmen určuje informáciu uchovanú v napísanom texte. V sekvenciách sa jednotlivé nukleotidy zvyknú označovať prvými písmenami (G, G, C, T, U), spoločné označenie pre bázy, ktoré sú derivátmi purínu (dvojitý cyklus: A, G) je Pu, spoločné označenie pre deriváty pyrimidínu (jednoduchý cyklus: C, T, U) je Py, všeobecné označenie akéhokoľvek nukleotidu je N. Ak je teda sekvencia nejakého génu u určitej skupiny organizmov napr. 5'CGGAPuTTAGPyGGTCNCCTA3', znamená to, že okrem troch pozícií sú ostatné tzv. konzervované, t.j. v danej sekvencii sa na nich vyskytuje vždy konkrétny nukleotid, na 5. pozícii sa vyskytuje jeden z purínových nukleotidov (A, G), na 10. pozícii jeden z pyrimidínových nukleotidov (C, T), a na 15. pozícii sa môže vyskytovať ktorýkoľvek nukleotid.

V molekule pentózy je báza naviazaná na pozícii 1', fosfátový zvyšok na pozícii 5' sa naväzuje na uhlík v pozícii 3' nasledujúceho nukleotidu (obr. 1). Molekula nukleovej kyseliny je teda priestorovo orientovaná. 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 konfiguráciu funkčných skupín na molekulách báz sa vodíkové mostíky vytvá-

rajú vždy medzi konkrétnymi dvojicami báz: adenín sa viaže s tymínom dvomi vodíkovými mostíkmi, cytozín s guanínom tromi. Oba reťazce DNA sú teda prísne komplementárne, poradie báz v jednom z nich určuje poradie v druhom. Molekula RNA je tvorená len jedným reťazcom, aj tu sa však vytvárajú väzby 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 následne určuje jej funkčnosť.



Obr. 1 Znázornenie chemickej štruktúry úseku molekuly DNA

Vodíkové väzby sú v porovnaní s kovalentnými väzbami v rámci nukleotidov podstatne slabšie, dajú sa narušiť napr. zvýšením teploty nad 90 °C (tento proces sa nazýva denaturácia nukleovej kyseliny). Pri návrate do normálnych podmienok (napr. po znížení teploty) majú nukleové kyseliny veľmi silnú tendenciu renaturovať, t.j. opäť vytvoriť väzby medzi komplementárnymi nukleotidmi. Tendenciu k tvorbe väzieb medzi komplementárnymi bázami vykazuje nielen dvojreťazcová DNA, ale aj jednoreťazcové fragmenty DNA či molekuly RNA, v tomto prípade sa však vytvárajú väzby medzi nukleotidmi nachádzajúcimi sa na rôznych miestach v rámci rovnakého reťazca. DNA môže existovať vo viacerých priestorových konformáciách, v živých bunkách je najčastejšie prítomná ako pravotočivá špirála, v ktorej molekuly deoxyribózy a fosfátové zvyšky sú orientované pozdĺž oboch vláken, vytvárajúcich kostru tejto špirály, a nukleotidy sú usporiadané v rovine kolmej na os špirály.

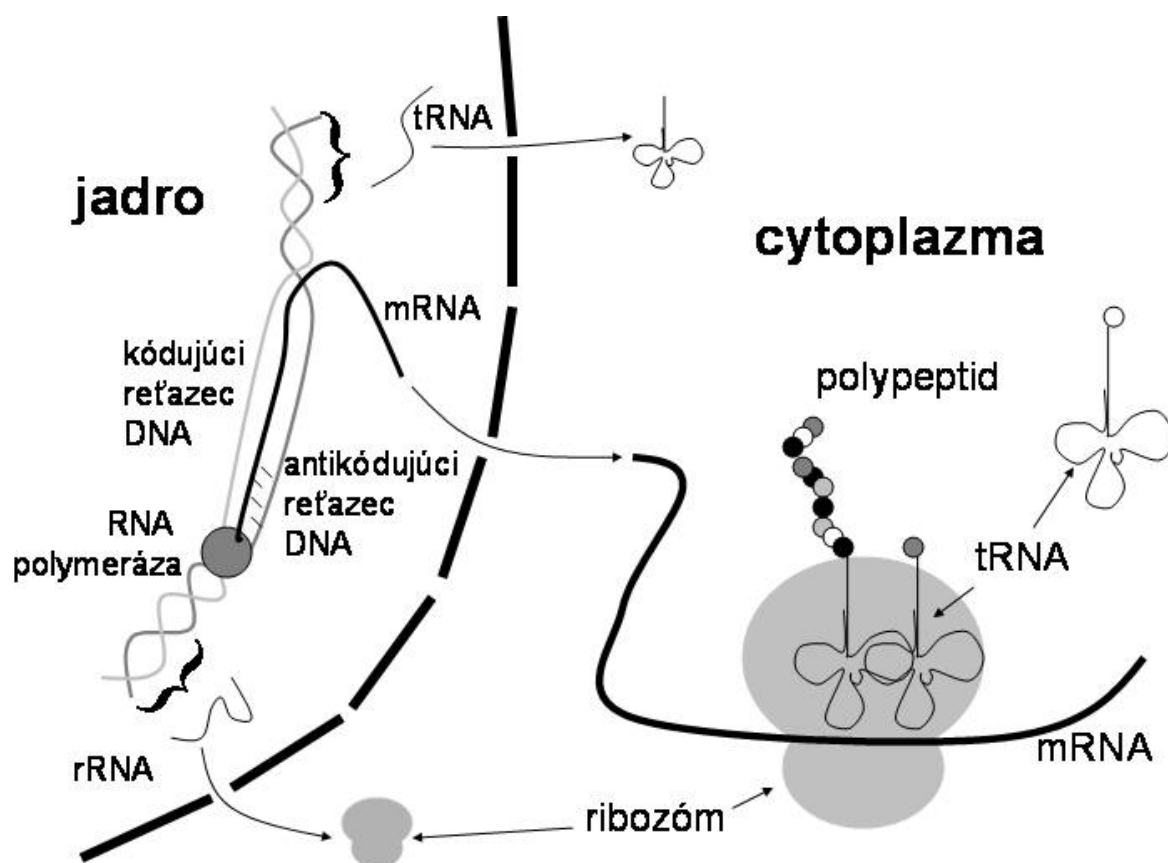
Keďže DNA predstavuje kompletný stavebný plán pre celý organizmus a „návod“ pre všetky bunčné funkcie, musia sa pred rozdelením bunky všetky molekuly DNA identicky nakopírovať tak, aby dcérske bunky mohli dostať po jednej kópii. Tento proces kopírovania sa označuje termínom **replikácia**. Proces replikácie DNA prebieha tzv. semikonzervatívnym spôsobom, teda žiadna z vytvorených molekúl nie je ani originálom, ani kópiou. Proces replikácie zabezpečuje enzým DNA-polymeráza, ktorý vykonáva viacero aktivít. Veľmi zjednodušený obraz udáva obr. 2. DNA-polymeráza najprv naruší vodíkové väzby, spájajúce oba reťazce DNA (biele) a následne pripája k oboj voľným reťazcom DNA jednotlivé nukleotidy, ktoré sa spájajú do dopĺňaných nových reťazcov (čiernych). Keďže oba pôvodné reťazce sú navzájom komplementárne ($A=T$, $C\equiv G$) a do novovytváraných reťazcov sa takisto môže zaradiť len nukleotidy, ktoré sú komplementárne k pôvodným, vznikajú touto cestou dve úplne identické molekuly, v ktorých vždy jeden reťazec je pôvodný a druhý je novo doplnený, obe sú teda spoločne originálom a spoločne kópiou.



Obr. 2 Schéma semikonzervatívnej replikácie DNA. Biely – pôvodný reťazec, čierny – novo dopĺňaný reťazec (<http://www.genome.gov>, upravené)

Gén predstavuje vždy úsek na molekule DNA. Dlho panovala predstava, že gény sú usporiadané za sebou, neprekrývajú sa. Gén bol považovaný nielen za funkčnú, ale aj základnú štrukturálnu jednotku. Prinajmenšom u vírusov sa však preukázalo, že gény sa nielen môžu prekrývať, ale dokonca jeden gén môže byť umiestnený v rámci iného. U eukaryotov (ku ktorým patria aj rastliny a živočíchy) navyše gény väčšinou nie sú súvislé, ale obsahujú 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.

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. 3). 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



Obr. 3 Priebeh exprese génu

d'alších 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). Zložitým procesom zostrihu sú intróny z primárneho transkriptu vystrihnuté a exóny pospájané. 5'-koniec je ukončený molekulou 7-metylguanozínu a na 3'-koniec sa pripája polyadenylový reťazec (rádovo desiatky adenozinových nukleotidov), ktorý je „identifikačným znakom“ **mediátorovej RNA** (*messenger RNA*; mRNA). U prokaryotov (baktérie, archebaktérie) 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) a **ribosómová** (*ribosomal RNA*; rRNA). Vystrihnuté intróny sú následne degradované za vzniku malých reťazcov, označovaných ako mikroRNA (*microRNA*; miRNA), ktoré môžu interferovať s DNA a zohrávajú úlohu pri regulácii aktivity génov.

Druhým štádiom exprese 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 jadrovú membránu do cytoplazmy, kde sa na ňu naviažu **ribozómy**. 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. Pri preklade funguje analogicky ako čítacia hlavička, 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 trojrozmernú štruktúru podobnú d'atelinovému listu, kde na stopke je naviazaná aminoky-

selina a na strednom liste trojlístka je rozoznávacia sekvencia (antikodón). Keďže vodíkové mostíky sa môžu vytvoriť len medzi komplementárnymi nukleotidmi, na kodón v mRNA s môže napojiť len taká tRNA, ktorá má presne komplementárny antikodón. Ribozóm následne katalyzuje pripojenie aminokyseliny na vznikajúci reťazec polypeptidu. Poradie trojíc nukleotidov (kodónov) v mRNA teda určuje poradie aminokyselín v polypeptide, tzv. primárnu štruktúru vznikajúcej bielkoviny. Písmená 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 tripletety môžu kódovať rovnakú aminokyselinu, pričom ich počet sa môže pohybovať od 1 (napr. UGG – tryptofán) po 6 (UUA, UUG, CUN – leucín). U mnohých tripletov rozhoduje o naviazanej aminokyseline len prvá dvojica báz (od 3'-konca), tretia báza už nemá informačný význam (tab. 1). 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 tripletety (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 (inercia/delécia) jedného alebo niekoľkých nukleotidov, zmenia sa od miesta mutácie všetky tripletety 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.

Pri zostrihu nemusia byť do molekuly mRNA zaradené všetky exóny. Pri viacerých génoch dochádza k alternatívnemu zostrihu v závislosti od typu a funkcie bunky. Jeden gén (t.j. jeden prepisovaný úsek DNA) môže viesť ku vzniku viacerých rôznych molekúl mRNA a teda aj viacerých rozdielnych produktov (polypeptidov), čo sa odrazí na rozdielom fenotype bunky.

Ako bolo spomenuté, genetická informácia určuje primárnu štruktúru polypeptidu, t.j. poradie aminokyselín. Medzi aminokyselinami v rámci reťazca za 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

Tab. 1 Genetický kód

Báza									
1.	2.								3.
	U		C		A		G		
U	UUU	Fenylalanín	UCU	Serín	UAU	Tyrozín	UGU	Cysteín	U
	UUC	Fenylalanín	UCC	Serín	UAC	Tyrozín	UGC	Cysteín	C
	UUA	Leucín	UCA	Serín	UAA	T	UGA	T	A
	UUG	Leucín	UCG	Serín	UAG	T	UGG	Tryptofán	G
C	CUU	Leucín	CCU	Prolín	CAU	Histidín	CGU	Arginín	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	Izoecín	ACU	Treonín	AAU	Asparagín	AGU	Serín	U
	AUC	Izoecín	ACC	Treonín	AAC	Asparagín	AGC	Serín	C
	AUA	Izoecín	ACA	Treonín	AAA	Lyzín	AGA	Arginín	A
	AUG	Metionín (I)	ACG	Treonín	AAG	Lyzín	AGG	Arginín	G
G	GUU	Valín	GCU	Alanín	GAU	Kys. asparágová	GGU	Glycín	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

I – iniciačný kodón začína transláciu, T – terminačný (STOP) kodón ukončuje transláciu

I – iniciačný kodón začína transláciu, T – terminačný (STOP) kodón ukončuje transláciu

Príklad 1.1: Gén pre polypeptid, ktorý je súčasťou peroxidázy buka, má sekvenciu

```

      0       1       2       3       4       5
      12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789
3' ...TTTACAGTCCATTCGACTTAGGGGCTAAGGTACCTGGAGCCCACGTTTGGGTCATCCAG...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 bázo­vého páru GC za TA (bodová mutácia) a s akými následkami?

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

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

e) Ako sa zmení sekvencia aminokyselín v polypeptide, ak dôjde v pozícii 22 k delecii bázo­vého páru 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 sekvencii nie sú prítomné intróny) zaraďujú nukleotidy komplementárne k prepisovanému reťazcu DNA:

```

      0       1       2       3       4       5
      12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789
DNA:  3' TTTACAGTCCATTCGACTTAGGGGCTAAGGTACCTGGAGCCCACGTTTGGGTCATCCAG5'
mRNA: 5' AAAUGUCAGGUAAGCUGAAUCCCCGAUUCCAUGGACCUCGGGUGCAAACCCAGUAGGUC3'

```

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' AAAUGUCAGGUAAGCUGCAUCCCCGAUUCCAUGGACCUCGGGUGCAAACCCAGUAGGUC3'
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 bude nasledovná

```

      0       1       2       3       4       5
      12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789
mRNA:  5' AAAUGUCAGGUAAGCUGCAUCCACGAUUCCAUGGACCUCGGGUGCAAACCCAGUAGGUC3'
polypeptid: MetSerGlyLysLeuHisProArgPheHisGlyProArgValGlnThrGlnSTOP

```

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

c) Ak dôjde v pozícii 43 k zámene adenozínu 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' AAAUGUCAGGUAAGCUGCAUCCCCGAUUCCAUGGACCUCGGGCCGCAAACCCAGUAGGUC3'
polypeptid: MetSerGlyLysLeuHisProArgPheHisGlyProArgAlaGlnThrGlnSTOP

```

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
      1234567890123456789012345678901234567890123456789
mRNA:      5'AAAUGUCAGGUAAGCUGGAUCCCCGAUCCAUGGACCUCGGGUGCAAACCCAGUAGGUC3'
polypeptid:      MetSerGlyLysLeuAspProArgPheHisGlyProArgValGlnThrGlnSTOP

```

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 p;vodne v tejto pozícii a teda od nej dôjde k posunu celého čítacieho rámca. Sekvencia mRNA a zodpovedajúca sekvencia aminokyselín v polypeptide bude nasledovná

