

Konzervační genetika

GENETICKÁ DIVERZITA



OPVK (CZ.1.07/2.2.00/28.0032)

Petr Smýkal, Dana Šafářová

Katedra botaniky, katedra buněčné biologie a genetiky

Univerzita Palackého, Olomouc

Proměnlivost (variabilita) daná:

Genotypem



Prostředím



Vývojevě

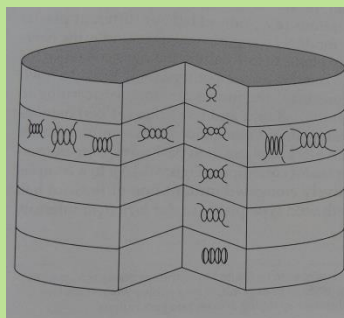
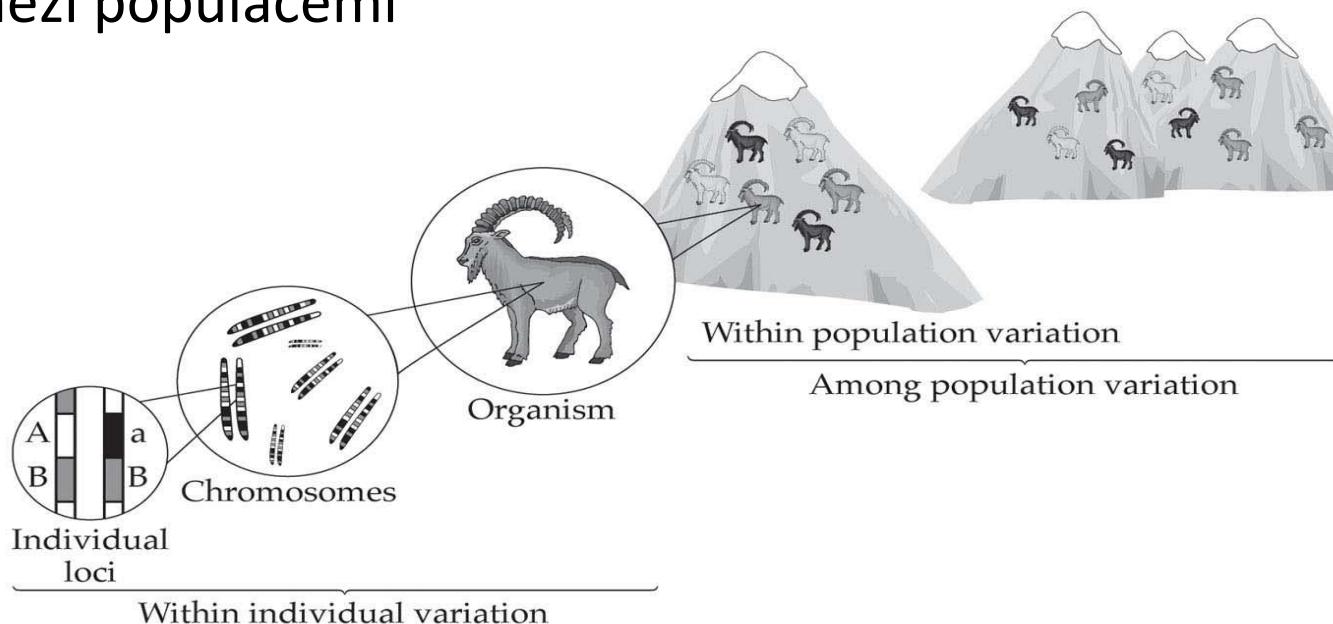


Figure 3.2 Extensive variability is possible in a single genotype of the green alga *Scenedesmus* during the course of a season (column) and within a given time period (row). (From Trainor, 1996.)



Genetická diverzita

- 1. v rámci jedince
- 2. mezi jedinci v rámci populace
- 3. mezi populacemi



PRINCIPLES OF CONSERVATION BIOLOGY, Third Edition, Figure 11.1 © 2005 Sinauer Associates, Inc.

Genetická diverzita jedince

- Každý jedinec je geneticky unikátní (s výjimkou klonů)
- Konzervační úsilí není většinou zaměřeno na jedince, ale genetická variabilita je zjišťována na jedincích

Pojmy (review)

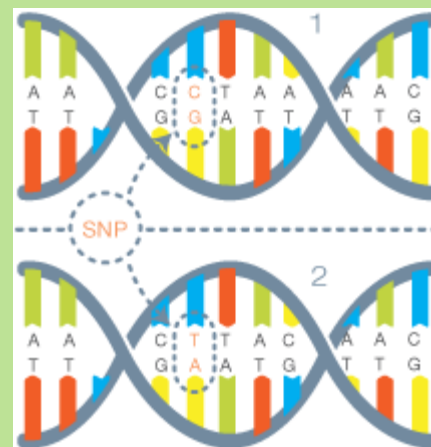
- Gen (neutralní geny, adaptivní geny)
- Alela
- Homozygot vs. heterozygot
- Heterozygozita
- Monomorfní vs. polymorfní

Popis genetické diverzity jedince

Fenotypový: barva, velikost, morfologické znaky, chování



Genotypový: DNA sekvence
geny / alely, proteiny





MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Metody detekce a analýzy variability

1. Morfometrie

2. Biochemické markery

3. Mikrosatelitní markery

4. Retrotransposonové markery

5. Genově specifické markery

6. Markery pro fylogenetické analýzy

Měření genetické variability

Mitochondriální a plastidová DNA

- haploidní markery
- uniparentální (liniovost) dědičnost
- nerekombinující markery
- využití pro fylogenetické studie
- mtDNA variabilní a využívaná u živočichů, cpDNA u rostlin

Jednolokusové jaderně kódovaná DNA

- mikrosatelity a repetitivní sekvence
- geny
- geny vázané na pohlavní chromosomy

Měření genetické variability

Heterozygotita (H_e) (= genová diverzita)

Zjištěná (H_o) x očekávaná (H_e)

Malá (nižší) heterozygotita = malá diverzita (inbreeding)

Vyšší heterozygotita než očekávaná = an isolate-breaking effect (the mixing of two previously isolated populations)

$$1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

Alelová diverzita - Allelic richness

A = Počet alel všech lokusů / počet všech lokusů

Celkový počet alel daného lokusu je citlivý na velikost vzorku (malé populace), důležitý ukazatel dlouhodobého evolučního potenciálu populace – proto byla zavedena veličina „**allelic richness**“

Efektivní počet alel – počet alel, který by vyústil v pozorovanou heterozygotitu

Podíl polymorfních lokusů – závislý na velikosti vzorku, větší = větší pravděpodobnost detekce vzácné alely

Genetická diverzita mezi jedinci

TABLE 11.2 *Gene Frequencies at Five Polymorphic Loci in the Club Moss Lycopodium lucidulum*

Locus	Allele	Woodridge, CT	Litchfield, CT	Binghamton, NY	New Lebanon, NY
PGM	<i>a</i>	0.00	0.00	0.50	0.00
	<i>b</i>	0.86	1.00	0.50	1.00
	<i>c</i>	0.14	0.00	0.00	0.00
PGI-2	<i>a</i>	0.68	1.00	1.00	0.75
	<i>b</i>	0.32	0.00	0.00	0.25
G6PD-1	<i>a</i>	0.93	1.00	0.82	0.91
	<i>b</i>	0.07	0.00	0.18	0.09
G6PD-2	<i>a</i>	1.00	1.00	0.50	1.00
	<i>b</i>	0.00	0.00	0.50	0.00
LGGP-1	<i>a</i>	0.50	0.50	1.00	1.00
	<i>b</i>	0.50	0.50	0.00	0.00

Source: Levin and Crepet 1973.

1 monomorfní

1 polymorfní

Genetická diverzita mezi populacemi

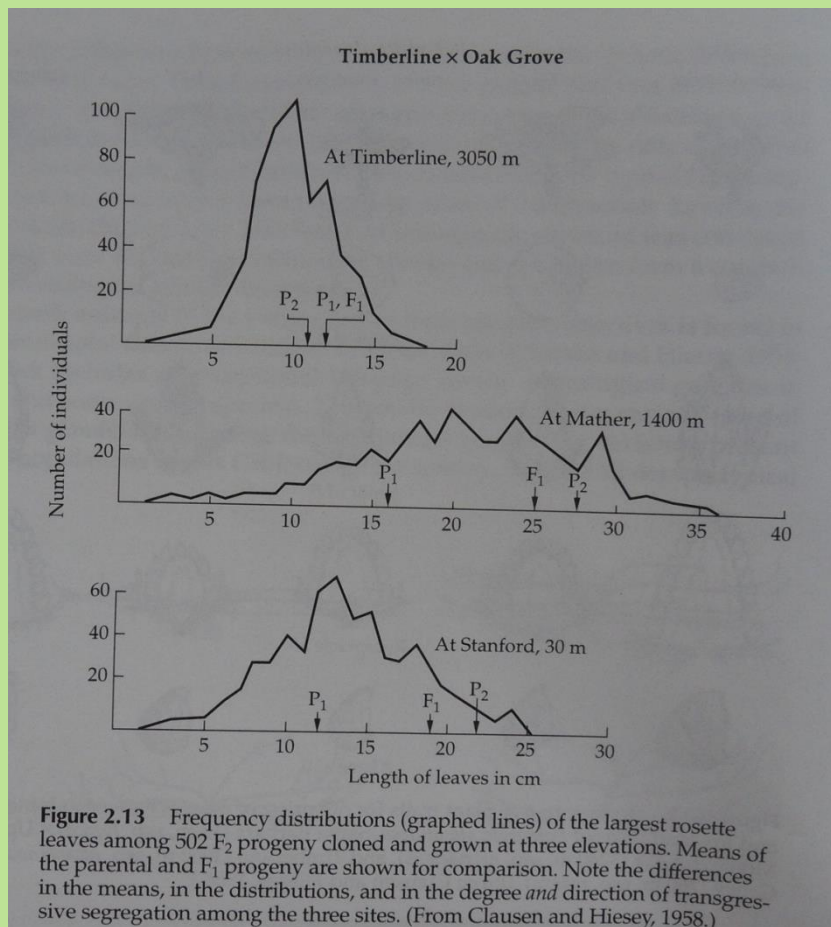
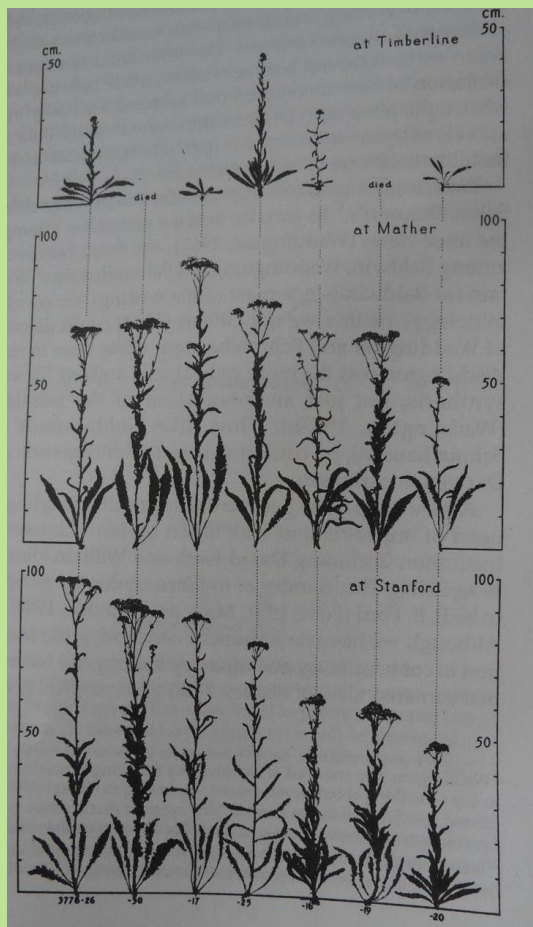


Figure 2.13 Frequency distributions (graphed lines) of the largest rosette leaves among 502 F_2 progeny cloned and grown at three elevations. Means of the parental and F_1 progeny are shown for comparison. Note the differences in the means, in the distributions, and in the degree and direction of transgressive segregation among the three sites. (From Clausen and Hiesey, 1958.)

Jens Clausen - zakladatel moderní ekologické genetiky, termín **ekotyp**
Genetic structure of ecological races (Clausen and Hiesey 1958)

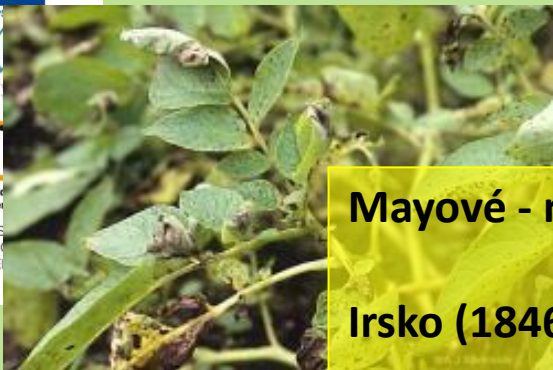
Heterozygozita a mezipopulační diverzita

TABLE 11.4 *Mean Total Heterozygosity (H_T) and Proportion Due to Among-Population Differentiation (D_{PT}) in Several Major Taxonomic Groups*

Taxon	H_T	Number of species	D_{PT}	Number of species
Vertebrates				
Fishes	5.1%	195	0.135	79
Amphibians	10.9%	116	0.315	33
Reptiles	7.8%	85	0.258	22
Mammals	6.7%	172	0.242	57
Birds	6.8%	80	0.076	16
Invertebrates				
Insects	13.7%	170	0.097	46
Crustaceans	5.2%	80	0.169	19
Molluscs	14.5%	105	0.263	44
Others	16.0%	15	0.060	5

Source: Ward et al. 1992.

