

# 3. Genetická a fenotypová proměnlivost

---

## 3.1 ZÁKONITOSTI GENETICKÉ PROMĚNLIVOSTI V POPULACÍCH

Jak napsal už Darwin ve svém *Původu druhů*, jedním ze základních předpokladů evolučních změn je různorodost vlastností organismů. Evoluci je podle něj třeba chápat jako dvoustupňový proces, při kterém 1. vzniká proměnlivost znaků mezi jedinci v populaci a 2. poměrné zastoupení těchto jedinců se z generace na generaci mění. Přítomnost genetické proměnlivosti je tedy základní a nezbytnou podmínkou evoluce. Avšak aby se změny četností jednotlivých variant mohly projevit i v dalších generacích, musí být tato proměnlivost alespoň částečně dědičná.

Souvislost mezi mírou genetické proměnlivosti v populaci a tempem evoluce této populace udává tzv. **základní teorém přírodního výběru**, definovaný R. A. Fisherem v roce 1930: *Míra zvýšení reprodukční zdatnosti libovolného organismu v libovolném čase je rovna jeho genetické proměnlivosti v tomto čase.*

V úvodní kapitole jsme se zmínili o dvou odlišných přístupech ke studiu dědičných znaků, personifikovaných osobami G. Mendela a F. Galtona. Mendel a po roce 1900 i jeho následovníci věnovali svoje úsilí zkoumání diskrétní proměnlivosti, známé též jako mendelovská (jednoduchá) proměnlivost. Jde o fenotypovou proměnlivost podmíněnou alelami jednoho nebo několika málo genů, přičemž vliv prostředí je ve srovnání s rozdíly v genotypu zanedbatelný. Jednoduchou mendelovskou proměnlivost lze v mnoha případech snadněji studovat přímo zkoumáním genů než sledováním jejich fenotypových projevů. Z toho vyplývá určitý paradox, neboť v popředí zájmu evolučních biologů je většinou proměnlivost fenotypová, ať už jde o morfologické znaky, charakteristiku ontogenetického vývoje, chování, věk při první reprodukci atd. - tedy takové znaky, kterými se zabývali biometrikové. Naproti tomu genetický výzkum se nejnáze provádí na úrovni molekul, jejichž rozdílné vlastnosti je však velmi obtížné dávat do přímé souvislosti s rozdíly ve fenotypu.

Protipólem studia diskrétní mendelovské proměnlivosti je přístup, jehož zakladatelem a největším propagátorem byl Francis Galton (1822-1911). Galton se zaměřil na studium kontinuální proměnlivosti, při kterém nelze fenotypové rozdíly mezi organismy jednoduše přiřadit působení jediného genu či velmi malého počtu genů s velkými účinky. Pro charakterizaci fenotypů se v tomto případě používá kvantitativní měřítko (např. výška, hmotnost). Zkoumání kontinuálních znaků ovšem s sebou přináší určité problémy: 1. tyto znaky jsou v typické podobě ovlivňovány alelami většího počtu genů, takže segregace kteréhokoli z nich je „maskována“ segregací ostatních genů, které daný znak ovlivňují, a 2. většina kontinuálních znaků je ovlivňována vnějším prostředím, takže studovaná fenotypová proměnlivost nemusí mít výhradně genetický základ.

Protože jsme při studiu proměnlivosti v populacích často omezeni na zkoumání rozdílů ve fenotypu, je nutné odlišit různé možné zdroje fenotypové proměnlivosti:

1. *Rozdíly v genotypu*, tedy v sekvenci DNA (u RNA-virů v sekvenci RNA). V této souvislosti je důležité mít na paměti, že některé typy genetických variant jsou přenášeny pouze po mateřské linii, jako je tomu u mitochondriálních genů většiny organismů, nebo naopak pouze po otcovské linii, jako například u chloroplastové DNA jehličnanů.

2. *Rozdíly v podmínkách prostředí.* V některých případech je fenotypová proměnlivost ovlivňována bezprostředně či během velmi krátkého časového úseku, jako například u některých fyziologických a behaviorálních znaků. Tyto znaky se mohou měnit několikrát opakovaně během života jedince. Naopak některé rozdíly, které zůstávají zachovány po celý život, nebo po část života, jsou způsobeny vlivy prostředí působícími v raných stádiích ontogeneze či dokonce ještě ve vajíčku.
3. *Mateřské (maternální) efekty.* K účinkům, kterými může matka ovlivňovat fenotyp svých potomků patří množství a složení žloutku, fyziologický stav matky v předporodní či předsnůškové fázi a rozsah a charakter mateřské péče v období po porodu či snůšce, přičemž rozdíly mezi jednotlivými matkami mohou být podmíněny odlišnostmi v jejich genotypu, ve výživě nebo jiných faktorech prostředí. Pro úplnost ještě dodejme, že u druhů, u nichž se vyskytuje otcovská péče, musíme počítat i s působením otcovských (*paternálních*) efektů.

### 3.1.1 Populace

Základní evoluční jednotkou je podle neodarwinismu **populace**. I když každý z nás má určitou intuitivní představu co to populace je, není snadné podat její přesnou definici. Většinou se termín „populace“ používá v poměrně vágním smyslu a z pochopitelných důvodů jsou odborníky jednotlivých biologických i nebiologických oborů zdůrazňovány různé rysy populací. V našem případě je užitečné dívat se na populaci především jako na soubor sdílených genů, tedy jako na společný *genofond* (gene pool). Avšak takto chápané populace jsou definovány příliš široce (v typickém případě by šlo prakticky o celý druh) a navíc areál druhu bývá často diskontinuální. Proto se často k definici populace přidává i hledisko určitého prostorového omezení. Populaci bychom si tedy mohli definovat jako *skupinu jedinců téhož druhu, mezi kterými existuje reprodukční kontinuita mezi generacemi a kteří obývají víceméně dobře definovanou geografickou oblast, přičemž k ekologickým a reprodukčním interakcím dochází častěji mezi příslušníky této skupiny než se členy jiných populací téhož druhu.*

I v takto definovaných populacích jsou však jedinci zřídka rozmístěni homogenně, ale naopak vytvářejí menší skupiny (hejna, stáda, smečky, kolonie, rodiny atd.). Příčinou této agregace je buď nehomogenost prostředí – a to i případech z lidského hlediska poměrně „kontinuálních“ biotopů, jako jsou jezera a moře (mělčí a hlubší místa) či louky (suchá a podmáčená místa) – nebo sociální interakce mezi členy populace. Takové skupiny se označují jako **lokální populace** neboli **démy**. Někdy se můžeme setkat i s termíny **subpopulace** či **mendelovská populace** (ve většině případů, včetně tohoto textu, jsou tyto termíny považovány za rovnocenné, přestože lokální populace [subpopulace] má obecnější význam – může být dále rozdělena na menší subpopulace atd. Naproti tomu dém je považován za základní rozmnožovací jednotku.) Celková populace složená z démů bývá nazývána **globální populace**; pokud je genetická výměna mezi démy do značné míry omezena (aniž by ovšem byly vzájemně zcela izolovány), mluvíme často o tzv. **metapopulaci**. Dalšími možnými typy populací mohou být některé uměle vytvořené populace, například experimentální nebo zemědělské. Často jsou používány i populace modelové, například populace panmiktická (viz dále).

#### **Náhodné oplození**

V důsledku rekombinace a segregace během gametogeneze nemohou být u pohlavně se rozmnožujících organismů genotypy přenašeny z generace na generaci. Každý genotyp se proto tvoří v každé generaci znovu po splnutí pohlavních buněk. Charakter nově vzniklého genotypu v oplozeném vajíčku tedy závisí na možnosti příslušných gamet setkat se během oplození a tato možnost je zase podmíněna pářením jedinců v předchozí generaci. Vztah mezi četností výskytu určitého genotypu je tak determinován četností spojení mezi příslušnými jedinci a tedy do značné míry způsobem rozmnožování. Například u organismů, které se rozmnožují samooplozením (např. některé druhy rostlin), lze u potomstva očekávat sníženou četnost výskytu heterozygotů. Protipólem je **náhodné oplození (panmixie)**, při kterém dochází k páření mezi jedinci opačného pohlaví zcela náhodně, se stejnou frekvencí, jakou by docházelo ke střetu dvou náhodně vybraných genotypů. Náhodné oplození tedy znamená, že pravděpodobnost spojení dvou genotypů je rovna četnosti těchto genotypů v populaci. Pokud je například četnost genotypu *MM* rovna 0,90, potom existuje 90% pravděpodobnost páření s jedincem nesoucím tento genotyp. Pravděpodobnost setkání dvou genotypů *MM* je  $0,9^2=0,81$ .

Náhodné oplození je důležitým populačně-genetickým modelem. V reálných situacích se však většinou setkáváme s většími či menšími odchylkami od modelového stavu. Ty mohou být způsobeny například prostorovou členitostí stanoviště, které způsobuje, že k páření s některými členy populace dochází s nižší pravděpodobností než s jinými. Příčinou nenáhodnosti oplození může být také křížení mezi příbuznými jedinci a v extrémním případě výše zmíněné samooplození. V neposlední řadě se můžeme v populaci setkat s tzv. **výběrovým pářením** (assortative mating), při kterém dochází k přednostnímu rozmnožování buď mezi geneticky či fenotypově podobnějšími jedinci (pozitivní výběrové páření), nebo naopak mezi jedinci odlišnějšími (negativní výběrové páření, disassortative mating).

Příkladem výběrového páření může být rozmnožovací strategie u myši domácí. Bylo zjištěno, že myši samice jsou schopny čichem identifikovat nositele různých typů hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) a podle toho modifikovat svoje rozmnožovací preference. Pokusné samice dávaly při výběru sexuálního partnera prokazatelně přednost samcům s odlišným typem MHC než měly samy. Naproti tomu méně preferovaly samce geneticky příliš odlišné. Jinými slovy, samice dávaly přednost příslušníkům vlastní populace, ovšem vyhýbaly se samcům, kteří byli (potenciálně) bezprostředně příbuzní.

Model náhodného oplození může být komplikován také tím, že se nemusí stejnou měrou týkat všech znaků. Například u člověka zcela jistě existuje náhodné oplození pro krevní skupiny, enzymy atd., avšak výběr partnera je zpravidla nenáhodný s ohledem na takové znaky, jako je výška či barva kůže. Jedním z důsledků odchýlení od modelu náhodného oplození je změna v četnosti genotypů, nikoli však alel. Představme si populaci, ve které má každý jedinec dva potomky. V průměru tak každý jedinec předá po jedné kopii obou svých alel do další generace. Výběrové páření nebo křížení mezi příbuznými změní zygotické (genotypové) kombinace mezi generacemi, avšak nemá vliv na to, které *alely* se do následující generace přenášejí. *Při nenáhodném oplození se tedy mění genotypové, nikoli však alelové četnosti* (viz 4.2.1).

### Genotypové a alelové četnosti

V předchozím textu jsme se několikrát setkali s pojmy genotypová a alelová četnost. Tyto termíny si nyní můžeme ilustrovat na příkladu přástevníka hluchavkového, *Panaxia dominula*<sup>1</sup>, který se ve Velké Británii vyskytuje ve třech barevných formách, vzájemně se lišících rozsahem bílých skvrn na černém podkladu prvního páru křídel a černých skvrn na červeném podkladu druhého páru křídel. Experimentální křížení ukázala, že popsaná proměnlivost je způsobena dvěma alelami jediného genu. Třetí barevnou formou jsou heterozygotní jedinci, kteří jsou intermediární mezi oběma homozygotními fenotypy. V následujícím textu budeme označovat genotyp určující nejvyšší zastoupení bílých skvrn jako  $A_1A_1$ , nejtmaší formu jako  $A_2A_2$  a intermediární formu jako  $A_1A_2$ .

V období 1939-1970 odchytil každoročně E. B. Ford na jedné lokalitě přástevníky a zaznamenával výskyt jednotlivých barevných variant. Celkový počet odchycených jedinců byl následující:

$A_1A_1$	$A_1A_2$	$A_2A_2$	Celkem
17062	1295	28	18385

**Genotypové četnosti** jsou definovány jako poměrné zastoupení jednotlivých genotypů v populaci. Pro genotyp  $A_1A_1$  je tato četnost  $17062/18385 = 0,928$ . Podobně četnost  $A_1A_2$  je rovna 0,070 a četnost homozygota  $A_2A_2$  je 0,002. Součet všech genotypových četností musí být vždy roven 1.

**Alelová** neboli **genová četnost** je poměrné zastoupení dané alely v populaci. Každý diploidní jedinec má po dvou kopiích všech autozomálních genů, takže celkový vzorek přástevníků obsahuje  $2 \times 18385 = 36770$  kopií sledovaného genu. Jeden z homozygotů nese dvě kopie alely  $A_1$ , zatímco heterozygot pouze jednu. Četnost alely  $A_1$  je tedy rovna počtu kopií této alely ( $17062 \times 2 + 1295 \times 1 = 35419$ ) dělenému celkovým počtem genových kopií ve vzorku:  $35419/36770 = 0,963$ . Podobně četnost alely  $A_2$  je  $(1295 \times 1 + 28 \times 2)/36770 = 0,037$ . I v tomto případě dává součet četností 1. Je důležité si uvědomit, že tato čísla jsou jen *odhady* skutečných četností, protože jsme k jejich výpočtu použili pouze vzorek (jakkoli velký) všech přástevníků obývajících zkoumanou lokalitu, přičemž předpokládáme, že tento náš vzorek je *náhodný*.

<sup>1</sup> Tento druh se podle současného názoru lepidopterologů nazývá *Callimorpha dominula*, avšak všechny genetické i evoluční publikace včetně nejrecentnějších používají původní termín *Panaxia* a proto se pro větší přehlednost i zde přidržíme tohoto staršího označení.

Získané poznatky si nyní můžeme zobecnit. Jestliže písmenem  $N$  označíme celkový počet jedinců ve vzorku,  $2N$  udává počet všech kopií daného genu. Je-li počet jedinců s genotypem  $A_1A_1$ ,  $A_1A_2$  a  $A_2A_2$   $n_1$ ,  $n_2$  a  $n_3$ , jejich genotypové četnosti  $P$ ,  $Q$  a  $R$  budou

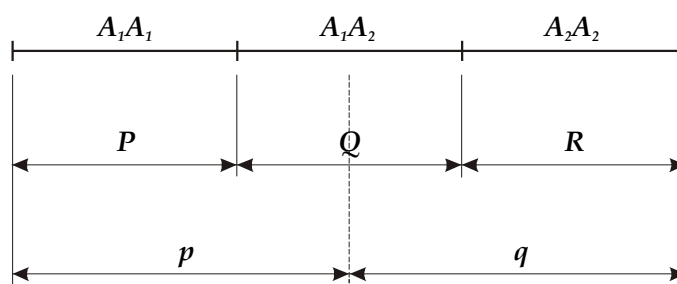
Genotyp	$A_1A_1$	$A_1A_2$	$A_2A_2$	Celkem
Počet	$n_1$	$n_2$	$n_3$	$N$
Četnost	$P=n_1/N$	$Q=n_2/N$	$R=n_3/N$	

přičemž platí  $P+Q+R=1$ .

Alelové četnosti se označují  $p$  a  $q$  ( $q=1-p$ ) a vypočítají se podle vztahu

$$p = (2n_1 + n_2)/2N \text{ a } q = (n_2 + 2n_3)/2N \quad (3.1)$$

nebo podobně  $p=P+1/2Q$  a  $q=1/2Q+R$ . Samozřejmě platí  $p+q=P+Q+R=1$  (obr. 3.1). V našem příkladě jsou tedy genotypové četnosti  $P=0,928$ ,  $Q=0,070$ ,  $R=0,002$  a genové četnosti  $p=0,963$  a  $q=0,037$ .



