

BP
9/2008

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra botaniky



Využití mikrosatelitů ke studiu šíření rostlin v řekách

Bakalářská práce

Gabriela Fuxová
Praha 2008

Školitel: Mgr. Tomáš Fér

Obsah

Abstrakt.....	3
Klíčová slova.....	3
Abstract.....	4
Keywords.....	4
1. Úvod.....	5
2. Literární rešerše.....	5
2.1 Šíření rostlin.....	5
2.1.1 Šíření vodou.....	6
2.1.2 Říční systémy.....	6
2.2 Klonální rostliny.....	7
2.3 Fylogeografie.....	8
2.4 Polyploidie.....	9
2.4.1 Autopolyploidie.....	9
2.4.2 Allopolyploidie.....	10
2.5 Molekulární markery.....	10
2.5.1 Mikrosatelity.....	12
2.5.2 Využití mikrosatelitů.....	15
2.6 Phragmites australis.....	16
3. Praktická část.....	19
3.1 Metodika.....	19
3.1.1 Sběr materiálu.....	19
3.1.2 Zpracování v laboratoři.....	20
3.1.3 Vyhodnocování primárních dat.....	22
3.2 Výsledky.....	22
3.2.1 Diskuze.....	24
3.2.2 Závěr.....	24
4. Plánované téma diplomové práce.....	25
4.1 Otázky a způsob jejich řešení.....	25
5. Seznam literatury.....	27



Obrázek 1: *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.

Zdroj: http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/~stueber/thome/band1/tafel_065_small.jpg

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce je shrnout dosavadní poznatky o studiu šíření rostlin, především pak využití molekulárních markerů v této problematice. Za pomoci molekulárních metod můžeme odhalit řadu mechanismů spojených s osidlováním nových stanovišť, udržováním druhové či genotypové bohatosti společenstev a údaje o vlastních principech šíření (míry využívání jednotlivých vektorů, jejich podíl na celkové diversitě společenstev, atd). Pochopení logiky šíření je základem pro pochopení ekologických procesů na krajinné úrovni.

Jako modelový systém pro studium šíření rostlin byly vybrány řeky, které mají řadu specifíků, například lineární charakter či polarizovaný tok diaspor, druhem využívajícím tento vektor ke svému šíření byl zvolen rákos obecný (*Phragmites australis*). Jedná se o klonální rostlinu, což do jisté míry ovlivňuje diversitu populací. Ke studiu genetické diversity populací rákosu v České republice byly použity mikrosatelity – vysoce variabilní molekulární marker. *Phragmites australis* je polyploidní rostlina, což s sebou nese určitá úskalí ohledně interpretace jednotlivých alel v lokusech. Problematika polyploidních rostlin i nástin řešení skórování allotetraploidních vzorků rákosu jsou taktéž uvedeny v následujícím textu.

Moje bakalářská práce má tři části. Hlavní částí je literární rešerše, kde je diskutována problematika spojená jak s molekulárními metodami studia šíření rostlin, tak s druhem *Phragmites australis* a potažmo jinými vodními klonálními rostlinami. Druhá část je věnována již provedené analýze několika vzorků a metodice dalšího zkoumání, která bude použita v rámci navazující diplomové práce. Poslední částí je nástin otázek, které bych chtěla zodpovědět v rámci diplomové práce.

Klíčová slova

fylogeografie, klonalita, hydrochorie, mikrosatelity, molekulární markery, *Phragmites australis*, polyploidie, rákos obecný, říční systémy, vodní rostliny

Abstract

The aim of this bachelor thesis is to summarize present pieces of knowledge about plant dispersal, especially using molecular markers in this questions. By using molecular methods we can detect a number of mechanisms connected with new locality colonization, preserving species or genotype diversity and getting data about principles of dispersal (amount of using dispersal vectors, their participation on species diversity,...). To understand the principles of plant dispersal is crucial for understanding ecological processes at the landscape level.

As the model of the plant dispersal were chosen river systems, with many specifications, like linear character and polarized seed flow; as the studied species were selected common reed – *Phragmites australis*. It is clonal plant, and this feature influences population diversity. For studying genetic diversity of *Phragmites australis* were used microsatellites – a highly polymorphic marker. Common reed is a polyploid species, with a little problems in interpretation of single allele in locus. Problems of polyploid species and outline of interpretation of allotetraploid samples are presented in the following text.

My bachelor thesis has three parts. The main part is literature search, where problems connected with molecular methods of plant dispersal and problems with *Phragmites australis* and other water clonal plants are discussed. The second part consist of a few already analyzed samples and the methodology, which will be use in consequential master degree thesis. The last part is a summary of questions I wish to answer in my master degree thesis.

Keywords

clonality, common reed, hydrochory, microsatellites, molecular markers, *Phragmites australis*.
phylogeography, polyploidy, river systems, water plants

1. Úvod

Šíření rostlin je jedním z hlavních procesů evoluce a dynamiky rostlinných populací (Ouborg et al. 1999). Prostorové uspořádání v rámci ekosystému je dáno z velké části pohybem semen. Na regionální úrovni může pohyb semen dokonce určovat míru kolonizace nových prostor či naopak extinkci některých populací (Brown et Kodric-Brown 1977). K tomu, abychom porozuměli vlivu jednotlivých dispersních vektorů na rozložení rostlinného společenstva v daném ekosystému je potřeba mít co nejdetailnější znalosti o studovaném druhu/druzích, a to nejen ekologické a fyziologické, ale především genetické.

V této bakalářské práci se budu věnovat studiu šíření rákosu *Phragmites australis* pomocí polymorfismu mikrosatelitových lokusů. Rákos obecný je vodní klonální allotetraploidní druh. Všechny tyto charakteristiky s sebou nesou jistou míru komplikací, co se studia za pomoci molekulárních markerů týče. Vysvětlení jednotlivých pojmů a nástin řešení problematiky s nimi spojené je hlavní náplní literární rešerše.