```

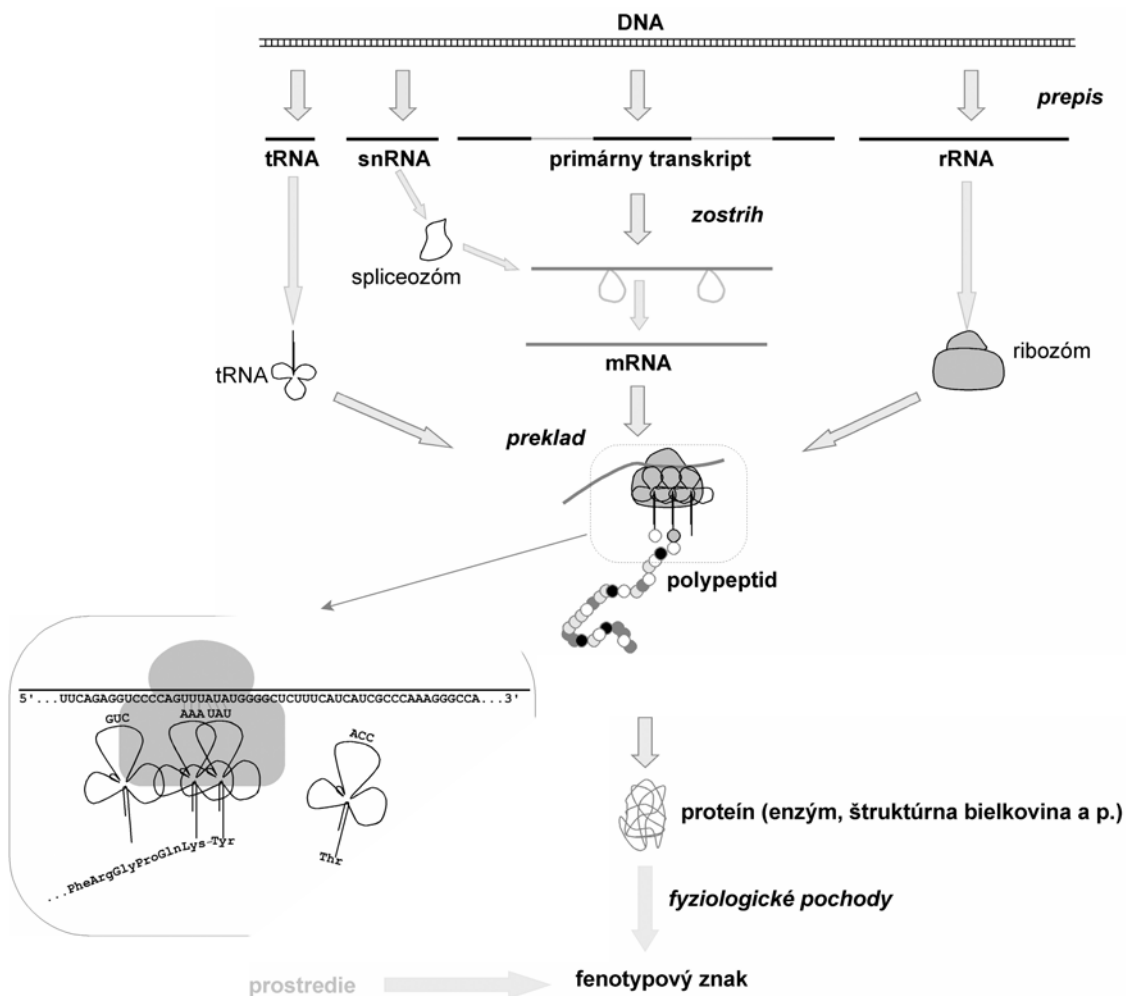
      0       1       2       3       4       5
      123456789012345678901234567890123456789012345678
mRNA:      5'AAAUGUCAGGUAAGCUGCAUCCCGAUCCAUGGACCUCGGGUGCAAACCCAGUAGGUC.3'
polypeptid:      MetSerGlyLysLeuHisProAspSerMetAspLeuGlyCysLysProSerArgSer..

```

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**.

(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. Bielkoviny majú v živých organizmoch rozdielne funkcie, najvýznamnejšia je funkcia enzymatická (biokatalytická) – enzýmy riadia všetky biochemické procesy. Od genotypu jedinca teda závisí jeho enzymatická výbava, ktorá cez riadenie biochemických procesov (za spolupôsobenia negenetických vplyvov – prostredia) určuje utváranie fenotypových znakov (obr. 4).

DNA v eukaryotických bunkách nie je uložená voľne. DNA obsiahnutá v najdlhšom chromozóme človeka má celkovú dĺžku 8,5 cm, takže 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 z histónov, čo sú malé proteínové molekuly, 8 molekúl histónov vytvára nukleozóm). Nukleozómy sú následne spakované (hyperšpiralizované) do 30 nm hrubého chromatinového vlákna.

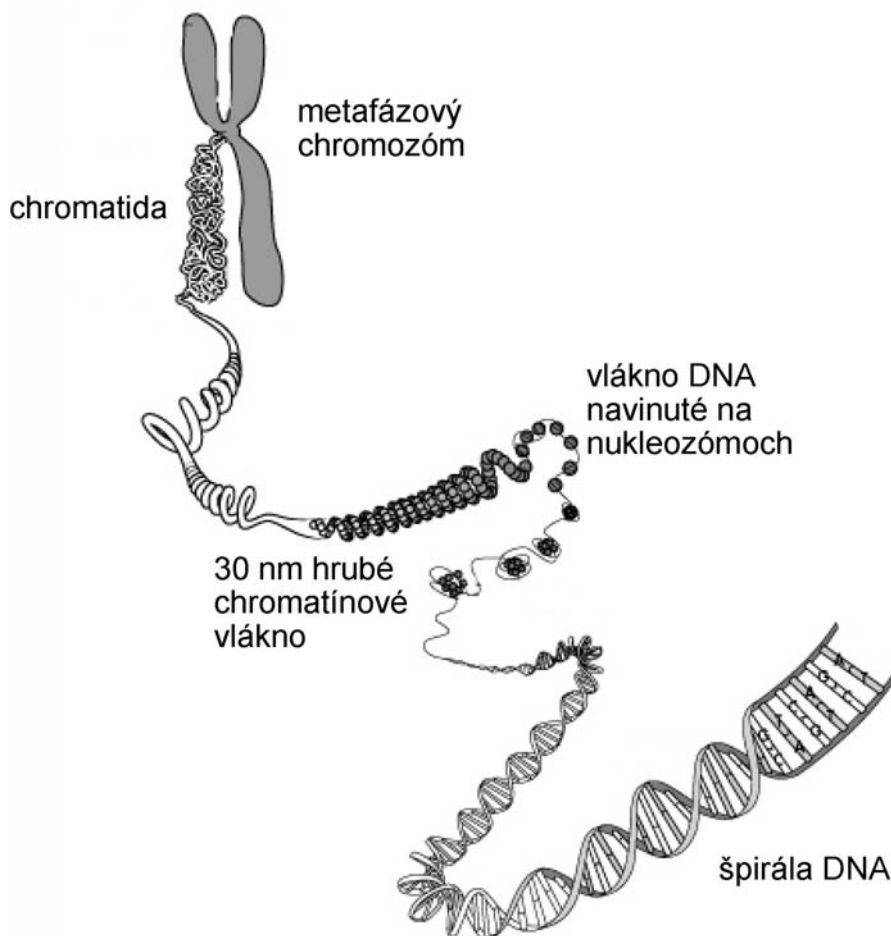


Obr. 4 Schéma procesov spojených s expresiou génu eukaryotov

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. 5), a ktorý označujeme termínom chromozóm.

Somatické (telové) bunky obsahujú za normálnych okolností dve sady chromozómov, sú tzv. **diploidné**. Ak kompletná sada obsahuje n chromozómov (tzv. **haploidný** počet), potom počet chromozómov v interkinetickej somatickej bunke je $2n$. 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**.

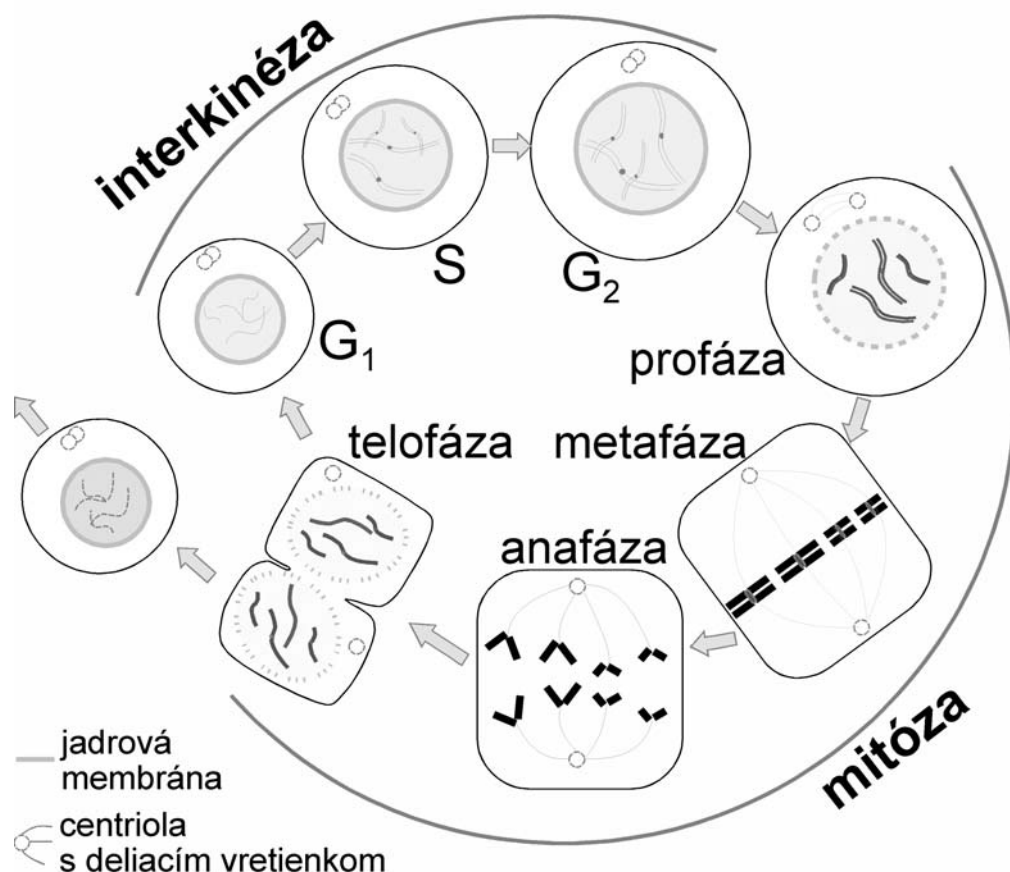
Eukaryotická bunka v priebehu svojho života prechádza viacerými fázami (obr. 6). Štádium medzi dvomi mitotickými deleniami sa označuje ako **interfáza** alebo **interkinéza**. Nové bunky vzniknuté delením najprv rastú, t.j. zväčšujú svoj objem. Toto štádium sa označuje ako G_1 (z angl. *gap*, t.j. medzera). 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



Obr. 5 Schematické znázornenie úrovní kondenzácie genetického materiálu od molekuly DNA po metafázový chromozóm (<http://www.accessexcellence.org>, upravené).

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.

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 zúženie 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. 7) 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



Obr. 6 Schéma priebehu eukaryotického bunkového cyklu. Zobrazenie interfázových chromozómov treba brať len ako ilustračné, v skutočnosti nie sú v jadre viditeľné.

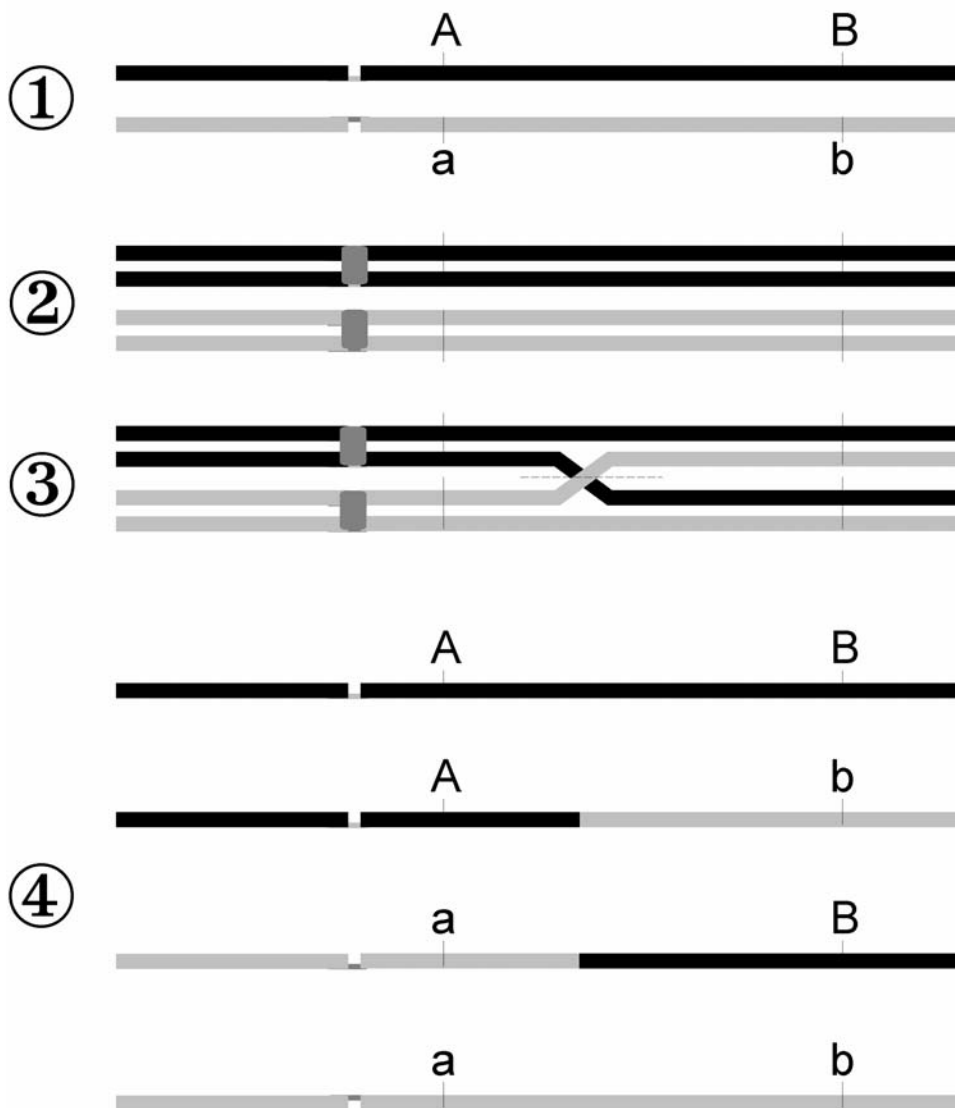
chromatíd k opačnému pólu bunky. V **telofáze** sú kompletne sady chromozómov nahromadené každá pri opačnom póle bunky. Chromozómy sa začínajú opäť dešpiralizovať a okolo nich sa obnovuje jadrová membrána, čím je ukončené delenie jadier. Následne počas cytokinézy dochádza k deleniu cytoplazmy sformovaním deliacej priehradky medzi jadrami (lipidová membrána) a následne sformovaním bunkovej steny. Počet chromozómov v bunke počas bunkového cyklu sa teda mení $2n \rightarrow 4n \rightarrow 2n$. Bunkové organelly sa počas cytokinézy (rozdelenia buniek po ukončení mitotického delenia jadier) rozdelia do oboch dcérskych buniek náhodne, vzhľadom na veľký počet mitochondrií aj chloroplastov v bunke sa prakticky s istotou dostanú do oboch dcérskych buniek.

V niektorých prípadoch nedôjde k cytokinéze, takže vznikajú bunky s viacerými jadrami. Multinukleárne bunky sú bežné u húb, v niektorých tkanivách živočíchov (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 G₁ nepokračuje fázou S ale vstupuje do kľudového stavu (G₀). Ten nemusí byť trvalý, niektoré bunky sú schopné vrátiť sa do fázy G₀ a následne sa opäť deliť. Pokiaľ je však bunka plne diferencovaná, pretrváva v senescentom stave až do ukončenia svojej životnosti apoptózou, t.j. programovanou smrťou. Na rozdiel od nekrózy, ktorá je „násilnou“ smrťou bunky, pri ktorej dôjde k dezorganizovanému rozpadu bunky, pričom uvoľnený bunecný obsah môže poškodiť susedné bunky, apoptóza je zákonným 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 útvar, zložený 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, vnikli kopírovaním tej istej molekuly DNA). Prekríženie je dobre viditeľné počas ďalšieho štádia profázy I, **diploténu**, 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 písmeni chí – χ). 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 chizmy 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 dekondujú, 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 zhlučujú pri opačných póloch, dekondujú 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 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



Obr. 7 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.

(alely) týchto génov, sa pri meióze rozchádzajú do rôznych gamét, tento proces sa označuje ako **segregácia** chromozómov resp. génov pri gametogenéze (obr. 7).

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 gény na jednom chromozóme rekombinovať, je crossing-over. Dvojica nesesterských chromatíd sa medzi dvoma 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 jedincem

1.3 Genetická analýza fenotypového znaku

Pod genetickou analýzou rozumieme určenie spôsobu genetickej kontroly fenotypového znaku (počet kontrolujúcich génov, ich vzájomné vzťahy a vzťahy alel a pod.). Základy genetickej analýzy, a tým genetiky ako vednej disciplíny vôbec, položil JOHANN GREGOR MENDEL. Na základe zákonitostí, ktoré popísal vo svojom diele *Versuche über die Pflanzenhybriden*, je možné na základe premenlivosti fenotypového 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).

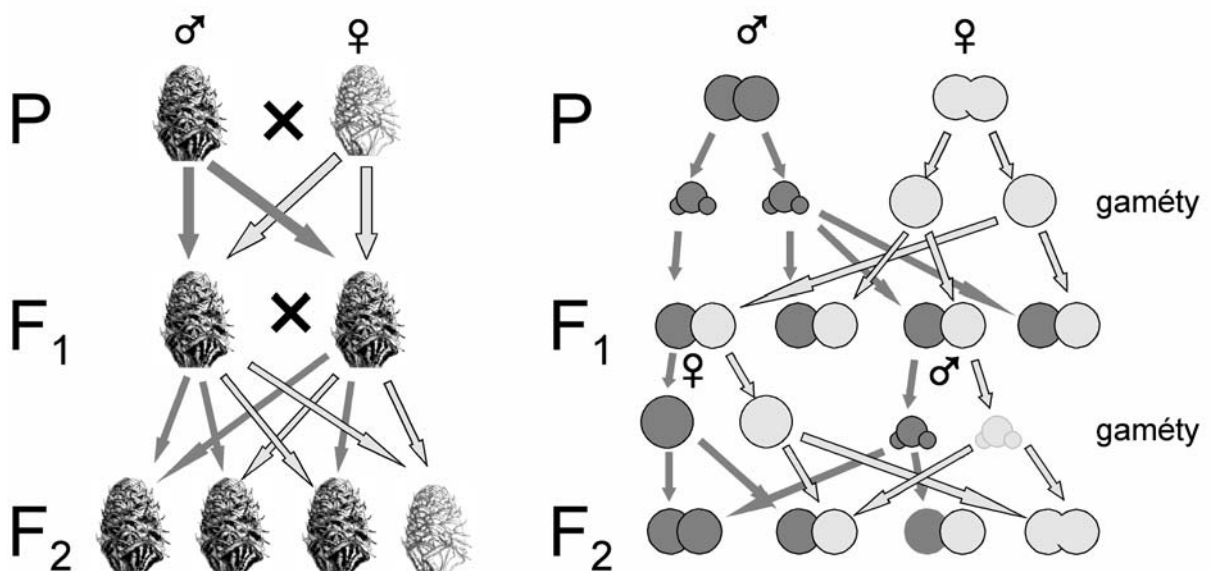
Jednotlivé gény a ich alelické varianty nemusia byť z hľadiska fenotypu rovnocenné, fenotypový prejav závisí nielen od prítomnosti alel v genotype, ale aj od ich vzájomného vzťahu (viď aj kap. 2.1). Častým prípadom vzťahu alel rovnakého génu je **úplná dominancia**. Alela, ktorú označujeme ako **dominantnú**, sa fenotypovo prejaví vždy, ak je v genotype jediná 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 homozygota 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 prejavia nezávisle na sebe, hovoríme o **kodominancii**.

Mendel vykonával svoje pokusy s rozdielnymi odrodami hrachu. Odrody poľnohospodárskych plodín sa vytvárajú dlhodobým systematickým umelým výberom, pri ktorom sa vyberajú nostielia 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, tvorené jedincami, ktoré sú vo väčšine génov homozygotné. Mendel na

Systém krvných skupín človeka *ABO* je kontrolovaný jedným génom s tromi alelami. Alely *A* a *B* sú kodominantné, alela *O* je recesívna. Genotypy *AA* a *AO* sa teda fenotypovo nedajú rozlíšiť, ich nositeľ má v oboch prípadoch krvnú skupinu **A** (prejavuje sa dominancia vloh *A* nad vlohou *O*). To isté platí pre genotypy *BB* a *BO*, nositeľ ktorých má krvnú skupinu **B**. Nositeľ genotypu *AB* má krvnú skupinu **AB** – vloh *A* a *B* sú navzájom kodominantné, teda obe sa prejavujú na fenotype. Krvnú skupinu **O** má len jedinec, ktorý je recesívne homozygotný, teda genotyp *OO*.

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.

Na obr. 8 je znázornené kríženie medzi dvoma jedincami smrekovca, ktoré sa odlišujú farbou samičích strobilov. U smrekovca (ale aj smreka) existujú dva farebné varianty – jedince so tmavými (červanými až purpurovými) samičími strobilmi a jedince so svetlými (svetlozelenými alebo žltými) strobilmi, toto zafarbenie sa dá následne rozoznať aj na dozretých šiškách. 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 variantami znaku. Potomstvo (hybridy tzv. 1. filiálnej generácie – **F₁**) však bude vykazovať len jeden variant znaku, všetky jedince nezávisle na ich počte budú mať červené strobily, potomstvo je teda **uniformné**. Obe recipročné kríženia (t.j. červenokvetý otec × žltokvetá matka aj žltokvetý otec × 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 **F₁**, v 2. filiálnej generácii **F₂** sa bude vyskytovať 75% červených jedincov a 25% žltých jedincov (pravidlo **zákonitého štiepenia v potomstve hybridov**).



Obr. 8 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 nielen overil takýto mechanizmus dedičnosti na celkovo 7 fenotypových znakoch, ale dokázal intuitívne nájsť správne vysvetlenie pre jeho mechanizmus. Je potrebné pripomenúť, že v jeho dobe nebolo nič známe o DNA ani chromozómoch, a všeobecne prijímanou predstavou o fungovaní dedičnosti bola tzv. teória zmiešavania (*blending inheritance*), podľa ktorej potomstvo vykazovalo vždy priemernú fenotypovú hodnotu oboch rodičov. Mendel došiel k správne názoru, že dedičnosť riadia fyzické, samostatné a stále jednotky (termín „gén“ pre tieto jednotky zaviedol až Johansen na začiatku 20. storočia, Mendel používal termín „dedičné faktory“). 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**; treba pripomenúť, že Mendel formuloval svoje pravidlá v polemike s teóriou zmiešavania, podľa ktorej sa vlohy od fenotypovo rozdielnych rodičov navzájom miešajú, výsledkom čoho je priemerný fenotyp potomstva).

Použitím dnešnej terminológie je možné sformulovať popis mechanizmu dedičnosti jednoduchšie. Rodičovské jedince v parentálnej generácii sú homozygotné. V príklade na obr. 9 je otcovský červenokvetý jedinec homozygot v dominantnej alele, t.j. má genotyp **AA**. Keďže na oboch chromozómoch má v gène *A* dominantnú vlohu, je schopný produkovať len peľové zrná s touto vlohou, teda všetky gaméty majú haplotyp *A*. Materský žltokvetý 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 zygota, 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 F₁ generácie červenú farbu strobilov.

F ₁ × F ₁		♂ Aa 	
F ₂		A ●	a ○
♀ Aa 	A ●	AA 	Aa 
	a ○	Aa 	aa 

F ₁ × P♂		♂ AA 
B ₁		A ●
♀ Aa 	A ●	AA 
	a ○	Aa 

F ₁ × P♀		♀ Aa 
B ₁		A ● a ○
♀ aa 	a ○	Aa 
		aa 

Obr. 9 Kombinačný štvorec pri monohybridnom krížení: generácia F₂ (kríženie medzi dvomi hybridmi F₁, šedá farba) a dva typy spätných krížení, t.j. generácia B₁ (kríženie medzi hybridom F₁ a otcovským resp. materským jedincem parentálnej generácie; **tučné písmo**).

Ak skrížime dva hybridné jedince (F₁) navzájom, pomery v ďalšej (F₂) 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% ($A_{\delta} + A_{\phi} \rightarrow AA$, $A_{\delta} + a_{\phi} \rightarrow Aa$, $a_{\delta} + A_{\phi} \rightarrow Aa$, $a_{\delta} + a_{\phi} \rightarrow aa$). 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 ($AA \times Aa \rightarrow 50\% AA + 50\% Aa$). Spätne kríženie hybridu F_1 so žltokvetým materským jedincom generácie P naopak vyprodukuje 50% červenokvetých a 50% žltokvetých jedincov. 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 rozoznateľné 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 F_1 generácie.

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. 10 Dihybridné kríženie

Pri **dihybridnom** krížení sa sleduje dedičnosť dvoch fenotypových znakov súčasne. Aj v tomto prípade platí, že nech sú fenotypy rodičovských jedincov (P) akékoľvek, generácia F_1 bude uniformná. V ďalšej generácii dochádza ku štiepeniu v pomere 9:3:3:1. V príklade na obr. 10 sa jedinci odlišujú vo farbe a tvare samičích strobilov (a následne šišíek). Vlohy pre tmavú farbu a pre krátke a hrubšie strobily sú dominantné, vlohy pre svetlú farbu a pre predĺžené štíhlejšie strobily sú recesívne. Ak v parentálnej generácii krížime jedince, ktoré sú homozygotné v génoch kontrolujúcich oba znaky (v tomto prípade otcovský jedinec je dominantý homozygot v géne pre farbu a recesívny homozygot v géne pre tvar strobilu, materský

jedinec naopak), potomstvo F_1 bude uniformné a buke vykazovať dominantný variant v oboch znakoch (t.j. bude mať tmavé krátke strobily, teda bude sa odlišovať od oboch rodičov). Po krížení dvoch jedincov F_1 medzi sebou sa v potomstve F_2 objavia 4 fenotypy. 9/16 jedincov bude mať tmavé a krátke strobily, rovnako ako jedince F_1 (jedince s aspoň jednou dominantnou alelou v oboch génoch, teda $A_B_$), 3/16 budú mať tmavé ale štíhle strobily, rovnako ako otcovský jedinec v parentálnej generácii (A_bb), 3/16 budú mať svetlé krátke strobily, rovnako ako materský jedinec v parentálnej generácii ($aaB_$) a 1/16 bude mať svetlé a dlhé strobily (nový fenotyp, ktorý sa v prechádzajúcich generáciách 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.

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 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 (aslebo v oboch), je zablokovaný prvý alebo druhý krok syntézy (alebo oba), syntéza farbiva teda neprebíha a list zostane zelený. Rozličné typy dvojgénovej epistázy a im zodpovedajúce štiepne pomery sú uvedené v tab. 2.

Tab. 2 Štiepne pomery pri rôznych typoch epistázy v porovnaní s komplementaritou génov

Účinok génov	Genotypy			
	A_B_	A_bb	aaB_	aabb
Komplementarita	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		

Cieľom genetickej analýzy je práve identifikovať, koľko génov kontroluje daný znak, aké alelické varianty sau nich vyskytujú, a akým spôsobom ovplyvňujú fenotyp. Pri genetickej analýze je možné použiť viacero postupov:

- kontrolované kríženie resp. samoopelenie
- analýza rodokmeňa
- analýza voľnoopeleného potomstva známeho materského jedinca (spoľahlivá genetická analýza je možná len pri neúplnej dominancii alebo kodominancii).

U ihličnatých drevín prichádza pri biochemických a molekulárnych znakoch do úvahy aj

paralelná analýza embryí a endospermov semien. U nahosemenných rastlín je endosperm haploidný a má rovnaký genotyp ako vajíčková bunka, teda materská gaméta. Existuje teda možnosť priameho sledovania segregácie génov v gamétach na základe štiepných pomerov fenotypových variánt v endospermoch.

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.

Kontrolované kríženie a samoopelenie

Pri kontrolovanom opeľovaní krížime medzi sebou jedince rôznych alebo rovnakých fenotypov resp. vykonávame umelé samoopelenie a sledujeme, v akom pomere sa jednotlivé fenotypy objavujú v potomstve z kríženia. V prípade lesných drevín spravidla nemáme k dispozícii vysoko homozygotné čisté línie, musím teda počítať aj s možnosťou, že jedince parentálnej generácie sú v génoch, kontrolujúcich znak, heterozygotné.

Príklad 1.3a: V potomstve zo samoopelenia červenolistého javora mliečneho (*Acer platanoides*) sa našlo 562 červenolistých a 438 zelenolistých jedincov. V potomstve zo samoopelenia zelenolistého jedinca sa našli výlučne zelenolistí jedinci. Pri krížení červenolistej a zelenolistej formy bolo v potomstve nájdených 124 červenolistých a 372 zelenolistých jedincov. Aká je genetická kontrola farby listu a aké sú genotypy rodičovských jedincov?

Riešenie:

Ak vychádzame z hypotézy, že farba listov u javora je kontrolovaná 1 génom, potom v potomstve zo samoopelenia môžeme očakávať štiepny pomer 1:0 (ak je rodičovský jedinec homozygot: $AA \times AA \rightarrow AA$, potomstvo je fenotypovo rovnaké), 3:1 (pri úplnej dominancii, ak je rodičovský jedinec heterozygot: $Aa \times Aa \rightarrow 1/4AA + 1/2Aa + 1/4aa$, pričom dominantní homozygoti AA a heterozygoti Aa sú fenotypovo rovnakí, teda štiepny pomer je 3/4:1/4, 3:1) alebo 1:2:1 (pri neúplnej dominancii, ak je rodičovský jedinec heterozygot: $Aa \times Aa \rightarrow 1/4AA + 1/2Aa + 1/4aa$, pričom homozygoti AA , aa a heterozygoti Aa sú fenotypovo odlišní). V našom prípade bol pozorovaný štiepny pomer 562:438, 1,283:1, čo sa štatisticky významne odlišuje od všetkých troch teoreticky predpokladaných štiepných pomerov. Preto musíme hypotézu o kontrole farby listov jedným génom zamietnuť.

Pri kontrole 2 génmi najzložitejšia situácia môže nastať, ak je rodičovský jedinec heterozygot v oboch génoch. V tomto prípade je **genotypový** štiepny pomer $AaBb \times AaBb \rightarrow 1/16AABB + 2/16AABb + 1/16AAbb + 2/16AaBB + 4/16AaBb + 2/16Aabb + 1/16aaBB + 2/16aaBb + 1/16aabb$. Za predpokladu úplnej dominancie a dvojnásobnej recesívnej epistázy môžeme v potomstve z takéhoto kríženia (ak je vlna pre červenú farbu listov dominantná a vlna pre zelenú farbu recesívna) očakávať štiepny pomer 9:7 $\approx$ 1,285:1 (jedince dominantne homozygotné alebo heterozygotné v oboch génoch sú červenolisté, jedince recesívne homozygotné v aspoň jednom géne sú zelenolisté). Odchýlka pozorovaného štiepného pomeru od teoreticky očakávaného je zanedbateľná a štatisticky nevýznamná. Prvé kríženie (samoopelenie) je teda vysvetliteľné týmto modelom za predpokladu, že rodičovský jedinec je genotypu $AaBb$.

Pri druhom samoopelení bol rodičovský jedinec zelenolistý. Ak platí hypotéza odvodená na základe prvého samoopelenia, musí byť genotypu $AAbb$, $Aabb$, $aabb$, $aaBB$ alebo $aaBb$. Vo všetkých týchto prípadoch akékoľvek samoopelenie môže produkovať len jedincov, ktorí v aspoň jednom z oboch génov budú homozygotní. Druhé samoopelenie teda neodporuje formulovanej hypotéze, genotyp rodičovského jedinca však nevieme jednoznačne určiť.

Pri krížení červenolistej a zelenolistej formy bol získaný štiepny pomer 124:372 $\approx$ 1:3.

Ak červenolistý rodičovský jedinec bol genotypu $AaBb$ a zelenolistý $aabb$, získame v potomstve práve tento pomer (jedinec genotypu $AaBb$ vytvára gaméty 4 typov: AB , Ab , aB , ab , jedinec

pokračovanie

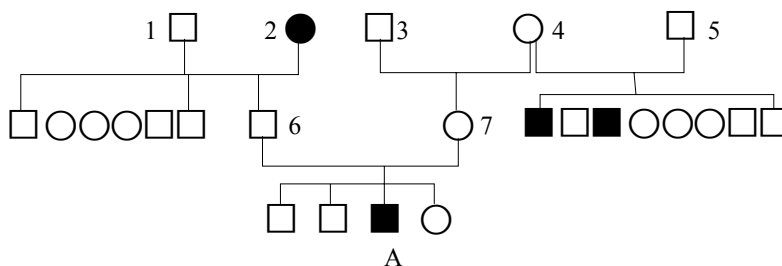
genotypu *aabb* vytvára len gaméty typu *ab*. Pri rovnakej životaschopnosti všetkých gamét budu teda v potomstve rovnako jednou štvrtinou zastúpené genotypy *AaBb*, *Aabb*, *aaBb* a *aabb*, z ktorých len prvý obsahuje obe dominantné alely *A* aj *B*, teda 1/4 potomstva bude červenolistá a 3/4 budú zelenolisté. Žiadna iná kombinácia genotypov červenolistého jedinca (*AABB*, *AaBB*, *AABb*) a zelenolistého jedinca (*AAbb*, *Aabb*, *aaBB*, *aaBb*) nevedie k štiepnemu pomeru 1:3.

Výsledok: na základe štiepných pomerov farby listu v potomstve je možné sa domnievať, že farba listu je kontrolovaná 2 génmi s úplnou dominanciou a epistatickou interakciou medzi génmi (dvojnásobná recesívna epistáza), genotyp červenolistého rodičovského jedinca je *AaBb*, genotyp zelenolistého rodičovského jedinca je *aabb*.

Analýza rodokmeňa

Opačný problém predstavuje identifikácia genotypu konkrétnych jedincov. Predovšetkým v prípade chovu (psy, zvernicový chov poľovnej zveri a pod.) nás spravidla zaujíma, ktoré jedince sú prenášačmi dedičných chorôb a teda predstavujú potenciálne riziko pre chov. Mnohé dedičné choroby sú podmienené defektnými alelami, ktoré majú tendenciu správať sa ako recesívne z dôvodu, ktorý už bol uvedený: 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 zdraví. Z hľadiska ďalšej perspektívy chovu je teda účelné identifikovať ich a vylúčiť z ďalšieho rozmnožovania. Identifikácia na základe fenotypu nie je možná, ale možné je vylíšiť takého jedinca na základe fenotypových prejavov ich predkov alebo ich potomstva.

Príklad 1.3b: V rodokmeni psa A, ktorý je postihnutý vrodeným skrátením spodnej čeľuste, sa toto postihnutie vyskytovalo nasledovne:



□ – pes, ○ – fena

■ – postihnutý jedinec, □ – zdravý jedinec

Dedičná choroba je spôsobená recesívnou defektnou alelou *s* (short mandible). Ktorí jedinci sú jej nositeľmi? (Jedincov, ktorí sú určite jej nositeľmi, označte krížikom, jedincov, ktorí môžu byť jej nositeľmi, označte otáznikom).

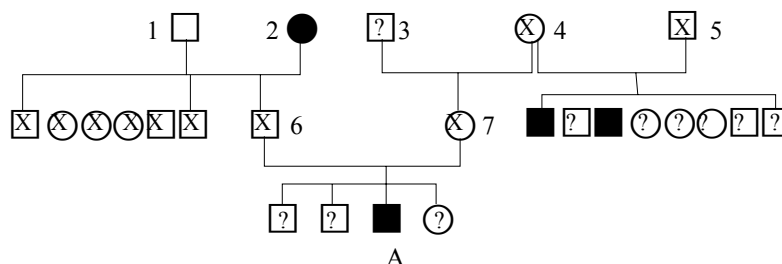
Riešenie:

Vloha pre postihnutie je recesívna, teda prejaví sa len v homozygotnom stave. Pes A je teda recesívny homozygot, recesívny vlohu musel zdediť od oboch rodičov. Oba jeho rodičia sú fenotypovo zdraví, ale musia byť nositeľmi alely *s*. Ak rodičia sú heterozygoti *Ss*, v potomstve sa vyskytujú genotypy *SS*, *Ss* a *ss* v pomere 1:2:1. U fenotypovo zdravých súrodencov psa A nie sme

teda schopní rozlíšiť, či sú dominantní homozygoti, alebo heterozygotní prenášači defektnej alely. Z rodičov psa 6 je matka 2 postihnutá (genotyp ss), otec 1 zdravý (genotyp SS alebo Ss). Ak by otec 1 bol heterozygot Ss , dalo by sa očakávať, že polovica súrodencov psa 6 bude postihnutá ($Ss \times ss \rightarrow 50\%Ss + 50\%ss$). Všetci súrodenci sú však fenotypovo zdraví, aj keď po matke 2 musia byť nositeľmi defektnej alely. Je teda je pravdepodobné, že otec 1 je dominantný homozygot SS , nie je teda prenášačom dedičnej choroby.

Rodičia feny 7 sú obaja zdraví. Pri krížení jej matky 4 so psom 5 objavuje v potomstve 1/4 jedincov s postihnutím (ss). Obaja jedinci 4 a 5 teda musia byť heterozygotnými prenášačmi defektnej alely (Ss). Pre nevlastných súrodencov feny 5 opäť platí, že nie je možné rozlíšiť dominantných homozygotov a heterozygotov. Rovnako toto rozlíšenie nie je možné pri psovi 3, pretože okrem feny 7 nemáme informácie o ďalšom jeho potomstve.

Výsledok

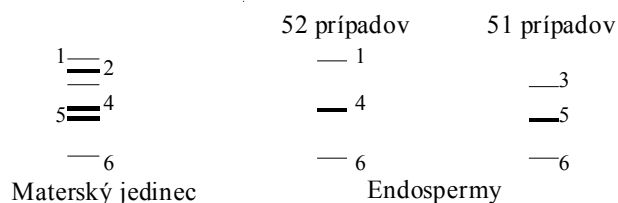


Segregácia biochemického alebo molekulárneho znaku v endospermoch ihličnanov

Ako už bolo uvedené, na endospermoch je možné sledovať len kvalitatívne biochemické alebo molekulárne znaky – prítomnosť či absenciu konkrétnych fragmentov DNA alebo proteínových molekúl. Elektroforézou (separáciou v elektrickom poli) je možné rozlíšiť fragmenty DNA na základe ich veľkosti (dĺžky) a proteínové molekuly na základe ich veľkosti, tvaru a povrchového elektrického náboja (podrobnejšie v kap. 1.3.2). Vzhľadom na to, že proteíny sú priamym výsledkom translácie, ich vlastnosti bezprostredne závisia od genetickej informácie nesenej príslušnými štrukturálnymi génmi. U multimérnych proteínov však vznikajú hybridné molekuly, ktoré sú kombináciou produktov dvoch rôznych alel (intralokusové hybridy), niekedy aj dvoch rôznych génov (interlokusové hybridy). Ich elektroforetická mobilita je spravidla intermediárna medzi mobilitami produktov alel.

Príklad 1.3c:

V endospermoch jedinca smreka obyčajného (*Picea abies*) boli nájdené nasledovné fenotypy enzýmu 6- fosfoglukonát dehydrogenázy:



Koľko génov kontroluje fenotypový prejav tohoto enzýmu a ktoré alely sa u nich vyskytujú?

Riešenie:

Teoreticky každá z frakcií, ktoré sa súčasne vyskytujú v endosperme, môže byť produktom iného génu. V endospermoch sa alternatívne vykytujú frakcie 1 a 3, frakcie 4 a 5, a frakcia 6.

Frakcia 6 v potomstve nie je premenlivá, vyskytuje sa konštantne, je teda pravdepodobné, že je produktom génu nezávislého na géne (génoch), ktorý produkuje ostatné frakcie.

Pokiaľ by dvojice frakcií 1-3 a 4-5 boli produktmi dvoch rôznych génov, mali by sa v prípade voľnej kombinácie vlôh vyskytovať kombinácie 1/4, 1/5, 3/4, 3/5 v pomere 1:1:1:1 (v prípade väzby génov by pomer mohol byť odlišný, ale mali by sa vyskytnúť všetky 4 kombinácie). Aj poloha frakcie 4 presne v strede medzi frakciami 1 a 6 a frakcie 5 v strede medzi 3 a 6 napovedá, že ide o hybridnú molekulu. Frakcie 1 a 3 sú teda produktami dvoch rôznych alel samostatného génu, zatiaľ čo frakcie 4 a 5 predstavujú medzilokusové hybridy.

Frakcia 2 sa v endospermoch nevyskytuje vôbec, na zymograme z diploidného pletiva materského jedinca má polohu presne v strede medzi produktami alel 1 a 3, ide teda o intralokusový hybrid.

Výsledok: Syntézu 6-fosfoglukonát-dehydrogenázy u smreka kontrolujú dva gény, v rýchlejšie migrujúcom géne *6-pgdh-A* sa vyskytujú dve alely, v pomalšie migrujúcom géne *6-pgdh-B* jedna alela. Štruktúra enzýmu je dimérna, jeho molekuly vytvárajú intralokusové aj interlokusové hybridy.

Dedičnosť pohlavia a znakov kontrolovaných gonozomálnymi génmi

Ako bolo spomenuté v kap. 1.1, pohlavné chromozómy sú na rozdiel od autozómov homologické len z malej časti. V prípade cicavcov je pohlavie určené práve prítomnosťou chromozómu Y, konkrétne je to lokus *SRY* (*sex-determining region Y*), obsahujúci gén per 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. jedince s konšteláciou XXY bude mať samčie pohlavie). Pri iných organizmoch môže byť situácia odlišná, pohlavie určuje počet chromozómov X (t.j. jedinec s konšteláciou XXY bude mať samičie pohlavie).

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 pravidlami. Potomstvo v F_1 nemusí byť uniformé a recipročné kríženia neposkytujú rovnaký výsledok.

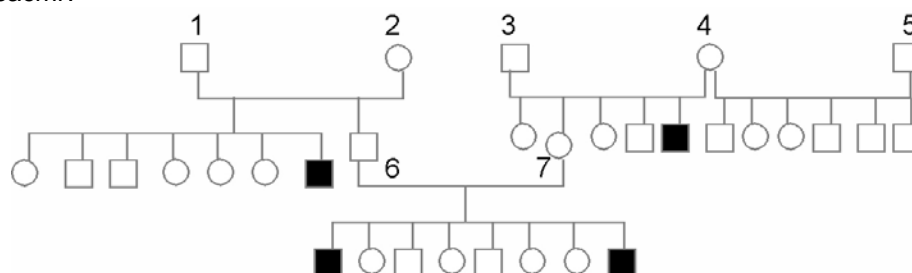
Tab. 3 Fenotypové štiepne pomery v generácii F_1 pri dedičnom postihnutí s gonozomálnou dedičnosťou

matka		otec		F_1		
genotyp	fenotyp	genotyp	fenotyp	genotyp	fenotyp	podiel
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
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

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. 3.

Pochopiteľne, v prípade, že žiadny z rodičov nie je prenášačom postihnutia ($XX \times XY$), je všetko potomstvo zdravé. Ako je však z tab. Xx 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 dvoch prípadoch nie je uniformné.

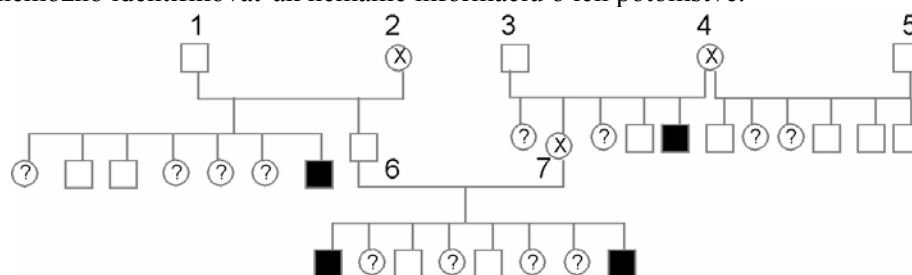
Príklad 1.3d: U psov spôsobuje dedičnú svalovú dystrofiu (CXMD; *canine X-linked muscular dystrophy*) mutácia génu viazaného na chromozóm X (md^+). Ktoré jedince v nasledujúcom chove sú jeho prenášačmi?



Riešenie:

Vloha pre CXMD je recesívna, ale viazaná na gonozóm X, teda prejaví sa v homozygotnom stave (md^+md^+) u samíc alebo u hemizygotných samcov (md^+-). Keďže v potomstve páru 6–7 sa vyskytlo postihnuté potomstvo, jeden z rodičov musí byť prenášačom. Otec je zdravý, teda nemôže byť ani nositeľom md^+ , teda prenášačkou musí byť matka (fena 6). Defektnú vlohu musela získať opäť od niektorého zo svojich rodičov, opäť jej otec (pes 3) bol zdravý, teda prenášačkou musela byť fena 4, čo potvrdzuje aj výskyt postihnutého psa v potomstve páru 3–4. Skutočnosť, že žiadny jedinec v potomstve páru 4–5 nie je postihnutý, ešte nevyvracia možnosť, že fena 4 môže byť prenášačkou. Pravdepodobnosť, že prenášačka bude mať so zdravým partnerom 4 zdravé šteňatá samčieho pohlavia je síce nízka (1/16), ale nie nulová. Analogicky aj v páre 1–2 musí byť jeden z partnerov prenášačom, a keďže pes 1 je zdravý, nositeľkou defektnej alely musí byť fena 2.

V celom rodokmeni zdravé psy nemôžu byť prenášačmi (ak by boli nositeľmi md^+ , musela by sa u nich choroba prejavíť, keďže nemôžu mať na chromozóme Y záložnú funkčnú kópiu md). Všetko samičie potomstvo prenášačky je fenotypovo zdravé, ale medzi fenkami je opäť 50% prenášačiek, ktoré však nemožno identifikovať ak nemáme informáciu o ich potomstve.



Polygénna dedičnosť

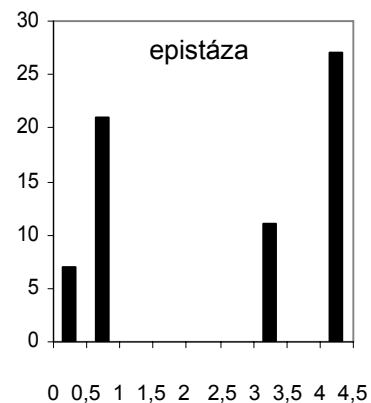
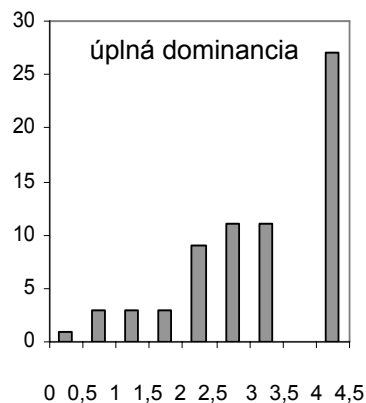
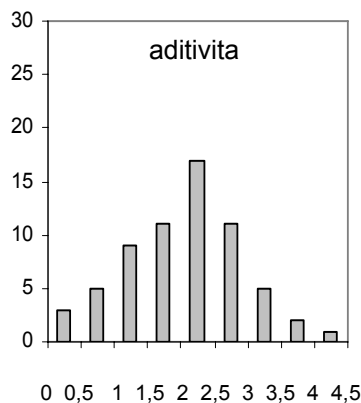
Ako je uvedené v kap. 1.1, vzťah 1 gén = 1 znak neplatí. V mnohých prípadoch môže gén súčasne ovplyvňovať viacero znakov, čo sa označuje ako pleiotropný účinok génu. Naopak, väčšina kvantitatívnych znakov s kontinuálnym rozdelením býva kontrolovaná polygénne,

Príklad 1.3e: Fenotypovú hodnotu hypotetického znaku určujú 3 gény. Oproti genotypu *aabbcc* s fenotypovou hodnotou 0 zvyšuje prítomnosť alely *A* fenotypovú hodnotu o 0,9 jednotky, alely *B* o 0,75 jednotky a alely *C* o 0,4 jednotky. Aké bude fenotypové rozdelenie v F_2 generácii, ak v parentálnej generácii krížime homozygotov s extrémnymi fenotypmi *AABBCC* a *aabbcc* pri aditivite, úplnej dominancii, a dvojnásobnej recesívnej epistáze génov *A* a *B*?

Riešenie:

V F_1 budú zastúpené heterozygoty *AaBbCc*, a to nezávisle na možných interakciách medzi alelami a génmi, teda hybridné potomstvo bude uniformné. V dostaneme nasledovné fenotypy (výsledná fenotypová hodnota každého genotypu (Ph) je daná súčtom fenotypových hodnôt za jednotlivé gény), a rozdelenie fenotypových hodnôt (početnosť jednotlivých fenotypov (*N*) vyplýva zo štiepneho pomeru 1:2:1):

genotyp	N	aditivita				úplná dominancia				epistáza		
		<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	Ph	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	Ph	<i>AB</i>	<i>C</i>	Ph
<i>AABBCC</i>	1	1,8	1,5	0,8	4,1	1,8	1,5	0,8	4,1	3,3	0,8	4,1
<i>AABBCc</i>	2	1,8	1,5	0,4	3,7	1,8	1,5	0,8	4,1	3,3	0,8	4,1
<i>AABBcc</i>	1	1,8	1,5	0	3,3	1,8	1,5	0	3,3	3,3	0	3,3
<i>AABbCC</i>	2	1,8	0,75	0,8	3,35	1,8	1,5	0,8	4,1	3,3	0,8	4,1
<i>AABbCc</i>	4	1,8	0,75	0,4	2,95	1,8	1,5	0,8	4,1	3,3	0,8	4,1
<i>AABbcc</i>	2	1,8	0,75	0	2,55	1,8	1,5	0	3,3	3,3	0	3,3
<i>AAbbCC</i>	1	1,8	0	0,8	2,6	1,8	0	0,8	2,6	0	0,8	0,8
<i>AAbbCc</i>	2	1,8	0	0,4	2,2	1,8	0	0,8	2,6	0	0,8	0,8
<i>Aabbcc</i>	1	1,8	0	0	1,8	1,8	0	0	1,8	0	0	0
<i>AaBBCC</i>	2	0,9	1,5	0,8	3,2	1,8	1,5	0,8	4,1	3,3	0,8	4,1
<i>AaBBCc</i>	4	0,9	1,5	0,4	2,8	1,8	1,5	0,8	4,1	3,3	0,8	4,1
<i>AaBBcc</i>	2	0,9	1,5	0	2,4	1,8	1,5	0	3,3	3,3	0	3,3
<i>AaBbCC</i>	4	0,9	0,75	0,8	2,45	1,8	1,5	0,8	4,1	3,3	0,8	4,1
<i>AaBbCc</i>	8	0,9	0,75	0,4	2,05	1,8	1,5	0,8	4,1	3,3	0,8	4,1
<i>AaBbcc</i>	4	0,9	0,75	0	1,65	1,8	1,5	0	3,3	3,3	0	3,3
<i>AabbCC</i>	2	0,9	0	0,8	1,7	1,8	0	0,8	2,6	0	0,8	0,8
<i>AabbCc</i>	4	0,9	0	0,4	1,3	1,8	0	0,8	2,6	0	0,8	0,8
<i>Aabbcc</i>	2	0,9	0	0	0,9	1,8	0	0	1,8	0	0	0
<i>aaBBCC</i>	1	0	1,5	0,8	2,3	0	1,5	0,8	2,3	0	0,8	0,8
<i>aaBBCc</i>	2	0	1,5	0,4	1,9	0	1,5	0,8	2,3	0	0,8	0,8
<i>aaBBcc</i>	1	0	1,5	0	1,5	0	1,5	0	1,5	0	0	0
<i>aaBbCC</i>	2	0	0,75	0,8	1,55	0	1,5	0,8	2,3	0	0,8	0,8
<i>aaBbCc</i>	4	0	0,75	0,4	1,15	0	1,5	0,8	2,3	0	0,8	0,8
<i>aaBbcc</i>	2	0	0,75	0	0,75	0	1,5	0	1,5	0	0	0
<i>aabbCC</i>	1	0	0	0,8	0,8	0	0	0,8	0,8	0	0,8	0,8
<i>aabbCc</i>	2	0	0	0,4	0,4	0	0	0,8	0,8	0	0,8	0,8
<i>aabbcc</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



