

Doprovodné materiály k přípravnému textu Biologické olympiády „Ochrana přírody z pohledu biologa“

Následující text představuje soubor čtyř nezávislých částí (S4.1 – S4.4), které slouží hlavně k zasazení informací z hlavního textu (tištěné brožurce) do širšího kontextu populační ekologie a genetiky. Tak jako v hlavním textu i zde platí, že podané informace neslouží k naučení se z paměti ale spíše by měly pomoci k získání ucelenější představy o této poměrně komplikované problematice.

S 4.1 Úvod do populační biologie - Struktura a dynamika populací

Struktura populací

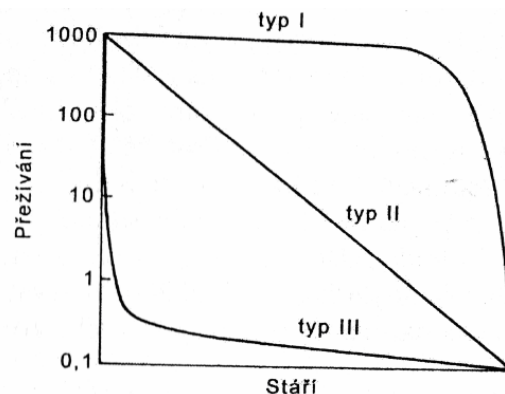
Podívejme se podrobněji, jak můžeme populační strukturu znázorňovat a jakým způsobem pak různě strukturované populace různých druhů souvisí s jejich ekologickými strategiemi. Zastoupení kohort, tedy věkové rozložení v populaci, je možné názorně zobrazit pomocí **věkové pyramidy**. Její tvar je určen podílem jedinců v jednotlivých kohortách, a tudíž vypovídá o stavu studované populace. Je dobré zmínit, že pyramidy založené na věku jedinců jsou užitečným nástrojem v případě živočichů. U rostlin se však konkrétní věk určuje poměrně těžko (snad vyjma jednoletek a stromů s letokruhy) a navíc ani není tak důležitý. Rostliny jsou velmi plastické, a tak například pcháče mohou v nepříznivých podmínkách přežít i několik let jako malé růžice (a kvetou jako tři až čtyřletí), zatímco na vhodnějším místě vykvetou a odplodí již hned napřesrok od vyklíčení (kvetoucí jedinci jsou dvouletí). Jedince v populacích rostlin je tak lepší spíše dělit do kategorií určených jejich velikostí nebo stadiem životního cyklu, ne věkem – s těmito velikostními kategoriemi pak můžeme pracovat podobně jako s věkovými kohortami živočichů (bližší v kap. 4.1 a na obrázku 12 v hlavním textu).

Při porovnávání věkového (nebo velikostního) rozložení v populacích různých druhů bychom brzy zjistili, že v rozložení četností mortality u jednotlivých kohort existuje souvislý přechod ohraničený dvěma extrémy. První z nich představují druhy, které nejčastěji umírají v počátečních stádiích života (křivka mortality typu III, obr. S4.1). Protože mizí obrovský podíl mladých jedinců, musí být počty mláďat dostatečně vysoké, aby se aspoň některým poštěstilo přežít a rozmnožit se. Možná jste si správně uvědomili, že tento typ v mnohém vystihuje tzv. **r-stratégy**, tedy organismy, které investují do velkého množství potomků (u rostlin semen) na úkor jejich kvality (potomci jsou malí či narození v brzkém stádiu vývoje). Sem patří například různí obyvatelé nestabilních biotopů (např. druhy raných sukcesních stádií), také řada hospodářských škůdců, plevelů, a vůbec všechny organismy, které investují relativně málo zdrojů (energie) do jednoho potomka. Druhým krajním typem jsou **K-stratégové**. Ti se v případě živočichů starají s velkou péčí o malý počet mláďat, nebo v případě rostlin vkládají do potomků hodně energie například ve formě dobře zásobených semen, takže jim ze začátku života nehrozí tak velké nebezpečí úmrtí. Tyto organismy proto mají malou úmrtnost v mládí, navíc bývají výrazně dlouhověké, nicméně s postupem času si začíná vybírat svou daň stárnutí (křivka mortality typu I, obr. S4.1).

Opět připomeňme, že téměř žádný druh není čistým zástupcem jedné ze skupin, navíc je hodnocení často relativní a záleží na úhlu pohledu. Příkladem může být kareta obrovská (*Chelonia mydas*), která je tvorem bezesporu dlouhověkým (což je typické pro K-stratégy), nicméně životní strategií je spíše r-stratég, neboť jen malé procento mláďat se díky predátorům dožije dospělosti.

Kohorty se však od sebe nemusí odlišovat pouze mírou mortality, jak bylo ukázáno výše, ale také natalitou. Všechny víceleté organismy postupně dospívají, rozmnožují se po určitý čas a posléze buď zemřou, nebo již nejsou reprodukčně aktivní. Natalita je u nich bývá

úzce spjatá s věkem. U některých druhů se mladí jedinci, kteří dospěli do pohlavní zralosti a jejich velikost se po zbytek života již výrazně nemění, často rozmnožují více a efektivněji než jedinci starší a opotřebovaní (u rostlin opět záleží více na velikosti a vitalitě jedinců než na věku). Naopak u živočichů, kteří rostou i po dosažení pohlavní zralosti (ryby, plazi, korál (je modulární), krabi, apod.), může natalita postupně růst po velkou část života (starší zvíře = většinou větší zvíře, tedy i víc potomků). U druhů teritoriálních či harémových nebo u druhů, kde je péče o potomstvo velice nákladná, je pro vybojování a ohlídání teritoria či harému popřípadě pro zdárnou výchovu mláďat třeba značných zkušeností, které se jedinci postupně učí. Vládci harémů proto bývají starší zkušení samci ve výborné fyzické kondici.



Obr. S4.1 Křivky mortality. Typ I – mortalita je nízká až do konce života (např. lidé). Typ II – pravděpodobnost úmrtí je stejná v každém věku (např. semena v půdě). Typ III – vysoká mortalita v mládí, ale jedinci, kteří přežijí, však již mají mortalitu nízkou. (Uvědomte si, že osa x vždy vyjadřuje stáří relativní vzhledem k celé délce života, tj. křivku typu III mohou mít jak hraboši žijící několik měsíců, tak například mořské želvy, které jsou dlouhověké, ale mají vysokou mortalitu mladých stádií.) Dle Jarošíka (2005).