2. Literární rešerše

2.1 Šíření rostlin

Rostliny jsou sesilní organismy, které ke svému šíření využívají reprodukční fáze svého životního cyklu, neboť nemají schopnost aktivního pohybu (pomineme-li autochorii – šíření semen nebo plodů vlastními silami rostliny, bez vlivů okolí). Během tohoto období tvoří diaspory, neboli částice oddělené od rostliny, které mohou dát vznik novému jedinci (Sernader 1906 sec. Müller-Schneider a Lhotská 1971).

Diaspory jako takové můžeme rozdělit podle způsobu jejich vzniku na vegetativní a generativní. Vegetativní (výběžky - nadzemní i podzemní, pupeny, hlízy, turiony, pacibulky) slouží k rozrůstání populace na dané lokalitě, kde již rostlina našla své optimum a je pro ni tedy výhodnější stát se méně závislou na generativním rozmnožování (Eriksson 1992), i k šíření na větší vzdálenosti. Generativní diaspory jsou určeny ke kolonizaci nových (tedy vzdálenějších) míst, takto vzniklé diaspory operují s vyšší variabilitou genetické informace v dceřinných generacích, a tedy širším spektrem ekologických optim. Dochází zde ke vzniku spor, semen, plodů, které jsou dále šířeny disperzními vektory – větrem (anemochorie), vodou (hydrochorie), zvířaty (zoochorie), člověkem (antropochorie)...

2.1.1 Šíření vodou

Rostliny využívající k šíření svých diaspor proudění vody se nazývají hydrochorní (Dammer 1892 sec. Müller-Schneider a Lhotská 1971). Lze říci, že každá rostlina má možnost být šířena vodou, avšak existuje skupina rostlin, které na tomto principu staví svoji disperzní strategii (Fér 2000). Jsou to typicky druhy obývající vodní, pobřežní a mokřadní ekosystémy, mají vyvinuty mechanismy, které pomáhají diasporám ještě více využít daného vektoru – proudění vody. Těmito mechanismy rozumíme investici do plovatelnosti semen, uzpůsobení dormance, přizpůsobení klíčení semen ve vodě či pod vodou (Fér 2000). Hydrochorie není nijak určena taxonomicky, vyvinula se nezávisle u mnoha skupin rostlin (Johansson et al. 1996, van der Pijl 1982).

Disperzními vektory hydrochorních rostlin se rozumí vodní plochy (rybníky, jezera...), říční koryta, mořské ekosystémy i déšť.

2.1.2 Říční systémy

V této práci se budu zabývat šířením rostlin podél říčních toků. Řeka představuje lineární ekosystém protékající krajinou, který zasahuje do ostatních ekosystémů a hraje významnou roli při přísunu bioty, vytváření habitatů (Cummins et al. 1989) a při šíření diaspor rostlin v okolí.

Budeme-li se na řeku dívat čistě z hlediska disperse, pak je voda v korytě vektorem hydrochorního šíření, který je specifický polarizovaným tokem diaspor zprostředkovaným vodním proudem (Johansson 1996) a migračními cestami, které jsou trvale determinované (Fér 2000). Tyto dva aspekty v jistém směru usnadňují případné studium druhů zde se vyskytujících (zejména populační analýzy atd). V takto „zjednodušeném“ systému můžeme zkoumat právě roli řeky v ustavování diversity jejího okolí, neboť rostliny se nešíří pouze po směru toku (Nilsson et al. 1991), a případné vlivy dalších biotických i abiotických vektorů – větru, ptactva a člověka (ať už budeme uvažovat jeho zásahy do charakteru toku nebo jeho vlastní funkci vektoru).

Vodní prostředí se dlouhou dobu považovalo za víceméně uniformní (Sculthorpe 1967, Les 1988, Barrett et. al. 1993) díky relativně subkosmopolitnímu rozšíření vodních rostlin. Santamaría (2002) tento omyl vyvrací ve své práci zabývající se vysvětlením širokého rozšíření vodních rostlin. Zmiňuje zde stresové faktory, které vodní prostředí ovlivňují a pro rostliny jsou zcela určující. Nedostatek uhlíku, přebytek sedimentů a následný nedostatek kyslíku pro kořeny, mechanická poškození způsobená proudem, osmotický stres i limitované

zdroje sice donutili rostliny vytvořit podobné mechanismy k přežití, avšak i tyto limitující faktory mají širokou škálu působení, která je v různých částech vodního prostředí odlišná (v rámci řeky kupříkladu rozdíl mezi břehem s rychle tekoucím proudem a zátočinou plnou náplav) (Santamaría 2002).

2.2 Klonální rostliny

Klonální rozmnožování u rostlin je klasickým příkladem nepohlavního rozmnožování. Rostlině tento způsob pomáhá vyrovnat se se stresujícími podmínkami prostředí, ve kterých žije (Loxdale et Lushai 2003, Klekowski 2003), neboť právě stresovými faktory bývá často limitováno pohlavní rozmnožování, a z genetického hlediska se tak snižuje riziko vymizení daného genotypu (Barret et al. 1993). Celkově lze říci, že klonální šíření rostliny je používáno především v měřících jejího mikroareálu, pro který je klon nejlépe přizpůsoben, a generativní šíření slouží ke vzniku nových (variabilních) genotypů, které jsou naopak šířeny na větší vzdálenosti, kde mají větší šanci na uchycení spíše ony. (Santamaría, Clausen et al. 2000)

Pro vědeckou práci na druzích s klonálním způsobem rozmnožování jsou důležité pojmy genet a rameta (Kays et Harper 1974). Genetou rozumíme jednoho genetického jedince, který se za pomoci různých oddenků může šířit do vzdálených míst, ovšem stále se jedná pouze o jeden genetický celek. Rameta je naproti tomu výběžkem genety, který vypadá jako samostatný jedinec, ale není geneticky odlišný od ostatních ramet, se kterými může či nemusí být v rámci genety vzájemně propojen.

Geneta tedy v podobě klonu může žít relativně dlouho, neboť dochází k neustálému obnovování „schránky“ genetické informace. Tím se zajistí pravděpodobnější přežití populace, což má nejspíše za následek nízkou genetickou variabilitu v rámci populace a relativně vysokou variabilitu mezi populacemi (Santamaría 2003).