**Obr. 3.1** Vztah mezi genotypovými četnostmi  $P$ ,  $Q$ ,  $R$  a alelovými četnostmi  $p$  a  $q$ .

### 3.1.2 Hardyho-Weinbergův zákon

V části věnované náhodnému oplození jsme se nezmínili o jednom důležitém modelu, často využívaném při matematickém modelování chování genetických systémů. Jde o model *nepřekrývajících se generací*, který předpokládá zánik všech dospělých členů populace v každé generaci před dosažením pohlavní zralosti jedinců generace následující. V praxi je tento předpoklad omezen pouze na omezené množství organismů, jako jsou některé druhy hmyzu s krátkou dobou života nebo jednoleté rostliny s krátkou vegetační dobou. V populační genetice se model nepřekrývajících se generací používá jako výchozí aproximace ke složitějším situacím a ačkoli se může na první pohled zdát příliš zjednodušující, ukazuje se, že výpočty očekávaných genotypových frekvencí na něm založené jsou adekvátní i pro řadu organismů s poměrně dlouhou a složitou životní historií.

Na příkladu prástevníka hluchavkového jsme si ukázali, že je poměrně snadné vypočítat alelové četnosti jestliže známe četnosti jednotlivých genotypů. Avšak lze naopak vypočítat genotypové četnosti z četností alel? V zásadě platí, že není možné ze dvou známých vypočítat tři neznámé. Jestliže však budeme předpokládat určité zjednodušující podmínky, můžeme genotypové četnosti přece jen odvodit. O dvou nezbytných podmínkách (tj. náhodné oplození a diskrétní generace) jsme se již zmínili. Navíc však musíme předpokládat absenci deterministických i stochastických evolučních sil, jejichž působení by mohlo měnit četnosti alel z generace na generaci. Všechny předpoklady, nezbytné pro další matematická odvození, si můžeme shrnout do následujících bodů:

1. Organismy jsou diploidní.
2. Rozmnožování je pohlavní.
3. Generace se vzájemně nepřekrývají.
4. Studovaný gen má dvě alely, které u heterozygota segregují v poměru 1:1.

5. Četnosti alel jsou pro každé pohlaví totožné.
6. Oplození je náhodné.
7. Velikost populace je velmi velká (teoreticky nekonečná), takže nemůže docházet k náhodným změnám v četnostech genotypů ani alel.
8. Nedochozí k migraci, nebo ji můžeme zanedbat. Jinými slovy, geny nejsou dodávány zvenčí, *neexistuje tok genů*.
9. Geny se nemění z jednoho alelového stavu v druhý, jinými slovy *nedochází k mutacím*, (nebo je lze ignorovat).
10. Všichni jedinci mají stejnou šanci přežití a reprodukce, *na studované alely tedy nepůsobí přírodní výběr*.

Jestliže jsou tyto předpoklady splněny, je vztah alelových a genotypových četností dán vztahem, který v roce 1908 nezávisle na sobě formulovali britský matematik **G. H. Hardy** (1877-1947) (viz poznámku v rámečku 3.1) a německý fyziolog **Wilhelm Weinberg** (1862-1937):

$$A_1A_1: p^2 \quad A_1A_2: 2pq \quad A_2A_2: q^2 \quad (3.2)$$

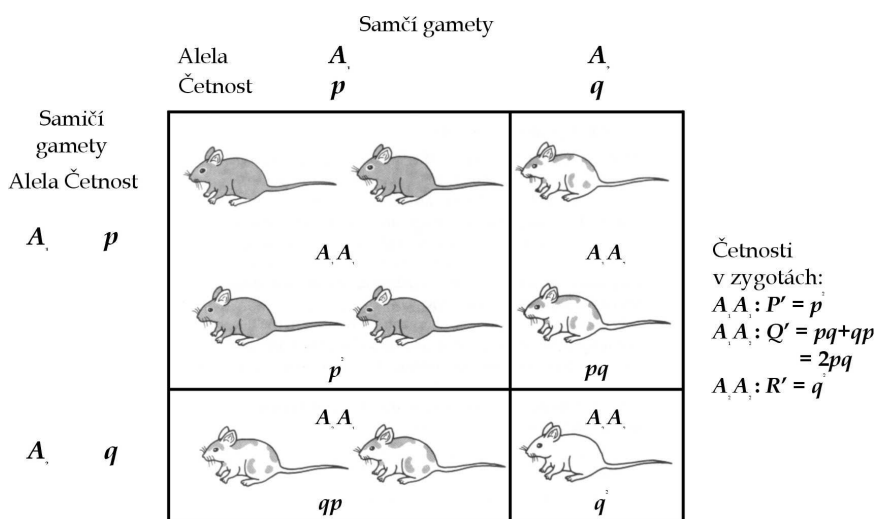
kde výrazy  $p^2$ ,  $2pq$  a  $q^2$  udávají četnosti jednotlivých genotypů.

Vztah (3.2) se nazývá **Hardyho-Weinbergův zákon** a jeho odvození si lze přiblížit dvojím způsobem:

1. Představme si právě vzniklou zygotu a jeden sledovaný gen. Tato zygota dostala jednu alelu od otce a jednu od matky a to s pravděpodobností podle následujícího schématu:

gen od otce	gen od matky	pravděpodobnost	
$A_1$	$A_1$	$p \times p = p^2$	}
$A_1$	$A_2$	$p \times q = pq$	
$A_2$	$A_1$	$q \times p = qp$	
$A_2$	$A_2$	$q \times q = q^2$	

Při tomto odvození jsme předpokládali, že celková pravděpodobnost získání alely, řekněme  $A_1$  od otce a  $A_2$  od matky je produktem obou separátních pravděpodobností. Tento předpoklad však platí pouze při náhodném oplození, které je nutnou podmínkou platnosti Hardyho-Weinbergova zákona (povšimněte si také toho, že alelové četnosti jsou stejné u samců i samic, proto jsme nepoužili různých indexů k rozlišení obou separátních pravděpodobností). Grafické znázornění celého argumentu je uvedeno na obr. 3.2.



**Obr. 3.2** Grafické znázornění Hardyho-Weinbergova zákona.

2. Odvození Hardyho-Weinbergova zákona z tabulky křížení (tabulka 3.1) je sice méně názorné než předchozí přístup, nicméně je užitečné si ho zde uvést, protože tabulka křížení je nezbytná ve složitějších případech, například pokud oplození není náhodné.

**Tabulka 3.1** Odvození Hardyho-Weinbergových poměrů z tabulky křížení

Křížení	Četnost křížení	Četnost zygot v potomstvu		
		$A_1A_1$	$A_1A_2$	$A_2A_2$
$A_1A_1 \times A_1A_1$	$P^2$	$P^2$	—	—
$A_1A_1 \times A_1A_2$	$2PQ$	$PQ$	$PQ$	—
$A_1A_1 \times A_2A_2$	$2PR$	—	$2PR$	—
$A_1A_2 \times A_1A_2$	$Q^2$	$Q^2/4$	$Q^2/2$	$Q^2/4$
$A_1A_2 \times A_2A_2$	$2QR$	—	$QR$	$QR$
$A_2A_2 \times A_2A_2$	$R^2$	—	—	$R^2$
Celkem	$(P+Q+R)=1$	$(P+Q/2)^2=p^2$	$2(P+Q/2)(Q/2+R)=2pq$	$(Q/2+R)^2=q^2$
Celkem v příští generaci		$P'$	$Q'$	$R'$

### Rámeček 3.1 Hardyho-Weinbergův zákon - historická poznámka

Princip definovaný Hardym a Weinbergem byl některým biologům v zásadě znám již před rokem 1908. Například americký genetik z Harvardovy univerzity William E. Castle (1867-1962) jeho základy formuloval již roku 1903. (V tomtéž roce, uprostřed prudkých sporů mezi mendelisty a biometriky, Castle mimo jiné publikoval i článek nazvaný „Mendelův zákon dědičnosti“, v němž naznačuje, že dědičnost kontinuálních znaků se může řídit Mendelovými zákony.) Nicméně Castleova práce v té době byla málo známa.

Za zmínku rovněž stojí, že G. H. Hardy uveřejnil svoje závěry jako argument proti tvrzení některých Mendelových odpůrců, kteří tvrdili, že pokud by Mendelovy zákony dědičnosti měly mít obecnou platnost, museli bychom se všude v přírodě setkávat s fenotypovými poměry blízkými 3:1. Bezprostředním důsledkem Hardyho-Weinbergova zákona je však naprosté odmítnutí tohoto tvrzení, protože genotypový poměr  $A- : aa$  je určen četnostmi alel a nemá žádnou tendenci zaujímat jakoukoli specifickou hodnotu.

### Některé aspekty Hardyho-Weinbergova zákona

Nejdůležitější důsledek Hardyho-Weinbergova zákona si můžeme odvodit následujícím způsobem. Jestliže předpokládáme existenci dvou alel na zkoumaném lokusu, pak z tabulky 3.1 vyplývá, že v následující generaci budou genotypové četnosti

$$\begin{aligned}
 P' &= P^2 + PQ + Q^2/4 = (P+Q/2)^2 = p^2 \\
 Q' &= PQ + 2PR + Q^2/2 + QR = 2(P+Q/2)(R+Q/2) = 2pq \\
 R' &= Q^2/4 + QR + R^2 = (R + Q/2)^2 = q^2
 \end{aligned}$$

Alelové i genotypové četnosti budou tedy v další generaci stejné jako v generaci předcházející, tedy určeny poměrem (3.2). Při platnosti základních předpokladů Hardyho-Weinbergova zákona *zůstává genotypové složení populace z generace na generaci konstantní* (o některých pomocných předpokladech bude pojednáno níže). Říkáme, že populace se nachází v **Hardyho-Weinbergově rovnováze**. *Nepůsobí-li na populaci některé*

z evolučních mechanismů (mutace, migrace, příbuzenské křížení, přírodní výběr atd.), stačí samotná mendelovská dědičnost k tomu, aby proměnlivost zůstala v populaci zachována.

Druhým důležitým bodem Hardyho-Weinbergova zákona je to, že rovnovážných frekvencí je dosaženo již po jedné generaci náhodného křížení. Předpokládáme přitom, že alelové četnosti jsou mezi samci a samicemi shodné a že generace se nepřekrývají. Ve druhém případě, tj. pokud se generace překrývají, je Hardyho-Weinbergovy rovnováhy dosaženo postupně během několika generací.

Pokud jsme hovořili o Hardyho-Weinbergově zákoně nebo o populacích, které jsou v Hardyho-Weinbergově rovnováze, vždy jsme zdůrazňovali nutnost zachování základních výchozích předpokladů. Avšak již z podstaty idealizovaného modelu nutně vyplývá, že reálné situace se budou do větší či menší míry od ideálního stavu odchylovat. Při studiu genetických aspektů evoluce se proto ptáme, do jaké míry absence jedné či více podmínek ovlivňuje alelové a genotypové četnosti v populacích. Přestože mírnější narušení některých předpokladů nemusí vždy vyústit v posunutí Hardyho-Weinbergovy rovnováhy, nelze je v žádném případě zanedbat. Naopak, vzhledem k tomu, že jevy jako nenáhodné oplození, mutace, tok genů, náhodné procesy způsobené malou populační velikostí a přírodní výběr mohou měnit četnosti alel nebo genotypů, patří k hlavním faktorům evolučních změn v populacích. O těchto mechanismech bude pojednáno v této a dalších dvou kapitolách.

Hardyho-Weinbergův zákon je přes mnohá omezení základním pilířem mnoha experimentálních i teoretických populačně-genetických výzkumů. (Je zajímavé, že mezi prvními, kdo použil dnes obvyklého výpočtu očekávaných četností a jejich srovnání s hodnotami pozorovanými k testování genetických hypotéz, byl roku 1917 S. Wright. Ještě zajímavější je ovšem skutečnost, že Wright v té době neměl ani ponětí o existenci Hardyho-Weinbergova zákona.) Vzhledem k rozšíření použití Hardyho-Weinbergovy rovnováhy v genetice populací a evoluční biologii je důležité mít na paměti, že konvenční statistické testy (např.  $\chi^2$  test) nejsou příliš citlivé k odchylkám od očekávaných genotypových frekvencí. Proto samotná skutečnost, že pozorované četnosti jsou v souladu s Hardyho-Weinbergovými poměry, ještě neznamená, že všechny podmínky nutné k dosažení rovnováhy skutečně platí.

Vraťme se k příkladu výskytu tří barevných variant přástevníka hluchavkového, studovaných E. B. Fordem. Ze zjištěných dat jsme vypočítali četnosti obou alel,  $p=0,963$  a  $q=0,037$ . Teoreticky očekávaná četnost genotypu  $A_1A_1$  je  $0,963^2=0,9274$ . Očekávaný počet jedinců s tímto genotypem vypočteme vynásobením této četnosti celkovým počtem motýlů ( $N$ ):  $0,9274 \times 18385 = 17050$ . Použijeme-li stejný postup i na ostatní genotypy, dostaneme následující výsledky:

Genotyp	$A_1A_1$	$A_1A_2$	$A_2A_2$
	$p^2$	$2pq$	$q^2$
Očekávaná četnost	0,9274	0,0713	0,0013
Pozorovaná četnost	0,9280	0,0704	0,0015
Očekávaný počet	17050	1311	24
Pozorovaný počet	17062	1295	28

Rozdíly mezi pozorovanými počty a hodnotami teoreticky očekávanými za předpokladu, že populace se nacházela v Hardyho-Weinbergově rovnováze, jsou prakticky zanedbatelné a lze je přičíst na vrub náhodnostem při shromažďování vzorku (tzv. chyba odebrání vzorku, sampling error). Abychom tento výsledek verifikovali, použijeme standardní statistický postup, test dobré shody ( $\chi^2$  test), ve kterém

$$\chi^2 = \sum \frac{(f - \hat{f})^2}{\hat{f}} \quad (3.3)$$

kde symbol  $f$  označuje pozorovaný počet genotypů a  $\hat{f}$  očekávaný počet v téže genotypové třídě;  $\sum$  znamená, že hodnoty ve všech genotypových třídách jsou sumovány. V našem případě  $\chi^2 = (17062-17050)^2 / 17050 + (1295-1311)^2 / 1311 + (28-24)^2 / 24 = 0,8704$ . Vzhledem k tomu, že máme celkem tři genotypové třídy, stupeň volnosti je  $df = 3(\text{počet tříd}) - 1(\text{počet parametrů, tj. } p) - 1 = 1$ . Porovnání s tabulkovou hodnou

ukazuje, že nulovou hypotézu shodnosti pozorovaných počtů s hodnotami očekávanými na základě předpokladu Hardyho-Weinbergovy rovnováhy nelze zamítnout.

Pokud by studovaný vzorek nebyl v souladu s Hardyho-Weinbergovým poměrem, můžeme uvažovat několik možností. Nejčastější příčinou odchylky od rovnovážných četností bývá narušení jednoho či více modelových předpokladů, zejména že oplození je nenáhodné, mezi vznikem zygot a dobou shromáždění vzorku působil přírodní výběr nebo velikost populace je omezená. Velmi častým případem odchylky od očekávaných hodnot je nižší zastoupení heterozygotů ve vzorku. Důvodem pro tento jev může být skutečnost, že náš vzorek nepochází z jediné populace. V rámečku 3.2 je ukázáno, že pokud se náš vzorek skládá ze dvou menších vzorků, z nichž každý pochází z jiné populace s náhodným oplozením, ale s odlišnými četnostmi alel, v celkovém vzorku budou heterozygotní genotypy zastoupeny méně než očekáváme podle Hardyho-Weinbergova zákona. Tento jev se nazývá **Wahlundův efekt** a setkáme se s ním ještě jednou v souvislosti s rozdělením populace (kap. 3.3).