Vývoj a regulace velikosti populace

Natalita a mortalita bývají v přírodě obvykle závislé na hustotě populace. Prostředí obvykle není schopné uživit geometrickou řadou se zvyšující množství potomků, které by produkovaly jednotlivé populace při svém konstantním růstu bez jakýchkoli omezení (viz rámeček S4.A). Jedinci v populaci totiž „nedbají o blaho“ ostatních jedinců, ale snaží se vyprodukovat maximální počet svých potomků. Díky tomu dochází mezi jedinci v populaci i mezi populacemi různých druhů ve stejném ekosystému ke konkurenci o dostupné zdroje, která působí jako regulace velikosti populace na únosnou míru. Kromě kompetice působí jako regulátor velikosti populací také predace (včetně parazitace).

Každá populace, která osídlí nějaké nové stanoviště (například nově vzniklý ostrov), nejprve roste geometrickou řadou až do doby, než začne být omezována množstvím dostupných zdrojů a vysokou mírou predace (kde je více kořisti, tam se budou logicky stahovat predátoři). Poté se v dané populaci ustanoví rovnováha mezi natalitou a mortalitou, populace zůstane v přibližně konstantní velikosti. V takovém případě říkáme, že populace dosáhla své **nosné kapacity prostředí**, tedy jakéhosi rovnovážného stavu, kdy je v populaci maximální počet jedinců daného druhu, který se v daném typu prostředí užívá (viz rámeček stres).. Pro zájemce o podrobnější informace o této problematice odkazujeme na přípravný materiál Biologické olympiády Ekologie.

Nyní se podíváme na to, jak konkrétně jsou populace regulovány. Hlavním mechanismem ovlivňujícím populační dynamiku jsou obecně zpětné vazby. Pozitivní zpětná vazba podporuje směr růstu populace, kterým se populace právě pohybuje. To znamená, že pokud populační velikost v daném okamžiku klesá, tak ji pozitivní zpětná vazba bude dále snižovat (viz např. Alleho efekt, rámeček 4.Q), a naopak pokud poroste, bude díky pozitivní zpětné vazbě růst ještě rychleji. Jejím důsledkem proto bývá nestabilita, neboť se populace

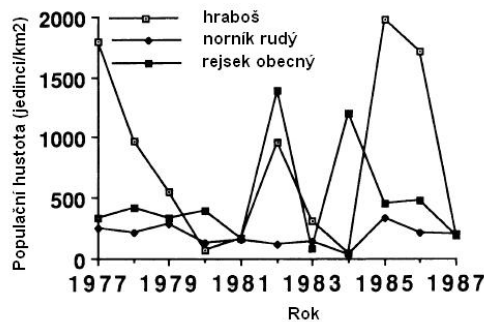
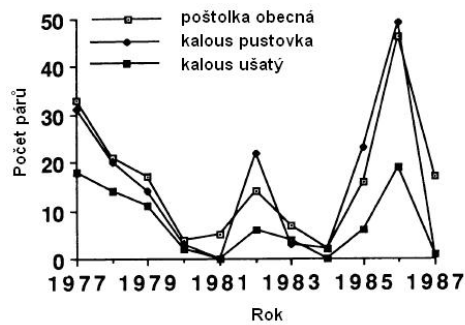
vzdaluje jedním či druhým směrem od svého rovnovážného stavu. Dalším příkladem velmi složité pozitivní zpětné vazby je extinkční vír popisovaný v kapitole 4.4.

V přírodě však naštěstí existuje záchranný mechanismus negativní zpětné vazby, který populační hustotu navrácí do rovnovážného stavu. Pokud se tedy například populace zvětšuje, pak negativní zpětná vazba bude její velikost opět snižovat a naopak. Příkladem negativní zpětné vazby může být namnožení predátora v místě nashromáždění kořisti, což má za následek výrazné snížení její početnosti (ať už jde o dravé ptáky regulující hlodavce, nebo třeba kůrovce regulujícího smrk), viz obr. S4.2. Proces negativní zpětné vazby je v přírodě velmi častý a je pro populační dynamiku klíčový.

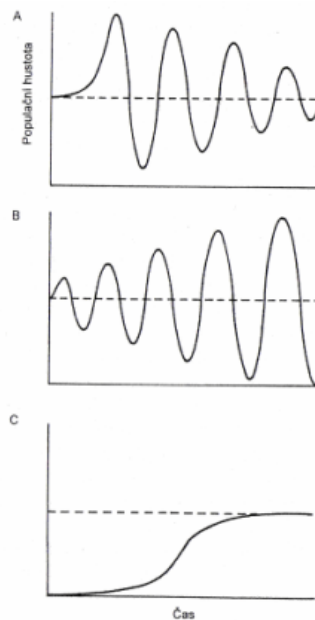
Všechny zpětnovazebné procesy a obzvláště negativní zpětná vazba však působí vždy s určitým časovým zpožděním. Predátorovi nějakou dobu trvá, než se stihne namnožit (což je proces celkem pomalý) či shromáždit (to už jde rychleji) v místě, kde se namnožila populace kořisti. Až pak dojde ke zvýšení predačního tlaku na kořist, její hustota se značně rychle snižovat, ale na úbytek kořisti reaguje predátor opět se zpožděním, jehož velikost znovu závisí na tom, zda predátor pouze odejde jinam, či musí snížit natalitu.

Z důvodů opoždění negativních zpětných vazeb může docházet k výrazným oscilacím velikosti populací a ke vzniku pravidelně se opakujících populačních cyklů (viz obr. S4.2 a S4.3). Extrémním příkladem populačních cyklů mohou být tzv. **gradace**. Gradace představuje obrovské navýšení populačních hustot, které se vyskytne jednou za několik let až desítek let. Takovéto chování známe u různých druhů hlodavců (hraboši, lumíci) nebo u řady druhů hmyzu (saranče stěhovavá), který v letech gradace způsobuje veliké ekonomické škody. Příčiny gradací nejsou zcela známy, ale obecně lze říct, že jsou obvykle důsledkem nějaké veliké změny prostředí či ztráty negativní zpětné vazby.

Míra kolísání (oscilace) velikosti populace predátora a kořisti závisí na délce zpoždění negativní zpětné vazby a rychlosti, se kterou pak zpětná vazba působí. U populace, kde působí zpětná vazba pouze s malým zpožděním a návrat k rovnovážnému stavu je pomalý (predátor rychle přimigruje na místo zvýšené početnosti kořisti, ale nestíhá ji hned sežrat), se budou oscilace postupně zmenšovat a dokonce mohou zmizet úplně. Pokud však negativní zpětná vazba působí s velkým zpožděním, ale její důsledky jsou rychlé (predátor se sice namnoží pomalu, ale díky své vysoké početnosti populaci kořisti rychle sežere), dochází často k výraznému zvyšování oscilací (tedy přestřelování a podstřelování rovnovážného stavu) (viz obr. S4.3). Výška oscilace může v takovém případě vzrůst natolik, že dojde k vymření populace. Působení negativní zpětné vazby (obvykle společně s působením pozitivní zpětné vazby) tedy může v extrémním případě paradoxně mít za následek vyhynutí jednotlivých populací, ačkoli obvykle populační dynamiku stabilizuje.