Přestože je klonální rozmnožování zastoupeno v rostliné říši relativně nerovnoměrně, je takřka pravidlem, že rostliny s touto životní strategií obývají subkosmopolitní areály. (Thiébaud 2007). Na jejich výskyt má díky vysoké ekologické valenci vliv pouze silný nedostatek živin, toxické prostředí či teplotní stres ohrožující metabolismus buněk. Naproti tomu se zdá, že klima nemá na jejich výskyt žádný vliv (Santamaría 2003).

V rámci vodních rostlin se s klonálním rozmnožováním setkáváme velice často (Les 2003). Voda tvoří ideální vektor pro šíření částí genet a jejich disperzi na vhodné místo. Díky zcela patrné výhodnosti této strategie nacházíme klonalitu i u řady invazivních druhů (např.

Impatiens grandiflora, *Heracleum mantegazzianum*, *Reynoutria*,...), které často právě řeky používají jako výchozí místo pro své našíření do okolních ekosystémů (Thiébaud 2007).

2.3 Fylogeografie

Fylogeografie je obor zabývající se principy a procesy řídícími geografickou distribuci genealogických linií, povětšinou na vnitrodruhové úrovni (Avise 1998). Za pomoci tzv. molekulárních markerů určuje příbuznost studovaných jedinců (Hennig 1999), kterou znázorňuje pomocí fylogenetických stromů, a tato zjištění následně porovnává s geografickým rozšířením jednotlivých vzorků. Na základě srovnání těchto dvou informací lze do jisté míry zrekonstruovat historickou migraci druhu/druhů, odhalit jednotlivé migrační proudy a případné migrační vztahy lokalit (Avise 2000).

Měřítko pro fylogeografické studie je prakticky neomezené. Záleží pouze na tom, jak velký vzorek – fylum – si definujeme (jedná se o monofyletický soubor jedinců, u nichž následně určujeme příbuznost; Hennig 1999). Asi nejvíce zkoumanou fylogeografickou otázkou je postglaciální migrace druhů (Petit et al. 1997, Sádlo et al. 2005), která představuje velké fylum na rozloze kontinentu (tedy druh nebo skupinu blízce příbuzných druhů). Zároveň však jde časoprostorová příbuznost studovat i na malých škálách – pohoří, povodí, okres (Tribsch et al. 2002, Fischer et al. 2000).

Příbuznost jednotlivých jedinců je určována pomocí jednoho či více molekulárních markerů či jiných fylogenetických analýz (Arbogast et Kenagy 2001). Nejčastěji se používají markery, které ke studiu používají nerekombinující části DNA děděné po mateřské linii (u rostlin plastidová DNA, u živočichů mitochondriální DNA).

Velkou nevýhodou fylogeografických analýz je jejich neschopnost zachytit vyhynulé linie. Pracujeme s alelami, které vzájemně porovnáváme a alely vymřelých linií jsou tedy nenávratně ztraceny. Proto nelze molekulární metody použít na dobu před posledním interglaciálem, zde přichází ke slovu palynologie a paleontologie. Přesto v rámci tohoto interglaciálu lze za pomoci markerů a fylogenetických stromů zjišťovat i ty nejjemnější změny v sekvencích polynukleotidů, na jejichž základě je novodobá fylogeografie postavena. A právě díky velkému rozvoji molekulárních technik zažívá toto odvětví geografie za dvacet let své existence velký rozkvět (Avise 1998). Zkoumá se výše zmíněná postglaciální migrace (Petit et al. 1997), zjišťují se migrační koridory jednotlivých druhů či skupin rostlin (Palmé et Vendramin 2002), odhalují se principy speciace a další významné události v rostlinné i živočišné říši.

2.4 Polyploidie

Polyploidie je významným evolučním procesem v rostlinné i živočišné říši, díky němuž může docházet i ke speciaci. Řada studií prokázala, že zdvojování genomu (opakovaná polyploidizace) je přítomné v evoluci velké části eukaryotních organismů (Lundin 1993, Sidow 1996), a je významným evolučním procesem. Největšího rozmachu dosahuje u rostlin, kde zvýšení chromozomových sádek není ve většině případů letální. V živočišné říši se s ní nesetkáváme tak často (White 1973), ovšem i zde je známa, včetně případů z podkmene obratlovců. Grant (1981) definoval polyploidii jako výskyt většího počtu chromozomů v karyotypu organismu, který vznikl přidáním celé chromosomové sady přítomné v mateřském organismu. Jinými slovy je polyploidie výskyt tří a více chromosomových sad.

Polyploidizace může vést k rozrůznění ekologických nároků zástupců jednotlivých stupňů ploidie – polyploidní organismy mohou obsazovat ekologické niky s podmínkami mezi habitaty diploidních předků (Soltis et al. 2003). Procesu polyploidizace se využívá například ve šlechtitelství kulturních i okrasných plodin (díky morfologickým změnám lze docílit zvýšení výnosů atd.), díky prokazatelnému vlivu počtu sad chromozomů na morfologii jedince (polyploidní rostliny mívají např. větší buňky, pozdější kvetení a plození, menší počet větších semen...; Clevering et Lissner 1999).

Podle způsobu vzniku polyploidních jedinců rozlišujeme několik typů polyploidie. Základní dělení na autopolyploidy a allopolyploidy pochází z roku 1926 (Kihara et Ono). Toto dělení zůstalo zachováno dodnes, bylo pouze doplněno o několik dalších podskupin na základě genetických a buněčných kritérií. Grant (1981) ve své knize uvádí, že základním kritériem pro rozlišení autopolyploidů a allopolyploidů (též označovaných jako amphiploidi) je chování chromozomů, plodnost, míra segregace a také morfologie. Allopolyploidi vznikají mezi jedinci různých druhů, autopolyploidi vznikají zpravidla uvnitř druhů (Soltis et Riesenberga 1986).

2.4.1 Autopolyploidie

Autopolyploid vzniká znásobením téže chromosomové sady (máme-li na začátku diploida, vznikne nám autotetraploid; $AA \rightarrow AAAA$). K takovéto události může dojít například působením tepelného šoku, který ovlivní průběh mitosy v zygotě, chromosomy se nerozestoupí do dvou buněk s normálním diploidním počtem chromosomů, ale vznikne jedna diploidní buňka, která obsahuje čtyřnásobek haploidní chromosomové sady. Z takto

vzniklých buněk může následně vyrůst polyploidní větev. Další možností vzniku autopolyploidie je i splnutí neredukovaných gamet (AA + AA) (Briggs et Walters 2001).

