

Biologický korespondenční seminář



Biozvěst

Ročník 0

Serie 2 - řešení

Milí řešitelé

Druhá série Biozvěstu se uzavírá, řešení úloh je tady. Některé otázky se dotýkaly poněkud komplexní tematiky a podrobné vysvětlení problematiky by si vyžádalo mnoho stran textu. Podrobnému probrání problematiky budou věnovány přednášky na terénním soustředění, tak nemusíte mít špatný pocit, pokud něčemu neporozumíte dokonale.

Oproti zadání byla provedena drobná korekce bodového ohodnocení úloh, tak se Vám omlouváme za případné zmatení. Pokud byste měli připomínky k autorskému řešení, neváhejte a ozvěte se, věcné chyby v řešení, které naleznete a podložíte relevantním literárním zdrojem budou ohodnoceny speciálními body.

Ve Vašich řešeních byste měli najít komentáře, které zdůvodňují bodové hodnocení odpovědí jiným než maximálním počtem bodů. Pokud komentáře nenaleznete, nahrálo se zřejmě řešení v režimu, který nám neumožňoval editaci při opravování. Pokud by Vám nebylo jasné, proč jste získali konkrétní počet bodů, ozvěte se.

Přeji mnoho zdaru při řešení třetí série,
Stanislav Vosolsobě

Úloha 1: Neukázněný biotop

Autor: Stanislav Vosolsobě

Počet bodů: 15

Bioslav dostal k narozeninám jako dárek let balonem, naneštěstí se udělalo špatné počasí a vzdušný koráb ztroskotal na neznámém místě. Bioslav však zachoval chladnou hlavu, vytáhl terénní zápisníček a zapsal si druhy, které spatřil v okolí: *Vaccinium myrtillus*, *Nardus stricta*, *Luzula sylvatica*, *Calamagrostis villosa*, *Polytrichum formosum*, *Sphagnum* sp., *Lycopodium annotinum*, *Dryopteris dilatata*, *Athyrium distentifolium*, *Listera cordata*, *Homogyne alpina*, *Trientalis europaea* a *Oxalis acetosella*. Poté se jal přeměřovat obvody mohutných stromů, které ho v biotopu zaujaly. Nakonec začal usilovně lovit jedince druhu *Apodemus agrarius*, protože dostal hlad. Bylo štěstí, že si hned po ztroskotání naplnil kapsu kvalitními žulovými kameny.

1) Z výčtu druhů určete v jakém biotopu Bioslav ztroskotal a kde to mohlo být (zkuste určit místo s největší možnou přesností, bylo to v České republice). Jaký druh stromu pravděpodobně měřil?

Dle vyjmenovaných druhů skončil Bioslav svoji vzduchoplavbu v horské smrčíně (zřejmě i částečně podmáčené a spíše řidší, neboť našel i luční druh smilku tuhou) a přeměřoval zcela jistě smrky, neboť jiný velký strom se v tomto biotopu nevyskytuje. V úvahu připadají nejvyšší pohraniční pohoří ČR. Vzhledem k tomu, že měl k dispozici žulový kámen, nemohlo se jednat o Jeseníky, ani jiné pohoří na Moravě, žuly se vyskytují jen v Krkonoších, Jizerských horách a v přerušovaném pásu od Karlovarska až po Novohradské hory. Myšice temnopásá k nám naopak zasahuje z východu na Moravu a z Polska se dostává až do pohoří v severních Čechách a z Krkonoš jsou záznamy až z Úpské louky, jinak je to druh nižších poloh. Bioslav tedy nebyl ani na Šumavě. Bradáček srdčitý je velmi vzácný horský druh, nejpočetnější lokality jsou v Jeseníkách a na Šumavě, ale záznamy jsou i z Krkonoš, Jizerských hor a západní části Krušných hor. Vzhledem k nenápadnosti může být přehlížen. Bika lesní je ve všech horských oblastech hojná, chybí pouze v Orlických horách a v Krkonoších se vyskytuje velmi vzácně, ale existují údaje z východní části. Ostatní druhy se vyskytují ve všech horských smrčínách. Provedeme-li syntézu všech údajů, mohl Bioslav ztroskotat v Krkonoších, avšak jen v jejich žulové části (úzká část hraničního hřebenu od Harrachova ke Sněžce) a s přihlédnutím k záznamům o nálezích myšice a biky to mohlo být v oblasti Úpské jámy (bylo by i logické, že narozeninový

let směřoval ke Sněžce). Dedukce, vyvozující ztroskotání v Jizerských horách či karlovarské části Krušných hor, nejsou taktéž považovány za chybné (v důsledku imisních kalamit ale v těchto horách spíše nebudou zmiňované „mohutné“ stromy...).