### Rámeček 3.2 Wahlundův efekt

Předpokládejme, že na sledovaném genu segregují dvě alely. Ze dvou různých populací, ve kterých probíhá náhodné oplození, jsou odebrány vzorky, každý o velikosti  $N/2$ , s četnostmi alely  $A$  0,2 a 0,7. Jestliže oba vzorky smícháme, očekávané počty jedinců s jednotlivými genotypy v celkovém vzorku  $N$  jsou

$$\begin{array}{ll} AA: & (0,004 + 0,490)N/2 = 0,265N \\ Aa: & (0,320 + 0,420)N/2 = 0,370N \\ aa: & (0,640 + 0,090)N/2 = 0,365N \\ \text{Celkem} & N \end{array}$$

Celková četnost alely  $A$  je tedy  $(2 \times 0,265 + 0,37)/2 = 0,45$ . Kdyby byl smíšený vzorek odebrán z jediné populace s náhodným oplozením, očekávané genotypové četnosti by byly 0,2025AA : 0,495Aa : 0,3025aa. Skutečné četnosti ve smíšeném vzorku tudíž ukazují na nedostatek heterozygotů ve srovnání s očekávanými hodnotami.

Tento nedostatek heterozygotů můžeme očekávat všude tam, kde celkový vzorek obsahuje směs dvou a více populací s náhodným oplozením, ve kterých existují rozdílné četnosti alel.

### Dominance

Dominantní alela svým fenotypovým projevem překrývá u heterozygotů expresi alely recesivní, takže nejsme schopni rozlišit heterozygota od dominantního homozygota. Vzhledem k tomu, že při dominanci můžeme rozlišit pouze dvě fenotypové třídy, dominantní a recesivní, nelze testovat shodu s Hardyho-Weinbergovým poměrem. Jestliže však předpokládáme, že populace se nachází v Hardyho-Weinbergově rovnováze, můžeme vypočítat alelové četnosti z fenotypové četnosti recesivního homozygota. Jestliže platí, že dominantní alela  $A$  a recesivní alela  $a$  jsou v rovnováze, dominantní fenotyp má četnost  $p^2 + 2pq$ , zatímco recesivní fenotyp zaujímá  $q^2$  populace.

Příkladem může být výskyt fenylketonurie u člověka. Tato vážná choroba se projevuje pouze u recesivních homozygotů. Předpokládáme, že podmínky platnosti Hardyho-Weinbergova zákona jsou splněny a chceme vypočítat, jaká část lidské populace obsahuje alelu pro fenylketonurii v heterozygotním stavu. Je však náš předpoklad Hardyho-Weinbergovy rovnováhy reálný? Až donedávna byl selekční tlak proti této metabolické poruše velmi silný vzhledem k jejím projevům (riziko těžkých somatických poruch, mentální retardace). Předpoklad absence přírodního výběru tedy neplatí. Nicméně četnost výskytu fenylketonurie není příliš vysoká, udává se, že pouze jeden z 10000 novorozenců trpí touto chorobou. Selektce proti tak vzácně se vyskytujícímu genotypu je proto málo účinná a pro naše účely ji lze zanedbat.

Z četnosti recesivního homozygota,  $q^2=0,0001$  vypočítáme četnost recesivní alely, tedy

$$q = \sqrt{0,0001} = 0,01 \quad p = 1 - q = 0,99$$

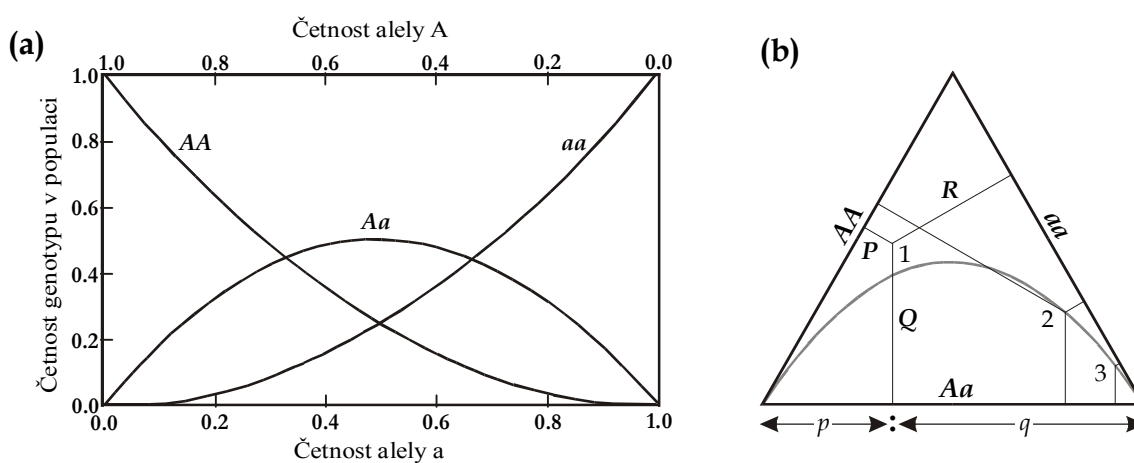
Četnost normálních homozygotů je  $p^2 = 0,99^2 = 0,9801$  a četnost heterozygotů je  $2pq = 0,0196$  ( $\cong 2\%$ ), tedy zhruba 2 lidé ze sta. Obecně pro odhad četnosti recesivní alely (odhad označujeme symbolem se stříškou) platí, že jestliže  $R$  je četnost recesivních homozygotů, je



$$\hat{q} = \sqrt{R} \quad (3.4)$$

### Četnost heterozygotů

Předchozí příklad s četností výskytu fenylketonurie a selekcí proti osobám postiženým touto poruchou nás přivádí k dalšímu aspektu Hardyho-Weinbergova zákona - jeho důsledku pro četnost heterozygotů pro recesivní alely, které se vyskytují v nízké četnosti. Vzájemný vztah četností genotypů  $AA$ ,  $Aa$  a  $aa$  ukazují grafy na obr. 3.3. Vyplývá z nich, že *heterozygotní genotyp je nejpočetnější, jsou-li četnosti obou alel 0,5*. Jestliže se četnost recesivní alely  $a$  snižuje, klesá četnost obou genotypů s touto alelou, avšak četnost homozygota  $aa$  je mnohem nižší a klesá vyšší rychlostí: zatímco zastoupení heterozygota se blíží nule rychlostí  $pq$ , četnost recesivního homozygota klesá rychlostí  $q^2$ . Četnost nositelů vzácné alely  $a$  v heterozygotním stavu je  $2p/(2p+q)$  a při velmi nízkém  $q$  se rovná téměř 1. *To vede k důležitému závěru, že vzácná alela existuje převážně v heterozygotním stavu.*



**Obr. 3.3** Genotypové četnosti při Hardyho-Weinbergově rovnováze. (a) Četnosti genotypů vyjádřené jako funkce četnosti alely A ( $p$ ). Četnost heterozygotního genotypu  $Aa$  je nejvyšší při  $p=q=0,5$ . S tím, jak se jedna z alel stává vzácnější, četnost homozygotů s touto alelou je mnohem nižší než četnost heterozygotů. (b) De Finettiho diagram. Kolmice z kteréhokoli bodu uvnitř rovnostranného trojúhelníka  $PQR$  představují poměrné zastoupení tří genotypů. Body, které jsou na parabole, představují populace v Hardyho-Weinbergově rovnováze. Vertikální úsečka  $Q$  rozděljuje základnu v poměru  $p:q$ .

### Geny vázané na chromozom X

Jak bylo zmíněno v kapitole 2.1.3, u savců a některých druhů hmyzu jsou samci heterogametičtí, tj. mají dva různé pohlavní chromozomy, X a Y, zatímco samice jsou homogameticke a mají dva chromozomy X. Geny na chromozomu X se označují jako **geny vázané na X**. Významným důsledkem tohoto uspořádání je to, že u samců se fenotypově projevují i recesivní alely genů vázaných na X vzhledem k absenci druhého chromozomu X. Zatímco tedy u samic existují tři genotypové třídy,  $AA$ ,  $Aa$  a  $aa$ , u samců najdeme pouze dvě:  $A$  a  $a$ . Náhodné křížení dvou alel vázaných na X je ukázáno na obr. 3.4. Alely jsou označeny  $X^A$  a  $X^a$ . Jak vyplývá z tabulky, samičí genotypové četnosti jsou v souladu s Hardyho-Weinbergovým zákonem, naproti tomu u samců jsou genotypové četnosti shodné s četnostmi jednotlivých alel.

Nezbytnou podmínkou pro platnost poměrů uvedených na obr. 3.4 je shodnost alelových četností u samců i samic, respektive u spermií a vajíček. Jestliže tato podmínka neplatí, rozdílné četnosti mezi pohlavími se vyrovnají během asi 10 generací náhodného oplození, protože v každé generaci je alelová četnost v zygotě rovna průměru četností u samčího a samičího rodiče.

Z hlediska lékařské genetiky má vazba genů na pohlavní chromozomy závažné důsledky, protože recesivní alely se budou projevovat mnohem častěji u mužů než u žen. Převaha mužů s genetickou vadou je zřejmá z genotypových četností:  $q$  (četnost u mužů) je vždy větší než  $q^2$  (četnost u žen, viz obr. 3.4). Tento

nepoměr se zvětšuje s tím, jak klesá četnost recesivní alely v populaci. Genetické postižení mužského potomka tak může genetik odvodit od matky, která je buď rovněž homozygotní pro recesivní alelu, nebo je heterozygotní a její porucha je známa jen podle fenotypu jejího bratra, otce nebo strýce z matčiny strany.

		Samčí gamety			
		Na chromozomu X		Na Y	
Alela		$X^A$	$X^a$		
Četnost		$p$	$q$		
Samičí gamety	Alela	Četnost	$X^A X^A$	$X^A X^a$	$X^A Y$
	$X^A$	$p$	$p^2$	$pq$	$p$
	$X^a$	$q$	$X^a X^A$	$X^a X^a$	$X^a Y$
			$qp$	$q^2$	$q$

Celkové četnosti v zygotech:

samice	samci
$X^A X^A$ : $p^2$	$X^A Y$ : $p$
$X^A X^a$ : $2pq$	$X^a Y$ : $q$
$X^a X^a$ : $q^2$	

**Obr. 3.4** Důsledky náhodného křížení s geny vázanými na X. Genotypové četnosti u samic jsou v souladu s Hardyho-Weinbergovým zákonem, zatímco u samců se rovnají alelovým četnostem.

### Více než dvě alely

Ačkoli jsme při odvození Hardyho-Weinbergovy rovnováhy kladli podmínku existence pouze dvou alel na genu, lze tuto rovnováhu odvodit i pro více alel. Očekávaný poměr genotypových četností  $p^2 : 2pq : q^2$  je binomickým rozvinutím výrazu  $(p+q)^2$ . Pro tři alely musíme jen přidat četnost třetí alely, řekněme  $r$ , a rozšířit tak tento výraz na rozvinutí polynomické,  $(p+q+r)^2$ , které můžeme napsat ve tvaru

$$p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr$$

Tento vztah si můžeme odvodit rovněž z tabulky křížení na obr. 3.5. Pro tři alely dostáváme celkem šest genotypů. Součtem polí odpovídajících si křížení v tabulce získáme následující genotypové četnosti:

$A_1 A_1$ :	$p^2$
$A_1 A_2$ :	$2pq$
$A_2 A_2$ :	$q^2$
$A_1 A_3$ :	$2pr$
$A_2 A_3$ :	$2qr$
$A_3 A_3$ :	$r^2$

Aplikaci tohoto odvození si můžeme ilustrovat na známém příkladu systému krevních skupin ABO u člověka. Lokus  $ABO$  je pro nás zajímavý nejen tím, že obsahuje tři alely, ale i tím, že mezi těmito alelami existuje dominance. Alely  $I^A$  a  $I^B$  jsou vzájemně kodominantní a současně obě jsou dominantní vůči alele  $I^o$ . Tyto alely kontrolují tvorbu povrchového antigenu erytrocytů. Genotypy  $I^A I^A$  a  $I^A i$  určují krevní

skupinu A, genotypy  $I^B I^B$  a  $I^B i$  určují skupinu B, heterozygotní kodominantní genotyp  $I^A I^B$  se projevuje jako skupina AB a konečně  $ii$  určuje skupinu 0.

		Samčí gamety		
		$A_1$	$A_2$	$A_3$
Alela		$p$	$q$	$r$
Četnost				
Samičí gamety	Alela	$A_1$	$A_2$	$A_3$
	Četnost	$p$	$q$	$r$
	$A_1$	$p^2$	$pq$	$pr$
	$A_2$	$pq$	$q^2$	$qr$
	$A_3$	$rp$	$rq$	$r^2$

**Obr. 3.5** Četnosti genotypů vzniklých náhodným párováním gamet pro tři alely jednoho genu.

Při výzkumu výskytu jednotlivých krevních skupin ve vzorku 6313 jedinců kavkazské rasy v Iowa City byly skupiny A, B, 0 a AB nalezeny u 2625, 570, 2892 a 226 lidí. Odhady alelových četností v tomto případě byly 0,2953 pro alelu  $I^A$ , 0,0625 pro  $I^B$  a 0,6755 pro  $i$ . Z těchto četností byly vypočteny očekávané počty nositelů jednotlivých skupin: 2636,0 (A), 582,9 (B), 2880,6 (0) a 213,5 (AB). Testem dobré shody jsme získali hodnotu  $\chi^2=1,11$  a srovnání s tabulkovou hodnotou (opět pro jeden stupeň volnosti) ukázalo pravděpodobnost 0,30. Nulovou hypotézu shody s Hardyho-Weinbergovou rovnováhou tedy nemůžeme zamítnout.

Uvedený příklad se třemi alelami můžeme samozřejmě rozšířit i na  $A_1, A_2, \dots, A_n$  alel s četnostmi  $p_1, p_2, \dots, p_n$  (kde platí  $p_1+p_2+\dots+p_n=1$ ). Genotypové četnosti v tomto případě budou

$$\begin{array}{ll}
 p_i^2 & \text{pro homozygoty } A_i A_i \\
 2p_i p_j & \text{pro heterozygoty } A_i A_j
 \end{array}$$

### 3.2 METODY STUDIA GENETICKÉ PROMĚNLIVOSTI

Studium přástevníka hluchavkového ve Velké Británii, prováděný E. B. Fordem, nám pomůže ilustrovat použití jedné z metod zkoumání proměnlivosti v přírodních populacích. Zopakujme, že tento druh se ve sledované oblasti vyskytuje ve dvou barevných formách, lišících se rozsahem skvrn na křídlech. Experimentální křížení ukázala, že obě barevné odchylky jsou určovány proměnlivostí jediného genu s pleiotropními účinky. (Jako **pleiotropie** se označuje situace, kdy jeden gen svým účinkem ovlivňuje současně více znaků.) Vzhledem k tomu, že hybridní jedinci se vyznačovali intermediárním fenotypem, bylo možno velmi snadno jednotlivé genotypové třídy v populaci identifikovat.