2.4.2 Allopolyploidie

Allopolyploid vzniká splnutím nestejných chromozomových sad (AA, BB → AB → AABB), tedy křížením dvou rozdílných druhů, při kterém vznikne neplodný hybrid (AB). Ten však může vytvořit malé procento neredukovaných gamet, které dají vzniknout polyploidní větvi AABB (Briggs et Walters 2001) která už plodná je.

2.5 Molekulární markery

Je mnoho metod, kterými se dá studovat šíření rostlin. Patří mezi ně metody přímé – chytání semen do pastí (Thiede et Augspurger 1996, Fér 2000), vypouštění označených semen (Johansson et Nilsson 1993), zkoumání drah disperzních vektorů za pomoci náhražek propagulí (Nilsson et al. 1991); a metody nepřímé – modelování drah za pomoci počítačových programů či laboratorních simulací (Cain et al. 1998). Tyto metody (zvláště přímé) mohou být velice přesné, však mají svoje nevýhody. Vzhledem k vysoké náročnosti zachování původních podmínek v terénu a často složité metodice, není výsledná disperzní křivka modelovaná na základě takto získaných dat tak přesná, jak by mohla být. Vykazuje totiž vysoký podíl šíření semen na krátkou vzdálenost a velice málo případů dálkového přenosu (Ouburg et al. 1999). Jinými slovy nám říká, že dálkový přenos je pouze náhodným jevem, což se ovšem neshoduje s experimentálně zjištěnou mírou osidlování nových prostor (Cain et al. 1998), neboť tyto experimentální metody nejsou schopny postihnout jev náhodného dálkového šíření.

Jak tedy lépe studovat šíření rostlin, ať již na krátké či dlouhé vzdálenosti, a nezanedbat ani jeden z aspektů? Jednou z možností je využít spojení ekologických a populačně genetických metod (Silvertown 1991). Disperze a genetický tok, který je v tomto případě zkoumán (místo toku propagulí), jsou úzce spojeny. A právě na rozdílnosti genetických informací vzniklých z velké části náhodným genetickým driftem selektivně neutrálních alel (Hartl et Clark 1997) jsou postaveny moderní molekulární markery.

Pojem marker všeobecně představuje cíleně vybranou část celkové informace, znak, který nějakým způsobem vypovídá o příbuznosti daného souboru vzorků (jedinci, populace, druhu). Podíváme-li se do minulosti, už Gregor Mendel v devatenáctém století použil první marker fenotypového rázu. Moderní molekulární markery představují informace získané na základě analýzy molekul DNA či proteinů. Předpokladem pro správnou analýzu vegetace je

tedy především výběr vhodné části informace – nejlépe takové, která nemá vliv na fitness jedince (tedy selektivně neutrální).

Za posledních několik let byla vyvinuta řada metod pro pokrytí co největší škály ekologické, evoluční, taxonomické či genetické problematiky. Ideální molekulární marker by měl podle Agarwal et al. (2008) splňovat následující kritéria: být polymorfní a rovnoměrně rozmístěný po celém genomu, poskytovat adekvátní vysvětlení genetických rozdílů, vytvářet nezávislý a spolehlivý marker, měl by být jednoduchý, levný a rychlý, k analýze by měl potřebovat co nejmenší vzorek DNA, mít vazbu na různé fenotypy a neměl by vyžadovat žádnou předchozí informaci o genomu či organismu. Tyto požadavky však zatím nebyly splněny v rámci jedné techniky, proto dnes máme k dispozici celou škálu molekulárních markerů lišících se v různých ohledech (tabulka 1), ze kterých je vždy potřeba vybrat ten „nejvhodnější“ pro danou studii (Sun et al. 1999).

Jedněmi z nejstarších molekulárních markerů jsou allozomy. Jejich mutační rychlost se uvádí v řádech 10^{-6} (Voelker et al. 1980) a našli své uplatnění především díky nízké náročnosti na technickou úroveň. Bohužel často (ne vždy) ukazují pouze malou variabilitu (Barret et al. 1993) a jsou dědičné z mateřské i otcovské rostliny (přes semena i pyl), je tedy potřeba odlišit šíření semen a přenos pylu. Dodnes je nevyřešena otázka, zda jsou allozomy selektivně neutrální či nikoliv.

Novodobé markery (RAPD, RFLP, AFLP, minisatelity, mikrosatelity) představují další krok k dokonalejšímu studiu rostlinných genomů. Ouborg et al. (1999) ve své práci uvádí rozdílnosti mezi těmito základními technikami a zároveň odhaluje základní principy výběru markeru podle charakteru práce.

Výše zmíněné markery se liší typem a množstvím vysvětlované variability. Každá metoda má svá pro a proti. Například množství vysvětlované variability je potřeba vybrat s přihlédnutím na studovaný vzorek. Studujeme-li populace na velkém území, je lepší vybrat si méně variabilní marker, který nám ukáže pouze větší rozdílnosti v genomu a ty menší, které by v tomto případě byly matoucí, nechá bez odezvy. Nejméně variabilním markerem jsou allozomy, o něco více variability zachytí RAPD a RFLP, pro odlišení jemných rozdílů v populacích se nejlépe hodí mikrosatelity a minisatellite fingerprints.

Další charakteristikou markeru je dominance/kodominance. Kodominantní marker je schopen rozlišit mezi homozygotem a heterozygotem (allozomy, mikrosatelity, RFLP), dále dovoluje snadné odhadnutí frekvencí jednotlivých alel v populaci. Dominantní marker (RAPD, AFLP) tuto vlastnost nemá.

Výběr studovaného genetického materiálu také ovlivňuje informace, které můžeme dostat. Jaderná DNA se dědí biparentálně – semeny i pylem. Organelová DNA je často děděna uniparentálně a je tedy lépe detekovatelná cesta od mateřského jedince k našemu vzorku (například při analýze rodičovství...)