*Za horskou smrčinu 0,5 bodu,
za smrk 0,5 bodu,
za dedukci lokality až 3 body.*

2) Jakými faktory je vymezen tento biotop (horní i spodní hranice)?

Horní hranice smrčin (cca 1 200 m n. m.) je dána klimaticky - smrčiny přecházejí do bezlesí či klečového porostu neboť již nejsou smrky schopné odolávat mrazu, sněhu a větru. Ve výškách 800 - 1 000 m přechází smrčiny do smíšených porostů - buk je v těchto výškách konkurenčně zdatnější, roste rychleji a netrpí kůrovcem (v ČR jsou kvůli dřevařské lobby smrčiny uměle drženy i v mnohem nižších výškách, ale jedná se o nepřírozený stav, pokud by neprobíhala údržba, lesy by během několika dekád rozvrátil kůrovec, kterému se daří v teplých oblastech ještě lépe než na horách).

2 body za rozpětí a zdůvodnění.

3) Jeden druh živočicha je pevně svázán s přirozeným vývojem tohoto biotopu. O kterého živočicha se jedná? Popište podrobně jeho vliv na ekosystém.

Je to lýkožrout smrkový čili kůrovec. Kůrovec přirozeně napadá smrčiny po větrných kalamitách, a pokud má kalamita větší rozsah, je početnost kůrovce taková, že je schopen destruovat velkoplošně celé smrkové porosty i mimo kalamitní zóny. Přirozený cyklus smrčiny je tvořen fází mladé smrčiny, fází vyspělé smrčiny stáří přes 100 let, která se pozvolna začíná rozvracet větrem a díky gradacím kůrovce v další fázi postupně odumírá a na padlých kmenech v poslední fázi regeneruje mladý les. Díky tomu, že přirozený les je mozaikovitý, nedochází příliš často k velkoplošným kalamitám a gradacím kůrovce. Problém lesa (a zejména lesníků) je stav, kdy je les lidskými zásahy dlouhodobě udržován ve fázi staré smrčiny (s cílem vyrobit kvalitní dřevo). Ta je velice náchylná k větrným kalamitám, které jsou velkoplošné a byly by následovány mohutnými gradacemi kůrovce (kůrovec mimo jiné preferuje osluněné kmene bez větví, které se vyskytují v hospodářském lese po polomu, v přirozeném lese rostou stromy řídkěji a jsou ovětveny po celé výšce a neposkytují tak ideální niku pro kůrovce). Těm je však zamezováno rychlou asanací kalamitního dříví a kácením napadených stromů (to se děje na většině území ČR). Na Šumavě byly tímto způsobem smrčiny kultivovány mnoho desetiletí až do vyhlášení bezzásahovosti na území národního parku. Bezzásahovost logicky vedla ke kolapsu přestárlých smrčin po několika větrných kalamitách a následné gradaci kůrovce a nyní přechází les do regenerační fáze. V Jizerských a Krušných horách byly celoplošné gradace kůrovce vyvolány odumíráním lesů kvůli kyselým dešťům, tehdy zřejmě ani nedocházelo k regeneraci lesa a bylo přistoupeno k rozsáhlému umělému zelešňování. To je v dnešní situaci na Šumavě zbytečné a naopak, jakýkoliv asanační zásah disturbuje přirozenou obnovu lesa.

*Za lýkožrouta 0,5 bodu,
za popis cyklu 2 body.*

Pokud by někdo místo lýkožrouta popisoval vliv vlků na početnost zvěře a potažmo efekt na přirozenou regeneraci ve smrčinách, bude to také uznáno

4) Jaký je jeho celkový vliv na biodiverzitu našeho ekosystému? Zjistěte příklady hmyzích druhů (zejména brouků), které se vyskytují pouze ve správně fungující verzi tohoto ekosystému a zjistěte, proč jsou tak vzácné.