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). V najjednoduchšom prípade sa účinky jednotlivých alel sčítavajú (aditívny účinok génov). V tomto prípade sa v F_2 s narastajúcim počtom kontrolujúcich génov nezávisle na veľkosti ich účinkov na fenotyp rozdelenie fenotypových hodnôt približuje normálnemu rozdeleniu. Komplikovanejšie pomery nastávajú, ak niektorý z génov vykazuje dominanciu, alebo ak sa v niektorých dvojiciach či väčších skupinách génov uplatňuje epistáza. Účinky génov sa takisto môžu znásobovať, v tom prípade hovoríme o multiplikačnom efekte.

1.4 Populačná genetika

Populácia je súbor jedincov rovnakého druhu, obývajúcich konkrétny biotop v konkrétnom čase, ktorí sú schopní sa navzájom medzi sebou krížiť.

Populácia je charakterizovaná viacerými vlastnosťami (veľkosť, hustota, dynamika vývoja, štruktúra, rozptyl atď.). Tieto vlastnosti ovplyvňujú v značnej miere vývoj jej genetickej štruktúry. Z genetického hľadiska sú najdôležitejšími vlastnosťami **efektívna veľkosť**, závisiaca nielen od početnosti populácie, ale aj od miery, v akej sa jedinci populácie podieľajú na jej reprodukcii, a **systém reprodukcie**, t.j. spôsob odovzdávania genetickej informácie z jednej generácie na nasledujúcu.

Genetickú štruktúru populácie definujú podiely jednotlivých genotypov (genotypová štruktúra) a podiely jednotlivých génov resp. ich variantov – alel (alelická štruktúra), čiže genotypové a alelické **frekvencie**. Frekvencie sa dajú vyjadriť ľubovoľným spôsobom (absolútnym počtom pri známej veľkosti populácie, relatívnym podielom, percentuálne), ale 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 je možné určiť frekvencie genotypov presne, ale spravidla sme odkázaní na výberové postupy a odhad genotypových a alelických frekvencií z výberovej vzorky. Frekvencia i . genotypu sa potom dá odhadnúť ako $P(A_i A_j) = n(A_i A_j) / \sum_k \sum_l n(A_k A_l) = n(A_i A_j) / N$ (bodový odhad), kde $n(A_i A_j)$ je počet jedincov genotypu $A_i A_j$ vo výberovej vzorke ($k, l = 1 \dots$ celkový počet alel) a N je celkový rozsah výberu (celková početnosť všetkých genotypov spolu vo výberovej vzorke). Frekvencia i . alely sa určí z podielov genotypov, v ktorých je daná alela zastúpená: $p(A_i) = P(A_i A_i) + \sum_j 0,5P(A_i A_j); j \neq i$ (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 (frekvencie) majú binomické rozdelenie. Variancia odhadu premennej s binomickým rozdelením je vo všeobecnosti $V_p = p(1 - p)/n$, stredná chyba je domocninou variancie. Stredná chyba odhadu frekvencie genotypu $A_i A_j$ je teda $s_{P(A_i A_j)} = \sqrt{P(A_i A_j) \cdot [1 - P(A_i A_j)] / N}$, 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).

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 splňajú, majú väčšiu šancu spojiť sa pri reprodukcii, než jedince, ktoré ich neplnia (napr. stromy, kvitnúce v rovnakej dobe, majú vyššiu šancu vzájomného opelenia než

Príklad 1.4a Vo vzorke jedincov analyzovaných v populácii smreka obyčajného v NPR Zadná Poľana sa našli nasledovné počty genotypov v gène pre jadrovú glutamát-oxaloacetát-transaminázu (*Got-B*): 22 ks *Got-B₁B₁*, 58 ks *Got-B₁B₂*, 102 ks *Got-B₂B₂*, 2 ks *Got-B₂B₃*. Aké sú odhadované frekvencie genotypov a alel v gène *Got-B* v tejto populácii a aké sú stredné chyby týchto odhadov?

Riešenie: Celkový rozsah výberovej vzorky je $22+58+102+2=184$ jedincov. Zastúpenie genotypov je nasledovné:

$$Got-B_1B_1 \ P(B_1B_1) = 22/184 = 0,1196$$

$$\text{Stredná chyba tohto odhadu je } s_{P(B_1B_1)} = \sqrt{0,1196 \cdot (1 - 0,1196) / 184} = 0,0239$$

$$Got-B_1B_2 \ P(B_1B_2) = 58/184 = 0,3152 \pm 0,0342$$

$$Got-B_2B_2 \ P(B_2B_2) = 102/184 = 0,5543 \pm 0,0366$$

$$Got-B_2B_3 \ P(B_2B_3) = 2/184 = 0,0109 \pm 0,0077$$

Podiely alel:

$$Got-B_1: p_1 = 0,1196 + \frac{1}{2} 0,3152 = 0,2772$$

$$\text{Stredná chyba tohto odhadu je } s_{P(B_1)} = \sqrt{0,2772 \cdot (1 - 0,2772) / (2 \cdot 184)} = 0,0233$$

$$Got-B_2: p_2 = 0,5543 + \frac{1}{2} 0,3152 + \frac{1}{2} 0,0109 = 0,7174 \pm 0,0235$$

$$Got-B_3: p_3 = \frac{1}{2} 0,0109 = 0,0054 \pm 0,0038$$

stromy, ktoré sú fenologicky asynchrónne). Kritériom výberu môže byť aj príbuzenstvo, príbuzenské kríženia sa označuje aj termínom **inbreeding**. Extrémnym prípadom príbuzenského kríženia je **autogamia** (samoopelenie resp. samooplodnenie). V reálnych populáciách sa samozrejme vyskytujú prechody medzi oboma extrémami.

Základnou zákonitosťou, ktorá popisuje prenos genetickej informácie medzi generáciami v panmiktickej populácii, je **Hardy-Weinbergov zákon**, podľa ktorého gametická konštitúcia populácie (t.j. zastúpenie jednotlivých alelických variánt v gamétach) je z generácie na generáciu konštantná, ak v populácii nepôsobí žiadny z faktorov, ktoré tento stav môžu zmeniť: selekcia, mutácie, migrácia a genetický drift. Stačí jedna generácia náhodného párovania, aby sa ustanovili aj konštantné podiely jednotlivých genotypov, ktoré zodpovedajú binomickému (pri 2 alelách) resp. multinomickému (pri viacerých alelách) pravdepodobnostnému rozdeleniu.

Je potrebné pripomenúť, že Hardy-Weinbergov zákon popisuje idealizovaný stav populácie, vzťahuje sa na autozomálne lokusy, a platí len v efektívne nekonečne veľkých populáciách za predpokladu oddelených generácií.

Platnosť Hardy-Weinbergovho princípu možno najjednoduchšie demonštrovať na príklade génu s dvoma alelami:

Ak v generácii t je v populácii zastúpená dominantná alela A s frekvenciou p a recesívna alela a s frekvenciou q , možno zastúpenie genotypov v generácii $t + 1$ určiť na základe najjednoduchších zákonitostí kombinatoriky. Predpokladom je, že genetická štruktúra oboch pohlaví je rovnaká (t.j. alelické frekvencie sa neodlišujú medzi pohlaviami: $p_{\delta} = p_{\text{♀}}$; $q_{\delta} = q_{\text{♀}}$). Pravdepodobnosť vzniku dominantne homozygotného genotypu AA , t.j. prípad, ak sa do zygoty spoja dve gaméty, ktoré sú nositeľkami dominantnej alely A , je $p_{\delta} \times p_{\text{♀}} = p^2$. Analogicky, pravdepodobnosť vzniku recesívne homozygotného genotypu aa je $q_{\delta} \times q_{\text{♀}} = q^2$. Pravdepodobnosť spojenia dvoch genotypovo rozdielnych gamét s alelami A a a do heterozygotnej zygoty Aa je $p_{\delta} \times q_{\text{♀}} + p_{\text{♀}} \times q_{\delta} = 2pq$. 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. Dominantní homozygoti AA , zastúpení v populácii podielom p^2 , tvoria len gaméty s dominantnou alelou A . U heterozygotov Aa , ktorí sú v populácii zastúpení podielom $2pq$, 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 rece-

sívnu alelu a . Podiel gamét s dominantnou alelou preto bude $p^2 + \frac{1}{2} 2pq = p^2 + pq = p(p + q)$. Analogicky, recesívna alela bude zastúpená vo všetkých gamétach produkovaných recesívnymi homozygotmi aa (podiel q^2) a v polovici gamét produkovaných heterozygotmi Aa , teda podiel gamét s recesívnou alelou preto bude $q^2 + \frac{1}{2} 2pq = q^2 + pq = q(p + q)$. Ak sú v populácii zastúpené len alely A a a , súčet ich frekvencií je 100%, teda $p + q = 1$, čoho dostávame opäť frekvencie $p \times 1 = p$; $q \times 1 = q$.

Pre prehľadnosť je možné celý mechanizmus popísať tabelárnou formou (tab. 4)

Tab. 4 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	...		

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

Obr. 11 Očakávané podiely potomstva pri náhodnom párovaní gamét

Tento popis mechanizmu reprodukcie je akceptovateľný u rastlín, kde samčie gaméty (presnejšie samčie gametofyty, teda peľové zrná) sa voľne pohybujú v priestore a náhodne dopadnú na samičiu pohlavnú bunku. V prípade živočíchov je však takýto popis krajným zjednodušením, v tomto prípade sa párujú nie haploidné gaméty, ale diploidné dospelé organizmy. Aj tu však platí, že pravdepodobnosť párovania dvoch genotypov je úmerná ich zastúpeniu v populácii (t.j. očakávaná frekvencia genotypovej kombinácie je rovná súčinu

frekvencií genotypov; obr. 12). Pri popise panmixie v živočíšnej populácii a dohade očakávaných podielov alel a genotypov je potrebné zohľadniť zastúpenie genotypov v rodičovskej generácii a genotypové štiepne pomery pri jednotlivých typoch kríženia (tab. 5).

Tab. 5 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	¼H ²	½H ²	¼H 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 =p ²	PH+2PQ+QH+½H ² =2(P+½H)(Q+½H) =2pq	Q ² +QH+¼H ² =(Q+½H) ² =q ²		
Generácia 1		Genotypové frekvencie potomstva				
Kríženie	Frekv					
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 =p ²	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 =q ²	p ² +½·2pq =p ² +pq=p	q ² +½·2pq =q ² +pq=q
Generácia 2						
...						

Z oboch tabuliek je zrejmé, že stačí jedna generácia náhodného kríženia, a v populácii sa nezávisle na východiskových frekvenciách genotypov (P , H , Q) ustáli konštantná genotypová štruktúra, v prípade bialelického lokusu p^2 homozygota AA , $2pq$ heterozygotov Aa a q^2 homozygotov aa . Túto štruktúru však možno rozšíriť na gén s ľubovoľným počtom alel: frekvencia ľubovoľného homozygota je p_i^2 , frekvencia ľubovoľného heterozygota $2p_i p_j$. 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 géne viazanom na chromozóm X sa môže dediť od oboch rodičov (obr. 13).

Gény viazané na chromozóm X sa vyskytujú u homogametického pohlavia (v prípade

		♂		
		<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. 12 Pravdepodobnosti vzniku jednotlivých genotypových rodičovských kombinácií a zastúpenie genotypov v ich potomstve

		♂	
		<i>R A0</i>	<i>S a0</i>
♀	<i>P AA</i>	PR $\text{♀}AA \times \text{♂}A0$ 0,5 ♀ AA + 0,5 ♂ A0	PS $\text{♀}AA \times \text{♂}a0$ 0,5 ♀ Aa + 0,5 ♂ A0
	<i>H Aa</i>	HR $\text{♀}Aa \times \text{♂}A0$ 0,25 ♀ AA + 0,25 ♀ Aa + 0,25 ♂ A0 + 0,25 ♂ a0	HS $\text{♀}Aa \times \text{♂}a0$ 0,25 ♀ Aa + 0,25 ♀ aa + 0,25 ♂ A0 + 0,25 ♂ a0
	<i>Q aa</i>	QR $\text{♀}aa \times \text{♂}A0$ 0,5 ♀ Aa + 0,5 ♂ a0	QS $\text{♀}aa \times \text{♂}a0$ 0,5 ♀ aa + 0,5 ♂ a0

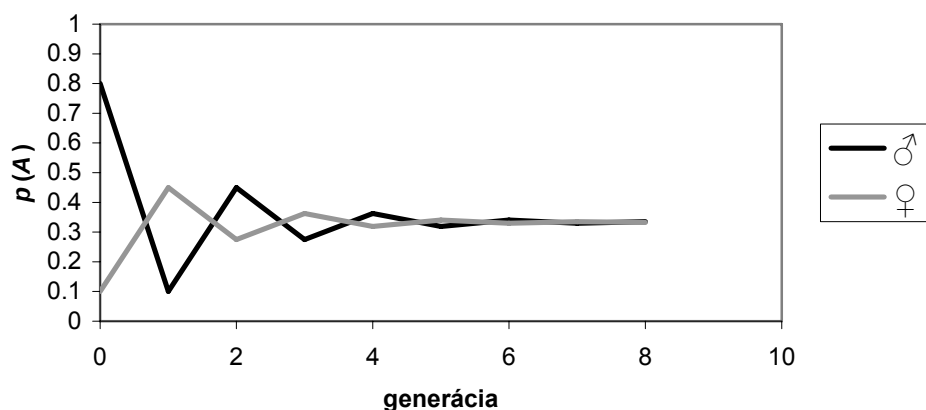
Obr. 13 Pravdepodobnosti vzniku jednotlivých genotypových rodičovských kombinácií a zastúpenie genotypov v ich potomstve pri gonozomálnych génoch

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 tretinou. 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

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

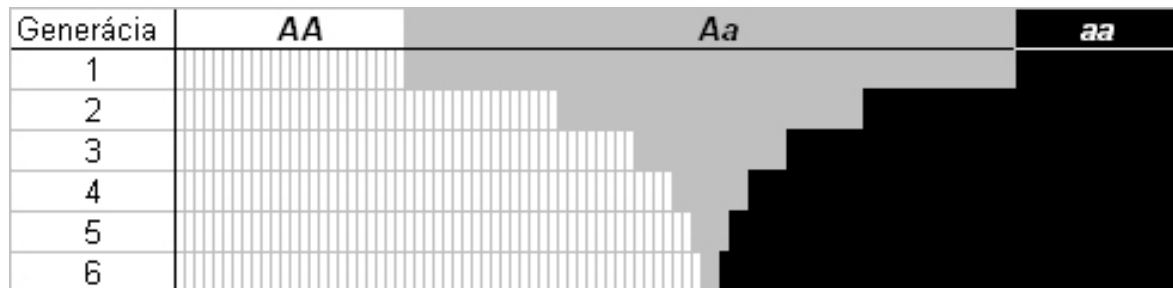
(analogicky $q = \frac{1}{3}(2Q + H + S)$).

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. 14).



Obr. 14 Vývoj frekvencie alely viazanej na X chromozóm u samcov a samíc v panmiktickej populácii.

Analogicky možno ilustrovať vývoj genotypovej štruktúry autogamnej populácie. 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



Obr. 15 Schéma vývoja genotypovej štruktúry populácie obligátne autogamného organizmu

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 exponenciálne klesá vždy na polovicu podielu v predchádzajúcej generácii (obr. 15). Populácia sa rozpadá na zmes homozygotných čistých línií.

Tab. 6 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	$P + 7/16 H$	$H/8$	$Q + 7/16 H$

1.4.1 Mechanizmy selekcie

Pod selekciou (výberom) rozumieme zmeny zastúpenia génov vyplývajúce z rozdielnej životaschopnosti či plodnosti ich nositeľov (prírodný výber), alebo z rozdielnych vlastností hospodársky či inak dôležitých pre človeka (umelý výber). Prírodný výber je jedným zo základných faktorov evolúcie. Jedinci, ktorí sú optimálne prispôbení danému prostrediu majú väčšiu šancu dožiť sa reprodukčného veku. Miera, v akej sa ich gény uplatnia pri utváraní následnej generácie, závisí od ich plodnosti (ktorá je daná množstvom produkovaného potomstva resp. produkovaných gamét, schopnosťou párovania a ďalších faktorov). Frekvencia génov, ktorých nositeľmi sú vysoko životaschopní a plodní jedinci sa teda v populácii z generácie na generáciu zvyšuje, naopak gény ostatných jedincov z populácie v priebehu generácií ubúdajú. Celková výslednica životaschopnosti a plodnosti sa označuje ako **relatívna biologická zdatnosť** jedinca (často sa aj v slovenskej literatúre používa anglický termín **fitness**) a možno ju definovať ako relatívnu schopnosť genotypu odovzdávať svoje alely do ďalších generácií.

Umelý výber je základnou metódou šľachtenia. Jeho dopad na genofond populácie je rovnaký ako u prírodného výberu, ale kritériom tu nie je životaschopnosť a plodnosť, ale znaky, ktoré sú pre človeka významné z hospodárskeho či iného hľadiska.

Podiel jedincov konkrétneho genotypu, ktoré sú v každej generácii z populácie v dôsledku selekcie vylúčené, označujeme ako selekčný koeficient s . Ak $s = 0$, ide o maximálne životaschopný a maximálne plodný genotyp. Pri $s = 1$ ide o genotyp, ktorého všetci nositelia sú z populácie vylúčení ešte pred dosiahnutím dospelosti alebo sú neschopní reprodukcie.

Efekt selekcie je možné merať zmenou frekvencie alel za jednu generáciu $\Delta q = q_{t+1} - q_t$. Selekcia môže za určitých okolností viesť k ustáleniu rovnováhy, t.j. k situácii, keď sa frekvencie alel ďalej nemenia ($\Delta q = 0$).

Kompletná eliminácia recesívnych homozygotov

Pri kompletnej eliminácii recesívnych homozygotov sú selekčné koeficienty nasledovné:

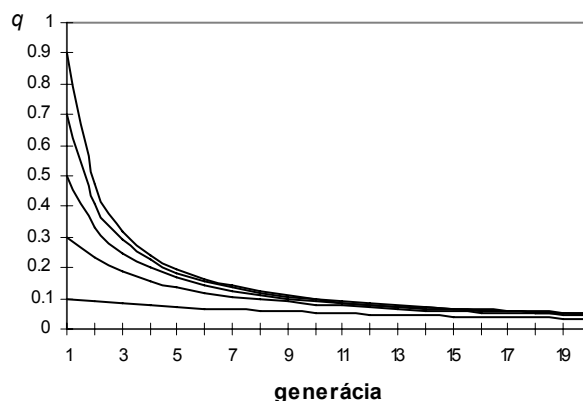
$$s_{AA} = s_{Aa} = 0, s_{aa} = 1.$$

Najčastejšou príčinou totálnej selekcie sú tzv. **letálne** alely, ktoré podmieňujú výskyt celého radu dedičných chorôb. Vznikajú najčastejšie poškodením génu mutáciou, ktorá spôsobí, že produkt génu (enzým) nie je schopný plniť svoju biochemickú funkciu. Pokiaľ ide o enzým, ktorého funkcia je pre organizmus životne dôležitá, nositeľ poškodeného génu nie je schopný prežiť. Letálne alely majú tendenciu správať sa recesívne. Ak jedinec získa od oboch rodičov poškodenú alelu a (homozygot aa), neprodukuje funkčný enzým, teda v niektorom štádiu vývoja (spravidla skoro) odumrie. Ak jedinec aspoň od jedného z rodičov získa funkčný gén A (heterozygot Aa alebo homozygot AA), jeho životné funkcie nie sú narušené, teda prežíva.

Úbytok frekvencie letálnej alely za 1 generáciu možno vypočítať ako $\Delta q = q/(1+q) - q = [q - q(1+q)]/(1+q) = -q^2/(1+q)$. Rýchlosť poklesu frekvencie je teda priamo úmerná štvorcu frekvencie alely – ak je východisková frekvencia vysoká, pokles je rýchly, ak sa frekvencia pohybuje rádovo na úrovni 1% alebo 1‰, pokles sa prakticky nedá pozorovať ani cez viacero generácií. Rýchlosť poklesu frekvencie recesívnej alely je maximálna pri intermediárnych frekvenciách ($q \approx 0,6$). Rovnováha sa v populácii nemôže ustáliť, resp. môže sa nastoliť pri teoreticky nekonečnom počte generácií kompletnej eliminácie recesívnej alely ($q = 0$ ak $-q^2/(1+q) = 0$, riešením tejto rovnice dostaneme $q = 0$).

Tab. 7 Vývoj alelických a genotypových štruktúr pri kompletnej eliminácii recesívnych homozygotov

Generácia	Genotypové frekvencie				Frekvencie alel v gamétach		
	AA	Aa	aa	Spolu	A	a	Spolu
0	P	H	Q	1	$p=P+H/2$	$q=Q+H/2$	1
1 – zygoty pred selekciou	p^2	$2pq$	q^2	1			
1 – po eliminácii aa	p^2	$2pq$	0	p^2+2pq			
1 – nové frekvencie u dospelých jedincov	$p^2/(p^2+2pq)$	$2pq/(p^2+2pq)$	$0/(p^2+2pq)$	1	$\frac{p^2/(p^2+2pq) + \frac{1}{2} 2pq/(p^2+2pq)}{(p^2+pq)/(p^2+2pq)} = \frac{p(p+q)}{p(p+2q)} = \frac{1}{1+q}$	$\frac{0/(p^2+2pq) + \frac{1}{2} 2pq/(p^2+2pq)}{(0+pq)/(p^2+2pq)} = \frac{pq/p(p+2q)}{pq/p(p+2q)} = \frac{q}{1+q}$	1
2	$1/(1+q)^2$	$2q/(1+q)^2$	$q^2/(1+q)^2$	1	...		



Obr. 16 Vývoj frekvencie recesívnej alely pri kompletnej eliminácii recesívnych homozygotov

Príklad 1.4.1a: $p = 0,8$; $q = 0,2$							
Riešenie:							
Generácia	Genotypové frekvencie				Frekvencie alel v gamétach		
	AA	Aa	aa	Spolu	A	a	Spolu
0					p 0,8	q 0,2	1
1 – zygoty pred selekciou	p^2 $= 0,8^2$ $= 0,64$	$2pq$ $= 2 \cdot 0,8 \cdot 0,2$ $= 0,32$	q^2 $= 0,2^2$ $= 0,04$	1			
1 – po eliminácii aa	p^2 0,64	$2pq$ 0,32	0	p^2+2pq $= 0,96$			
1 – nové frekvencie u dospelých jedincov	$p^2/(p^2+2pq)$ $= 0,64/0,96$ $= 0,667$	$2pq/(p^2+2pq)$ $= 0,32/0,96$ $= 0,333$	$0/(p^2+2pq)$ $= 0/0,96$ $= 0$	1	$0,667 + \frac{1}{2} 0,333$ $= 0,833$	$0 + \frac{1}{2} 0,333$ $= 0,167$	1
2	$0,833^2$ $= 0,694$	$2 \cdot 0,833 \cdot 0,167$ $= 0,278$	$0,167^2$ $= 0,028$	1	...		

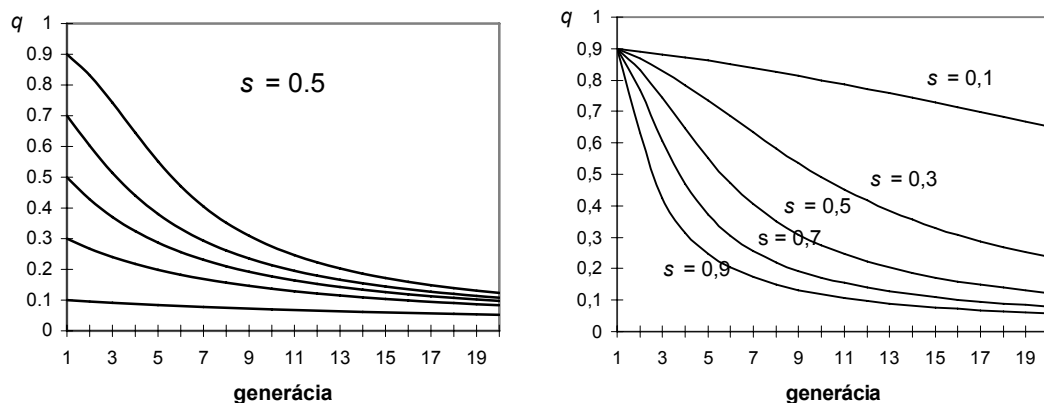
Parciálna selekcia proti recesívnym homozygotom

Pri parciálnej selekcii proti recesívnym homozygotom sú selekčné koeficienty nasledovné: $s_{AA} = s_{Aa} = 0$, $0 < s_{aa} < 1$. Pre zjednodušenie označme selekčný koeficient recesívnych homozygotov ako s . Ak frekvencia recesívnych homozygotov pred selekciou je q^2 , ich úbytok z populácie v dôsledku selekcie je $-sq^2$, v populácii ich po selekcii teda zostáva $(1-s)q^2$.

Parciálna selekcia je podstatne častejším a z biologického hľadiska významnejším prípadom. Funkčné produkty rôznych alel rovnakého génu môžu mať v dôsledku rozdielnej štruktúry rozdielne vlastnosti, enzým produkovaný jednou alelou môže mať optimum svojej funkcie v určitých podmienkach (pH, teplota atď.), produkt inej alely v iných podmienkach. Okrem toho, celková fitness jedinca nie je výsledkom účinku jediného génu (s výnimkou letálnych alel), ale celého súboru génov, teda nevhodný genotyp v jednom gène môže byť kompenzovaný vhodným genotypom v iných génoch. Priemerná fitness konkrétneho genotypu teda spravidla nebýva rovná 0 alebo 1 ako pri totálnej selekcii, ale je úmerná miere, akou sa daný gén podieľa na celkovej fitness jedinca. Parciálna selekcia je teda hlavným mechanizmom adaptácie na podmienky prostredia, z generácie na generáciu sa v jej dôsledku

Tab. 8 Vývoj frekvencie recesívnej alely pri parciálnej selekcii proti recesívnym homozygotom

Generácia	Genotypové frekvencie				Frekvencie alel v gamétach		
	AA	Aa	aa	Spolu	A	a	Spolu
0	P	H	Q		$p=P+H/2$	$q=Q+H/2$	1
1 – zygoty pred selekciou	p^2	$2pq$	q^2	1			
1 – po selekcii	p^2	$2pq$	$(1-s)q^2$	$1-sq^2$			
1 – nové frekvencie u dospelých jedincov	$p^2/(1-sq^2)$	$2pq/(1-sq^2)$	$(1-s)q^2/(1-sq^2)$	1	$\frac{p^2/(1-sq^2) + \frac{1}{2} 2pq/(1-sq^2)}{(p^2+pq)/(1-sq^2)} = \frac{p(p+q)/(1-sq^2)}{p/(1-sq^2)}$	$\frac{(1-s)q^2/(1-sq^2) + \frac{1}{2} 2pq/(1-sq^2)}{(q^2-sq+pq)/(1-sq^2)} = \frac{q(p+q-sq)/(1-sq^2)}{q(1-sq)/(1-sq^2)}$	1
2	...						



Obr. 17 Vývoj frekvencie recesívnej alely pri parciálnej selekcii proti recesívnym homozygotom v závislosti na východiskovej frekvencii (vľavo) a selekčnom koeficiente (vpravo)

Príklad 1.4.1b: $p = 0,2$, $q = 0,8$, $s_{aa} = 0,6$

Riešenie:

Generácia	Genotypové frekvencie				Frekvencie alel v gamétach		
	<i>AA</i>	<i>Aa</i>	<i>aa</i>	Spolu	<i>A</i>	<i>a</i>	Spolu
0					$p = 0,2$	$q = 0,8$	1
1 – zygoty pred selekciou	$p^2 = 0,2^2 = 0,04$	$2pq = 2 \cdot 0,2 \cdot 0,8 = 0,32$	$q^2 = 0,8^2 = 0,64$	1			
1 – po selekcii	$p^2 = 0,04$	$2pq = 0,32$	$(1-s)q^2 = (1-0,6) \cdot 0,64 = 0,256$	$0,04 + 0,32 + 0,256 = 0,616$			
1 – nové frekvencie u dospelých jedincov	$0,04/0,616 = 0,065$	$0,32/0,616 = 0,519$	$0,256/0,616 = 0,416$	1	$0,065 + \frac{1}{2} \cdot 0,519 = 0,324$	$0,416 + \frac{1}{2} \cdot 0,519 = 0,676$	1
2 – pred selekciou	$0,324^2 = 0,105$	$2 \cdot 0,324 \cdot 0,676 = 0,438$	$0,676^2 = 0,457$	1	...	...	

zvyšuje zastúpenie alel, ktoré sú pre konkrétne podmienky prostredia optimálne. Opäť platí, že alely, ktoré sú pre dané prostredie menej vhodné, majú tendenciu spráčať sa recesívne, t.j. znížená fitness sa prejaví len pri homozygotnom genotype, pretože ak jedinec aspoň od jedného z rodičov získa optimálnu alelu, jeho biochemický mechanizmus funguje bez narušenia.

Zmenu frekvencie selektovanej alely za 1 generáciu možno určiť ako

$\Delta q = q(1 - sq)/(1 - sq^2) - q = [q(1 - sq) - q(1 - sq^2)] / (1 - sq^2) = -sq^2(1 - q)/(1 - sq^2) = -spq^2/(1 - sq^2)$. Úbytok je teda rýchly len pri silnej selekcii (vysoký koeficient s) a pri nepriaznivom východiskovom stave populácie (vysoká frekvencia q).

Parciálna selekcia proti dominantnej alele

V tomto prípade je selekčný koeficient pre recesívne homozygotný genotyp nulový, selekcia prebieha proti dominantným homozygotom a heterozygotom ($s_{aa} = 0$; $0 < s_{AA} < 1$; $0 < s_{Aa} < 1$). Ak predpokladáme úplnú dominanciu (t.j. fitness dominantného homozygota a heterozygota je rovnaká), prebieha selekcia rovnakou intenzitou proti genotypom *AA* aj *Aa*, t.j. $s_{AA} = s_{Aa}$ (pre zjednodušenie ho označme s). Ak frekvencia dominantných homozygotov

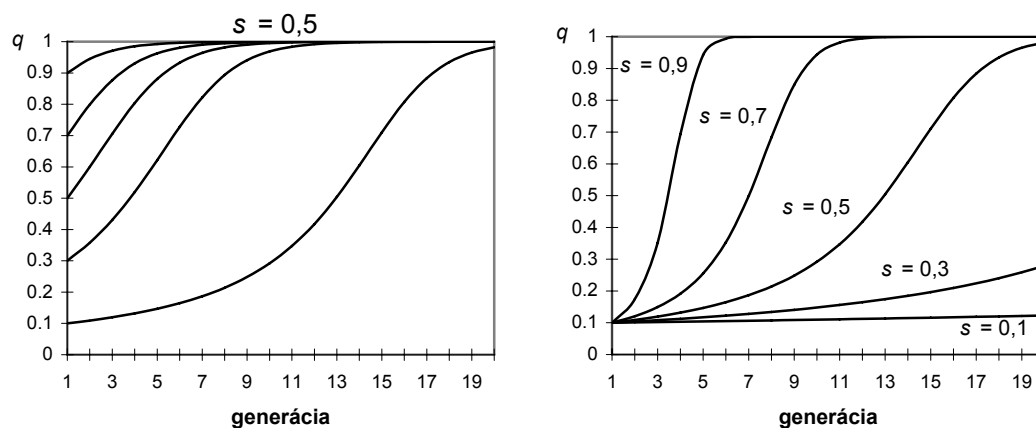
pred selekciou je p^2 a heterozygotov $2pq$, v populácii po selekcii zostáva podiel jedincov $1 - s(p^2 + 2pq) = 1 - sp(p + 2q) = 1 - s(1 - q)(1 + q) = 1 - s + sq^2$.

K tomuto typu selekcie dochádza, ak je dominantná alela z hľadiska životaschopnosti nevýhodná (napr. gény podieľajúce sa na kontrole syntézy atraktantov pre hmyz či iných škodcov – ich nefunkčné alelické varianty budú recesívne, ale z hľadiska prežívania jedincov výhodné). Totálna selekcia proti dominantnej alele ($s = 1$) vedie ku kompletnej eliminácii dominantnej alely hneď v prvej generácii ($p_1 = (1-s)p/(1-s+sq^2) = (1-1)p/(1-s+sq^2) = 0$).

Nárast frekvencie recesívnej alely za 1 generáciu možno určiť ako $\Delta q = q(1-s+sq)/(1-s+sq^2) - q = [q(1-s+sq) - q(1-s+sq^2)]/(1-s+sq^2) = spq^2/(1-s+sq^2)$. Tento typ selekcie takisto nevedie k ustáleniu rovnováhy (s výnimkou prípadu $s = 1$).

Tab. 9 Vývoj frekvencie recesívnej alely pri parciálnej selekcii proti dominantnej alele

Generácia	Genotypové frekvencie				Frekvencie alel v gamétach		
	<i>AA</i>	<i>Aa</i>	<i>aa</i>	Spolu	<i>A</i>	<i>a</i>	Spolu
0					<i>p</i>	<i>q</i>	1
1 – zygoty	p^2	$2pq$	q^2	1			
1 – po selekcii	$(1-s)p^2$	$(1-s)2pq$	q^2	$1-s+sq^2$			
1 – nové frekvencie u dospelých jedincov	$(1-s)p^2/(1-s+sq^2)$	$(1-s)2pq/(1-s+sq^2)$	$q^2/(1-s+sq^2)$	1	$(1-s)p^2/(1-s+sq^2) + \frac{1}{2}(1-s)2pq/(1-s+sq^2) = (1-s)p/(1-s+sq^2)$	$q^2/(1-s+sq^2) + \frac{1}{2}(1-s)2pq/(1-s+sq^2) = q(1-s+sq)/(1-s+sq^2)$	1
2							
...							



Obr. 18 Vývoj frekvencie recesívnej alely pri parciálnej selekcii proti dominantnej alele v závislosti na východiskovej frekvencii (vľavo) a selekčnom koeficiente (vpravo)

Parciálna selekcia pri aditivite génov

O aditivite hovoríme, ak je fitness heterozygota presne priemerom oboch homozygotov. Selekcia prebieha proti heterozygotom s polovičnou intenzitou než proti jednému z homozygotov ($s_{AA} = 0$, $0 < s_{aa} < 1$, $s_{Aa} = \frac{1}{2}s_{aa}$). Ak selekčný koeficient s_{aa} pre zjednodušenie označíme s , a frekvencia homozygotov aa pred selekciou je q^2 a heterozygotov $2pq$, v populácii po selekcii zostáva podiel jedincov $1 - sq^2 - \frac{1}{2}s \cdot 2pq = 1 - s(q^2 + pq) = 1 - sq$.

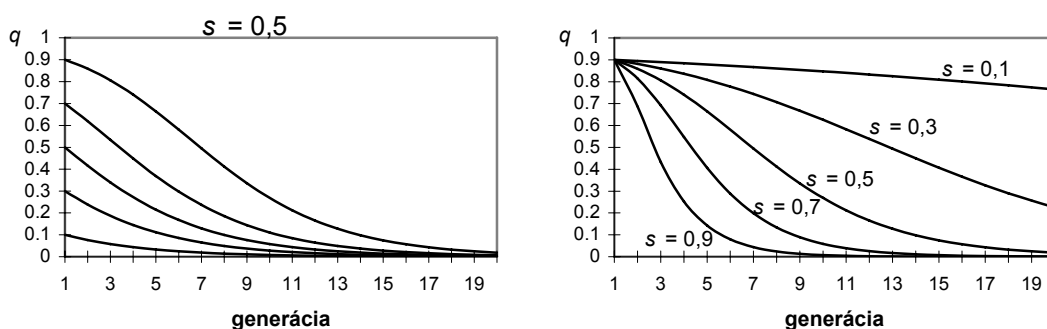
Aditívny model je základným modelom selekcie, z ktorého vychádzajú základné koncepcie kvantitatívnej genetiky a šľachtenia výberom. Pri kvantitatívnych fenotypových znakoch kontrolovaných polygennými komplexami sa vychádza z predpokladu, že prinajmenšom časť

genetickej kontroly je zabezpečovaná génmi s aditívnym účinkom, a na tomto predpoklade je založená očakávaná odozva na selekčný tlak.

Zmena frekvencie alely a za jednu generáciu sa pri tomto modeli určí ako $\Delta q = q[1-s/2(1+q)]/(1-sq) - q = (q - sq/2 - sq^2/2 - q - sq^2)/(1-sq) = -spq/2(1-sq)$. Tento typ selekcie je efektívnejší než selekcia proti recesívnym homozygotom, aj pri relatívne slabom selekčnom tlaku je redukcia frekvencie nežiadúcej alely rýchlejšia dokonca aj v porovnaní s totálnou selekciou proti letálnym alelám.

Tab. 10 Vývoj frekvencie recesívnej alely pri selekcii v prípade aditivity génov

Generácia	Genotypové frekvencie				Frekvencie alel v gamétach		
	AA	Aa	aa	Spolu	A	a	Spolu
0	P	H	Q	1	p	q	1
1 – zygoty	p^2	$2pq$	q^2	1			
1 – po selekcii	p^2	$(1-s/2)2pq$	$(1-s)q^2$	$1-sq$			
1 – nové frekvencie u dospelých jedincov	$p^2/(1-sq)$	$(1-s/2)2pq/(1-sq)$	$(1-s)q^2/(1-sq)$	1	$p^2/(1-sq) + \frac{1}{2}(1-s/2)2pq/(1-sq) = p(1-sq/2)/(1-sq)$	$(1-s)q^2/(1-sq) + \frac{1}{2}(1-s/2)2pq/(1-sq) = q[1-s/2(1+q)]/(1-sq)$	1
2	...	...	...				



Obr. 19 Vývoj frekvencie recesívnej alely pri parciálnej selekcii pri aditivite alel v závislosti na východiskovej frekvencii (vľavo) a selekčnom koeficiente (vpravo)

Parciálna selekcia v prospech heterozygotov

V prípade superdominancie sú selekciou zvýhodnené heterozygotné genotypy oproti obom homozygotom ($s_{Aa} = 0$, $0 < s_{AA} < 1$, $0 < s_{aa} < 1$).

K tomuto typu selekcie dochádza pri heteróznom efekte (somatická, reprodukčná, adaptívna heteróza), t.j. pri prevahe hybridných (heterozygotných) jedincov na čistými typmi (homozygotmi).

Zmena frekvencie alely a za jednu generáciu sa dá určiť ako

$$\Delta q = q(1 - s_{aa}q)/(1 - s_{AAP}^2 - s_{aa}q^2) - q = [q(1 - s_{aa}q) - q(1 - s_{AAP}^2 - s_{aa}q^2)]/(1 - s_{AAP}^2 - s_{aa}q^2) = [q - s_{aa}q^2 - q + s_{AAP}p^2q + s_{aa}q^3]/(1 - s_{AAP}^2 - s_{aa}q^2) = [s_{AAP}p^2q - s_{aa}q^2(1 - q)]/(1 - s_{AAP}^2 - s_{aa}q^2) = pq(s_{AAP} - s_{aa}q)/(1 - s_{AAP}^2 - s_{aa}q^2).$$

Tento typ selekcie vedie k ustáleniu rovnováhy. Ak $\Delta q = 0$

$$pq(s_{AAP} - s_{aa}q)/(1 - s_{AAP}^2 - s_{aa}q^2) = 0$$

$$s_{AAP} - s_{aa}q = 0$$

$$s_{AA}(1 - q) = s_{aa}q$$

$$q = s_{AA}/(s_{AA} + s_{aa}).$$

Ak teda selekcia prebieha s rovnakou intenzitou proti obom typom homozygotov AA aj aa

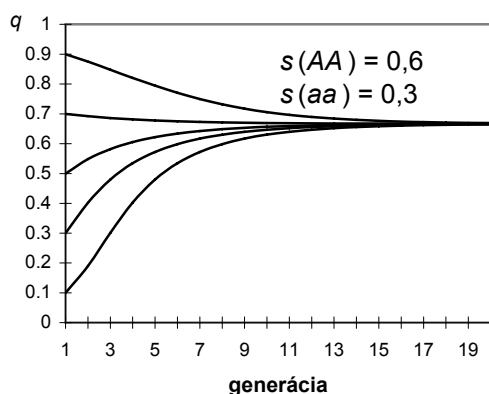
($s_{AA} = s_{aa}$), populácia smeruje k ustáleniu frekvencie alely a : $q = 0,5$ a po ustálení tejto hodnoty sa napriek selekcii frekvencie alel ďalej nemenia.

Analogickým spôsobom je možné určiť vývoj alelických frekvencií pri **selekcii proti heterozygotom** (napr. pri vzdialenej hybridizácii, keď hybridné, teda vo väčšine génov heterozygotné jedince často vykazujú zhoršený rast a zníženú životaschopnosť). Zmena frekvencie alely a za jednu generáciu je v tomto prípade

$\Delta q = -pq(s_{AA}p - s_{aa}q)/(1 + s_{AA}p^2 + s_{aa}q^2)$ a smeruje k labilnej rovnovážnej frekvencii $q = s_{AA}/(s_{AA} + s_{aa})$.

Tab. 11 Vývoj frekvencie recesívnej alely pri parciálnej selekcii v prospech heterozygotov

Generácia	Genotypové frekvencie				Frekvencie alel v gamétach		
	AA	Aa	aa	Spolu	A	a	Spolu
0					p	q	1
1 – zygoty	p^2	$2pq$	q^2	1			
1 – po selekcii	$(1 - s_{AA})p^2$	$2pq$	$(1 - s_{aa})q^2$	$1 - s_{AA}p^2 - s_{aa}q^2$			
1 – nové frekvencie u dospelých jedincov	$(1 - s_{AA})p^2 / (1 - s_{AA}p^2 - s_{aa}q^2)$	$2pq / (1 - s_{AA}p^2 - s_{aa}q^2)$	$(1 - s_{aa})q^2 / (1 - s_{AA}p^2 - s_{aa}q^2)$	1	$[(1 - s_{AA})p^2 + 1/2 2pq] / (1 - s_{AA}p^2 - s_{aa}q^2) = p(1 - s_{AA}p) / (1 - s_{AA}p^2 - s_{aa}q^2)$	$[(1 - s_{aa})q^2 + 1/2 2pq] / (1 - s_{AA}p^2 - s_{aa}q^2) = q(1 - s_{aa}q) / (1 - s_{AA}p^2 - s_{aa}q^2)$	1
2	...	...	...				



Obr. 20 Vývoj frekvencie recesívnej alely pri parciálnej selekcii v prospech heterozygotov v závislosti na východiskovej frekvencii

Všetky uvedené základné modely selekcie je potrebné brať ako teoretické modely, vzťahujúce sa na nekonečne veľké populácie pohlavne sa množiacich diploidných organizmov soddelenými generáciami. V reálnych situáciách existujú všetky medzistupne od úplnej dominancie po aditivitu a selekčný koeficient konkrétneho genotypu nemusí byť konštantný ale môže závisieť od konkrétnych podmienok prostredia, v ktorom sa organizmus vyskytuje. Navyše, v reálnych populáciách sa generácie najčastejšie prekrývajú (v každom prípade to platí pre lesné dreviny aj poľovnú zver, v menšej miere pre škodcov) a ich veľkosť je vždy obmedzená.

1.4.2 Väzba a väzbová nerovnováha v populácii

V kap. 1.1 bol spomenutý pojem väzby génov. Gény, ktoré sa nachádzajú na rovnakom chromozóme, sa nemôžu voľne rekombinovať, pretože sú navzájom fyzicky viazané, tvoria

jednotný celok vytváraný molekulou DNA. Takéto gény sú potomstvu odovzdávané v rovnakej konfigurácii alel, v akej sa nachádzajú na rodičovských chromozómoch.

Napriek fyzickej väzbe sa však takéto gény rekombonovať môžu vďaka crossing-overu (prekriženiu chromozómov pri meióze sprevádzanému vzájomnou výmenou častí v mieste prekriženia). Logicky, čím ďalej od seba na chromozóme sa gény nachádzajú, tým väčšia je pravdepodobnosť, že medzi nimi dôjde k prekriženiu a tým vyššia teda bude frekvencia rekombinácií. Túto jednoduchú úvahu však komplikuje skutočnosť, že medzi dvomi génmi môže dôjsť aj k viacerým crossing-overom, nielen k jednému. Dvojité prekriženie medzi génmi vedie k obnoveniu pôvodnej alelickej konfigurácie sledovanej dvojice génov. Presnejšie povedané, nepárny počet crossing-overov vedie k vzniku rekombinovaných gamét, páry naopak k vzniku nerekombinovaných gamét. Ďalšou komplikáciou je interferencia: vznik crossing-overu v jednej oblasti chromozómu môže znižovať pravdepodobnosť jeho výskytu v susedných oblastiach. Napriek týmto komplikáciám je sledovanie frekvencie rekombinácie génov základným prístupom k mapovaniu genómu, t.j. k určovaniu pozície génov na chromozómoch.

Je potrebné rozlišovať fyzickú vzdialenosť, ktorá je vyjadrovaná počtom bázoých párov deliacich dve definované miesta na chromozóme (napr. miesta dvoch bodových mutácií) a mapovú vzdialenosť, ktorá sa odvíja od výskytu rekombinácie génov. Gén totiž nie je bodom na chromozóme, ale zaberá pomerne dlhý fyzický úsek chromozómu. V podstate až súčasné projekty sekvenovania genómov mnohých organizmov umožnili kvantifikovať aj fyzické vzdialenosti medzi génmi.

Vychádzajme z predpokladu, že dvojica génov A a B sa nachádza na rovnakom chromozóme a každý má dva alelické varianty A/a a B/b . Jedinec, ktorý je dvojitý heterozygot $AaBb$, by pri voľnej kombinácii génov (teda v prípade, keby sa gény nachádzali na rôznych chromozómoch), vytváral 4 kombinácie alel v gamétach, každú sa rovnakou štvrtinovou frekvenciou: $\frac{1}{4}AB + \frac{1}{4}Ab + \frac{1}{4}aB + \frac{1}{4}ab$. Keďže sú však gény A a B viazané, frekvencie gamét závisia od alelickej konfigurácie a vzdialenosti medzi génmi. Pri konfigurácii *cis* (t.j. obe dominantné alely sa nachádzajú na jednom chromozóme a obe recesívne na druhom; angl. *coupling*), t.j. konfigurácii AB/ab , by bez crossing-overu vznikali len gaméty s alelickými kombináciami AB a ab , pri konfigurácii *trans* (na chromozóme sa nachádza kombinácia dominantnej alely jedného génu a recesívnej alely druhého; angl. *repulsion*), t.j. konfigurácii Ab/aB , by vznikali len gaméty Ab a aB . Ak k rekombinácii dochádza s frekvenciou c , alelické kombinácie v gamétach sú nasledovné:

