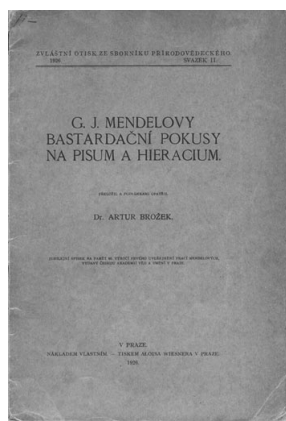


Mendelistická genetika

Mendelova práce

Se svými hybridizačními pokusy s hrachem (*Pisum* L.) začal Mendel v roce 1856 v klášterní zahradě na Starém Brně. Experimenty prováděl do roku 1868, když byl zvolen za opata kláštera. V únoru a březnu roku 1865 měl dvě přednášky před brněnskou Přírodovědeckou společností, kde komplexně představil svůj objev principů dědičnosti. Svou práci pak o rok později publikoval v němčině v časopise *Verhandlungen des Naturforschenden Vereines* pod názvem „*Versuche über Pflanzenhybriden*“ (Pokusy s rostlinnými hybridy).

Originální text si můžete prohlédnout na této adrese "Versuche über Pflanzen-Hybriden" (Vorgelegt in den Sitzungen vom 8. Februar und 8. März 1865): www.netspace.org/MendelWeb/MWGerText.html. Anglický překlad C.T. Druery a William Batesona z roku 1901 je zde "Experiments in Plant Hybridization": www.netspace.org/MendelWeb/Mendel.html. První překlad do češtiny provedl v roce 1926 Dr. Artur Brožek při příležitosti 60. výročí prvního uveřejnění prací Mendela.



Obsah článku

1. Úvodní poznámky
2. Volba pokusných rostlin
3. Rozdělení a uspořádání pokusů
4. Povaha míšenců
5. Prvá generace míšenců
6. Druhá generace míšenců
7. Další generace míšenců
8. Potomci míšenců, v nichž je spojeno více znaků odlišných
9. Pohlavní buňky míšenců
10. Pokusy s míšenci jiných druhů rostlinných
11. Závěrečné poznámky

Úvodní odstavce článku

"Umělá křížení, která byla na okrasných rostlinách konána za získání nových barevných odrůd, byla podnětem k pokusům, o nichž zde chci pojednat. Nápadná pravidelnost, s jakou se vždy vracejí tytéž míšeni formy, kdykoliv došlo k oplození stejnými druhy, byla výzvou k dalším pokusům, jejichž úkolem bylo sledovati vývin míšenců a jejich potomstva"

"Pojednání toto líčí ukázkou jednoho takového pokusu. Ten byl omezen samou povahou věci na malou skupinu rostlin a je nyní po uplynutí 8 let v podstatě skončen. Blahovolný posudek nechť rozhodne, zda-li postup, podle něhož byly jednotlivé pokusy uspořádány a provedeny, odpovídá vytčenému úkolu."

Plné citace dvou Mendelových prací z genetiky:

Gregor Mendel: *Versuche über Pflanzenhybriden* (Pokusy s rostlinnými hybridy). *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn* (Sborník přírodovědeckého spolku v Brně), IV. svazek, za rok 1865, tiskem 1866, v části *Abhandlungen* (Původní sdělení), s. 3-47.

Gregor Mendel: *Über einige aus künstlicher Befruchtung gewonnen Hieracium-Bastarde* (O některých bastardech jestřábníků získaných umělým oplodněním). *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn* (Sborník přírodovědeckého spolku v Brně), VIII. svazek, za rok 1869, tiskem 1869, v části *Abhandlungen* (Původní sdělení), s. 26-31.

Napsal i další práce z oblasti zoologie (1x) a meteorologie (9x).

Mendelův experiment - výběr rostlin a znaků

Mendel nebyl první, který se chtěl pokusit pomocí experimentu zjistit zákonitosti dědičnosti, jeho práce je však precizní model naplánovaného experimentu a analýzy. Dokázal pozoruhodný vhléd do metodologie vědeckého pokusu (vliv studií fyziky na Vídeňské univerzitě) a jeho nutnost pro experimentální biologii.



"Cena a význam každého pokusu je podmíněna vhodností pomůcek k němu použitých i účelným jich upotřebením. Ani v tomto případě, který předkládám, nemůže být lhostejné, které rostlinné druhy byly voleny za předmět pokusů a jakým způsobem tyto rostliny byly provedeny."

Výběr experimentálního materiálu

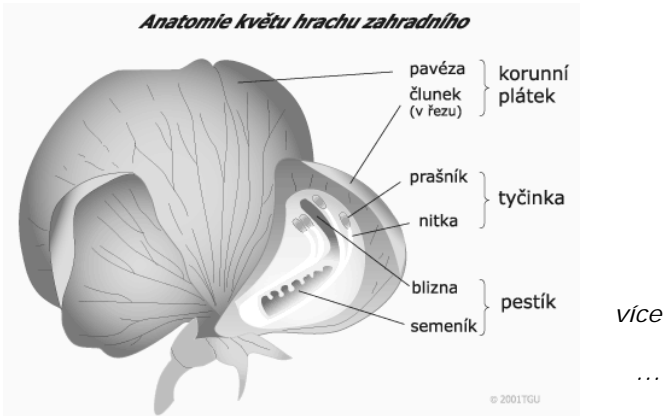
To, že nějaká pravidla dědičnosti existují, vyplývalo z různých zahradnických zkušeností, zejména při pěstování květin. Záměrným umělým oplodněním vypěstoval fuchsii, která se ještě neobjevila. Byla vsutku jedinečná. To že křížením mohou vznikat nové tvary a vlastnosti přivítal i opat Cyril Napp, který se sám věnoval šlechtěním révy a včel. Tuto jedinečnou fuchsii Mendel rozmnožoval řízkem, takže brzo měl mnoho stejných keříčků této tzv. Mendelovy fuchsie. Zjistil, že křížením se jedinečné znaky jeho fuchsie časem vytrácejí, na rozdíl od řízkování (tato skutečnost byla všeobecně známa). Jejich křížením navzájem se objevovaly původní tvary, ty nejjednodušší znaky se objevovaly a zase mizely.

Přesto Mendel tušil, že znaky fuchsie jsou příliš složité, aby ho dovedly k poznání podstaty dědičnosti. Mendel vybral organizmus, který snadno a nenáročně roste a mohl být uměle hybridizován. Rostliny hrachu se v přírodě samoopylují, ale také se snadno kříží, rychle se reprodukuje a ještě v téže sezóně dozraje.

"Pokusné rostliny musí nutně: 1. mít znaky trvale se různící; 2. míšenci jejich musí po dobu kvetení být chráněni před vlivem každého cizího pylu anebo musí se ho snadno uchránit; 3. míšenci a jejich potomci nesmějí utrpět žádné patrné poruchy plodnosti v pokoleních po sobě následujících."

Samčí a samičí pohlavní orgány se nacházejí u hrachu v jednom květu.

"Zvláštní pozornost byla již od počátku věnována leguminosám pro jejich zvláštní stavbu květu. Pokusy, které byly konány s členy této čeledi, dokázaly, že vyčteným požadavkům rod *Pisum* náležitě vyhovuje. Nemůže nastat snadno porucha vlivem cizího pylu, ježto pohlavní ústrojí se uzavírají těsně člunkem a prašníky pukají již v poupěti, takže blizna je již před rozkvetením pylem pokryta. ... Umělé oplozování ovšem je poněkud obtížné, nicméně daří se skoro vždycky."



Proč musel Mendel obcházet pokusné záhonky s lupou, pinzetou a malými nůžkami a upravovat květy hrachu?

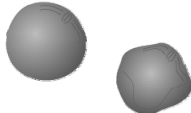
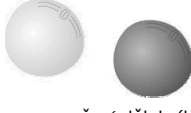
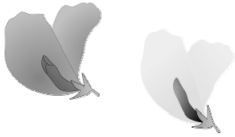


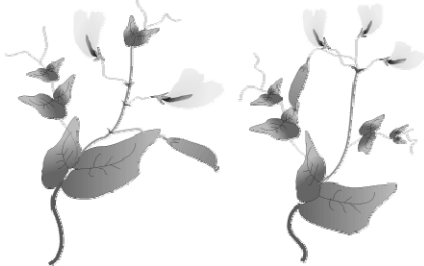



Neznáme přesně, které variety hrachu Mendel přesně používal. Ve svém spise popsal, že sledoval dostupné variety hrachu své doby (celkem vybíral z 34 různých druhů a variet) a můžeme se domnívat, že byly podobné jako na ilustraci z Album Benary (1876-93).