Tabulka 1: srovnání nejčastěji používaných molekulárních markerů (Agarwal et al. 2008)

RFLP restriction length polymorphism, RAPD random amplified polymorphic DNA, SSR simple sequence repeats (mikrosatelity), SSCP single strand conformational polymorphism, CAPS cleaved amplified polymorphic sequence, SCAR sequence characterized amplified region, AFLP amplified fragment length polymorphism, IRAP/REMAP inter-retrotransposon amplified polymorphism/retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism

	množství	reproduko- vatelnost	stupeň polymorfismu	lokusová specifita	technické požadavky	množství potřebné DNA	hlavní použití
RFLP	vysoké	vysoká	střední	ano	vysoké	vysoké	fyzické mapování
RAPD	vysoké	nízká	střední	ne	nízké	nízké	genové značení
SSR	střední	střední	střední	ne	střední	nízké	genetická diversita
SSCP	nízké	střední	nízký	ano	střední	nízké	SNP mapování
CAPS	nízké	vysoká	nízký	ano	vysoké	nízké	alelická diversita
SCAR	nízké	vysoká	střední	ano	střední	nízké	genové značení a fyzické mapování
AFLP	vysoké	vysoká	střední	ne	střední	střední	genové značení
IRAP/REMAP	vysoké	vysoká	střední	ano	vysoké	nízké	genetická diversita
RAMPO	střední	střední	střední	ano	vysoké	nízké	genetická diversita

2.5.1 Mikrosatelity

Mikrosatelity nebo též Simple Sequence Repeats (SSRs; Balloux et Lugon-Moulin 2002) jsou tandemově se opakující repetice 1-6 bp nacházející se v eukaryotických i prokaryotických genomech. Vyskytují se převážně v nekódujících oblastech DNA (Metzgar et al. 2000) a jsou charakterizovány vysokým stupněm délkového polymorfismu. Jejich původ je nejspíše ve sklouznutí polymerázy v průběhu replikace DNA (Schlötteter et Tautz 1992), mutační rychlost je relativně velká – 10^{-3} až 10^{-5} na lokus (Tautz 1989). V posledních 30 letech se staly díky své vysoké variabilitě vyhledávaným molekulárním markerem využívaným pro studium populačně genetických otázek.

Jedinou nevýhodou je jejich neuniverzálnost – pro každý druh je potřeba vyvinout nový specifický pár primerů pro PCR reakci, což je relativně náročné (Zane et al. 2002). Každý druh má kolem mikrosatelitů tzv. flanking regions – specifické sekvence nukleotidů, které jsou stejné pro každého jedince daného druhu pro daný mikrosatelit. Kompatibilní primery lze tedy najít buď sekvenací genomu tohoto druhu (řadu osekvenovaných druhů lze nalézt v genomových knihovnách), nebo využitím primerů vyvinutých pro blízce příbuzný

druh – metodou tzv. cross-amplifikace (úspěšnost amplifikace zcela logicky klesá s fylogenetickou vzdáleností; Scribner et Pearce 2000).

Mikrosatelity rozdělujeme do tří skupin:

- 1) jednoduché (simple) – ATATATATATATAT...
- 2) složené (compound) – ATATATATATATGCGCGCGCGC....
- 3) přerušované (interrupted) – ATATATCCATATACCATATAT...

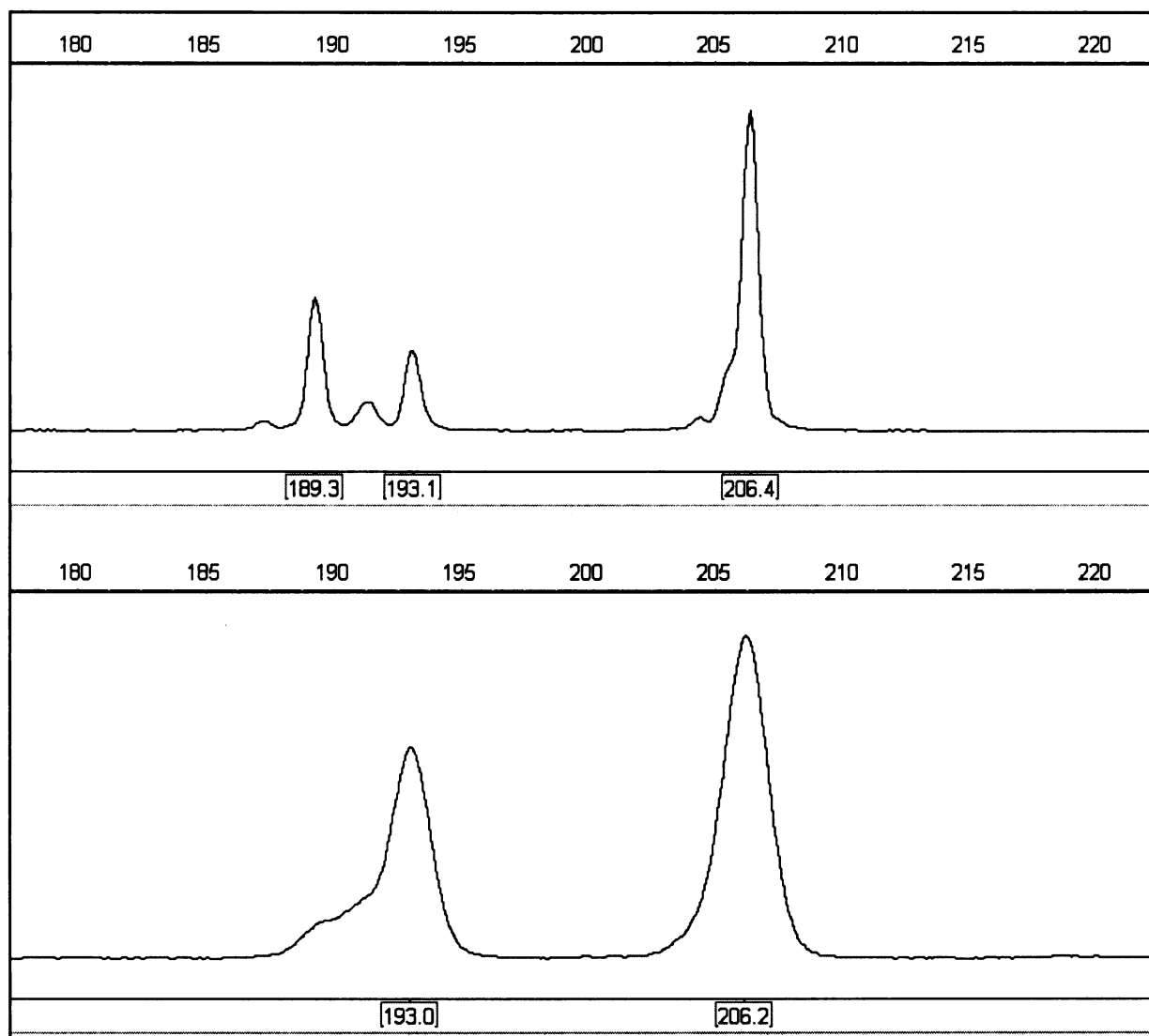
Nejčastější počty opakujících se bází jsou tři: dinukleotidy (u rostlin nejčastěji sekvence AT), trinukleotidy (neporušují čtecí rámec, vyskytují se tedy i v kódujících oblastech genomu) a tetranukleotidy (Jarne et Lagoda 1996).