Význam genetické diversity v praxi



Mayové - monokultury kukuřice - choroby/škůdci/eroze

Irsko (1846) - *Phytophthora infestans* u brambor



USA (1970) - kukuřice x *Helminthosporium maydis*

T typ CMS ve vazbě na gen náchylnosti

současnost - banánovník cv. Cavendish - houba Black Sigatoka

Đábel medvědovitý (*Sarcophilus harrisii*) - devil facial tumour disease

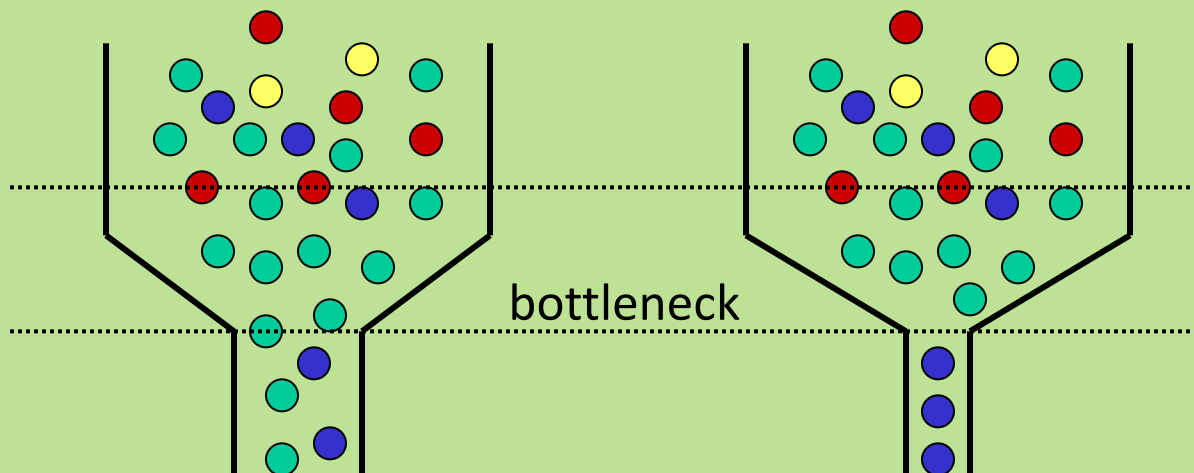


Diverzita versus domestikace

Planý druh

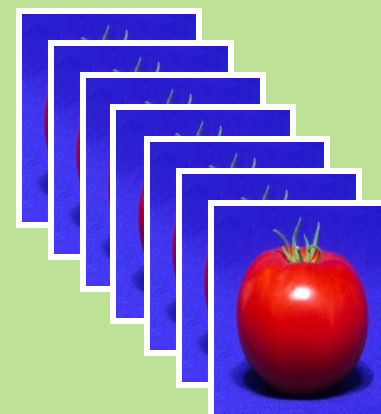
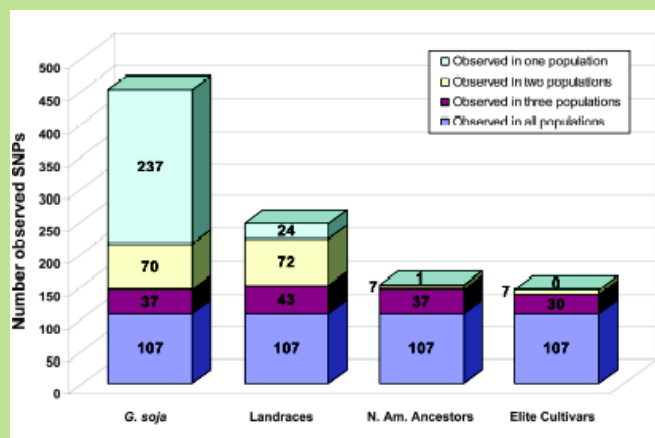
Domestikace

Kulturní druh



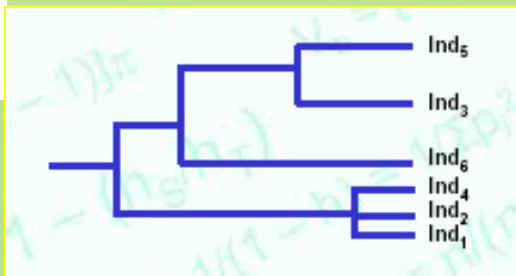
Neutrální gen

Selektovaný gen

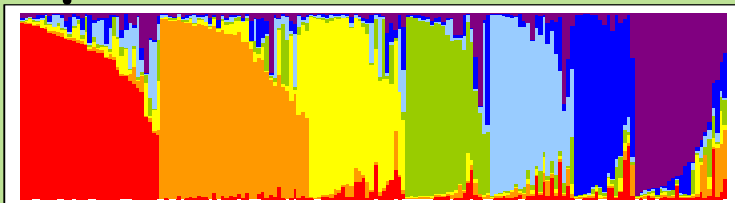


Genetické diverzity a genofondové sbírky

Genetická příbuznost

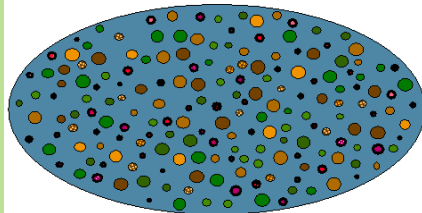


Populační struktura

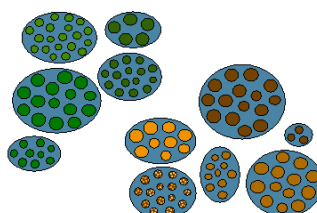


Core kolekce

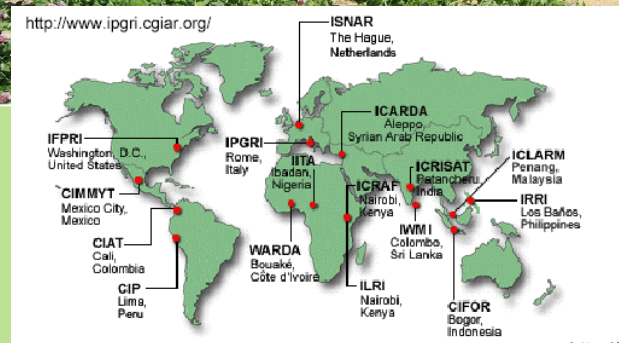
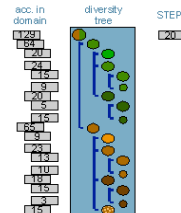
Definition of the domain (1) the entire collection



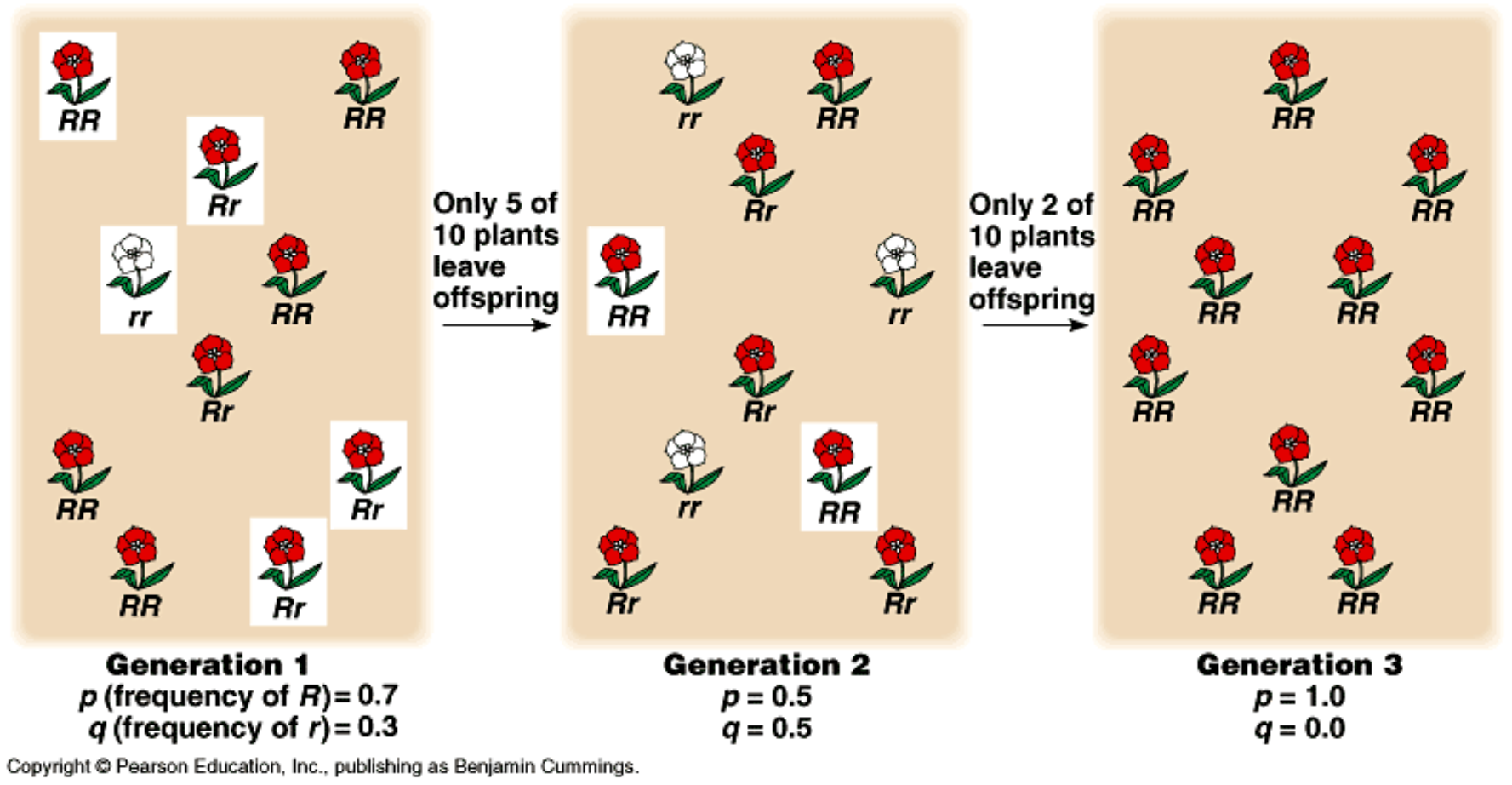
Choice of accessions (1) the divided domain



Allocation of entries (1) the size of the core



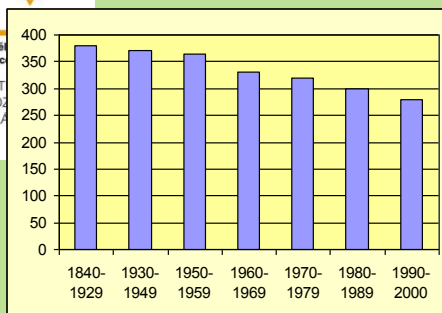
Genetická eroze (drift a shift)



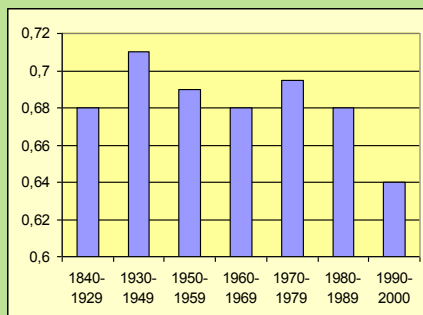
aneb ztráta diverzity

Změna genetické diverzity v čase

Total number of alleles

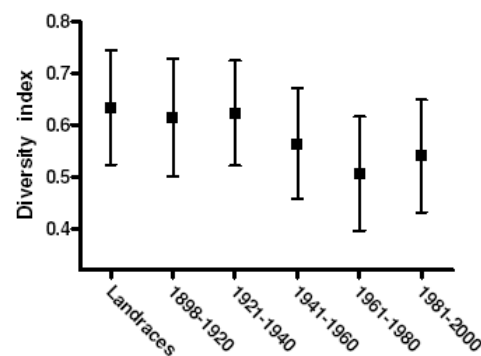


Nei average genetic diversity

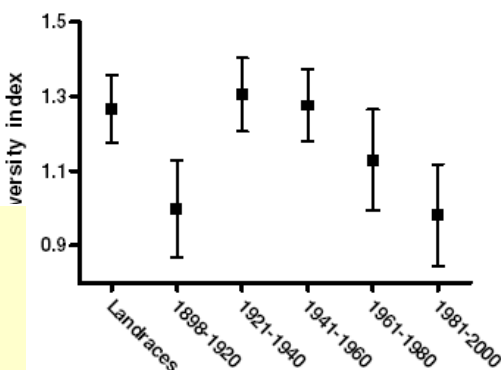


(data from Roussel *et al.* 2005)
480 wheat varieties, 39 SSRs, 1840-2000
Nersting *et al.* 2006
nordic oat varieties, SSR + morphology

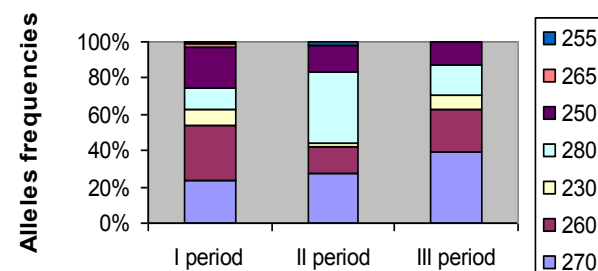
b) Nei's diversity index over SSR data



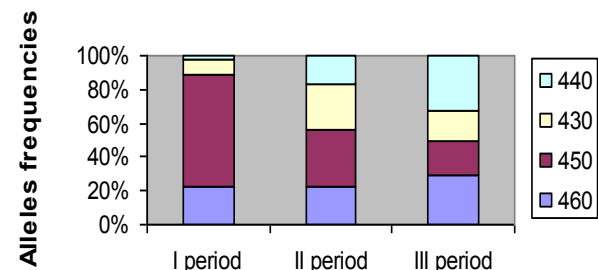
a) Shannon Weaver index over phenotypic data



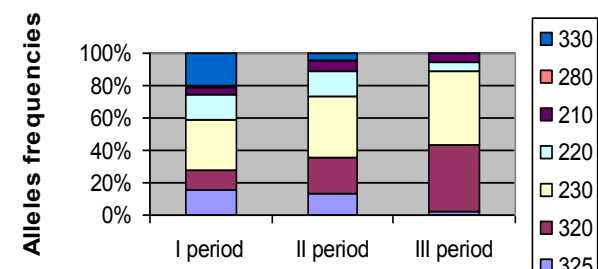
AD-270



B-14



AD-141



Genetic diversity trends in twentieth century crop cultivars: a meta analysis

Mark van de Wouw · Theo van Hintum ·
Chris Kik · Rob van Treuren · Bert Visser

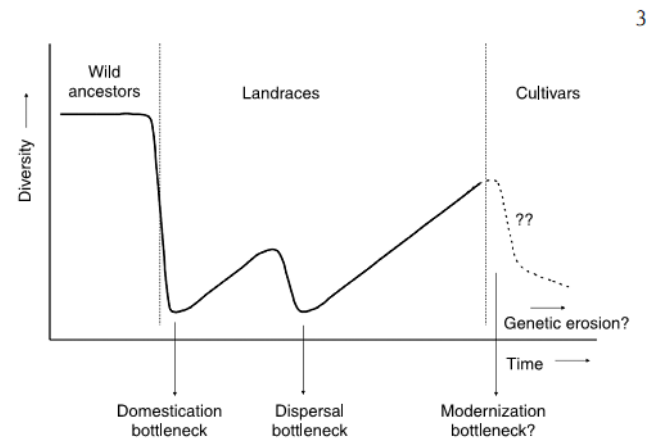


Fig. 2. Model of trends in diversity of crops from wild ancestors to modern cultivars.