Podobná proměnlivost ve zbarvení, způsobená alelovými rozdíly na jednom genu nebo několika málo genech, se pochopitelně neomezuje jen na přástevníky, ale byla pozorována u mnoha druhů živočichů a rostlin (např. u husice sněžné, *Chen caerulescens*, nebo lasice kolčavy, *Mustela nivalis*). V mnoha případech byl zjištěn výskyt většího počtu alel, například u sluněčka *Harmonia axyridis* určuje obrovskou fenotypovou

rozmanitost ve zbarvení krovek minimálně 15 alel na jediném lokusu. Proměnlivost podobného typu se ovšem nemusí týkat jen zbarvení. Například u *D. melanogaster* byla zjištěna celá řada mutací, které se projeví změnami v anatomii a které bylo lze snadno identifikovat pouhým okem či pomocí preparační lupy (zbarvení oka, tvar křídel, počet štětín apod.). U téhož druhu se rozdílné genotypy na lokusu *period* projevovaly různou délkou cirkadiálního rytmu.

Vzhledem k tomu, že mnoho těchto mutací je recesivních, je zpravidla nezbytné provádět speciální laboratorní křížení s cílem získat linie jedinců homozygotních pro daný lokus nebo celý chromozom, který tento lokus obsahuje. Sérií křížení je získáno potomstvo, které je z jedné čtvrtiny homozygotní pro danou recesivní alelu. Tímto způsobem lze zjišťovat četnost výskytu nejen morfologických odchylek, ale i znaků, které ovlivňují životaschopnost svých nositelů. Mortalita jedinců v populaci je zjišťována jako odchylka od předpokládaného čtvrtinového zastoupení recesivních homozygotů. Pionýrské práce ve výzkumu volně žijících populací byly vykonány ve 30. letech na octomilce *D. pseudoobscura*. Klíčovou roli v nich sehrál T. Dobzhansky, který spolu s A. H. Sturtevantem a dalšími spolupracovníky navázal na práci S. Četverikova. Výsledky ukázaly, že kolem 10% chromozomů 2. páru je v homozygotním stavu letálních nebo semi-letálních a navíc polovina těch, které nezpůsobují smrt svých nositelů, snižuje nějakým způsobem jejich životaschopnost. Podobné výsledky byly zjištěny i pro chromozomy 3 a 4. Navíc mnoho chromozomů způsobovalo v homozygotním stavu sterilitu.

Tyto závěry byly překvapující. Navíc jestliže se setkají dva letální geny v heterozygotním stavu, jejich dvojnásobně heterozygotní nositelé mají většinou normální životaschopnost i plodnost. Vysoká četnost letálních *chromozomů* je proto způsobena existencí vzácných letálních *alel na mnoha lokusech*. Ukázalo se tak, že *populace v přírodě obsahují obrovské množství skryté proměnlivosti a tato proměnlivost se týká mnoha, nebo většiny lokusů*. To vedlo Dobzhanského a další k názoru, že proměnlivost v přírodních populacích není výjimkou z pravidla, ale naopak je normálním stavem a nemá proto smysl rozdělovat alely na „divoké“ a „mutantní“. Mimoto alela, která má v jedné populaci vysokou četnost, může být vzácná v populaci jiné. Dobzhansky v této souvislosti rád používal Četverikovovu metaforu, přirovnávající organismy k houbě, která absorbuje velké množství chromozomových i genových změn (doslova je „nasávají jako houba“). Odhaduje se například, že každý člověk má 3-5 recesivních letálních alel v heterozygotním stavu.

Dopad výsledků Dobzhanského studií i práce jeho následovníků byl dalekosáhlý. Do té doby většina genetiků zastávala názor (mohli bychom ho označit jako „klasický“ model) H. Mullera, že všechny organismy jsou v podstatě geneticky uniformní a občasné mutace jsou v drtivé většině škodlivé a proto jsou z populace rychle odstraňovány (např. většina anatomických aberací u *D. melanogaster*). Naproti tomu Dobzhanského skupina vycházela z toho, že skrytá genetická proměnlivost existuje v každé populaci a téměř na každém lokusu a každý jedinec je proto geneticky unikátní. Dobzhansky tento názor shrnul do svého „rovnovážného“ modelu (který sám označoval jako „rovnovážnou teorii evoluce“), podle kterého „kterýkoli lokus v populaci obsahuje (zpravidla) celou šíři možných alel“. Tyto alely jsou podle něj v populaci udržovány různými mechanismy, mezi nimiž klíčovou roli hraje vyšší zdatnost heterozygotů (heteróze).

Vyvstávala však otázka, jakým způsobem může být tak rozsáhlá proměnlivost v populacích udržována. Jeden z možných mechanismů – heteróze – byl naznačen právě Dobzhanským, nicméně tento problém zůstal otevřený až do druhé poloviny 60. let a my se s ním znovu setkáme při pojednávání o různých typech přírodního výběru a o neutrální teorii molekulární evoluce.

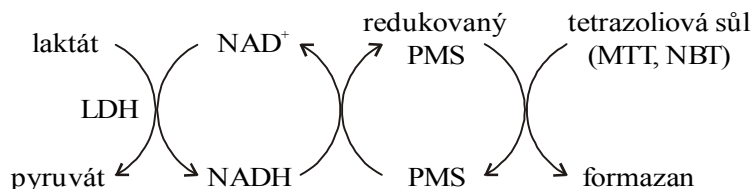
### 3.2.1 Elektroforéza proteinů

Primární struktura proteinů je tvořena řadou aminokyselin spojených kovalentní vazbou (viz. 2.2.1). Tato primární struktura je geneticky určena. Každá z 20 základních aminokyselin je jedinečnou strukturou svých postranních řetězců, velikostí a tvarem. Avšak pouze pět z nich nese na postranním řetězci elektrický náboj, tři kladný (určený skupinou  $\text{NH}_3^+$  v postranním řetězci): arginin, histidin a lyzin, a dvě záporný (určený skupinou  $\text{COOH}^-$ ): kyselina asparagová a glutamová. Poměrné zastoupení těchto aminokyselin určuje celkový náboj proteinu. Elektrických vlastností proteinových makromolekul využívá **elektroforéza**.

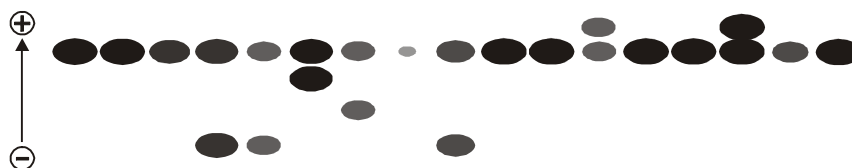
Princip elektroforézy (název pochází z řečtiny a znamená „transport pomocí elektriny“) je znám již od konce 19. století, ale skutečný rozmach využití této metody v genetice byl umožněn až od 2. poloviny 50. let. V té době došlo ke dvěma revolučním změnám, které znamenaly celkové zjednodušení a současně mnohem širší uplatnění elektroforézy. Především původní kapalné médium (tzv. „metoda pohyblivého

rozhraní“) bylo nahrazeno pevným substrátem („zónová elektroforéza“), kterým byl zpočátku papír, později celulózoacetát, agaróza, škrob a polyakrylamid. Posléze, v roce 1957, byly zavedeny histochemické metody barvení *in situ*, které využívají katalytických vlastností enzymů. To umožnilo z nepurifikovaného surového extraktu, obsahujícího tisíce nejrůznějších proteinů, identifikovat několik molekul se stejnými katalytickými vlastnostmi. Srovnání základních parametrů v současnosti nejběžněji používaných typů elektroforetických médií ukazuje tabulka 3.1.

Základní postup elektroforézy je jednoduchý. Vzorek homogenizované tkáně (nebo celého organismu, jako např. v případě octomilky) je aplikován na nosné médium, například škrobový gel. Ke koncům gelu je připojen zdroj elektrického proudu, jehož vlivem se bílkovinné molekuly pohybují buď ke kladnému pólu (anodě), nebo k zápornému pólu (katodě). Pohyb molekul je určen buď pouze jejich celkovým nábojem, nebo, v závislosti na velikosti pórů nosného média, i jejich velikostí a tvarem. Rozdíly ve velikosti jednotlivých molekul téhož proteinu jsou určeny prostorovým uspořádáním bočních řetězců aminokyselin, jejichž vlastnosti (elektrický náboj, přítomnost hydrofilních nebo hydrofobních skupin, přítomnost atomů síry apod.) určují sekundární a terciární strukturu daného proteinu vzájemným odpuzováním nebo naopak přitažlivostí jednotlivých částí molekuly, tvorbou disulfidických můstků atd. Po určité době je zdroj napětí odpojen a gel obarven specifickým barvivem, obsahujícím látku, kterou studovaný enzym využívá jako substrát (obr. 3.6). Pokud proteiny nemají enzymatické vlastnosti (např. albumin, transferrin, hemoglobin), mohou být barveny nespecifickými barvivy (amidočern, Coomassie Blue atd.).



**Obr. 3.6** Příklad histochemického barvení laktátdehydrogenázy. Enzymatická reakce přeměny substrátu (laktátu) na produkt (pyruvát), katalyzovaná tímto enzymem, je díky přítomnosti koenzymu (NAD) spřažena s přenosem elektronu, katalyzovaném fenazinmethosulfátem (PMS), na speciální barvivo, tetrazoliovou sůl. Touto reakcí dochází k přeměně rozpustné, žlutě zbarvené tetrazoliové soli (thiazolylová modř, MTT, nebo nitrotetrazoliová modř, NBT) na modrofialový nerozpustný precipitát, formazan. Směs tetrazolia a PMS je citlivá na světlo, takže inkubace musí probíhat ve tmě.

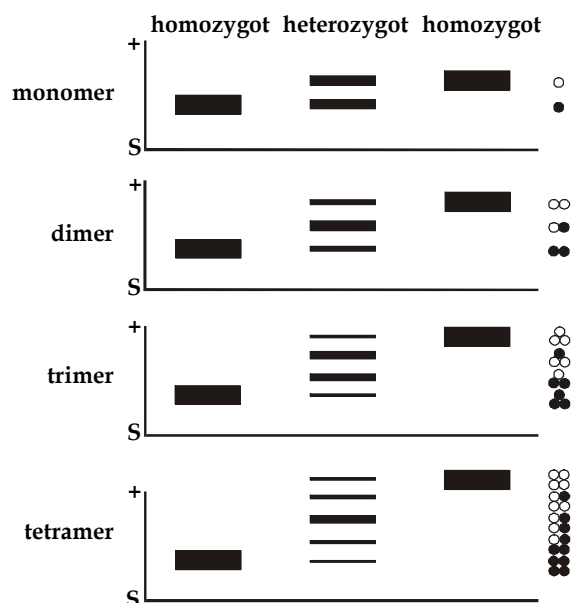


**Obr. 3.7** Příklad zymogramu, ukazujícího genetickou proměnlivost enzymu fosfoglukomutázy (PGM) mezi 18 jedinci *Fundulus zebrinus*. Podle rozdílů v elektroforetické mobilitě můžeme na gelu rozeznat pět elektromorf (alel). Nejpočetněji zastoupená alela (druhá nejrychlejší) je označena 100, ostatní jsou označeny podle své relativní polohy vůči alele 100. Tento enzym je monomerní, tzn. u heterozygotů nalezneme dva pruhy (viz. obr. 3.8). Jednotlivé genotypy jsou tedy zleva doprava: 100, 100, 100, 85/100, 85/100, 95/100, 90/100, 100, 85/100, 100, 100, 100/105, 100, 100, 100/105, 100, 100.

Po obarvení se na gelu objeví řada barevných skvrn, které představují jednotlivé **izozymy** (obr. 3.7). Jako **izozymy** (izoenzymy) se označují všechny funkčně podobné formy daného enzymu včetně všech polymerů složených z podjednotek, kódovaných buď různými lokusy, nebo různými alelami téhož lokusu; **alozymy** tvoří tu část izozymů, které jsou variantami polypeptidů představujících různé alelické varianty jednoho lokusu. Celý gel se nazývá zymogram. Jedinec může být homozygotní pro dva izozymy, ale pokud

obsahuje dva alozymy, musí být nutně heterozygotní (neboť ty představují segregující alely jediného lokusu). Důležitou vlastností enzymů, sledovaných elektroforeticky, je jejich kodominance (viz kap. 2.3.1), která umožňuje identifikaci heterozygotů (obr. 3.7, 3.8). Pro úplnost je nutno dodat, že elektroforéza nemůže identifikovat dvě alely kódující molekuly enzymu s totožným nábojem popř. velikostí, a proto může daná elektroforetická varianta představovat více než jeden alozym. Někdy se proto používá obecnější termín „elektromorfa“.

Přes tato a další omezení (např. proteiny musí být rozpustné ve vodě, což z analýzy vylučuje fibrilární molekuly) i přes bouřlivý rozvoj molekulárně-genetických metod je elektroforéza díky své jednoduchosti a relativní levnosti stále jednou z nejužívanějších technik studia genetické proměnlivosti v populacích.



**Obr. 3.8** Schematické znázornění očekávaného vzorku proužků u heterozygotů v případě monomerní, dimerní, trimerní a tetramerní struktury proteinu.

**Tabulka 3.1** Srovnání některých vlastností čtyř základních metod elektroforézy proteinů (podle Hillise et al. 1996). Poznámky: <sup>a</sup> zkratky pro jednotlivé metody a typy gelu: SGE = škrob, PAGE = polyakrylamid, CAGE = celulózoacetát, AGE = agaróza; <sup>b</sup> relativní výhoda.

Vlastnost	SGE <sup>a</sup>	PAGE	CAGE	AGE
odděluje podle náboje	ano	ano	ano	ano
odděluje podle velikosti	ano	ano	ne	ne
počet řezů z jednoho gelu	až >6 <sup>b</sup>	většinou 1	1	1
toxický	ne <sup>b</sup>	ano	ne <sup>b</sup>	ne <sup>b</sup>
délka elektroforetické migrace	4-24h	4-6h	0,3-3h <sup>b</sup>	3-4h
minimální množství vzorku	2μl	2μl	0,5μl <sup>b</sup>	1μl
maximální možné množství jednoho vzorku na gelu	>50μl <sup>b</sup>	>50μl <sup>b</sup>	5μl	>50μl <sup>b</sup>
nezbytné množství barvicího roztoku	5-50ml	10-50ml	1-3ml <sup>b</sup>	10-50ml
elektroendosmóza	ano	ne <sup>b</sup>	ano	ano
použité napětí (V/cm)	1-10	5-10	<3 <sup>b</sup>	20
nutné chlazení	ano	někdy	ne <sup>b</sup>	ano
snadná manipulace s gely	obvykle <sup>b</sup>	ne	ano <sup>b</sup>	ano <sup>b</sup>
současná separace kationtových i aniontových proteinů	ano <sup>b</sup>	ne	ano <sup>b</sup>	ano <sup>b</sup>

### 3.2.2 Analýza restrikčních fragmentů

K nejrozšířenějším molekulárním metodám patří soubor technik, využívajících zvláštní vlastnosti speciálních enzymů, které se nazývají **restrikční endonukleázy**. Tyto enzymy rozpoznávají specifické sekvence dvouřetězcové DNA, tzv. rozpoznávací sekvence (dlouhé zpravidla 4–6pb), přičemž oba řetězce štěpí buď uvnitř, nebo blízko této sekvence. Rozpoznávací sekvence mohou být buď unikátní (např. u enzymu *EcoRI*), nebo neurčité (např. *HindII*). Místo štěpení DNA se označuje jako **restrikční místo**. U mnoha endonukleáz jsou restrikční místa na komplementárních řetězcích DNA vzájemně posunuta, což umožňuje jejich snadné spojení pomocí ligázy s jinými fragmenty. Příklad některých běžně používaných restrikčních endonukleáz a jejich rozpoznávacích sekvencí je uveden v tabulce 3.2.