Zjišťovaná variabilita vzorků je závislá na počtu opakování dané sekvence a zcela odpovídá délce PCR produktů, což umožňuje snadnou detekci alel v lokusu (každá má jinou délku/mají obě stejnou délku). Takto jednoduše odhalíme heterozygoty či homozygoty v diploidních populacích. Při studiu polyploidních druhů si takto jistí být nemůžeme. Ve chvíli, kdy se nám např. pro allotetraploida objeví fenotyp „AB“, nevíme, jestli se jedná o genotyp ABAA, ABAB nebo ABBB (Markwith et al. 2006).

S touto problematikou skórování je potřeba se vypořádat především kvůli statistickým programům, které zatím nejsou schopny pracovat s neúplně určenými allopolyploidními vzorky. V tuto chvíli máme dvě možnosti skórování mikrosatelitových gelů.

Becher et al. (2000) se rozhodl posuzovat každou alelu (tedy každou délku PCR produktu) zvlášť – jako přítomnou či nepřítomnou. Pro výslednou binární matici dat lze poté použít techniky vyvinuté pro dominantní markery.

Saltonstall (2003) oproti tomu použila „diploidní model“ skórování. Pokud se vyskytly alely dvě nebo tři, byly ostatní označeny za chybějící v rámci lokusu, přestože mohly být přítomny pouze ve stejných kopiích. Tento přístup ovšem nepočítá s případem, že se jedna alela vyskytuje v lokusu ve třech kopiích a druhá pouze v jedné, což je také zdroj variability, který je tímto způsobem ztracen.



Obrázek 2: Ukázka analýzy primárních dat v programu GeneMarker dvěma různými způsoby

Becher et al. (2000):

alela	189	193	207
jedinec 1	1	1	1
jedinec 2	0	1	1

Saltonstall (2003):

(? – chybející data)

	lokus 1			
jedinec 1	189	193	207	?
jedinec 2	193	207	?	?

Těmito dvěma způsoby lze připravit datovou matici, kterou můžeme použít jako výchozí pro některé statistické programy. Ovšem přicházíme tak o část informace. Markwith et al. (2006) přišel s programem Tetrasat, ve kterém se snaží vyvinout systém, který by využil všech dostupných informací o autotetraploidním vzorku. Program si podle počtu zadaných alel dodá do matice všechny ostatní možné kombinace lokusu, se kterými dále pracuje. Jedná se tak o jeden z mála principů, jak nepřijít o část variability a ještě více tak zhodnotit

genetickou informaci obsaženou ve vzorcích. Program však lze použít pouze pro omezené množství vzorků a lokusů a nelze ho využít pro allopolyploidní druhy.

2.5.2 Využití mikrosatelitů

Mikrosatelity mají díky svým jedinečným vlastnostem řadu využití. Máme-li k dispozici všechny jedince dané populace, lze s téměř stoprocentní pravděpodobností určit rodiče daného jedince (tzv. analýza paternity a příbuznosti). Na stejném principu (porovnávání genotypů) funguje i identifikace klonů. Další využití nacházejí mikrosatelity v populačně-genetických studiích, kde sledují genový tok a migrace jednotlivých genotypů, popřípadě zkoumají historii populací a jejich efektivní velikost.

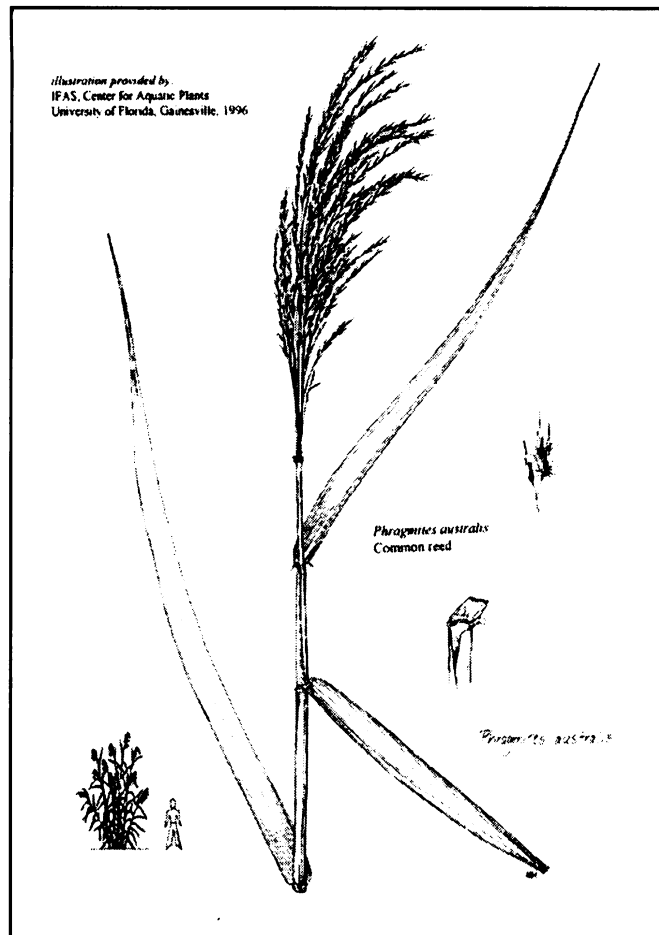
Příkladem analýzy rodičovství je článek Robledo-Arnuncio et Gil (2005), kteří zkoumali model šíření pylových zrn v rámci izolované populace *Pinus sylvestris*. K dispozici měli 36 stromů v rámci malé reliktní populace, z nichž sebrali k analýze 813 semen. Zjistili, že dálková imigrace pylu představuje 4,3 % pozorovaného opylení, samoopylení je velice časté (25%) a průměrná vzdálenost přenosu pylu je 48m. Z dalších analýz vyplynulo, že počet a distribuce donorů pylu v malé populaci může silně ovlivňovat směr efektivního šíření pylových zrn.