Díky činnosti lýkožrouta je ve smrčinách významné zastoupení stojících či ležících odumřelých stromů, které jsou nikou pro xylofágní brouky. V hospodářských lesích není obecně žádné stojící odumřelé dřevo k dispozici. Po vyvrácení tlejí padlé kmene na zemi, poskytují taktéž útočiště mladým semenáčkům, velkému množství hub a dalších organismů. Z hmyzích zástupců můžeme jmenovat horské xylofágní tesaříky, např. *Cornumutilla quadrivittata* či kovaříky *Ampedus auripes*, *Denticollis interpositus*, *Diacanthous undulatus*.

*Vliv na biodiverzitu 1 bod,
za alespoň tři zástupce 1,5 bodu.*

5) Řada druhů z výčtu má u nás podobný, blíže příbuzný druh. Identifikujte příslušné dvojice a popište, jak byste druhy od sebe odlišili a jak se liší ekologicky a rozšířením.

Na mysli jsem měl zejména tyto páry podobných druhů:

Kaprad' podobná *Dryopteris expansa*

3x zpeřený list

lístečky ploché, světlejší

sporangia černá

oba druhy jsou v přírodě poměrně často zaměňovány, spolu s papratkou samičí jsou nejčastějšími kapradinami, kterou můžeme potkat v lesích, zvláště smrkových.

Plavuň pučivá *Lycopodium annotinum*

1 výtrusný klas

konec lístku holý

hlavně v horských smrčínách

Papratka horská *Athyrium distentifolium*

kupky výtrusnic okrouhlé

horské smrčiny, suťové bučiny, kary

od kapradě samce se papratka samičí odlišuje listem, který je 3-4x zpeřený, u samce jen 2x

Bradáček srdčitý *Listra cordata*

drobná rostlina do 15 cm

kosodřevina, smrčiny, jen hory

Ploník obecný *Polytrichum commune*

báze lístků vytváří pochvu lodyžky

vlhká místa, hory, smrčiny

Kaprad' rozložená *D. dilatata*

3x zpeřený a poslední řád úkrojků členěný

lístečky se kroutí dolů, tmavší list

sporangia černá až hnědá

Plavuň vidlačka *L. clavatum*

2 - 3 výtrusné klasy

konec lístku protažený v blanitý výrutek

kamenitá a místa a meze i v nižších polohách

Papratka samičí *A. filix-femina*

kupky výtrusnic protáhlé

lesy od nížin do hor, zvláště ve smrčínách

Bradáček vejčitý *L. Ovata*

přes 30 cm, odliší se snadno od pohledu

okraje listnatých lesů, louky, nižší polohy

Ploník ztenčený *P. Formosum*

báze lístků neobjímá lodyhu

celé území, i na sušších místech

4 body za alespoň 4 dvojice

Úloha 2: Nukleové kyseliny

Autor: Stanislav Vosolsobě

Počet bodů: 23

V biosféře se nachází velké množství různých druhů nukleových kyselin, které jsou základními stavebními kameny života. Buď jsou tvořeny DNA, nebo RNA. Konkrétní typy se pak rozlišují malým písmenkem na začátku (např. mRNA). Různých typů je celý zvěřinec.

1) Vaším prvním úkolem bude připojit následující označení k DNA či RNA:

ds, c, m, mt, chl, t, r, si, mi, ss, hn, g, sn, sno, pre-m, pi.

2) Každý typ stručně charakterisujte a popište jejich funkci. Nastiňte případné souvislosti mezi různými typy.

dsDNA	dvouvláknová DNA	tvorí dvoušroubovici komplementárních vláken, u chromosomů
dsRNA	dvouvláknová RNA	u RNA virů či v případě interakce mRNA s siRNA
cDNA	komplementární DNA	vzniká reverzním přepisem mRNA do DNA, viz níže
mRNA	messenger RNA	vznikne přepisem genu z chromosomu, templát pro translaci
mtDNA	mitochondriální DNA	genom (chromosom) mitochondrie s méně než 100 geny
chlDNA	chloroplastová DNA	genom (chromosom) plastidů, obsahuje asi 150 genů
tRNA	transferová RNA	váže aminokyselinu, přichází na ribosom (rRNA) a interaguje s tripletou na mRNA (=genetický kód) při translaci. 20 typů.
rRNA	ribosomální RNA	několik různých rRNA spolu s dalšími proteiny tvoří ribosom.
siRNA	silencing RNA	dvouřetězcová RNA, 21 bází, degradace cizorodé RNA
miRNA	micro RNA	22 bází, degradace komplementární mRNA (regulace exprese)
ssDNA	jednovláknová DNA	u virů či rozpletená DNA při replikaci/transkripci
ssRNA	jednovláknová RNA	u virů či všechny další typy (mRNA, tRNA, rRNA, ...)
hnRNA	heterogenní jaderná	synonymum pro pre-mRNA
gRNA	guide RNA	slouží k editaci mRNA. U mitochondrií jsou v mRNA z