Obr. S4.2 Působení negativní zpětné vazby - závislost populační hustoty predátorů a jejich kořisti na příkladu dravých ptáků živících se drobnými savci ve Skandinávii. Na zvýšení populační hustoty kořisti reagovali poštoňky a kalousi zvýšenou imigrací (tedy zvýšením populační hustoty), čímž účinně regulovali početnost své kořisti – norníků, hrabošů a rejseků. Snížení populační hustoty drobných savců naopak vedlo k emigraci (a tedy snížení jejich početnosti) dravých ptáků do jiných míst s větším množstvím kořisti. Výsledkem jsou tedy vzájemně provázané populační cykly dravců a kořisti. Korpimaki a Norrdahl (1991).



Obr. S4.3 Působení negativní zpětné vazby (predátora) na vznik oscilací v populační hustotě kořisti. Čárkovaně znázorněn rovnovážný stav. A – tlumící se oscilace vedoucí ke vzniku rovnováhy díky působení negativní zpětné vazby, která reaguje malým časovým zpožděním, ale populační hustotu snižuje pomalu, B – zvyšující se oscilace v důsledku opožděného, ale následně příliš prudkého působení negativní zpětné vazby, C – stabilní populační dynamika znázorňující optimální vztah negativní zpětné vazby a populační hustoty. Dle Jarošíka (2005).

Rámeček S4.A Růst geometrickou řadou

Pro odhady velikostí populace v budoucnu se u živočichů obvykle vychází pouze z počtů samic a dcer, neboť pouze samičí pohlaví je to, které tvoří nové jedince. Představme si libovolnou populaci o 200 jedincích, kde by každá samice měla v průměru 3 potomky. Na počátku tedy máme v populaci 100 samic, z nichž každá má průměrně 1,5 dcery (polovina potomků jsou dcery). Takováto situace vypadá velmi reálně. Jak velká by byla tato populace po pěti generacích? Výpočet je jednoduchý:

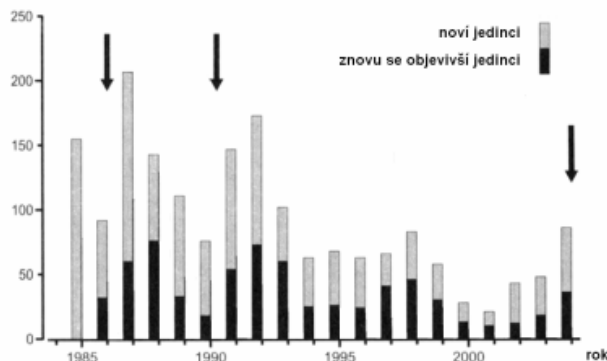
$$((((100 \times 1,5) \times 1,5) \times 1,5) \times 1,5) \times 1,5 = 100 \times 1,5^5 = 759,4 \text{ samic.}$$

Za pouhých pět generací by se tedy takováto populace téměř zosminásobila.

(Podle Jarošíka, 2005)

Rámeček S4.B Výkyvy v početnosti nadzemních rostlin kruštíků

Kruštíky (rod *Epipactis*) jsou částečně parazitické orchideje, které si můžou kromě fotosyntézy v různé míře přilepšovat asimiláty od okolních dřevin, které „vysávají“ z jejich partnerské mykorhizní houby (blíže o tom v přípravném textu Biologické olympiády Mutualsimus). Díky tomu můžou v některých sezónách zůstat skryté v podobě svých podzemních částí vyživovaných paraziticky, což se nám „nadzemcům“ jeví, jako kdyby dotyčné rostliny zahynuly. Podrobné dlouhodobé studie využívající značených rostlin přitom odhalily, že jednotlivé rostliny můžou zůstat pod zemí „skryté“ až 18 let! Míra (ne)objevování se nadzemních rostlin navíc zřejmě dost závisí na vnějších podmínkách (např. po vlhkém podzimu se objeví více rostlin). Každopádně, při nezasvěceném, byť dlouhodobém, pohledu na populace kruštíků (ale i jiných orchidejí jako např. sklenobýl či korállice), se nám může zdát, že jejich populace extrémně kolísají (viz obrázek). Ve skutečnosti však populace mohou být početně velmi stálé a kolísá jen „chuť“ jednotlivých rostlin objevovat se nad zemí, fotosyntetizovat a plodit.



Přibývání a znovu se objevování jedinců v populaci kruštíku široolistého. Černé šipky značí roky s obzvlášť vlhkým podzimmem. (Podle Light a Mc Connail, 2006)

S 4.2 Tabulky přežívání

Tvorby přechodových matic můžeme dále využít také pro odhadování vývoje populace v budoucnu. K tomu jsou používány v případě živočichů tzv. **tabulky přežívání** (Přepřacováno dle Jarošíka, 2005). S jejich pomocí můžeme ze současného složení populace a známých populačních parametrů odhadnout budoucí velikost a složení populace. Tabulky přežívání bývají zpravidla sestavovány pouze pro samičky, pro zjištění celkové velikosti populace proto posléze musíme počet vynásobit dvěma. Tabulka 1 představuje přechodovou matici znázorňující základní populační parametry jedné studované populace kde se vyskytují společně jedinci čtyř věkových skupin, neboli kohort. V populaci tedy máme směs různě starých jedinců, z nichž nejstarším jsou čtyři roky. Věková skupina 0 představuje daný rok nově narozené jedince (tedy 0-1 rok staré). Pravděpodobnosti přechodu z jedné kohorty do druhé jsou zde označeny jako $p(x)$, tato veličina tedy představuje pravděpodobnost, že samička daný úsek života přežije, že se tedy dožije úseku následujícího. Další parametr $l(x)$ znamená věkově specifické přežívání, nebo-li poměr samiček, které přežijí od narození do věku x . Rozdílem obou parametrů je, že je vztaženo vždy jen ke konkrétnímu věku, zatímco $l(x)$ počítá pravděpodobnost přežití vztaženou k celému časovému úseku od počátku života do věku x . Posledním důležitým parametrem je $m(x)$, nebo-li věkově specifická plodnost, tedy průměrný počet potomků, které samička v daném věku zplodí. Všechny tyto veličiny jsme získali díky konstrukci přechodových matic zcela analogicky způsobu, který jsme si popsali na rostlinném příkladu v rámečku 4.E, rozdílem oproti velikostním kategoriím rostlin je, že živočichové nemůžou zůstat ve stejné věkové kohortě, ve které se nacházejí v současnosti, proto mohou být pravděpodobnosti přechodu $p(x)$ všech kohort zapsané v jediném sloupci (u mrkve jsme k tomu potřebovali sloupec 3).