	<i>cis</i>	<i>trans</i>
AB	$(1 - c)/2$	$c/2$
Ab	$c/2$	$(1 - c)/2$
aB	$c/2$	$(1 - c)/2$
ab	$(1 - c)/2$	$c/2$

pričom frekvencia rekombinácie sa pohybuje medzi 0 a $\frac{1}{2}$ (je potrebné pripomenúť, že alelickú konfiguráciu jedinca nepoznáme, môžeme ju usudzovať len podľa gamét, aké vytvára). Preto sa zvykne počítať na silu väzby λ , ktorá sa vypočíta ako $\lambda = 1 - 2c$ a pohybuje sa od 0 (žiadna väzba, voľná rekombinácia) po 1 (úplná väzba, žiadna rekombinácia).

Konstruktia genetickej mapy spočíva v zoradení lokusov na chromozóme a určení vzdialeností medzi nimi. Frekvencia rekombinácie ani sila väzby nie sú vhodné ako miery vzdialenosti, pretože nie sú aditívne (t.j. súčet rekombinačných frekvencií medzi génmi AB a BC nedáva rekombinačnú frekvenciu medzi génmi AC). Keďže k rekombinácii dochádza len pri nepárnom počte prekrižení medzi dvomi lokusmi, rekombinačná frekvencia c vyjadruje pravdepodobnosť, že dôjde k nepárnemu počtu crossoverov, zatiaľ čo doplnok $1 - c$ zodpovedá pravdepodobnosti výskytu párneho počtu prekrižení (vrátane absencie prekriženia, teda nulového počtu crossoverov). Ak posudzujeme trojicu génov A , B a C , potom nepárny počet

prekrižení medzi lokusmi A a C môže nastať vtedy, ak vznikne nepárny počet prekrižení medzi lokusmi A a B a párny medzi B a C alebo naopak, párny medzi A a B a nepárny medzi B a C (súčet párneho a nepárneho čísla je nepárny, naopak súčet dvoch nepárnych čísel je párny). Medzi rekombinačnými frekvenciami c_{AC} , c_{AB} a c_{BC} je teda matematický vzťah:

$$c_{AC} = c_{AB}(1 - c_{BC}) + c_{BC}(1 - c_{AB}) = c_{AB} + c_{BC} - 2c_{ABCBC}$$

Ak dochádza k interferencii, teda prítomnosť crossoveru v jednej oblasti genómu potláča jeho vznik v susedstve, je potrebné zaviesť do tohoto vzťahu parameter interferencie δ :

$$c_{AC} = c_{AB}(1 - c_{BC}) + c_{BC}(1 - c_{AB}) = c_{AB} + c_{BC} - 2(1 - \delta)c_{ABCBC}$$

kde δ sa pohybuje od 0 v prípade, že k interferencii nedochádza, po 1 v prípade, ak je úplná. Rekombinačné frekvencie sú teda aditívne len pri veľmi silnej interferencii.

Mapová vzdialenosť pochopiteľne musí odrážať nielen nepárne, ale aj párne počty crossoverov. Existuje celý rad mapovacích funkcií. Za predpokladu, že prekriženia sa vyskytujú náhodne a nezávisle pozdĺž celého chromozómu. Počet crossoverov je malé celé číslo, jeho pravdepodobnostné rozdelenie teda sleduje Poissonovo rozdelenie. Z neho sa dá odvodiť očakávaný podiel rekombinovaných gamét (t.j. gamét s nepárnym počtom crossoverov):

$$c = \sum_{k=0}^{\infty} p(m, 2k+1) = e^{-m} \sum_{k=0}^{\infty} \frac{m^{2k+1}}{(2k+1)!} = (1 - e^{-2m})/2$$

kde $p(m, k)$ je pravdepodobnosť, že medzi dvoma lokusmi vzdialenými m mapových jednotiek dôjde ku k crossoverom. Vzdialenosť m (Haldaneova mapová vzdialenosť) sa z tohoto vzťahu dá vyjadriť ako

$$m = -\ln(1 - 2c)/2$$

a vyjadruje sa v morganoch (M) resp. centimorganoch (cM) (jednotky sú nazvané podľa autora chromozómovej teórie dedičnosti T.H. Morgana).

Keďže Haldaneova mapová vzdialenosť je založená na predpoklade nezávislého výskytu crossoverov, teda nulovej interferencie, boli vyvinuté ďalšie mapovacie funkcie, ktoré interferenciu pripúšťajú. Často sa využíva Kosambiho funkcia

$$m = \frac{1}{4} \ln \frac{1 + 2c}{1 - 2c}$$

a empiricky odvodené mapové funkcie.

Väzba génov pochopiteľne ovplyvňuje aj výskyt alelických kombinácií v populácii, čím určuje zastúpenie genotypov a následne aj zastúpenie fenotypových znakov. Frekvencie

Príklad 1.4.2

V endospermoch 160 semien jedinca smreka obyčajného (pri nahosemenných rastlinách zásobné pletivo semena predstavuje samičí gametofyt, teda obsahuje rovnakú haploidnú sadu alel ako oocyt), v ktorých boli analyzované izoenzymové gény pre jadrovú glutamát-oxaloacetát transaminázu (*Got-B*) a izocitrát dehydrogenázu (*Idh-B*) (viď kap. 1.5), sa našli nasledovné kombinácie alel:

62 *Got-B*₁₀₀-*Idh-B*₁₀₀, 19 *Got-B*₈₀-*Idh-B*₁₀₀, 23 *Got-B*₁₀₀-*Idh-B*₁₂₃, 56 *Got-B*₈₀-*Idh-B*₁₂₃.

Aká je sila väzby a mapová vzdialenosť medzi génmi *Got-B* a *Idh-B*?

Riešenie: Pri voľnej rekombinácii by sa všetky alelické kombinácie vyskytovali v gametofytoch s rovnakou frekvenciou 25%. V tomto prípade sú kombinácie *Got-B*₁₀₀-*Idh-B*₁₀₀, a *Got-B*₈₀-*Idh-B*₁₂₃ zastúpené podstatne vyšším podielom, možno teda predpokladať, že gény sú viazané a alelická konfigurácia materského jedinca je *Got-B*₁₀₀-*Idh-B*₁₀₀/*Got-B*₈₀-*Idh-B*₁₂₃. Podiel rekombinovaných gamét (gametofytov) je teda $c = (19+23)/(62+19+23+56) = 42/160 = 0,2625 = 26,25\%$.

Sila väzby je $\lambda = 1 - 2c = 1 - 2 \times 0,2625 = 0,475$.

Haldaneova mapová vzdialenosť je $m = -\ln(1 - 2c)/2 = -\ln(1 - 2 \times 0,2625)/2 = -\ln(0,475)/2 = 0,744/2 \text{ M} = 37,2 \text{ cM}$

Kosambiho mapová vzdialenosť je $m = \frac{1}{4} \ln[(1 + 2c)/(1 - 2c)] = \frac{1}{4} \ln[(1 + 2 \times 0,2625)/(1 - 2 \times 0,2625)] = \frac{1}{4} \ln[1,525/0,475] = 29,2 \text{ cM}$

gamét v populácii (presnejšie frekvencie alelických kombinácií v gamétach) sa odvíjajú od sily väzby medzi génmi. Pokiaľ sledujeme len jeden lokus, frekvencie alel v gamétach sú identické s frekvenciami alel v populácii, takže v panmiktickej populácii zostávajú z generácie na generáciu konštantné. Pokiaľ je však predmetom záujmu genetická štruktúra vo viacerých lokusoch, rekombinácia môže spôsobovať, že gametické frekvencie sa v čase menia aj v panmiktickej populácii. Pri absencii väzby sa očakávaná frekvencia alelickej kombinácie v gamétach dá odhadnúť jednoducho ako súčin alelických frekvencií v jednotlivých génoch:

$$p_{AB} = p_A p_B; \quad p_{ABCDE...} = p_A p_B p_C p_D p_E...$$

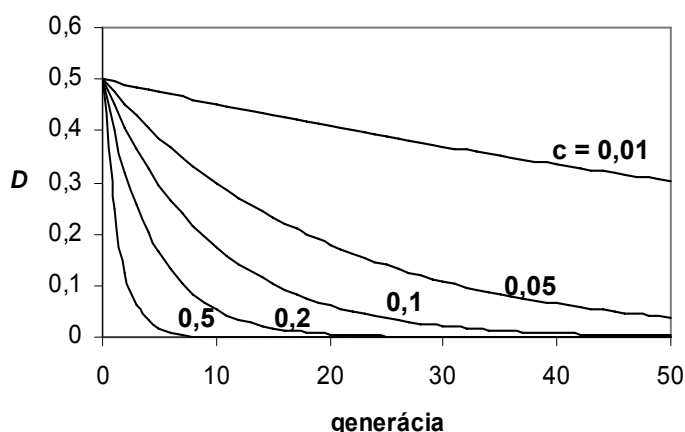
Pokiaľ sa gametická frekvencia od tohoto očakávania odchyľuje, je to prejav **väzbovej nerovnováhy** (angl. *linkage disequilibrium*; *LD*), ktorú možno kvantifikovať ako

$$D_{AB} = p_{AB} - p_A p_B$$

Väzbová nerovnováha sa v populácii postupne znižuje. S každou generáciou sa vďaka crossoverom počas gametogenézy v populácii objavujú nové a nové rekombinované gaméty, až sa ich frekvencia postupne vyrovná rovnovážnemu zastúpeniu. Pokles v čase je exponenciálny:

$$D_t = D_0(1 - c)^t$$

kde D_t je väzbová nerovnováha v generácii t a c je frekvencia rekombinácií. Rýchlosť úbytku väzbovej nerovnováhy je teda značne závislá od sily väzby, pri frekvencii rekombinácie okolo 0,5 je rýchly, pri tesnej väzbe ($c \rightarrow 0$) môže väzbová nerovnováha pretrvávať po viacero generácií (obr. 21).



Obr. 21 Zmena väzbovej nerovnováhy v závislosti na čase a rekombinačnej frekvencii

Väzbová nerovnováha utlmuje fenotypovú odozvu populácie na prirodzený či umelý výber. Multilokusové genotypy vďaka väzbe a väzbovej nerovnováhe vznikajú v populácii vo frekvenciách odlišných od očakávani založených na nezávislej kombinácii alel, čo ovplyvňuje aj rozdelenie frekvencií fenotypov v populácii. Z hľadiska šľachtienia teda väzbová nerovnováha komplikuje predpoveď genetického zisku (viď kap. 2). Aj keby zdrojová populácia pri šľachtení bola vo väzbovej rovnováhe v génoch, kontrolujúcich znak, ktorý je kritériom selekcie, šľachtiteľská populácia (súbor výberových stromov, semenný sad a pod. viď kap. 2) predstavuje vždy pomerne početne obmedzený súbor jedincov s konkrétnymi konfiguráciami alel v genotypoch. Je teda málo pravdepodobné, že jednotlivé alelické konfigurácie v nej budú zastúpené v podieloch, zodpovedajúcich očakávaným rovnovážnym frekvenciám.

Ďalším efektom, ku ktorému väzba génov vedie, je vznik koadaptovaných komplexov génov. Alely, ktoré sú vhodné pre konkrétne podmienky prostredia a teda v týchto podmienkach podmieniajú vyššiu biologickú zdatnosť, majú vďaka spoločnému účinku väzby

a selekcie tendenciu hromadiť sa na rovnakom chromozóme. Ak jedinec získa od niektorého z rodičov chromozóm, na ktorom sa náhodne skombinujú výhodné alelické varianty, je zvýhodnený oproti nositeľom horších alelických kombinácií a má teda vyššiu šancu na prežitie a rozmnožovanie. Väzbová skupina s takouto alelickou kombináciou sa teda zachováva a jej frekvencia sa postupne v populácii zvyšuje, až môže dôjsť k jej úplnej fixácii. Ak sa do populácie dostanú iné alely (v dôsledku imigrácie jedincov z iných populácií, prirodzeného spojenia populácií pri zániku izolačnej bariéry, umelého spojenia jedincov pochádzajúcich z rozdielnych populácií pri šľachtení), môže dôjsť k rozpadu týchto komplexov v dôsledku rekombinácie a následne k poklesu biologickej zdatnosti. Tento jav sa označuje ako outbredná depresia, je to vlastne opak heterózneho efektu.

1.4.3 Genetická štruktúra populácie

Genetické markéry

Pre zachytenie vývoja zastúpenia genotypovej a alelickej štruktúry v dôsledku evolučných faktorov, teda selekcie, genetického driftu, migrácie a mutácií, musíme byť schopní popísať a kvantifikovať genetickú premenlivosť v rámci populácie a charakter genetickej premenlivosti medzi populáciami. Musíme teda mať k dispozícii znaky, u ktorých z ich fenotypového prejavu sme schopní odvodiť ich genotyp. Takéto znaky nazývame **genetickými markermi**. 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**. Sú to 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.

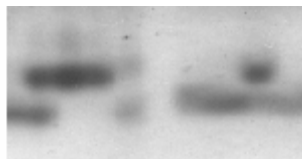
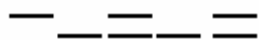
Podľa charakteru možno genetické markéry klasifikovať na:

- morfologické (u drevín najčastejšie morfologické odchýlky v tvare a farbe listov, 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

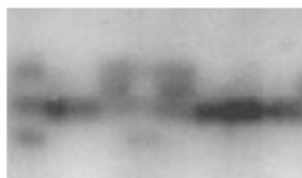
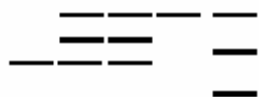
Z uvedených skupín predovšetkým proteínové a DNA markéry spĺňajú požiadavky na kodominantné génové markéry.

Izoenzýmy 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 (–COOH,

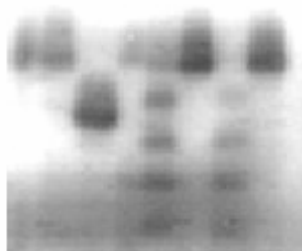
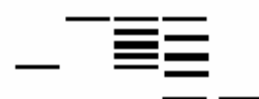
monomérny enzým



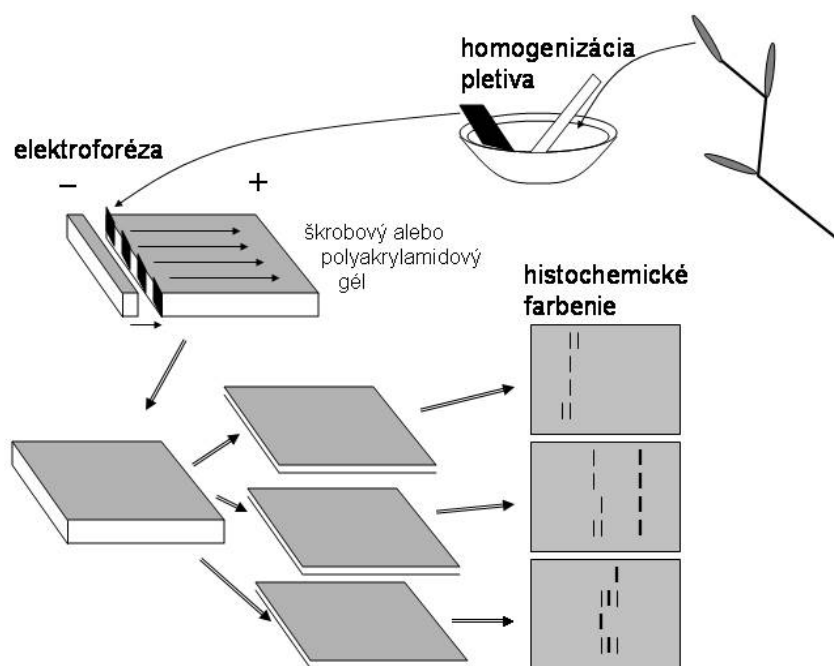
dimérny enzým



tetramérny enzým



Obr. 22 Príklady zymogramov (separovaných vyfarbených frakcií enzýmov) troch enzýmových systémov u buka. Monomérny enzým – peroxidáza (lokus *Px-B*), dimérny enzým – dehydrogenáza kyseliny izocitrónovej (lokus *Idh-B*), tetramérny enzým – menadion-reduktáza (lokus *Mnr-A*)



Obr. 23 Schéma analýzy izoenzým

–NH₂, –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+} atď.) a farbivá reagujúce s produktmi reakcie. V miestach, kde sa v géli 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 (kap. 1.2). V najjednoduchšom prípade (monomérny enzým produkovaný len 1 génom) každý pružok zodpovedá jednej alele génu, ktorý kontroluje syntézu enzýmu (obr. 22). Počet alelických variant sa pri izoenzýmoch pohybuje spravidla v rozmedzí 1–4 (výnimočne do 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:

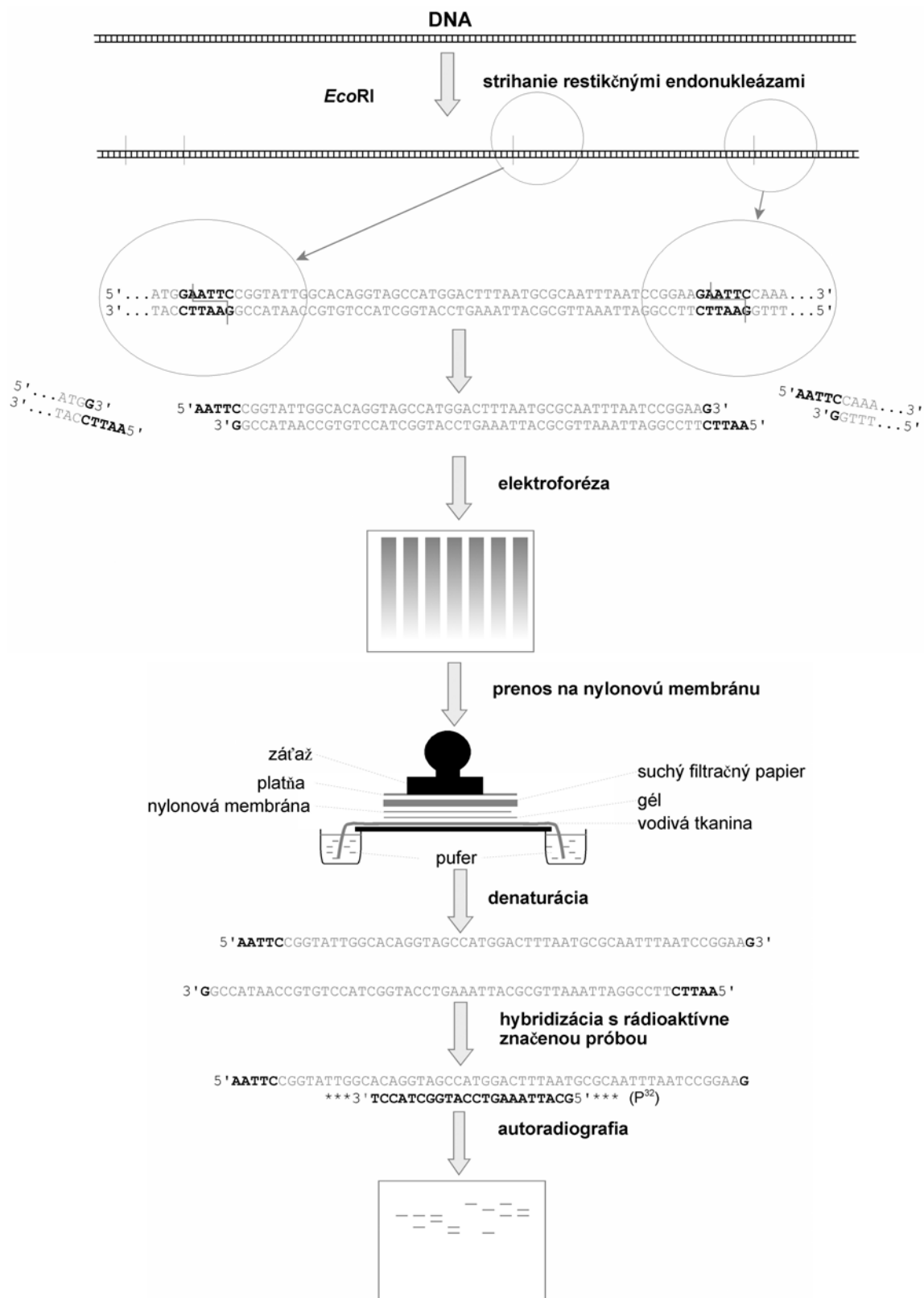
- reštrikčná analýza (RFLP – *restriction fragment length polymorphism*) – rozdelenie molekuly DNA na definované úseky pomocou špecifických enzýmov. Reštrikčné endonukleázy (reštriktázy) sú bakteriálne enzýmy, ktoré vyhľadávajú na molekule DNA konkrétnu sekvenciu nukleotidov, a pokiaľ ju nájdu, molekulu DNA rozdelia (napr. endonukleáza *EcoRI*, izolovaná z črevnej baktérie *Escherichia coli*, vyhľadáva sekvenciu $G\downarrow AATTC/CTTAA\downarrow G$ 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, enzýmy typu I vyhľadávajú konkrétny sekvenčný motív a reťazec DNA prerušia na definovanom mieste mimo tejto sekvencie, typ II strihá v rámci sekvencie, typ III vyhľadáva síce konkrétnu sekvenciu, ale reťazec DNA preruší na náhodne vybranom mieste. Pre účely molekulárnej biológie aj génového inžinierstva sa najčastejšie využívajú endonukleázy typu II. Väčšina endonukleáz vyhľadáva tzv. palindromické sekvencie, t.j. motívy, ktoré sú v smere čítania ($5' \rightarrow 3'$) identické (napr. Spomínaná endonukleáza *EcoRI* vyhľadáva sekvenciu $5'GAATTC3'$, t.j. komplementárna sekvencia v druhom reťazci $3'CTTAAG5'$ je v smere čítania $5' \rightarrow 3'$ (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 rôzdielnych 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). Prehľad vybraných reštriktáz uvádza tab. 12.

Tab. 12 Najbežnejšie využívané reštrikčné endonukleázy II. typu

Previs				Hladký koniec			
Enzým	Sekvencia	Enzým	Sekvencia	Enzým	Sekvencia	Enzým	Sekvencia
<i>BamHI</i>	$C\downarrow GATTC$	<i>SC/NI</i>	$G\downarrow CGC$	<i>BthI</i>	$CTC\downarrow GAG$	<i>HaeII</i>	$AGC\downarrow GCT$
<i>EcoRI</i>	$G\downarrow AATTC$	<i>PvuI</i>	$CGAT\downarrow CG$	<i>EcoRV</i>	$GAT\downarrow ATC$	<i>MstI</i>	$TGC\downarrow CGA$
<i>EcoRII</i>	$\downarrow CC(AT)GG$	<i>GaII</i>	$CCGC\downarrow GG$	<i>HaeIII</i>	$GG\downarrow CC$	<i>Eco47III</i>	$AGC\downarrow GCT$
<i>HindIII</i>	$A\downarrow AGCTT$	<i>SpeI</i>	$A\downarrow CTAGT$	<i>PvuII</i>	$CAG\downarrow CTG$	<i>NaeI</i>	$GCC\downarrow GGC$
<i>MseI</i>	$T\downarrow TAA$	<i>SaII</i>	$G\downarrow TCGAC$	<i>BsuRI</i>	$GG\downarrow CC$	<i>SspI</i>	$AAT\downarrow ATT$

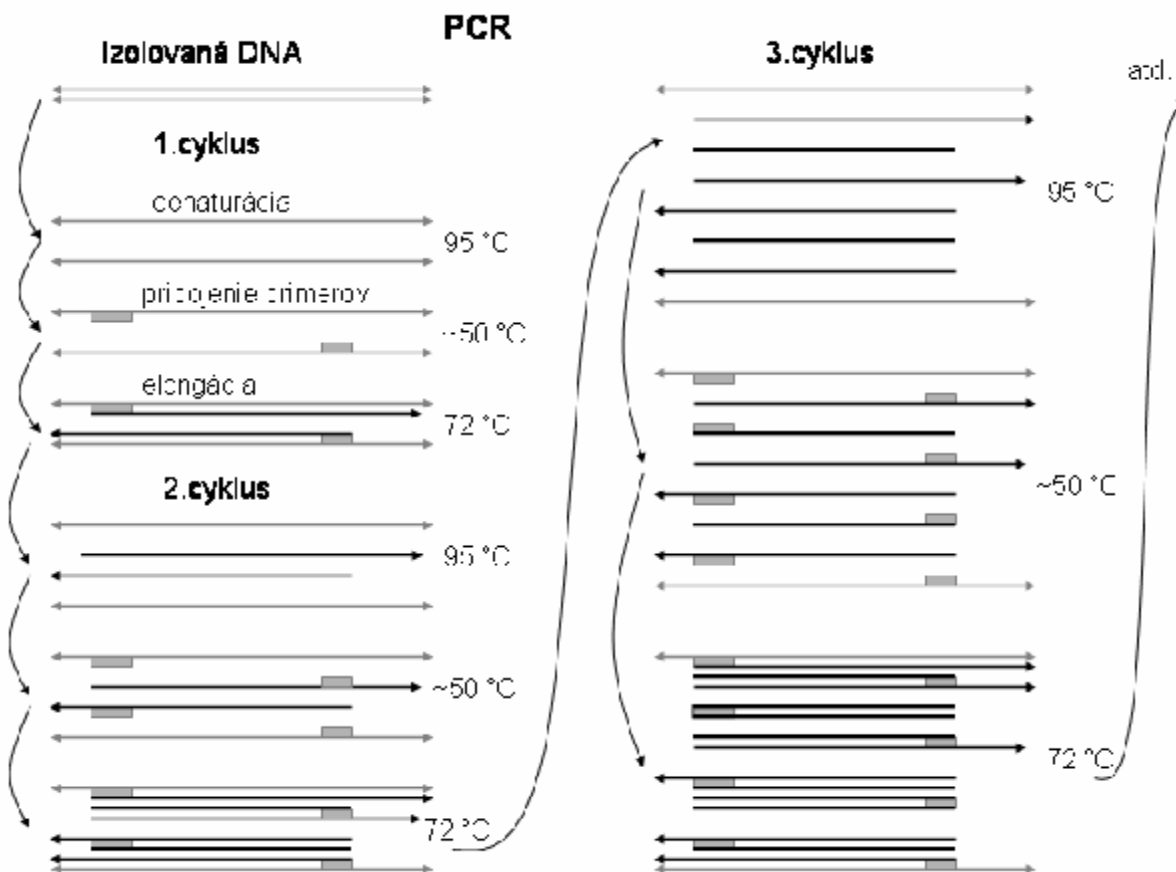
Stríhaním reštrikčnými endonukleázami sa celý reťazec DNA rozdelí na fragmenty, ktoré je možné separovať elektroforeticky a následne farbiť rôznymi technikami. Dĺžka fragmentov sa meria počtom **bázových párov** (bp).

Pri jadrovej DNA je množstvo fragmentov získaných štiepením ktoroukoľvek z možných



Obr. 24 Schéma RFLP analýzy

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



Obr. 25 Schéma polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Amplifikované fragmenty sú označené hrubou čiarou. Šípka znamená, že molekula DNA v danom smere pokračuje.

rádovo milióny fragmentov, ktoré po elektroforéze nie je možné ich navzájom odlíšiť (na géli s 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, ktoré je ovšem 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 reťaci 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 primeru) začne dopĺňať

druhý reťazec. Od druhého cyklu týmto spôsobom exponenciálne narastá počet fragmentov s dĺžkou zodpovedajúcou vzdialenosti medzi dvomi komplementárnymi miestami (obr. 25). Fragментy 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 rovnaký, takže náboj pripadajúci na jednotku dĺžky DNA fragmentu je v podstate konštantný. Fragментy sú teda pri pohybe triedené podľa dĺžky, dlhšie fragментy 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 fragmentami, ktoré sú predmetom záujmu, sú veľké (viac ako 10 bp). Pri analýze v agarózovom géli sa pre identifikáciu fragmentov bežne používa farbenie etídiumbromidom (EtBr), čo je farbivo, reagujúce s báзами v DNA, ktoré je následne možné vybudíť UV svetlom. Práve jeho schopnosť interkalovať s DNA je dôvodom, prečo je silne karcinogénne a mutagénne. Existujú však aj zdravotne neškodné náhrady EtBr (SybrGreen a i.). Pre jemnejšie analýzy sa ako gélový nosič používa elektroforéza c polyakrylamidovom géli (PAGE). DNA je možné aj v tomto prípade farbiť EtBr, ale skôr sa využíva farbenie striebrom. Veľmi efektívna je separácia fragmentov DNA v automatických DNA-sekvenátoroch. Elektroforéza tu neprebíha na plochom géli, ale v dlhých kapilárach naplnených polyakrylamidovým gélom. Pri PCR sa používajú značené primery (oligonukleotidy s naviazaným farbivom) a farbivo je vybudzované laserovým lúčom.

Len malú časť DNA eukaryontov (t.j. aj rastlín a živočíchov) tvoria sekvencie, zodpovedajúce funkčným génom, teda kódujúce nejaký funkčný produkt (polypeptid, tRNA, rRNA, snRNA). Veľkú časť (u drevín sa odhaduje na cca. 95%) 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, teda 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 expresie. 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 iniciálne náklady pre konštrukciu týchto markérov (identifikáciu okrajových sekvencie pre definovanie primerov).

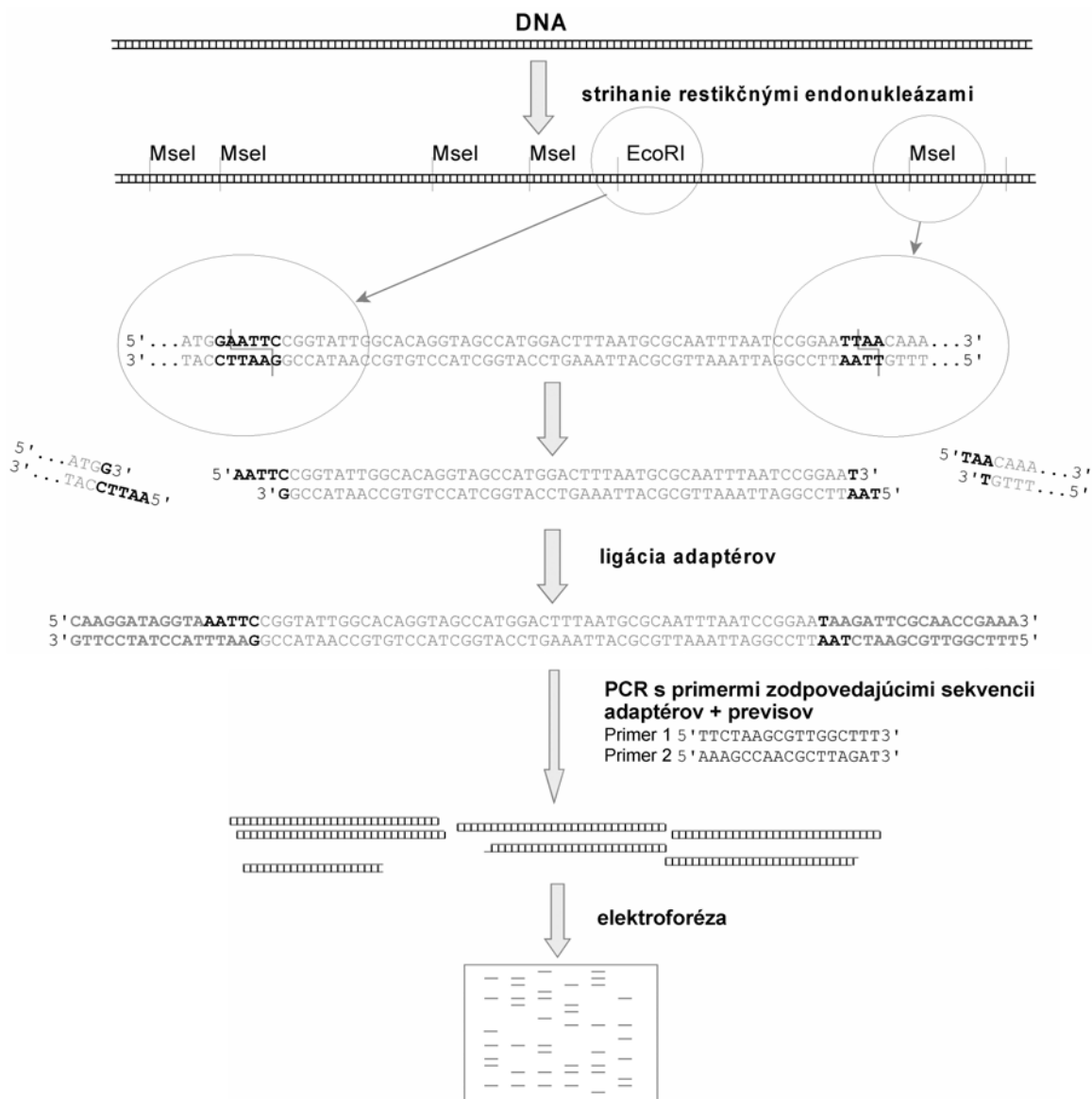
Pre štúdie vyžadujúce veľký súbor analyzovaných génov dobre pokrývajúci celý jadrový genóm bol vyvinutý typ markérov označovaný RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) založený na PCR technológii. Pri RAPD markéroch sa používajú krátke primery (~8–10 bp) a pomerne nízka teplota pre annealing, ktorá umožňuje aj nešpecifické párovanie

primerov (t.j. sekvencie na DNA nemusí byť prísne komplementárna s primerom, ale môže sa v 1 báze odlišovať). 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 vzniknú 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 (izolovaná z reastlinného alebo živočíšneho materiálu) sa najprv štiepi dvojicou endonukleáz vytvárajúcich previs, z ktorých jedna vyhľadáva dlhšiu sekvenciu (a teda strihá zriedkavejšie a tvorí dlhšie fragmenty), druhá kratšiu (strihá častejšie, teda vytvára kratšie fragmenty). Bežne sa používa napr. kombinácia *EcoRI* (vyhľadáva motív 6bp, teda tvorí fragmenty s dĺžkou $4^6=4096$ bp) a *MseI* (4 bp; fragmenty 256 bp). Kombinácia umožňuje optimalizovať počet aj dĺžku fragmentov: určitá časť fragmentov bude na jednom konci prestrihnutá *EcoRI* (pomerne malá, keďže tento enzým strihá zriedkavejšie) a na druhom *MseI* (teda bude mať dĺžku rádovo v stovkách bp, čo je optimálne pre elektroforetickú separáciu). 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). Schéma AFLP technológie je uvedená na obr. 26. 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 (príslušná časť gélu sa vyreže a DNA sa purifikuje analogickými metódami, aké sa používajú pri jej izolácii z pletív) a sekvenovať, teda určiť poradie nukleotidov v ňom (metódy sekvenovania DNA budú popísané ďalej), 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*), ktorý je opäť kodominantným markérom (sekvenčne špecifické primery amplifikujú len konkrétny úsek DNA, analýza heterozygota teda poskytne dva fragmenty s rozdielnymi dĺžkami).

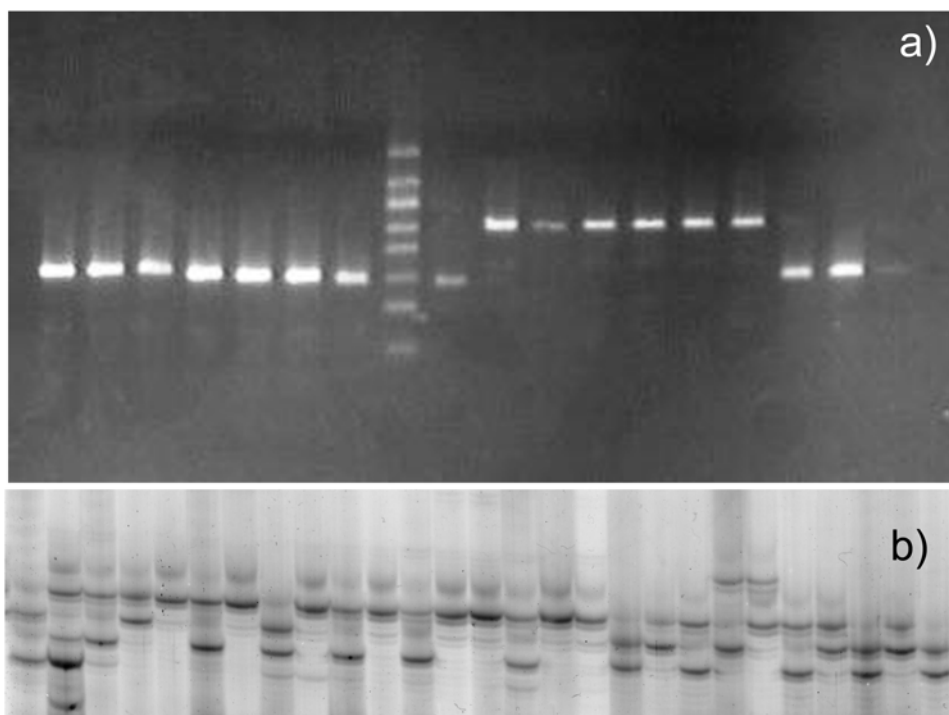
Pre niektoré účely (predovšetkým pre rekonštrukciu migrácie a kolonizácie, sledovanie toku génov a pod.) sa s výhodou používajú fragmenty mimojadrovej, t.j. chloroplastovej a mitochondriálnej DNA, ktorá má uniparentálnu dedičnosť (spravidla po matke, výnimočne, napr. pri našich domácich hospodársky významných ihličnanoch, po otcovi). Molekuly organelárnej DNA sa nerekombinujú (bunka spravidla obsahuje len jeden typ cpDNA či mtDNA, takže ani nemá ako dôjsť k rekombinácii), teda haplotyp sa zásadne dedí ako celok. Keďže bunka obsahuje iba jeden haplotyp mtDNA a prípadne cpDNA, t.j. len po jednom variante každého mitochondriálneho či chloroplastového génu, každá mutácia, ktorá takýto gén znefunkční, sa správa ako dominantne letálna, teda organizmus s takýmto genómom nie je schopný prežiť. Preto sú viaceré sekvencie v mtDNA a cpDNA vysoko konzervatívne, teda identické aj pri taxonomicky veľmi rozdielnych organizmoch (najmä sekvencie pre organelárne tRNA a rRNA), teda primery definované na ich základe sú použiteľné nielen pre konkrétny druh, ale často sú univerzálne aj pre vyššie taxonomické jednotky (čelade, niekedy dokonca pre všetky krytosemenné rastliny). Keďže organelárny genóm je neporovnateľne



Obr. 26 Schéma AFLP analýzy.

menší v porovnaní s jadrovým, pri analýze organelárnej DNA možno kombinovať PCR a RFLP analýzu. Pomocou použitia 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 restrikčnou 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 komplementárnych báz. Jednoreťazcová molekula nezostáva v lineárnej forme, ale poprehýba sa a vytvorí troj-



Obr. 27 Príklady separácie DNA fragmentov: a) mitochondriálny markér *nad-5/4* u jedle bielej, amplifikovaný PCR, separácia v agaróze, farbenie EtBr, b) jadrový mikrosatelitný markér FR41 u jaseňa štíhleho, PAGE, farbenie striebrom

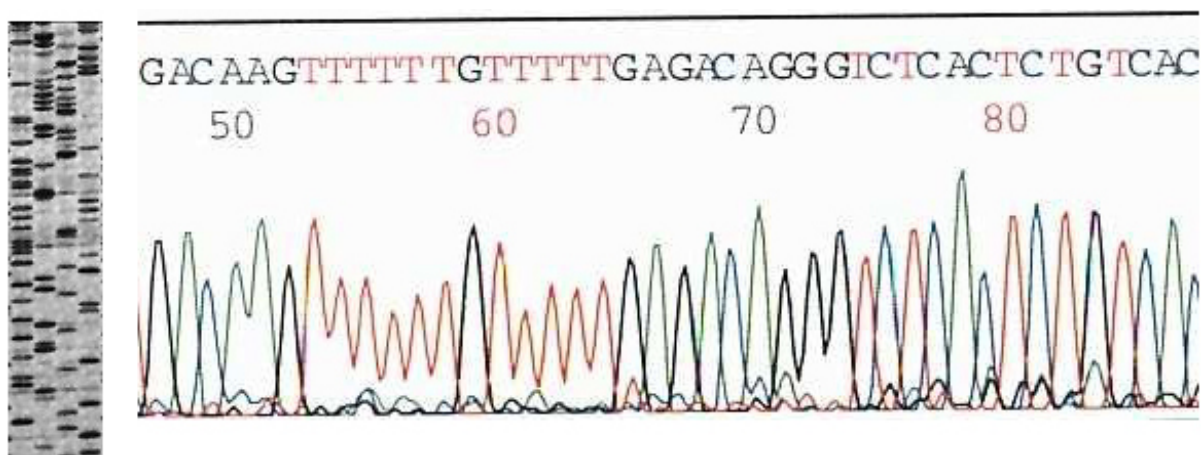
rozmerný útvar stabilizovaný vodíkovými väzbami medzi nukleotidmi v rámci rovnakého reťazca. Jej trojrozmerný tvar je teda závislý na sekvencii báz, stačí aj jedna zámena bázy na to, aby výsledný tvar bol odlišný. Rýchlosť pohybu takýchto molekúl pri elektroforéze je odtvaru závislá (čím bližšie ku guľovitému tvaru, tým je pohyblivosť vyššia). Pri SSCP sa konkrétny úsek DNA namnoží PCR, fragmenty sa denaturujú (teda rozdelia na dvojice jedno-reťazcových molekúl) vysokou teplotou a formaldehydom, a následne za normálnych nede-naturujúcich podmienok separujú elektroforézou. Počas migrácie jednoreťazcové molekuly zaujmú trojrozmernú konformáciu, ktorá ovplyvňuje ich mobilitu v géli.

Tab. 13 Prehľad DNA markérov

Typ markéra	Dedičnosť
RFLP	kodominantná
VNTR	kodominantná
Jadrové mikrosatelity (nSSR)	kodominantná
Chloroplastové mikrosatelity (cpSSR)	uniparentálna (spravidla maternálna)
RAPD	dominantná
AFLP	dominantná
SSCP	kodominantná
PCR-RFLP cpDNA a mtDNA	uniparentálna (spravidla maternálna)
SCAR	kodominantná

Často je dôležité poznať priamo sekvenciu báz v konkrétnom úseku DNA. Pre sekvenova-nie (teda určenie poradia báz) sa dnes najčastejšie využívajú postupy založené na PCR, predovšetkým Sangerova metóda ukončovania reťazca dideoxynukleotidmi (*chain-termina-tion 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 skupinu 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 „siah“ po jednotlivých nukleotidoch náhodne, je dielom náhody, v ktorom štádiu siahne po 2'-deoxynukleotide (ktorý umožní ďalšie predĺžovanie reťazca) a kedy po 2'3'-dideoxynukleotide (ktorý predĺžovanie 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. Dideoxy-nukleotidy 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 (obr. 28).



Obr. 28 Autoradiogram klasického Sangerovho sekvenovania (vľavo) a výstup z kapilárového DNA-sekvenátora (vpravo). Krivky merajú intenzitu farebného signálu na jednotlivých pozíciách gélu, rôzne farby zodpovedajú rozdielnym bázam.

Druhým možným postupom je tzv. pyrosekvenovanie (*pyrosequencing*; sekvenovanie syntézou), ktoré je založené na detekcii aktivity DNA-polymerázy chemoluminiscenciou. Jednoreťazcová DNA, viazaná na pevnú látku (magnetické guľičky potiahnuté streptavidínom) je hybridizovaná s iníciačným primerom (aby DNA-polymeráza mala ako predĺžovať komplementárny reťazec), a je inkubovaná s roztokom obsahujúcim DNA-polymerázu, ATP-sulfurylázou, luciferázou, apyrázou, adenosín-5'-fosfosulfát (APS) a luciferín. Následne sú postupne pridávané jednotlivé deoxynukleotidtrifosfáty (dNTP; vid' kap. 1). V prítomnosti dNTP komplementárneho k prvému voľnému (nespárovanému) nukleotidu sa nukleotid zaradí do komplementárneho reťazca a uvoľní sa dvojfosfátový zvyšok (pyrofosfát). ATP sulfuryláza v prítomnosti pyrofosfátu konvertuje APS na ATP, slúžiaci ako zdroj energie pre premenu luciferínu na oxyluciferín sprostredkovanú aktivitou luciferázy. Reakcia (prebiehajúca vtedy, keď je pridaný správny dNTP) vyvoláva svetelný záblesk detekovaný CCD kamerou. Nezaradené nukleotidy a zvyšný ATP sú degradované apyrázou a reakcia môže prebehnúť odznovu.

Na pyrosekvenovaní je založená technológia tzv. 454-sekvenovania, ktoré umožňuje sekvenovať veľké množstvo DNA, dokonca aj celé genómy vyšších organizmov. Táto metóda je v porovnaní so Sangerovou metódou podstatne rýchlejšia a v prepočte na 1 bázu aj podstatne lacnejšia.

Charakteristiky genetickej premenlivosti

Pri použití ktoréhokoľvek typu génových markérov 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 (podieľ, 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: $P_{ij} = N(A_iA_j)/N$. Frekvenciu alely A_i je možné odhadnúť ako $p_i = [N(A_iA_i) + \frac{1}{2} \sum_{j \neq i} N(A_iA_j)]/N$ (P_{ij} – frekvencia genotypu A_iA_j , p_i – frekvencia alely A_i , $N(A_iA_j)$ – počet jedincov genotypu A_iA_j , N – celkový počet jedincov vo výberovej vzorke).

Alelické a genotypové frekvencie sú základom pre výpočet syntetických charakteristík genetickej štruktúry populácie. Pojem „genetická premenlivosť“ má viacero rovín, popisovať možno rôzne aspekty premenlivosti. Jedným z nich je genetická (alelická alebo genotypová) **multiplicita**, teda počet rôznych typov (alel, genotypov, haplotypov), ktoré sa v populácii vyskytujú, bez ohľadu na to, ako často sa vyskytujú (t.j. bez ohľadu na ich frekvenciu). Najjednoduchšou mierou genetickej multiplicity je celkový počet alel, resp. **priemerný počet alel pripadajúci na 1 lokus (n_a)**. Pokiaľ je populácia v danom géne monomorfna (t.j. nie je v ňom pozorovateľná variabilita) počet alel (aj počet genotypov) nadobúda minimálnu hodnotu, teda 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. Pravdepodobnosť, že výber s rozsahom N jedincov z hypoteticky nekonečnej panmiktickej populácie diploidných jedincov nezachytí aspoň jednu alelu s minimálnou frekvenciou α sa dá kvantifikovať ako

$$\varphi(2N, \alpha) = \sum_{i=1}^{n(\alpha)-1} (-1)^{i+1} \binom{n(\alpha)-1}{i} \left\{ (1-i\alpha)^{2N} + i\alpha^{2N} [n(\alpha)-i]^{2N-1} \right\}$$

kde $n(\alpha)$ je maximálny možný počet alel, ktoré môžu mať frekvenciu väčšiu ako α (najväčšie celé číslo menšie ako $1/\alpha$) (Gregorius 1980). 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.

Ďalším aspektom premenlivosti je **diverzita**. Pod týmto pojmom rozumieme rozmanitosť, rôznorodosť v zastúpení definovaných typov v súbore (genetická diverzita je daná zastúpením alel či haplotypov v populácii, druhová diverzita spoločenstva zastúpením druhov a pod.), ktorá závisí nielen od ich počtu, ale aj od rovnomernosti ich zastúpenia. Každá miera diverzity má teda 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 (Hill 1973), 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. Pre $a = 0$ sa z indexu stáva jednoducho počet identifikovaných typov, teda miera bohatosti:

$$v_0 = \left(\sum_{i=1}^A p_i^0 \right)^{1/(1-0)} = \sum_{i=1}^A 1 = A.$$

Naopak, pre $a \rightarrow \infty$ index konverguje k hodnote $v_\infty = (p_{i(\max)})^{-1}$, teda odráža výlučne vyrovnanosť. Pre $a = 1$ index nie je definovaný (v exponente vzorca je delenie nulou), ale dá sa dokázať, že pre $a \rightarrow 1$ index konverguje k hodnote

$$v_1 = \prod_{i=1}^A (p_i)^{-p_i} = e^{-H'}$$

kde $H' = -\sum_{i=1}^A p_i \ln p_i$, čo je z ekológie známy Shannon-Weaverov index diverzity. Tento

index v skutočnosti vychádza z teórie informácie a meria neistotu, s ktorou možno predikovať, ku ktorému typu bude patriť jedinec (v našom prípade alela, haplotyp a pod.) náhodne vybraný z populácie.

Ako optimálna hodnota sa javí $a = 2$. Index v_2 sa označuje aj ako **efektívny počet alel** (Crow a Kimura 1970):

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

(p_i je frekvencia i . alely).

Alelická diverzita sa odráža v genotypovej štruktúre, predovšetkým v heterozygotnosti, t.j. podiele heterozygotných genotypov v populácii. Heterozygotnosť predstavuje vlastne miery 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:

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

teda ako podiel počtu heterozygotov ($N(A_i A_j)$, $i \neq j$) 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, pri panmiktickej rovnováhe je alelická aj genotypová štruktúra populácie konštatná, 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 odvodíť z alelických frekvencií na základe Hardy-Weinbergovho zákona: $P'_{ii} = p_i^2$, $P'_{ij} = 2p_i p_j$ (P'_{ij} je očakávaná frekvencia genotypu $A_i A_j$). Rovnovážna, **očakávaná heterozygotnosť** je

vlastne súčet očakávaných frekvencií všetkých heterozygotných genotypov: $H_E = \sum_{i \neq j} P'_{ij}$. Z praktického hľadiska je ovšem jednoduchšie vypočítať ju ako:

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

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

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

kde N je rozsah výberovej vzorky (počet analyzovaných genotypov).

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 efektívne nachádza (t.j. v čím 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. Maximálny možný podiel heterozygotov je sa dá odvodiť z frekvencie najčastejšej alely ($p_{i(\max)}$):

$$\begin{aligned} H_{\max} &= 2(1 - p_{i(\max)}) && \text{pre } p_{i(\max)} > 0,5 \\ H_{\max} &= 1 && \text{pre } p_{i(\max)} \leq 0,5 \end{aligned}$$

Pre ilustráciu: ak má najčastejšia alela zastúpenie 90%, a zostávajúce alely pripadá 10%, teda aj keby sa všetky zriedkavé alely vyskytovali v populácii výlučne v heterozygotných genotypových kombináciách s najčastejšou, nemôže podiel heterozygotov prekročiť 20%, nech by mechanizmy pôsobiace v populácii proti výskytu homozygotov boli akokoľvek účinné. Pre niektoré účely môže byť zmysluplné zohľadniť tento potenciál, preto Hattemer *et al.* (1993) zaviedli koncept tzv. podmienenej heterozygotnosti:

$$H_c = H_O / H_{\max}$$

Mieru odchýlky genotypovej štruktúry populácie od 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 ($F < 0$).

Všetky doteraz popísané charakteristiky kvantifikujú premenlivosť vnútri populácií. Ďalším aspektom genetickej premenlivosti je **diferenciácia** medzi populáciami. 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 (1975):

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

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

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

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

(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:

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

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