Genetic erosion reflected in pedigrees

Varietal erosion

Allelic erosion

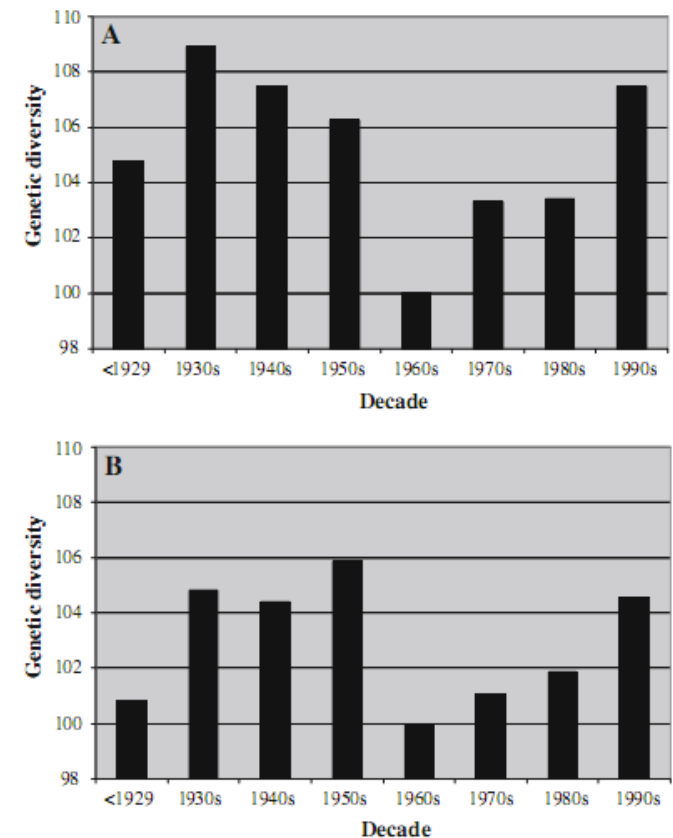


Fig. 1 Crop genetic diversity in the twentieth century based on an unweighted (a) and a weighted (b) meta analysis of 44 publications. The diversity in the decade with the lowest diversity was set to 100

Analýza změny distribuce genetické diverzity v čase

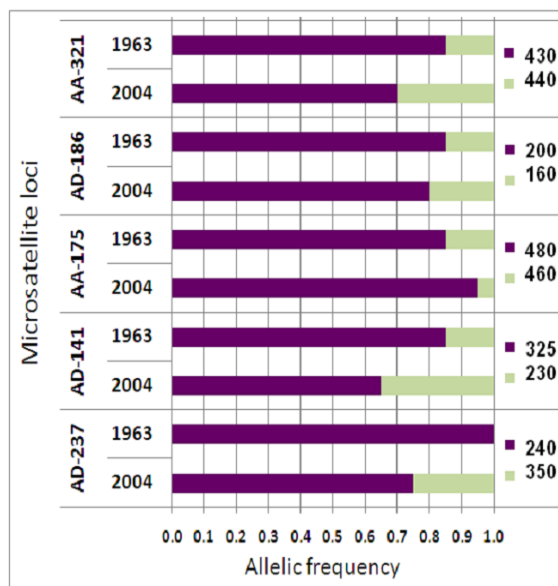


Figure 4.1 Allele frequency changes in accession 'Arvika'. The microsatellite fragment/allele sizes are shown in base pairs.

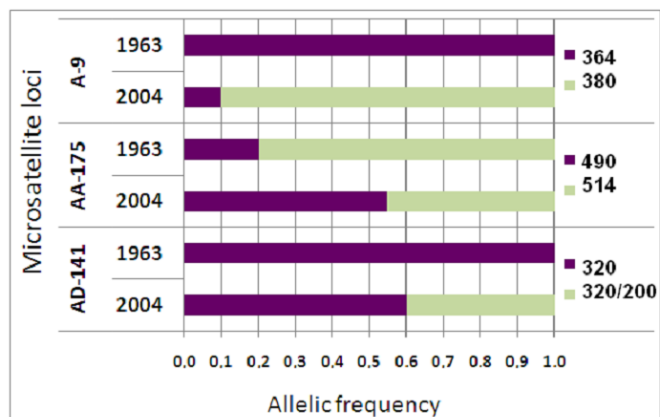


Figure 4.2 Allele frequency changes in accession 'Bohatýr'. The microsatellite fragment/allele sizes are shown in base pairs.

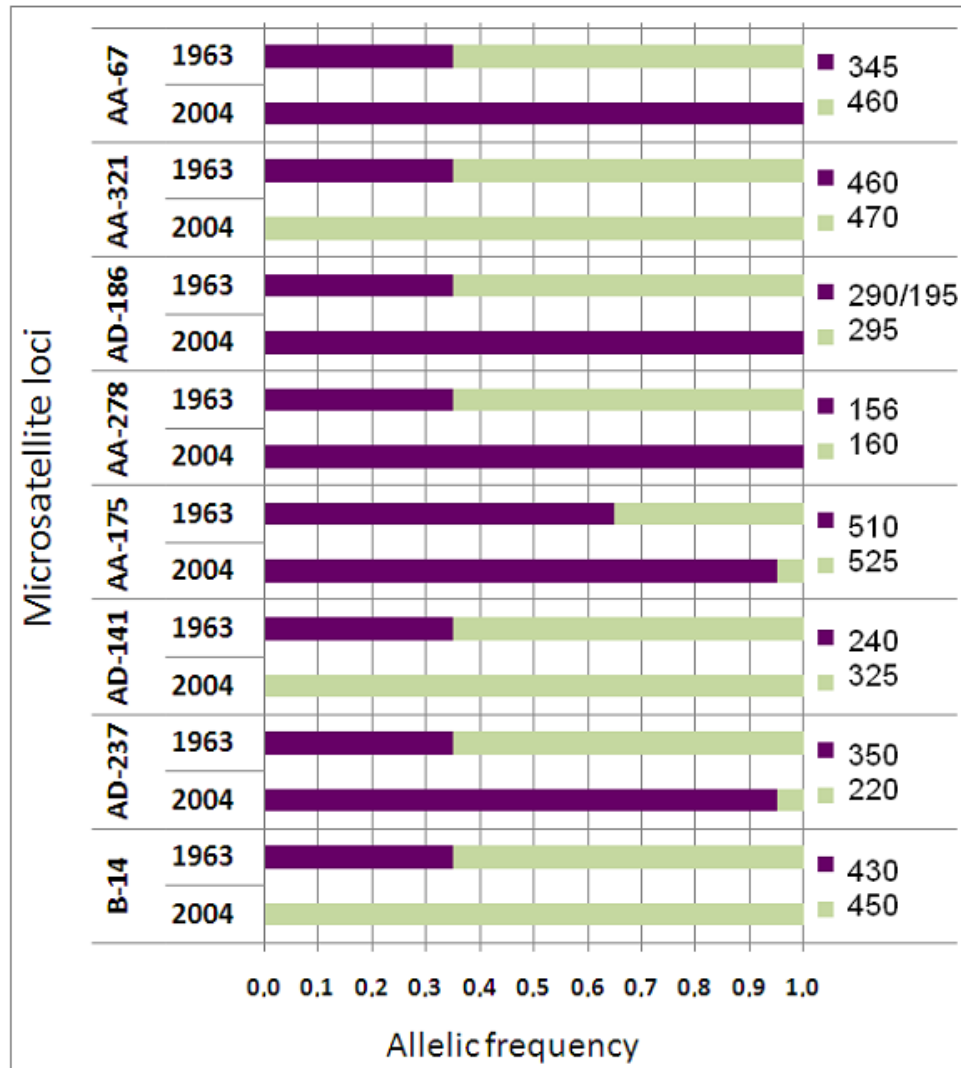


Figure 4.3 Allele frequency changes in accession 'Český banán'. The microsatellite fragment/allele sizes are shown in base pairs.

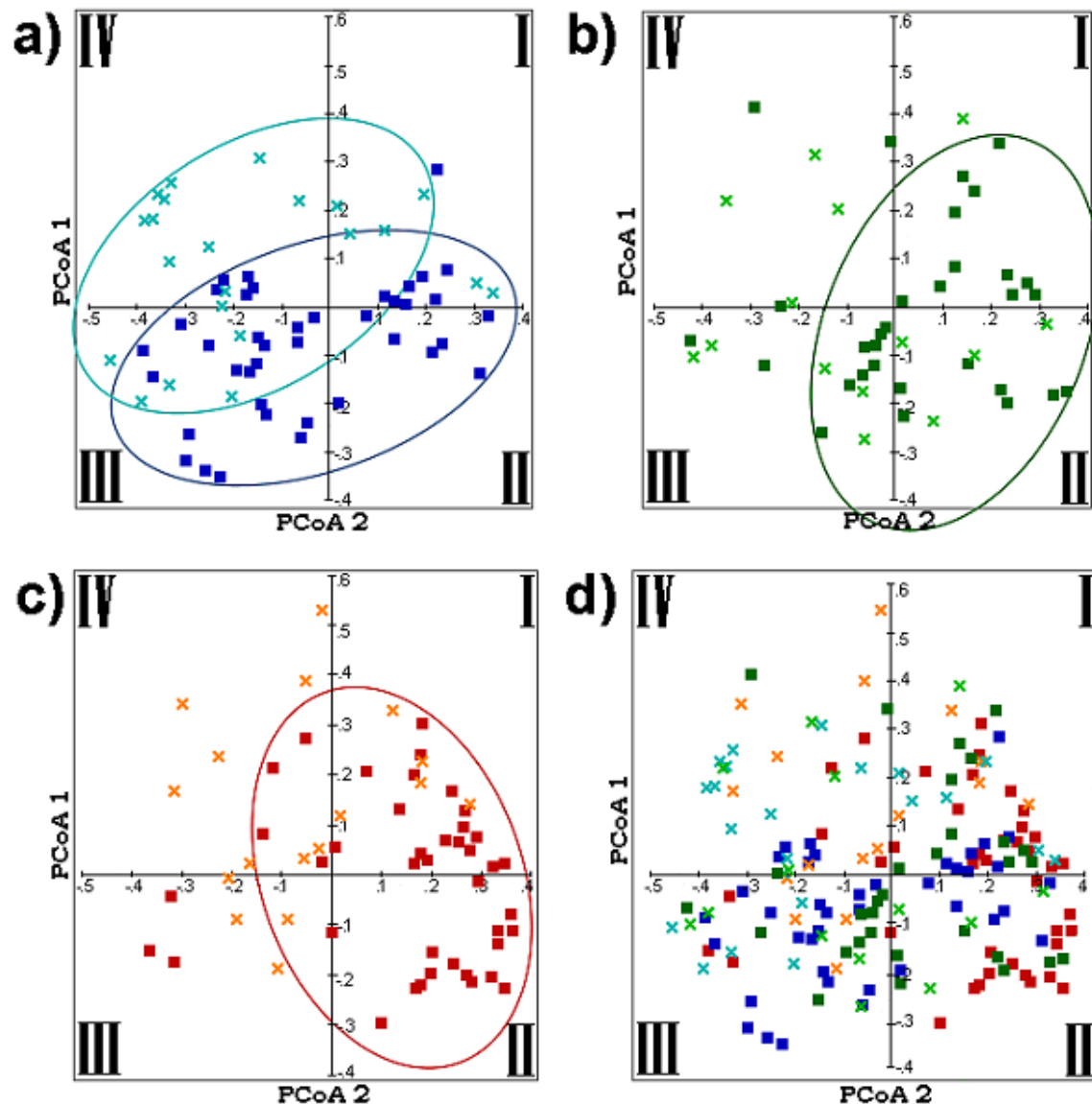


Figure 4.12 Principal coordinate Axis 1 versus PCoA 2 of SSR allelic data. **a)** *Period 1* accessions, **b)** *Period 2* accessions, **c)** *Period 3* accessions, **d)** all 175 accessions from *Periods 1-3*. Dry seed peas are symbolized with square, fodder peas with cross symbol. Ellipses represent dry seed pea and fodder pea accessions respectively. *Period 1* accessions are in blue, *Period 2* green and *Period 3* in red color.

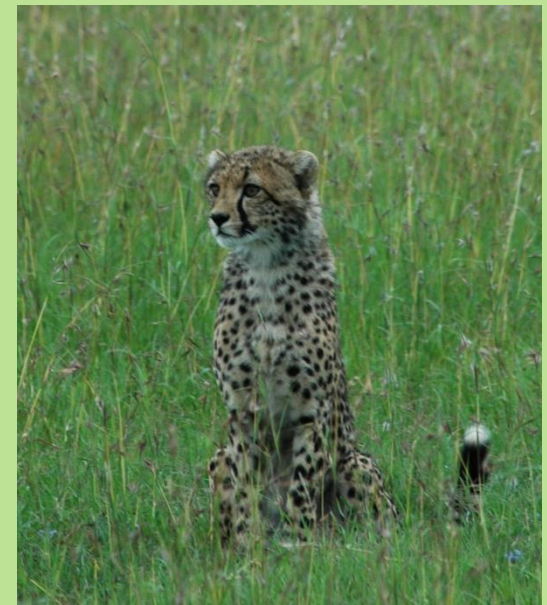
Genetická diverzita a ohrožené druhy

V případě ohrožených druhů kdy existuje jen menší populace s malým počtem jedinců se vždy zjistila nižší (v průměru 65%) genetická diverzita než v případě příbuzných neohrožených druhů.

	počet alel/ lokus (A)	heterozygotita (H)
Pes hyenový (<i>Lycaon pictus</i>)	3.5	0.56
Pes domácí (<i>Canis lupus f. familiaris</i>)	6.4	0.73
Vlček etiopský (<i>Canis simensis</i>)	2.4	0.21
Vlk obecný (<i>Canis lupus</i>)	4.5	0.62

I když se postupně obnoví velikost populace, geneticky zůstává poznamenaná „bottleneck efektem“

Genetická diverzita a ohrožené druhy



př. Gepard

	počet jedinců	počet lokusů	polymorfismus %	H _o
Gepard (<i>Acinonyx jubatus</i>)	55	52	0	0
	6	155	3,2	0,013
Kočka domácí (<i>Felis domestica</i>)	56	61	21,3	0,082
Lev (<i>Panthera leo</i>)	20	50	12	0,37
Myš (<i>Mus musculus</i>)	87	46	20,5	0,088
Člověk	100	104	31,7	0,063

Hodnocení genetické diverzity populací

Jednotlivé lokusy:

frekvence alel a genotypů

Heterozygozita (zjištěná / očekávaná)

Hardy-Weinbergova rovnováha

Více než jeden lokus:

linkage disequilibrium

(malá populace, populační bottleneck, spojení odlišných populací a výběr – vedou k nenáhodné asociaci mezi lokusy, zvláště vyskytují-li se na stejném chromosomu)

Hardy-Weinbergova rovnováha



Godfrey Hardy
(1877-1947) anglický matematik



Wilhelm Weinberg
(1862-1937) německý lékař

through mathematical modeling based on probability, they concluded in 1908 that gene pool frequencies are inherently stable but that evolution should be expected in all populations virtually all of the time.