Mendel si pečlivě zapisoval velké rozpětí vlastností hrachů. Rozvážil si výběr specifických párů znaků pro své pokusy, tak aby byly zřetelné a jednoznačně pozorovatelné. Přestal sledovat znaky, jejichž varianty byly málo odlišitelné.

Studované znaky

Nakonec se Mendel rozhodl (po dvouletém zkoušení) pro sedm vlastností: výška rostliny (vysoká x zkrácené), barva semene (zelené x žluté), tvar semene (hladké x svraštělé), barva slupky semene (zbarvená - šedá x bílá), tvar lusku (naplněný x svrasklý), barva lusku (zelený x žlutý), rozdělení květů (podél lodyhy x na konci lodyhy).

 <p>1. 'Rozdíl ve tvaru zralých semen' - kulatý (<i>R</i>) nebo (<i>r</i>) pravidelně hranatý až hluboce vrásčitý tvar (gen na 7. chromozomu) Charakter dělohy vrásčitého tvaru v mutantní formě se projeví při zrání. Tenká vrstva osemení se hroutí kolem semene během zrání.</p>	semena
 <p>2. 'Rozdíl ve zbarvení endospermu' <small>označení děloh (kotyledonů)</small> - žluté až oranžové (<i>I</i>) a (<i>i</i>) zelené dělohy (gen na 1. chromozomu) Tato vlastnost se projevuje při zrání semene. Nezralé dělohy jsou zelené a nedostatek chlorofylu poruchou jeho tvorby, který charakterizuje zelený mutantní fenotyp.</p>	
 <p>3. 'Rozdíl ve zbarvení květu' - zbarvený (<i>A</i>) a bílý (<i>a</i>) květ (gen na 1. chromozomu) Lze hovořit i o znaku barvy osemení. Je-li bílá a zároveň průsvitná, tak je vidět barva děloh. Tyto rostliny mají bílé květy. Nebo je slupka zbarvena šedě až do hněda. Pokud měly fialové puntíky, pak neměly rostliny bílé květy, ale pavéza květu byla fialová, křídla purpurová a stonek v paždí listů je červeně prokresleny. Přítomnost pigmentů v semeni je vázán na barvu květu. Lokus je asociován s přítomností nebo nedostatkem pigmentu v květu.</p>	květ
 <p>4. 'Rozdíl ve tvaru zralého lusku' - jednoduše klenutý (<i>V</i>) a zaškrncený (<i>v</i>) lusk (gen na 4. chromozomu) Parchment je vrstva sklerenchymu, který se vyvíjí jako vnitřní vrstva stěny lusku. Výsledkem je hladká stěna nebo svrásťelá, kdy lusk sleduje tvar jednotlivých semen.</p>	lusk
 <p>5. 'Rozdíl ve zbarvení nezralých lusků' - zelený (<i>Gp</i>) a nažloutlý (<i>gp</i>) lusk (gen na 5. chromozomu)</p>	
 <p>6. 'Rozdíl v postavení květů' - rozdělení lusků (květů) podél lodyhy (<i>Fa</i>) a na konci lodyhy (<i>fa</i>) (gen na 4. chromozomu)</p>	

 <p>7. 'Rozdíl v délce stonku'</p> <ul style="list-style-type: none"> - delší (normálně vzrostlé rostliny; 6 až 7 coulů vzdálená jednotlivá odvětvení) a kratší internodia (zakrslé rostliny; ¾ až 1½ coulu vzdálená jednotlivá odvětvení) - gen na 4. chromozomu 	stonek
---	---------------

Podstata Mendelových experimentů

Již od dětství byl Johann obklopen přírodou. Vyrůstal na zemědělské usedlosti s ovocným sadem a chovem včel. Od dětství cítil z přírody působení sil "tajemného" zákona, který řídí v přírodě veškeré dění. Začínal mít tušení, že může odhalit tajemství tvůrce, že mu nestačí pouze uznávat zákony a využívat je, ale pátrat po příčinách a pozadí zákonů. Již svým teologickým vzděláním tušil, že není jen jeden zákon, který vše řídí, ale je mnoho zákonů, které řídí běh přírody. V jeho tušení jej podporovali učitelé všech škol, kterými procházel (farář Schreiber, učitel Hynčické školy Thomas Makitta, ředitel opavského gymnázia a augustiniánský mnich Schaumann, Profesor Franz z Olomoucké univerzity, ...).

Filozofie experimentů : Mendel jako neznámý badatel byl veden jednou velkou myšlenkou, že se vlastnosti dědí podle pravidla „buď vše nebo nic“. Tato myšlenka jej napadla, i když se obecně myslelo, že křížením vznikají jedinci s vlastnostmi s průměrnou hodnotou obou rodičů – **teorie míšení** (kterou se zabýval i Charles Darwin). Všechny dědičné znaky by se podle této teorie stále více "průměrovaly" až by nakonec na světě byli všichni lidé (a organizmy obecně) úplně stejní - zprůměrování (a to by se týkalo i pohlaví!; a jak by docházelo k evoluci?). Při pokusech v klášterní zahradě přišel na myšlenku, že sám znak není rozhodující, ale že je výrazem něčeho, co spočívá hlouběji. Z této apriorní teoretické představy vypracoval svůj pokus.

Cíl pokusu: Porovnat změny pro dva odlišné varianty znaku a určit zákonitost, podle níž se tyto varianty znaku vyskytují, všeobecně platný zákon vzniku hybridů.

"Spojí-li se oplozením dvě rostliny, které se trvale liší v jednom nebo více znacích, pak přecházejí, jak četné pokusy dokazují, společné znaky beze změny na míšence i jejich potomky; každé dva znaky odlišné na míšenci spojují se ve znak nový, který obyčejně na jejich potomstvu je podroben vždy týmž proměně. Úkolem pokusu bylo pozorovat tyto změny vždy pro dva odlišující znaky a vyšetřit zákon, podle něhož tyto v generacích po sobě se vyskytují. Ten se tedy skládá z právě tolika pokusů jednotlivých, kolik se na pokusných rostlinách vyskytuje znaků trvale odlišných."

Čistota pokusného materiálu: Nejdříve musel prokázat, že jednotlivé odrůdy hrachu jsou "čisté". Vybíral z 34 různých odrůd hrachu. Mendel nespolehal na označení od obchodníků a zvolené odrůdy pěstoval izolovaně tak dlouho, dokud nevykazovaly žádné rozdílné znaky. Systematickým pěstováním se mu za dva roky podařilo získat čisté linie hrachů.

Sledované znaky: Mendel pracoval se sedmi znaky, viditelnými rysy, které se vyskytují v kontrastních (odlišitelných) formách (dominantní a recesivní).

Pěstování rostlin: Většinu pěstoval na zahradních záhonech, malou část v květináčích (kontrolní rostliny) ve skleníku v době kvetení.

Metody rozmnožování rostlin: Jako hlavní metodu používal křížení (hybridizaci) a umělé oplodňování. Mendel křížil vždy takové rostliny, které se trvale lišily v jednom

nebo více znacích, vypěstoval potomstvo a počítal, s jakou četností a v jakých kombinacích se rodičovské znaky objeví u potomků. Měl také kontrolní rostliny. Ve všech pokusech prováděl reciproká křížení. Musel také hlídat rostliny od nechtěného opylování hmyzem (Mendel uvádí jak "hlavního" škůdce brouka *Bruchus pisi*).

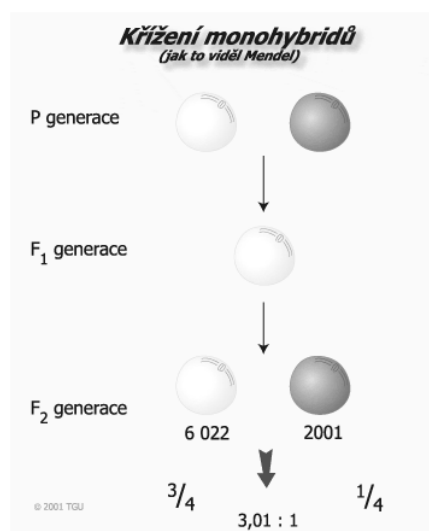
Evidence výsledků: V roce 1856 začal Mendel provádět hlavní pokus umělého oplodňování mnoha rostlin. Pečlivě a přesně zapisoval veškeré výsledky (sledoval přes 28 000 rostlin!; podrobně vyšetřoval 10 000 rostlin). Tento postup využívaný fyzikou či chemií použil jako první v biologii. Dosud se také v biologii popisovaly jen jednotlivé části živých organismů, Mendel sledoval rostlinu jako ucelenou bytost. Svou hypotézu položil tak, aby získal jen konkrétní odpověď, jak tomu bylo u fyzikálních pokusů.