Ďalšia z často používaných genetických vzdialeností vychádza z princípov matematickej topológie (Gregorius 1987):

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

teda je jednoducho sumou absolútnych hodnôt rozdielov vo frekvenciách jednotlivých alel medzi populáciami.

Príklad 1.4.3: Vo výberovej vzorke 20 jedincov z populácie buka lesného **X** boli zistené nasledovné genotypy v lokuse izocitrát-dehydrogenázy *Idh-A*:

A_2A_2 A_2A_2 A_1A_1 A_1A_2 A_1A_2 A_1A_1 A_2A_2 A_2A_2 A_2A_3 A_1A_1 A_1A_2 A_2A_2 A_2A_2 A_2A_2 A_1A_2 A_1A_2 A_1A_1 A_1A_2 A_2A_2

Aké sú charakteristiky genetickej štruktúry?

Aká je genetická vzdialenosť tejto populácie k populácii **Y** s alelickými frekvenciami $p(A_1) = 0,2$ $p(A_2) = 0,5$ $p(A_3) = 0,3$?

Riešenie:

genotypové frekvencie:

$$P(A_1A_1) = 4/20 = 0,20 \quad P(A_1A_2) = 7/20 = 0,35 \quad P(A_1A_3) = 0/20 = 0,00$$

$$P(A_2A_2) = 8/20 = 0,40 \quad P(A_2A_3) = 1/20 = 0,05 \quad P(A_3A_3) = 0/20 = 0,00$$

alelické frekvencie:

$$p(A_1) = P(A_1A_1) + \frac{1}{2}[P(A_1A_2) + P(A_1A_3)] = 0,20 + \frac{1}{2}[0,35 + 0,00] = 0,375$$

$$p(A_2) = P(A_2A_2) + \frac{1}{2}[P(A_1A_2) + P(A_2A_3)] = 0,40 + \frac{1}{2}[0,35 + 0,05] = 0,600$$

$$p(A_3) = P(A_3A_3) + \frac{1}{2}[P(A_1A_3) + P(A_2A_3)] = 0,00 + \frac{1}{2}[0,00 + 0,05] = 0,025$$

pozorovaná heterozygotnosť:

$$H_O = [N(A_1A_2) + N(A_1A_3) + N(A_2A_3)]/N = (7 + 0 + 1)/20 = 0,400$$

očakávaná heterozygotnosť:

$$H_E = 1 - \sum_i p_i^2 = 1 - (0,375^2 + 0,600^2 + 0,025^2) = 1 - 0,501 = 0,499$$

index fixácie:

$$F = 1 - H_O/H_E = 1 - 0,400/0,499 = 1 - 0,802 = 0,198$$

efektívny počet alel:

$$n_e = 1/\sum_i p_i^2 = 1/(0,375^2 + 0,600^2 + 0,025^2) = 1/0,501 = 1,995$$

genetická vzdialenosť medzi populáciami **X** a **Y**:

$$J_x = \sum_i p_{xi}^2 = (0,375^2 + 0,600^2 + 0,025^2) = 0,501$$

$$J_y = \sum_i p_{yi}^2 = (0,2^2 + 0,5^2 + 0,3^2) = 0,380$$

$$J_{xy} = \sum_i p_{xi} p_{yi} = (0,375 \cdot 0,2 + 0,600 \cdot 0,5 + 0,025 \cdot 0,3) = 0,383$$

$$D = -\ln(J_{xy} / \sqrt{J_x J_y}) = -\ln(0,383 / \sqrt{0,501 \cdot 0,380}) = -\ln(0,8766) = 0,1317$$

Koncept genetickej vzdialenosti v princípe možno aplikovať aj na úroveň jedinca, keďže aj v tomto prípade sa dajú kvantifikovať alelické „frekvencie“: u homozygota A_iA_i je frekvencia A_i rovná 100%, u heterozygota A_iA_j 50%, vo všetkých ostatných prípadoch 0%. V mnohých prípadoch, najmä pri použití dominantných alebo uniparentálnych DNA markérov, 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 (Sneath a Sokal 1973):

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

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 za vždy vzťahuje na dvojicu populácií. Predmetom genetického screeningu však spravidla bývajú rozsiahle súbory rádovo desiatok, niekedy stoviek populácií, výsledkom hodnotenia diferenciácie genetickými vzdialenosťami teda nie je jedna hodnota, ale matica hodnôt $n_p \times n_p$ (ak n_p je počet analyzovaných populácií), v ktorej pri veľkom počte populácií nie je možné zorientovať. Pre identifikáciu zákonitostí, štruktúry v rámci takejto matice (t.j. identifikáciu skupín populácií geneticky podobných alebo naopak geneticky odlišných) je možné použiť metódy zhlukovej analýzy (*cluster analysis*), ktoré zobrazia vzťahy medzi populáciami formou stromového grafu (dendrogramu), alebo analýzu základných koordinát (PCoA; *principal coordinate analysis*), výstupom ktorej je bodový graf. Zhluková analýza využíva algoritmus spájania podobných populácií (t.j. populácií separovaných malými genetickými vzdialenosťami) do skupín (zhluky, klastre) s následným prepočtom vzdialenosti takéhoto novovytvoreného zhuku voči ostatným populáciám resp. ich zhukom. Spôsob prepočtu je pri rôznych zhukovacích algoritmoch rozdielny, najčastejšie sa využíva metóda UPGMA (metóda nevážených priemerov), pri ktorej je vzdialenosť medzi zhukom a nezahrnutou populáciou neváženým aritmetickým priemerom genetických vzdialeností medzi všetkými populáciami zahrnutými v zhuku a nezahrnutou populáciou. Ďalšou často používanou metódou je metóda najbližšieho suseda (*neighbour joining*), ktorá minimalizuje celkovú dĺžku vetiev dendrogramu. Pri PCoA algoritmus konštruuje mnohorozmerné bodové pole, v ktorom každá populácia predstavuje jeden bod, pričom vzdialenosti medzi bodmi sú dané genetickými vzdialenosťami. PCoA vkladá do tohto bodového poľa súradnicový systém, t.j. hľadá optimálny priemet takéhoto bodového poľa do roviny dvoch súradnicových osí tak, aby priemet čo najlepšie vystihoval tvar bodového poľa (t.j. aby sa geneticky diferencované populácie na ňom zobrazili navzájom vzdialenými bodmi a populácie geneticky podobné navzájom blízkymi bodmi).

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) definovali Gregorius a Roberds (1986) 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 (Wright 1943). 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 variácia 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 variácia frekvencie alely v celom súbore). Analýza variácie umožňuje rozšíriť túto štatistiku aj na

prípade viac než dvoch alel a väčšieho počtu lokusov.

Ako technicky jednoduchšia náhrada F_{ST} sa dá použiť štatistika G_{ST} , ktorú možno odovdiť 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 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 (Pons a Petit 1998):

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

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.

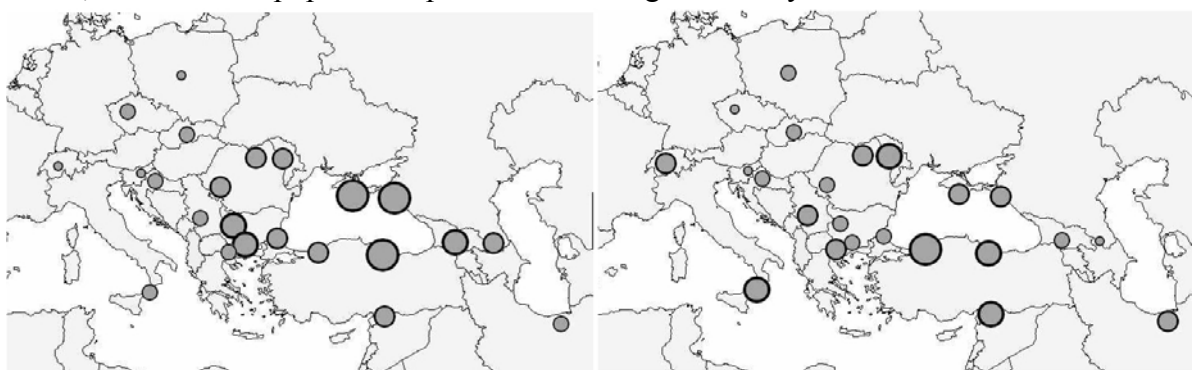
Tab. 14 Charakteristiky genetickej variability drevín v závislosti na ich biologických charakteristikách (Hamrick et al. 1993).

Kategória	Úroveň druhu			Úroveň populácie			G_{ST}
	n_a	n_e	H_E	n_a	n_e	H_E	
Dreviny spolu	2,22	1,24	0,177	1,76	1,20	0,148	0,084
Nahosemenné	2,38	1,22	0,169	1,83	1,20	0,151	0,073
Krytosemenné	2,10	1,26	0,183	1,68	1,20	0,143	0,102
Endemity	1,82	1,09	0,078	1,48	1,08	0,056	0,141
Lokálne rozšírené	2,08	1,22	0,165	1,61	1,19	0,143	0,124
Regionálne rozšírené	1,87	1,23	0,169	2,31	1,26	0,194	0,065
S rozsiahlym areálom	2,11	1,39	0,257	2,56	1,33	0,228	0,033
Boreálne	2,58	1,28	0,206	2,07	1,28	0,204	0,038
Mierneho pásma	2,27	1,22	0,166	1,81	1,20	0,145	0,092
Tropické	1,87	1,28	0,191	1,51	1,16	0,125	0,119
Opelované živočíchmi	2,18	1,30	0,211	1,72	1,22	0,163	0,099
Vetroopelivé	2,31	1,23	0,173	1,84	1,21	0,154	0,077
Šírené gravitáciou	2,48	1,26	0,144	1,69	1,20	0,141	0,131
Šírené živočíchmi	2,07	1,34	0,231	1,90	1,29	0,208	0,051
Šírené vetrom	2,24	1,21	0,160	1,79	1,20	0,149	0,076

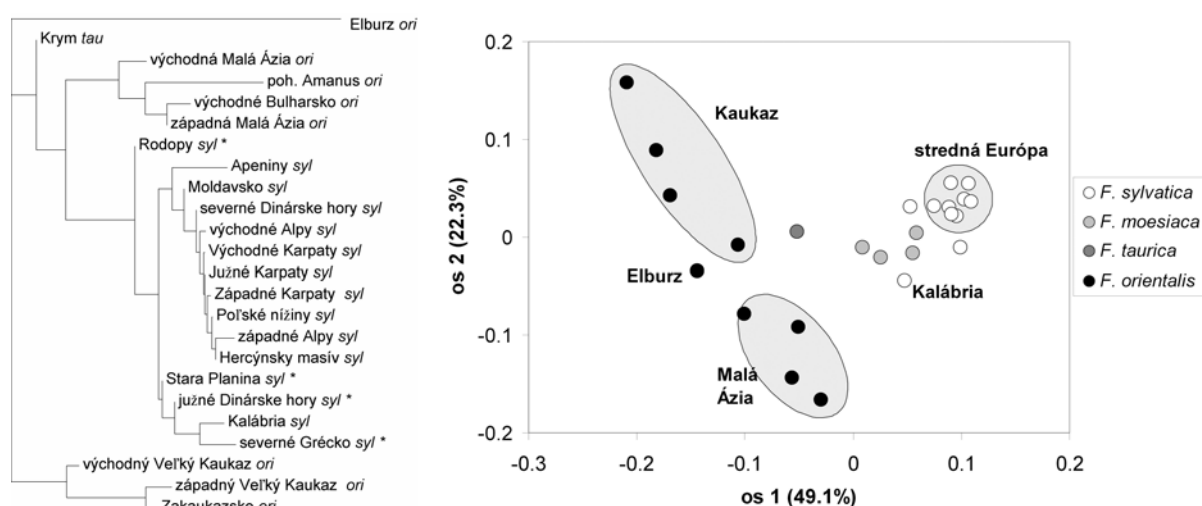
Základnú informáciu o úrovni genetickej variability v rôznych skupinách lesných drevín poskytuje tab. 14, založená na metaanalýze výsledkov genetických štúdií 191 druhov drevín. Rozdiely medzi skupinami drevín, ktoré sa odlišujú svojimi biologickými charakteristikami, vyplývajú zo skutočnosti, že úroveň premenlivosti je výsledkom pôsobenia evolučných

mechanizmov, ktoré utvárajú genetickú štruktúru ich populácií (selekcia, migrácia, drift, mutácie a ďalšie) a odráža možnosti a limity, ktoré poskytuje spôsob reprodukcie a všetky procesy s reprodukciou spojené. Rovnaké rozdiely existujú aj medzi populáciami v rámci druhu a odrážajú sa vo fenotypovej premenlivosti, schopnosti populácií adaptovať sa na meniace sa prostredie a ďalšie prakticky významné aspekty.

Len pre ilustráciu uvádzame na obr. 29 rozdelenie alelickej bohatosti (počet alel prepočítaný na konštantnú veľkosť vzorky 50 jedincov) a lokálnej genetickej diferenciácie v populáciách buka (komplex *Fagus sylvatica sensu lato*) v Európe a západnej Ázii. Je zrejmé, že u poddruhu ssp. *orientalis* s výskytom na Kaukaze, v Malej Ázii a v Iráne, ktorý je fylogeneticky starší a na jednotlivých lokalitách sa vyskytuje nepretržite od treťohôr, sa stihlo vyvinúť mutačným procesom viac alel (populácie sú geneticky bohatšie) než u ssp. *sylvatica* v Európe, z ktorých väčšina kolonizovala miesta svojho súčasného výskytu nedávno po skončení poslednej doby ľadovej. Ovšem aj v rámci európskeho poddruhu sú zreteľné rozdiely medzi populáciami v oblasti glaciálnych refúgií (miest, kde dreviny prečkali zaľadnenie) a novo kolonizovanými miestami, keďže počas postglaciálnej migrácie populácie stratili časť svojej genetickej výbavy v dôsledku tzv. efektu zakladateľa. Keďže väčšina európskych populácií pochádza z refúgia vo východných Alpách, vykazujú zároveň minimálnu diferenciáciu, na rozdiel od populácií ssp. *orientalis* s fragmentovaným areálom.



Obr. 29 Rozdelenie počtu alel po rarefakcii (vľavo) a diferenciácie (F_{ST} ; vpravo) na základe analýzy 12 izoenzymových génov v regionálnych populáciách buka



Obr. 30 Dendrogram vytvorený algoritmom najbližšieho suseda (vľavo) a bodový diagram analýzy základných koordinát (vpravo) založený na genetických vzdialenostiach podľa Neia medzi regionálnymi populáciami buka

Pre identifikáciu štruktúry v matici genetických vzdialeností sa používa zhuková analýza a PCoA. V prípade, že sa pre hodnotenie používajú také génové markéry, ktoré sú selekčne neutrálne (teda nepodliehajú prírodnému výberu), odrážajú vzťahy medzi populáciami fylogenzu, teda dendrogram možno interpretovať ako fylogenetický strom. V prípade populácií buka (obr. 30) je zrejmé, že populácie ssp. *sylvatica* sú len minimálne diferencované (čo súvisí s ich pôvodom z jediného refúgia) a blízke k nim sú balkánske populácie, ktoré sa niekedy vylišujú ako samostatný taxón *F. moesiaca*. Krymské populácie, niekedy tiež považované za samostatný taxón *F. taurica*, sa v PCoA javia ako prechodné medzi obidvomi hlavnými poddruhmi, ale v dendrograme zaujímajú postavenie medzi populáciami ssp. *orientalis*. Dendrogram naznačuje, že ssp. *sylvatica* sa pomerne nedávno odštiepil od maloázijských populácií ssp. *orientalis*, je teda evolučne mladým taxónom.

1.4.4 Systém reprodukcie a tok génov

Pod systémom reprodukcie rozumieme všetky mechanizmy, ktoré sa podieľajú na odovzdávaní genetickej informácie z rodičovskej na následnú generáciu. Jeho zložkami sú predovšetkým:

- systém pohlavného a nepohlavného rozmnožovania (podiel vegetatívneho množenia výmladkami, hrúžením, podiel apomixie)
- pohlavná štruktúra populácie (zastúpenie samčích, samičích a obojpohlavných jedincov, rozdelenie produkcie samčích a samičích gamét)
- systém párenia (rozdelenie frekvencie párenia medzi jedincami populácie, podiel samoopelenia a cudzoopelenia, inkompatibilita, autosterilita)
- tok génov vnútri populácie a medzi populáciami (u semenných rastlín migrácia génom prostredníctvom peľu a semien, prípadne oddelenými časťami rastlín; u živočíchov dospelými jedincami resp. prenos v embryonálnom stave)

U hlavných lesných drevín v našich podmienkach je rozhodujúcim spôsobom prirodzeného rozmnožovania pohlavná reprodukcia. Keďže väčšinou sú dreviny autokompatibilné, z praktického hľadiska je z komponentov reprodukčného systému najdôležitejší systém párenia, predovšetkým určenie podielu samoopelenia a cudzoopelenia. Samoopelenie ako extrémna forma príbuzenského kríženia, inbrídingu, vedie k tzv. **inbrídingovej depresii**, t.j. zreteľnému zníženiu vitality a rastových schopností. Z hľadiska zachovania genofondu a pre posúdenie miery kontaminácie semenných sadov cudzím peľom má praktický význam aj hodnotenie toku génov medzi populáciami, predovšetkým podielu migrantov na tvorbe následnej generácie.

Určovanie podielu samoopelenia, cudzoopelenia a migrantov je v princípe problémom určenia otcovstva. V konkrétnej uzavretej populácii sú pri vzorke semien materské jedince známe, je však potrebné identifikovať otcovského jedinca. Pre tento účel je možné výhodne využiť metódy určovania paternity pomocou kodominantných genetických markérov – v minulosti sa najčastejšie používali izoenzyémy, s ohľadom na vyššiu presnosť výsledkov pri rozumnej úrovni nákladov sa dnes ako optimálne javia mikrosatelitné DNA markéry s podstatne vyššou mierou polymorfizmu.

Metodický postup je najjednoduchší u ihličnatých drevín, u ktorých sme v genotype embrya schopní odlíšiť materskú a otcovskú alelu (viď kap. 1.2). Semenno nahosemenných rastlín, vrátane ihličnanov, sa skladá zo zásobného pletiva, ktoré je haploidné a jeho haplotyp je zhodný s vajíčkom, a diploidného embrya, ktoré vzniká delením zygoty. Alely, ktoré sa zhodne vyskytujú v endosperme aj v embryu, pochádzajú teda od materského jedinca. Úzus pri zapisovaní genotypu je, že ako prvá sa píše alela pochádzajúca od matky, ako druhá alela pochádzajúca od otca. Ak je napr. genotyp embrya $A_1A_3 B_3B_2 C_2C_2$, materská gaméta má haplotyp $A_1 B_3 C_2$ a otcovská gaméta $A_3 B_2 C_2$.

Príklad 1.4.4:

V populácii tvorenej jedincami X, Y, Z boli nájdené nasledovné genotypy materských jedincov a potomstva. Aký je podiel samoopelenia, cudzoopelenia a migrantov?

Materské genotypy					Riešenie:					
	A	B	C	D	Kombinácie alel v gamétach, vytvárané materskými genotypmi:					
X	A ₁ A ₁	B ₂ B ₂	C ₁ C ₂	D ₁ D ₃	X:		Y:		Z:	
Y	A ₁ A ₂	B ₂ B ₂	C ₁ C ₃	D ₃ D ₃	x1	A ₁ B ₂ C ₁ D ₁	y1	A ₁ B ₂ C ₁ D ₃	z1	A ₁ B ₂ C ₁ D ₁
Z	A ₁ A ₁	B ₂ B ₂	C ₁ C ₁	D ₁ D ₃	x2	A ₁ B ₂ C ₁ D ₃	y2	A ₁ B ₂ C ₃ D ₃	z2	A ₁ B ₂ C ₁ D ₃
					x3	A ₁ B ₂ C ₂ D ₁	y3	A ₂ B ₂ C ₁ D ₃		
					x4	A ₁ B ₂ C ₂ D ₃	y4	A ₂ B ₂ C ₃ D ₃		
Potomstvo					Peľové gaméty potomstva		Pravdepodobnosť pôvodu		Možný pôvod otcovských gamét	
							samoop.	cudzoop.	migr.	
X1	A ₁ A ₁	B ₂ B ₂	C ₁ C ₂	D ₃ D ₁	X1	A ₁ B ₂ C ₂ D ₁	1	0	0	x3
X2	A ₁ A ₁	B ₂ B ₂	C ₂ C ₁	D ₁ D ₂	X2	A ₁ B ₂ C ₁ D ₂	0	0	1	mimo
X3	A ₁ A ₁	B ₂ B ₂	C ₁ C ₁	D ₁ D ₃	X3	A ₁ B ₂ C ₁ D ₃	0,33	0,67	0	x2,y1,z2
X4	A ₁ A ₂	B ₂ B ₂	C ₂ C ₂	D ₃ D ₁	X4	A ₂ B ₂ C ₂ D ₁	0	0	1	mimo
X5	A ₁ A ₂	B ₂ B ₂	C ₂ C ₁	D ₁ D ₃	X5	A ₂ B ₂ C ₁ D ₃	0	1	0	y3
Y1	A ₁ A ₁	B ₂ B ₂	C ₁ C ₁	D ₃ D ₁	Y1	A ₁ B ₂ C ₁ D ₁	0	1	0	x1,z1
Y2	A ₁ A ₁	B ₂ B ₂	C ₁ C ₂	D ₃ D ₁	Y2	A ₁ B ₂ C ₂ D ₁	0	1	0	x3
Y3	A ₂ A ₂	B ₂ B ₂	C ₁ C ₂	D ₃ D ₃	Y3	A ₂ B ₂ C ₂ D ₃	0	0	1	mimo
Y4	A ₂ A ₁	B ₂ B ₂	C ₁ C ₂	D ₃ D ₃	Y4	A ₁ B ₂ C ₂ D ₃	0	1	0	x4
Y5	A ₁ A ₂	B ₂ B ₂	C ₁ C ₁	D ₃ D ₂	Y5	A ₂ B ₂ C ₁ D ₂	0	0	1	mimo
Z1	A ₁ A ₁	B ₂ B ₂	C ₁ C ₁	D ₁ D ₁	Z1	A ₁ B ₂ C ₁ D ₁	0,5	0,5	0	x1, z1
Z2	A ₁ A ₁	B ₂ B ₂	C ₂ C ₂	D ₁ D ₃	Z2	A ₁ B ₂ C ₂ D ₃	0	1	0	x4
Z3	A ₁ A ₁	B ₂ B ₂	C ₁ C ₁	D ₁ D ₃	Z3	A ₁ B ₂ C ₁ D ₃	0,33	0,67	0	x2,y1,z2
Z4	A ₁ A ₁	B ₂ B ₃	C ₁ C ₁	D ₁ D ₁	Z4	A ₁ B ₃ C ₁ D ₁	0	0	1	mimo
Z5	A ₁ A ₁	B ₂ B ₂	C ₂ C ₃	D ₁ D ₃	Z5	A ₁ B ₂ C ₃ D ₃	0	1	0	y2
spolu:						2,17	7,83	5		
rozsah výberovej vzorky:						3 × 5 = 15 semien				
Podiel samoopelenia:						2,17/15 = 0,145				
Podiel cudzoopelenia:						7,83/15 = 0,522				
Podiel migrantov:						5,00/15 = 0,333				

Pri určovaní paternity sa vychádza z genotypovania všetkých jedincov populácie (pokiaľ ide o populáciu s menším počtom genotypov, napr. semenný sad, nie je to problém). Z každého jedinca sa zároveň zozbiera vzorka semien, v ktorých sa paralelne analyzuje endosperm a embryo. Pre materské genotypy je potrebné určiť, aké kombinácie alel v gamétach sú schopné vytvárať. Počet rôznych typov gamét je 2^N (N – počet lokusov, v ktorých je jedinec heterozygotný). Napr. materský genotyp $A_1A_3 B_2B_3 C_2C_2$ je heterozygotný v 2 génoch (A a B), tvorí teda $2^2 = 4$ typy gamét: $A_1 B_2 C_2$, $A_1 B_3 C_2$, $A_3 B_2 C_2$ a $A_3 B_3 C_2$. Následne sa pre jednotlivé peľové haplotypy vo vzorke embrií porovnaním s materskými haplotypmi určuje ich pôvod, t.j. či pochádzajú z materského jedinca (samoopelenie), z iného jedinca v rámci populácie (cudzoopelenie) alebo z jedinca populácie (migrácia).

V prípade menej polymorfných genetických markérov môže viacero jedincov v populácii vytvárať gaméty s rovnakým haplotypom. Pokiaľ jeden z nich je aj materský jedinec, je potrebné rozdeliť pravdepodobnosť paternity úmerne počtu možných otcov medzi samoope-

lenie a cudzoopelenie. S migráciou sa uvažuje len v prípade, ak haplotyp peľovej gaméty nie je schopný tvoriť žiadny z jedincov v rámci populácie.

1.4.5 Selekcia podmienená plodnosťou

Modely selekcie uvedené v kapitole 1.4.1 uvažujú predovšetkým so životaschopnosťou. Biologická zdatnosť jedinca (fitness) je však daná aj plodnosťou, t.j. mierou, v akej sa jediniec, ktorý sa dožil reprodukčného veku, podieľa na tvorbe ďalšej generácie. Táto miera závisí v rastlinných populáciách predovšetkým od množstva produkovaných gamét a časových resp. priestorových možností na to, aby sa vyrpudukované gaméty zúčastnili na tvorbe zygot. Z časového hľadiska je dôležitým faktorom synchronizácia fenologických fáz kvitnutia medzi jedincami populácie (prekryv doby samčieho kvitnutia a doby receptivity samičích kvetov resp. makrostrobilov), z priestorového hľadiska vzájomné rozmiestnenie jedincov s ohľadom na mechanizmy prenosu peľu a ich účinnosť (vektor prenosu peľu: vietor resp. hmyz, rozptylová funkcia a priemerná rozptylová vzdialenosť a pod.).

V početných prirodzených populáciách sa efekt selekcie podmienenej plodnosťou spravidla prejaví až po veľkom počte generácií, nie je teda relevantný z krátkodobého hľadiska (napr. z hľadiska hospodárskych zásahov). V populáciách zriedkavých drevín alebo v šľachtiteľských populáciách typu semenných sádov však rozdiely v plodnosti a fenológii kvitnutia môžu spôsobiť značný posun v zastúpení génov medzi generáciami.

Z metodického hľadiska je najsprávnejším postupom hodnotenia vývoja alelickej a genotypovej štruktúry jeho priame overenie pomocou genetických markérov v rodičovskej generácii a vo vzorke potomstva. S ohľadom na cenu genetických analýz však táto cesta pri praktickom hodnotení funkcie semenných sádov nie je vždy schodná. Podiel jedincov na tvorbe potomstva a následne zmena genetickej štruktúry sa však dajú relatívne spoľahlivo odhadnúť na základe potenciálu pre vzájomné kríženie konkrétnych rodičovských párov, vychádzajúceho z produkcie gamét a fenologickej synchronizácie medzi jedincami. Pochopteľne, nie je možné sčítavať gaméty, ale ako podklad pre odhad plodnosti jedinca možno využiť niektorú ľahko merateľnú veličinu, ktorá s plodnosťou súvisí. Ako mieru produkcie samičích gamét možno využiť odhadovaný počet alebo hmotnosť plodov resp. šišiek, na určenie miery produkcie samčích gamét odhadovaný počet kvetov alebo samčích strobilov. Predpoklad, že všetky jedince v populácii majú napr. rovnakú sypavosť šišiek, nie je síce realistický, ale rozdiely spôsobené týmto faktorom sú v porovnaní s rozdielmi podmienenými variabilitou v počte plodov či kvetov zanedbateľné. Druhým faktorom, určujúcim príspevok jedinca k tvorbe potomstva, je jeho fenologická synchronizácia so zvyškom populácie. Pre jej hodnotenie je nevyhnutné vykonať v dobe kvitnutia pozorovania jedincov a určiť u každého z nich začiatok a koniec obdobia produkcie peľu a samičej receptivity, čo si samozrejme vyžaduje dôkladnú znalosť morfológie kvetov resp. strobilov a ich jej zmien počas vývoja.

Ak pomineme ostatné potenciálne vplyvy, zastúpenie konkrétnej kombinácie dvoch rodičovských jedincov v potomstve bude priamo úmerné podielu na produkcii samičích gamét jedného z rodičov, podielu na produkcii samčích gamét druhého z rodičov, a dĺžke trvania doby, počas ktorej sa samičia receptivita prvého rodiča prekrýva s produkciou peľu druhého rodiča (vrátane prípadného samoopelenia u jednodomých rastlín). Súčinom týchto troch veličín teda dostaneme relatívne skóre, ktoré určuje, ako často môžeme príslušnú rodičovskú kombináciu v potomstve očakávať. Z technického hľadiska je jednoduchšie rozdeliť tento výpočet na dve fázy. Prvou je určenie prekryvu plodnosti, teda pravdepodobnosti, s akou vznikajú jednotlivé rodičovské kombinácie bez ohľadu na fenológiu. Túto pravdepodobnosť určíme ako súčin podielu jedného z rodičov na tvorbe samičích gamét a podielu druhého z rodičov na tvorbe samčích gamét. Druhou fázou je posúdenie fenologického prekryvu, teda počtu dní, v ktorých sa prekrýva receptivita samičích orgánov a produkcia

Príklad 1.4.5:

V semennom sade smrekovca opadavého je zastúpených 5 klonov, každý rovnakým počtom vrúbľovancov. V sade boli v čase kvitnutia urobené fenologické pozorovania, na základe ktorých bola určená doba samičej receptivity a prášenia jednotlivých klonov. Zároveň bol odhadovaný počet samčích strobilov. V ďalšom roku boli po klonoch odvážené šišky z vyprodukovanej úrody. Klony boli genotypované v dvoch lokusoch. Aká bude očakávaná genetická štruktúra potomstva z tejto úrody?

Klon	♀ gaméty		♂ gaméty		genotyp
	váha šišíek	termín receptivity	počet strobilov	termín prášenia	
1	1 kg	16.5–22.5.	2000	11.5–20.5.	AaBB
2	–	–	500	16.5.–21.5.	AaBb
3	1.5 kg	12.5.–19.5.	–	–	AABB
4	2 kg	12.5.–19.5.	2000	16.5.–21.5.	aaBB
5	0.5 kg	17.5.–23.5.	500	8.5.–15.5.	AaBB

Riešenie:

Alelické frekvencie v semennom sade (za predpokladu, že každý klon je zastúpený rovnakým počtom vrúbľovancov): $p(A) = 1 \times 1AA + \frac{1}{2} \times 3Aa + 0 \times 1aa = 0,5$; $p(a) = 0,5$; $p(B) = 0,9$; $p(b) = 0,1$.

Podiely klonov na produkcii gamét:

♀ gaméty: Sumárna hmotnosť šišíek 5 kg, podiel klonu č. 1: $1/5 = 0,2$; klon č. 2: 0; klon č. 3: 0,3; klon č. 4: 0,4; klon č. 5: 0,1

♂ gaméty: Sumárna počet samčích strobilov 5000, podiel klonu č. 1: $2000/5000 = 0,4$; klon č. 2: 0,1; klon č. 3: 0; klon č. 4: 0,4; klon č. 5: 0,1

Prekryv plodnosti

klon		♂ 1	♂ 2	♂ 3	♂ 4	♂ 5
		0,4	0,1	0	0,4	0,1
♀ 1	0,2	$0,2 \times 0,4 = 0,08$	$0,2 \times 0,1 = 0,02$	$0,2 \times 0 = 0$	$0,2 \times 0,4 = 0,08$	$0,2 \times 0,1 = 0,02$
♀ 2	0	0	0	0	0	0
♀ 3	0,3	0,12	0,03	0	0,12	0,03
♀ 4	0,4	0,16	0,04	0	0,16	0,04
♀ 5	0,1	0	0,01	0	0,04	0,01

Fenologický prekryv (dni)

klon	♂ 1	♂ 2	♂ 3	♂ 4	♂ 5
♀ 1	16.–20.5. = 5 dní	6	0	6	0
♀ 2	0	0	0	0	0
♀ 3	8	4	0	4	4
♀ 4	8	4	0	4	5
♀ 5	4	6	0	4	0

Relatívne skóre kríženia

klon	♂ 1	♂ 2	♂ 3	♂ 4	♂ 5	Σ
♀ 1	$5 \times 0,08 = 0,4$	0,12	0	0,48	0	1
♀ 2	0	0	0	0	0	0
♀ 3	0,96	0,12	0	0,48	0,12	1,68
♀ 4	1,28	0,16	0	0,64	0,20	2,28
♀ 5	0	0,06	0	0,16	0	0,22
Σ	2,64	0,46	0	1,76	0,32	5,18

Podiely rodičovských kombinácií

klon	♂ 1	♂ 2	♂ 3	♂ 4	♂ 5	Σ
♀ 1	$0,4/5,18 = 0,077$	0,023	0	0,093	0	0,193
♀ 2	0	0	0	0	0	0
♀ 3	0,185	0,023	0	0,093	0,023	0,324
♀ 4	0,247	0,031	0	0,124	0,039	0,440
♀ 5	0	0,012	0	0,031	0	0,043
Σ	0,509	0,089	0	0,340	0,062	1

Podiely a haplotypy realizovaných gamét jednotlivých klonov

	Klon					
	1	2	3	4	5	
♀ gaméty	0,193	0	0,324	0,440	0,043	
♂ gaméty	0,509	0,089	0	0,340	0,062	
priemer	0,351	0,044	0,162	0,390	0,053	
genotyp	<i>AaBB</i>	<i>AaBb</i>	<i>AABB</i>	<i>aaBB</i>	<i>AaBB</i>	
<i>A</i>	0,175	0,022	0,162	—	0,027	<i>p(A)</i> = 0,386 <i>p(a)</i> = 0,614
<i>a</i>	0,176	0,022	—	0,390	0,026	
<i>B</i>	0,351	0,022	0,162	0,390	0,053	<i>p(B)</i> = 0,978 <i>p(b)</i> = 0,022
<i>b</i>	—	0,022	—	—	—	

peľu. Maticu relatívnych skóre potom dostaneme prenásobením prvkov matice prekryvu plodnosti a matice fenologického prekryvu. Po predelení prvkov matice relatívnych skóre jej sumou dostaneme následne podiely jednotlivých rodičovských kombinácií v potomstve. Marginálne súčty (t.j. riadkové a stĺpcové sumy) podielov rodičovských kombinácií následne určujú príspevky jednotlivých jedincov (napr. klonov v semennom sade) k realizovaným gamétam. Je potrebné rozlišovať medzi podielmi jedincov na vyprodukovaných gamétach a realizovaných gamétach. Úplne zrejme je to pri peľi - každá rastlina vyprodukuje obrovské množstvo peľových zŕn, ale len minimálna časť z nich sa uplatní pri opelení. Keďže v zmysle Mendelových zákonov genotyp jedinca nezávisí od toho, ktorú alelu získal od ktorého z rodičov, je zmysluplné vypočítať priemerný príspevok jedincov k realizovaným gamétam. Ak poznáme genotypy rodičovských jedincov, možno na základe ich podielov na realizovaných gamétach určiť očakávané alelické frekvencie v potomstve.

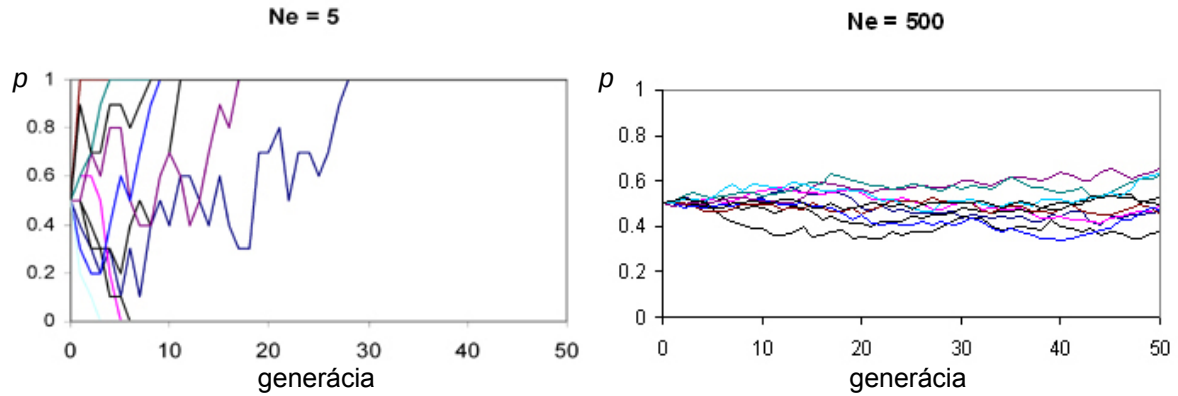
1.4.6 Genetický drift, inbreeding a efektívna veľkosť populácie

Fungovanie panmiktickej populácie bolo v úvode kap. 1.4 popisované ako deterministický proces, v ktorom zmena frekvencie génu je funkciou východiskovej frekvencie a selekčného koeficienta. V prípade veľkých populácií je takýto model adekvátny. V malých populáciách je ovšem proces prenosu dedičnej informácie z generácie na generáciu stochastický, t.j. zohráva v ňom úlohu náhoda. Pravdepodobnosť, že gén s frekvenciou p v populácii N jedincov (čo pri diploidných organizmoch predstavuje $2N$ génov) sa v potomstve populácie objaví v n exemplároch sa dá určiť na základe Poissonovho rozdelenia:

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

Ak použijeme extrémny príklad populácie s 2 jedincami (t.j. $2N = 4$), gén, ktorý má v populácii frekvenciu 50% z nej s pravdepodobnosťou 6,25% vypadne, s rovnakou pravdepodobnosťou bude fixovaný (vypadnú ostatné alely), s pravdepodobnosťou 25% sa v ďalšej generácii vyskytne v 1 exemplári (resp. v 3 exemplároch) a s pravdepodobnosťou 37,5% sa vyskytne v 2 exemplároch (t.j. jeho frekvencia sa nezmení), z čoho vyplýva, že pravdepodobnosť zachovania pôvodného zastúpenia génov (0,375) je menšia než pravdepodobnosť, že dôjde k nejakej zmene (0,625). Tento proces náhodnej zmeny alelických frekvencií, spojený v krajnom prípade s vypadnutím resp. fixáciou alel, sa nazýva genetický posun (drift).

Dopad genetického driftu ilustruje obr. 31. Ak je početnosť populácie nízka, osudom prakticky každej alely v priebehu pár generácií je buď vypadnutie z genofondu populácie, alebo



Obr. 31 Simulácia účinkov genetického driftu na zastúpenie alely s východiskovou frekvenciou $p = 0,5$ v populácii s konštantnou veľkosťou 5 jedincov (vľavo) a 500 jedincov cez 50 generácií.

fixácia (t.j. vypadnú všetky ostatné varianty a alela nadobudne frekvenciu 100%). Pochopiteľne, v okamihu, keď sa v populácii stratí polymorfizmus (t.j. zostane v nej zastúpená jediná alela daného génu), daný gén prestane byť predmetom či už prírodného výberu alebo náhodných zmien a frekvencia zostávajúcej alely bude naďalej konštantne 100%. Iba nová mutácia alebo imigrácia génu z inej populácie môže obnoviť polymorfizmus génu a tým z neho urobiť „potravu“ pre ďalšiu evolúciu. Ak je početnosť populácie vysoká, môže zastúpenie častej alely v dôsledku náhody kolísať, ale je málo pravdepodobné, že z populácie vypadne alebo že bude fixovaná (v prípade populácie vpravo k tomu v priebehu 50 generácií nedošlo ani v jednej z 10 simulácií). Pochopiteľne, iná je situácia u zriedkavého alelického variantu génu. Ak by sa v 500-člennej populácii vyskytla alela s frekvenciou 0,001 (t.j. v jednej kópii, u jedného heterozygotného jedinca), pravdepodobnosť, že sa v ďalšej generácii už neobjaví, je v zmysle Poissonovho rozdelenia 60%. Osudom väčšiny nových mutácií je teda vypadnutie z genofondu populácie, a to bez ohľadu na to, či sú pre organizmus v danom prostredí výhodné, neutrálne alebo nevýhodné.

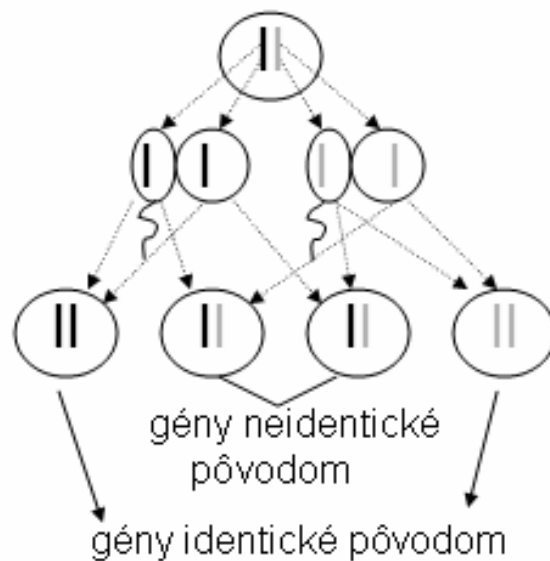
Obmedzenie počtu jedincov v populácii teda vedie k náhodnej, nepredikovateľnej zmene zastúpenia génov. Miera tejto zmeny je závislá od veľkosti populácie. Zo zákonitostí binomického rozdelenia vyplýva variancia zmeny alelických frekvencií

$$\sigma_{\Delta p}^2 = p(1 - p) / N$$

Rozptyl alelických frekvencií v následnej generácii je teda tým väčší, čím menšia je početnosť populácie (presnejšie počet jedincov zúčastňujúcich sa reprodukcie) a čím viac sa frekvencia alely približuje 0,5.

Ďalším dôsledkom poklesu veľkosti populácie je zvýšený podiel príbuzenského kríženia (inbreedingu) medzi jedincami populácie. Existuje celý rad mysliteľných príbuzenských vzťahov medzi rodičovskými jedincami. Bežné hovorové pojmy (vlastní súrodenci, nevlastní súrodenci, rodič – potomok, bratrance a pod.) ich síce popisujú zrozumiteľnou formou, ale pre kvantifikáciu miery príbuznosti nestačia. Stupeň príbuznosti rodičovských jedincov je možné merať koeficientom inbreedingu, ktorý určuje pravdepodobnosť, s akou je dvojica homologických génov náhodne vybraných z genómu potomka identická pôvodom (t.j. oba exempláre génu sú kópiou toho istého génu, ktorý sa vyskytol v genóme spoločného predka, vznikli replikáciou úseku na rovnakej molekule DNA).

Koeficient inbreedingu jedinca, ktorý pochádza zo samoopelenia (obr. 32), je teda 0,5: pravdepodobnosť spojenia dvoch gamét s „čiernym“ resp. dvoch gamét so „šedým“ chromozómom je v oboch prípadoch 1/4 (gény oboch gamét sú v tomto prípade identické pôvodom), pravdepodobnosť spojenia samčej gaméty s „čiernym“ a samičej so „šedým“ chromozómom resp. naopak je tiež 1/4 (v tomto prípade gény gamét nie sú identické pôvodom). Analogicky,



Obr. 32 Koncept identity pôvodom. Chromozómy gamét označené rovnakou farbou vznikli replikáciou toho istého chromozómu zárodočnej bunky rodičovského jedinca, teda aj všetky gény, ktoré sú na nich lokalizované, sú kópiami tých istých rodičovských génov (sú identické pôvodom).

koeficient inbreedingu potomstva z kríženia medzi plnosesterskými príbuznými (“vlastní súrodenci”) alebo medzi rodičom a potomkom je 0,25, pri krížení polosesterských príbuzných (“nevlastní súrodenci”) je 0,125 atď.

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.

Ako už bolo konštatované, malá početnosť populácie vedie k zvýšenému inbreedingu. Vo veľkej populácii, pokiaľ nie je priestorovo alebo inak štruktúrovaná, vedie náhodný výber spravidla k voľbe nepríbuzného partnera. 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. Medzi veľkosťou populácie a priemerným koeficientom inbreedingu pri náhodnom párovaní existuje funkčný vzťah:

$$F_t = 1 - (1/2N)^t$$

kde F_t je koeficient inbreedingu v t . generácii, N je počet jedincov populácie (vzťah vychádza z konštatnej veľkosti populácie). Prírastok inbreedingu za 1 generáciu ($t = 1$) sa teda dá vypočítať ako:

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