Fér et Hroudová (2008a) zkoumali šíření *Nuphar lutea* v říčních korytech. Ze 44 lokalit nacházejících se na řekách Cidlina, Mrlina a Labe (ČR) sebrali 156 vzorků, které následně zanalyzovali pomocí mikrosatelitů. Zjistili, že šíření vegetativních propagulí na dlouhé vzdálenosti je u tohoto druhu velmi limitované. Vzhledem k prokázané vyšší genetické diversitě v dolní části toku řeky lze usuzovat na šíření druhu po proudu, a díky pozitivní autokorelaci mezi jedinci a říční vzdáleností lze předpokládat opakované šíření semen v rámci deseti kilometrů.

Mikrosatelity byly použity i ke studiu genetické diversity a šíření rákosu obecného v rámci malého říčního systému (Fér et Hroudová 2008b). Bylo sebráno 189 vzorků na březích řek Cidlina a Mrlina. Pomocí Bayesovského clusterování jedinců odhalili autoři několik clusterů, jejichž distribuce ukazuje na šíření vodou nebo větrem podél toku řeky. Ostatní clustery byly rozesety náhodně podél obou řek a lze tedy usuzovat na šíření za pomoci větru. Vzdálenost mezi jednotlivými populacemi se stejnými genotypy se pohybovala od 0,5 do 10,8 km, což může být dáno vegetativním šířením na dlouhé vzdálenosti.

2.6 Phragmites australis

Rákos obecný (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.) je kosmopolitně rozšířená rostlina z čeledi Poaceae tvořící rozsáhlé klonální porosty (Marks et al. 1993). Její původ je nejspíše ve východní či střední Asii (Gorenflot et al. 1990 ex Clevering et Lissner 1999). Roste na většině typech půd od jílovitých po písčité a je tolerantní k slaným i alkalickým podmínkám (Marks et al. 1993). Nejčastěji se s ním (krom vodního prostředí) setkáváme podél železničních tratí, v silničních příkopech a jiných prohloubeninách, ve kterých se drží voda.



Obrázek 3: *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.
zdroj: <http://aquat1.ifas.ufl.edu/phraus2.jpg>

Jedná se o vysokou jednoletou rostlinu se vzpřímenými, 2 až 4m vysokými stébly, která jsou neohebná, hladká a dutá. V průměru mohou mít až 2,5 cm a jsou zakončena hustou, často nafialovělou třiceticentimetrovou latou se 3-7květými klásky. Šedozelené listy vyrůstají ze stébla a jsou 25-50 cm dlouhé, 1-5 cm široké. Kořenový systém je silně vyvinutý, vytváří hustou síť výběžků, ze kterého následně vyrůstají další ramety, kořeny rákosu šahají do hloubky okolo 1 m.

Rozmnožuje se výběžky (obr. 4) nebo plody (Hejný 1960). Obilky jsou šířeny především větrem a vodou (do vodních toků mohou padat celé laty), je známé i šíření ptáky (Ridley 1930). Vegetativní rozmnožování slouží k posílení populace v rámci dané lokality a rákos tímto způsobem vytváří rozsáhlé porosty složené z jednoho či více klonů. Hydrochorně se mohou šířit i jednotlivé úlomky oddenků (Haslam 1972).

Porosty rákosu chrání pobřeží před erozí půdy, udržují živiny na daném místě a vytváří postupný přechod mezi vodní plochou a suchou půdou. Rákos je často vysazován do nově vzniklých břehů aby bránil jejich sesuvu (Uchytíl 1992). Slouží jako zdroj potravy pro

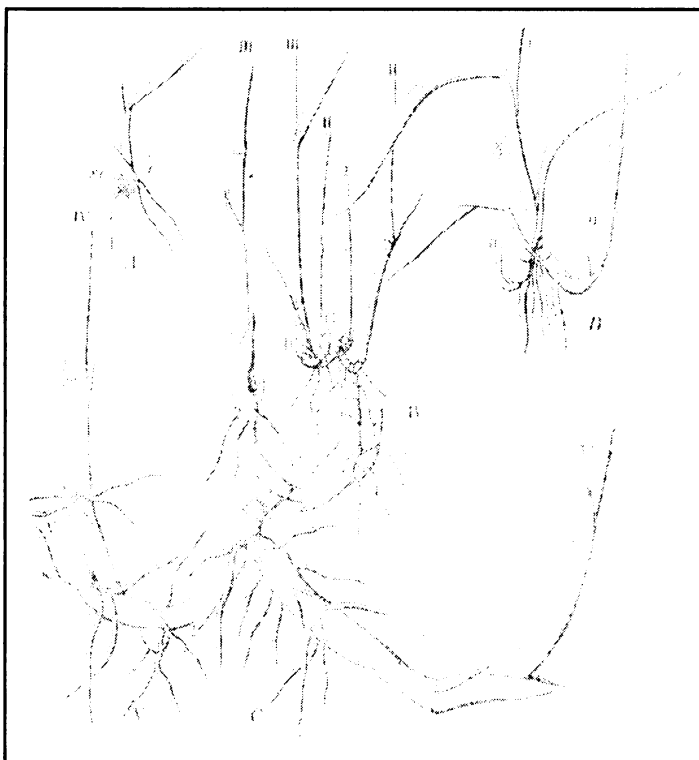
členovce, ptáky a savce a v neposlední řadě vytváří specifický domov pro řadu ohrožených druhů, které jsou na tomto habitatu závislé (Ostendorp 2003).