Matematické vyhodnocení: V jeho práci se dále objevují matematické a statistické výrazy. Stejný postup využívá i současná genetik, rozdíl je jen v tom, že jej Mendel prováděl před 150 lety.

Vztah mezi geny, chromozomy a dělením buňky nepřímo objevil Mendel.

Monohybridní křížení

Mendel speciálně křížil rostliny hrachu, které se lišily jedním znakem - monohybridní křížení. Jako příklad zde uvádíme křížení rostliny se žlutými a se zelenými semeny (čistých linie - parentální generace P). Všechny rostliny hybridní (F₁) měly barvu semene žlutou.



Co je vidět v F₁ generaci? Vždy vidíme jeden z obou rodičovských fenotypů v této generaci. Ale F₁ vlastní informaci potřebnou k produkci obou rodičovských fenotypů v následující generaci. F₂ generace vždy produkuje poměr 3:1, kde dominantní vlastnost je přítomna třikrát více než recesivní.

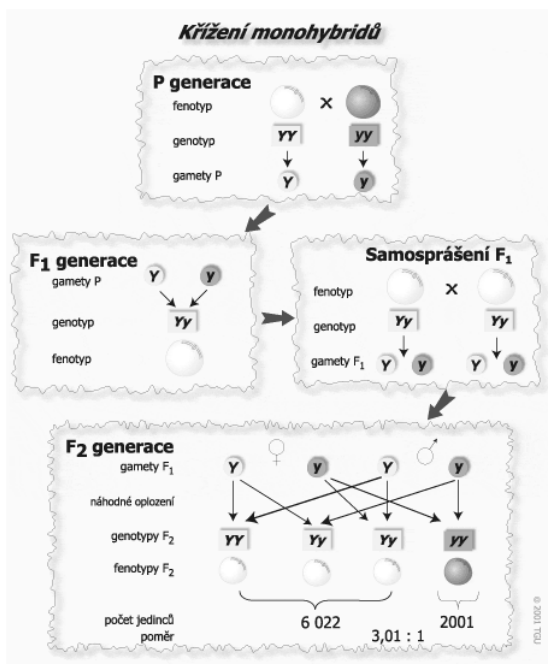
Mendel vytvořil dva termíny k popisu vztahu dvou fenotypů na základě fenotypů F₁ a F₂ generace:

Dominantní alela, která se projevuje vždy vůči alternativní alele; fenotyp, který se projevuje v F₁ generaci z kříže dvou čistých linií.

Recesivní alela, jejíž exprese je potlačena přítomností dominantní alely; fenotyp, který se ztrácí v F₁ generaci z křížení dvou čistých linií a objevuje se znovu v F₂ generaci.

Výsledky z monohybridního křížení sledovaných sedmi vlastností

P křížení	F ₁ fenotyp	F ₂ počet fenotypů	F ₂ poměr
kulatá x svrasklá semena	kulatá	5474 kulatá a 1850 svrasklá	2,96 : 1
žlutá x zelená semena	žlutá	6022 žlutá a 2001 zelená	3,01 : 1
květy fialové x bílé	fialové	705 fialové a 224 bílé	3,15 : 1
vysoké x zakrslé rostliny	vysoké	787 vysoké a 227 zakrslé	3,84 : 1
lusky jednoduše klenuté x zaškrčené	jednoduše klenuté	882 jednoduše klenuté a 299 zaškrčené	2,95 : 1
zelené x žluté lusky	zelené	428 zelené a 152 žluté	2,82 : 1
květy podél osy x na konci osy	květy podél osy	651 podél a 207 na konci osy	3,14 : 1



Rodičovská generace (P):

YY (žluté), yy (zelené)
zárodečné buňky mají výbavu Y (žluté), y (zelené)

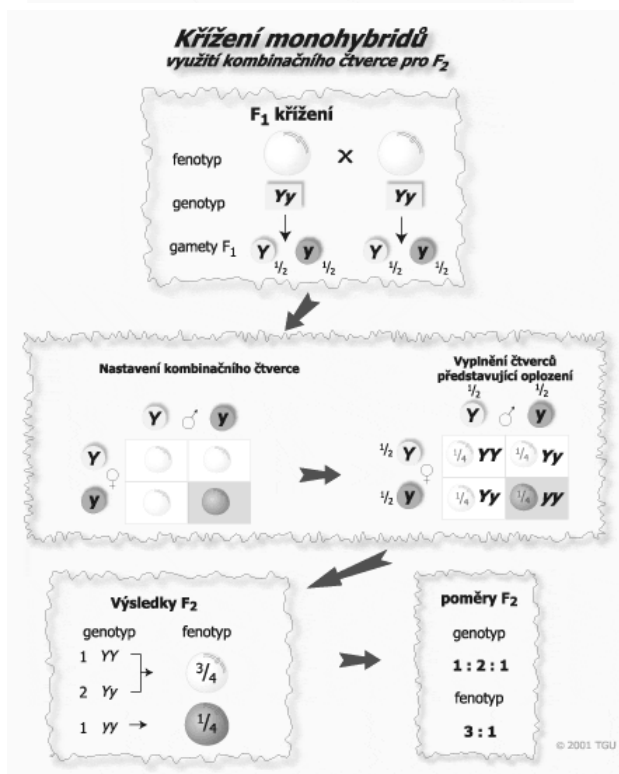
1. hybridní generace (F1):

$Y \times y \rightarrow Yy$ (všechny dceřiné rostliny žluté, neboť alela Y je dominantní); zárodečné buňky mají výbavu $Y + y$ (stejný počet zárodečných buněk, které mají jen Y a těch, které mají jen y)

2. hybridní generace (F2):

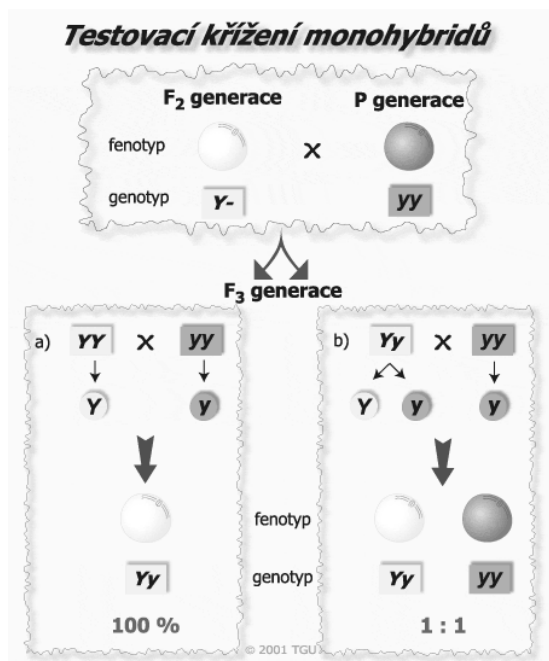
$(Y + y) \times (Y + y) \rightarrow YY + Yy + Yy + yy$ (3/4 rostlin se žlutými semeny, 1/4 se zelenými semeny, neboť alela Y je dominantní)

F₂ generace byla stvořena křížením F₁ rostlin mezi sebou. To může být zobrazeno graficky pomocí kombinačního (Punettova, Mendelova) čtverce nebo pomocí kombinované pravděpodobnosti.



Potvrzení hypotézy Mendelova prvního principu





Můžeme se zajímat o poměr dědičných faktorů u F_1 hybridní generace. Lze jej sice vyvodit z poměru 3:1 u F_2 hybridní generace, avšak lze dát přednost přímé testovací metodě. Mendel prováděl proto pokusy testovacího "zpětného" křížení. Jednotlivci F_1 hybridní generace se při ní nekříží mezi sebou, ale s tím rodičem, který nese recesivní znak. Místo F_2 hybridní generace bylo provedeno zpětné křížení:

$(Y + y) \times y \rightarrow Yy + yy$ (žlutá a zelená semena v poměru 1:1)

Na obrázku je kompletní testovací křížení F_2 generace s dominantním znakem a P generace s recesivním znakem. Toto schéma obsahuje i speciální zpětné křížení.