Tento vzťah však predpokladá, že každý jedinec populácie prispieva k tvorbe potomstva rovnakou mierou (resp. že každý genotyp prispieva do genofondu následnej generácie v miere, v akej je v populácii zastúpený). 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 v tomto prípade 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 ideálne panmiktickej populácie, ktorá by pri náhodnom krížení vykazovala rovnakú mieru inbreedingu resp. rovnakú varianciu alelických frekvencií (t.j. rovnakú mieru genetického driftu) ako hodnotená reálna populácia. Vo vzťahoch pre výpočet prírastku inbreedingu či variance 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 reprodukujúcich 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):

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

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.

Príklad 1.3.5: Vypočítajte efektívnu veľkosť semenného sadu z príkladu 1.3.4

Riešenie:

Podiely rodičovských kombinácií

Klon	♂ 1	♂ 2	♂ 3	♂ 4	♂ 5
♀ 1	<u>0,074</u>	0,022	0	0,09	0
♀ 2	0	<u>0</u>	0	0	0
♀ 3	0,18	0,022	<u>0</u>	0,09	0,022
♀ 4	0,24	0,03	0	<u>0,112</u>	0,037
♀ 5	0,03	0,011	0	0,03	<u>0</u>

Sumárny podiel samoopelenia: $0,074 + 0 + 0 + 0,112 + 0 = 0,186$

$N_e = 1 / (\sum C_{ii}) = 1/0,186 = 5,37$

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 ideálne panmiktickej populácie, ktorá by pri náhodnom krížení vykazovala rovnakú mieru inbreedingu resp. rovnakú varianciu alelických frekvencií (t.j. rovnakú mieru genetického driftu) ako hodnotená reálna populácia. Vo vzťahoch pre výpočet prírastku inbreedingu či variance 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):

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

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.

Príklad 1.3.5: Vypočítajte efektívnu veľkosť semenného sadu z príkladu 1.3.4

Riešenie:

Podiely rodičovských kombinácií

Klon	♂ 1	♂ 2	♂ 3	♂ 4	♂ 5
♀ 1	<u>0,074</u>	0,022	0	0,09	0
♀ 2	0	<u>0</u>	0	0	0
♀ 3	0,18	0,022	<u>0</u>	0,09	0,022
♀ 4	0,24	0,03	0	<u>0,112</u>	0,037
♀ 5	0,03	0,011	0	0,03	<u>0</u>

Sumárny podiel samoopelenia: $0,074 + 0 + 0 + 0,112 + 0 = 0,186$

$N_e = 1 / (\sum C_{ii}) = 1/0,186 = 5,37$

V prípade semenných sadov, ktoré sú zakladané ako potomstvá výberových stromov, t.j. jedincov vybraných individuálnym výberom a teda navzájom nepríbuzných, je jedinou formou príbuzenského kríženia samoopelenie, pri ktorom $F = 0,5$. Ak podiel samoopelenia označíme s , potom nárast inbreedingu $\Delta F = F \cdot s = 0,5 \cdot s = 1/2N_e$, z čoho $N_e = 1/s$. Efektívnu veľkosť semenného sadu teda možno vypočítať ako prevrátenú hodnotu podielu samoopelenia.

2. ŠĽACHTENIE

2.1 Premennivosť fenotypových znakov

Ako už bolo povedané v kap. 1.1, premenlivosť, spočívajúca na najnižšej (individuálnej) úrovni vo vzájomnej odlišnosti jedincov v individuálnych znakoch a vlastnostiach, patrí k základným charakteristikám živej hmoty. Šľachtenie len využíva túto základnú vlastnosť v prospech človeka. Jeho náplňou je zmena fenotypových vlastností organizmov tak, aby lepšie vyhovovali nárokom človeka. V prípade lesných drevín teda ide o zmenu fenotypových vlastností lesných drevín tak, aby vyhovovali požiadavkám lesného hospodára. Predmetom šľachtenia môže byť v princípe ktorákoľvek vlastnosť, hodnotená na základe ktoréhokoľvek fenotypového znaku. Najčastejším predmetom záujmu šľachtiteľa v prípade drevín produkcia biomasy (meraná spravidla výškovým a hrúbkovým rastom), kvalita produkcie (priamosť kmeňa, vidličnatosť, absencia točitosti vlákien, hustota dreva a pod.) a odolnosť voči abiotickým či biotickým škodlivým činiteľom (fenológia rašenia a ukončovania vegetácie súvisiaca s odolnosťou voči neskorým či skorým mrazom, odolnosť voči patogénom typu *Ophiostoma neo-ulmi* a ďalšie).

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). Na rozdiel od výchovy porastov v rámci pestovania lesa, ktoré si kladie analogické ciele ako šľachtenie, ale dosahuje ich modifikáciou prostredia, šľachtenie smeruje k zmene fenotypových vlastností cez zmenu dedičnej zložky premenlivosti, teda zmenou genetickej štruktúry pestovaného materiálu.

Materiál, s ktorým šľachtiteľ pracuje, musí byť v prvom rade popísaný: aby sa dali zmeny dosiahnuté šľachtiteľskými opatreniami sledovať, je nutné kvantifikovať ako stredové hodnoty znakov, ktoré sú predmetom šľachtenia, tak aj miera ich premenlivosti. 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: $95\%IS = \bar{x} \pm t_{\alpha} \cdot s_{\bar{x}}$

Ako bolo spomenuté, fenotyp, t.j. súbor znakov a vlastností jedinca, je určený spoluúčinkovaním dedičných faktorov, súhrnne označovaných ako genotyp, a faktorov nededičných, ktoré označujeme ako prostredie. Miera vplyvu genotypu a prostredia je pri rôznych znakoch rozdielna. Z hľadiska šľachtienia výberom je dôležité pri jednotlivých hospodársky alebo inak významných znakoch vedieť, nakoľko sú determinované genotypom. Odozva na selekciu (výber) je totiž priamo závislá na tejto skutočnosti.

Príklad: V provenienčnom pokuse jedle bielej boli vo veku xx rokov namerané na jednej parcele nasledovné výšky 20 jedincov (v metroch):

8,1 8,2 7,4 8,3 8,2 8,8 7,9 7,7 7,5 8,1 8,1 8,0 8,2 9,1 8,3 8,3 7,9 7,9 8,0 8,1

Aké sú charakteristiky premenlivosti výšky tejto proveniencie?

Riešenie:

$$\sum_i x_i = 162,1 \quad \sum_i x_i^2 = 1316,61$$

$$\bar{x} = \sum_i x_i / n = 161,20 / 20 = 8,105$$

$$s_x^2 = \left(\sum_i x_i^2 / n - \bar{x}^2 \right) \cdot n / (n - 1) = (1316,61 / 20 - 8,105^2) \cdot 20 / 19 = 0,1468$$

$$s_x = \sqrt{s_x^2} = \sqrt{0,1468} = 0,3832$$

$$s_{x\%} = 100\% \cdot s_x / \bar{x} = 0,3832 / 8,105 \cdot 100\% = 4,73\%$$

$$s_{\bar{x}} = s_x / \sqrt{n} = 0,3832 / \sqrt{20} = 0,0857$$

$$95\%IS = \bar{x} \pm t_{(0,95;20)} \cdot s_{\bar{x}} = 8,105 \pm 2,086 \cdot 0,0857 = \langle 7,306; 8,904 \rangle$$

Miera a charakter premenlivosti fenotypového znaku, rozdelenie početnosti podľa fenotypových tried, závisia nielen od počtu génov, ktoré daný znak kontrolujú, a ich alelických frekvenciách, ale aj na interakciách medzi alelami v rámci génu (dominancia, superdominancia) resp. interakciách medzi génmi (epistáza) (viď kap. 1.3). 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 dominantný 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 **fluktuačná** (spôsobená náhodnou variabilitou prostredia).

Najjednoduchší model, z ktorého genetika kvantitatívnych znakov vychádza, je lineárny aditívny vzťah medzi fenotypovou hodnotou, vplyvom genotypu a vplyvom prostredia:

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

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) a odchýlkou od tejto hodnoty, ktorá je vyvolaná *j*. prostredím (E_j) (Falconer 1960). 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

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

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. 1.3.1 a 1.4), D_i je odchýlka od aditivity spôsobená dominanciou a I_i je odchýlka spôsobená medzigénovými interakciami, teda epistázou.

Odvodenie 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. 33 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 jedincom genotypu aa , účinky alel sa teda jednoducho sčítajú (odtiaľ názov aditivita). V prípade dominancie $d \neq 0$, 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. 33 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 jedinec 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 , $__B$).

Ak stredovú hodnotu medzi obidvomi 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. 15.

Vzťah medzi priemernou hodnotou znaku v populácii, alelickými frekvenciami a účinkami genotypov je teda

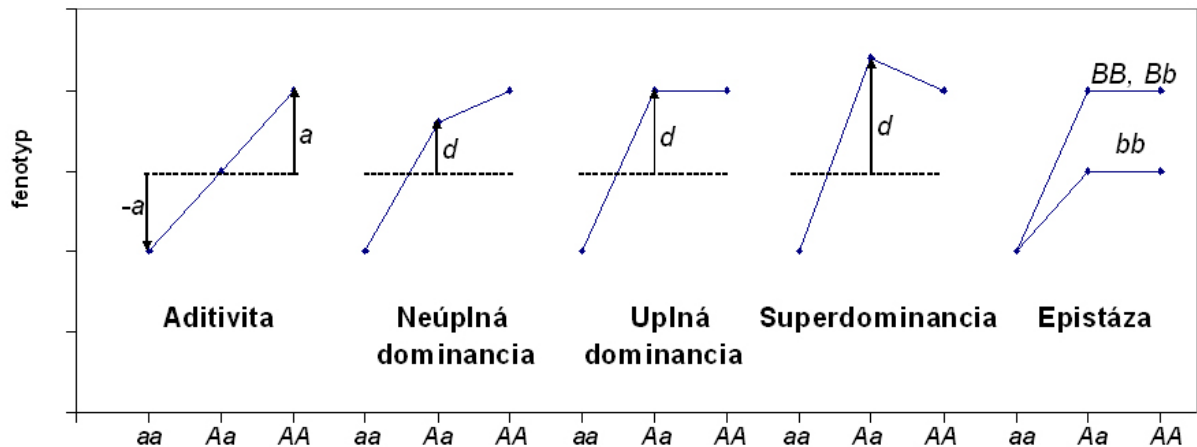
$$\bar{x} = x' + a(p-q) + 2pqd$$

pričom príspevok každého génu k priemeru fenotypového znaku v populácii sa dá rozdeliť na dve zložky: príspevok homozygotov v danom géne $a(p-q)$ a príspevok heterozygotov $2pqd$. Takto odvodené genotypové hodnoty sa vzťahujú na genotypy, nie na gény. V každej

Tab. 15 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 bielelický lokus platí $p+q=1$



Obr. 33 Hodnoty fenotypového znaku u jednotlivých genotypov v bielelickom lokuse pri jednotlivých typoch interakcie medzi alelami resp. génmi pri absencii vplyvu prostredia ($E=0$).

generácii však pri diploidných, pohlavne sa množiacich organizmoch gény obsiahnuté v genotypoch náhodne segregujú do gamét a v následnej generácii sa usporiadajú do nových genotypových kombinácií. Ak chceme kvantifikovať „šľachtiteľskú hodnotu“ jedinca, musíme vychádzať z génov, nie genotypov, teda určiť priemerný vplyv alely na fenotypovú hodnotu. Priemerný vplyv alely A sa dá kvantifikovať ako odchýlka potomstva od populačného priemeru, ak potomstvo obdrží od jedného z rodičov alelu A a druhá je vybraná z dostupných gamét náhodne (tab. 16). Zámena jednej alely za inú teda vyvolá zmenu fenotypu o hodnotu:

$$\alpha = \alpha_1 - \alpha_2 = [a + d(q - p)][q - (-p)] = [a + d(q - p)](q + p) = a + d(q - p).$$

pričom z porovnania vzťahov pre výpočet α , α_1 a α_2 vyplýva: $\alpha_1 = qa$; $\alpha_2 = -pa$.

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 šľachtenia určuje priemerná výkonnosť jeho potomstva. Šľachtiteľskú hodnotu (*breeding value*) je teda možné priamo merať: ako konkrétneho rodiča krížime s ďalšími jedincami náhodne vybranými z populácie, šľachtiteľská hodnota (alebo **aditívna hodnota**; A) predstavuje dvojnásobok rozdielu medzi priemerom potomstva a priemerom populácie (len polovica génov potomstva pochádza od testovaného rodiča, preto dvojnásobok) (Falconer 1960). Šľachtiteľská 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

Tab. 16 Výpočet efektu jednotlivých alel v gène s dominanciou v panmiktickej populácii

Gaméta	Genotypové hodnoty a frekvencie genotypov potomstva			Priemerné genotypové hodnoty genotypov potomstva	–priemer populácie	Priemerný efekt alely (rozdiel priemeru potomstva a priemeru populácie)
	AA	Aa	aa			
	$x' + a$	$x' + d$	$x' - a$			
A	p	q		$x'(p+q) + pa + qd$	$-(x' + a(p-q) + 2pqd)$	$x' - x' + pa + qd - pa + qa - 2pqd = q[a + d(q - p)] = \alpha_1$
a		p	q	$x'(p+q) - qa + pd$	$-(x' + a(p-q) + 2pqd)$	$x' - x' - qa + pd - pa + qa - 2pqd = -p[a + d(q - p)] = \alpha_2$

z matematického hľadiska je praktickejšie vyjadrovať ju odchýlkou od populačného priemeru.

Aditívna hodnota jedinca je daná aditívnou časťou účinku alel v rámci génu. Je teda možné vypočítať ju ako sumu priemerných efektov všetkých alel v genotype jedinca, ktoré daný znak kontrolujú. Pre bialelický lokus budú teda aditívne hodnoty jednotlivých genotypov (vyjadrených ako odchýlka od populačného priemeru) nasledovné:

$$AA \quad 2\alpha_1 = 2qa$$

$$Aa \quad \alpha_1 + \alpha_2 = a(q - p)$$

$$aa \quad 2\alpha_2 = -2pa$$

Priemer aditívnych hodnôt v populácii je rovný nule: $p^2 \cdot 2qa + 2pq \cdot a(q - p) + q^2 \cdot (-2pa) = 2p^2qa + 2pq^2a - 2p^2qa - 2pq^2a = 0$.

Rozdiel medzi aditívnou hodnotou a genotypovou hodnotou predstavuje odchýlku, spôsobenú **dominanciou** (**D**; *dominance deviation*): $G = A + D$ (obr. 34). 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. Odvodenie veľkosti dominantných efektov pre jednotlivé genotypy vyplýva z porovnania genotypovej a aditívnej hodnoty pre jednotlivé genotypy. Keďže populačný priemer je $\bar{x} = x' + a(p - q) + 2pqd$, genotypové hodnoty vyjadrené ako odchýlky od priemeru budú nasledovné:

$$AA \quad x' + a - (x' + a(p - q) + 2pqd) = a(1 - p + q) - 2pqd = 2q(a - dp)$$

$$Aa \quad x' + d - (x' + a(p - q) + 2pqd) = -a(p - q) + d - 2pqd = a(q - p) + d(1 - 2pq)$$

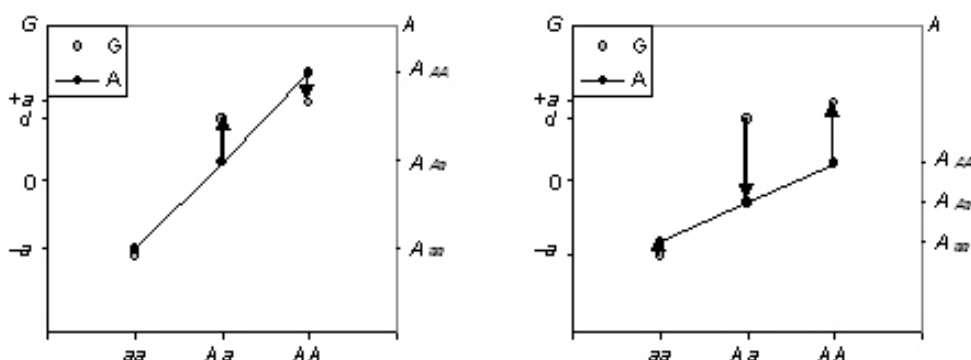
$$aa \quad x' - a - (x' + a(p - q) + 2pqd) = -a(1 - q + p) - 2pqd = -2p(a + dp)$$

Z tab. 16 vyplýva pre vzťah medzi efektom alely a genotypovými hodnotami: $\alpha = a + d(q - p)$, z čoho $a = \alpha - d(q - p)$. Ak túto hodnotu dosadíme do vzťahov pre výpočet genotypových hodnôt (vyjadrených ako relatívne hodnoty, teda odchýlky od populačného priemeru) a výrazy zjednodušíme, dostaneme hodnoty v tab. 17. Rozdiel medzi relatívnou genotypovou hodnotou a aditívnou hodnotou predstavuje odchýlku podmienenú dominanciou.

Rovnako ako aditívne hodnoty aj odchýlky podmienené dominanciou sú závislé od kontextu populácie, ktorej je testovaný jedinec členom. Z obr. 34 vyplýva, že pokiaľ sa zmení zastúpenie génov v populácii, posunú sa pri nezmenených genotypových hodnotách aditívne hodnoty (ležiacie 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

Tab. 17 Genotypové a aditívne hodnoty a dominantčné odchýlky jednotlivých genotypov v panmiktickej populácii

Genotypy	AA	Aa	aa
Absolútne genotypové hodnoty	$x' + a$	$x' + d$	$x' - a$
Frekvencie	p^2	$2pq$	q^2
Relatívne genotypové hodnoty	$2q(a - dp)$ $= 2q(\alpha - dq + dp - dp)$ $= 2q(\alpha - dq)$	$a(q-p) + d(1-2pq)$ $= (\alpha - dq + dp)(q-p) + d(1-2pq)$ $= q\alpha - dq^2 + dpq - p\alpha + dpq - dp^2$ $+ d - 2pqd$ $= \alpha(q-p) + d(1-p^2-q^2)$ $= \alpha(q-p) + d \cdot 2pq$	$-2p(a + dq)$ $= -2p(\alpha - dq + dp + dq)$ $= -2p(\alpha + dp)$
– Aditívne hodnoty	$-(2q\alpha)$	$-\alpha(q-p)$	$-(-2p\alpha)$
Dominančné odchýlky	$-2dq^2$	$2dpq$	$-2dp^2$



Obr. 34 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.

sa posunú v prospech tých alel, ktoré sú v daných podmienkach alebo z hľadiska požiadaviek šľachtiteľa 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.

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).

2.2 Dedivosť a genetický zisk

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 platí, že je súčtom hodnoty podmienenej genotypom a

hodnoty podmienenej prostredím ($P = G + E$), tak pre fenotypovú variáciu musí platiť:

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

kde V_P je celková fenotypová variácia (rozptyl; $V \equiv s^2$; variácia hodnôt fenotypového znaku u jedincov populácie), V_G je variácia podmienená genotypom (t.j. variácia genotypových hodnôt jedincov populácie), V_E je variácia 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 šľachtiteľského 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 variácie platí:

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

Keďže variácia je sumou štvorcov odchýlok znaku od priemeru populácie delená početnosťou, možno jednotlivé komponenty variácie určiť jednoducho z aditívnych hodnôt (vyjadrených odchýlkou od priemeru) resp. dominantných odchýlok jednotlivých genotypov a ich frekvencií (tab. 18)

Tab. 18 Výpočet aditívnej a dominantnou podmienenej genetickej variácie fenotypového znaku

Genotyp	Frekvencia	Aditívna hodnota	Zložka variácie	Dominantná odchýlka	Zložka variácie
	P	A	$P \cdot A^2$	D	$P \cdot D^2$
AA	p^2	$2q\alpha$	$4\alpha^2 p^2 q^2$	$-2d q^2$	$4d^2 p^2 q^4$
Aa	$2pq$	$\alpha(q - p)$	$2pq\alpha^2(q - p)^2$	$2dpq$	$8d^2 p^3 q^3$
aa	q^2	$-2p\alpha$	$4\alpha^2 p^2 q^2$	$-2dp^2$	$4d^2 p^4 q^2$
Σ	1	$V_A =$	$2pq\alpha^2(2pq + p^2 - 2pq + q^2 + 2pq) =$ $= 2pq\alpha^2(p + q)^2 =$ $= 2pq\alpha^2$	$V_D =$	$4d^2 p^2 q^2 (q^2 + 2pq + p^2) =$ $= (2pqd)^2 (p + q)^2 =$ $= (2pqd)^2$

Opäť teda platí, že komponenty variácie závisia výlučne od príslušného typu dedičnosti znaku: aditívna variácia závisí len od aditívnych hodnôt, variácia podmienená dominantnou výlučne od dominantných odchýlok. Oba komponenty variácie 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 variácia (jej aditívna aj dominantná zložka) sa znižuje a tým sa znižuje aj odozva populácie na selekciu.

Keďže jednotlivé komponenty variácie sa jednoducho sčítavajú, má zmysel pýtať sa, akú časť z celkového súčtu každý z nich predstavuje. Podiel genotypovej premenlivosti (meranej variáciou) 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*).

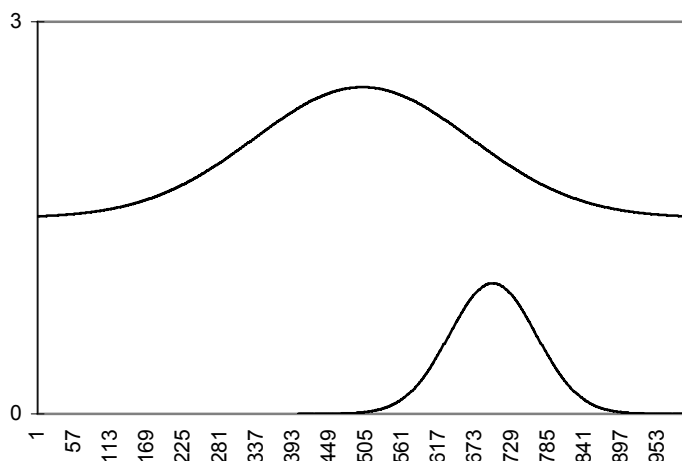
Podiel aditívnej genotypovej variancie ku celkovej fenotypovej variancii sa označuje ako **dedivosť v užšom zmysle** (*narrow-sense heritability*):

$$h^2 = V_A / V_P$$

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 šľachtiteľská 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.

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 základnej populácie oproti základnej populácii samotnej. Tento posun sa spravidla meria rozdielom priemerných hodnôt znaku (aritmetických priemerov).

Kritériom výberu, či už prirodzeného alebo umelého, je vždy fenotyp jedinca. Dieťa, trpiace cystickou fibrózou ako jedným zo závažných dedičných ochorení, nezomiera kvôli tomu, že má gény pre cystickú fibrózu (teda kvôli genotypu), ale preto, že trpí klinickými problémami tejto choroby (teda kvôli prejavu choroby samotnej, t.j. kvôli fenotypu). Pri šľachtení výberom teda nemôžeme jedincov vyberať podľa genotypu, pretože ten nepoznáme. 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 najvyššou (resp. najnižšou) hodnotou znaku, ktorý je kritériom šľachtenia. Rozdiel medzi priemerom hodnoty znaku v základnej populácii a v selektovanej časti populácie (napr. v súbore výberových stromov) sa nazýva **selekčný rozdiel** alebo selekčný diferenciál: $S = \bar{X}_S - \bar{X}_P$. Nie je možné očakávať, že sa celý selekčný rozdiel preniesie do ďalšej generácie, t.j. že priemer znaku v ďalšej generácii sa od priemeru základnej populácie bude odlišovať o rovnakú hodnotu ako výberové stromy. Pretože kritériom výberu je fenotyp, ktorý závisí nielen od dedičných faktorov, ale aj od prostredia,



Obr. 35 Schéma určenia odozvy na selekciu (genetického zisku) pri šľachtení individuálnym výberom

medzi výberovými stromami nutne budú zastúpené aj jedince, ktorých vynikajúci fenotyp nie je spôsobený príspevkom genotypu, a je dôsledkom zvýhodnených podmienok prostredia (napr. stromy, ktoré boli v mladšom veku vyvetvované, alebo rástli v hustejšom zápoji, budú mať v dospelosti vyššiu kvalitu kmeňa), 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 základnej populácie, t.j. **genetický zisk** (odozva na selekciu), ktorý je vlastne cieľom šľachtenia, je teda úmerný selekčnému rozdielu (čím fenotypovo lepšie výberové stromy použijeme, tým väčší efekt môžeme očakávať) a dedivosti (čím viac je znak podmienený geneticky, tým väčšia časť výberových stromov bude fenotypovo nadpriemerná vďaka genotypu, a teda bude schopná svoje vlastnosti prenášať na potomstvo). Genetický zisk teda predstavuje rozdiel medzi šľachtiteľským materiálom (t.j. potomstvom jedincov, ktoré boli vyselektované na základe ich fenotypu) a materiálom nešľachtiteľným (potomstvom jedincov, ktoré by boli náhodne vybrané zo zdrojovej populácie).

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 selektujeme medzi 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, ako sú niektoré poľnohospodárske plodiny, možno genetický zisk priamo merať: $\Delta = \bar{X}_N - \bar{X}_P$. Pri lesných drevinách sme však pri plánovaní šľachtiteľských programov odkázaní na predikciu genetického zisku na základe selekčného rozdielu a dedivosti. Typ dedivosti použitej pre odhad genetického zisku závisí od spôsobu rozmnožovania selektovaných jedincov. 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 tvorbe genetického zisku sa uplatnia všetky komponenty genotypovej premenlivosti, aditívne aj neaditívne, preto pre predikciu genetického zisku môžeme použiť dedivosť v širšom zmysle:

$$\Delta = S \cdot H^2$$

Ak je však potomstvo získavané náhodným krížením v šľachtiteľskej populácii (semenné sady), genotypy potomstva sú oproti genotypom výberových stromov nanovo usporiadané náhodným spôsobom, pretože pri generatívnom množení dochádza k segregácii a rekombinácii alel. Odchýlky podmienené dominanciou alebo epistázou sa teda v potomstve objavujú iba v miere úmernej zastúpeniu alel. V tvorbe genetického zisku môžeme teda počítať len s aditívnou zložkou genotypovej premenlivosti, preto pre predikciu genetického zisku musí byť použitá dedivosť v užšom zmysle:

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

Pri vegetatívnom množení (klony, multiklonálne zmesi) sú genotypy výberových stromov 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, rezkovance predstavujú ontogeneticky starší materiál oproti semenáčikom, teda aj z hľadiska vlastností, ktoré sú predmetom šľachtenia, sa môžu správať odlišne. Preto sa pre stanovenie genetického zisku vychádza

Príklad:

Osem klonov smreka bolo testovaných na troch lokalitách. Meraná bola výška vo veku 40 rokov. Namerané hodnoty sú uvedené v tabuľke. Aká je dedivosť meraného znaku v širšom zmysle? Aký genetický zisk možno očakávať pri selekcii 25% najlepších jedincov?

Lokalita	Klon							
	2012	2019	2211	1014	1588	1590	3126	3127
Podbanské	13	14	10	8	9	7	14	9
Mláčik	15	14	10	11	13	10	15	10
Kráľ	20	16	15	11	18	10	16	16

$$\text{Riešenie: } \left(\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n x_{ij} \right)^2 / m \cdot n = (13 + 14 + 10 + \dots + 16)^2 / 8 \times 3 = 304^2 / 24 = 3850,67$$

sumy štvorcov:

celková:

$$\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n x_{ij}^2 - \left(\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n x_{ij} \right)^2 / m \cdot n = (13^2 + 14^2 + 10^2 + \dots + 16^2) - 3850,67 = 4110 - 3850,67 = 259,33$$

klony:

$$\sum_{i=1}^m \left(\sum_{j=1}^n x_{ij} \right)^2 / n - \left(\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n x_{ij} \right)^2 / m \cdot n = [(13 + 15 + 20)^2 + \dots + (9 + 10 + 16)^2] / 3 - 3850,67 = 11944/3 - 3850,67 = 130,67$$

lokality:

$$\sum_{j=1}^n \left(\sum_{i=1}^m x_{ij} \right)^2 / m - \left(\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n x_{ij} \right)^2 / m \cdot n = [(13 + 14 + \dots + 9)^2 + \dots + (20 + 16 + \dots + 16)^2] / 8 - 3850,67 = 31544/8 - 3850,67 = 92,33$$

$$\text{reziduálna: } 259,33 - 130,67 - 92,33 = 36,33$$

Tabuľka analýzy variancie:

Zdroj variancie	Suma štvorcov	Stupne voľnosti	Stredný štvorec	Komponent variancie
Celková	259,33	$8 \times 3 - 1 = 23$	$259,33/23=11,27$	
Klony	130,67	$8 - 1 = 7$	$130,67/7=18,67$	$(11,27-2,59)/3 = 5,36$
Lokalita	92,33	$3 - 1 = 2$	$92,33/2=46,16$	$(46,16 - 2,59)/8 = 5,45$
Reziduálna	36,33	$(8-1) \times (3-1) = 14$	$36,33/14=2,59$	2,59

$$\text{Dedivosť v širšom zmysle: } H^2 = 5,36 / (5,36 + 5,45 + 2,59) = \mathbf{0,3998}$$

priemerné výšky klonov:

Klon	2012	2019	2211	1014	1588	1590	3126	3127	Celkove
Výška	16,00	14,67	11,67	10,00	13,33	9,00	15,00	11,67	12,67

25% z 8 klonov predstavuje 2 klony. Ako najlepšie sa ukazujú klony 2012 a 3126, s priemernými výškami 16 a 15 m. Priemerná výška selektovaného materiálu je teda 15,5 m, selekčný diferenciál predstavuje $15,5 \text{ m} - 12,67 \text{ m} = 2,83 \text{ m}$. Očakávaný genetický zisk je teda $\Delta = S \cdot H^2 = 2,83 \text{ m} \times 0,3998 = 1,13 \text{ m}$. Ak teda budeme pre zalesňovanie používať len materiál z uvedených dvoch klonov, dosiahneme v danom veku priemernú výšku porastu $12,67 \text{ m} + 1,13 \text{ m} = 13,40 \text{ m}$.

z dedivosti, zisťovanej klonálnymi testami, ktorá môže byť odlišná od dedivosti v širšom zmysle (klonálna dedivosť; *clonal heritability*).

Jednotlivé komponenty fenotypovej premenlivosti je možné určiť analýzou variancie. V najjednoduchšom prípade, teda pre určenie klonálnej dedivosti, stačí mať súbor genotypov replikovaných na viacerých stanovištiach klonovaním (napr. rezkovaním alebo explantátovými kultúrami). Variancia medzi klonmi predstavuje genotypovú zložku a variancia medzi lokalitami zložku podmienenú prostredím. U reziduálnej variancie v tomto prípade možno predpokladať, že je podmienená výlučne heterogenitou podmienok v rámci lokality, teda nemá genetické pozadie (klony predstavujú identické genotypy) a je súčasťou premenlivosti podmienenej prostredím. Rozklad genotypovej premenlivosti na aditívnu a neaditívnu zložku už vyžaduje test potomstva, ide teda o technicky aj matematicky zložitejšiu problematiku.

V najjednoduchšom prípade máme súbor m klonov vysadených na n lokalitách v jednom exemplári. V tomto prípade môžeme pre určenie komponentov premenlivosti použiť dvojfaktorovú analýzu variancie bez opakovania. Hodnota x_{ij} predstavuje fenotypovú hodnotu (napr. výšku) i . klonu na j . lokalite. Určenie komponentov rozptylu vychádza z tabuľky analýzy variancie (tab. 19).

Tab. 19 Analýza variancie dvojného triedenia bez opakovania

Zdroj variancie	Sumy štvorcov (SS)	Stupne volnosti (DF)	Stredný rozptyl (MS)
Celkom	$SS_C = \sum_i \sum_j x_{ij}^2 - (\sum_i \sum_j x_{ij})^2 / m \cdot n$	$DF_C = n \cdot m - 1$	
Klony	$SS_K = \sum_i (\sum_j x_{ij})^2 / n - (\sum_i \sum_j x_{ij})^2 / m \cdot n$	$DF_K = m - 1$	$MS_K = SS_K / DF_K$
Lokalita	$SS_L = \sum_j (\sum_i x_{ij})^2 / m - (\sum_i \sum_j x_{ij})^2 / m \cdot n$	$DF_L = n - 1$	$MS_L = SS_L / DF_L$
Reziduál	$SS_R = SS_C - SS_K - SS_L$	$DF_R = DF_C - DF_K - DF_L = (m-1) \cdot (n-1)$	$MS_R = SS_R / DF_R$

Reziduálny stredný rozptyl je totožný s reziduálnou varianciou ($MS_R = V_R$). Stredný rozptyl medzi klonmi však okrem variancie medzi klonmi obsahuje aj reziduálnu varianciu:

$$MS_K = V_R + n V_K = MS_R + n V_K$$

Na základe tohoto vzťahu je možné varianciu medzi klonmi určiť ako $V_K = (MS_K - MS_R) / n$. Analogicky, stredný rozptyl medzi lokalitami okrem variancie medzi lokalitami obsahuje aj reziduálnu varianciu:

$$MS_L = V_R + n V_L = MS_R + n V_L$$

Na základe toho je možné varianciu medzi lokalitami určiť ako $V_L = (MS_L - MS_R) / m$.

Variacia medzi klonmi predstavuje v princípe celkovú genotypovú varianciu (tento typ šľachtiteľského testu neumožňuje odlišiť aditívne a neaditívne zložky). Variancia medzi lokalitami a reziduálna variacia predstavujú komponenty premenlivosti podmienenej prostredím. Dedivosť v širšom zmysle (resp. presnejšie klonálnu dedivosť) teda môžeme určiť ako

$$H^2 = V_K / (V_K + V_L + V_R)$$

2.3 Interakcia genotyp $\times$ prostredie

Ako je uvedené v kap. 2.2, 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 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 teda možné testovať dvojfaktorovou analýzou variancie:

Tab. 20 Analýza variancie dvojného triedenia s opakovaním

Zdroj variance	Stupne voľnosti (DF)	Komponenty variance	F-test
Genotypy	$DF_G = m-1$	$MS_G = \sigma_e^2 + r \sigma_{GE}^2 + mr \sigma_G^2$	MS_G / MS_{GE}
Lokality	$DF_E = n-1$	$MS_E = \sigma_e^2 + r \sigma_{GE}^2 + nr \sigma_E^2$	MS_E / MS_{GE}
$G \times E$ interakcia	$DF_{GE} = (m-1).(n-1)$	$MS_{GE} = \sigma_e^2 + r \sigma_{GE}^2$	MS_{GE} / MS_R
Reziduál	$DF_R = mn.(r-1)$	$MS_R = \sigma_e^2$	

σ_e^2 – reziduálna variancia, σ_G^2 , σ_E^2 , σ_{GE}^2 – komponenty variance podmienené vplyvom genotypu, prostredia a $G \times E$ interakcie

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 variance 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 Finlay–Wilkinsonova metóda hodnotenia $G \times E$ interakcie. Pri tomto postupe je priemerná fenotypová hodnota všetkých genotypov na konkrétnej lokalite použitá ako charakteristika prostredia tejto lokality (analógiou je bonitácia porastov, kde stredná resp. horná výška vo veku 100 rokov ako charakteristika dreviny v rámci porastu zároveň charakterizuje kvalitu stanovišťa z hľadiska danej dreviny). Pokiaľ vychádzame

Príklad:

V provenienčnom pokuse vykazovali jednotlivé proveniencie smreka na 6 lokalitách priemerné výšky vo veku 20 rokov uvedené v nasledujúcej tabuľke. Zhodnoťte G×E interakciu u jednotlivých proveniencií Finlay-Wilkinsonovou metódou a vypracujte odporúčania pre použitie jednotlivých proveniencií.

Proveniencia	Nadm. výška (m)	Vyšná Boca 1100 m n.m.	Hrončok 750 m n.m.	Hnilčík 650 m n.m.	Lendak 950 m n.m.	Kamenec 500 m n.m.	Oščadnica 700 m n.m.
1 Krám	750	7,1	7,9	7,5	8,1	7,8	8,2
2 Klenovský Vepor	1050	5,5	7,0	4,8	5,6	5,7	7,0
3 Hriňová	620	5,8	6,8	6,5	7,0	6,1	7,2
4 Čertovica	980	5,1	7,7	6,8	7,2	6,2	8,0
5 Smokovce	1000	4,9	6,6	6,5	6,5	5,2	6,2
6 Kotlov žľab	1300	3,9	4,1	3,6	3,5	3,4	3,8
7 Tatranská Lomnica	1250	4,2	5,1	4,5	4,7	4,1	4,8
8 Kľačany	700	5,6	8,0	7,5	8,0	6,5	8,7
9 Liptovská Lúžna	890	6,9	8,1	7,2	7,4	7,1	7,5
10 Smrekovica	1420	4,0	3,8	3,3	4,3	3,3	4,0
11 Čergov	950	5,1	7,2	4,2	5,8	5,6	7,1
12 Nálepko	650	5,5	8,0	6,4	7,2	5,8	7,9
13 Krásno n. Kysucou	800	5,4	9,0	6,4	8,2	6,2	9,0
14 Babia hora	1150	5,1	6,5	7,0	7,0	6,3	6,4
15 Veľký Polom	880	6,9	8,5	7,9	8,0	6,8	8,4

Riešenie:

Regresný koeficient pre i . provenienciu je možné určiť podľa vzťahu

$$b_i = \frac{n \sum_j x_{ij} \bar{x}_j - \sum_j x_{ij} \sum_j \bar{x}_j}{n \sum_j \bar{x}_j^2 - (\sum_j \bar{x}_j)^2}$$

kde x_{ij} je stredná výška i . proveniencie na j . lokalite a $\bar{x}_j$ je priemerná výška všetkých proveniencií na j . lokalite, ktorá vyjadruje bonitu stanovišťa.

Priemerné výšky jednotlivých lokalít sú:

Lokalita					
Vyšná Boca 1100 m n.m.	Hrončok 750 m n.m.	Hnilčík 650 m n.m.	Lendak 950 m n.m.	Kamenec p.V. 500 m.n.	Oščadnica 700 m n.m.
5,40 m	6,95 m	6,01 m	6,57 m	5,74 m	6,94 m

Regresný koeficient pre provenienciu Krám sa teda vypočíta ako

$$b_1 = \frac{6 \times (7,1 \times 5,40 + 7,9 \times 6,95 + \dots + 8,2 \times 6,94) - (7,1 + 7,9 + \dots + 8,2) \times (5,40 + 6,95 + \dots + 6,94)}{6 \times (5,40^2 + 6,95^2 + \dots + 6,94^2) - (5,40 + 6,95 + \dots + 6,94)^2} = 0,526$$

Analogicky je možné vypočítať regresné koeficienty pre ďalšie proveniencie, ktoré sú zhrnuté v tabuľke:

	Číslo proveniencie														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
$\bar{x}_i$ (m)	776	593	656	683	598	371	456	738	736	378	583	680	736	638	775
b_i	53	101	78	158	92	13	54	164	56	23	140	163	238	60	105

$\bar{x}_i$ – priemerná výška i . proveniencie na všetkých pokusných lokalitách

Zo sledovaných lokalít sa ako optimálne z hľadiska výškového rastu javia Hrončok a Oščadnica, t.j. plochy v nadmorskej výške cca. 700–750 m. Rast je spomalený na vysokopoloženej ploche Vyšná Boca a na plochách v nižších nadmorských výškach, trpiacich pravdepodobne suchom, a navyše vystavených vplyvu imisií (Hnilčík, Kamenec pod Vtáčnikom).