Jestliže je celá DNA nebo její část rozštěpena, vzniká několik fragmentů o různé délce. Tyto fragmenty potom lze od sebe oddělit běžnou elektroforézou. Jelikož pentózofosfátová kostra nukleové kyseliny nese vždy stejně velký záporný náboj, jsou fragmenty (migrující vždy k anodě) separovány výhradně podle své délky: kratší fragmenty migrují rychleji a tudíž se na gelu dostanou dále než fragmenty delší. Délka jednotlivých fragmentů je zjišťována jejich porovnáním s hmotnostními standardy, které jsou umístěny na tomtéž gelu. Vzhledem k tomu, že na rozdíl od enzymů nelze k zviditelnění nukleových kyselin využít katalytických vlastností, je nutno fragmenty DNA na gelu detekovat jinými metodami, například autoradiografií (většinou se používají radioaktivní izotopy  $^{32}\text{P}$  a  $^{35}\text{S}$ ), nebo fluorescenčními barvivy (biotin aj.).

Nejčastěji používaným postupem v analýze restrikčních fragmentů je metoda známá jako **Southernova transferová hybridizace (Southern blotting)**; anglický termín „blotting“ lze doslova přeložit jako vysátí inkoustové skvrny savým papírem). Po rozštěpení DNA jedním nebo několika restrikčními enzymy jsou vzniklé fragmenty podrobeny elektroforéze. Potom jsou dvouřetězcové štěpy („double stranded DNA“, dsDNA) denaturovány roztokem NaOH a výsledné jednořetězcové fragmenty („single stranded“ DNA, ssDNA,) jsou pak spolu s roztokem nasávány z gelu silnou vrstvou filtračního papíru či jiného absorpčního materiálu přes nitrocelulóзовou nebo nylonovou membránu, na které se zachytí (vlastní „blotting“). Membrána s fragmenty se potom ponoří do roztoku, jenž obsahuje molekuly značené sondy. Jako sonda je označován segment jednořetězcové DNA o sekvenci, která je komplementární s částí studovaných fragmentů a proto s nimi může přímo na membráně tvořit dvouřetězcové molekuly (hybridizovat). Fragmenty se sondou lze nakonec identifikovat přiložením fotografického filmu na membránu (při radioaktivním značení nebo chemoluminiscenci), nebo barvením (u biotinových sond).

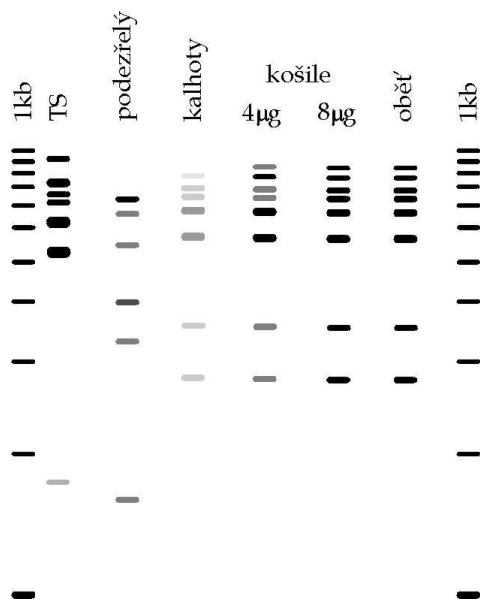
Jestliže je některá z rozpoznávacích sekvencí pozměněna mutací, dojde ke ztrátě jednoho restrikčního místa a v důsledku toho se na gelu objeví jeden dlouhý (pomalý) fragment místo dvou krátkých (rychlých). Podobně může – byť s nižší pravděpodobností – dojít ke vzniku nového restrikčního místa, tedy dvou kratších fragmentů z jednoho dlouhého. Díky tomu je možno tyto genetické změny detekovat a podle charakteristického rozložení proužků na gelu i rozpoznat jednotlivé genotypy. Rozdíly v délce fragmentů, podléhající v populaci mendelovské segregaci, se označují jako **polymorfismus délky restrikčních fragmentů**, zkráceně **RFLP** (restriction fragment length polymorphism).

Využití restrikčních analýz je skutečně široké, od konstrukce restrikčních map přes zjišťování úrovně genetické proměnlivosti v populacích až po studium genetických rozdílů mezi populacemi, druhy či vyššími taxony a rekonstrukci fylogeneze. Jednou z oblastí častého využití je soudnictví a kriminalistika (spory o otcovství, identifikace pachatele apod.). K těmto účelům se používá analýza tzv. hypervariabilních úseků, neboli **minisatelitů**. Minisatelity jsou krátké sekvence DNA o délce 10–60pb (nejčastěji 15–35pb), soustředěné v euchromatinových oblastech obratlovců, hub a rostlin. Jejich sekvence, bohatá na guanin, je značně konzervativní, na rozdíl od lemujících sekvencí DNA, které se mezi různými lokusy liší. Celá jednotka skládající se z minisatelitového jádra a lemujících sekvencí tvoří jednotku dlouhou až 200pb, která je tandemově mnohonásobně opakována. Velká variabilita minisatelitů spočívá v proměnlivém počtu těchto repetitivních jednotek – proto se jim někdy říká **VNTR lokusy** (variable number of tandem repeats). Díky obrovské mutační rychlosti (až  $10^{-2}$ /gametu/generaci) se v populaci vyskytuje velmi vysoký počet alel. Některé sondy dokáží odhalit současně více lokusů – v tom případě se u každého jedince objeví větší počet proužků (u některých sond i více než 50) a můžeme ho tak spolehlivě identifikovat. Výsledku takové analýzy se proto někdy říká **molekulární otisk prstů** (fingerprint) a celá metoda se označuje jako **DNA fingerprinting**. Příklad využití této techniky při odhalení pachatele je ukázán na obr. 3.9.

**Tabulka 3.2** Rozpoznávací sekvence a restrikční místa několika obecně používaných restrikčních endonukleáz. Název endonukleázy je odvozen z názvu organismu, ze kterého byl tento enzym získán, např. *EcoRI* byl izolován z *Escherichia coli*, *HindIII* z *Haemophilus influenzae*, *HaeIII* z *Haemophilus aegyptus* apod.

Enzym	Restrikční místo	Počet restrikčních míst		
		Tabáková cpDNA	Lidská mtDNA	Včelí mtDNA
<i>AluI</i>	5'-AG↓CT-3' 3'-TC↓GA-5'	341	64	19
<i>BamHI</i>	5'-G↓GATCC-3' 3'-CCTAG↓G-5'	40	1	0
<i>BclI</i>	5'-T↓GATCA-3' 3'-ACTAG↓T-5'	54	4	6
<i>ClaI</i>	5'-AT↓CGAT-3' 3'-TAGC↓TA-5'	59	1	4
<i>DraI</i>	5'-TTT↓AAA-3' 3'-AAA↓TTT-5'	64	4	103
<i>EcoRI</i>	5'-G↓AATTC-3' 3'-CTTAA↓G-3'	97	3	5
<i>EcoRV</i>	5'-GAT↓ATC-3' 3'-CTA↓TAG-5'	36	3	1
<i>HaeIII</i>	5'-GG↓CC-3' 3'-CC↓GG-5'	196	50	0
<i>HindIII</i>	5'-A↓AGCTT-3' 3'-TTCGA↓A-5'	33	3	2
<i>HinPI</i>	5'-G↓CGC-3' 3'-CG↓CG-5'	89	17	1
<i>MluI</i>	5'-A↓CGCGT-3' 3'-TGCGC↓A-5'	9	0	0
<i>MspI</i>	3'-GG↓CC-5' 5'-C↓CGG-3'	214	23	1
<i>NcoI</i>	5'-C↓CATGG-3' 3'-GGTAC↓C-5'	?	4	0
<i>PstI</i>	5'-CTGCA↓G-3' 3'-GAC↓GTC-5'	14	2	1
<i>PvuII</i>	5'-CAG↓CTG-3' 3'-GTC↓GAC-5'	12	1	1
<i>RsaI</i>	5'-GT↓AC-3' 3'-CA↓TG-5'	286	35	9
<i>SacI</i>	5'-GAGCT↓C-3' 3'-CTC↓GAG-5'	21	2	0
<i>SacII</i>	5'-CCGC↓GG-3' 3'-GG↓CGCC-5'	7	2	0
<i>TaqI</i>	5'-T↓CGA-3' 3'-AG↓CT-5'	639	29	30
<i>XbaI</i>	5'-T↓CTAGA-3' 3'-AGATC↓T-5'	49	5	3





**Obr. 3.9** Využití DNA fingerprintingu při vyšetřování. Autoradiogram membrány po Southernově hybridizaci s DNA oběti a podezřelé osoby. Byl rovněž odebrán vzorek krve z košile a kalhot podezřelého. Výsledek jednoznačně ukazuje, že krev na oblečení patří oběti a nikoli podezřelému. Ostatní linie jsou použité molekulární hmotnostní standardy. Pravděpodobnost, že krev pochází od jiné osoby než oběti byla vypočtena jako  $1:33 \cdot 10^9$ , tj. mnohokrát více než počet všech lidí na Zemi. Výpočty pravděpodobností jsou však poněkud kontroverzní, protože jsou závislé na statistických předpokladech o proměnlivosti v rámci ras a etnických skupin.

### 3.2.3 Polymerázová řetězová reakce

Jednou z nejdůležitějších molekulárně-genetických metod je bezesporu **polymerázová řetězová reakce, PCR** (polymerase chain reaction). Tato metoda umožňuje syntetické namnožení požadovaného množství DNA teoreticky i z jediné molekuly. Takto nasyntetizovaný materiál má navíc tu výhodu, že obsahuje prakticky výhradně studovanou sekvenci, takže ho zpravidla není nutno dále purifikovat.

Typickou vlastností většiny polymeráz je schopnost rozpoznávat jednořetězcovou DNA (ssDNA) jako templát a současně se vázat na deoxyribonukleotid-trifosfáty (dNTP). Jestliže je na ssDNA navázán krátký oligonukleotid (primer), polymeráza se naváže těsně za tento segment a za využití energie vázané v trifosfátech dNTP katalyzuje syntézu komplementárního nukleotidového řetězce (viz kap. 2.2.5 a obr. 2.11, 2.17). Jestliže dvouřetězcovou DNA (dsDNA) zahřejeme na vysokou teplotu, dojde k její denaturaci, při které oba řetězce disociují za vzniku ssDNA. Při následném snížení teploty dochází k opětovnému spojování řetězců (reasociaci). Pokud je v roztoku ve velkém množství přítomen primer, budou s ním jednotlivé řetězce reasociovat rychleji než s ostatními řetězci. Důvodem je jednak větší snadnost navázání kratší sekvence a jednak vyšší pravděpodobnost spojení vzhledem k nadbytku primerů. Tyto vlastnosti využívá polymerázová řetězová reakce ke kopírování cílové sekvence (templátu) vždy znovu a znovu, v několika po sobě jdoucích cyklech, přičemž v každém cyklu se počet kopií zdvojnásobí. Začneme-li tedy se dvěma templátovými řetězci, po 25 cyklech jich dostaneme  $2^{25} = 33\,554\,432$ .

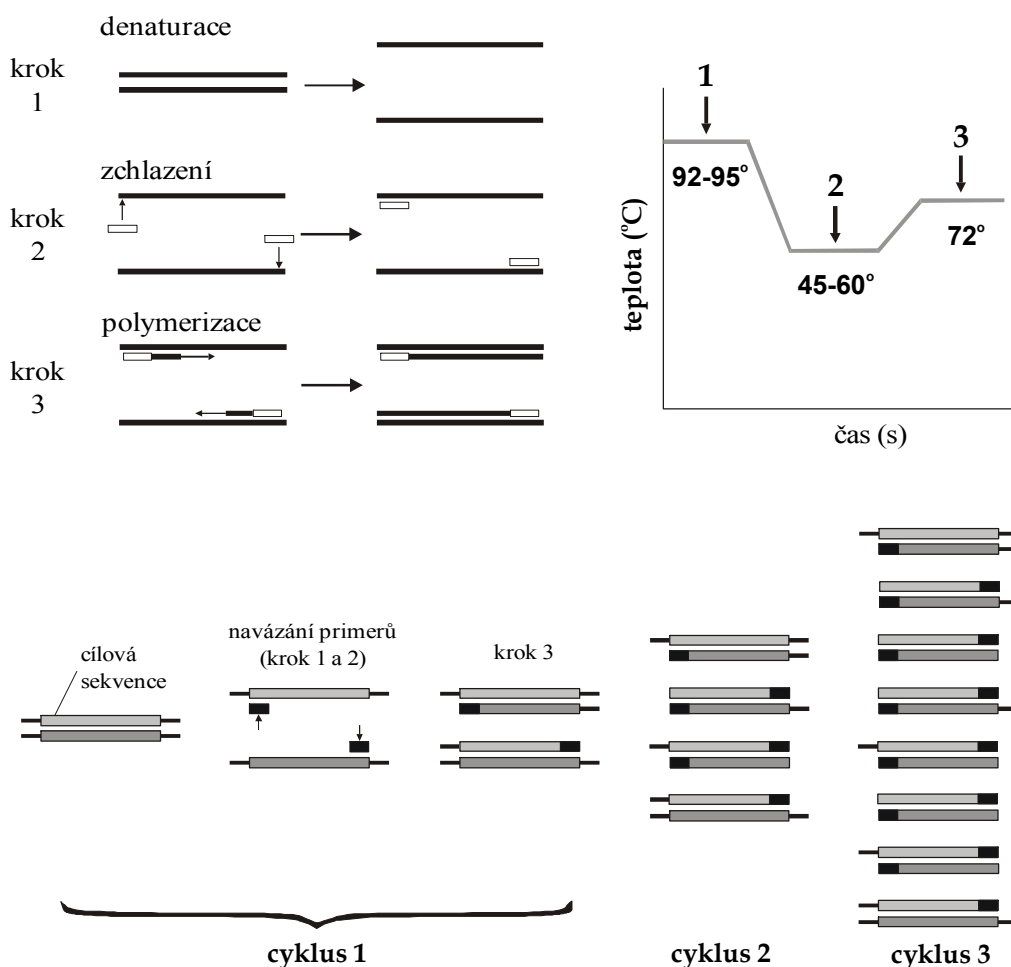
Ačkoli byl princip celého procesu znám již počátkem 70. let, je PCR v dnešní podobě známa teprve od roku 1983 (autor této metody, Kary B. Mullis z kalifornské firmy Cetus Corporation, dostal později za její objev Nobelovu cenu). Extrémní pH i vysoké teploty, při kterých dochází k denaturaci dsDNA, totiž současně inaktivují polymerázu, nutnou pro syntézu nukleotidového řetězce. To dříve vyvolávalo nutnost dodávat v každém cyklu vždy novou polymerázu. Převrat přineslo až použití polymerázy gramnegativní heteroorganotrofní tyčinkové bakterie *Thermus aquaticus*, žijící v horkých pramenech. Tento enzym (známý dnes jako *Taq* polymeráza) je vysoce tepelně stabilní a lze ho tedy použít i při vysokých teplotách.