Mendelovy závěry z monohybridního křížení

1. Rozhodující činitelé dědičnosti jsou částicové povahy. Tyto determinanty se dnes nazývají *geny*.
2. Každý rodič má pár genů v každé buňce pro každou vlastnost. F_1 generace z křížení dvou čistých linií obsahuje jednu alelu dominantní a jednu recesivní. Tyto dvě alely tvoří genový pár.
3. F_1 potomci vykazují pouze jeden rodičovský znak - dominantní.
4. Výsledky reciprokého křížení byly stejné, bez ohledu na to, který z rodičů (otec matka) předal dominantní či recesivní alelu.
5. Vlastnost, která se neprojevila v F_1 generaci se znovuobjevila v F_2 generaci u 25 % potomků. "Je zřejmo, že míšenci vždy pro dva odlišující se znaky tvoří semena, z nichž vždy jedna polovina tvoří opět formu míšence, kdežto druhá dává rostliny, které zůstávají stálými a ve stejném počtu znaků dominantní a recesivní získají."
6. Vlastnosti zůstali nezměněné u potomků, ani se nesměšily, ale chovaly se jako oddělené jednotky.
7. Jeden člen genového páru segreguje do gamet, takže každá gameta nese pouze jeden člen genového páru.
8. Gamety se spojují náhodně a bez ohledu na jiné genové páry spojené.
9. Velká písmena představují dominantní vlastnost a malá recesivní.

Z těchto výsledků Mendel formuloval své první závěry:

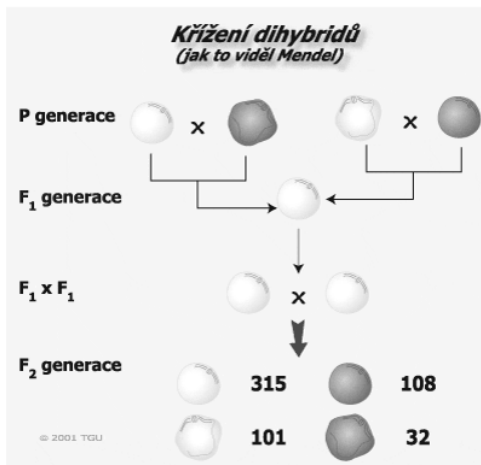
Mendelův první princip - princip párů faktorů; vlastnosti jsou kontrolovány jednotkovými (diskrétními) faktory, které jsou v párech v každé buňce, v každém organismu

Mendelův druhý princip - princip dominance; faktory, které se projeví v F_1 generaci jsou **dominantní** a ty co se skryly nebo neprojevily v hybridní F_1 generaci jsou **recesivní** (tyto pojmy označují také vlastnosti, těmito alelami determinovanými)

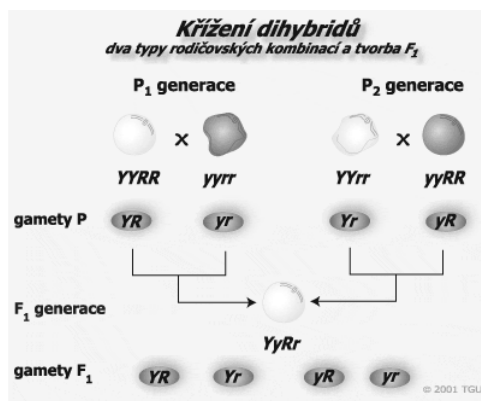
Mendelův třetí princip - princip segregace; během formování gamet se každý člen alelického páru odděluje od druhého, aby se vytvořila genetická konstituce gamety, takže gameta obdrží jeden nebo druhý faktor

Dihybridní křížení

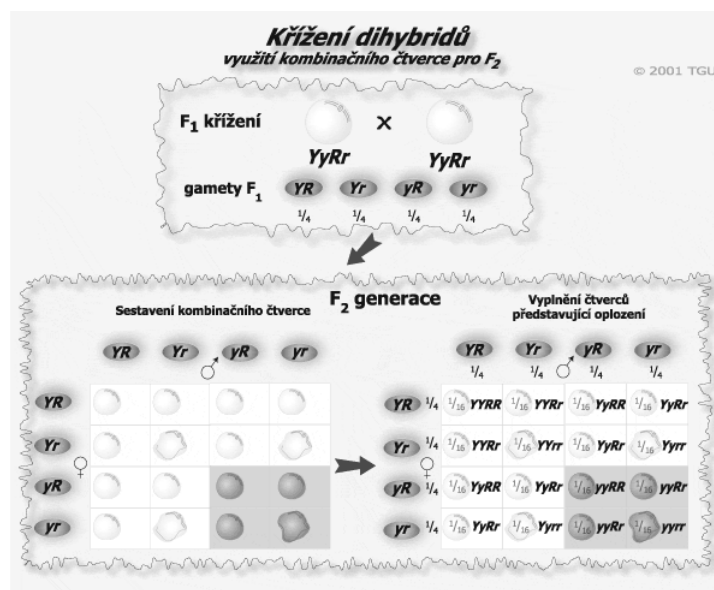
Dosud jsme sledovali expresi pouze jednoho genu. Mendel také prováděl křížení, v kterých sledoval segregaci dvou genů. Tyto experimenty tvořily základ jeho objevu druhého principu volné kombinovatelnosti (nezávislého třídění).

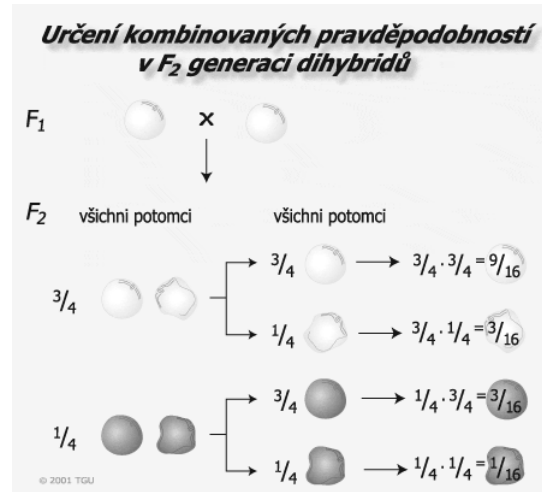
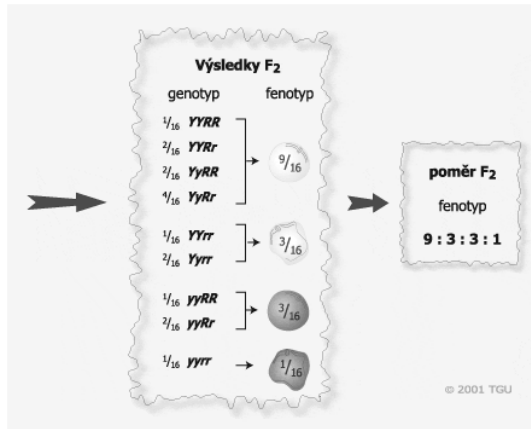


Vztah dominance mezi alelami pro každou vlastnost, byl Mendelovy znám již při jednoduchém křížení. Cílem dihybridního křížení bylo určit, zda existuje nějaký vztah mezi různými alelickými páry. Zde je příklad, kde se sleduje barva semene a tvar semene.