Zo sledovaných proveniencií sú výrazne nadpriemerné (priemer výšok všetkých proveniencií na všetkých plochách je 6,27 m) proveniencie 1, 15, 8, 9 a 13. Proveniencia 15 – Veľký Polom vykazuje trend výškového rastu prakticky kopírujúci bonitu stanovišťa, regresný koeficient je 1,05. Proveniencia 1 – Krám je generalista ($b = 0,53$). Rastom vyniká predovšetkým na horších stanovištiach, zatiaľ čo na plochách Hrončok a Očšadnica patrí síce k nadpriemerným, ale nie ku špičkovým provenienciám. Možno ju teda odporúčať predovšetkým pre horšie stanovištia, najmä imisne ovplyvnené plochy. Naproti tomu proveniencia 8 a najmä proveniencia 13 sú špecialisti. Proveniencia 13 ($b = 2,38$) patrí na horších stanovištiach k priemerným až podpriemerným, zatiaľ čo na kvalitnejších stanovištiach je jednoznačne najlepšia. Možno ju teda odporúčať pre dobré stanovištia v nadmorských výškach okolo 750 m n.m. Vysokohorské proveniencie (Smrekovica, Kotlov žľab, Tatr. Lomnica) patria v priemere k najslabším. V rámci sledovaných plôch sa správajú ako generalisti. Je však možné, že na ploche, založenej vo výške porovnateľnej s výškou ich pôvodu by patrili k dobre rastúcim provenienciám, čo naznačuje ich vcelku dobrý rast na ploche Vyšná Boca v porovnaní s nižšie položenými plochami. Odporúčania pre používanie proveniencií je však možné dávať len pre rozsah podmienok prostredia, pokrytý pokusnými plochami, akákoľvek extrapolácia nemusí byť spoľahlivá

prostredia menej, než je u danej dreviny bežné.

Pojem G×E interakcie je možné vzťahovať nielen na súbor genotypov v úzkom zmysle tohoto slova, ale aj iných geneticky definovateľných jednotiek (proveniencií, potomstiev a pod.)

3. PRAKTICKÉ VYÚSTENIE GENETIKY V LESNOM HOSPODÁRSTVE

3.1 Lesný reprodukčný materiál

Zákon 138/2010 Z.z. definuje lesný reprodukčný materiál ako

- Semeno a semennú surovinu (semená, plody, súplodia, šišky)
- Osivo (semená určené na výsev)
- Časti rastlín (odrezky, hrúžence, korene a prúty pre autovegetatívne množenie, explantáty a embryá na mikropropagáciu, vrúbky a očka pre heterovegetatívne množenie)
- Sadbový materiál (semenáčky a sadenice, vrátane semenáčikov vyzdvihnutých z prirodzeného zmladenia)

určené na umelú obnovu lesa, zalesňovanie a iné lesnícke účely.

Účelom legislatívy týkajúcej sa lesného reprodukčného materiálu je vytvoriť podmienky na to, aby lesný reprodukčný materiál pochádzal z kvalitných zdrojov a bola zaručená pravosť jeho označenia a pôvodu. O zaručenie kvality zdrojov a pravosti označenia lesného reprodukčného materiálu ide od momentu zberu semien resp. odberu častí rastlín na vegetatívne množenie až po dodávku materiálu na zalesňovanie. Spolu s vhodným pôvodom (provenienciou) reprodukčného materiálu významnou mierou predurčujú produkčnú schopnosť a stabilitu lesov. Príčinou sú dedičné danosti lesných drevín, najmä vysoká dedivosť hospodársky a ekologicky dôležitých vlastností, ako sú rýchlosť rastu, krivosť, vidličnatosť a točitosť kmeňa, hrúbka vetiev, náchylnosť na choroby, a rozdielna odozva lesných drevín rôzneho pôvodu na pestovanie v podmienkach líšiach sa od podmienok v mieste ich pôvodu.

Aj keď sa na umelú obnovu lesných porastov použijú stanovištne vhodné dreviny, pre ich budúcu produkciu a stabilitu je mimoriadne dôležitý kvalitný zdroj a vhodný pôvod lesného

reprodukčného materiálu. Dodržovaním zásad správnej praxe v tejto oblasti môžeme veľa získať a ich ignorovaním oveľa viac stratiť. Snaha o okamžitú úsporu nákladov pri zakladaní porastov zaobstaraním lacnejších sadeníc z nekvalitného zdroja alebo nevhodného pôvodu je zanedbateľná v porovnaní s budúcnými komplikáciami, ktoré ich použitie spôsobuje.

Dôsledky použitia reprodukčného materiálu pochádzajúceho z nevhodných zdrojov sa v lesných porastoch prejavujú celé desaťročia ako straty na produkcii a vitalite, zvýšené náklady na ochranu lesa alebo predčasnú obnovu porastov. Tieto straty môžu byť až niekoľkonásobne vyššie ako prínosy selekcie v podobne uznaných porastov alebo semenných sádov.

3.1.1 Európska a medzinárodná legislatíva súvisiaca s LRM

Obchod s lesným reprodukčným materiálom je jednou z mála oblastí lesného hospodárstva, ktorá je právne regulovaná na medzinárodnej úrovni. Primárnym zmyslom právnej regulácie je zaručiť lesnému hospodárovi, že materiál, ktorý nakupuje, bude spĺňať základné požiadavky na kvalitu a pravosť:

- Sprievodné dokumenty k materiálu poskytujú lesnému hospodárovi základné informácie o mieste pôvodu a rámcových ekologických podmienkach v oblasti pôvodu.
- Uznávanie zdrojov reprodukčného materiálu dáva záruku dodržania požiadaviek na ich kvalitu a umožňuje z obehu vylúčiť materiál, ktorý sa v minulosti ukázal ako nevhodný.
- Určenie základných požiadaviek na testovanie umožňuje objektívne hodnotenie výsledkov šľachtenia lesných drevín a ich využitie pre účely pestovania lesa.
- Oficiálny dohľad posilňuje dôveru v pravosť dokumentov sprevádzajúcich reprodukčný materiál. Lesný hospodár má spoľahlivú informáciu o pôvode reprodukčného materiálu, ktorú môže využiť pre spoľahlivé vyhodnotenie vlastných skúseností s jeho použitím.

Medzinárodná legislatíva pre obchod s lesným reprodukčným materiálom sa vyvíjala v dvoch líniách, ktoré sa výrazne navzájom ovplyvňovali. Prvou sú pravidlá Organizácie pre hospodársku spoluprácu a rozvoj (OECD), druhou právne predpisy Európskej únie.

Schéma OECD pre certifikáciu lesného reprodukčného materiálu v medzinárodnom obchode (*OECD Scheme for the Certification of Forest Reproductive Material Moving in International Trade*) vznikla v r. 1967. Jej dnes platná verzia bola prijatá rozhodnutím Rady OECD 20. júna 2007. Schéma je otvorená pre všetky členské štáty OECD a aj iné štáty, ktoré sú členmi OSN alebo Svetovej obchodnej organizácie. V súčasnosti má 25 členov.

Členstvo je dobrovoľné, ale pokiaľ sa k nej krajina pripojí, musí zabezpečiť striktné dodržiavanie pravidiel pre všetok materiál, ktorý sa v súlade s ňou produkuje a obchoduje. Schéma sa zaoberá 7 oblasťami:

- 1) Kategórie lesného reprodukčného materiálu: (a) z identifikovaného zdroja (*Source Identified*) a (b) selektovaný (*Selected*).
- 2) Vymedzenie provenienčných oblastí (*Regions of Provenance*),
- 3) Uznávanie zdrojov lesného reprodukčného materiálu (*Basic Material*),
- 4) Registrácia uznaného zdrojového materiálu,
- 5) Produkcia reprodukčného materiálu všetkých kategórií,
- 6) Kontrola, balenie a označovanie reprodukčného materiálu,
- 7) Spôsob vykonania pravidiel schémy.

Schéma rozlišuje pojmy „lesný reprodukčný materiál“ (*Forest Reproductive Material*), ktorým sú semená, časti rastlín, alebo sadenice, a „zdroj lesného reprodukčného materiálu“ (*Basic Material*), ktorým sú stromy alebo porasty, z ktorých sa zbiera. Lesný reprodukčný

materiál sa môže uvádzať do obehu v 4 kategóriách: identifikovaný (*Source Identified*), selektovaný (*Selected*), materiál z netestovaných semenných sádov (*Untested Seed Orchards*) a testovaný (*Tested*).

Ďalším dôležitým aspektom schémy je ohraničenie provenienčných (semenárskych) oblastí. Schéma definuje pojem „pôvod“ (*Origin*) pre autochtónny zdroj ako miesto, kde porast alebo strom rastú, pre neautochtónny zdroj ako miesto, odkiaľ boli semená alebo sadenice, použité pre založenie zdroja, pôvodne dovezené. Pojem „proveniencia“ je definovaný jednoducho ako miesto, kde strom alebo porast rastie (v prípade autochtónneho zdroja sú jeho pôvod a proveniencia totožné). Provenienčná oblasť (*Region of Provenance*) je následne územie (nie nevyhnutne kontinuálne), vykazujúce relatívne homogénne ekologické podmienky, v ktorom rastú porasty danej dreviny s podobnými fenotypovými a genetickými znakmi. Schéma predpokladá vymedzenie provenienčných oblastí na základe administratívnych a prirodzených geografických hraníc pri prípadnom zohľadnení nadmorskej výšky či akýchkoľvek iných hraníc, ktoré členský štát považuje za relevantné pre tento účel.

Každý členský štát musí určiť oficiálny orgán (*Designated Authority*), ktorý zodpovedá za implementáciu pravidiel schémy. Oficiálny orgán vymedzuje provenienčné oblasti, zodpovedá za uznávanie zdrojov, zriaďuje a vedie Národný register zdrojov lesného reprodukčného materiálu, register Producentov lesného reprodukčného materiálu. Uskutočňuje tiež pravidelné kontroly všetkých štádií produkcie lesného reprodukčného materiálu. Schéma určuje aj spôsob balenia a označovania reprodukčného materiálu.

Legislatíva Európskej únie pre lesný reprodukčný materiál je od začiatku harmonizovaná so Schémou OECD. Aktuálne v EÚ platí **Smernica Rady Európskych spoločenstiev 1999/105/ES z 22.12.1999 o obchode s reprodukčným materiálom lesných drevín**. Do svojho právneho systému ju musí preniesť každý členský štát. Obsahuje spoločné definície súvisiacich pojmov pre celú EÚ a presne vymedzuje oblasti, na ktoré sa vzťahuje. V mnohých aspektoch preberá a dopĺňa pravidlá Schémy OECD. Okrem reprodukčného materiálu z identifikovaného zdroja a selektovaného materiálu rozlišuje 2 kvalitatívne vyššie kategórie „kvalifikovaný“ (*Qualified*) a „testovaný“ (*Tested*) reprodukčný materiál. Pri kategórii „identifikovaný“ je na rozhodnutí členských štátov, či na svojom území povolia jeho používanie. Smernica rovnako ako Schéma OECD určuje povinnosť každého členského štátu zriadiť oficiálny orgán (*Official Body*) zodpovedajúci za plnenie jej pravidiel.

Smernica výslovne stanovuje, že obchod s materiálom, ktorý spĺňa požiadavky ňou stanovené, by nemal podliehať žiadnym dodatočným obmedzeniam okrem tých, ktoré stanovuje samotná smernica, čo platí nielen pre medzinárodný obchod, ale aj pre uvádzanie do obehu na vnútroštátnom trhu. Zároveň však dovoľuje, aby členské štáty stanovili dodatočné alebo prísnejšie požiadavky na uznanie zdrojov na ich vlastnom území a pre špecifické regióny s odlišnými klimatickými a inými stanovištnými podmienkami (severské, mediteránne, vysokohorské) pripúšťa úpravu požiadaviek na vonkajšiu kvalitu reprodukčného materiálu. Členský štát zároveň môže zakázať dodávku konkrétneho reprodukčného materiálu konečnému spotrebiteľovi, ak na základe informácie o pôvode, či na základe výsledkov výskumu je dôvod predpokladať, že použitie tohto materiálu nie je priaznivé pre lesné hospodárstvo, životné prostredie, genetické zdroje alebo biologickú diverzitu na danom území. Zákaz prenosu teda v zmysle smernice musí byť konkrétne zdôvodnený. Na druhej strane v súlade s Všeobecnou deklaráciou 3. ministerskej konferencie o ochrane lesov v Európe smernica stanovuje, že pre umelú obnovu by mal byť prednostne používaný materiál domácich drevín a miestnej proveniencie, u ktorého sa dá predpokladať dobrá adaptácia na lokálne stanovištné podmienky. Geneticky modifikovaný materiál sa smie uvádzať do obehu len vtedy, ak je nezávadný pre ľudské zdravie a životné prostredie, čo sa posudzuje na základe výsledkov hodnotenia rizika pre životné prostredie podľa Smernice 90/220/EC.

3.1.2 Právna regulácia v oblasti lesného reprodukčného materiálu na Slovensku

Na Slovensku v obnove lesa prevláda dlhodobá (podklady z inventarizácie lesa máme od r. 1950) umelá obnova nad obnovou prirodzenou. Pri všetkej snahe o zvyšovanie podielu prirodzenej obnovy to tak pravdepodobne zostane aj naďalej. Príčinami sú pretrvávajúce kalamity, problémy s odumieraním lesov, čoraz častejšie klimatické extrémny resp. posun areálov drevín súvisiaci s klimatickou zmenou.

Prvým právnym predpisom upravujúcim získavanie a použitie reprodukčného materiálu lesných drevín bola Vyhláška Ministerstva hospodárstva IX-54/7-1939 z 8. augusta 1939 o výbere porastov pre zber semená a pestovanie sadeníc. Slovensko je tak jednou z prvých krajín so systémom regulácie pre túto oblasť. Na uvedení vyhlášku nadviazali neskôr prijaté predpisy, zvyčajne to boli vyhlášky k zákonom o lesoch.

Podrobné pravidlá uznávania a obhospodarovania zdrojov semien lesných drevín a semenársku rajonizáciu ako podklad pre reguláciu prenosu reprodukčného materiálu zaviedla Smernica Ministerstva lesného a vodného hospodárstva SSR z roku 1985 na uznávanie lesných porastov a výberových stromov na zber semená a na prenos sadeníc k vyhláške č. 7/1978 Zb. o uznávaní lesných porastov a stromov na pestovanie a zber lesných semien a odrezkov. Smernica bola na svoju dobu moderný predpis, plne zodpovedajúci aktuálnemu stavu poznania. Z právneho hľadiska sa opierala o zákon č. 100/1977 Zb. o hospodárení v lesoch a štátnej správe lesného hospodárstva, ktorý v §9 ods. 1 stanovoval povinnosť „zabezpečiť dostačujúce množstvo druhovo a geneticky vhodného osiva a sadeníc potrebných na obnovu lesných porastov a na zalesnenie pozemkov na to určených“. V podmienkach pred rokom 1989, keď viac než 90% výmery lesov bolo v štátnom vlastníctve a hospodárili v nich podniky štátnych lesov priamo ministerstvom a aj ostatné lesy boli pod tzv. odbornou správou štátnych lesov, bol predpis na úrovni smernice ministerstva záväzný pre všetky lesné pozemky.

Po zmene vlastníckych pomerov a uplatnením princípov právneho štátu po roku 1989 sa stala problémom nedostatočná záväznosť smernice. Neštátnym hospodárskym subjektom a aj štátnym podnikom môže povinnosti ukladať len všeobecne záväzný právny predpis - zákon alebo vyhláška.

V r. 2000 sa Slovensko pripojilo k OECD a stalo aj členom Schémy pre certifikáciu lesného reprodukčného materiálu v medzinárodnom obchode. Právnu kompatibilitu so schémou OECD zabezpečila vyhláška Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky (ďalej len MPSR) č. 64/2001 Z. z. o reprodukčnom materiáli lesných drevín, jeho získavaní a evidencii (naviazaná a vtedy platný zákon č. 100/1977 o hospodárení v lesoch a štátnej správe lesného hospodárstva).

Pred vstupom do Európskej únie SR musela do svojho právneho systému preniesť (transponovať) Smernicu Rady 1999/105/ES o obchode s lesným reprodukčným materiálom. Podobne ako v ČR, Rakúsku, Poľsku, Nemecku či Slovinsku na tento účel slúži samostatný zákon o lesnom reprodukčnom materiáli (bol to zákon NR SR č. 217/2004 Z. z.) a jeho vykonávacia vyhláška MPSR č. 571/2004 Z. z. o zdrojoch reprodukčného materiálu lesných drevín, jeho získavaní, produkcii a používaní (dostupné na <http://www.zbierka.sk>). Od 1. 1. 2011 vstúpil do platnosti nový zákon o lesnom reprodukčnom materiáli (138/2010 Z. z.) a vykonávacia vyhláška 501/2010 Z.z. Menšie úpravy boli zavedené novelou 49/2011 Z.z.

Súvisiace informácie na svojej internetovej stránke povinne zverejňuje aj Národné lesnícke centrum, ktoré je oficiálnym orgánom SR, zodpovedným za uplatnenie predpisov o lesnom reprodukčnom materiáli vyplývajúcich zo Smernice Rady 105/1999/ES a Schémy OECD pre certifikáciu lesného reprodukčného materiálu v medzinárodnom obchode. Obdobné oficiálne orgány pre LRM existujú v každom členskom štáte EÚ Súvisiace úlohy zabezpečuje Útvár kontroly lesného reprodukčného materiálu Liptovský Hrádok.

Zákon o lesnom reprodukčnom materiáli (138/2010 Z.z. v znení neskorších predpisov) v nadväznosti na Smernicu Rady 1999/105/ES, určuje predovšetkým:

- Minimálne požiadavky na kvalitu zdrojov reprodukčného materiálu.
- Rajonizáciu genofondu do semenárskych oblastí a výškových zón.
- Národný register a národný zoznam zdrojov lesného reprodukčného materiálu.
- Kategórie, v ktorých sa lesný reprodukčný materiál môže uvádzať do obehu.
- Systém dohľadu na zaručenie pravosti reprodukčného materiálu od zberu cez spracovanie a pestovanie po uvedenie do obehu.
- Podmienky a povinnosti pre uvádzanie LRM do obehu na spoločnom trhu EÚ.
- Povinnosť spolupráce s oficiálnymi orgánmi ostatných členských štátov EÚ.
- Podmienky použitia lesného reprodukčného materiálu na území SR.

Účelom právnych predpisov pre lesný reprodukčný materiál v EÚ aj SR:

- A) Zaručiť kvalitu zdrojov reprodukčného materiálu.
- B) Zaručiť pravosť reprodukčného materiálu na spoločnom trhu EÚ.

Opatrenia na zaručenie kvality zdrojov lesného reprodukčného materiálu

- 1) Kategórie reprodukčného materiálu, v ktorých sa LRM môže uviesť do obehu,
- 2) Vymedzenie semenárskych oblastí,
- 4) Fenotypová klasifikácia a kategorizácia lesných porastov,
- 3) Typy zdrojov lesného reprodukčného materiálu,
- 5) Uznávanie zdrojov reprodukčného materiálu,
- 6) Národný register a národný zoznam zdrojov lesného reprodukčného materiálu.

1) Kategórie reprodukčného materiálu:

- **Identifikovaný zdroj** - pochádza zo zdroja známej proveniencie bez uplatnenia selekcie, ktorý spĺňa technické požiadavky prílohy č. 2 zákona 217/2004 resp. 138/2010.
- **Selektovaný** - pochádza zo zdroja, ktorý bol vyselektovaný na základe fenotypových znakov na úrovni populácie (hromadnou selekciou) a spĺňa technické požiadavky prílohy č. 2 zákona 217/2004 resp. 138/2010. U nás sú jeho zdrojom uznané porasty pre zber semena.
- **Kvalifikovaný** - pochádza zo zdrojov, ktorými sú semenné sady, rodičovské - výberové stromy, klony alebo zmesi klonov, ktorých zložky boli vyselektované individuálnou selekciou na základe fenotypových znakov, ktoré spĺňajú technické požiadavky prílohy č. 3 zákona 217/2004 resp. 138/2010.
- **Testovaný** - pochádza zo zdrojov, ktorými sú uznané porasty, semenné sady, rodičovské-výberové stromy, klony alebo zmesi klonov. Kvalita reprodukčného materiálu musí byť overená porovnávacím testom alebo odhadom na základe genetickej skúšky zložiek reprodukčného materiálu. Materiál musí spĺňať požiadavky prílohy č. 4 zákona 217/2004 resp. 138/2010.

2) Vymedzenie semenárskych oblastí:

Účelom je zabezpečenie vhodných zdrojov reprezentujúcich konkrétne ekologické podmienky v rámci semenárskych oblastí. Semenárskou oblasťou (konkrétnej dreviny) sa rozumie oblasť s podobnými stanovištnými podmienkami, v ktorej sa porasty danej dreviny a aj zdroje jej reprodukčného materiálu vyznačujú podobnými fenotypovými a genetickými znakmi. Môže ich ovplyvniť nadmorská výška.

Samostatné semenárske oblasti máme vymedzené pre 7 hlavných lesných drevín: smrek obyčajný, jedľa biela, borovicu lesnú, smrekovec opadavý, buk lesný, dub zimný a dub letný. Pre ostatné lesné dreviny je Slovensko jednou semenárskou oblasťou. Medzi semenárskymi

oblasťami v prirodzenom areáli hlavných drevín nie je možný prenos reprodukčného materiálu zvonka. Do oblastí mimo prirodzený areál sa LRM prenášať môže.

Výškový prenos (t.j. používanie) reprodukčného materiálu v semenárskych oblastiach je regulovaný na základe lesných vegetačných stupňov. Podľa aktuálnych predpisov je možné prenášať materiál v rámci rovnakého lesného vegetačného stupňa alebo o jeden l.v.s. smerom nahor.

3) Fenotypová klasifikácia, kategorizácia a pôvod lesných porastov

Fenotypová klasifikácia je súčasťou vonkajších prác pri vyhotovovaní lesných hospodárskych plánov resp. plánov starostlivosti o les. Predmetom hodnotenia je **produkčnosť, tvárnosť, korunovosť**. Výsledkom hodnotenia je **fenotypová hodnota** dreviny. Na jej základe sa lesný porast zaraďuje do jednej z kategórií:

A - fenotypovo vysokohodnotný porast,

B - fenotypovo hodnotný porast,

C - porast fenotypovo priemerný,

D - porast pôvodom a fenotypovo nevhodný

(kategórie A–D zodpovedajú kategóriám IIA–IID podľa starých predpisov).

Vek uskutočnenia fenotypovej klasifikácie v lesných porastoch je:

- 60 rokov (61 +) pre smrek, jedľu, borovicu lesnú, buk, duby.
- 40 rokov (41+) pre borovicu limbu, duglasku tisolistú, jedľu obrovskú, borovicu hladkú, orech čierny a dub červený.
- 20 rokov (21+) sa určuje pre rýchlorastúce dreviny: topol osikový, čierny a biely, jelšu lepkavú a sivú, brezu.
- 60 rokov (61+) pre ostatné dreviny.

Zdrojom lesného reprodukčného materiálu môžu byť len porasty fenotypovej kategórie A a B, v niektorých prípadoch C. Nesmú nimi byť porasty fenotypovej kategórie D.

Pre drevinu v lesnom poraste sa určuje aj **pôvod**, ktorý môže byť autochtónny, miestny, neautochtónny a neznámy. **Autochtónny** je porast, ktorý pochádza z nepretržitej prirodzenej obnovy na tom istom mieste alebo je založený z reprodukčného materiálu generatívneho pôvodu z toho istého porastu alebo autochtónnych porastov v bezprostrednom susedstve. **Miestny pôvod** znamená, že porast (alebo jeho materský porast) bol založený z reprodukčného materiálu pochádzajúceho z tej istej semenárskej oblasti. Pri autochtónnych porastoch alebo semenných zdrojoch sa ako pôvod uvádza miesto, na ktorom rastú. Ak je pôvod **neautochtónny**, uvádza sa miesto pôvodu reprodukčného materiálu, použitého na ich založenie. Pôvod porastu alebo semenného zdroja môže byť aj **neznámy**.

4) Typy zdrojov lesného reprodukčného materiálu:

- Pre kategóriu „identifikovaný“ je to porast alebo skupina stromov.
- Pre kategóriu „selektovaný“:
 - o **uznaný porast** (lesný porast uznaný pre zber semena)
 - o **semenný porast** (porast, ktorý je reprodukčnou výsadbou alebo vznikol prirodzenou obnovou vysokohodnotných porastov fenotypovej kategórie A).
 - o **(génová základňa)** (súvislý komplex porastov z vyrovnanou vekovou štruktúrou, obsahujúci uznané porasty, slúžiaci na zachovanie genofondu lesných drevín; ako zdroj LRM sa pripúšťali do r. 2010.)
- Pre kategóriu „kvalifikovaný“:
 - o **rodičovský - výberový strom**
 - o **semenný sad** klonový alebo generatívny
 - o **klon**
 - o **zmes klonov**

O multiklonálna varieta

- Pre kategóriu "testovaný" to môžu byť všetky vyššie uvedené zdroje po overení ich genetických vlastností testami potomstiev na aspoň dvoch reprezentatívnych lokalitách v odlišných stanovištných podmienkach.

5) Uznávanie zdrojov reprodukčného materiálu:

Návrh na uznanie zdroja reprodukčného materiálu predkladá Národnému lesníckemu centru (ďalej NLC) správca lesného pozemku pri obnove lesného hospodárskeho plánu. Zdroj navrhnutý na uznanie musí spĺňať požiadavky na kvalitu uvedené v prílohách č. 2 až 4 zákona 217/2004 resp. 138/2010. Ich splnenie preveruje NLC.

Za zdroj **možno uznať porasty fenotypovej kategórie A a B, s podielom biologicky zrejých jedincov príslušnej dreviny** aspoň 10 % s najnižším počtom 40 jedincov. Ak sa uznáva porast, môže ho tvoriť niekoľko susedných jednotiek priestorového rozdelenia lesa, ak patria do tej istej semenárskej oblasti, výškovej zóny a fenotypovej kategórie danej dreviny.

NLC schvaľuje zdroj reprodukčného materiálu, vyhotovuje jeho uznávací list a prideluje mu evidenčný kód. Evidenčný kód je nezameniteľné alfanumerické označenie každého zdroja lesného reprodukčného materiálu. U nás používaný kód obsahuje informáciu o drevine, type zdroja, semenárskej oblasti, výškovom pôvode, územnosprávnej jednotke a registračné číslo zdroja.

O zriadení alebo zrušení uznaného zdroja materiálu **rozhoduje obvodný lesný úrad** na návrh NLC. Stav a obhospodarovanie uznaných zdrojov kontroluje resp. usmerňuje NLC a lesné úrady. Uznanie zdroja sa zruší, ak prestane spĺňať požiadavky určené zákonom.

Označovanie uznaných zdrojov v mapách a teréne:

V lesníckych mapách sa uznaný porast označuje skratkou „UP“ resp. do r. 2010 „A“ alebo „B“ podľa fenotypovej kategórie, výberový strom VS, semenný sad SS, génová základňa GZ, semenný porast SP. V teréne uznaný zdroj reprodukčného materiálu vyznačuje jeho správca (vlastník, obhospodarovateľ):

- Uznaný porast 5 cm širokým zeleným pruhom po obvode kmeňa vo výške 1,3 m na okrajových stromoch porastu. Do r. 2010 sa používal pruh žltej farby pre uznané porasty fenotypovej kategórie A alebo znak „X“ zelenej farby pre uznané porasty kategórie B.
- Rodičovský - výberový strom číslom stromu a dvojitém pruhom po celom obvode žltou farbou vo výške 1,3 m. Pruhy majú šírku 5 cm a medzera medzi nimi 15 cm.
- Semenný porast na rohoch a lomových bodoch hospodárskymi kopcami a po odrastení na okrajových stromoch 10 cm širokým žltým pruhom po obvode kmeňa vo výške 1,3 m.
- Hranica génovej základne znakom „G“ na okrajových stromoch vonkajšej hranice GZ.

6) Národný register a národný zoznam zdrojov reprodukčného materiálu

Národný register s podrobnými údajmi a Národný zoznam ako stručný výťah národného registra, poskytujú prehľad disponibilných zdrojov lesného reprodukčného materiálu podľa drevín a semenárskych oblastí, kategórií a typov zdrojov LRM na Slovensku aj každom členskom štáte EÚ.

Národný register je databáza s podrobným prehľadom o geografických, genetických a biometrických charakteristikách jednotlivých zdrojov, ako aj ich vlastníctve a správe. Register je verejne prístupný na požiadanie podľa zákona o slobodnom prístupe k informáciám.

Národný zoznam zdrojov je výťahom z národného registra. V členských štátoch EÚ aj Schémy OECD pre LRM majú národné zoznamy jednotnú štruktúru. Následne sa z nich zostavuje Spoločný zoznam zdrojov LRM pre celú EÚ (*Community List of Approved Basic Materials for the Production of Forest Reproductive Material*, http://ec.europa.eu/food/plant/propagation/forestry/index_en.htm). Národný zoznam obsahuje nasledujúce údaje:

- a) botanický názov alebo skratku dreviny, pre ktorú sa zdroj uznal,
- b) kategóriu LRM, pre ktorú je určený,
- c) účel využitia zdroja,
- e) kód zdroja,
- f) lokalita zdroja určená semenárskou oblasťou, nadmorskou výškou a prípadne aj presnou súradnicou (zemepisnou šírkou a dĺžkou) alebo aj názvom lokality.
- d) typ zdroja,
- g) rozloha alebo určenie veľkosti zdroja počtom klonov, potomstiev alebo zastúpených výberových stromov (napr. v semenných sadoch)
- h) pôvod (autochtónny, neautochtónny alebo neznámy),
- i) prípadné dodatočné informácie.

Opatrenia na zaručenie pravosti pôvodu (identity) lesného reprodukčného materiálu

- 1) Osvedčenie o odbornej spôsobilosti
- 2) Podmienky získavania lesného reprodukčného materiálu
- 3) Podmienky pestovania a registrácia reprodukčného materiálu
- 4) Kontrola lesného reprodukčného materiálu
- 5) Sankcie: osobitné opatrenia a pokuty

1) Osvedčenie o odbornej spôsobilosti

Na prácu s lesným reprodukčným materiálom – jeho zber, spracovanie, skladovanie, pestovanie a uvádzanie do obehu je potrebné **osvedčenie o odbornej spôsobilosti**. S LRM teda môžu pracovať len osoby ktoré sú držiteľmi osvedčenia o odbornej spôsobilosti alebo pracujú pod priamym dohľadom držiteľov osvedčenia o odbornej spôsobilosti. Fyzická osoba môže byť držiteľom osvedčenia, ak:

- má aspoň úplné stredné odborné vzdelanie so zameraním na lesníctvo alebo pestovanie a prácu s rastlinným materiálom a
- je držiteľom osvedčenia o odbornej spôsobilosti na činnosti s lesným reprodukčným materiálom alebo
- je držiteľom obdobného dokladu vydaného iným členským štátom EÚ.

Fyzická osoba – podnikateľ alebo právnická osoba sa stáva držiteľom osvedčenia, ak

- zamestnáva fyzickú osobu, ktorá je držiteľom osvedčenia o odbornej spôsobilosti alebo obdobného dokladu vydaného iným členským štátom.
- je zapísaná v obchodnom registri alebo v inom obdobnom registri.

2) Získavanie lesného reprodukčného materiálu

Zber semená, odber častí rastlín na ďalšie množenie a vyzdvihovanie semáčikov z prirodzeného zmladenia je predmetom kontroly. Podľa zákona 138/2010 budú zbory kontrolovať najmä lesné úrady. Fyzická alebo právnická osoba, ktorá plánuje zbierať semeno, semennú surovinu, semenáčky z prirodzeného zmladenia alebo časti rastlín pre vegetatívne množenie, preto zber vopred oznamuje obvodnému lesnému úradu.

Semeno alebo semenná surovina konkrétnej dreviny sa zbiera v rámci jedného zberu:

- v uznaných porastoch a zdrojoch identifikovaného LRM najmenej z 20 stromov drevín so semenárskymi oblasťami a najmenej 10 stromov ostatných drevín,
- semenných sadoch, ak plodí aspoň 50 % vrúbľovancov.

- z najmenej z 10 rodičovských - výberových stromov z rovnakej semenárskej oblasti a výškovej zóny.

Pre kategóriu identifikovaný možno zbierať semeno na základe povolenia NLC:

- ak pre danú drevinu nemožno zabezpečiť reprodukčný materiál kategórie selektovaný alebo kvalifikovaný,
- ak je pre obnovu ochranných lesov a lesov osobitného určenia potrebné zabezpečiť reprodukčný materiál prispôbený miestnym stanovištným podmienkam,
- ak je reprodukčný materiál určený na vývoz mimo EÚ,
- ak zdroj reprodukčného materiálu nebol zaradený do fenotypovej kategórie D.

3) Evidencia reprodukčného materiálu

Predmetom evidencie sú **oddiely** lesného reprodukčného materiálu tvorené reprodukčným materiálom tej istej dreviny, presne známeho množstva, pozbieraného v tom istom čase z toho istého zdroja reprodukčného materiálu. Oddiel je spoločne spracovaný, skladovaný, ošetrovaný a pestovaný. V prípade sadeníc má oddiel rovnaký spôsob a rovnakú dobu pestovania.

Na identifikáciu oddielov reprodukčného materiálu slúži vyššie spomenutý nezameniteľný **Evidenčný kód zdroja**.

Každý oddiel lesného reprodukčného materiálu v celej EÚ - od zberu semena resp. odberu častí rastlín na vegetatívne množenie až po jeho použitie na zalesňovanie - sprevádza **List o pôvode** (v pôvodnom znení smernice Rady 1999/105/ES „**Master Certificate**“) s evidenčným kódom zdroja a údajmi o pôvode, zbere a pestovaní každej partie reprodukčného materiálu. List o pôvode je základným identifikačným dokladom („rodným listom“) každého oddielu LRM. Aj keď sa vystavuje v národných jazykoch, má jednotný obsah a formu vo všetkých štátoch celej EÚ.

Lesný reprodukčný materiál sa môže spracúvať, uskladňovať a pestovať len v zariadeniach registrovaných oficiálnym národným orgánom pre lesný reprodukčný materiál, t. j. NLC.

4) Kontrola lesného reprodukčného materiálu

Kontrolou sa preveruje

- **pôvod a pravosť:** zber, označovanie, produkcia, evidencia, kvalita a uvádzanie reprodukčného materiálu do obehu,