Hardy-Weinbergova rovnováha

Hardy-Weinbergův zákon praví, že podíl jednotlivých alel se v panmiktické populaci nemění. V případě, že pro daný gen existuje pouze systém dvou alel, znamená to že:

(četnost dominantní alely značíme p a recesivní q):

$$p + q = 1 \text{ (tj. 100 \%)}$$

Pravděpodobnost vzniku:

homozygota dominantního je $p \times p$

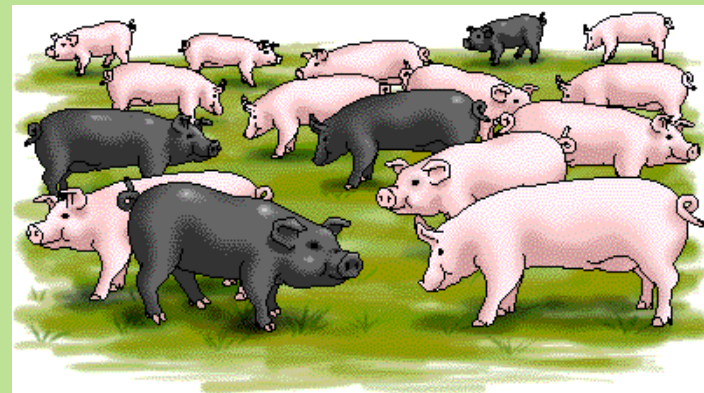
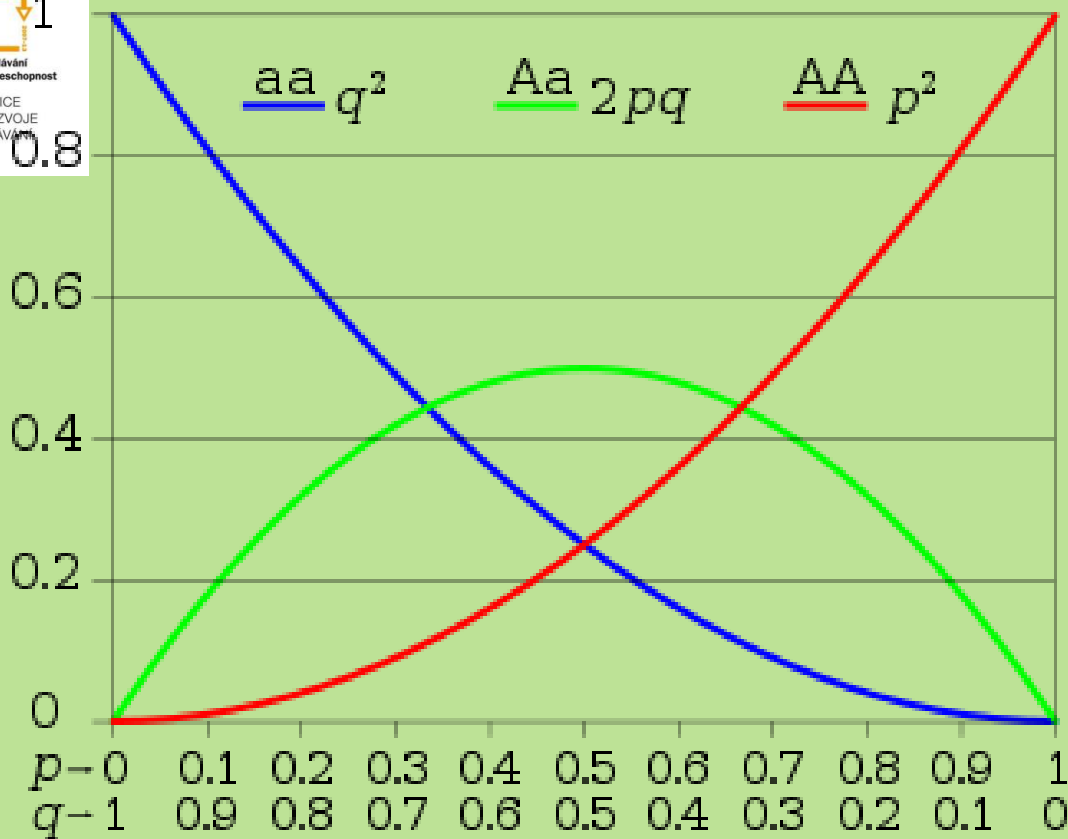
homozygota recesivního je $q \times q$

heterozygota je $2pq$.

Celkové genotypové složení populace tedy lze vyjádřit s pomocí vzorce:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Hardy-Weinbergova rovnováha



Punnettův čtverec pro
Hardy-Weinbergův zákon

		Females	
		$A (p)$	$a (q)$
Males	$A (p)$	AA (p^2)	Aa (pq)
	$a (q)$	Aa (qp)	aa (q^2)

Hardy-Weinbergova rovnováha

Punnettův čtverec pro
Hardy-Weinbergův zákon

		Females	
		A (p)	a (q)
Males	A (p)	AA (p ²)	Aa (pq)
	a (q)	aA (qp)	aa (q ²)

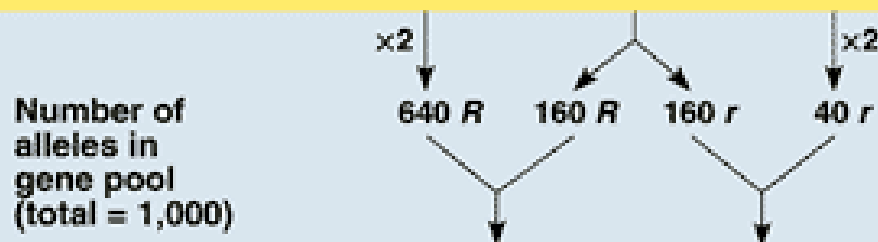
Frekvence A:
(p² + pq)

Frekvence a:
(q² + pq)

Parent population:

Phenotypes			
Genotypes	RR	Rr	rr
Number of plants (total = 500)	320	160	20

Genotype frequencies
 $\frac{320}{500} = 0.64$ RR $\frac{160}{500} = 0.32$ Rr $\frac{20}{500} = 0.04$ rr



Allele frequencies
 $\frac{800}{1,000} = 0.8$ R $\frac{200}{1,000} = 0.2$ r

p = frequency of R = 0.8 q = frequency of r = 0.2

(a) Gene pool of parent population

Kdy platí Hardy-Weinbergova rovnováha ?

Předpoklady (ideální populace):

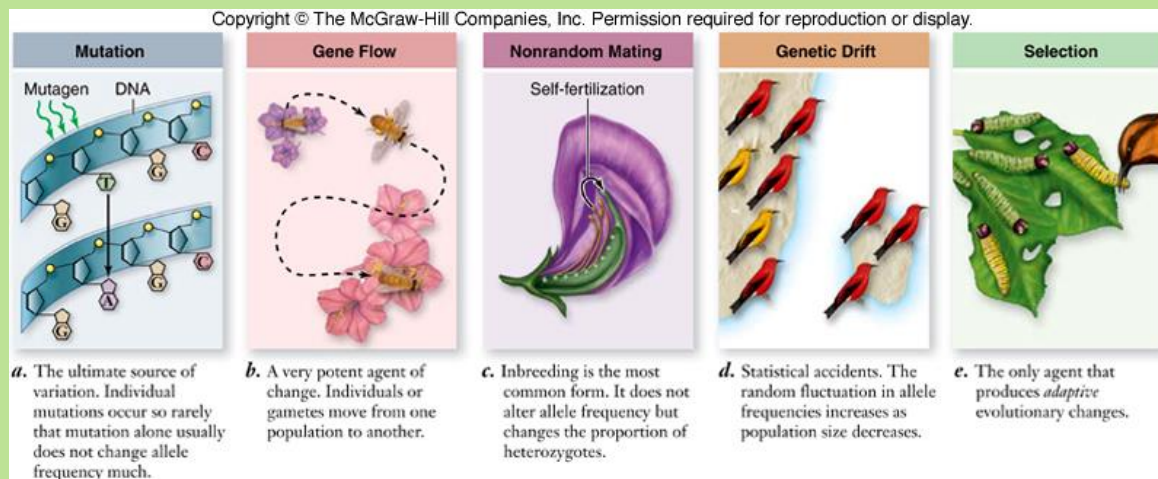
- Diploidní organismus
- Probíhá jen pohlavní rozmnožování
- Generace se nepřekrývají
- Oplození je náhodné
- Populace je nekonečně velká
- Nedochází k migraci jedinců, mutacím nebo výběru

Kdy NE-platí Hardy-Weinbergova rovnováha ?

•Nenáhodné oplození - inbríding

Často spojeno s malou velikostí populace a následných příbuzenským párovaním

•Působení výběru



•Vznik mutací

Velmi malý vliv na změnu populaci neboť mutační rychlost je v řádu 10^{-4} až 10^{-8} ,

•Migrace (gene flow)

Genetické spojení více populací vedoucí k postupné homogenizaci

•Malá populace

Působení náhodných změn frekvence alel - vliv genetického driftu, častý případ ohrožených druhů

Zobecnění Hardy-Weinbergova zákona pro polyploidii

Pokud existují jen dvě alely:

- pro diploida: $(p + q)^2 / p^2 + 2pq + q^2 = 1$
- Pro polyploida platí polynomické rozšíření:

$$(p + q)^c = 1$$

kde c vyjadřuje stupeň ploidie):

Např. tetraploid $4n$ $(p + q)^4 = 1$

<u>Genotyp</u>	<u>Frekvence</u>
AAAA	p^4
AAAa	$4p^3q$
AAaa	$6p^2q^2$
Aaaa	$4pq^3$
aaaa	q^4

Hodnocení statistické významnosti odchylky od HW

Pomocí χ^2 testu (Pearsonův chí-kvadrát test / test dobré shody)



Přástevník hluchavkový (*Callimorpha dominula*)
Data from Ford (1971)

Pozorováním zjištěný počet

Example Hardy–Weinberg principle calculation

Phenotype	White-spotted (AA)	Intermediate (Aa)	Little spotting (aa)	Total
Number	1469	138	5	1612

Hodnocení statistické významnosti odchylky od HW

Example Hardy–Weinberg principle calculation

Phenotype	White-spotted (AA)	Intermediate (Aa)	Little spotting (aa)	Total
Number	1469	138	5	1612

Reálná frekvence alel:

$$p = p^2 + pq = 1469/1612 + 138/(1612*2) = 0,954$$

$$q = q^2 + pq = 5/1612 + 138/(1612*2) = 0,046$$

Neboli:

$$p = (2*AA + Aa)/2*total = (2*1469 + 138)/2*1612 = 0,954$$

$$q = (2*aa + Aa)/2*total = (2*5 + 138)/2*1612 = 0,046$$

Očekávaný počet dle HW zákona

$$\text{Exp}(AA) = p^2 n = 0.954^2 \times 1612 = 1467.4$$

$$\text{Exp}(Aa) = 2pq n = 2 \times 0.954 \times 0.046 \times 1612 = 141.2$$

$$\text{Exp}(aa) = q^2 n = 0.046^2 \times 1612 = 3.4$$

Hodnocení statistické významnosti odchylky od HW

χ^2 test (výpočet hodnoty)

$$\begin{aligned}\chi^2 &= \sum \frac{(O - E)^2}{E} \\ &= \frac{(1469 - 1467.4)^2}{1467.4} + \frac{(138 - 141.2)^2}{141.2} + \frac{(5 - 3.4)^2}{3.4} \\ &= 0.001 + 0.073 + 0.756 \\ &= 0.83\end{aligned}$$

Porovnání vypočítané hodnoty s hodnotou tabulkou –
volba df (stupně volnosti):

1 stupeň volnosti

(počet genotypů – 1 – /počet alel-1/

= počet genotypů – počet alel).

Tabulka některých kvantilů pro některé počty stupňů volnosti:

stupňů volnosti	$q_{0,95}$	$q_{0,99}$
1	3,84	6,63
2	5,99	9,21
3	7,81	11,34
4	9,49	13,28
5	11,07	15,09
10	18,31	23,21
15	25,00	30,58
20	31,41	37,57
30	43,77	50,89
40	55,76	63,69
50	67,50	76,15

Df:1 stupeň volnosti
(počet genotypů počet alel).

Při 5% hladině významnosti pro 1 stupeň volnosti je hodnota 3.84, a jelikož χ^2 value (0.38) je menší, **platí nulová hypotéza že populace je v Hardy–Weinbergově rovnováze**

95% kvantil odpovídá kritické hodnotě pro 5% hladinu významnosti,
99% kvantil kritické hodnotě pro 1% hladinu významnosti.

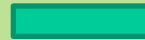


alela A

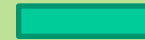


100/100

alela B



100/75



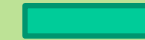
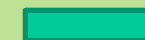
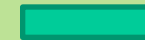
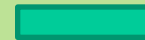
100/75



75/75



100/75



Dle Leary et al. (1993) data pro frekvenci isozymového lokusu (mIDHP-1) u pstruha (Clark Fork, Idaho)

Genotyp	Pozorovaný počet	Očekávaný počet dle HW	Chi-kvadrát hodnota
100/100	1	$p^2N = 5.8$	3.97
100/75	22	$2pq = 12.5$	7.22
75/75	2	$q^2N = 5.8$	3.58
Celkem	25	25.1	14.58

Očekávaná frekvence alely 100 = $p = ((2 \times 1) + 22) / 50 = 0.48$

Očekávaná frekvence alely 75 = $q = (22 + (2 \times 2)) / 50 = 0.52$

Stupně volnosti (3 genotypy - 2 alely) = 1

vypočtená hodnota χ^2 (14.58) ve větší než kritická hodnota pro $P < 0.001$. Proto je pravděpodobnost tohoto rozdílu jen náhodou menší než 0.001.

Následně lze tedy odmítnout nulovou hypotézu, že analyzovaná populace je v HW rovnováze pro tento lokus. (Je zde však významný přebytek heterozygotů !)