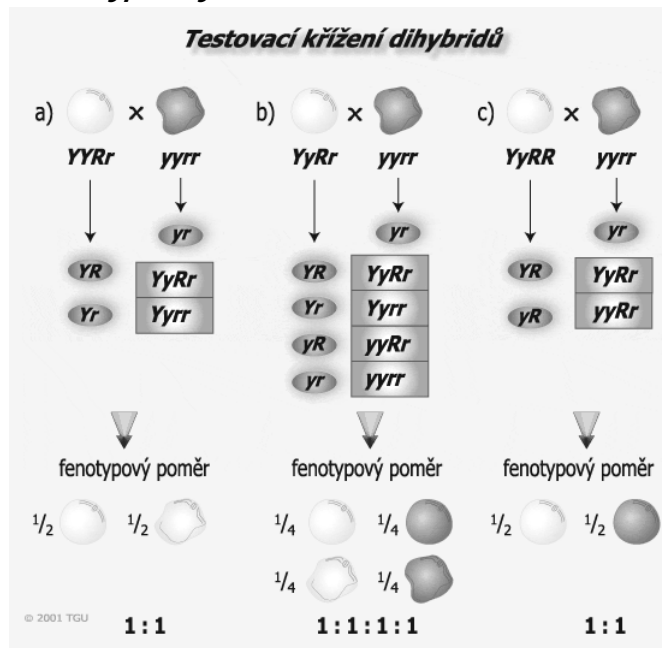


- rodičovská generace (P):
rostliny $YYRR$ (žluté-kulaté), zárodečné buňky YR
rostliny $yyrr$ (zelené-vrásčité), zárodečné buňky yr
- 1. hybridní generace (F₁):
 $YR \times yr \rightarrow YyRr$ (všechny rostliny žluté-kulaté).
zárodečné buňky: $YR + Yr + yR + yr$





Testování hypotézy



Skutečnou "sílu" znaků ukáže metoda testovacího křížení ve složitějších případech, kdy se rodičovské rostliny liší v alelách dvou znaků. *Zpětné křížení* hybridu YyRr (příklad b) s rodičem, který má ve vybavě recesivní znaky, vede k jednoduchému výsledku:

$$(YR + Yr + yR + yr) \times yr \rightarrow YyRr + Yyrr + yyRr + yyrr$$

(všechny čtyři typy rostlin byly ve stejném počtu > 1:1:1:1)



Mendelovy závěry z dihybridního křížení

1. Hybridní F₁ potomci vykazují pouze jednu variantu obou rodičovských znaků - vždy dominantní.
2. V F₂ generaci se objeví nové typy, které se v ničem nepodobají rodičům (v našem případě žluté-vrásčité semena; zelená-kulatá semena). Vzniknou rekombinací dědičného materiálu a označují se proto jako rekombinanty.
3. Rekombinace dědičných faktorů probíhá podle pravidel pravděpodobnosti. Alely dědičných faktorů jsou v každé nové generaci náhodně vybírány.
4. U hybridní F₂ generace se projeví všechny kombinace rodičovských vlastností ve specifickém poměru: 9:3:3:1.

Z těchto výsledků Mendel formuloval své závěry:

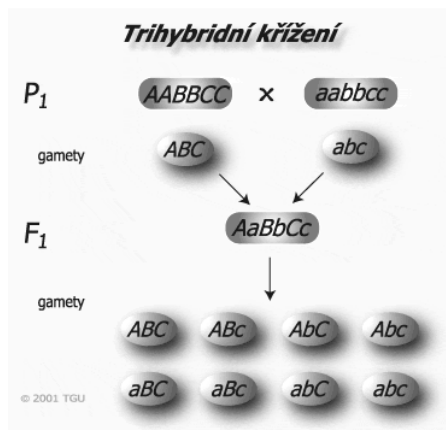
Mendelův čtvrtý princip – princip volné kombinovatelnosti; během formování gamet je segregace alel jednoho alelického páru nezávislá na segregaci alel jiného alelického páru. "Stálé znaky, které se vyskytují na různých formách nějakého rostlinného kmene, opětovně umělým oplozováním mohou vstoupiti do všech sestav,



„které jsou možné podle kombinačních pravidel.“ „Míšenci tvoří zárodkové a pylové buňky, které ve stejném počtu odpovídají všem stálým formám, jež povstávají z kombinování znaků spojených oplozením.“

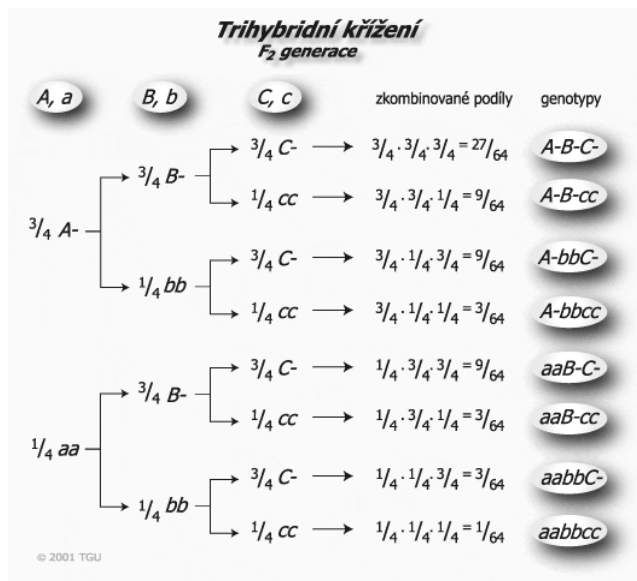
Trihybridní křížení

Ačkoliv je trihybrid více komplexnější než dihybrid, výsledky jejich křížení je opět snadné vypočítat, jestliže se držíme pravidel segregace a volné kombinovatelnosti. Příkladem může být následující schéma .



Jednotlivé genové páry představují teoretické odlišitelné vlastnosti a jsou symbolizovány jako A/a , B/b a C/c .

Opět křížením dvou homozygotních rodičů ($AABBCc$ a $aabbcc$) vzniká hybridní F_1 generace ($AaBbCc$). Tito hybridní produkují osm různých kombinací gamet ve stejné frekvenci (stejně pravděpodobnosti přenosu).



Pro zobrazení F_2 generace vzniklé křížením F_1 můžeme použít kombinační čtverec. Byl by to však čtverec o stranách 8×8 jednotlivých buněk, tedy 64 políček. Protože takovéto zobrazení je již těžkopádnější a méně přehledné, používá se na odvození F_2 generace jiná metoda - rozvětvací diagram.

Ta je použita v případě trihybridního křížení. V F_2 generaci bude pro každý gen platit poměr 3:1. Je třeba aplikovat zákon součinu pravděpodobností. Fenotypový podíl u trihybrida je 27:9:9:9:3:3:3:1.

Jednoduchá matematická pravidla užitečná v řešení genetických problémů

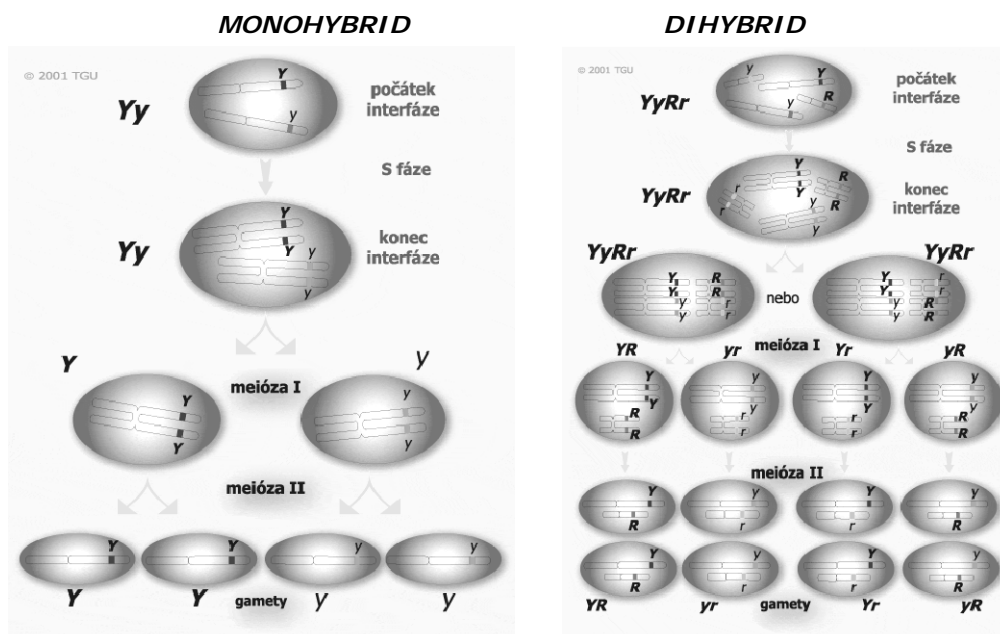
Počet heterozygotních párů alel	$n=1$	$N=2$	$n=3$	obecně
Počet F_1 gamet	2	4	8	2^n
Podíl recesivních homozygotů v F_2	1/4	1/16	1/64	$1/(2^n)^2$
Počet různých F_2 fenotypů (při úplné dominanci u všech alelických párů)	2	4	8	2^n
Počet různých genotypů (nebo fenotypů není-li zde dominance)	3	9	27	3^n

Vícehybridní křížení F_1 generace, kde n je počet genů segregujících se 2 alelami.