Tab. 1

Věková skupina (x)	$p(x)$	$l(x)$	$m(x)$
0	0,5	1	0
1	1	0,5	0
2	0,5	0,5	2
3	0,5	0,25	3
4	0	0,125	1

První řádek tabulky 1 (věková skupina 0) ukazuje, že z nově narozených jedinců se jich dalšího období dožije pouze 50% ($p(x) = 0,5$). Parametr $l(x)$ je zde nastaven jako 1 automaticky, neboť se v prvním roce života ještě nedá náležitě spočítat, všichni jedinci v tomto období existují. Ve druhém řádku již však vidíme, že se prvního roku (věku 1) života dožije 50% jedinců, což odpovídá výsledku popsaném parametrem $p(x)$. Ze sloupce $m(x)$ je patrné, že se samičky začnou rozmnožovat až ve dvou letech stáří, přičemž nejplodnější jsou ve třech letech. (Pro úplnost je však třeba upozornit, že 3 let se dožije jen 25% ($l(3)=0,25$) samic, proto je průměrný počet potomků za život jedné samice dán součtem součinů věkově specifického přežívání ($l(x)$) a věkově specifické natality ($m(x)$) v jednotlivých letech života.) V tabulce 2 máte ve studované populaci pro tento rok (rok 0) vyplněné konkrétní počty jedinců zjištěných v jednotlivých kohortách ve studované populaci. S použitím veličiny $p(x)$ uvedené v tabulce 1 lze snadno dopočítat, jak si tito jedinci povedou v následujících letech. Dvouletý jedinec má pravděpodobnost přežití do dalšího roku 0,5, takže v roce 1 budeme mít v kohortě tříletých jedinců pravděpodobně 5 jedinců ($0,5 \times 10 = 5$). Podobně lze vypočítat počty pro všechny další kohorty a roky. Všimněte si, že se daná kohorta posunuje v tabulce během let vždy po úhlopříčce zleva dolů doprava.

Tab..2

Věková skupina (x)	Roky						
	0	1	2	3	4	5	6
0							
1	0						
2	10	0					
3	0	5	0				
4	20	0	2,5	0			

Jak ale vyplnit horní část tabulky? Jednoduše tak, že přidáme informaci o natalitě ($m(x)$) z tabulky 1. V tabulce 3 máte oproti tabulce 2 doplněný počet nově narozených jedinců (= věková skupina 0). Ten zjistíte vynásobením parametru $m(x)$ (věkově specifické plodnosti) a počtu jedinců u každé kohorty. Pokud sečtete množství jedinců, které zplodí v daném roce každá kohorta, dostanete výsledek, který se doplní do věkové skupiny 0 v tomto roce. V letošním roce byli přítomni jen dvouletí a čtyřletí jedinci. Dvouletí vyprodukovali 20 nových jedinců (10×2), čtyřletí také 20 nových jedinců (20×1), dohromady se tedy v letošním roce v populaci objeví 40 nových jedinců.

Tab. 3

Věková skupina (x)	Roky						
	0	1	2	3	4	5	6
0	40						
1	0	20					
2	10	0	20				
3	0	5	0	10			
4	20	0	2,5	0	5		

S postupujícím časem budou samozřejmě i tito jedinci stárnout, umírat a plodit své potomky, takže lze pomocí znalosti množství jedinců v každé kohortě a parametrů $p(x)$ a $m(x)$ postupně vyplnit všechna políčka tabulky, jak je ukázáno v tabulce 4.

Tab. 4

Věková skupina (x)	Roky						
	0	1	2	3	4	5	6
0	40	15	42,5	45	58,8	78,8	97,8
1	0	20	7,5	21,2	22,5	29,4	39,4
2	10	0	20	7,5	21,2	22,5	29,4
3	0	5	0	10	3,8	10,6	11,2
4	20	0	2,5	0	5	1,9	5,3

Výpočty množství jedinců v budoucnosti jsou samozřejmě teoretické, proto čísla v tabulce nejsou celá. Navíc byla volena záměrně tak, aby se s nimi snadno počítalo. Ve skutečných populacích se zpravidla pracuje s vyšším počtem jedinců a více věkovými kategoriemi, proto za nás tento výpočet provádí počítač, avšak princip je stále tentýž. Tato metoda se běžně používá pro odhad velikosti a složení populace v budoucnu, což se hodí obzvláště u velmi ohrožených druhů, kde je na základě početních prognóz do budoucna možné naplánovat co nejefektivnější ochranu či např. zavést záchranné programy (viz kap. 4.2).

S 4.3 Metody v populační genetice

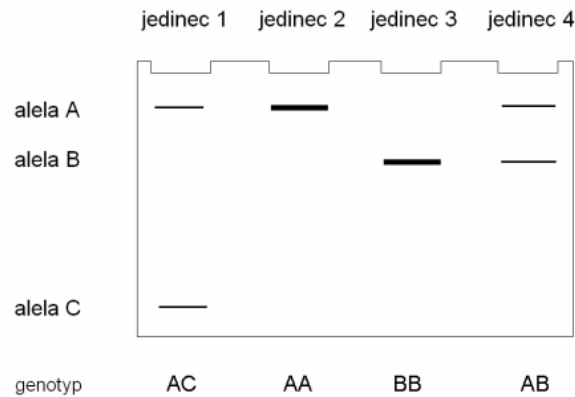
V rámci tohoto textu jsme vybrali tři molekulární metody, kterými se dnes nejčastěji odhaluje genetická diverzita populací – jedná se o analýzu allozymů, mikrosatelitů a o metodu AFLP. Z metod studujících karyologickou diverzitu pak zmíníme průtokovou cytometrii.

V rámečku 4.I jste se dozvěděli, že v populační genetice většinou studujeme selekčně neutrální nekódující DNA. Ze tří genetických metod, které si nyní popíšeme, platí obě vlastnosti (nekódující úsek a selekční neutralita) pro mikrosatelity a do značné míry asi i pro AFLP (byť u této metody to vlastně přesně nevíme). Pokud jde o allozomy, tam studujeme enzymy, tedy proteiny, jejichž variabilita je samozřejmě dána geny. Však jsou taky většinou o něco méně variabilní než zbylé dvě metody. Princip selekční neutrality je ale (víceméně) zachován i zde. Pro tyto studie se totiž používají zejména enzymy základního metabolismu (např. glykolýza, metabolismus aminokyselin, apod.). Ty jsou pod zvlášť silným selekčním tlakem – prostě musí fungovat, bez nich organismus nemůže žít. Z toho plyne, že pokud se nějaké varianty (alely) vůbec vyskytují, nejspíš jsou selekčně neutrální, protože jinak by je selekce z genofondu velmi rychle odstranila.