neznámého důvodu chyby, přepsaná mRNA je poté editována pomocí gRNA a chyby jsou opraveny, aby vznikl správný protein

snRNA malá jaderná RNA zajišťuje sestřih pre-mRNA (vystřížení intronů)
snoRNA malá jadéřková RNA editace bazí tRNA a rRNA (methylace a pseudouridylyace)
pre-mRNA prekurzor mRNA v jádře před sestřihem a přidáním 5'-čepičky a polyA 3'-konce
piRNA piwi-interacting RNA zajišťuje umlčování methylaci genů u zvířat, interaguje s proteinem piwi.

18 bodů

0,25 bodu za přiřazení, 0,25 bodu za název, 0,5 bodu za popis

3) Který typ se na Zemi začíná vyskytovat až od druhé poloviny 20. století?

Zejména cDNA, připravuje se v laboratoři pomocí reverzní transkriptázy z mRNA pokud chceme studovat transkriptom buňky (tj. všechny mRNA). mRNA je totiž labilní a nedá se s ní pracovat, tudíž ji po izolaci hromadně převedeme do komplementární formy cDNA. Ta je poté i dobrým templátem pro PCR.

1 bod

4) Jak se liší významem “si” a “mi”? Co dělá a kdo nebo co jsou “Dicer” a “Argonaut”.

miRNA vznikají přepisem konkrétních regulačních genů, třeba mir165. Primární transkript obsahuje komplementární oblasti, které tvoří vlásenku. Ta je rozpoznána proteinem Dicer, který rozstřípe vlásenku a uvolní dvouřetězcový úsek miRNA (cca 22 bazí). Jedno z vláken je degradováno a druhé vstupuje do proteinového komplexu RISC (RNA-induced silencing komplex, součástí komplexu je protein Argonaut), který zprostředkovává interakci cílové mRNA s miRNA, která je k ní komplementární. Cílová mRNA je po interakci s miRNA degradována. MiRNA je tedy organismu vlastní nástroj k post-transkripční regulaci exprese různých genů, zejména se uplatňuje při ontogenetickém vývoji mnohobuněčných organismů. Naproti tomu siRNA slouží k umlčování cizorodých genů v organismu, typicky vzniká z virové dsRNA. Velmi často také vznikají siRNA, pokud transformujeme buňku cizorodým genem při genových manipulacích. Buňka umí rozeznat cizorodý gen, pokud se exprimuje v nadměrném množství, či má nestandardní strukturu mRNA, poté aktivuje RNA-dependentní RNA polymerázu, která k cizorodé mRNA vytvoří komplementární vlákno, vzniká dsRNA jako při virové infekci a ta je rozeznávána Dicerem a vznikají siRNA. Tyto opět prostřednictvím RISC degradují cizorodou mRNA. Navíc podle siRNA může probíhat methylace chromozomální DNA, která je schopna blokovat expresi již na úrovni transkripce a zablokuje tak cizorodý gen, pokud se inkorporoval do genomu (při virové infekci či třeba infekci *Agrobacterium* u rostlin)

2 body

5) Rozeberte význam “mir165” při formování tvaru (tj. patterning) listu.

Mir165 je miRNA, která interaguje s mnoha geny, které se podílí na formování tvaru listu. Obecně by se dalo říci, že mir165 snižuje meristemickou aktivitu při zakládání listu, zajišťuje, aby se buňky při zakládání listu dělily přesně tak, jak je vhodné. Jemná regulace zajišťování systémem miRNA umožňuje variace mezi jednoduchými, složenými, malými či velkými listy.