Zobecnění Hardy-Weinbergova zákona pro více alel

- pro dvě alely $(p + q)^2 = 1 / p^2 + 2pq + q^2 = 1 /$

- Pro tři alely:

$$(p + q + r)^2 = 1$$

kde c vyjadřuje stupeň ploidie):

<u>Genotyp</u>	<u>Frekvence</u>
A_1A_1	p^2
A_2A_2	r^2
aa	q^2
A_1A_2	$2pr$
A_1a	$2pq$
A_2a	$2qr$

Testování HW rovnováhy pro jeden lokus se 3 alelami

Genotyp	Pozorovaný počet	Očekávaný počet dle HW	Chi-kvadrát hodnota
100/100	4	$p^2N = 2.1$	1.72
100/81	6	$2pq = 9.7$	1.41
81/81	14	$q^2N = 11.0$	0.82
100/66	4	$2pr = 4.0$	0
81/66	7	$2qr = 9.2$	0.53
66/66	3	$r^2N = 1.9$	0.64
Celkem	38	37.9	5.12

Očekávaná frekvence alely 100 ... $p = ((2 \times 4) + 6 + 4) / 2 \times 38 = 0.237$

Očekávaná frekvence alely 81 ... $q = (6 + (2 \times 14) + 7) / 2 \times 38 = 0.539$

Očekávaná frekvence alely 66 ... $r = (4 + 7 + (2 \times 3)) / 2 \times 38 = 0.224$

Vzorek má 6 genotypů a 3 nezávislé alely, počet stupňů volnosti je $6 - 3 = 3$ vypočtená hodnota χ^2 (5.12) je méně než kritická hodnota 7.82, proto lze přijmout nulovou hypotézu, tj. analyzovaná populace je v HW rovnováze pro daný lokus.

V praxi – malý populační vzorek a více alel

Rožn: χ^2 test se nedoporučuje provádět je-li očekávaná hodnota menší než 5

Navíc u malých vzorků je systematický bias vzhledem k diskretním hodnotám genotypů

Proto byly zaveden

exaktní **Fisherův test** (1935)

χ^2 je větší než tabulková

Hodnota 3.84 což vede k

odmítnutí nulové hypotézy.

Avšak Fisherův test ukazuje, že

lze očekávat odchylku větší než

j jsme zjistili v 8% (0.0823)

případů. A tedy neodmítnutí

nulové hypotézy.

Genotypy

100/100 100/80 80/80

21 19 0
(23.3) (14.5) (2.3)

$p = 0.763$

$\chi^2 = 3.88$

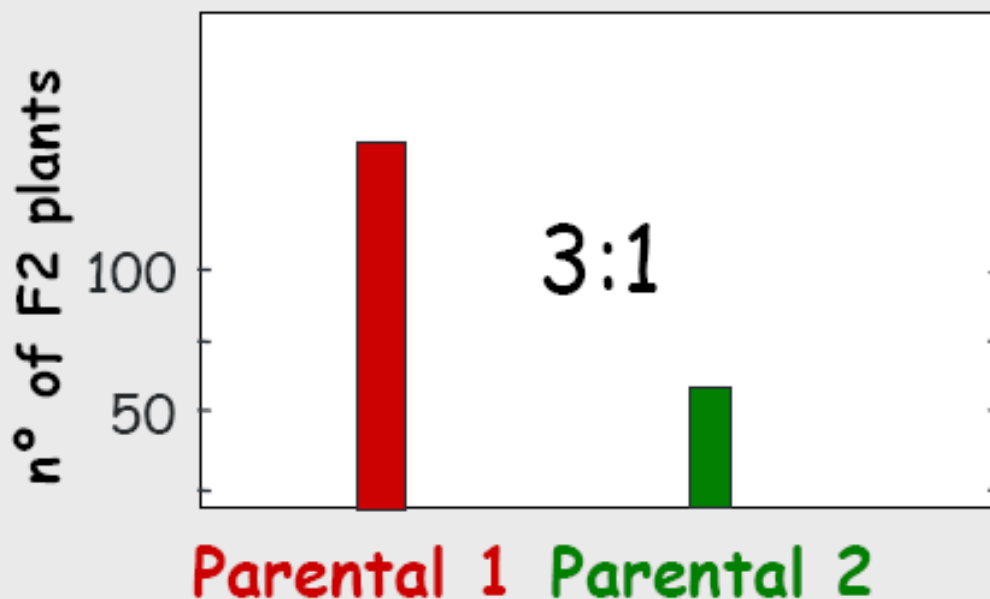
Možné vzorky

100/100	100/80	80/80	Pravděpodobnost	Kumulativní pravděpodobnost	χ^2
30	1	9	0.0000	0.0000	34.67
29	3	8	0.0000	0.0000	25.15
28	5	7	0.0001	0.0001	17.16
27	7	6	0.0023	0.0024	10.69
26	9	5	0.0205	0.0229	5.74
21	19	0	0.0594	0.0823	3.88
25	11	4	0.0970	0.1793	2.32
22	17	1	0.2308	0.4101	1.2
24	13	3	0.2488	0.6589	0.42
23	15	2	0.3411	1.0000	0.05

Kvalitativní znaky



QUALITATIVE VARIATION





MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDELÁVÁNÍ

Kvantitativní variace

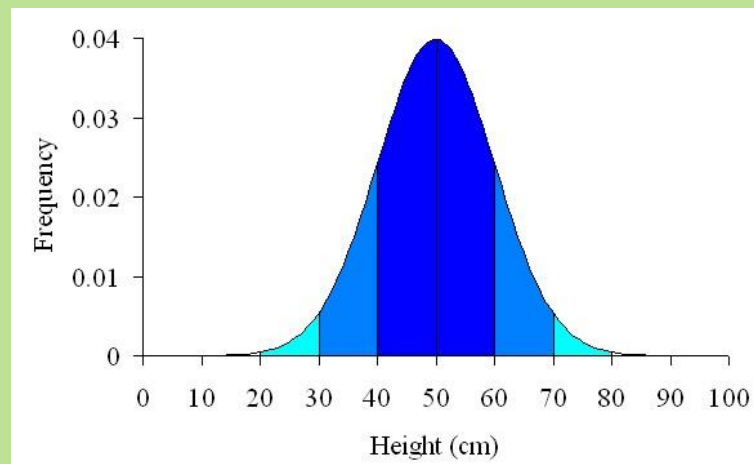
Kvantitativní znaky

- Založení polygenně
- Větší vliv prostředí na projev jednotlivých genů
- Nižší heritabilita znaku
- Kontinuální distribuce projevu

Kvantitativní variace

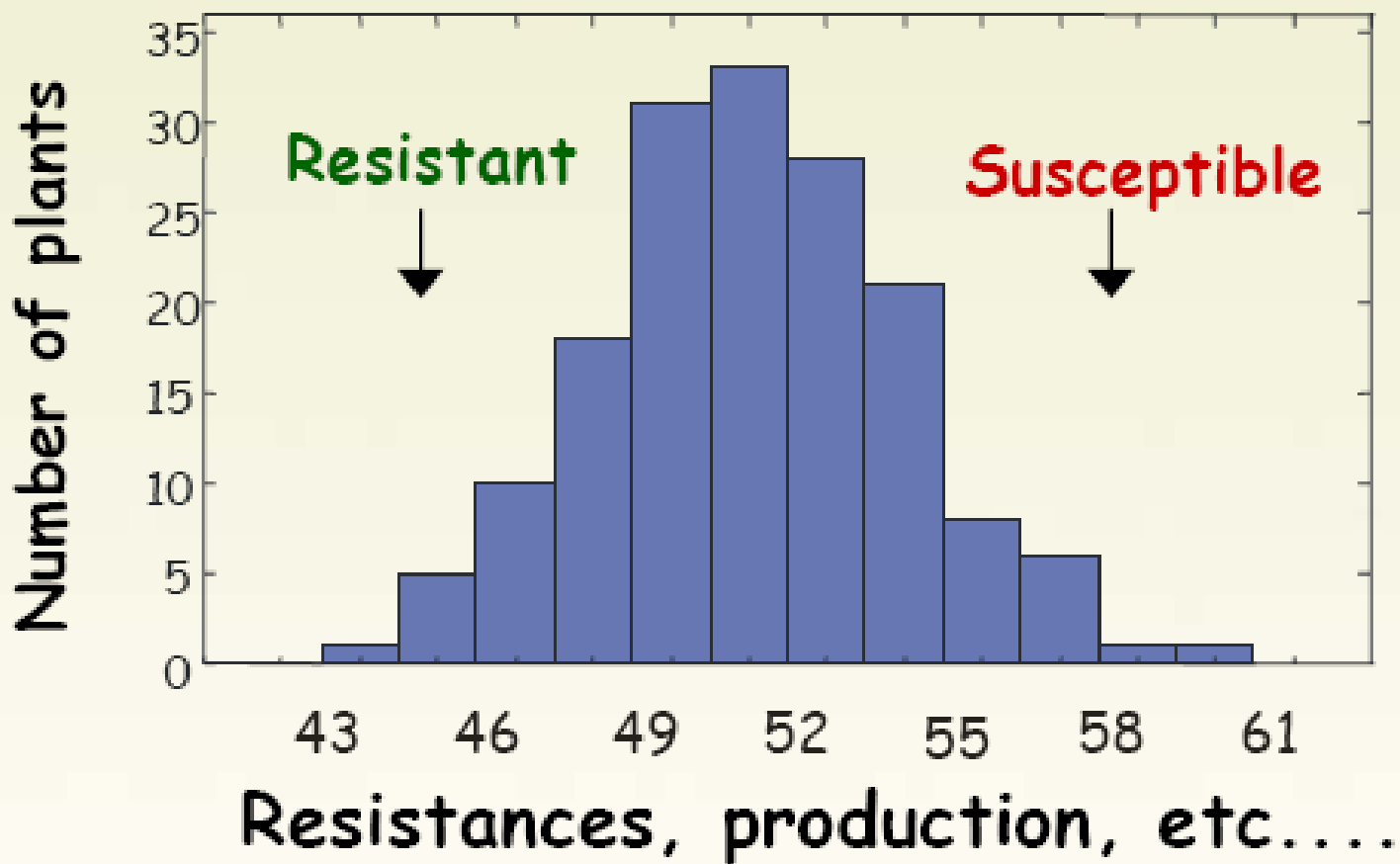
Jedinci se odlišují v reprodukci a přežívání (fitness)
např. věk nástupu do reprodukce, počet potomstva, věk

Typické kvantitativní znaky jsou výška, váha

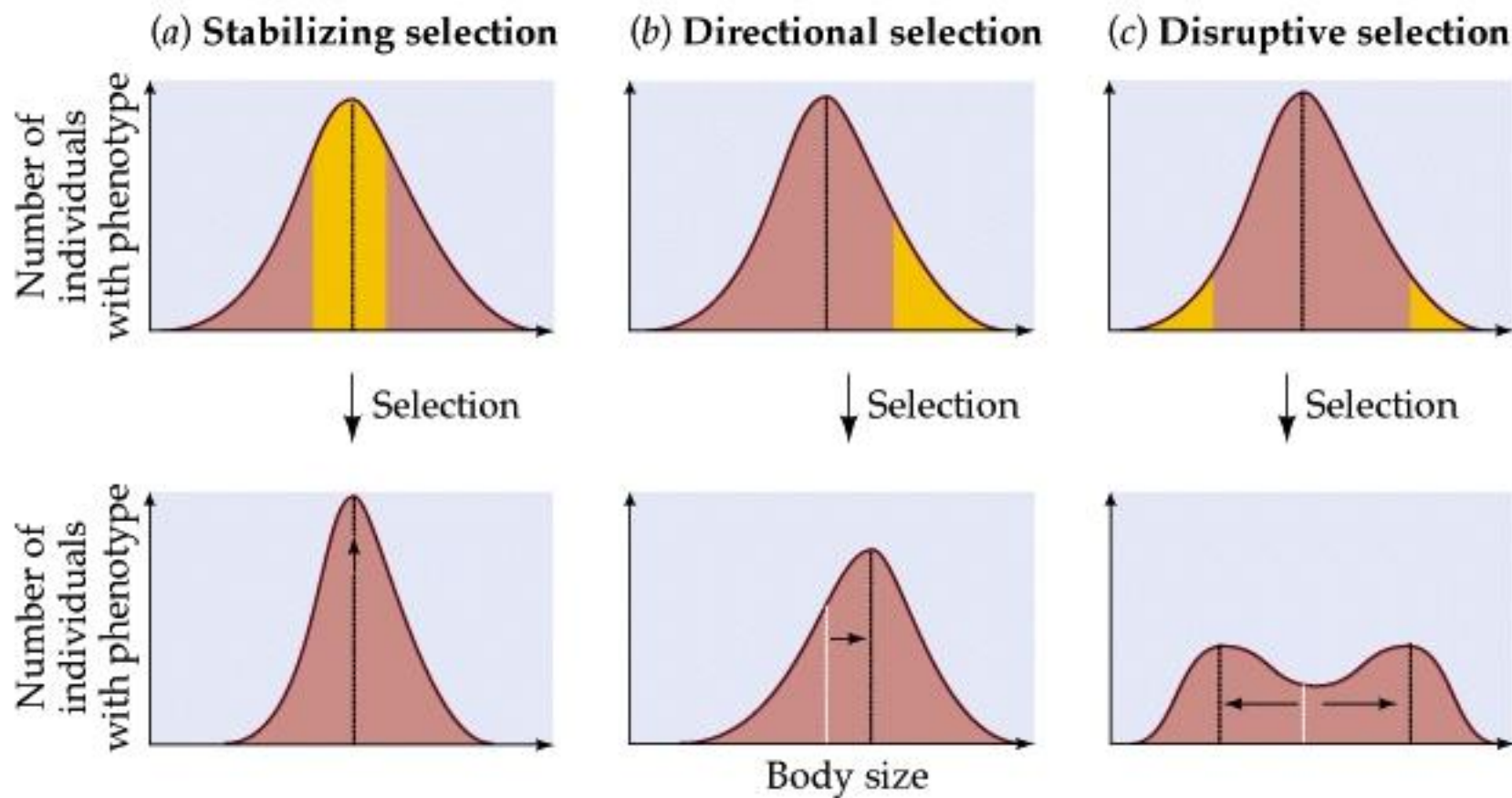


Kvantitativní znaky jsou ovlivněny prostředím mají tedy nižší heritabilitu než znaky kvantitativní

Kvantitativní znaky (QTLs)



Působení selekce na kvantitativní znaky



Metody hodnocení genetické diverzity

Biochemické markery

Isozymy (isoenzymy) – enzymy odlišující se v aminokyselinové sekvenci ale katalyzující stejnou chemickou reakci