Allozomy

Allozomy (také isozymy neboli isoenzymy; tyto pojmy sice neznamenají přesně totéž, ale pro naše účely je rozdíl zanedbatelný) jsou různé varianty téhož enzymu (tedy proteinu) mírně se lišící stavbou a tím i některými svými vlastnostmi. Jednotlivé allozomy tedy představují produkty různých alel genu pro daný protein. Důležité je, že vlastnosti allozymů ovlivňují jejich pohyblivost v elektrickém poli, čímž je možné jejich jednotlivé varianty oddělit pomocí tzv. elektroforézy. Patříčně rozpuštěné a přefiltrované vzorky rozdrcených tkání či pletiv obsahující všechny proteiny jsou nanášeny na okraj gelového plátu (gely mohou být vyrobeny z různých látek, to pro nás teď není důležité), který se nachází v elektrickém poli. Působením stejnosměrného proudu se pohybují směrem k jeho opačnému konci. Více pohyblivé molekuly prolezou gelem (který si můžete představit jako síto) dále od startu než molekuly málo pohyblivé. Ty zůstanou blízko startovní čáry. Abychom mohli mezi tisíci proteiny rozdělených na našem gelu identifikovat náš zájmový protein, musíme si ho nějak zvýraznit. K tomu se využívá enzymatické podstaty allozymů. Proteinům rozděleným na gelu se po proběhnutí elektroforézy „předhodí“ vhodný substrát specifický pro studovaný enzym, který ho rozštěpí za vzniku barevného produktu. Ve výsledku pak získáme barevné proužky různě rozmístěné na gelu, z nichž můžeme odečíst genetickou konstelaci studovaných jedinců (viz obrázek S4.4). Takovouto analýzu provedeme pro více různých allozymových lokusů (více různých enzymů). Po „přečtení“ gelů pak spočítáme zastoupení alel jednotlivých lokusů u všech našich jedinců a vypočteme z nich základní populačně genetické charakteristiky. Například v případě zmiňovaném v rámečku se lvi jsme analyzovali 26 různých allozymových lokusů, z nichž 20 mělo pouze jednu alelu, u pěti lokusů jsme našli dvě alely a u jednoho lokusu (ADA) dokonce alely tři.

Allozomy stály u zrodu populační genetiky v 70. letech díky velmi jednoduchému způsobu analýzy i poměrně vysokému množství získaných informací. V současnosti však již stále více převládají informativnější analýzy studující genetickou variabilitu přímo na úrovni DNA. Přesto se však s „allozymovými“ pracemi můžete stále poměrně často setkat i v populačně genetických studiích díky jejich snadnému a poměrně levnému provedení a značné univerzálnosti metody (tytéž enzymy – a tedy tytéž metody detekce – můžeme použít u velmi různých druhů a mnohé dokonce jak u zvířat, tak i u rostlin).



Obř. S4.4 Schematické znázornění gelu s jedním analyzovaným allozymovým lokusem u čtyř jedinců. Náš lokus měl v daném výběru jedinců tři alely (A, B a C), přičemž všichni jedinci se lišili kombinací těchto alel (svými genotypy). Jedinci 1 a 4 jsou heterozygoti (mají dvě různé alely), kdežto jedinci 2 a 3 homozygoti (mají dvakrát tutěž alelu, tedy pouze jeden proužek, který je alespoň teoreticky silnější). Ve skutečnosti může být sestava proužků na gelu složitější, ale na principu to nic nemění.

Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou tandemově se opakující úseky DNA nejčastěji o délce 2-6 párů nukleotidů (základních stavebních kamenů DNA), celková délka sekvence bývá nejčastěji 100-300 párů nukleotidů. Příkladem takového mikrosatelitu může být sekvence:

ATATATATATATAT.....ATATATATATATATAT = (AT)₅₁.

Můžete se také setkat s alternativními názvy - zkratkami STRs (tedy v angličtině Short Tandem Repeats), SSRs (Simple Sequence Repeats), nebo VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats).

Mikrosatelitové oblasti se vyskytují v genomu všech organismů v poměrně velké frekvenci a to především v úsecích genomu, které nekódují žádné geny. Jejich velkou výhodou je vysoká variabilita v rámci studované populace. Díky neustále se opakujícímu se několikabázovému motivu dochází při replikaci k častým chybám (tedy mutacím), obvykle díky sklouznutí DNA polymerázy (enzym zodpovědný za tvorbu DNA), čímž se daný mikrosatelit může prodloužit či zkrátit. Různě dlouhé varianty jednoho mikrosatelitu tak představují jeho jednotlivé alely. Udávaná mutační rychlost mikrosatelitů je 10^{-2} - 10^{-6} na lokus za generaci. Výsledkem je veliký polymorfismus v délce jednotlivých lokusů (tedy v počtu opakování základního motivu). Každý jedinec v populaci tedy vlastní soubor mikrosatelitových lokusů unikátní délky (jednotlivé lokusy mohou být u různých jedinců shodné, ale celý soubor se liší), takže je na základě analýzy několika různých mikrosatelitových lokusů možné jednotlivé jedince v populaci bezpečně odlišit. Mikrosatelity tedy umožňují naprosto jedinečnou a v minulosti nepředstavitelnou možnost nahlédnout do nitra fungování populací i celých druhů.

Mikrosatelity se studují tak, že se vybrané mikrosatelitové lokusy namnoží pomocí PCR reakce (k tomu ale musíme znát i sekvenci DNA v okolí mikrosatelitu, abychom mohli navrhnout primery, což je největší technickou limitací této metody) a vzniklé fragmenty se rozdělí pomocí elektroforézy podle jejich délky (počtu nukleotidů, delší fragmenty jsou méně pohyblivé). Výsledkem je soubor různě dlouhých proužků, které jsou specifické pro každého jedince v populaci a mohou sloužit jako jeho charakteristika.