Moderní pojetí Mendelovy práce

Zde si můžete porovnat výsledky Mendelova pokusu (který mohl sledovat pouze fenotypové rozdíly) a dnešním pojetím genu, jeho lokalizace na chromozomech, pohybem chromozomů během buněčného dělení a vlastním dělením buňky.



Závěr a důsledky Mendelových pokusů

"Pokusíme se získané výsledky krátce shrnout, nalézáme, že ony odlišující se znaky, které na pokusných rostlinách se snadno a určitě dají rozeznati, v míšeném spojení zachovávají úplně stejné poměry. Potomci míšenců pro každé dva odlišující znaky jsou v polovině případů opět míšenci, kdežto v druhé polovině jsou ve stejném počtu podle znaku rostlin matečné a otecké stálí. Je-li spojeno oplozením v některém míšenci více odlišujících se znaků, pak tvoří potomci jejich členy kombinační řady, ve které jsou spojeny vývojové řady vždy pro dva odlišující znaky.

Úplný souhlas, který vykazují všechny znaky podrobené pokusu, zajisté připouští a opravňuje předpoklad, že stejné poměry přísluší též ostatním znakům, které na rostlinách méně určitě vystupují a proto nemohly býti pojaty do jednotlivých pokusů."

Mendel ve své práci přesně zdůvodnil, proč se mu jevil hrách jako obzvláště vhodný modelový organizmus pro vyřešení dané otázky. Při pokusech křížení se soustředil na hodnocení jednotlivých, jednoduchých a dobře rozeznatelných, párově se vyskytujících jevů. U všech popsal hodnocené znaky a podrobil je statistickému hodnocení. Mendel zjistil, že v 1. generaci mají všichni kříženci stejný vzhled (*uniformita F_1 generace*), přičemž je na nich možné rozeznat buď jeden z hodnocených znaků (ten nazval Mendel "*dominantní*", opačný - ustupující - je "*recesivní*"), nebo mají přechodnou podobu. Ve 2. generaci kříženců vystupují původní znaky při hodnocení jednoho páru dědičných znaků v poměru 3:1 (ve prospěch dominantního znaku), nebo 9:3:3:1 při hodnocení dvou párů znaků. Hodnocené znaky se tedy od 2. generace zákonitě štěpí (*segreguje*). Při křížení s více znaky se pak nové formy, jejich počet i poměrné zastoupení řídí zákony kombinatoriky. Každý jednotlivý znak je tedy nezávislý na jiných a může být samostatně děděn (*volná kombinovatelnost*).

Nezanedbal však ověření svých závěrů také na jiných rostlinných druzích. Jeho práce má proto název "*Pokusy na rostlinných hybridech*". Zavedl přílehlavou symboliku, aby mohl své hypotézy ověřit ve vzorcích. Tehdy to byl postup zcela jiný, než rozvláčný popis jeho současníků, jako byl třeba Charles Darwin. Nejdůležitější na Mendelově práci je myšlenkový postup. Ze statistické analýzy, vyhodnocení mnoha jedinců, vyvodil organizaci dědičného materiálu pro každého z těchto jedinců. Mendel dospěl k platným závěrům, přestože v jeho době nebylo ještě možno zkoumat dědičné faktory biochemicky a jen nepřímou se usuzovalo, že existují. Mendelova myšlenková metoda položila základy genetického bádání, které přetrvaly až do současné molekulární genetiky.



Využití teorie pravděpodobnosti v genetice

Pravděpodobnost a genetiky

Základní definice

Jev je výsledek každého pokusu.

Pokus je uskutečnění určitého systému podmínek (např. vrh kostkou).

Rozdělení jevů:

- 1) **Náhodné jevy** jsou jevy, které při provedení daného pokusu mohou, ale nemusí nastat (např. objevení se líce při házení mincí; rozchodu chromatid chromozomů či spojování gamet).
- 2) **Jisté jevy** jsou jevy, které se při provedení daného pokusu uskuteční vždy, s pravděpodobností rovnou 1.
- 3) **Nemožné jevy** jsou jevy, které se při provedení daného pokusu nikdy neuskuteční, s pravděpodobností rovnou 0.

Definice pravděpodobnosti

Klasická - Laplaceova definice:

$$P(A) = \frac{m}{n} \quad \text{kde } n \text{ je počet případů možných,} \\ m \text{ je počet případů příznivých.}$$

Statistická definice:

Provedeme-li n pokusů a jev A se uskuteční přitom m -krát, pak m je četnost jevu a $\frac{m}{n}$ je relativní četnost jevu. Statistickou pravděpodobností jevu A je číslo, kterému se

blíží relativní četnost jevu A , tj. $P(A) = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{m}{n}$

Genetické poměry jsou vhodně vyjádřeny jako pravděpodobnosti (tj. $\frac{3}{4}$ vysoké: $\frac{1}{4}$ nízké). Tyto hodnoty předpovídají výsledek každého oplození, takže pravděpodobnost výskytu zygoty s genetickým potenciálem pro vysoký vzrůst je $\frac{3}{4}$, zatímco potenciál pro nízký vzrůst je $\frac{1}{4}$. Pravděpodobnost má rozpětí od 0 (kdy se jev určitě nestane) do 1,0 (kdy se jev určitě stane).

Zákon součinu a součtu

Když se dva nebo více jevů děje náhodně a nezávisle jeden na druhém (stochasticky nezávislé, jestliže pravděpodobnost jednoho z nich nezávisí na tom, zda se druhý jev uskutečnil nebo ne), ale ve stejném čase, můžeme spočítat pravděpodobnost, s kterou se budou vyskytovat oba jevy (průnik). Zde se aplikuje **zákon součinu** (pravděpodobnost jak - tak). (*Součin jevů A , B označujeme $A \cdot B$, kdy se společně uskuteční oba jevy A i B*). Jak vyplývá z principu volné kombinovatelnosti, pravděpodobnost dvou nebo více současných dějů je roven **součinu** jejich individuálních pravděpodobností.

Pro nezávislé náhodné jevy A, B platí: $P(A|B) = P(A)$ a $P(A \cdot B) = P(A) \cdot P(B)$

V genetice můžeme aplikovat také **zákon součtu** na samostatně vzájemně vylučující se jevy: "*Součet jevů A , B značíme $A+B$, kdy nastane alespoň jeden z jevů A , B* ".

Náhodné jevy:

- **neslučitelné** - jevy A a B se navzájem vylučují (buď A nebo B). Pravděpodobnost, že nastane jeden jev, je součet pravděpodobností obou navzájem se vylučujících jevů. U neslučitelných jevů A , B platí $A \cdot B = 0$, a tedy $P(A+B) = P(A) + P(B)$.
- **slučitelné** - $P(A+B) = P(A) + P(B) - P(A \cdot B)$
- **podmíněné** - Podmíněnou pravděpodobností náhodného jevu A rozumíme pravděpodobnost tohoto jevu počítanou za předpokladu, že se uskutečnil jev H .

$$P(A|H) = \frac{P(A \cdot H)}{P(H)}$$

- Pravděpodobnost součinu dvou jevů A , H : $P(A \cdot H) = P(A|H) \cdot P(H)$



Tyto jednoduché zákony pravděpodobnosti jsou užitečné při diskusích o přenosu GI a použijete je při řešení genetických problémů. Když si přejeme znát výsledky křížení je třeba spočítat pravděpodobnosti každého možného jevu. Výsledky těchto výpočtů nám dovolí předpovědět podíl potomků s daným fenotypem nebo genotypem.

Co je důležité! Předpovědi možných jevů se provádějí jen na velkých souborech dat. Jestliže předpovídáme, že 9/16 potomků dihybridního křížení bude mít dominantní znaky, je nepravděpodobné, že v malém souboru přesně 9 z každých 16 budou takové. Odchylka od očekávaného poměru v malém vzorku je připisována odchylce způsobené náhodně. Vliv náhody se zmenšuje s velikostí vzorku.

Zjistěte si kolik pokusných rostlin Mendel pěstoval na klášterních záhoncích! Mohl tedy získat statisticky významné výsledky svých genetických poměrů?