2 body

Úloha 3: Kladistika

Autor: Stanislav Vosolsobě

Počet bodů: 14

V minulé sérii jsme se zabývali sběrem znaků pro fylogenetickou analýzu a stanovili jsme si dva základní požadavky, kterými se řídí fylogenetika - musíme přísně dbát na to, abychom porovnávali pouze homologické znaky mezi organismy (tj. neporovnávat například křídlo hmyzu s křídlem ptáků) a snažit se nashromáždit co největší počet znaků a z těch teprve rekonstruovat fylogenezi,

neboť pokud postavíme rekonstrukci na malém počtu znaků, můžeme omylem pracovat se znaky nehomologickými či konvergentními.

1) **Proč v současnosti dominuje molekulární fylogenetika nad klasickou, která pracovala s morfologickými znaky (podobně jako Vy v praktické úloze minulé serie)?**

Neboť poskytuje řádově více znaků (= jednotlivé posice nukleotidů v genomu) než klasická lze použít universální metody (PCR, sekvenace) pro všechny organismy. Je objektivnější, rychlejší a jednodušší

1 bod

2) **Vlastní metodika výpočtu fylogenetického stromu zcela radikálně ovlivňuje spolehlivost výsledku. Popište, čím se liší strategie výpočtu u metody algoritmické (např. Neighbor-joining) od metod heuristických (např. Maximum parsimony či Maximum likelihood).**

Algoritmické metody postupně spojují do stromu taxony podle algoritmu, který vyhodnocuje podobnost sekvencí, heuristické metody generují všechny možné topologie fylogenetického stromu a podle zadaného kritéria určují, který strom je nejpravděpodobnější (maximální parsimonie hledá strom, ve kterém je nejméně evolučních změn, maximální věrohodnost - likelihood - naopak hledá nejpravděpodobnější evoluční cestu na základě součtu pravděpodobnosti všech hypotetických mutací, ke kterým mohlo v minulosti dojít).

Za obě metody celkem 2 body

3) **Nastiňte rozdíl mezi distančními metodami a znakovými. Základem řady metod vycházejících z molekulárních dat je evoluční model, k čemu slouží?**

Distanční metody nejdříve počítají matici vzdáleností (distancí) mezi sekvencemi na základě jejich podobnosti a potom je podle tohoto parametru spojují. Znakové metody (např. parsimonie) generují strom přímo na základě jednotlivých znaků (např. dle přítomnosti konkrétních nukleotidů na určité posici v genu atd...). Evoluční model (matice) vyčísluje pravděpodobnost substitucí mezi různými nukleotidy či aminokyselinami. Určuje se většinou empiricky z velkého souboru sekvencí nějakého genu z příbuzných organismů. Na základě pravděpodobností mutací se počítá evoluční vzdálenost mezi sekvencemi či pravděpodobnost konkrétní topologie evolučního stromu.

3 body

4) **Naše data z minulé praktické úlohy zpracujeme metodou maximální parsimonie. Výpočet proveďte pomocí Wagnerova algoritmu (popsán je podrobně například v <http://ibot.sav.sk/usr/Karol/docs/Prednasky>, soubor kladistika9.doc). Výpočetní náročnost roste s počtem taxonů v analýze, tudíž bude stačit, pokud provedete analýzu pro menší počet taxonů (5-6 včetně outgroupu). Čím více znaků použijete, tím bude analýza zajímavější. Pokud bude výsledný strom vycházet nejednoznačně, nevádí, je to jen doklad obtížnosti fylogenetické práce způsobený konvergentními a nehomologickými znaky (nejednoznačné uzly zvýrazněte). U každé větve spočítejte kritérium parsimonie, tedy ke kolika evolučním změnám v konkrétní větvi muselo dojít (větev je linie spojující dvě větvení stromu).**

5 bodů za výpočet,

problematika výpočtu stromu bude probrána na soustředění.