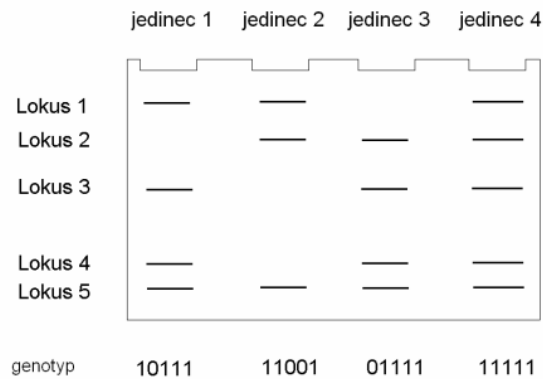
Pro účely ochranné genetiky je využití mikrosatelitů velmi podobné výše popsaným allozymům (stanovení vnitropopulační genetické variability, detekce *inbreedingu*, zjištění míry rozrůzněnosti a izolace populací, stanovení příbuznosti mezi studovanými jedinci, atd.). V lidské populaci se mikrosatelity využívají pro určení otcovství, nebo identifikaci pachatele z DNA anlezené na místě činu. Oproti allozymům však mají několik výhod. Předně jsou více

variabilní (jejich lokusy jsou častěji polymorfní a mívají více alel), jejich analýzou tak můžeme odhalit jemnější rozdíly v genetické struktuře populace. Izolace DNA je dnes již také metodicky jednodušší než izolace enzymů. Allozymy si musí zachovat enzymatickou aktivitu a proto mohou být izolovány pouze z živých tkání a jsou citlivé na teplotu při skladování i vlastní analýze. Naproti tomu DNA lze získat i z vhodně fixovaných mrtvých tkání, což mimo jiné umožňuje přivést materiál z míst, odkud je to do laboratoře daleko (u živočichů se používá fixace čistým lihem, u rostlin rychlé vysušení pomocí silikagelu). V případě mikrosatelitů dokonce můžeme často využít i DNA izolovanou z poměrně poškozených materiálů jako jsou například muzejní exempláře, zbytky per, nebo dokonce výkaly (viz rámeček 4.T). Nevýhodou mikrosatelitů však je, že pro jejich odhalení a práci s nimi musíme alespoň částečně poznat genom studovaného organismu, což je časově i finančně náročné.

AFLP

AFLP je zkratka pro *Amplified Fragment Length Polymorphism* (polymorfismus v délce namnožených fragmentů). Zjednodušeně řečeno funguje tak, že pomocí speciálních enzymů specificky rozstřípeme celkovou genetickou informaci (DNA) našeho organismu a ze vzniklé přehršle fragmentů DNA pak určitými molekulárními postupy (pomocí tzv. PCR reakce) specificky namnožíme pouze malou část těchto fragmentů (pouze tyto namnožené úseky DNA pak budou detekovatelné v další fázi analýzy). Získané fragmenty opět rozdělíme pomocí elektroforézy podle jejich délky a získanou „změť proužků“ vyhodnotíme (dnes se místo elektroforézy na gelu používá přesnější rozdělování fragmentů v sekvenátorech, to však na principu nic nemění). Největší výhodou AFLP je získání obrovského množství informací – v jediném běhu analýzy můžeme zachytit cca 100 různých lokusů (tedy různých proužků), které pokrývají genetickou informaci jedince v celé její šíři (fragmenty pocházejí z různých částí celkové DNA). Srovnajte si to s mikrosatelity nebo allozymy, kdy nám jedna konkrétní analýza poskytne informaci jen o jednom nebo několika málo lokusech. Díky tomu se většina těchto analýz musí spokojit s přibližně 5-20 lokusy. Klíčovou nevýhodou AFLP však je (vedle vysoké ceny a z uvedených metod největší náročnosti na technické provedení a přesné dodržení všech reakční podmínek), že tato metoda neumí na rozdíl od předchozích dvou odlišit dominantní homozygoty od heterozygotů. Při AFLP máme v daném lokusu (fragment určité délky) jen dva stavy, dvě „alely“: přítomnost a nepřítomnost. Nepřítomnost fragmentu můžeme považovat za analogii recesivní alely (tj. projeví se, jen když tam není žádná dominantní). Naopak přítomnost je analogií dominantní alely. Nejsme ale schopni poznat, kolikrát v genomu tato „alela“ je – jestli dvakrát u (diploidního) dominantního homozygota nebo jen jednou (u heterozygota) – v obou případech dotyčný fragment vzniká a my ho detekujeme (viz obr S4.5). Dalším problémem AFLP dat je fakt, že přesně neznáme genetickou podstatu jednotlivých fragmentů, takže si nemůžeme být jistí, že všechny fragmenty jedné délky jsou skutečně stejný úsek DNA (resp. je dosti pravděpodobné, že některé lokusy jsou směs fragmentů různého původu – vzhledem k velkému počtu lokusů a způsobu provedení analýzy je jejich ale menšina a zkrácení výsledků malé).

Protože AFLP neumí odlišit heterozygoty, není to příliš vhodná metoda pro studium genetických procesů uvnitř populací, např. detekci *inbreedingu*). Na druhou stranu poskytuje velké možnosti při studiu rozmístění genetické variability mezi populacemi včetně odhalování jejich vzájemných vztahů a při studiu evolučních historií v rámci druhů (viz např. rámeček chrastavec). Pomocí AFLP například můžeme zjistit, které populace jsou geneticky bohatší než jiné a které hostí nějakou unikátní genetickou variabilitu (mají nějaké unikátní fragmenty, které jinde nenalezneme). Také můžeme pomocí AFLP snadno rozdělit populace do geneticky určených skupin (poukazující například na odlišné migrační historie). Zcela zásadní výhodou AFLP oproti mikrosatelitům je univerzálnost metody, tedy že ji můžeme použít i u organismů o nichž nemáme žádné předchozí genetické informace.



Obr. S4.5 Schematické znázornění AFLP gelu (ačkoliv to v současnosti už analyzujeme jinak, můžeme si výsledky vykreslit do podoby gelu v počítači) s pěti analyzovanými lokusy u čtyř jedinců (ve skutečnosti bývá lokusů mnohem více, desítky až stovky). V tomto případě považujeme každou pozici na gelu za jeden lokus, můžeme tedy odlišit pouze dva stavy: 1 = proužek přítomen, 0 = proužek chybí. Proto není možné odlišit heterozygoty od homozygotů, stále však můžeme sledovat jiné populačně-genetické charakteristiky (například jasně vidíme, že lokus 5 je v našem vzorku monomorfní, tj. má všude pouze „alelu“ 1, zatímco ostatní lokusy jsou polymorfní).

Jak vidíte již z našeho omezeného výčtu, žádná z popsaných metod není univerzálně vhodným řešením. Spíše se musíme v každém konkrétním případě rozhodnout, k jaké metodě sáhnout v závislosti na typu zkoumaného organismu (např. známý modelový organismus nebo neznámý vzácný druh) a na konkrétní pokládané otázce (např. studium vnitropopulační variability a procesů ji ovlivňujících nebo spíše vztahy mezi populacemi).