Binomická věta v genetice

Případy, kde jeden ze dvou alternativních jevů je možný během každého čísla pokusů. Aplikováním *binomické věty*, můžeme rychle vypočítat pravděpodobnost jakékoliv specifické sady jevů mezi velkým počtem potenciálních jevů. Např., v rodině jakékoliv velikosti můžeme vypočítat pravděpodobnost jakékoliv kombinace mužského či ženského potomka: v rodině o pěti dětech lze vypočítat pravděpodobnost čtyř dětí jednoho pohlaví a jednoho dítěte druhého pohlaví atd.

Binomická věta: $(a + b)^2 = 1$, kde a a b jsou pravděpodobnosti dvou alternativních jevů a n je počet pokusů. Pro každou hodnotu n má binomická věta svůj charakter.

N	dvojčlen	rozvinutý dvojčlen
1	$(a + b)^1$	$a + b$
2	$(a + b)^2$	$a^2 + 2ab + b^2$
3	$(a + b)^3$	$a^3 + 3a^2b + 3ab^2 + b^3$
4	$(a + b)^4$	$a^4 + 4a^3b + 6a^2b^2 + 4ab^3 + b^4$
5	$(a + b)^5$	$a^5 + 5a^4b + 10a^3b^2 + 10a^2b^3 + 5ab^4 + b^5$
N	$(a + b)^n$	$a^n, a^{n-1}b, a^{n-2}b^2, a^{n-3}b^3, \dots, b^n$ neboli: $(a+b)^n = a^n + \binom{n}{1}a^{n-1}b + \binom{n}{2}a^{n-2}b^2 + \binom{n}{3}a^{n-3}b^3 + \dots + \binom{n}{n-1}ab^{n-1} + b^n$

Numerické koeficienty předcházející každému výrazu lze snadno určit pomocí Pascalova trojúhelníku:

n	Pascalův trojúhelník							
0					1			
1				1	1			
2			1	2	1			
3		1	3	3	1			
4		1	4	6	4	1		
5		1	5	10	10	5	1	
6	1	6	15	20	15	6	1	
7	1	7	21	35	35	21	7	1

atd.

Použitím této metody lze rozčlenit například:

$$(a + b)^7 = a^7 + 7a^6b + 21a^5b^2 + 35a^4b^3 + 35a^3b^4 + 21a^2b^5 + 7ab^6 + b^7$$



Jaká je pravděpodobnost, že v rodině se čtyřmi dětmi jsou dva chlapci a dvě dívky? Nejdříve, označíme pravděpodobnosti pro každý jev:

$$a = \text{chlapec} = \frac{1}{2}$$

$$b = \text{dívka} = \frac{1}{2}$$

Pak určíme odpovídající členy v rozvinutém dvojčlenu, kde $n = 4$:

$$(a + b)^4 = a^4 + 4a^3b + 6a^2b^2 + 4ab^3 + b^4$$

Každý člen, mocninel nad a reprezentuje počet chlapců a mocninel nad b pak počet dívek. Takže přesné vyjádření pravděpodobnosti je:

$$P = 6a^2b^2 = 6\left(\frac{1}{2}\right)^2\left(\frac{1}{2}\right)^2 = 6\left(\frac{1}{2}\right)^4 = 6/16 = 3/8$$

Pravděpodobnost, že rodiny o 4 dětech budou mít dva chlapce a dvě dívky je 3/8.

Pro určení početního koeficientu pro jakoukoliv sadu mocnitelů (chceme-li znát pravděpodobnost určité kombinace ve skupině určitého rozsahu) může být aplikován jednoduchý vzorec: $(A+B)^n \approx P = \frac{n!}{s!t!} P_A^s P_B^t$,

$$(A+B)^n \approx P = \frac{n!}{s!t!} P_A^s P_B^t,$$

kde n je celkový počet jevů; s je počet kolikrát se jev a stane; t je počet kolikrát se jev b stane; P_A , P_B jsou pravděpodobnosti příslušných jevů; $!$ je faktoriál ($5! = 5 \cdot 4 \cdot 3 \cdot 2 \cdot 1 = 120$; $0! = 1$). Tedy $n = s + t$.

Použitím vzorce, určíme pravděpodobnost u rodiny se sedmi dětmi, kde bylo 5 chlapců a 2 dívky. Pak $s = 5$, $t = 2$ a $n = 7$. Doplníme i 5 případů jevu A a 2 případy jevu B.

$$P = \frac{n!}{s!t!} P_A^s P_B^t = \frac{7!}{5!2!} \left(\frac{1}{2}\right)^5 \left(\frac{1}{2}\right)^2 = 21\left(\frac{1}{2}\right)^7 = 21/128$$

V rodinách se sedmi dětmi, průměrně, je 21/128 předpovězeno, že mají 5 chlapců a 2 dívky.

V rodině, kde oba rodiče mají normální pigmentaci se narodilo albinotické dítě. Tzn. že oba rodiče museli být heterozygoti v genu pro pigmentaci. Jestliže mají 6 dětí, jaká je pravděpodobnost, že 4 budou normální (A) a 2 budou albíni (B)?

Na základě křížení $Aa \times Aa$? $A = 3/4$; $B = 1/4$

$$P = \frac{n!}{s!t!} P_A^s P_B^t = \frac{6!}{4!2!} \left(\frac{3}{4}\right)^4 \left(\frac{1}{4}\right)^2 = 15\left(\frac{81}{4096}\right) = 1215/4096$$

Využití výpočtu na základě binomické věty je v různých oblastech genetiky, včetně analýzy polygenních vlastností a studiu populační rovnováhy.

Binomické rozdělení objevil i Mendel ve svých štěpných poměrech a je charakteristické právě pro genetickou problematiku. Popřemýšlejte znovu o Mendelových experimentech a jeho závěrech z tohoto matematického pohledu!

Hodnocení genetických dat: chí-kvadrát (χ^2) test

Mendelovy fenotypové poměry 3:1 pro monohybrida a 9:3:3:1 pro dihybrida jsou hypotetické předpovědi na základě následujících předpokladů:

1. každá alela je dominantní nebo recesivní
2. platí segregace
3. děje se náhodná kombinovatelnost
4. oplození je náhodné

Poslední tři předpoklady jsou ovlivněny náhodou a tudíž jsou cílem náhodného kolísání.

Závěry:

1. Jevy segregace, náhodné kombinace a fertilizace jsou podmínkou k náhodné kolísavosti z jejich předpovězeného výskytu jako výsledek náhodné odchylky.



2. Jak velikost vzorku vzrůstá, průměrná odchylka z očekávaného podílu nebo poměru úměrně klesá. Takže velký vzorek snižuje vliv náhodné odchylky na konečný jev.

V genetice je nutné, aby se mohla ohodnotit pozorovaná odchylka. Když předpokládáme, že data splňují daný poměr jako je 1:1, 3:1, 9:3:3:1, určíme si **nulovou hypotézu**. Ta předpokládá, že není reálný rozdíl mezi **změřenými hodnotami** (nebo poměry) a **předpovídanými**. Zjevné rozdíly mohou být přisouzeny zcela náhodě. Vyhodnocení nulové hypotézy je provedeno statistickou analýzou. Je-li zamítnuta, pozorované odchylky od očekávaných hodnot nejsou přičteny pouze náhodě. Jestliže nulová hypotéza nemohla být zamítnuta, pozorované odchylky mohou být přičteny náhodě.

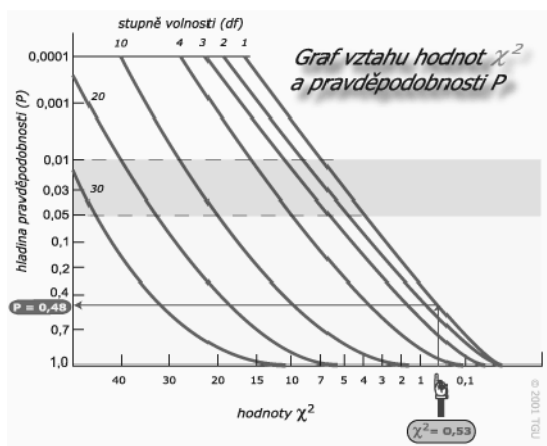
Statistická analýza poskytuje matematický základ pro určení, jak dobře se pozorovaná data shodují či liší od předpovězených (očekávaných) – test se nazývá **dobrá shoda** (goodness of fit). Jeden z nejjednodušších statistických testů je **chí kvadrát (χ^2) test**. Hodnota χ^2 je použita k odhadu, jak častá je pozorovaná odchylka, či jaká pozorovaná odchylka může být očekávána, když je způsobena náhodou.