5) **Věrohodnost stromu se dá statisticky vyhodnotit pomocí metod bootstrapování či jack-knife. Nastiňte jejich princip a popište, jak byste je prováděli s Vašimi daty.**

Poměrně často se stává, že různé morfologické znaky či posice v genech poskytují různý fylogenetický strom. Výsledný strom je pak konsensem ze všech znaků či posic. Je však důležité vědět, zda-li výsledná topologie vychází na základě 30% či 80% znaků. Při jack-knife testujeme robustnost stromu tak, že opakovaně, třeba 100x, zahodíme náhodně vybranou polovinu znaků (posic) a s ořezanou sadou dat znovu počítáme strom. Při bootstrapování generujeme opět opakovaně modifikované soubory dat, které mají v tomto případě stejně znaků jako původní soubor, ale jednotlivé znaky jsou z původního souboru vybírány náhodně (tj. některé se opakují, jiné chybí). Z každého souboru opět odvodíme strom. Potom vyhodnotíme, kolikrát jsme získali s náhodně upravenými daty stejný strom jako z primárních dat. Pokud vychází původní topologie

(určuje se pro každé větvení ve stromu) ve více než 50% případů, má smysl se větvemi zabývat, pokud získáme stejné větvení ve více než 80% případů, jedná se již o poměrně robustní výsledek
Za popis obou metod celkem 2 body

6) Co je to artefakt “long branch attraction” a jak vzniká?

Česky „přitahování dlouhých větví“. Projevuje se tak, že vysoce odvozené druhy, které prodělaly mnoho evolučních změn (mutací), seskupuje analýza společně na bázi stromu, místo aby vyčnívaly ze skupin, ze kterých pocházejí. Například parazitické Microsporidia (modifikované houby) a některé velmi odvozené druhy prvoků primitivnější metody seskupují na bázi evolučního stromu eukaryot. Je to způsobeno tím, že během rychlé evoluce mutovala konkrétní pozice mnohokrát a již se dokonale překryl původní fylogenetický signál. Proti tomuto artefaktu je odolná metoda maximum likelihood, která nebere v úvahu jen současné stavy znaku, ale i všechny možné cesty, jakými mohlo být dnešního stavu dosaženo.

1 bod

7) Nepovinný úkol za bonusové body: Můžete zkusit analyzovat vaše data metodou Neighbor-joining.

až 3 body

Úloha 4: Miliardy přátelských bakterií

Autor: Stanislav Vosolsobě

Počet bodů: 15

Řada mléčných výrobků se honosí obsahem živých mléčných bakterií. Vaším úkolem bude experimentálně odhadnout počet živých bakterií vztážený na jednotku objemu výrobku (objem stačí určovat relativně). Srovnajte „přátelskost“ různých produktů. Jedna z použitelných metod se v praxi používá třeba při stanovování čistoty pitné vody. Podrobně popište metodiku a diskutujte výsledky s literaturou.

Úvod

Využijeme kultivační metody. Mléčný výrobek je vlastně suspence bakterií, pokud ji velice naředíme a známé množství rozetřeme na živnou půdu, můžeme pozorovat růst jednotlivých bakteriálních kolonií, kdy každá kolonie odpovídá jedné bakterii v naředěné suspenzi. Kolonie spočítáme a obsah bakterií vypočítáme pronásobením koeficientem ředění. Dle literatury můžeme očekávat obsahy bakterií v řádu 1 milion bakterií na litr

Metodika

Živné médium uvaříme z agaru a mléka (cca 15 - 20 g na litr). Takové médium bude nejjednodušší avšak spolehlivé. Bohužel nelze sterilisovat v tlakovém hrnci, neboť by se srazilo, tedy ho alespoň důkladně převaríme. Rozlijeme do misek, např. nízkých kelímků s víčkem, které desinfikujeme ponořením do Sava či 70% lihu a opláchneme ve sterilisované vodě. Já jsem si dopřál luxusu sterilních Petriho misek.

Zkoumaný výrobek naředíme několikrát za sebou v konstantním poměru, alespoň 1:50, já jsem ředil v poměru 1:100 (10 µl + 990 µl převařeného mléka) pomocí mikropipet. Lze použít jakoukoliv vhodnou desinfikovanou nádobku, na které si uděláme rysky. Malé množství suspenze (100 µl) od všech ředění rozetřeme na médium. Můžeme použít třeba kapátko od nosních kapek a rozetřít malou lžičkou (desinfikuleme v lihu či opálíme nad sporákem). Sterilitu udržíme, pokud držíme misku dnem vzhůru.

Kultivujeme přes noc na topení (optimum je okolo 37°C). Druhý den spočítáme kolonie na všech ředěních.