Průtoková cytometrie

Také k detekci karyologické diverzity dnes využíváme nových a efektivnějších metod. Jedinci jednoho druhu lišící se stupněm ploidie (počtem chromozomových sad) mohou být morfologicky téměř neodlišitelní a k jejich rozpoznání je tedy nutné využít speciálních přístupů. Již dávno se podobné studie dělají pomocí spočítání chromosomů pod mikroskopem. Jenže to je časově náročné, takže není možné analyzovat hodně jedinců. Tento problém překonala v poslední době především průtoková cytometrie (využívá se především u rostlin). Tato metoda je založena na izolaci celých neporušených jader nebo buněk a jejich barvení pomocí speciálních barviv vázajících se přímo na DNA. Přístroj zvaný průtokový cytometr pak změří intenzitu záření vysílaného jednotlivými jádry, přičemž intenzita záření je přímo úměrná obsahu DNA v jádře („čím víc DNA, tím intenzivněji to svítí“). Tato metoda je velmi rychlá: vyizolujeme buněčná jádra (ve speciálním roztoku nasekáme žiletkou část rostlinného pletiva nebo tkáň živočicha) nebo vezmeme přímo vhodnou suspenzi volných buněk (např. krev obratlovců nebo hemolymfu hmyzu), přefiltrujeme, vložíme do drahého přístroje a za několik minut odečteme výsledky. Proto s pomocí průtokové cytometrie můžeme například snadno sledovat výskyt velkého množství jedinců s různým počtem chromozomových sad v nějakém území (např. rámeček 4.K). Protože průtokový cytometr nepočítá chromosomy, ale stanovuje celkový obsah DNA v jádře, můžeme tyto údaje využít i při studiu druhů lišících se pouze obsahem DNA aniž by se lišily počtem chromosomů (tj. mají chromosomy různě velké, přičemž pomocí průtokové cytometrie spolehlivě zjistíme mnohem menší rozdíly, než by byly přímo vidět v mikroskopu). Průtoková cytometrie tak může být velmi vhodná při rozpoznávání hybridizace mezi dvěma druhy s odlišným obsahem DNA (např. při stanovení rizika genetické eroze u endemického rožce kuřičkolistého, viz rámeček 4.U).

Rámeček S4.C Jaké procesy ovlivňují genetickou diverzitu na populační úrovni?

Udělejme si zde nyní stručný přehled jevů a procesů ovlivňující genetickou diverzitu populací. Většinu z nich jsme již zmínili, avšak „rozstrkaně“, na různých místech kapitoly 4 v hlavním textu (když se nám hodily v souvislostech důležitých pro ochranářskou biologii). V ideálních modelových populacích je vliv těchto procesů zanedbáván, protože však žijeme v reálném světě, je dobré s jejich vlivy počítat. Pokud například při genetickém studiu naší populace zjistíme vychýlení z podmínek daných Hardy-Weinbergovou rovnováhou, bude to mít za lubem právě některý z těchto procesů. Je dobré si také uvědomit, že tyto procesy jsou zároveň i příčiny evoluce naší populace (evoluce na nejjednodušší úrovni je vlastně změna frekvence alely v populaci).

- **Mutace** jsou náhodné změny ve struktuře DNA a chromozomů, které vedou ke vzniku nových alel v populaci (dobrých, neutrálních i škodlivých). Jsou tak zdrojem genetické variability. K mutacím však obecně dochází poměrně zřídka (např. díky opravným mechanismům DNA v jádře), proto bývá v řadě populačně genetických studií jejich vliv zanedbáván.
 - **Selekce** (přírodní výběr) je proces, kdy jsou z nadbytku genetické variability do dalších generací preferenčně předávány takové alely, které zajišťují svým nositelům lepší fitness (případně jakýmkoliv jiným způsobem dokáží zajistit předání sebe sama do další generace). Selektace tak vede k adaptivním evolučním změnám (např. lepší přizpůsobení jedinců konkrétním podmínkám daného místa). Selektace tedy zároveň může vést ke ztrátě alel (těch méně vhodných v daném prostředí).
 - **Genetický drift** je proces náhodných změn v zastoupení alel v populaci, který vede k náhodné ztrátě některých alel. Narozdíl od selektace však může vést ke ztrátě jakékoliv alely, tedy i té momentálně výhodné (jde o čistě náhodný proces). Jeho síla roste se zmenšující se velikostí populace.
 - **Migrace** jedinců z jiných populací (v genetické terminologii také zvaná tok genů) může do naší populace přinést do nové alely. Vede tak ke zvýšení vnitropopulační genetické diverzity. Zároveň ale snižuje vzájemnou genetickou rozrůzněnost jednotlivých populací (která byla vytvořena společným účinkem mutací, selektace a driftu).
 - **Způsob rozmnožování** nevede sám o sobě ke vzniku nebo ztrátě nějakých alel, vytváří ale důležitý kontext pro působení ostatních jevů. Blízké příbuzenské křížení (nebo dokonce samoopylování rostlin) známé jako *inbreeding* například vede k nenáhodnému „přeskládání“ alel do jedinců a k nárůstu homozygotnosti. Populace nepohlavně se množících jedinců zase mohou zcela postrádat jakoukoliv vnitřní genetickou diverzitu (např. všechny naše populace zavlečené křídkatky japonské jsou tvořeny jediným samičím klonem). Znalost rozmnožovacího systému je tak zcela zásadní informací při jakémkoliv studiu genetické variability populací.
-
-

S 4.4 Užitečné populačně genetické výpočty a koeficienty

Výpočet frekvence alel a genotypů

V reálných systémech většinou nejdříve známe skutečné frekvence genotypů v populaci a teprve z nich dopočítáváme frekvence alel a ověříme, zda se populace nachází v Hardy-Weinbergerově rovnováze. Gen produkující protein vaječného bílku kajky mořské (*Somateria mollissima*, vrubozobí) má pouze dvě alely: F a S. Pomocí allozymové analýzy můžeme snadno zjistit, kteří jedinci ve studované populaci (67 jedinců) mají pouze alelu F (celkem 37 jedinců), kteří pouze alelu S (6 jedinců) a kteří jsou heterozygotní, tedy s konstelací FS (24 jedinců). Frekvenci jednotlivých genotypů zjistíme snadno – je to podíl z celkového počtu jedinců (tedy například frekvence jedinců FF je $37 / 67 = 0,552$, tj. 55,2%).