Vzorec pro χ^2 analýzu je: $\chi^2 = \sum \frac{(P-O)^2}{O}$, kde **P** – pozorované hodnoty; **O** – očekávané hodnoty pro danou kategorii. Protože (P-O) je odchylka **d**, vzorec může být zjednodušen: $\chi^2 = \sum \frac{d^2}{O}$

Tabulka níže podrobně popisuje postup výpočtu χ^2 testu pro výsledky F_2 generace mono- a dihybridního křížení. Postupuje se vyplňováním sloupců zleva doprava. Konečný krok v χ^2 testu je jeho interpretace. Musíte určit hodnotu **stupňů volnosti** (*df* – degrees of freedom), které v této analýze je $n - 1$, kde n je počet různých kategorií, do kterých připadá každý údaj. Pro poměr 3:1 mohou mít rostliny dva fenotypy. Takže $n = 2$ a $df = 2 - 1 = 1$. Pro poměr 9:3:3:1 je $df = 3$. Stupně volnosti musí být brány v úvahu, protože čím větší je počet kategorií, tím více je očekáváno odchylek jako výsledků působení náhody. Dále podle tabulky (přesnější, viz statistika) nebo [grafu](#) hodnot χ^2 určíme pravděpodobnost pro příslušnou hodnotu χ^2 a stupně volnosti.

a) monohybridní křížení					
Očekávaný poměr	Pozorované hodnoty (P)	Očekávané hodnoty (O)	Odchylka (d=P-O)	Odchylka ² (d ²)	Odchylka ² /Očekávané (d ² /O)
¾	740	¾ (1000) = 750	740 - 750 = -10	(-10) ² = 100	100/750 = 0,13
¼	260	¼ (1000) = 250	260 - 250 = +10	(+10) ² = 100	100/250 = 0,40
	Σ = 1000				χ² = 0,53
					podle tabulky či grafu ⇒ P = 0,48
b) dihybridní křížení					
Očekávaný poměr	Pozorované hodnoty (P)	Očekávané hodnoty (O)	Odchylka (d=P-O)	Odchylka ² (d ²)	Odchylka ² /Očekávané (d ² /O)
9/16	587	567	+20	400	0,71
3/16	197	189	+ 8	64	0,34
3/16	168	189	- 21	441	2,33
1/16	56	63	- 7	49	0,78
	Σ = 1008				χ² = 4,16
					podle tabulky či grafu ⇒ P = 0,26





Hladina významnosti	Stupně volnosti				
	1	2	3	4	5
0,05	3,84	5,99	7,81	9,48	11,07
0,01	6,35	9,21	11,34	13,27	15,08
χ^2					

$\chi_{tab.} > \chi_{vyp.} \Rightarrow$ Je shoda mezi pozorovanými a očekávanými četnostmi a H_0 se nezamítá.

$\chi_{tab.} < \chi_{vyp.} \Rightarrow$ Je průkazný rozdíl mezi pozorovanými a očekávanými četnostmi a H_0 se zamítá.

V případě monohybridního křížení byl $\chi^2 = 0,53$ čemuž odpovídá pravděpodobnost $P = 0,48$. Nejdůležitější v χ^2 testu je porozumět, co hodnota P znamená. Když například vyšla hodnota $P = 0,48$ (48 %), pak ji lze interpretovat tak, že kdyby byl stejný experiment vícekrát opakován, u 48 % pokusů by se očekávalo, že se projeví náhodná odchylka stejně velká nebo větší než lze pozorovat v úvodním pokusu. Naopak, 52 % opakování by ukázalo menší odchylku vůči úvodnímu pozorování jako výsledek náhody. Hladina pravděpodobnosti menší než 0,05 ($P \leq 0,05$) říká, že pozorované odchylky mohly být získány náhodností a že rozdíly mezi pozorovanými a předpovězenými hodnotami jsou značné a lze podle ní zamítnout nulovou hypotézu. Hodnoty P větší než 0,05 ($P > 0,05$) naznačují, že pravděpodobnost pozorované odchylky v důsledku náhody je 5 % a více. Závěr je nezamítnutí nulové hypotézy. V našem případě ($P = 0,48$) není hypotéza segregace zamítnuta u monohybridního křížení.

Jak byste hodnotili případ dihybridního křížení, kde $\chi^2 = 4,16$ a $P = 0,26$?



Genetické poměry se projevují jako pravděpodobnosti výskytu. Takže odvození výsledků z křížení podléhá porozumění zákonům pravděpodobnosti. Byly popsány zákony součtu, součinu a podmíněné pravděpodobnosti a použití binomické věty v genetické problematice.

Statistické analýzy se používají k testování platnosti výsledků z experimentů. Pozorované variance od očekávaných poměrů jsou předpovídány v důsledku náhodné odchylky.

χ^2 test nám dovoluje předpovědět pravděpodobnost takové variance způsobené náhodností. Pomocí výpočtu hodnoty χ^2 hodnotíme nulovou hypotézu - není rozdíl mezi skutečnými a očekávanými hodnotami.

Analýzy rodokmenů

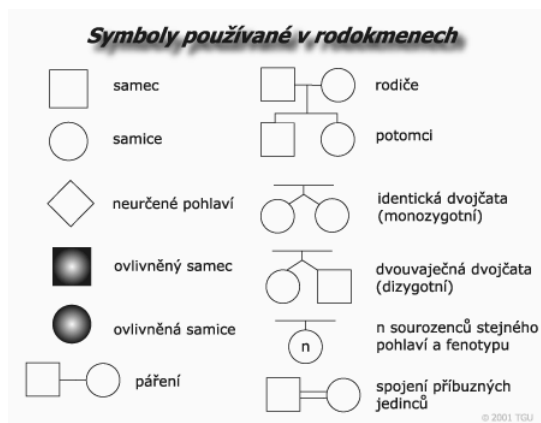
Analýza rodokmenů poskytuje metodu pro studium typů přenosu genetické informace pro různé vlastnosti (zejména kvalitativních, jako je barva, nemoci, krevní skupiny, ...) při sledování několika generací (význam hlavně u výzkumu způsobů dědičnosti znaků u lidí).

Nejjednodušším způsobem studia vzorů dědičnosti je kreslení rodinných "stromů" příbuznosti s označením hodnoty studované fenotypové vlastnosti. Analýzou rodokmenu lze předpovědět, jak geny kontrolují zděděnou vlastnost. Čím více rodin se stejnými výsledky získáme, tím více přesnější odhad způsobu dědičnosti známe. Využití rodokmenů ovlivňuje hodnota **penetrance** a **expresivity**.

Konvenční značky:

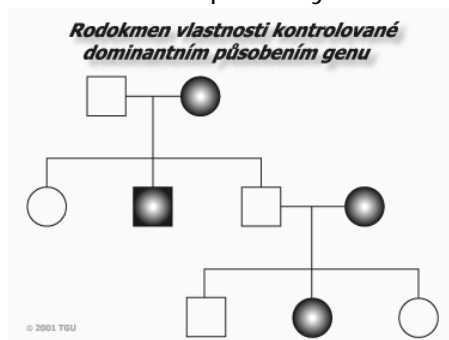
Rodiče jsou spojeni horizontálními liniemi a vertikální linie vede k potomkům. Vyplněné symboly představují jedince, u kterých se projevil sledovaný znak (nazývají se *ovlivnění*). Číslo v symbolu značí počet vlastních sourozenců stejného pohlaví.

Když již jsou fenotypová data sesbírána z několika generací a je nakreslen rodokmen, pečlivá analýza dovolí určit, zda vlastnost je dominantní nebo recesivní. Zde následují určitá pravidla.



Vlastnosti projevující **dominantní** genové působení:

- ovlivnění jedinci mají nejméně jednoho ovlivněného rodiče
- fenotyp se většinou objevuje v každé generaci
- dva neovlivnění rodiče mají pouze neovlivněné potomky



Vlastnosti projevující **recesivní** genové působení:

- neovlivnění rodiče mohou mít ovlivněné potomky
- ovlivnění potomci jsou jak samčího tak samičího pohlaví