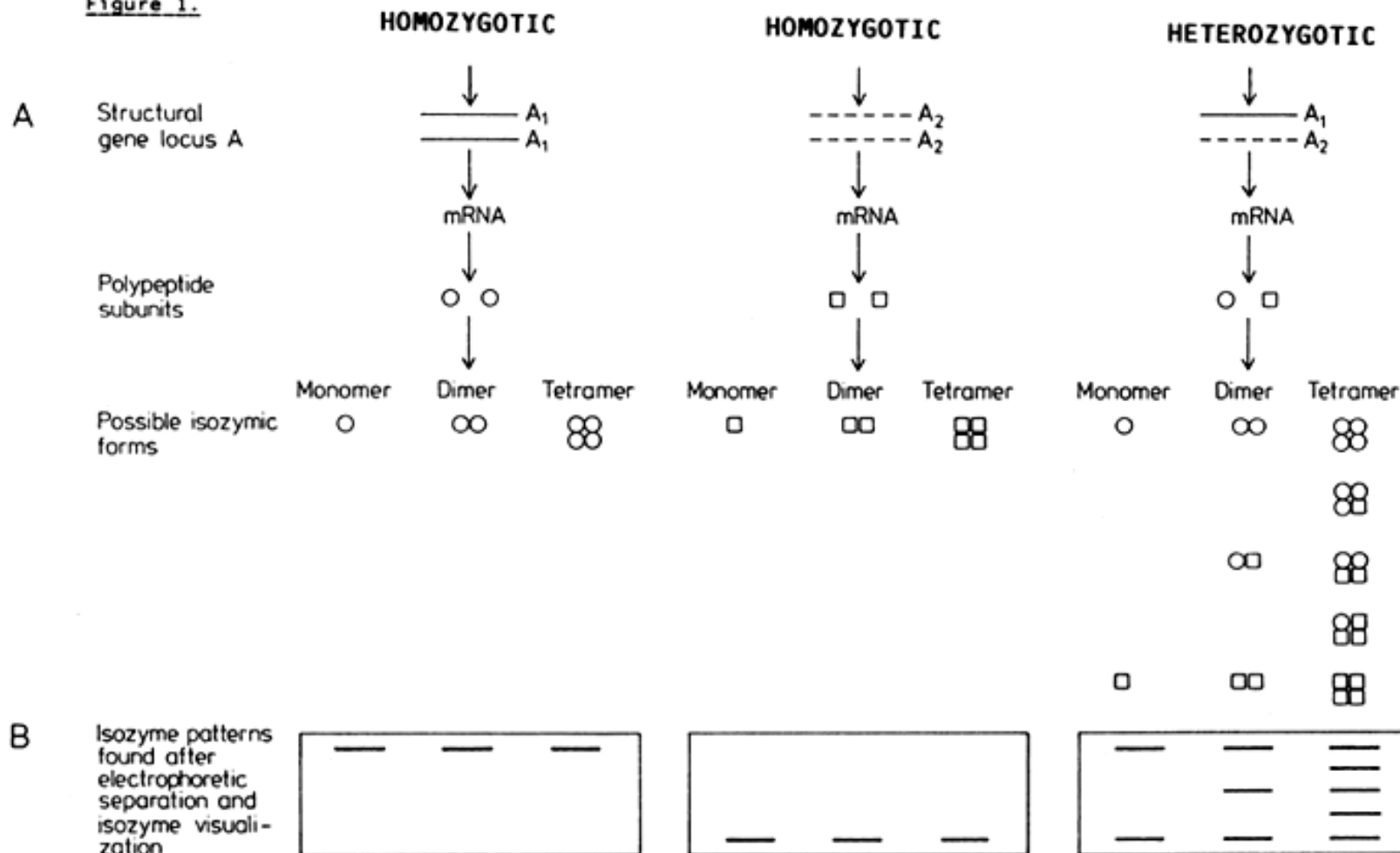
first described by R. L. Hunter and Clement Markert (1957) who defined them as **different variants of the same enzyme having identical functions and present in the same individual.**

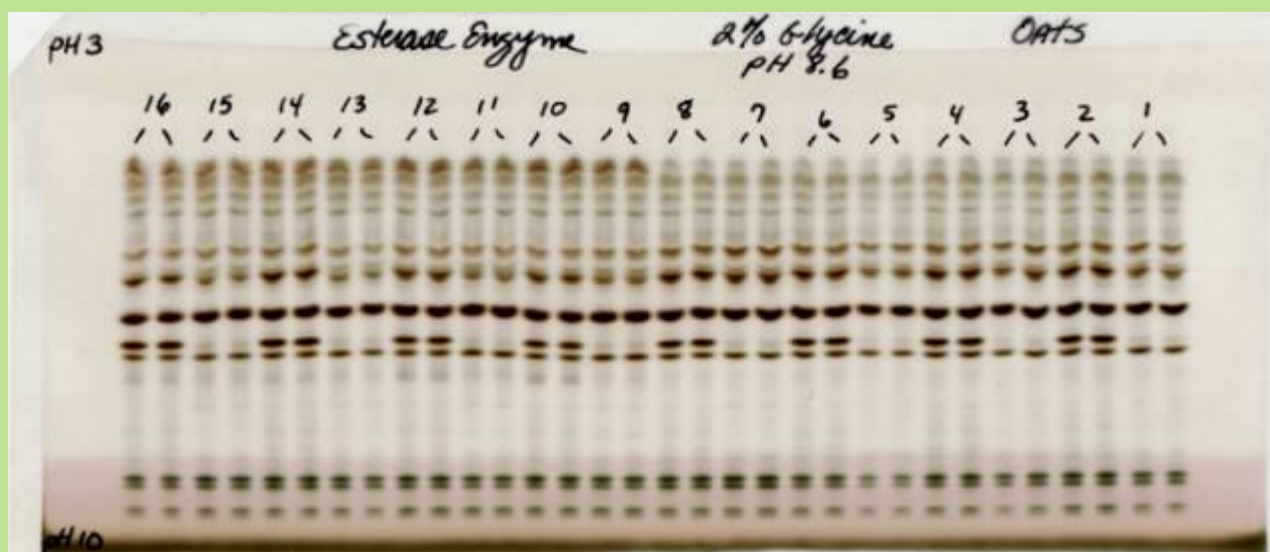
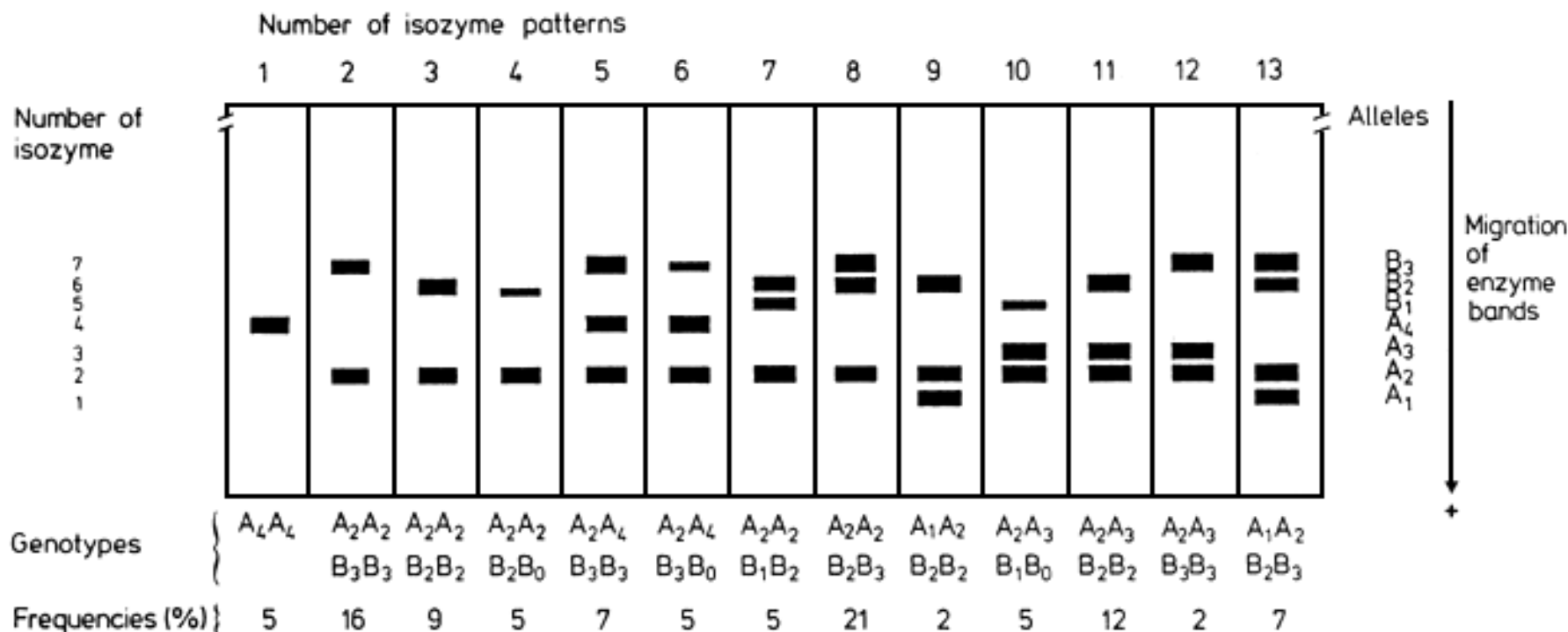
This definition encompasses

(1)enzyme variants that are the product of different genes and thus represent different loci (described as **isozymes**) and

(2)enzymes that are the product of different alleles of the same gene (described as **allozymes**).

Figure 1.





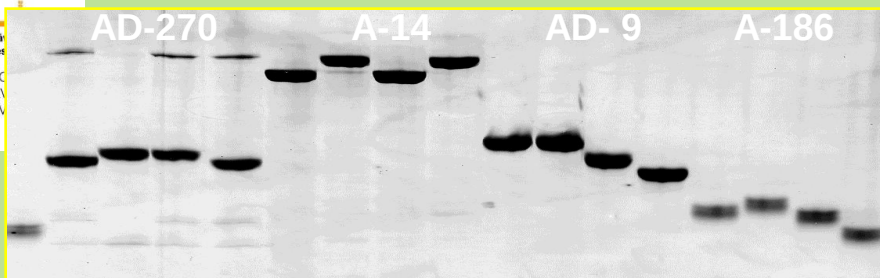
Výhody isozymových markerů:

- Univerzálnost
- Jednoduchost stanovení
- Vysoký polymorfismus
- Ko-dominance (možnost detekce heterozygotů)

Nevýhody isozymových markerů:

- Nutnost práce s čerstvým materiálem
- Závislost na ontogenetickém stáří a typu pletiva
- Vliv prostředí – problém porovnání mezi lokalitami, lety
- Limitovaný polymorfismus
- Dostupnost přibližně 40 isozymových systémů

Mikrosatelitní (SSR) repetice

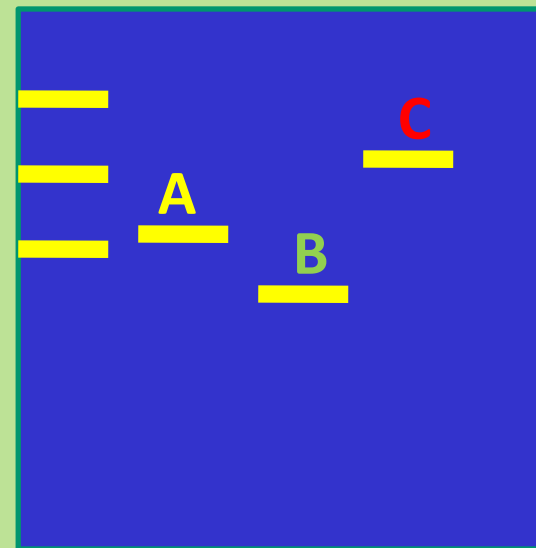
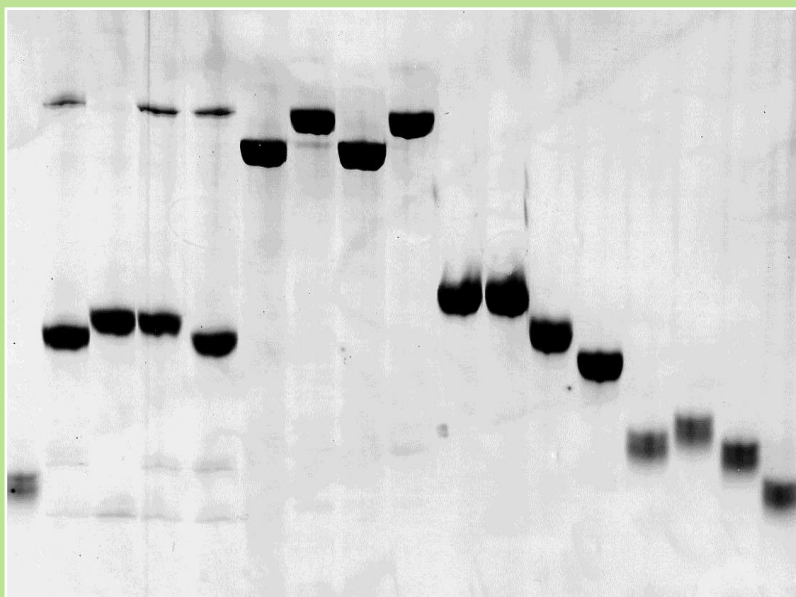
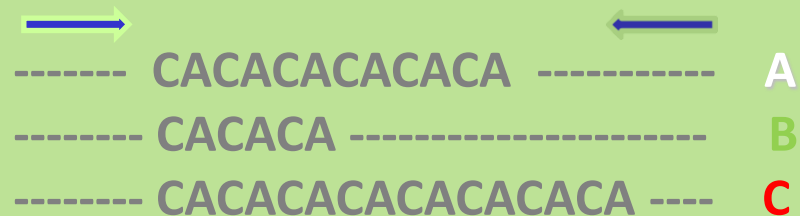
[illegible]

Crop	Nr.	Nr.DNA	Name	PSMAD-270	PSAD-9	PSAM-14	PSAM-237	278
L01	00001	1	Dětenický žlutý velkozrnný	270	360	460	330	170
L01	00002	2	Klatovský zelený	260	360	450	330	150
L01	00003	3	Liblický bastard	270	360	460		160
L01	00004	4	Milion zelený	230	330	450	220	170
L01	00005	5	Milion žlutý	260	330	450	330	170
L01	00006	6	Slovenský expres	260	360	450	330	170
L01	00007	7	Slovenský konzervový	270	330	450	330	160
L01	00008	8	Viktoria 75	260	330	450	330	170
L01	00009	9	Viktoria 800	280	330	450	220	160

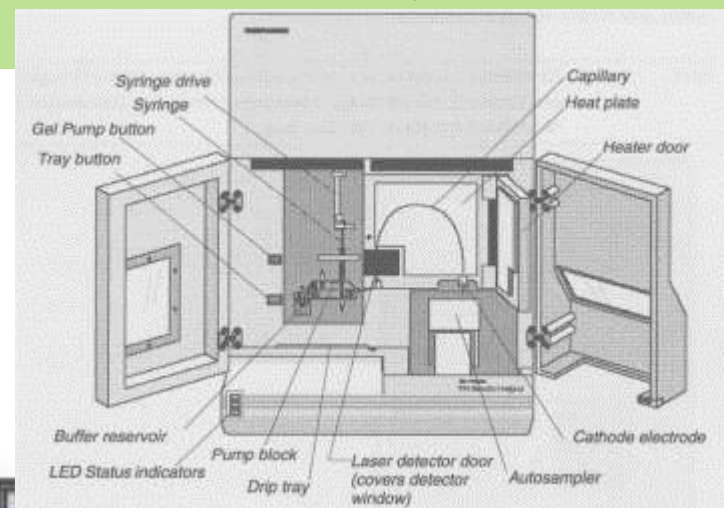
Výhody: vysoký polymorfismus, ko-dominance