Roztok pro PCR obsahuje templátovou DNA, jednotlivé dNTP (4 nukleotidy), dva primery, *Taq* polymerázu a kofaktor ve formě iontů hořčíku. Primery jsou voleny tak, že se vážou na komplementární řetězce v určité vzdálenosti od sebe (většinou  $\leq 1000$ pb). PCR zahrnuje několik (zpravidla shodných) cyklů, typicky 20-30. Každý cyklus se skládá ze tří základních kroků (obr. 3.10):

**Denaturace.** Během této fáze se roztok zahřeje na  $94^\circ\text{C}$  na dobu přibližně 30s. Během této doby se dvouřetězcová DNA disociuje na jednotlivé řetězce.

**Zchlazení.** Snížením teploty přibližně na 55°C na 30-60s dojde k reasociaci primerů s ssDNA. Tento krok je z celého procesu nejzásadnější, neboť na správném navázání primerů závisí úspěch celé metody.

**Extenze.** V tomto kroku dochází k vlastní polymerizační reakci. Optimální teplotou pro *Taq* polymerázu je 72°C, někdy se však používá i teplota vyšší, až 75°C. Délka trvání této fáze závisí na délce syntetizovaného fragmentu: 30s při délce menší než 500pb, 60s při délce 500-1500pb a 90s je-li fragment delší než 1500pb. (Teplota a časové rozmezí jednotlivých kroků se může měnit v závislosti na velikosti a charakteru zkoumaného úseku DNA.)



**Obr. 3.10** Princip polymerázové řetězové reakce. Nahoře vpravo reakční podmínky, opakující se v každém cyklu PCR.

### 3.2.4 Analýza mikrosatelitů

Jednou z velkých výhod polymerázové řetězové reakce je možnost selektivního namnožení zcela určitého úseku DNA, který chceme analyzovat. To umožňuje například jednoduchou detekci přítomnosti/absence molekulárních markerů nebo obecněji rozlišení jedinců s odlišnou genetickou výbavou. Princip PCR využívá i metoda náhodného napojování primerů na sekvence DNA (tzv. random priming), označovaná jako **RAPD** (random amplified polymorphic DNA, náhodně amplifikovaná polymorfní DNA). Spolu

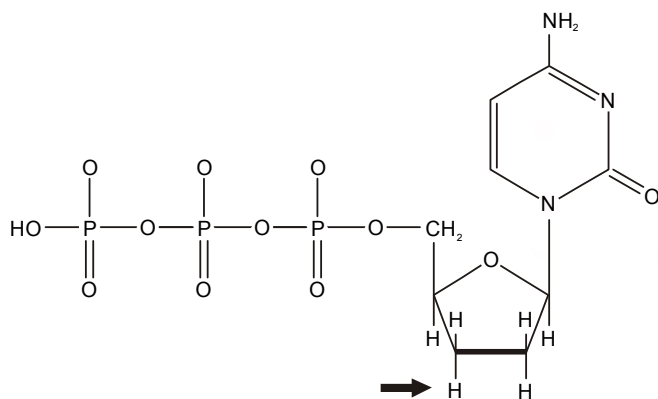
s RFLP se tato technika řadí mezi tzv. vícelokusové metody, neboť zkoumá více segmentů současně. Tím se odlišují od metod jednolokusových (např. elektroforéza enzymů), které charakterizují vždy pouze jeden lokus.

Mezi metody druhého typu patří i analýza **mikrosatelitů**, která se v současnosti těší vzrůstající oblibě. Mikrosatelity jsou velmi krátké, tandemově se opakující sekvence (repetice) o délce 1-6pb (nejčastěji 2-4 pb), roztroušené po celém genomu. Například dvounukleotidová sekvence  $(CA/GT)_n$  v genomu eukaryot existuje v desítkách tisíc kopií, které se vyskytují v repeticích dlouhých 20 až 60pb ( $n = 20-60$ ). Podobně jako minisatelity se i mikrosatelity vyznačují vysokou četností mutací (až  $10^{-3}$ /gametu/generaci), které způsobují proměnlivost jejich délky, a proto se někdy označují jako **krátké tandemové repetice**, **STR** (short tandem repeats) nebo **SSR** (simple sequence repeats). Na rozdíl od minisatelitů však u této metody odpadá štěpení DNA endonukleázami, Southernův transfer i používání značené sondy. Alelovou formu zkoumaného mikrosatelitového lokusu lze zjistit pouhou elektroforézou, kterou teoreticky můžeme rozlišit i rozdíly o velikosti jediného nukleotidu (stejně jako u restričních fragmentů platí, že čím je repetice delší, tím pomaleji v elektrickém poli migruje). Nevýhodou ovšem je, že pro každý mikrosatelitový lokus je nutno nejdříve najít odpovídající lemující oblasti, které by bylo možno využít jako primery.

Mikrosatelity nacházejí široké pole uplatnění, od forezních vyšetření, kde postupně nahrazují DNA fingerprinting, přes odhad migrace a struktury populací po diagnostiku druhů.

### 3.2.5 Sekvencování DNA

Tato metoda umožňuje zjistit přímo sekvenci nukleotidů v řetězci DNA. Dostatečné množství materiálu je zajištěno buď klonováním, nebo pomocí PCR. Z několika sekvenačních metod se v současnosti nejvíce používá Sangerovo sekvencování, založené na kontrolovaném přerušení replikace DNA dideoxynukleotidovými analogy normálních nukleotidů (obr. 3.11). Jako matrice (templát) pro sekvenační reakci slouží fragment ssDNA získaný buď tepelnou denaturací dsDNA, izolací z vektorů s ssDNA, nebo opětovnou polymerázovou řetězovou reakcí s převahou jednoho z primerů. V následujícím kroku se k matici připojí primer, dlouhý většinou 15-25 pb, a celý vzorek se rozdělí na čtyři díly. Ke každému z nich se přidají čtyři deoxynukleotidy (dATP, dCTP, dGTP a dTTP) z nichž alespoň jeden je radioaktivně značený, a DNA polymeráza (někdy označovaná jako *sekvenáza*). Vždy do jedné ze zkumavek je potom přidán jeden dideoxynukleotid (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Činností polymerázy se syntetizuje nový řetězec podle templátu napojováním jednotlivých nukleotidů na volné 3'-OH skupinu primeru, nebo předchozího nukleotidu. Čas od času však dojde k napojení přítomného dideoxynukleotidu, který neobsahuje volnou 3'-OH skupinu, takže syntéza nového řetězce se v tomto místě zastaví. Podle toho, ve kterém místě dojde k zastavení syntézy, vznikají fragmenty DNA o různé délce, které se dále separují elektroforézou v polyakrylamidovém gelu a poté vizualizují expozicí na fotografický film.



**Obr. 3.11** Dideoxycytozin-5'-trifosfát.

V současné době je stále více používáno automatické sekvencování pomocí sekvenátorů. I v tomto případě se nejčastěji využívá Sangerova enzymatická metoda, avšak namísto radioaktivních izotopů jsou

nukleotidy značeny fluorescenčními barvivy, která umožňují barevné odlišení jednotlivých bází. Fragменты jsou detekovány během elektroforetické migrace, při níž procházejí určitým místem, snímaným pomocí stacionárního laseru. „Automatizace“ metody spočívá v tom, že odpadá vizuální „čtení“ gelu a manuální záznam – místo toho je sekvence zaznamenána přímo do paměti počítače, nebo vytištěna na papír.

### 3.3 GENETICKÁ PROMĚNLIVOST V PŘÍRODNÍCH POPULACÍCH

#### 3.3.1 Polymorfismus a polytypie

Jedním z ústředních pojmů genetiky populací je **polymorfismus**. Jako **polymorfní** je označován gen, který obsahuje více než jednu alelu. Jestliže gen existuje pouze v jediné variantě, je **monomorfní**. V praxi se však používá méně striktní kritérium a jako polymorfní se označuje gen, jehož nejpočetnější alela se vyskytuje v četnosti nižší než 0,95 popřípadě 0,99. Díky opakujícím se mutacím se totiž v každé velké populaci vyskytují vzácné alely prakticky pro každý gen. Z hlediska zkoumání genetické proměnlivosti v populacích je však žádoucí zaměřit se pouze na alely, jejichž četnosti jsou příliš vysoké na to, aby je bylo možno vysvětlit opakujícími se mutacemi.

Pro úplnost je třeba dodat, že termín polymorfismus lze použít v podstatě pro jakékoli fenotypové varianty, tedy i ty, které jsou určeny větším počtem (třeba i neznámých) genů. Polymorfismus bývá někdy nesprávně zaměňován s pojmem **polytypie**. Jako polytypické označujeme populace, které jsou pro daný znak monomorfní, ale v každé z nich je fixována odlišná varianta tohoto znaku (např. v populaci 1 se vyskytuje pouze alela A, kdežto v populaci 2 najdeme výhradně alelu B).

#### **Alozymový polymorfismus a heterozygotnost**

Abychom mohli genetickou proměnlivost hodnotit a především srovnávat mezi jednotlivými populacemi, je nutno ji nějakým způsobem kvantifikovat. K tomuto účelu se často využívají čtyři jednoduché indexy, založené na alelových či genotypových četnostech, zjištěných pomocí proteinové elektroforézy. Jsou to:

1. **Průměrný počet alel na lokus, A**, vypočtený jako aritmetický průměr alel na všech zkoumaných lokusech.
2. **Podíl polymorfních lokusů, P** (většinou  $P_{0,05}$  nebo  $P_{0,01}$ ), definovaný jako poměrné zastoupení polymorfních lokusů v celkovém vzorku zkoumaných lokusů včetně monomorfních.
3. **Průměrná skutečná (pozorovaná) heterozygotnost,  $H_o$**  (z anglického „observed“) vyjadřuje, na jakém podílu zkoumaných lokusů je průměrný jedinec v populaci heterozygotní.
4. **Průměrná očekávaná heterozygotnost,  $H_e$**  (angl. „expected“) vychází z předpokladu, že zkoumaná populace se nachází v Hardyho-Weinbergově rovnováze. Počítá se jako aritmetický průměr heterozygotností na jednotlivých lokusech (včetně monomorfních), tyto heterozygotnosti se potom počítají podle vzorce  $1 - \sum p_i^2$ , kde  $p_i$  je četnost  $i$ -té alely a  $p_i^2$  je četnost homozygota  $A_iA_i$ . Někdy se pro tento index používá termín **genová diverzita**.

V roce 1966 byly publikovány dvě klíčové práce, zaměřené na genetickou proměnlivost v přírodních populacích. V první z nich Richard Lewontin a John Hubby prezentovali výsledky analýzy variability na 18 enzymatických lokusech u *Drosophila pseudoobscura* z pěti lokalit na západě Spojených států. Každý z těchto pěti populačních vzorků obsahoval přibližně jednu třetinu polymorfních lokusů, které obsahovaly od dvou do šesti různých alel a tyto alely se navíc vyskytovaly v poměrně vysokých četnostech. Průměrná heterozygotnost se v každé populaci pohybovala okolo 0,12, tj. průměrná octomilka byla heterozygotní na 12% analyzovaných lokusů. Jestliže vezmeme v úvahu umírněný odhad, že *Drosophila* má kolem 6000 genů, pak zhruba 2000 jejích genů je polymorfních a 700 lokusů se vyskytuje v heterozygotním stavu. Autor druhé práce, Harry Harris, který zkoumal lidskou populaci, dospěl k podobným závěrům. Od té doby byly publikovány stovky prací o alozymové proměnlivosti ve volně žijících populacích živočichů i rostlin, včetně tzv. „živých fosilií“.

Práce Harrise a Lewontina a Hubbyho měla pro evoluční biologii obrovský význam. Prokázaly totiž, že přírodní populace jsou geneticky velmi proměnlivé (tab. 3.3 a obr. 3.12) a že *takřka každý pohlavně se*

*rozmnožující jedinec je geneticky unikátní.* Z tabulky 3.3 je ovšem patrné, že mezi jednotlivými skupinami organismů existují poměrně výrazné rozdíly v rozsahu proměnlivosti. Vyšší hodnoty polymorfismu i heterozygotnosti obecně nalézáme u bezobratlých (především u hmyzu), u kterých je přibližně 40% lokusů polymorfních a heterozygotnost se pohybuje kolem 10-15%. Podobné hodnoty byly zjištěny rovněž u rostlin. Naopak obratlovci jsou obecně méně geneticky variabilní ať už jde o podíl polymorfních lokusů (15-20%), nebo průměrnou heterozygotnost (4-8%). Některé molekulární markery, například mikro- a minisatelity jsou však daleko proměnlivější: uvádí se, že úroveň heterozygotnosti dosahuje u mikrosatelitů 45-90% a u minisatelitů dokonce 90-100%.

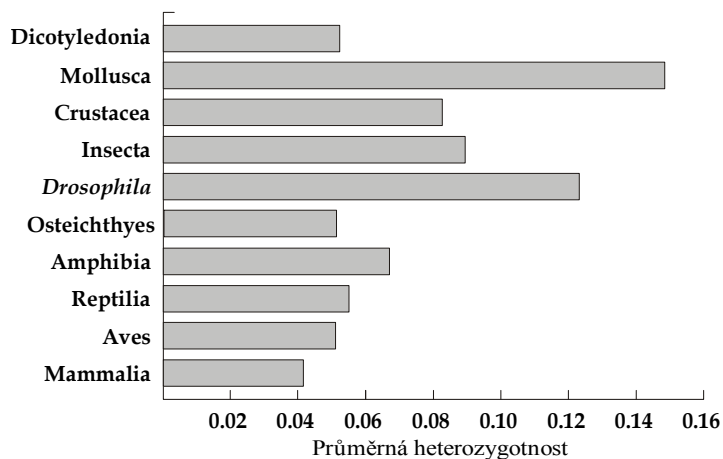
Ačkoli je však výskyt genetického polymorfismu takřka normou, existují významné výjimky. Příkladem může být gepard (*Acinonyx jubatus*), který je geneticky prakticky monomorfní. Analýza 49 proteinových lokusů u 30 jedinců východoafrického poddruhu *A. j. raineyi* ukázala, že pouhé dva geny jsou polymorfní. Podíl polymorfních lokusů byl tedy pouze 0,04 a průměrná heterozygotnost 0,01, tj. jen 4% zkoumaných genů obsahovala více než jednu alelu a jen 1% bylo v heterozygotním stavu. Mezi 98 jedinci nominálního poddruhu *A. j. jubatus* z Jižní Afriky byl dokonce polymorfismus odhadnut na 0,02 a heterozygotnost na 0,0004! Ještě větší překvapení však přineslo zjištění, že gepardi jihoafrické subspecie bez problémů akceptují kožní transplantáty nepřibuzných jedinců. To znamená, že daná populace je monomorfní pro hlavní histokompatibilitní lokus (MHC), který je u ostatních savců vysoce polymorfní. Z toho lze usuzovat, že v minulosti došlo alespoň ke dvěma drastickým redukcím početnosti gepardích populací, které způsobily ztrátu genetické proměnlivosti.

