

Metody molekularne w ekologii  
Wykład 5 / 2-11-2011

Markery dominujące – otrzymujemy dla nich nie dane genotypowe, a haplotypowe – tylko jeden allel z dwóch chromosomów jest identyfikowany, ten dominujący. Markery są losowe. Nie ma specyficznych starterów.

Metoda RAPD

- Random Amplified Polymorphic DNA;
  - krótkie, 10-12 nukleotydowe startery;
  - uzyskuje się nie 1 określony fragment, ale szereg fragmentów niespecyficznych amplifikowanych przez taki starter (dużo prążków);
  - genetyczna charakterystyka osobnika na podstawie tego, które fragmenty uległy amplifikacji w PCR a które nie.
  - stosuje się tam gdzie nieznane są mikrosatelity, geny markerowe.
  - im bardziej podobne do siebie osobniki pod względem genetycznym, tym bardziej podobne powinny być wyniki – prążki.
  - nie można raczej używać materiału z prób nieinwazyjnych, bo wtedy jest tam DNA z wielu różnych źródeł. Jest to metoda podatna na kontaminację obcym DNA. Ale można u bardzo wielu gatunków stosować.
- Co robić żeby uzyskiwać bardziej jasne wyniki, żeby interpretacja nie była uzależniona od subiektywnej oceny obserwatora? (prążki można czasami różnie odczytywać)

Wstępne procedury ograniczające liczbę uzyskiwanych fragmentów, żeby obraz wyników się nie zamazywał, oraz wprowadzenie takich modyfikacji w PCR, żeby powielaniu ulegały ściśle określone fragmenty i żeby powielanie zachodziło w sposób powtarzalny – metoda AFLP

- Amplified Fragments Length Polymorphism;
- trawienie DNA genomowego dwoma enzymami restrykcyjnymi, pozostawiającymi tzw. lepkie końce;
- ligacja adaptorów dwuniciowych (syntetyczne cząsteczki o ściśle określonej sekwencji) do końców;
- amplifikacja preselektywna metodą PCR z użyciem starterów komplementarnych do adaptorów, o jeden nukleotyd dłuższych od adaptera – tzw. nukleotyd preselektywny; amplifikacji ulegną tylko fragmenty poprzecinane na jednym końcu jednym enzymem, a na drugim końcu drugim enzymem, reszta odpadnie, a poza tym, tylko zasada komplementarna do tej zasady, która jest na końcu musi być... dodatkowa selekcja. Nie wiem o co chodzi do końca;
- amplifikacja selektywna, jest nie jedna dodatkowa zasada, ale trzy. Tylko fragmenty, które mają takie same trzy kolejne nukleotydy się zamplifikują, co jest dodatkową selekcją;
- analiza wielkości amplifikowanych fragmentów (zwykle automatyczny sekwenator);

Typem markera molekularnego są też fragmenty DNA mitochondrialnego.

Cechy DNA mitochondrialnego zwierząt

- małe rozmiary (15-20 tys. Par zasad);
- kolistość (oprócz niektórych parzydełkowców);
- dwuniciowość;
- haploidalność;
- koduje konserwatywny zestaw genów (oprócz nicieni, niektórych mięczaków i parzydełkowców).

DNA mitochondrialne jako marker molekularny w badaniach ekologicznych

- występuje u wszystkich eukariontów;
- dziedziczenie w linii matczynej;
- wysokie tempo mutacji (środowisko – dużo wolnych rodników);
- większość mutacji to proste podstawienia nukleotydowe;
- brak rekombinacji (choć w pewnym stopniu zachodzi);
- występuje w komórkach w dużej liczbie kopii;
- wolniej ulega degradacji niż DNA jądrowe.

Heteroplazmia – występowanie więcej niż jednego typu mtDNA w komórkach osobnika

- samce omułkowatych mają dwa genomy mitochondrialne M i F (podwójne dziedziczenie jednorodzielskie);
- wysokie tempo mutacji może generować nowe haplotypy w komórkach osobnika, ale są one eliminowane w wyniku dryfu genetycznego, oraz efektu „szyjki od butelki” w czasie oogenezy;
- „przeciekanie ojcowskie” (paternal leakage) – kiedy jednak mitochondria z plemnika dostaną się do zarodka. Może dać początek odrębnej frakcji mitochondriów u osobnika. Zjawisko bardzo rzadkie, występujące głównie w krzyżówkach między podgatunkami i gatunkami.

Czynniki zapobiegające „przeciekaniu ojcowskiemu” u zwierząt

- brak mitochondriów w plemnikach (niektóre skorupiaki);
- mitochondria plemników nie wnikają do komórki jajowej (niektóre osłonice);
- selektywne niszczenie mitochondriów ojca w cytoplazmie komórki jajowej.

Analizy są też utrudniane przez występowanie pseudogenów - genów mitochondrialnych takich, które zostały włączone przypadkiem do genomu i utraciły funkcję, a są bardzo podobne do funkcjonalnych genów mitochondrialnych.

mtDNA jako miara zmienności genetycznej w populacjach

- liczba haplotypów ( $h$ ) – liczba różnych haplotypów występująca w danej populacji;
- różnorodność haplotypowa ( $H$ ) – prawdopodobieństwo, że dwa wybrane losowo haplotypy z populacji będą różne;
- różnorodność nukleotydowa ( $\pi$ ) – średnia liczba różnic na pozycję nukleotydową między dwoma haplotypami, losowo wybranymi z populacji;