Testoval jsem jogurt Hollandia, meruňkový kefir a mléko Albert Quality (asi 20 ml nedopitého zbytku, který byl inkubován přes noc na laboratorním stole

Výsledky

Použil jsem čtyři koncentrace:

- výchozího výrobek ředění 100x, rozetřeno 0,1 ml z celkem 1 ml (počet kolonií nutno násobit

- 1 000x pro přepočet na 1 ml (přibližně 1 g) výrobku
- předchozí koncentrace ředěná 100x, opět rozetřeno 0,1 ml (násobíme 100 000x)
- další ředění 100x (násobíme 10 000 000x)
- poslední ředění opět 100x (násobíme 1000 000 000x)

Výrobek	1 000x	100 000x	10 000 000x	1000 000 000x
Jogurt	nespočet kolonií	mnoho kolonií	řídke kolonie	nic
Kefír	nespočet kolonií	řídke kolonie	jednotlivé kolonie	nic
Zašlé mléko	nespočet kolonií	mnoho kolonií	řídke kolonie	nic

Pro odhad početnosti použijeme ředění, kde jsou desítky kolonií (řídke kolonie), pokud jsou na misce pouze jednotky kolonií, může hrát velkou roli náhoda či kontaminace a odhad by byl nespolehlivý. Jogurt i zašlé mléko mají řádově okolo 0,1 miliardy bakterií v 1 g, kefír pouze milion bakterií na 1 g.

Diskuse

Výsledek u jogurtu a kefíru souhlasí s údaji, které nacházíme na internetu. (Jogurt je tvořen pouze mléčnými bakteriemi, kefír je divočejší společenstvo obsahující i kvasinky, které produkují i ethanol a density mikroorganismů jsou nižší). Zajímavý je vysoký počet bakterií ve starém mléku, neboť mléko zatím ani nejevilo pachové známky kysnutí.

*Popis metodiky (ředící metoda,...) za 5 bodů,
provedení, výsledky a diskuse za 10 bodů dle přesnosti.*

Připomínám, že podrobná dokumentace metodiky a diskuse výsledků (tj. porovnání s dostupnými literárními údaji a zhodnocení relevance výsledků) je nedílná součást jakéhokoliv experimentu.

Úloha 5: Blast

Autor: Stanislav Vosolsobě

Počet bodů: 10

Tato část semináře byla zaměřena na hledání podobných sekvencí v databázi

1) Nejdříve prozkoumejte seznamy kompletně sekvenovaných organismů a vyberte druhy, které budou zajímavé, pokud chceme zkoumat historii lidských keratinů (abyste pokryli základní evoluční stupně vývoje živočichů).

Pro kompletní fylogenetickou rekonstrukci bych doporučoval blastovat např. tyto kompletně sekvenované organismy

- nějakého úplně basálního živočicha (vločkovce *Trichoplax adherens* či houbovce *Amphimedon queenslandica*)

- velmi basálního strunatce, např. kopinatce *Branchiostoma floridae*

- rybu či lépe žraloka

- latimerii jako zástupce svaloploutvých ryb, ze kterých se vyvinuli čtyřnožci

- nějakého plaze

- jiného savce než člověka, ptakopyska jako basálního zástupce, myš pro srovnání

Díky tomuto výběru budeme mít vždy představu, k jakému pokroku došlo během hlavních evolučních přechodů (vločkovci a houbovci jsou předchůdci pro Triblastica, kopinatec pro obratlovce atd...)

Blastovat octomicku jako zástupce hmyzu můžeme pro srovnání s vývojem ve druhoústé větvi, ale bez znalosti sekvenční diversity u předků prvo- a druhoústých nemůžeme dělat žádný evoluční závěr.

*Za výběr alespoň 5 druhů 3 body,
pokud nejsou ve výběru respektována výše zmíněná kritéria 1 bod*

2) Pro každý druh proveďte blastování postupně se všemi základními typy lidských keratinů. Vyberte vždy několik nejpodobnějších sekvencí a ty shromažďujte v poznámkovém bloku. Pro přehlednost zjednodušte názvy sekvencí (je úplně jedno, co je v prvním řádku sekvence za znakem ">"). V BioEditu pak odstraňte redundantní sekvence, které se opakují. Výsledný soubor fasta přidejte do řešení úlohy.

Až 7 bodů,

až – 3 body, pokud nejsou sekvence přehledně uspořádány

až – 3 body, pokud je sekvencí malý počet