**Tabulka 3.3** Genetický polymorfismus založený na elektroforéze alozymů u některých taxonů živočichů a rostlin.

Taxon	Počet zkoumaných druhů	Podíl lokusů polymorfních	Průměrná heterozygotnost
<b>Bezobratlí</b>			
mořští plži	5	0.175	0.083
suchozemští plži	5	0.437	0.150
ostatní mořští bezobratlí	9	0.587	0.147
haplodiploidní blanokřídlí	6	0.243	0.062
<i>Drosophila</i>	43	0.431	0.140
ostatní hmyz	23	0.329	0.074
bezobratlí celkem	93	0.397	0.112
<b>Obratlovci</b>			
ryby	51	0.152	0.051
obojživelníci	13	0.269	0.079
plazi	17	0.219	0.047
ptáci	7	0.150	0.047
hlodavci	26	0.202	0.054
savci	46	0.147	0.036
obratlovci celkem	135	0.173	0.049
<b>Rostliny celkem</b>	473	0.505	--

Proto pomíneme-li vzácné výjimky, lze konstatovat, že v historickém kontextu byl spor mezi zastánci Mullerova „klasického“ modelu a Dobzhanského „rovnovážného“ modelu rozhodnut ve prospěch T. Dobzhanského. Tyto překvapivé výsledky však nastolily otázku mechanismů, zodpovědných za existenci polymorfismu v populacích. Tento problém se stal jedním z ústředních motivů populační genetiky. S tím

bezprostředně souvisí i následující otázka: „Může přírodní výběr sám o sobě zajistit udržení tohoto polymorfismu, nebo jsou zkoumané znaky selektivně neutrální?“ Tyto problémy zaměstnávaly evoluční genetiky dvě desetiletí a problém neutrality se stal předmětem diskusí, které přetrvávají do dnešních dní (viz kap. 7).



**Obr. 3.12** Průměrná heterozygotnost u některých skupin rostlin a živočichů. Vzhledem k rozsahu shromážděných údajů jsou hodnoty heterozygotnosti v rámci rodu *Drosophila* uvedeny samostatně. Z grafu je patrné, že úroveň genetické proměnlivosti je u bezobratlých 2-3x vyšší než u obratlovců, avšak i u nich je její rozsah velmi významný.

### Reprezentativnost alozymového polymorfismu

Do jaké míry může alozymový polymorfismus reprezentovat celkovou míru genetické proměnlivosti? Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, elektroforetické metody mají svá omezení, především limitovaný rozsah rozlišení a nemožnost detekce řady substitucí aminokyselin. To samozřejmě vede k tomu, že tento polymorfismus je podhodnocený. Současně však bylo zjištěno, že zatímco přesnější metody většinou identifikují další alely polymorfních genů, lokusy, klasifikované klasickou elektroforézou jako monomorfní, zůstávají většinou monomorfní i nadále.

Na druhé straně geny, které jsou rutinně touto metodou zkoumány, se většinou ve tkáních vyskytují ve vysokých koncentracích (tzv. „enzymy skupiny I“) a postrádají vysokou substrátovou specifitu, typickou pro enzymy centrálních metabolických procesů („enzymy skupiny II“). Například u 10 enzymů skupiny I *D. melanogaster* byla hodnota polymorfismu odhadnuta na 0,70 a heterozygotnost na 0,24, zatímco u 11 enzymů skupiny II byly tyto hodnoty 0,27 a 0,04. Z toho důvodu mohou být odhady založené na elektroforéze naopak nadhodnoceny.

Ačkoli je tedy elektroforéza enzymů a neenzymatických bílkovin základní metodou detekce genetické proměnlivosti, extrapolace získaných výsledků na celý genom je obtížná.

### Polymorfismus sekvencí DNA

Vzhledem k limitované rozlišovací schopnosti a dalším omezením tradičních elektroforetických technik začaly být hledány možnosti studia genetické variability na té nejnižší úrovni, tj. na úrovni jednotlivých nukleotidů. K zásadnímu pokroku došlo v 80. letech v souvislosti s technickými inovacemi, které zjednodušily do té doby náročné sekvencování DNA. První práci, zaměřenou na analýzu sekvence DNA, prezentoval v roce 1983 Martin Kreitman. Kreitman zkoumal úsek o 2721bp, obsahující gen pro alkoholdehydrogenázu (ADH), u 11 jedinců *D. melanogaster* ze tří oblastí Starého světa a tří oblastí USA. V té době bylo již známo, že populace tohoto druhu jsou polymorfní pro dvě alely, *Adb<sup>F</sup>* („fast“) a *Adb<sup>S</sup>* („slow“). Kromě genu ADH, který se skládal ze čtyř exonů a tří intronů, obsahoval zkoumaný segment i 3' a 5' lemužící sekvence.

Nejdůležitějším výsledkem Kreitmanových studií bylo zjištění, že 13 z celkového počtu 14 variant kódující oblasti byly synonymní substituce, které nezpůsobovaly záměnu jedné aminokyseliny za druhou. Jediná nesynonymní nukleotidová substituce byla zodpovědná za rozdíly v elektroforetické mobilitě mezi alelami *Adb<sup>F</sup>* a *Adb<sup>S</sup>*. Jinými slovy jediná záměna nukleotidu z celkových 2721 nukleotidů způsobila změnu konečného produktu a tím i odlišnosti v biochemických a fyziologických vlastnostech organismu. Závěry Kreitmanovy práce byly později potvrzeny na základě analýzy RFLP u mnohem většího vzorku 1533 mušek, pocházejících z 25 populací východních oblastí Severní Ameriky, u kterého bylo odhaleno na 113 různých haplotypů (haplotyp je jedinečná kombinace genetických znaků přítomných na chromozomu).

Opět se ukázalo, že přírodní populace obsahují velké množství variant nukleotidových sekvencí, které nemají vliv na sekvenci aminokyselin v proteinu.

Podobně jako v případě alozymového polymorfismu, rovněž proměnlivost na úrovni nukleotidů je nutno nějakým způsobem kvantifikovat. Úroveň **nukleotidového polymorfismu**,  $\theta$ , je definována jako podíl nukleotidových míst, u kterých předpokládáme, že jsou polymorfni v kterémkoli zkoumaném vzorku dané oblasti genomu. Odhad nukleotidového polymorfismu je dán vztahem

$$\hat{\theta} = \frac{S}{a_1}, \quad (3.5)$$

kde  $S$  je podíl nukleotidového polymorfismu pozorovaný ve vzorku a  $a_1$  je definováno vztahem

$$a_1 = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i},$$

kde  $n$  je velikost vzorku.

Druhým ukazatelem proměnlivosti na úrovni DNA je **nukleotidová diverzita**, označovaná  $\pi$ . Ta udává průměrný podíl nukleotidových rozdílů mezi všemi možnými páry sekvencí ve vzorku (je-li  $n$  celkový počet sekvencí, potom existuje  $n(n-1)/2$  párových srovnání).

### **Využití genetického polymorfismu**

Existence genetického polymorfismu, ať už jej zkoumáme na úrovni alozymů, sekvencí aminokyselin či nukleotidů, skýtá celou řadu možných aplikací, z nichž celá řada bude zmíněna v následujících kapitolách. V první řadě lze některé genetické varianty využít přímo jako jisté „vizitky“, umožňující studium organismů v jejich přirozeném prostředí. Zejména v souvislosti se vzrůstajícím spektrem využití PCR nalézají molekulární znaky stále širší využití při rutinním „screeningu“ přírodních populací.

Na vnitrodruhové úrovni lze polymorfismus využít při studiu genetických vztahů mezi jednotlivými lokálními populacemi. Jestliže jednotlivé subpopulace (děmy) sdílejí společné alely díky toku genů mezi nimi, můžeme na základě rozdílů v jejich četnostech odhadnout rozsah tohoto toku a tím i míru strukturovanosti populace. Rozdělení genotypových četností uvnitř subpopulací indikuje zda a v jakém rozsahu v nich dochází k odchylkám od náhodného páření (např. v důsledku příbuzenského křížení).

V předešlé kapitole byly naznačeny některé možnosti využití polymorfismu v medicíně i soudní praxi. Některé molekulární markery mohou být geneticky vázány na geny vyvolávající závažná onemocnění a lze je proto aplikovat v diagnostice a výzkumu směřovanému k možnému léčení těchto genetických poruch. Části genomu, charakteristické vysokou variabilitou, našly velmi široké uplatnění. Díky jejich extrémní proměnlivosti je můžeme použít pro *genetické označení* každého jedince („DNA typing“). Typickou ukázkou jsou tzv. molekulární otisky prstů (DNA fingerprinting), které byly popsány v kapitole 3.1.2. Kromě forenzního využití (identifikace pachatele, určení paternity) tyto markery umožňují zkoumat míru vzájemné příbuznosti v přírodních populacích živočichů a rostlin a současně studovat jejich rozmnožovací systémy. V eko-etologických studiích nám mohou například pomoci určit, zda jedinci, kteří vykazují prvky altruistického chování, jsou vzájemně geneticky příbuzní. Avšak i četnosti genotypů méně polymorfních markerů mohou poskytnout vodítko při hodnocení typů rozmnožování jako například míry samooplození v populacích jednodomých rostlin nebo hermafroditických živočichů.

Významnou oblastí možných aplikací genetického polymorfismu je zkoumání evoluční historie a evolučních mechanismů. V prvním případě hovoříme o *molekulární systematice* nebo *molekulární fylogenetice*, která v posledních 20 letech zaznamenala významný pokrok. V poslední době dochází k rozmachu tzv. *fylogeografie*, která mapuje evoluci populací jednoho či více druhů v kontextu jejich geografické situace, testuje jednotlivé hypotézy o jejich kolonizační historii a vliv geografických bariér či glaciálních refugií.

### **3.3.2 Proměnlivost na více lokusech**

Dosud jsme uvažovali proměnlivost vyskytující se na jednom lokusu. Geny však neexistují izolovaně, ale jsou obklopeny jinými geny. Fyzické spojení dvou a více genů na jednom chromozomu se označuje jako **vazba**. Za vazbu nepovažujeme funkční či jiný vztah mezi geny. Důsledky vazby mezi geny si můžeme přiblížit na následujícím jednoduchém příkladu. Uvažujme dva geny (A a B), každý se dvěma alelami ( $A_1, A_2$  a  $B_1, B_2$ ). Četnosti alel  $A_1$  a  $A_2$  označíme jako  $p_A$  a  $q_A$ , tak, že platí  $p_A + q_A = 1$ . Je-li populace v Hardyho-Weinbergově rovnováze a oplození je náhodné, vyskytují se genotypy  $A_1A_1, A_1A_2$  a  $A_2A_2$  v četnostech  $p_A^2, 2p_Aq_A$  a  $q_A^2$ . Analogicky, četnosti alel  $B_1$  a  $B_2$  označíme  $p_B$  a  $q_B$ , přičemž četnosti tří možných genotypů  $B_1B_1, B_1B_2$  a  $B_2B_2$  jsou opět dány Hardyho-Weinbergovým zákonem, tedy  $p_B^2, 2p_Bq_B$  a  $q_B^2$ .

Jestliže se podle třetího Mendelova zákona alely obou genů volně kombinují, říkáme, že tyto geny jsou ve **vazbové rovnováze** a jednotlivé gamety se tvoří v následujících četnostech:

$$\begin{aligned} A_1B_1: & p_A \times p_B \\ A_1B_2: & p_A \times q_B \\ A_2B_1: & q_A \times p_B \\ A_2B_2: & q_A \times q_B \end{aligned} \tag{3.6}$$

Jestliže však z nějakého důvodu začne být alela  $A_1$  spojena výhradně s alelou  $B_1$  a alela  $A_2$  výhradně s alelou  $B_2$ , budou vznikat pouze genotypy  $A_1B_1A_1B_1, A_1B_1A_2B_2$  a  $A_2B_2A_2B_2$ . Toto spojení mezi alelami dvou různých genů se označuje jako **vazbová nerovnováha**. (Tento termín, podobně jako řada dalších pojmů v evoluční biologii, není příliš šťastný, neboť vytváří dojem, že geny ve vazbové nerovnováze musí být vzájemně fyzicky vázány, tj. vyskytovat se na tomtéž chromozomu. Avšak jak si ukážeme dále, alely se mohou vyskytovat ve vazbové nerovnováze z rozmanitých příčin, aniž by příslušné geny byly ve vazbě, a naopak, dva lokusy mohou být fyzicky vázány a přitom se nacházet ve vazbové rovnováze.)

Jestliže platí výchozí předpoklady pro Hardyho-Weinbergův model (zejména velká velikost populace, absence mutace, migrace a selekce), dříve či později dojde v důsledku rekombinace k ustavení vazbové rovnováhy. Avšak tento proces může být velmi pomalý, na rozdíl od Hardyho-Weinbergovy rovnováhy, které je dosaženo během jediné generace náhodného oplození (v případě nepřekrývajících se generací), nebo během několika málo generací (v případě překrývajících se generací).

Je zřejmé, že rychlost poklesu vazbové nerovnováhy bude záviset na míře rekombinace mezi oběma studovanými geny. Předpokládejme například dvojnásobně heterozygotní genotyp  $A_1B_1A_2B_2$  (v tomto případě říkáme, že popsaný heterozygot se nachází ve vazbové fázi *cis*), který vznikl splynutím gamet  $A_1B_1$  a  $A_2B_2$ . Gamety produkované tímto genotypem budou  $A_1A_1$  (1),  $B_2B_2$  (2),  $A_1B_2$  (3) a  $A_2B_1$  (4). Typy 1 a 2 označujeme jako nerekombinantní gamety, zatímco typy 3 a 4 jsou rekombinantní. Splynutím gamet 3 a 4 vzniká dvojnásobný heterozygot  $A_1B_2A_2B_1$  (říkáme, že je ve vazbové fázi *trans*). Díky mendelovské segregaci jsou četnosti gamet typu 1 a 2 stejné a totéž platí pro gamety typu 3 a 4. Avšak celková četnost 1+2 se nemusí rovnat četnosti 3+4. Poměrné zastoupení rekombinantních alel se nazývá **rekombinační frakce, r**. Na této veličině závisí rychlost, kterou se populace přibližuje vazbové rovnováze (obr. 3.13).

Uvažujme populaci, ve které jsou četnosti jednotlivých gamet následující:

$$\begin{aligned} A_1B_1: & P_{11} = p_A p_B \\ A_1B_2: & P_{12} = p_A q_B \\ A_2B_1: & P_{21} = q_A p_B \\ A_2B_2: & P_{22} = q_A q_B \end{aligned}$$

kde platí  $P_{11} + P_{12} + P_{21} + P_{22} = 1$ .

Pro jednoduchost budeme uvažovat jen gamety typu  $A_1B_1$ . V každé generaci buď dojde mezi oběma geny k rekombinaci (s pravděpodobností rovnající se  $r$ ), nebo k rekombinaci nedojde (s pravděpodobností  $1-r$ ). Četnost gamet  $A_1B_1$  v kterékoli generaci je závislá na jejich četnosti v generaci předcházející podle následujícího vztahu:

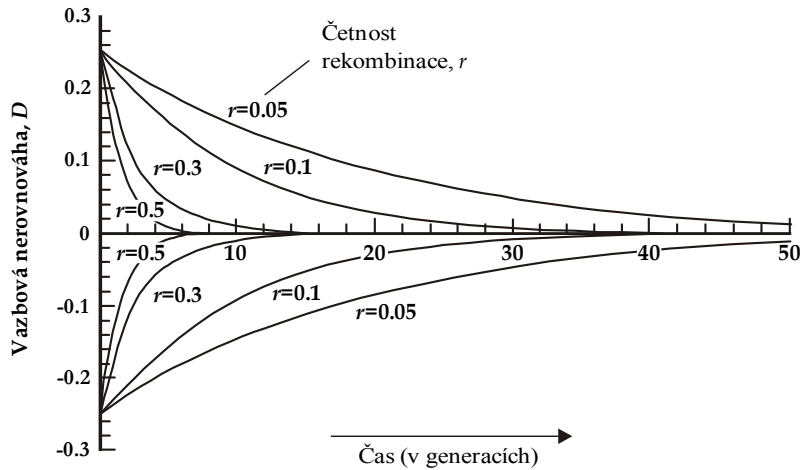
$$P_{11}' = (1-r) P_{11} + r p_A p_B \tag{3.7}$$

a tedy



$$P_{11}' - p_A p_B = (1-r)(P_{11} - p_A p_B) \quad (3.8)$$

kde  $(P_{11} - p_A p_B) = D$ .