- **kvalita** a obhospodarovanie zdrojov reprodukčného materiálu,
- **použitie** stanovištne a geneticky vhodného reprodukčného materiálu na obnovu lesných porastov a zalesňovanie.

V SR aj iných členských štátoch EÚ resp. Schémy OECD pre LRM na účely evidencie a kontroly slúži národný register a zoznam zdrojov lesného reprodukčného materiálu, zoznam držiteľov osvedčenia pre prácu s LRM, registrácia zariadení na uskladnenie a spracovanie LRM, listy o pôvode a evidencia lesného reprodukčného materiálu. Orgánmi štátnej odbornej kontroly sú Lesné úrady a Národné lesnícke centrum.

5) Sankcie: lesné úrady a NLC ukladajú sankcie v podobe osobitných opatrení a pokút:

- Pozastavenie uvádzania lesného reprodukčného materiálu do obehu až do odstránenia zistených nedostatkov bez odkladného účinku.
- Zrušenie registrácie reprodukčného materiálu.
- Zakázanie zberu semena, semennej suroviny, odber častí rastlín a vyzdvihovanie semenáčikov z prirodzeného zmladenia.
- Nariadenie likvidácie nezaregistrovaného reprodukčného materiálu.
- Nariadenie likvidácie založeného porastu alebo porastov.

- o Začatie konania pre nesplnenie zalesňovacej povinnosti.

Na internetovej stránke Národného lesníckeho centra <http://www.nlcsk.org> >>> Činnosti >>> Kontrola lesného reprodukčného materiálu, je zverejnený:

- Zoznam držiteľov osvedčenia o odbornej spôsobilosti,
- Národný zoznam zdrojov reprodukčného materiálu,
- Semenárske oblasti lesných drevín,
- Informácie o legislatíve,
- Kontakt na oficiálne orgány ostatných členských štátov EÚ.
- Národný dokument SR pre uplatnenie Schémy OECD pre lesný reprodukčný materiál.

3.1.3 Semenné sady

Semenné sady sú účelové výsadby, zakladané s cieľom produkcie geneticky vysokohodnotného osiva. Zakladajú sa ako potomstvo výberových stromov. Spravidla sa pre založenie semenného sadu výberové stromy namnožia vegetatívne (vrúbľovaním), aby sa ich genotyp zachoval v nezmenenej podobe, v tomto prípade hovoríme o klonových semenných sadoch. Menej často sa uplatňuje generatívne množenie výberových stromov, spravidla formou voľnoopeleného potomstva. Semenné sady založené z generatívneho potomstva nazývame jadrové.

Z hľadiska klasifikácie OECD teda patria k tzv. kvalifikovaným zdrojom, keďže rodičovské jedince (výberové stromy) prešli individuálnym fenotypovým výberom. Po preverení genetickej kvality testmi potomstiev je možné klasifikovať semenný sad ako testovaný semenný zdroj.

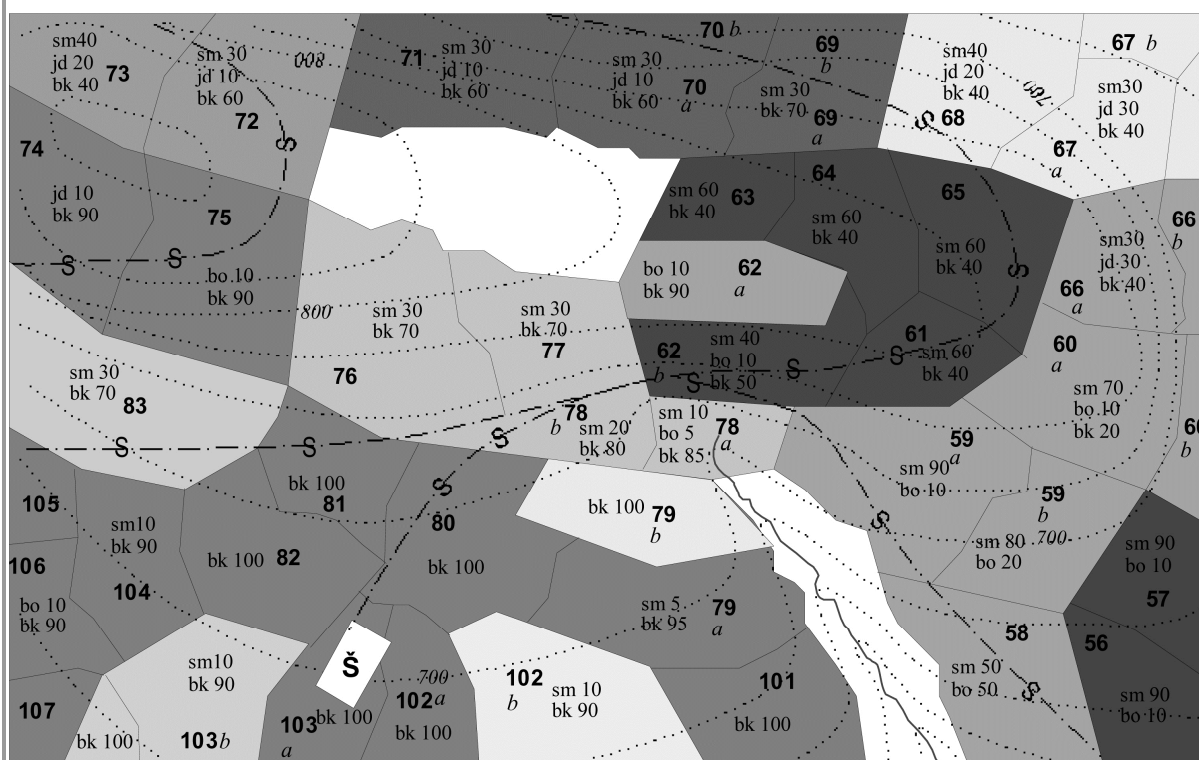
Vzhľadom na účel semenných sadov ich zakladáme v podmienkach, ktoré zabezpečujú maximálnu produkciu semien a možnosť jednoduchého obhospodarovania a ošetrovania (kvalitná pôda, dobré klimatické podmienky, rovný terén, mierny sklon, dopravná prístupnosť). V ošetrovaní semenných sadov je základným úkonom tvarovanie korún s cieľom pribrzdiť výškový rast a vyformovať široké koruny s dostatočným prístupom svetla. Kvitnutie je možné stimulovať aj ďalšími opatreniami: melioráciou pôdy, hnojením, fytohormónmi, k pomerne drastickým a preto menej odporúčaným opatreniam patrí strangulácia alebo krúžkovanie konárov.

Na to, aby semenný sad produkoval skutočne geneticky hodnotné potomstvo, musí fungovať ako uzavretá panmiktická populácia. Pod panmixiou rozumieme rovnakú pravdepodobnosť kríženia medzi ktoroukoľvek dvojicou klonov. V ideálnej panmiktickej populácii každý jedinec prispieva k tvorbe samčích aj samičích gamét, t.j. pohlavných buniek (u drevín peľových zŕn a vajíčok) rovnakým podielom, pričom každá dvojica gamét má rovnakú šancu spojiť sa do zygoty, z ktorej sa vyvinie embryo a následne jedinec potomstva. Odchýlka od panmixie znamená, že v skutočnosti nie všetky klony v semennom sade produkujú rovnaký počet pohlavných buniek, ktoré sa úspešne uplatnia v reprodukcii. Efektívny počet klonov (počet klonov zodpovedajúcich ideálnej panmixii) je v tomto prípade menší než skutočný počet vysadených klonov. Dôsledkom je zvýšenie podielu príbuzenského kríženia, ktoré vedie k tzv. inbrídingovej depresii (zhoršenie rastu, vitality, odolnosti) a k zmenšeniu genetickej premenlivosti potomstva. Maximálna miera panmixie sa v semennom sade zabezpečí tým, že každý rodičovský klon je zopakovaný vo viacerých exemplároch (rôzne jedince jedného klonu majú identický genotyp), ktoré sú v sade rozmiestnené tak, aby sa na jeho ploche vyskytovali rôzne kombinácie susedných klonov (susedné jedince sa navzájom opelujú najčastejšie). Vrúbľovance rovnakého klonu musia byť čo najviac vzdialené medzi sebou, aby sa minimalizovalo samoopelenie (vzájomné opelenie medzi jedincami rovnakého

Príklad: Na modelovom území (mapa v mierke 1:20000, odtiene zodpovedajú vekovým triedam analogicky ako farby na porastovej mape) je potrebné založiť semenný sad borovice sosny. K dispozícii je 25 klonov, počet vrúbľovancov podľa jednotlivých klonov je nasledovný:

klon 1 – 15 ks, 2 – 7 ks, 3 – 11 ks, 4 – 12 ks, 5 – 20 ks, 6 – 3 ks, 7 – 9 ks, 8 – 10 ks, 9 – 12 ks, 10 – 12 ks, 11 – 8 ks, 12 – 20 ks, 13 – 11 ks, 14 – 7 ks, 15 – 8 ks, 16 – 2 ks, 17 – 13 ks, 18 – 18 ks, 19 – 16 ks, 20 – 16 ks, 21 – 5 ks, 22 – 20 ks, 23 – 21 ks, 24 – 11 ks, 25 – 25 ks.

Kde v tomto území by ste ho založili? Nakreslite plán sadu s rozmiestnením klonov. Aká je efektívna veľkosť sadu za predpokladu, že vrúbľovance kvitnú synchronne a všetky klony majú rovnakú plodnosť?



Riešenie: Celkový počet vrúbľovancov je 312. Pri borovici sosne sa používa spon 7×7 m, t.j. na 1 vrúbľovavec pripadá plocha 49 m^2 , na celý sad je teda potrebná plocha 1,53 ha. Z hľadiska konfigurácie terénu je pre semenný sad potrebné voľiť plochu s minimálnym sklonom, do úvahy teda prichádzajú porasty 79a–82, 60a–66a, alebo nelesná pôda nad porastami 76–77. Nelesná pôda (ak ide o pasienky, lúky a pod.) je pre založenie semenného sadu spravidla výhodnejšia. V tomto prípade sa však v jej blízkosti nachádzajú porasty s pomerne vysokým zastúpením borovice (62a, b, 75), navyše táto plocha nie je sprístupnená cestou. Porasty 61, 64, 65 sú v rubnom veku, v blízkosti cesty, na druhej strane ich nevýhodou je východná expozícia a blízkosť porastov so zastúpením borovice (59a, b, 60 a, 62a, b). Ako najvhodnejšie riešenie sa v tomto území javí využitie škôly v poraste 103a. Výhodou je mierny sklon, dobré pôdne podmienky (škôlka), rovný povrch pôdy umožňujúci perspektívne využitie mechanizácie, južná expozícia, sprístupnenie cestou. Borovicové porasty sa nevyskytujú prinajmenšom v bezprostrednom susedstve.

Rozmery škôlky sú 110×181 m, výmera 1,99 ha teda postačuje pre celý semenný sad. Pre maximálnu výmenu peľu medzi vrúbľovancami je optimálny tvar sadu blízky štvorcovému, je teda vhodné využiť celú šírku škôlky. Pri spon 7×7 m sa na plochu škôlky vjde 15×21 radov vrúbľovancov (105×147 m). Pre minimalizáciu samoopelenia je potrebné rozmiestniť vrúbľovance rovnakého klonu čo najďalej od seba:

pokračovanie

25	1	3	20	25	23	10	5	14	23	2	12	25	3	8	13	2	5	18	20	23
5	22	24	7	18	12	22	9	20	19	21	22	1	5	14	25	16	12	8	3	5
18	19	23	11	22	15	1	25	12	4	17	18	11	10	12	17	19	24	1	9	17
17	8	13	5	6	4	19	7	22	13	25	24	23	9	22	18	21	2	25	7	12
12	25	21	12	9	17	3	23	21	8	5	20	15	13	24	1	4	23	5	13	23
23	20	22	19	25	8	5	24	10	1	12	6	14	25	7	20	12	10	15	18	4
4	5	10	20	1	22	11	18	25	7	22	10	18	21	5	19	3	17	22	11	25
24	9	18	23	7	14	12	15	19	3	9	19	17	11	23	9	25	14	8	12	19
22	15	25	3	5	18	23	4	17	20	23	25	4	12	24	18	14	2	24	20	1
20	13	17	4	9	25	13	5	2	12	15	24	1	3	10	22	1	5	4	23	3
1	23	19	22	2	19	10	22	11	8	18	5	22	2	20	13	7	19	25	10	18
18	12	5	11	12	1	20	9	23	25	10	13	23	14	25	15	23	11	13	9	22
25	10	8	25	18	7	3	18	24	19	9	20	16	19	8	12	10	20	1	17	20
4	20	24	15	22	9	17	5	22	17	12	7	18	4	17	22	18	12	8	25	
	19	13	23	5	25	12	4	1	23	6	25	22	1	5	3	25	23	19	5	

Efektívna veľkosť sadu:

Zastúpenie klonov:

klon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
počet	15	7	11	12	20	3	9	10	12	12	8	20	11
frekvencia (%)	4,81	2,24	3,53	3,85	6,41	0,96	2,88	3,21	3,85	3,85	2,56	6,41	3,53
klon	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	spolu
počet	7	8	2	13	18	16	16	5	20	21	11	25	312
frekvencia (%)	2,24	2,56	0,64	4,17	5,77	5,13	5,13	1,60	6,41	6,73	3,53	8,01	100

$$N_e = 1 / \left(1 / (0,0481^2 + 0,0224^2 + \dots + 0,0801^2) \right) = 1 / 0,0486 = \mathbf{20,554}$$

Efektívna veľkosť semenného sadu teda zodpovedá len 20 rovnomerne zastúpeným klonom (za predpokladu rovnomerného a fenologicky synchronizovaného kvitnutia všetkých zastúpených klonov).

genotypu je z genetického hľadiska ekvivalentné selfingu). Semenný sad by zároveň mal byť umiestnený čo najďalej od porastov rovnakej dreviny, aby nedochádzalo k opeleniu cudzími jedincami.

Jediným opatrením, ktoré efektívne napomáha splneniu všetkých troch menovaných podmienok, je dodatkové opelenie. Peľ sa zozbiera z klonov zastúpených v sade, prípadne aj z ďalších klonov (v klonových archívoch resp. v semennom sade samotnom), pri nízkych teplotách je možné ho skladovať bez straty vitality, a v nasledujúcom roku sa rozprašuje do korún vrúbľovancov v dobe kvitnutia. Týmto spôsobom je možné prispieť k panmiktickému páreniu (eliminujú sa fenologické rozdiely resp. rozdiely v bohatosti kvitnutia jednotlivých klonov) a zároveň dodávaný peľ konkuruje pri opelení peľu, vytváranému samotným vrúbľovancom (redukcia samoopelenia) aj peľu z okolitých porastov (zníženie kontaminácie), a zároveň je možné rozšíriť genetickú bázu produkovaného semena (použitím peľu výberových stromov, ktoré v sade nie sú zastúpené).

Vyhľadávka stanovuje minimálny počet 40 klonov (väčšina starších sadov na Slovensku obsahuje len 20–30 klonov). Klony by mali byť zastúpené rovnakým počtom vrúbľovancov, vyznačovať sa zhruba rovnakou produkciou samčích a samičích gamét a byť fenologicky synchronizované. Tieto podmienky v praxi často nie sú dodržané, resp. nie je ich možné v čase zakladania sadu kontrolovať, preto efektívny počet klonov je spravidla nižší ako skutočný. Efektívnu veľkosť semenného sadu je možné vypočítať ako

$$N_e = 1/\sum m_i f_i$$

kde m_i resp. f_i je podiel i -teho klonu na produkcii samčích resp. samičích gamét, ktoré sa úspešne uplatnia v reprodukcii. Tento podiel je možné odhadnúť na základe pozorovania produkcie samčích a samičích kvetov resp. strobilov a fenologických pozorovaní. Pokiaľ tieto údaje nie sú k dispozícii, je možné pre odhad efektívnej veľkosti použiť podiel klonov na produkcii šišíek alebo semien, prípadne aspoň podiel na počte jedincov p_i . V tomto prípade sa výpočet efektívnej veľkosti sadu zjednoduší na

$$N_e = 1/\sum p_i^2$$

Semenné porasty sú zakladané ako generatívne potomstvo uznaných porastov kategórie A. Účelom ich zakladania je reprodukovať genofond hospodársky najcennejších čiastkových populácií lesných drevín. Pôvod z jednotlivých materských stromov a rozmiestnenie jedincov na ploche v nich spravidla nebývajú kontrolované. Z hľadiska klasifikácie OECD je možné ich zaradiť medzi selektované resp. po preverení ich kvality medzi testované semenné zdroje.

3.1.4 Provenienčný výskum ako podklad pre reguláciu prenosu LRM

Legislatíva rozlišuje pojmy „pôvod“ a „proveniencia“ zdroja reprodukčného materiálu. **Pôvod** je pre autochtónny zdroj miesto, kde porast alebo strom rastú, pre neautochtónny zdroj ide o miesto, odkiaľ boli semená alebo sadenice, použité pre založenie zdroja, pôvodne dovezené, ide teda o pôvod v biologickom zmysle slova. **Proveniencia** je definovaná jednoducho ako miesto, kde strom alebo porast rastie. Napriek tejto legislatívnej odlišnosti sa oba pojmy často chápu ako totožné.

Ako bolo spomenuté v kap. 2.1, fenotypový prejav je vždy výsledkom spoluúčinkovania dedičných faktorov a prostredia. Ak teda sledujeme fenotypovú premenlivosť organizmov v ich prirodzenom prostredí, nie sme schopní oba zdroje premenlivosti od seba oddeliť. Preto botanika oddávna využívala tzv. presadzovacie pokusy (*common-garden experiments*) v ktorých je rastlinný materiál rôzneho pôvodu, patriaci k rozdielnym taxónom a pod. testovaný na jednej spoločnej ploche, teda v rovnakých podmienkach prostredia. Ak teda jedince vykazujú premenlivosť, možno ju pripísať genetickým faktorom.

Lesníctvo prispelo do skupiny presadzovacích experimentov samostatným typom výskumu: provenienčnými pokusmi. Korene **provenienčného výskumu** boli výsostne praktické. S príchodom moderného lesníctva, spojeného s využívaním holorubov a následným zalesňovaním cca v 17. storočí sa objavil obchod so semenami a sadenicami lesných drevín, a

od 18. storočia začal nadobúdať na rozsahu aj význame predovšetkým u smreka, borovice lesnej a smrekovca. Pôvod a následná distribúcia semien pritom neboli kontrolované. Ešte na začiatku 20. storočia dochádzalo k presunom veľkých množstiev (rádovo tisíce kilogramov) semien ihličnanov v rámci Európy, pričom podobne veľký rozsah mal obchod so semenami dubov, brezy a jelše. Výsledky a dopady týchto presunov nie sú jednoznačné. V niektorých prípadoch boli úspešné, a dovezený materiál rastom predstihuje porasty lokálneho pôvodu. Na druhej strane existuje množstvo prípadov, keď prenos materiálu skončil hospodárskou katastrofou. Táto skutočnosť viedla k zakladaniu prvých porovnávacích výsadiieb, ktoré ukázali výrazné rozdiely medzi „lokálnymi rasami“ v rastových a adaptívnych znakoch. Napriek tejto skutočnosti rozsiahly obchod so semenom bez ohľadu na lokalizáciu a kvalitu zdroja, v ktorom jediným kritériom bola cena, pokračoval ešte do polovice 20. storočia.

Napriek svojmu pôvodne čisto praktickému zameraniu je provenienčný výskum zdrojom základných biologických poznatkov pre evolučnú biológiu, genetiku aj taxonómiu. Aj keď vo všeobecnosti odráža predovšetkým adaptívnu premenlivosť drevín, ktorá je dôsledkom prispôbovania sa lokálnych populácií na miestne podmienky prostredia prirodzeným výberom, časť premenlivosti pozorovanej v provenienčných pokusoch je nutné pripisovať aj faktorom nesúvisiacim so selekciou, predovšetkým migrácii, izolácii a genetickému driftu. **Ciele provenienčného výskumu** zahŕňajú ako teoretické, tak aj praktické aspekty:

- **hodnotenie geografickej premenlivosti druhu**

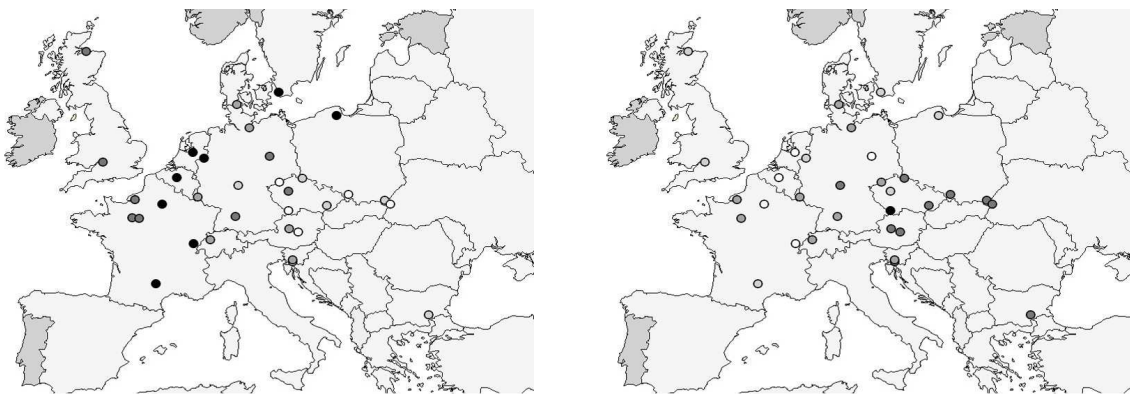
Provenienčný výskum sa týka predovšetkým geografickej variability sledovanej dreviny. Jeho zmyslom je identifikovať geografické trendy resp. priestorové rozdelenie genetického komponentu premenlivosti dôležitých fenotypových znakov, ako aj prípadné špecifické reakcie jednotlivých proveniencií na prenos. Provenienencie v niektorých znakoch môžu vykazovať relatívne stále trendy, nezávislé na mieste výsadby. U buka vo všeobecnosti západnejšie provenienencie (teda z oblastí s oceánickejšou klímou) rašia na jar podstatne neskôr ako východné provenienencie (rozdiel dosahuje cca 18 dní). Tento rozdiel v dobe rašenia sa odráža v poškodení neskorými jarnými mrazmi (obr. 34). V iných znakoch sa však môže prejavovať výrazná G×E interakcia, teda provenienencie na rôznych miestach vykazujú rozdielne reakcie. Ak je rovnaká sada proveniencií vysadená na viacerých plochách, dobre reprezentujúcich areál druhu resp. záujmové územie, je možné kvantifikovať optimálnu mieru prenosu na základe reakcie proveniencie v dôležitých znakoch, ako je výškový či objemový rast, produkcia biomasy, prežívanie a pod., pričom prenos je kvantifikovaný ako rozdiel v geografických súradniciach či ekologických charakteristikách medzi miestom pôvodu a miestom výsadby (obr. 35).

- **hodnotenie genetickej variability proveniencií**

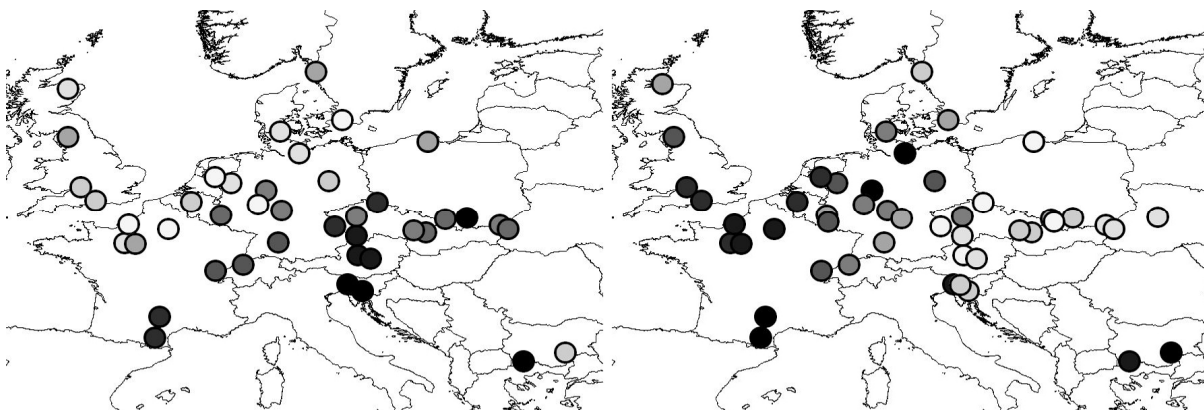
Výsadba v homogénnych podmienkach umožňuje eliminovať variabilitu fenotypových znakov inherentnú v prirodzených populáciách a študovať genetický komponent premenlivosti nielen rastu a prežívania, ale aj kvalitatívnych, fyziologických, fenologických a ďalších znakov významných z praktického hľadiska aj z hľadiska štúdia adaptácie ako evolučného procesu.

- **stanovenie hraníc a smeru prenosu lesného reprodukčného materiálu**

legislatíva o LRM definuje pojem provenienčnej oblasti ako územia, ktoré vykazujú relatívne homogénne ekologické podmienky, a v ktorom rastú porasty danej dreviny s podobnými fenotypovými a genetickými znakmi. V slovenskej terminológii sa zaužíval skôr pojem semenárska oblasť, pričom legislatíva definuje aj výškové zóny ako jednotky pre reguláciu vertikálneho prenosu LRM. Vo väčšine krajín sú hranice takýchto provenienčných oblastí vymedzené na základe klimatických regiónov, administratívnych hraníc a pod. Takéto delenie však odráža len paušálne zjednodušené predstavy o procese adaptácie a úplne ignoruje ďalšie procesy formujúce genofond lokálnych populácií, teda môže sa míňať účinkom. Provenienčný výskum poskytuje schodnú alternatívu, pretože dáva overené informácie



Obr. 34 Rozdelenie doby rašenia (priemerný juliánsky deň dosiahnutia stredového štádia otvárania púčikov; vľavo) a poškodenia mrazom (4-stupňová škála; vpravo) 32 proveniencií buka na ploche pokusu BFH 1998 na VŠLP



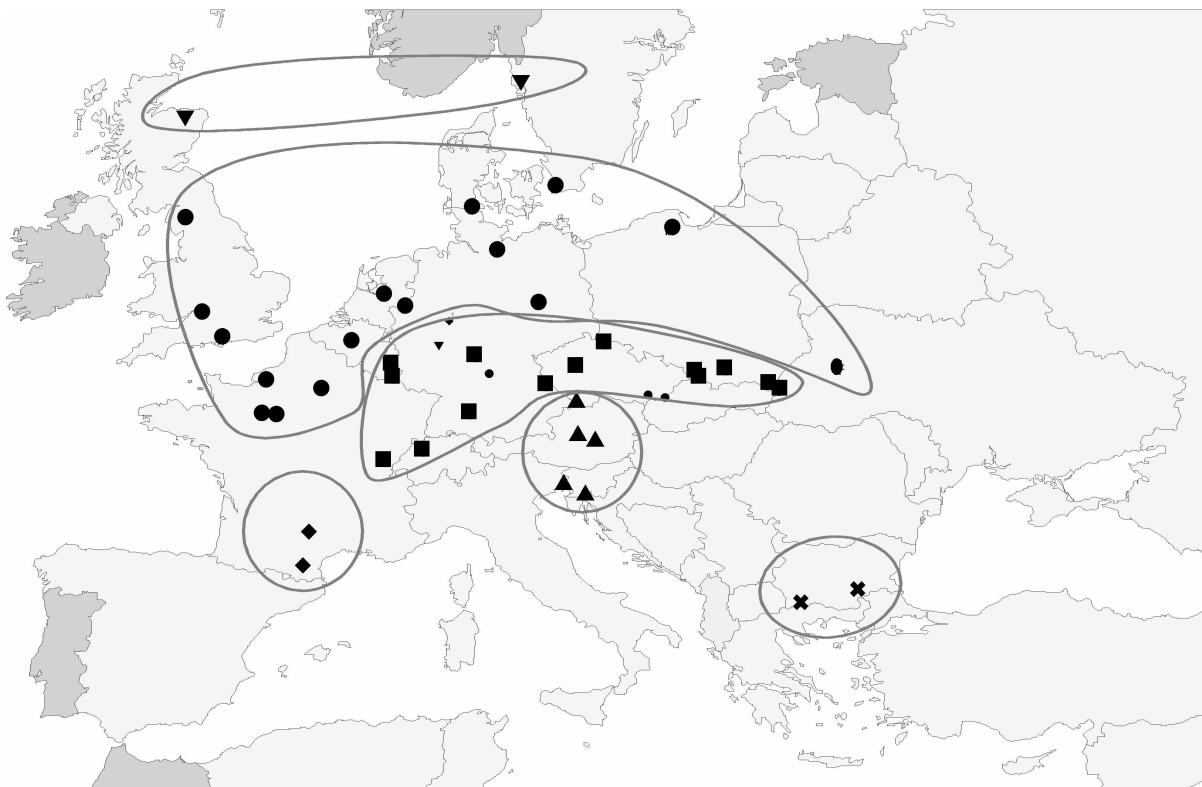
Obr. 35 Rozdelenie optimálnej miery prenosu meranej reakciou vo výškovom raste na prenos v závislosti na nadmorskej výške (vľavo) a reakciou v prežívaní na prenos v závislosti na priemernej ročnej teplote (vpravo) u proveniencií buka v pokuse BFH 1998

o reakcii jednotlivých lokálnych populácií na prenos a identifikácia ich trendov umožňuje generalizovať predpoveď takýchto reakcií aj pre populácie, nezahrnuté v pokuse. Provenienčné oblasti by mali byť vymedzené ako súbory populácií, vykazujúce čo najhomogénnejšiu odozvu na prenos vo viacerých znakoch a vo vzťahu k čo najväčšiemu počtu ekologických faktorov (obr. 36).

- **využitie materiálu pre ďalšie šľachtenie**

Samotné provenienčné pokusy môžu predstavovať zdroj cenného materiálu. Zdrojové porasty, v ktorých bolo zbierané semeno pre založenie pokusu, už v dobe jeho hodnotenia nemusia existovať. Inými slovami, v čase, keď sa na základe pokusu zistí, že potomstvo určitého porastu vykazuje vynikajúci rast, odolnosť alebo iné dôležité vlastnosti, tento porast už nemusí byť k dispozícii. Jeho genofond je však zachovaný v jedincoch vysadených na pokusných plochách, ktoré sa dajú následne využiť pre založenie rekonštitučného semenného sadu alebo namnožiť iným spôsobom.

Na to, aby provenienčný pokus poskytoval informácie, ktoré od neho očakávane, a aby sa tieto informácie dali považovať za zmysuplné a spoľahlivé, musí byť založený zodpovedajúcim spôsobom. Nutný rozsah pokusu závisí práve od očakávaných informácií. Pre výstupy pokusu je dôležité, aby ako časť areálu, ktorá je predmetom záujmu ako zdroj proveniencií, tak aj cieľová oblasť, pre ktorú proveniencie testujeme, boli dostatočne reprezentované. Čím vyššia je variabilita podmienok prostredia, tým väčšie rozdiely možno očakávať v adaptačných procesoch (minulých či budúcich) a v genetickej štruktúre populácií, ktorá je ich výsledkom. Pre počet testovaných proveniencií je dôležitá variabilita minulých evolučných



Obr. 36 Proveniencie buka vyznačujúce sa rovnakou reakciou vo výškovom raste a prežívaní na prenos a adaptívne homogénne oblasti vymedzené na ich základe

procesov. Veľká heterogenita pôdných a klimatických podmienok v areáli druhu (resp. tej jeho časti, ktorá je premetom záujmu pokusu) zvyšuje počet proveniencií, ktoré je potrebné testovať. Naopak, pre počet testovacích plôch je dôležité mať podchytené možné budúce evolučné procesy. Vysoký počet testovacích plôch je teda nutný v prípade, ak sú heterogénne podmienky prostredia v cieľovej oblasti, teda tam, kde budú vybrané proveniencie používané.

3.2 Genetické zdroje, ich zachovanie a ochrana

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. 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 nostieľov. Pod genetickými zdrojmi rozumieme teda konkrétne jedince (napr. výberové stromy), a ich súbory vzniknuté prirodzene (lokálne prirodzené subpopulácie) alebo umelo vytvorené človekom (klonové archívy, semenné sady, pokusné plochy a pod.). Genetické zdroje môžu byť ohrozené prírodnými faktormi (choroby charakteru epidémií, ohrozujúce existenciu celého druhu, napr. grafióza brestov, abiotické a biotické škodlivé činitele, ohrozujúce lokálne populácie) a činnosťou človeka (nevhodné hospodárske postupy, imisie a pod.). Optimálne je, ak sme schopní chrániť a zachovávať genetické zdroje v mieste ich prirodzeného výskytu, t.j. **in situ**. Pokiaľ existuje riziko zániku lokálnych populácií alebo hospodársky cenných genotypov, existuje možnosť ich ochrany **ex situ**, t.j. ich evakuácie mimo priamo ohrozených miest.

Podľa miery narušenia pôvodnej genetickej štruktúry rozlišujeme genetické zdroje:

- **primárne** – nenarušené činnosťou človeka (prírodné lesy)
- **sekundárne** – bežne obhospodarované lesné porasty, genetická štruktúra ktorých je ovplyvnená hospodárením
- **terciárne** – syntetické, človekom vytvorené populácie (klonové archívy, semenné sady, semenné porasty, pokusné plochy a pod.).

Značná časť primárnych genetických zdrojov nie je pod gesciou lesného hospodárstva. Ide predovšetkým o lesy v **národných prírodných rezerváciách** a jadrových zónach **národných parkov**, ochrana ktorých vyplýva zo zákonných predpisov o ochrane prírody. Do tejto kategórie však možno zaradiť aj v podstate neobhospodarované lesné porasty na extrémnych stanovištiach, zaradené najčastejšie do kategórie ochranných lesov alebo lesov osobitného určenia (porasty na hornej hranici lesa, v skalnatom teréne, na extrémnych podložiach a pod.).

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**. V zmysle zákona 217/2004 resp. 138/2010 je génová základňa komplex vekovo diferencovaných lesných porastov, zriadený a dlhodobo chránený so súhlasom správcu lesného pozemku na zachovanie lesných genetických zdrojov v mieste pôvodu v plnej šírke génového spektra. 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 primiešaných a zriedkavých drevinách je prípustná aj menšia rozloha. Obhospodarovanie porastov v GZ je zamerané na dosiahnutie **prírodzenej obnovy** dreviny, pre ktorú bola zriadená. Ak sa nedosiahne prirodzená obnova dreviny, použije sa umelá obnova reprodukčným materiálom pochádzajúcim z uznaných porastov tej istej GZ. Ak sa v GZ vyskytujú nepôvodné alebo fenotypovo nevhodné porasty, tieto možno zaradiť do predčasnej obnovy.

Génová základňa sa zriaďuje podobným postupom ako sa uznávajú zdroje lesného reprodukčného materiálu. Dokumentáciu génovej základne tvorí **uznávací list** s údajmi o drevine, účele, lokalizácii a rozlohe a vlastníčkovi a **projekt génovej základne**, ktorý obsahuje

- definíciu poslania a opis východiskového stavu lesných porastov,
- prehľad porastov so základnými údajmi o ich štruktúre,
- požiadavky na plánovanie hospodárskych opatrení v ďalšom období,
- podrobnú lesnícku mapu a ťažbovú mapu územia na dobu platnosti lesného hospodárskeho plánu resp. plánu starostlivosti o les.

Kompenzáciou za prípadné zvýšenie nákladov obnovy lesa je zaradenie génových

základní medzi lesy osobitného určenia podľa zákona 326/2005 Z.z. o lesoch, ktoré nie sú predmetom dane z pozemkov.

Za určitú formu ochrany genetických zdrojov *in situ* možno považovať aj **uznané porasty**, v ktorých je obhospodarovanie rovnako zamerané na dosiahnutie prirodzenej obnovy.

Terciárne genetické zdroje existujú takmer výlučne *ex situ*. Ich hlavným typom sú **génové banky**, čiže zariadenia, v ktorých sú uchovávané časti rastlín, použiteľné pre ďalšie rozmnožovanie. Ide predovšetkým o banky semien, ale u niektorých drevín prichádza do úvahy aj skladovanie vegetatívne množeného materiálu, napr. *in vitro* kultúr. Na Slovensku je budovaná banka semien, v súčasnosti pod gesciou š.p. Lesy Slovenskej republiky (OZ Semenoles Lipt. Hrádok). Banka semien lesných drevín je súbor oddielov semien určený na dlhodobé uchovanie reprezentatívnych vzoriek genofondu vysokohodnotných a v mieste pôvodu ohrozených porastov lesných drevín. Do banky semien lesných drevín sa zaraďujú oddiely tých drevín, ktoré sa dajú dlhodobo skladovať bez výraznej zmeny klíčivosti. Každý oddiel semien uložený v banke je rozdelený na štyri časti:

1. Základná zásoba.
2. Skúšobné vzorky.
3. Vzorky na testy potomstiev, zakladanie jadrových semenných sádov a výskum.
4. Pracovná zásoba na reprodukciu genetických zdrojov: zakladanie semenných porastov, obnovu porastov v génových základniach alebo ochranných lesoch.

Pre lesné dreviny, ktorých semená sa dajú skladovať kratšiu dobu, sa v banke vytvára len jedna zásoba na všetky uvedené účely.

Za formu uchovávania genetických zdrojov *ex situ* možno považovať aj **klonové archívy** a **semenné sady**, v ktorých sú zakonzervované genotypy výberových stromov, t.j. hospodársky najcennejších jedincov. **Semenné porasty** kopírujú genofond hospodársky najcennejších populácií, uznaných porastov kategórie A. Možno ich zakladať ako reprodukčné výsadby umelou obnovou (t.j. *ex situ*) aj prirodzenou obnovou (*in situ*).

Špecifickú formu terciárnych genetických zdrojov predstavujú pokusné výsadby – provenienčné 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). Arboréta, botanické záhrady parky a podobné zariadenia spravidla obsahujú minimálne počty zástupcov jednotlivých druhov drevín, často bez informácie o geografickom pôvode, ale najmä pri kriticky ohrozených druhoch môžu významne napomôcť ich záchrane.

Lesné dreviny, okrem hospodárskeho významu, sú kľúčovou zložkou významnej časti prírodných a prírode blízkych ekosystémov. Vzhľadom na to, že vo väčšine prípadov neboli v minulosti predmetom výberu, šľachtenia a pod (teda v podstate sa jedná o divorastúce, nie domestikované organizmy), predstavujú populácie lesných drevín dôležité genetické zdroje a prispievajú k biologickej rozmanitosti na všetkých jej úrovniach. Pojmy „genetický zdroj“ a „zdroj reprodukčného materiálu“ sa v prípade lesných drevín značne prekrývajú. Na to, aby genetický zdroj mohol byť akokoľvek využitý pre praktické účely, musí byť formálne uznaný ako zdroj lesného reprodukčného materiálu. Umelá obnova lesov a výber reprodukčného materiálu sa teda významne dotýkajú problematiky ochrany a zachovania genetických zdrojov a biodiverzity. Lesnícka legislatíva musí preto brať do úvahy medzinárodné dohody a právne normy v tejto oblasti, prinajmenšom tie, ktoré sa nejakým spôsobom dotýkajú lesných ekosystémov, lesných drevín, a hoci aj nepriamo súvisia s problematikou umelej obnovy lesa. Z noriem a dohôd, ktoré sú relevantné pre Európu, je najvýznamnejšou **Dohoda o biologickej rozmanitosti** (*Convention on Biological Diversity*, CBD), prijatá v rámci Konferencie 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. Právne záväznou normou je aj **Medzinárodná dohoda o rastlinných genetických zdrojoch pre potravinárstvo a poľnohospodárstvo** (*International Treaty on Plant Genetic Resources*, ITPGR), 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 európske krajiny 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 lesného reprodukčného materiálu je významná predovšetkým rezolúcia 2 prvej ministerskej konferencie, ktorá sa konala v roku 1990 v Štrasburgu (S2) o zachovaní lesných genetických zdrojov. Pre implementáciu tejto rezolúcie bol zriadený program EUFORGEN, ktorého zastrešujúcou inštitúciou je Medzinárodný ústav pre rastlinné genetické zdroje (*International Plant Genetic Resources Institute*; IPGRI) so sídlom v Ríme. 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. Z rezolúcií ďalších ministerských konferencií sa problematiky lesného reprodukčného materiálu dotýkajú najmä rezolúcie H2 (Všeobecné smernice pre zachovanie biologickej rozmanitosti európskych lesov; Helsinky 1993) a L2 (Paneurópske kritériá, indikátory a pracovné smernice pre trvalo udržateľné obhospodarovanie lesov, Lisabon 1998). 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.

Literatúra

Crow, J.F., Kimura, M., 1970: *Introduction to Population Genetics Theory*. Harper & Row, New York - Evanston - London.

Gillet, E.M., Gömöry, D., Paule, L., 2006: Measuring genetic variation within and among populations at marker loci. In: T. Geburek & J. Turok (eds.) *Conservation and Management of Forest Genetic Resources in Europe*. ISBN 80-967088-3, Arbora Publishers, Zvolen and IPGRI, Rome, 237–274.

Gregorius, H.-R., 1980: The probability of losing an allele when diploid genotypes are sampled. *Biometrics* 36: 643-652.

Gregorius, H.-R., 1987: The relationship between the concepts of genetic diversity and differentiation. *Theoretical and Applied Genetics* 74: 397-401.

Gregorius, H.-R., Roberds, J.H., 1986: Measurement of genetical differentiation among subpopulations. *Theoretical and Applied Genetics* 71: 826-834.

Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., Sherman-Broyles, S.L., 1992: Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6: 95-124.

Nei, M., 1975: *Molecular and Population Genetics and Evolution*. North-Holland Publ. Co., Amsterdam, Oxford.

Petit, R.J., El Mousadik, A., Pons, O., 1998: Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12: 844-855.

Pons, O., Petit, R.J., 1996: Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* 144: 1237-1245.

Sneath, P.H.A., Sokal, R.R., 1973. *Numerical Taxonomy*. W.H. Freeman, San Francisco.

Vendramin, G.G., Hanson, O.K., 2006: Molecular markers for characterizing variation in forest trees. In: T. Geburek, J. Turok (eds.) *Conservation and Management of Forest Genetic Resources in Europe*. Arbora Publishers, Zvolen, 337–368.

Wright, S., 1943: Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.