	Genotypy			Celkem
	FF	FS	SS	
Počty jedinců	37	24	6	67
Frekvence genotypů	0,552	0,358	0,09	1

Také frekvence alel vypočteme jednoduše přímo z počtu genotypů: frekvence alely F (označme ji p) bude $p = (2 \times \text{FF} + \text{FS}) / (2 \times \text{celkový počet jedinců}) = (2 \times 37 + 24) / (2 \times 67) = 0,73$. V každém homozygotovi FF jsou dvě alely F, proto to násobení dvojkou.. Naopak v heterozygotovi je jen jedna alela F. Celkový počet alel v kompletním souboru jedinců je dvojnásobkem počtu jedinců (každý jedinec má dvě alely). Frekvenci alely S (označme ji q) spočteme analogickým způsobem, nebo ji můžeme jednoduše dopočíst jako rozdíl od celkového součtu, který je vždy 1; tedy: $q = 1 - p = 0,27$

Nyní, když známe skutečné frekvence alel v populaci, už můžeme dopočíst ideální frekvence genotypů za předpokladu Hardy-Weinbergovy rovnováhy - dosadíme frekvenci alel do vztahu $p^2 + 2pq + q^2 = 1$): frekvence FF = $p^2 = (0,73)^2 = 0,533$; frekvence SS = $q^2 = (0,27)^2 = 0,073$; frekvence FS = $2pq = 2 \times (0,53 \times 0,27) = 0,394$. Součet všech tří genotypových frekvencí samozřejmě opět činí 1. V tomto okamžiku můžeme vypočítat očekávaný počet jedinců každého genotypu za H-W rovnováhy (spočtený jako dotyčná frekvence \times celkový počet studovaných jedinců) a statisticky otestovat, zda se pozorované počty genotypů kajky liší od pozorovaných hodnot z tabulky (z matematických důvodů je nutné používat konkrétní počty jedinců, ne frekvence). Pokud se oba počty statisticky významně liší, znamená to, že populace není v Hardy-Weinbergově rovnováze a byla pravděpodobně ovlivněna některým z populačně genetických procesů (například zvýšená míra mutací, selekce, příbuzenského křížení). Popis statistického testování už přesahuje rámec tohoto textu, pro pořádek pouze zmiňme, že počty z našeho příkladu nebyly statisticky významně odlišné od hodnot očekávaných, nemůžeme tedy prokázat vliv žádného ze zmiňovaných procesů.

Koeficient inbreedingu

Míru *inbreedingu* v konkrétní populaci lze obecně vyjádřit pomocí koeficientu inbreedingu (F). Ten můžeme chápat jako číslo odrážející to, o kolik je v naší populaci méně heterozygotů, než bychom teoreticky očekávali v panmiktické populaci za platnosti Hardy-Weinbergovy rovnováhy (vzorečkem řečeno: $F = 1 - (\text{skutečný podíl heterozygotů} / \text{očekávaný podíl heterozygotů})$). Teoretický podíl heterozygotů spočteme z údajů o frekvenci alel sledovaného lokusu v naší populaci, které můžeme stanovit s použitím vhodné molekulární metody (viz metody zmíněné výše, v části S 4.3). Nikdy však nestudujeme pouze jeden lokus. Pro dostatečně přesný odhad F je potřeba větší množství lokusů i analyzovaných jedinců.

Podívejme se na konkrétní příklad. V hypotetické populaci jsme studovali *inbreeding* na dvou lokusech u sta jedinců. Pozorované frekvence genotypů a z nich spočtených frekvencí alel shrnuje následující tabulka:

	Genotypy			Alely	
	AA	Aa	aa	A	a
lokus 1	AA	Aa	aa	A	a
pozorované počty	60	50	25		
frekvence	0,25	0,5	0,25	p = 0,5	q = 0,5
lokus 2	BB	Bb	bb	B	b
pozorované počty	50	20	30		
frekvence	0,5	0,2	0,3	p = 0,6	q = 0,4

Očekávanou heterozygotitu spočteme jednoduše podle pravidla předpokládajícího Hardy-Weinbergovu rovnováhu, kdy je frekvence heterozygotů $2pq$. Očekávaná heterozygotita lokusu 1 je tedy $2 \times (0,5 \times 0,5) = 0,5$; očekávaná heterozygotita lokusu 2 je $2 \times (0,6 \times 0,4) = 0,48$. Průměrná očekávaná heterozygotita je tedy 0,49. Nyní již stačí jen porovnat očekávanou heterozygotitu s průměrnou pozorovanou heterozygotitou (ta je $(0,2+0,5)/2 = 0,35$) podle vztahu $F = 1 - (\text{skutečná heterozygotita} / \text{očekávaná heterozygotita})$: $F = 1 - (0,35/0,49) = 0,29$. Koeficient *inbreedingu* naší populace je $F = 0,29$.

V praxi samozřejmě pracujeme s větším počtem lokusů a tyto lokusy také mívají větší počet alel (ne jen dvě jako v našem případě). Konkrétní výpočty by byly „v ruce“ už poměrně složité, proto je za nás počítá celá řada specializovaných programů.

Pozn. Extrémní případ inbreedingu nalézáme u populací hermafroditních organismů (řady rostlin nebo parazitů), které se množí samooplozením. Představme si populaci skládající se z výhradně se samooplozujících jedinců. Homozygotní jedinci z takové populace budou produkovat výhradně homozygoty (mají jenom jednu alelu, kterou mohou předat do gamet). Pokud je jedinec heterozygotní, bude produkovat 50% heterozygotů a 50% homozygotů (25% homozygotů jednoho typu, např. AA a 25% druhého typu, např. aa). V další generaci i z těchto homozygotních potomků vzniknou již jen další homozygoti, zatímco heterozygotní potomci vyprodukují zase polovinu homozygotů a polovinu heterozygotů. V takové populaci se tedy v každé generaci sníží podíl heterozygotů na polovinu!

Fixační index F_{ST}

Také izolovanost jednotlivých populací jde poměrně dobře měřit s použitím molekulárně genetických metod. V praxi se nejčastěji vyjadřuje pomocí tzv. fixačního indexu (F_{ST}), který porovnává frekvence alel nebo heterozygotů v jednotlivých dílčích populacích vůči průměrně hodnotě pro celou „superpopulaci“ druhu (nabývá hodnot 0 – 1). Pokud by nebyla žádná diferenciace mezi populacemi, budou hodnoty u všech dílčích populací stejné a logicky rovné celkové průměrné hodnotě. V takových případech by se hodnota F_{ST} blížila 0. V původní verzi fixační index měřil diferenciaci populací pomocí poklesu podílu heterozygotů způsobeného „rozdělením“ celé „superpopulace“ na malé dílčí populace, které jsou pak kvůli menšímu počtu jedinců postižené vyšší mírou genetického driftu (a tedy fixací různých alel a ztrátou jiných, což snižuje heterozygotnost). Novější vzorce si spíše než počtu heterozygotů všimají rozdílného zastoupení jednotlivých alel v jednotlivých subpopulacích. Dále je nutné zmínit, že i samotný pojem „fixační index“ se používá v různém smyslu – kromě zde uvedeného v současnosti nejčastějšího významu může obecně označovat určité populačně genetické statistiky, včetně dříve probíraného koeficientu *inbreedingu*). Pokud zjistíme, že jsou populace hodně rozrůzněné, je to velmi pravděpodobně důsledek omezeného genového toku (migrace) mezi nimi – každá populace je vystavena jiné intenzitě a jinému směru působení selekce, mutací a genetického driftu, čímž se jednotlivé populace postupně začínají od sebe odlišovat, pokud je migrace zároveň „neprůměruje“.