Mikrosatelitní markery - detekce

1) Elektroforetická separace
fragmentů (odlišení cca 8-10 bp),
2-3% NuSieve agarózový gel, 10-
12% PAGE



Mikrosatelitní markery automatická fragmentační analýza



Mikrosatelitní markery

Výhody:

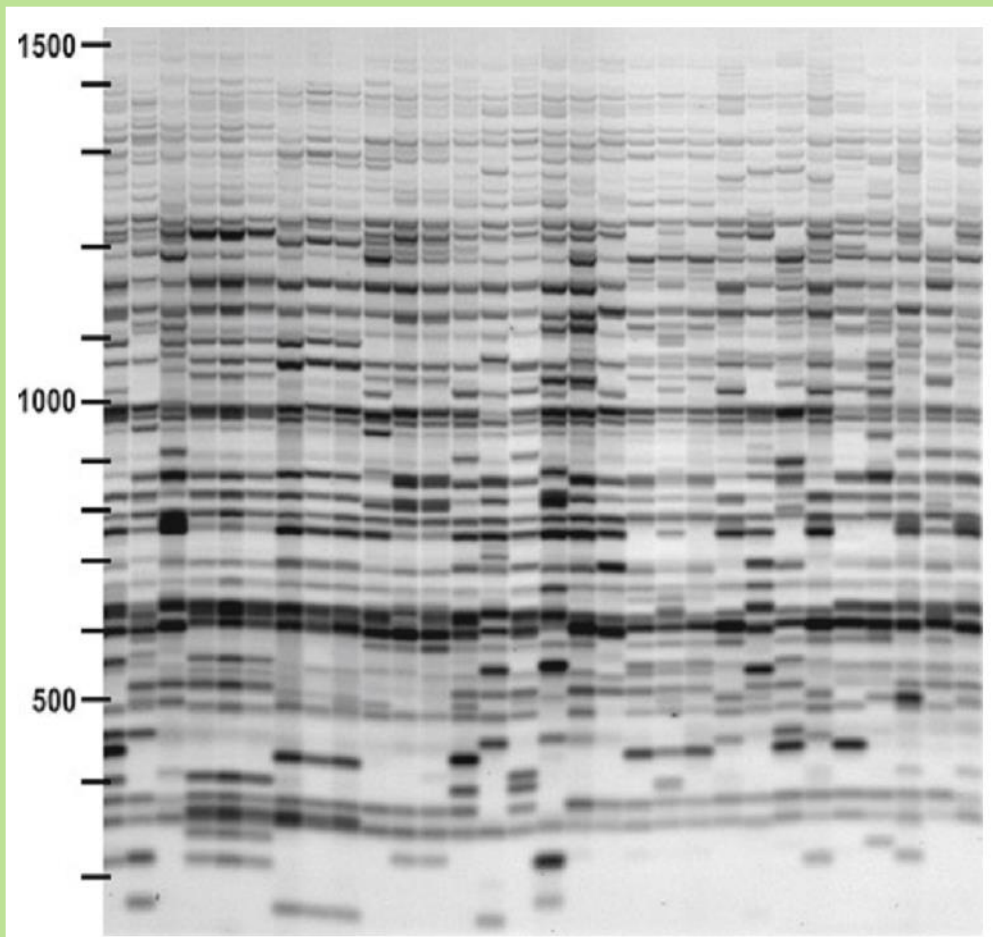
- vysoký polymorfismus – multi-alelismus
- ko-dominance (možnost detekce heterozygotního stavu, směsi)
- jednoduchost aplikace metodiky
- Mapovatelnost – znalost pozice (lokusu)

Nevýhody:

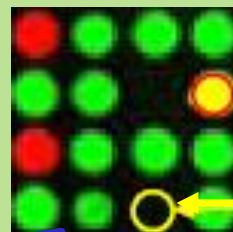
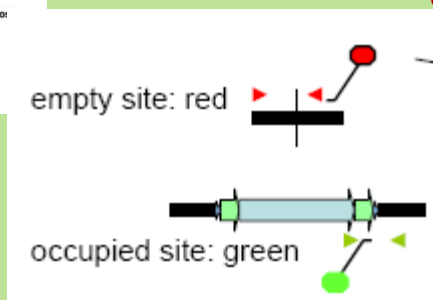
- **homoplasie**, vysoká mutační rychlost ($10^{-3} - 10^{-4}$ na lokus a generaci)
- přenos mezi druhy není zcela možný/ aplikovatelný
- pro *de novo* vyvinutí - potřeba sekvenování, obohacené knihovny
- přesnost odečtu alel

Multilokusové metody - DNA fingerprinting

- Minisatelity
- RAPD
- AFLP a varianty
- ISSR
- IRAP

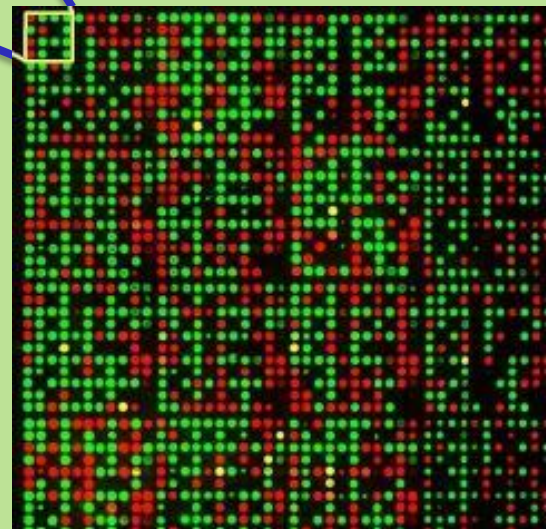
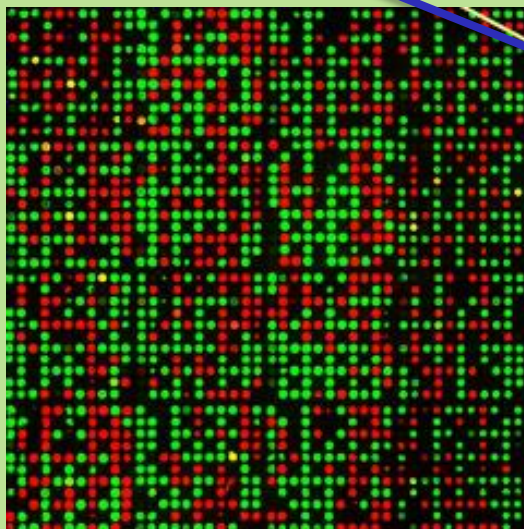


Lokus specifické Retrotransposon-based insertion polymorphism (RBIP)

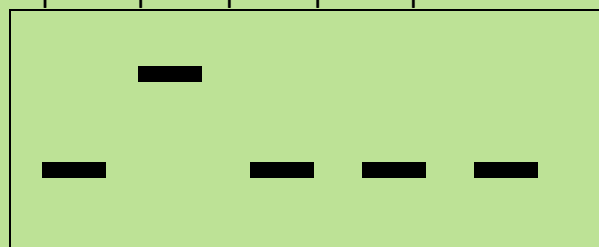


Heterozygote

No PCR amplification
(primer mismatch)

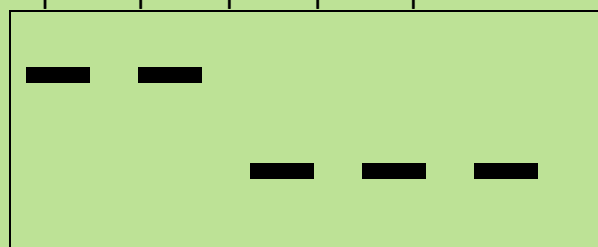


člověk šimpanz gorila orangutan gibbon

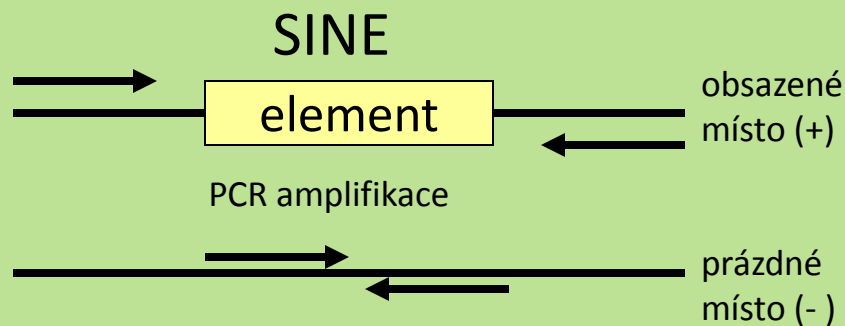
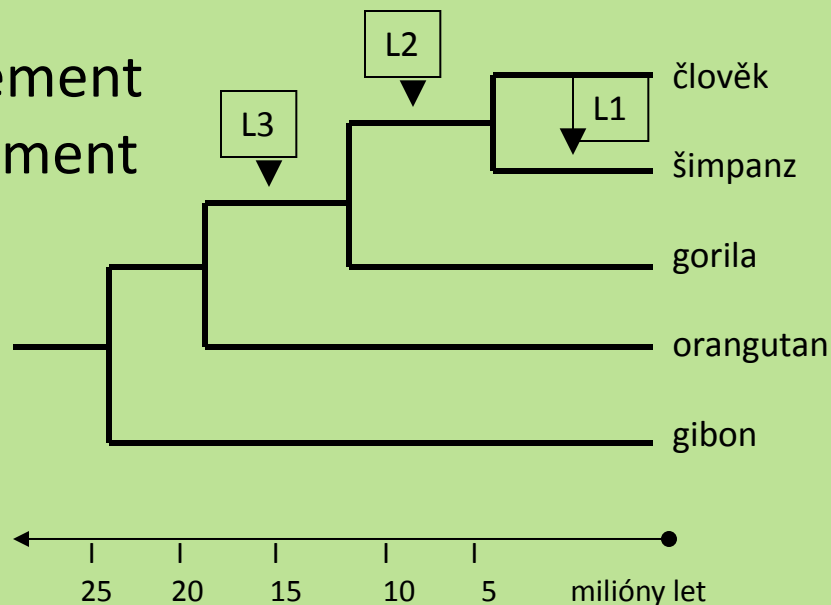
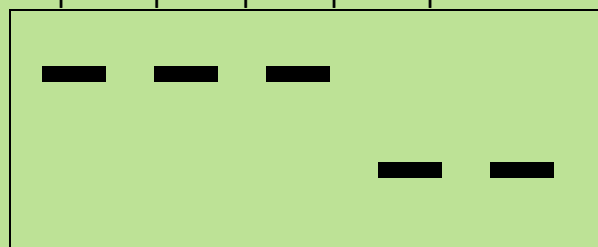


+ element
- element

člověk šimpanz gorila orangutan gibbon

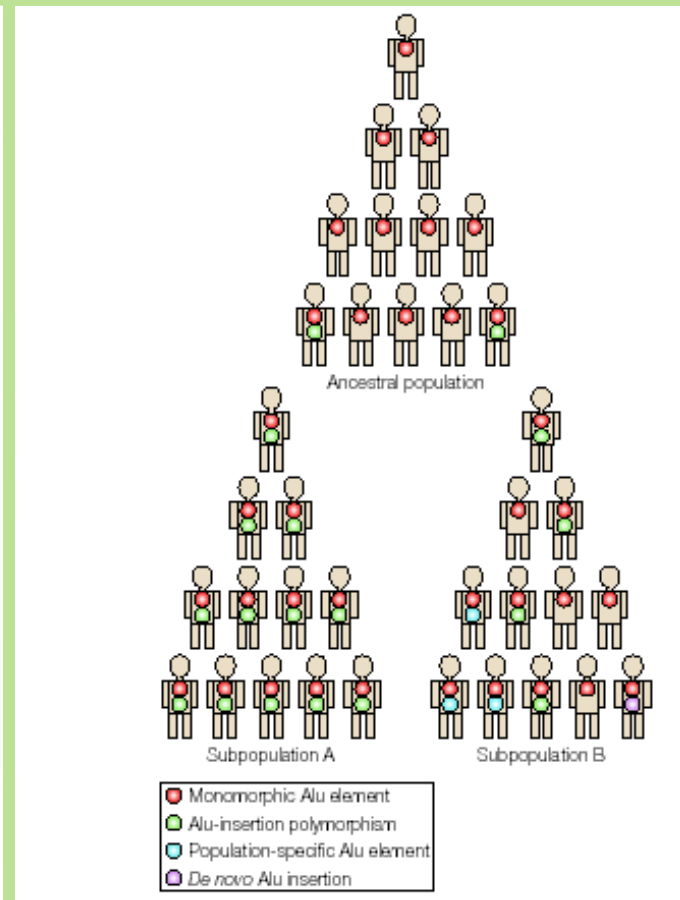
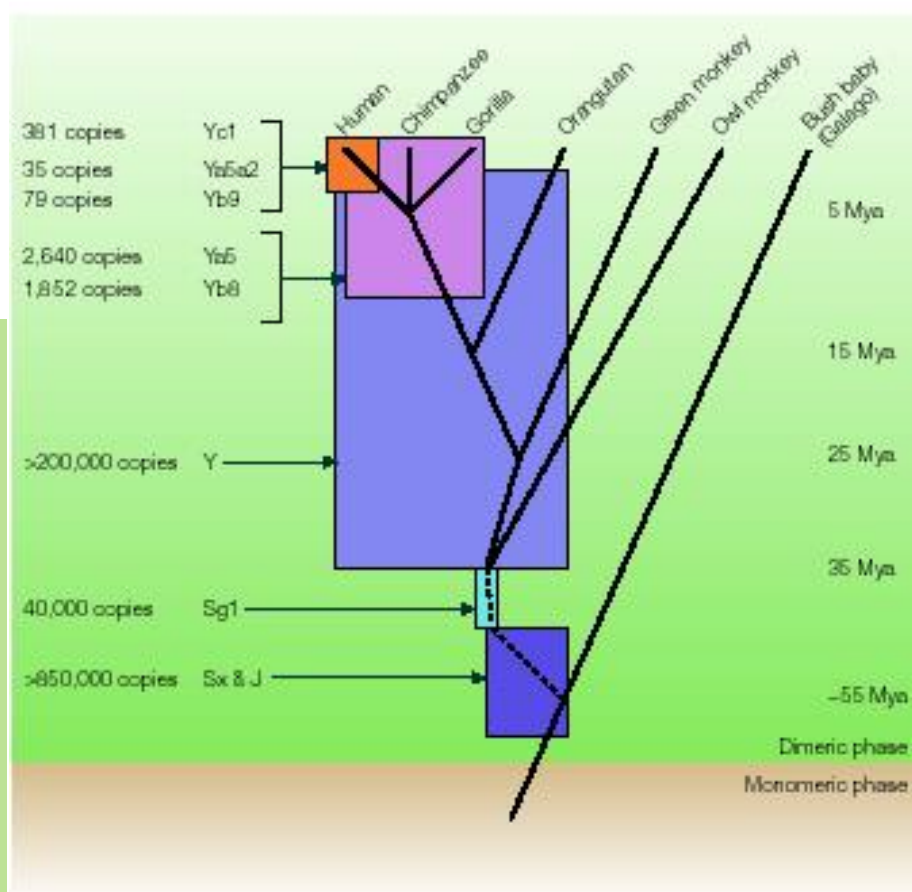