**Obr. 3.13** Pokud je oplození náhodné a jestliže neexistují síly, které by vazbovou nerovnováhu obnovovaly, tato nerovnováha se postupně zmenšuje až k nulové hodnotě (tj. ustaví se vazbová rovnováha). Rychlost tohoto procesu závisí na četnosti rekombinací mezi oběma geny ( $r$ ).

Veličina  $D$  se nazývá **koefficient vazbové nerovnováhy**. Po  $t$  generacích bude  $D = D_0(1-r)^t$  až nakonec dosáhne nulové hodnoty (viz obr. 3.13). Totéž co pro gamety  $A_1B_1$  platí i pro ostatní typy gamet a tedy

$$\begin{aligned} P_{11} &= p_A p_B + D \\ P_{12} &= p_A q_B - D \\ P_{21} &= q_A p_B - D \\ P_{22} &= q_A q_B + D \end{aligned}$$

Vazbová nerovnováha je potom vyjádřena vztahem

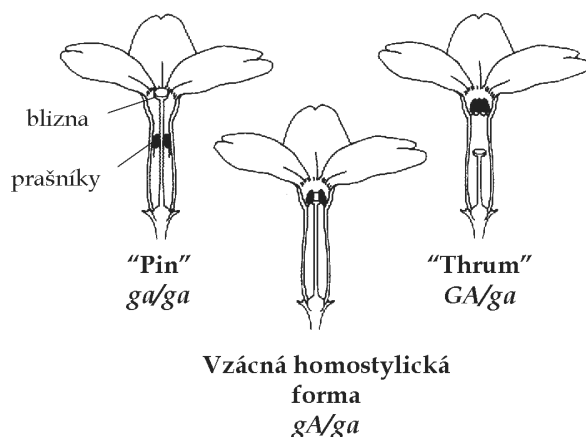
$$D = P_{11}P_{22} - P_{12}P_{21} \quad (3.9)$$

Například jsou-li četnosti alel  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$  a  $B_2$  v populaci  $p_A=0,4$ ,  $q_A=0,6$ ,  $p_B=0,3$  a  $q_B=0,7$ , budou četnosti gamet  $P_{11}=0,12$ ,  $P_{12}=0,28$ ,  $P_{21}=0,18$  a  $P_{22}=0,42$ . V tomto případě je populace ve vazbové rovnováze. Lze si však představit případ, kdy jsme v populačním vzorku našli hodnoty  $P_{11}=0,22$ ,  $P_{12}=0,18$ ,  $P_{21}=0,08$  a  $P_{22}=0,52$ . Jinými slovy, zjistili jsme převahu gamet  $A_1B_1$  a  $A_2B_2$ . Koefficient vazbové rovnováhy by v tomto případě byl roven 0,10. Četnost genotypu  $A_1A_1B_1B_1$  by v případě vazbové rovnováhy byla  $0,12^2=0,0144$ , ale při  $D=0,10$  se tato četnost zvýší na  $0,22^2=0,0484$ . Vazbová nerovnováha proto mění četnosti genotypů i fenotypů.

V pohlavně se rozmnožujících populacích bez příbuzenského křížení se většinou dvojice lokusů nacházejí ve vazbové rovnováze. Existují však výjimky. Známým příkladem je prvosenka jarní (*Primula vulgaris*). U této rostliny existuje tzv. heterostylie, tj. situace, kdy se rostliny téže populace liší délkou tyčinek a pestíku. Téměř všechny rostliny se vyskytují v jedné ze dvou forem: fenotyp označovaný jako „pin“ (špendlík) má krátké tyčinky a dlouhý pestík, zatímco fenotyp „thrum“ (třápec) se vyznačuje krátkým pestíkem a dlouhými tyčinkami. Tento rozdíl se dědí téměř výhradně jako by byl určen jediným párem alel, přičemž alela pro „trásňový“ fenotyp je vůči „špendlíkovému“ dominantní. Vzácně se však u potomstva vyskytuje třetí, „homostylický“ fenotyp se stejně dlouhými tyčinkami i pestíkem. Délka samčích a samičích struktur je tedy určována dvěma úzce vázanými geny: alely  $G$  a  $g$  určují krátký respektive dlouhý pestík,

kdežto alely  $A$  a  $a$  jsou zodpovědné za dlouhé respektive krátké tyčinky. Trásňový fenotyp má genotyp  $GA/ga$  a špendlíková forma má genotyp  $ga/ga$  (obr. 3.14).

Rekombinantní rostliny  $Ga/ga$  (krátký pestík i tyčinky) a  $gA/ga$  (dlouhý pestík i tyčinky) jsou v přírodě velmi vzácné. Je to způsobeno především tím, že heterostylické rostliny jsou úspěšnější při opylení křížem, neboť pyl jedné rostliny se přichytí na opylující hmyz v místě, které odpovídá umístění blizny rostliny druhé. Navíc tento složitý polymorfismus ve skutečnosti zahrnuje sedm úzce vázaných lokusů, které jsou všechny ve vazbové nerovnováze. Jeden z těchto genů je zodpovědný za inkompatibilitu (neslučitelnost) samčích a samičích pohlavních buněk jedné rostliny, která způsobuje snížení počtu vznikajících semen. Vazbová nerovnováha je tedy v tomto případě udržována selekcí. Přírodní výběr je však jen jedním z možných mechanismů, způsobujících odchylky od vazbové rovnováhy.



**Obr. 3.14** Heterostylie u prvosenky (*Primula*). V přírodě se vyskytují takřka výhradně fenotypy „thrum“ a „pin“. Vzácně však vznikají, díky rekombinaci, homostylické formy, u kterých jsou tyčinky i pestík stejně dlouhé.

### Příčiny vazbové nerovnováhy

Vazbová nerovnováha má z hlediska populační genetiky a evoluční biologie velký význam. Souvisí s řadou důležitých oblastí, například s molekulární evolucí (kap. 7), otázkou vzniku pohlavního rozmnožování a pohlavním výběrem (kap. 13) a speciací (kap. 15). Jak bylo zmíněno dříve, vazbová nerovnováha nemusí nutně souviset s fyzickou vazbou genů na jednom chromozomu. Mezi možné příčiny vazbové nerovnováhy patří:

1. Nenáhodnost oplození.
2. Přírodní výběr.
3. Zkoumaný vzorek ve skutečnosti představuje směs dvou různých druhů, které se liší svými alelovými četnostmi na obou lokusech.
4. Jakmile vznikne nová mutace, nutně musí být spojena s určitými alelami, které se právě vyskytují na daném chromozomu, a tudíž je s nimi ve vazbové nerovnováze. Tato nerovnováha bude zachovávána i v dalších generacích, dokud nebude rozrušena rekombinací.
5. Recentní vznik populace splynutím dvou původních populací, lišících se alelovými četnostmi, přičemž vazbová nerovnováha dosud nestačila vymizet.
6. Rekombinace je mizivá nebo k ní vůbec nedochází, například v důsledku chromozomových inverzí (viz kap. 3.3).
7. Vazbová nerovnováha může být způsobena náhodným genetickým posunem (kap. 5): jestliže je míra rekombinace nízká, můžeme si všechny čtyři typy gamet představit jako čtyři alely jednoho genu; pokud se četnost jedné z těchto „alel“ náhodně zvýší, bude to ve skutečnosti znamenat relativní nadbytek této kombinace.

Jedním z možných zajímavých důsledků vazbové nerovnováhy je vliv na evoluční tempo sledovaného znaku. Představme si, že dva lokusy přispívají k proměnlivosti ve velikosti těla. Jestliže jsou přírodním výběrem preferovány větší velikosti a gamety  $A_1B_1$  a  $A_2B_2$  jsou v nadbytku ( $D>0$ ), daný znak se bude vyvíjet rychleji než při vazbové rovnováze. Je to dáno tím, že genotypy  $A_1A_1B_1B_1$  i  $A_2A_2B_2B_2$  budou mít vyšší četnost než při  $D=0$ . Protože se oba genotypy ze všech čtyř možných typů vzájemně nejvíce liší svou reprodukční zdatností, selekce bude eliminovat  $A_2$  a  $B_2$  rychleji než v případě vazbové rovnováhy. Naopak jestliže jsou v nadbytku gamety  $A_1B_2$

a  $A_2B_1$ , je  $D < 0$ . V tomto případě se hodnoty znaku u většiny jedinců v populaci pohybují okolo průměru, extrémní genotypy  $A_1A_1B_1B_1$  a  $A_2A_2B_2B_2$  jsou zastoupeny méně a odpověď na selekční tlak je opožděná. Jestliže je tedy původně  $D < 0$ , ale přírodní výběr podporuje dvojité homozygoty  $A_1A_1B_1B_1$ , změna studovaného znaku bude zpočátku malá a teprve později, když selekce změní četnost gamet natolik, že  $D > 0$ , dojde ke zrychlení evoluce. Tento jev se nazývá **zpoždění odpovědi na selekční tlak** a můžeme se s ním často setkat při experimentech s umělou selekcí.

## SOUHRN

1. Existence genetické proměnlivosti je základní podmínkou evoluce. Genetická proměnlivost může být buď diskrétní (mendelovská), nebo kvantitativní. V mnoha případech můžeme studovat pouze rozdíly ve fenotypu, které jsou ovlivněny kromě genotypu i podmínkami prostředí a maternálními, popřípadě i paternálními vlivy.
2. Základní evoluční jednotkou je podle neodarwinismu populace. V evoluční genetice většinou populaci chápeme jako soubor společně sdílených genů. Populace mohou být například přírodní, zemědělské, experimentální a modelové. Kromě toho rozeznáváme populace globální a lokální (subpopulace, mendelovské populace, démy). Soubor lokálních populací se někdy označuje jako metapopulace. V genetice populací se nejčastěji používají modelové populace, definované souborem podmínek, které umožňují matematické vyjádření vztahu mezi zkoumanými parametry i vystužení nejdůležitějších či určujících parametrů ve studovaném systému.
3. Důležitými veličinami genetiky populací jsou genotypová a alelová (genová) četnost. Genotypová četnost udává poměrné zastoupení jednotlivých genotypů v populaci, alelová četnost vyjadřuje poměrnou početnost alel. Genotypové četnosti mezi zygoty jsou do značné míry ovlivněny způsobem, jakým se v předchozí generaci tvoří sexuální páry. Jestliže je páření a tedy i oplození náhodné, budou v případě dvou alel očekávané četnosti genotypů  $A_1A_1$ ,  $A_1A_2$ ,  $A_2A_2$  rovny  $p^2$ ,  $2pq$  a  $q^2$ , kde  $p$  a  $q$  jsou četnosti alel  $A_1$  a  $A_2$ , přičemž platí, že  $p+q=1$ . Tento vztah mezi genotypovými a genovými četnostmi se nazývá Hardyho-Weinbergův zákon, který říká, že za určených modelových podmínek budou tyto četnosti konstantní a tato rovnováha se u organismů s nepřekrývajícími se generacemi ustaví po jediné generaci náhodného křížení. Jedním z dalších důležitých důsledků Hardyho-Weinbergova zákona je, že vzácné alely se v populaci budou vyskytovat převážně v heterozygotním stavu.
4. Platnost Hardyho-Weinbergova zákona není omezena jen na nejjednodušší případy, lze ho uplatnit i pro více alel a také na geny vázané na pohlaví. Ve druhém případě jsou genotypové četnosti určeny Hardyho-Weinbergovou rovnováhou pouze u homogametického pohlaví, kdežto u pohlaví heterogametického jsou rovny četnostem alelovým. V důsledku toho bude zastoupení samců s recesivní mutací vázanou na pohlaví vždy vyšší ( $q$ ) než zastoupení samic ( $q^2$ ). Čím je tedy recesivní, pohlavně vázaná alela vzácnější, tím větší je převaha samců, postižených touto mutací.
5. Genetickou proměnlivost lze studovat několika způsoby. Substituce aminokyselin v řetězci proteinu mohou způsobit změny ve velikosti a charakteru celkového elektrického náboje makromolekuly i v její konfiguraci, které se potom odrazí v odlišné migraci této molekuly v elektrickém poli. Toho využívá elektroforéza proteinů, která je jednou z nejznámějších a nejčastěji používaných metod zkoumání genetické variability. Vlastnosti restričních enzymů využívá analýza polymorfismu délky restričních fragmentů (RFLP) nebo DNA fingerprinting. K lokalizaci zkoumaného úseku DNA slouží Southernova transferová hybridizace. Masové využití molekulárních metod umožnila polymerázová řetězová reakce (PCR), pomocí níž lze získat prakticky jakékoli množství DNA. PCR je navíc možno využít i při detekci nositelů některých molekulárních markerů (molecular typing) a další metody (RAPD, analýza mikrosatelitů).
6. Kdyby byly populace geneticky uniformní a stávající genotypy by byly nahrazovány občasnými mutacemi, evoluce by byla velmi pomalá. Elektroforéza alozymů však ukázala, že přibližně třetina

lokusů u průměrného jedince v populaci obsahuje více než jednu alelu. Takovéto lokusy označujeme jako polymorfní. Přestože je reprezentativnost alozymového polymorfismu diskutabilní, ukazuje se, že rozsah genetické proměnlivosti v přírodních populacích je značný.

7. Alely na různých lokusech, ovlivňující tentýž znak, nebo různé znaky, se někdy v populaci nacházejí v určitých kombinacích nenáhodně, tj. častěji než předpokládá třetí Mendelův zákon. Tento jev se nazývá vazbová nerovnováha a mezi její příčiny patří nenáhodnost oplození (výběrové páření, příbuzenské křížení), přírodní výběr, hybridizace dvou různých populací, které se liší svými alelovými četnostmi na obou lokusech, recentní mutace, absence rekombinace, genetický drift.

## DOPORUČENÁ LITERATURA

Fisher, R. A. 1930. *The genetical theory of natural selection*. The Clarendon Press, Oxford. [Klasické dílo jednoho ze zakladatelů populační genetiky a syntetické teorie. Obsahuje popis základního teorému přírodního výběru.]

Hartl, D. L., Clark, A. G. 1997. *Principles of population genetics*. 3<sup>rd</sup> ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. [Třetí vydání úspěšné knihy zabývající se základními principy populační, molekulární a kvantitativní genetiky.]

Hillis, D. M., Moritz, C., Mable, B. K. 1996. *Molecular systematics*. 2<sup>nd</sup> ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. [Monografie věnovaná molekulárním metodám využívaným v systematice. Kromě kapitol o elektroforéze proteinů, molekulární cytogenetice, polymerázové řetězové reakci, DNA-DNA hybridizaci, restrikčních analýzách a sekvencování nukleových kyselin obsahuje i kapitoly věnované statistickému zpracování dat v populační genetice a fylogenetice.]

Lewontin, R. C. 1974. *The genetic basis of evolutionary change*. Columbia University Press, New York. [Dnes již klasické dílo obsahující popis genetické proměnlivosti zkoumané různými metodami včetně proteinové elektroforézy, doplněný historickým přehledem a rozsáhlou analýzou příkladů využití populačně-genetické teorie na reálné případy.]

Maynard Smith, J. 1998. *Evolutionary genetics*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo. [Učební text určený studentům se znalostí mendelovské genetiky, elementární algebry a statistiky.]

Relichová, J. 1997. *Genetika populací*. Masarykova univerzita Brno. [Vysokoškolská skripta určená studentům kursu populační genetiky.]