člověk šimpanz gorila orangutan gibbon



Inzerce retrotransposonu jako fylogenetická značka

Alu- elementy a lidská diversita



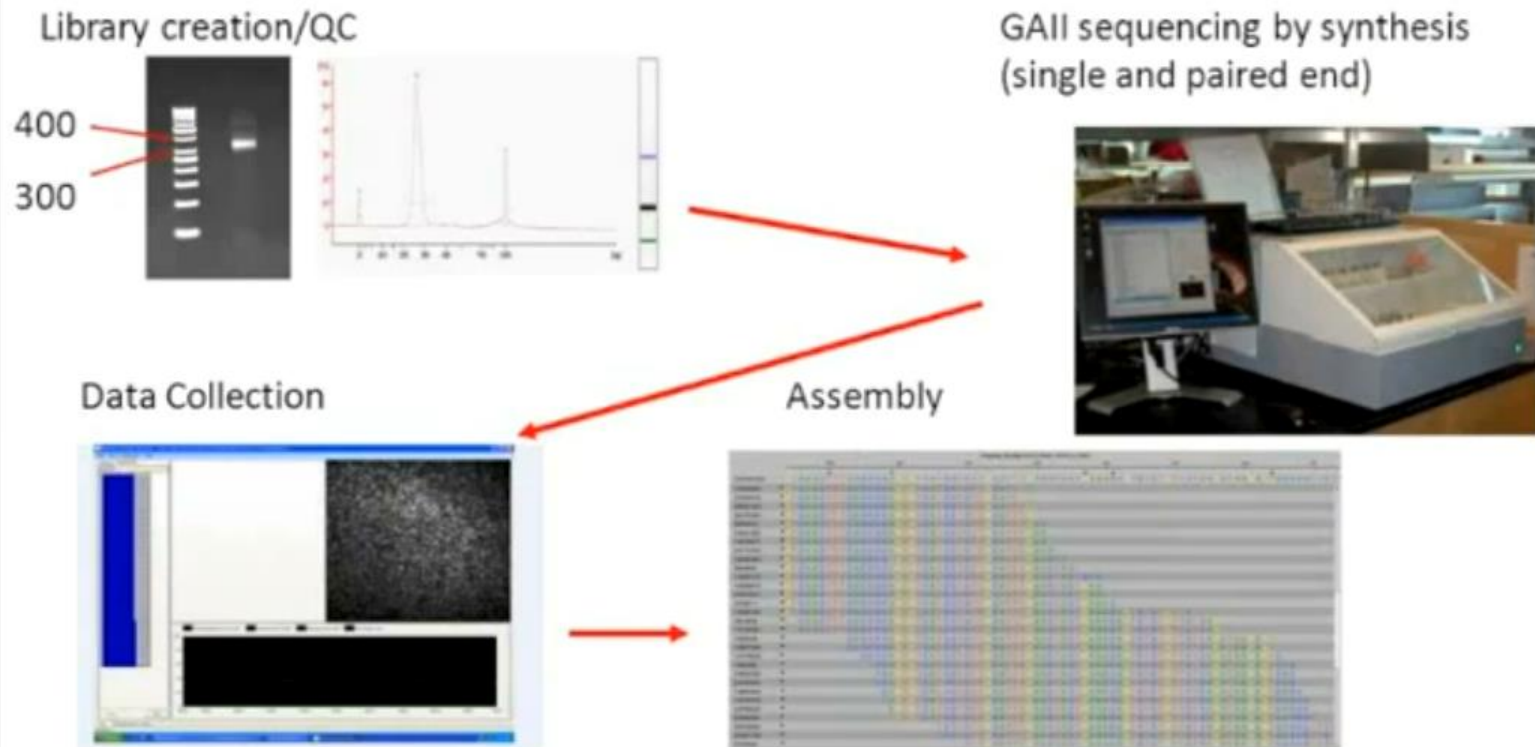
Retrotransposonové markery

Výhody:

- * Abundantní složka eukaryotických genomů
- * Dominantní (IRAP/SSAP) / ko-dominantní markery (RBIP)
- * Rychlá aplikace na nové druhy

Nevýhody:

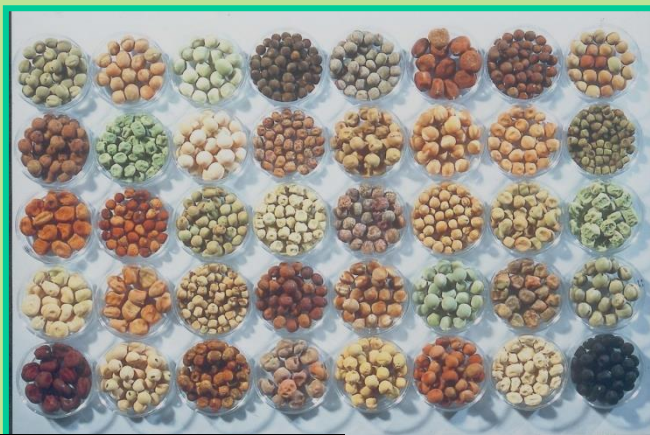
- Dominantní markery (IRAP/SSAP) nepřesné pro fylogenezi –
- vhodné pro studium vnitrodruhové diverzity
- Ko-dominantní (RBIP) – přesné, ale náročné na vývoj



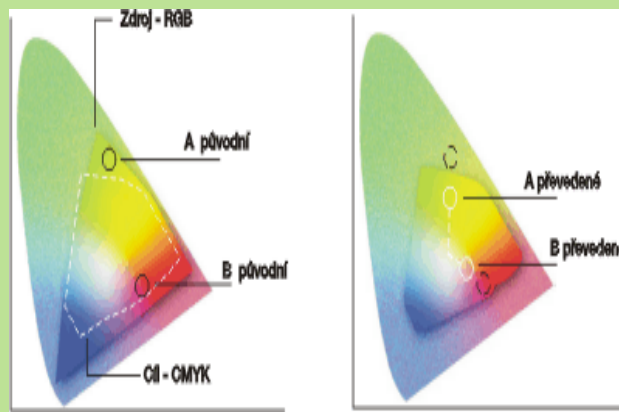
Genotyping technology is changing rapidly and markers are no longer limiting

Popis fenotypového projevu – subjektivita/objektivita hodnocení

Semeno-barva v plné zralosti



1. světležlutá
2. žltorůžová
3. vosková/dvoubarevná
4. žlutozelená
5. šedozelená
6. tmavozelená
7. světlehnědá
8. hnědá
9. černá

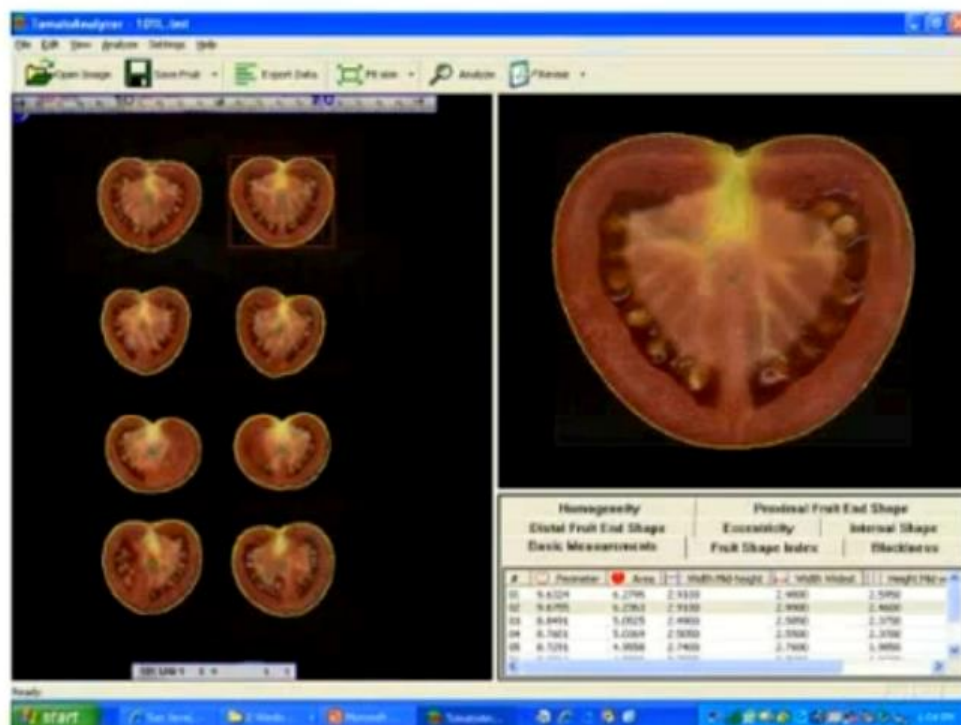


Číselné zhodnocení průměrných
pozic souřadnic L,a,b v CIE-LAB
barevném prostoru (3D)

Colour deviation: $\Delta E_{a,b}$
 $\Delta E_{a,b} = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$

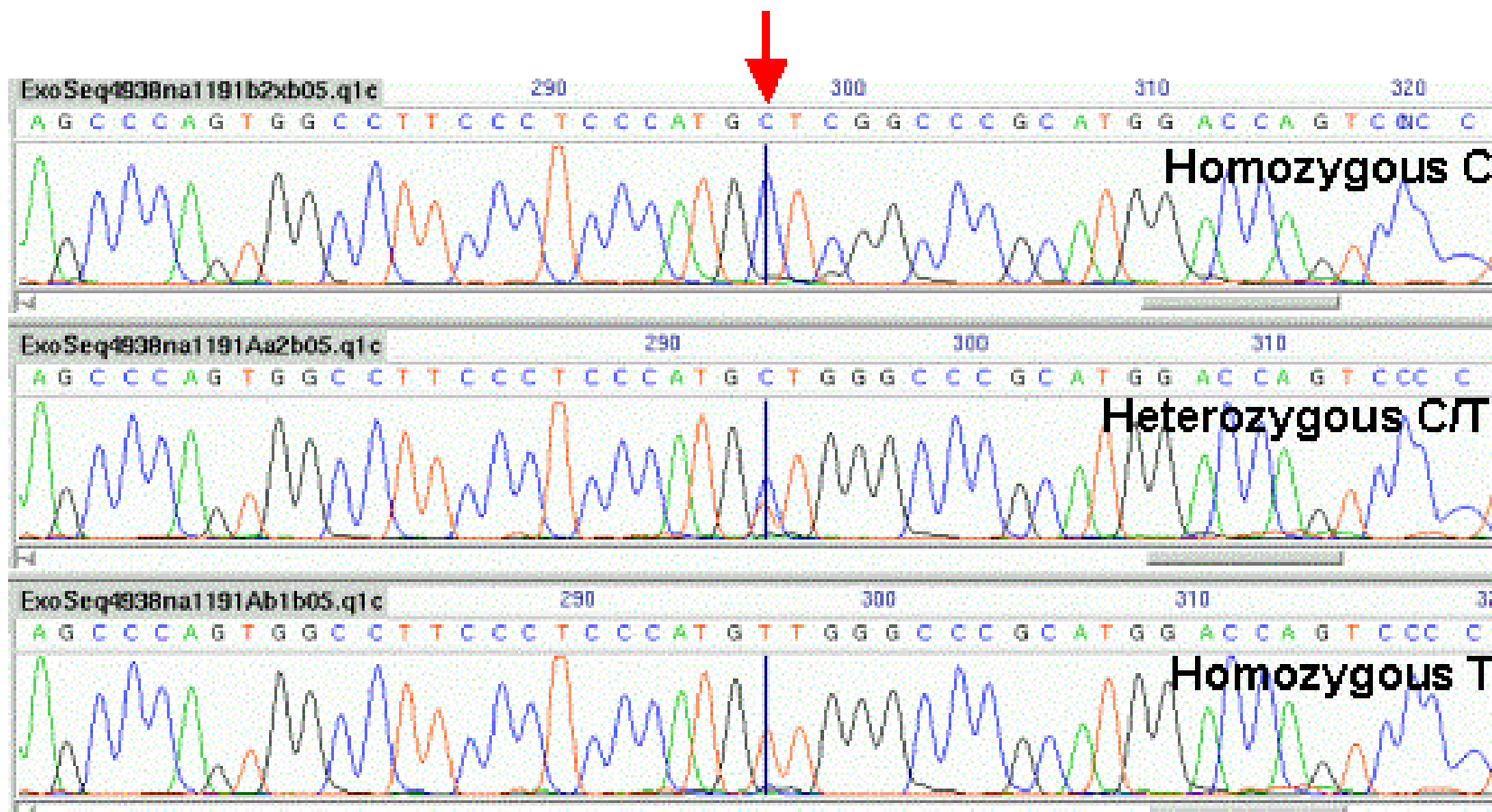
Example of fruit shape and fruit color

Phenotyping as an objective and archived resource: Tomato Analyzer
(Brewer et al., *Plant Physiology*, 2006, **141**, 15-25; Darrigues et al., 2008 *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133:579-586)



In many cases tools already exist to collect high quality objective phenotypic data

Single Nucleotide Polymorphism - SNPs



DNA variabilita



1 SNP scored in 1536 pea samples

Good uns	5	22	63	48	52
J11267	A	C	G	G	G
J11544	A	C	G	G	G
J1186	A	C	G	G	G
J115	G	C	G	G	G
J1267	G	C	G	G	G
J12376	G	C	G	G	G
J1166	G	C	G	G	G
J11844	G	C	G	G	G
J12546	A	C	G	G	G
J12200	G	C	G	G	G
J1321	G	C	G	G	G
J1399	G	C	A	G	G
J1228	G	C	A	G	G
J11975	G	T	G	T	A
J11435	G	T	G	T	A
J1113	G	T	G	T	A
J11775	G	T	G	T	A
J11829	G	T	G	T	A