V rámci vodních makrofyt je *Phragmites australis* jednou z nejvíce studovaných rostlin (Fér 2008). Její vysoký počet ploidních úrovní a klonální charakter otvírá širokou škálu otázek ohledně vlivu polyploidie na morfologii, ekologii atd.

Základními euploidními čísly rákosu je 3x, 4x, 6x, 7x, 8x, 10x, 11x, 12x ($x=12$), z čehož nejběžnější jsou

tetraploidi ($2n = 48$) a oktoploidi ($2n = 96$) (Clevering et Lissner 1999). Tetraploidi jsou považováni za allotetrapolyploidy, vznikli hybridizací dvou mateřských druhů, oktoploidi jsou autoallooktoploidní, tedy vznikli zdvojením chromosomů allotetraploidů (Clevering et Lissner 1999). Vzhledem k postupné migraci polyploidů za dobu jejich existence (několik tisíc let) není překvapením, že jednotlivé stupně ploidie mají svá „centra“ rozšíření. Tetraploidi (evolučně zřejmě nejstarší) jsou dominantními v Evropě a Americe, kdežto oktoploidi převažují v Asii (bylo dokázáno, že ke zdvojení chromosomů a jejich vzniku došlo opakovaně; Gorenflot et al. 1979 ex Clevering et Lissner 1999). V České republice se setkáváme především s tetraploidy, oktoploidní populace byla nalezena na slanisku Nesyt (Clevering et Lissner 1999).

Hansen et al. (2006) se ve své práci zabýval vlivem stupně ploidie a geografického původu na morfologii klonů. Z jeho studia vyplynulo, že oktoploidní genotyp má větší listy, vyšší a mohutnější výhony a větší buňky než hexaploidi a tetraploidi. Dodekaploidi se nijak významně neliší od ostatních genotypů, tetraploidi jsou podobní hexaploidům. Hustota průduchů klesá se stupněm ploidie, zřejmě díky prodlužujícím se průvodním buňkám. Závěrem ovšem dodává, že rozdílnost mezi jednotlivými zkoumanými klony je z velké míry dána vysokou genetickou variabilitou a kosmopolitním rozšířením rákosum.



Obrázek 4: tři semenáčky: A-velmi mladý, C-nejstarší zdroj: <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Warming-Skudbygning-Fig10-Phragmites-australis.jpg>

Klonální charakter druhu *Phragmites* vyvolává další otázky ohledně genetické variability v rámci populací. Pokud bychom totiž brali populaci na dané lokalitě jako jeden genetický celek (jeden klon), dopustili bychom se chyby. White et al. (2004) prováděl výzkum klonálních porostů *Phragmites australis* v deltě řeky Mississippi. Zjišťoval, zda jsou populace tvořeny pouze jedním klonem. Dle očekávání zjistil, že tomu tak není a v rámci velkých populací může nalézt i několik geneticky i morfologicky odlišitelných klonů. Ovšem zajímavé bylo prostorové uspořádání daných populací. White et al. (2004) našel tzv. „background“ a „patchy“ populace. Patchy populace tvořily kruhové ostrovy uprostřed background populací, jež je obklopovaly. Morfologické rozdíly mezi jednotlivými klony byly signifikantně prokázány a odpovídaly předběžným závěrům z izozymové analýzy. Jako důvod tohoto uspořádání dále uvažuje několik faktorů prostředí, jako jsou hloubka vody a charakter substrátu, neboť jednotlivé klony mají svá optima od sebe posunuta a tedy každý dominuje jinde.

Přestože v Evropě jsou populace rákosu relativně stálé, představuje tato dobře se šířící rostlina například v severní Americe problematický druh (Keller 2000). Kolonizováním a následným obsazováním nových míst nahrazuje stávající vegetaci (Marks et al. 1994) a mění tak strukturu i funkci těchto mokřad. Velmi závažnou otázkou je odlišit od sebe „benigní“



populace, které jsou stabilní a nepředstavují pro okolí žádnou hrozbu, a invazivní populace, které svým šířením ohrožují stávající ekosystémy (Marks et al. 1993). Tuto kryptickou invazi studovala Saltonstall (2002) na území severní Ameriky, kdy porovnávala vzorky moderních společenstev s herbářovými položkami z období před rokem 1910. Dokázala, že za dramatický nárůst počtu populací *Phragmites australis* za posledních 150 let opravdu může nepůvodní klon a zároveň zjistila, že rozšíření tohoto klonu bylo nejspíše způsobeno člověkem – rozsáhlou stavbou železnic a silnic na konci 19. a začátku 20. století (tedy převozem kamení a sutě z příbřežních oblastí do vnitrozemí).

Obrázek 5: porost *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.

zdroj: http://plants.usda.gov/java/largeImage?imageID=phau7_004_avp.tif

3. Praktická část

Byla vyvinuta řada metod, kterými lze studovat šíření roslin řekami. Můžeme chytat semena či jiné propagule přímo v korytu toku v různých vzdálenostech od námi vybrané populace (Bullock et al. 2006), můžeme pomocí sledování značených semen zkoumat dálkové šíření diaspor (Nathan et al. 2003). Další metodou je matematické modelování pohybu propagulí kolem mateřské rostliny, založené na některém z již vyvinutých dispersních modelů (Nathan et al. 2002).

V této práci jsme se však rozhodli použít ke studiu šíření roslin genetické metody (molekulárních markerů), která nám poskytne potřebnou informaci o genetické podobnosti jedinců a populací, na jejímž základě můžeme dále usuzovat na šíření jednotlivých genotypů v rámci daného vektoru – v našem případě říčního proudu. Z široké rodiny molekulárních markerů byly vybrány mikrosatelity. Jedná se o vysoce variabilní kodominantní marker s délkovým polymorfismem, tedy technika umožňující rozlišit jednotlivé genotypy i v rámci klonálních rostlin (kterými rákos bezesporu je). Tímto nám umožňuje oddělit vnitropopulační a mezipopulační diversitu rákosu v ČR.

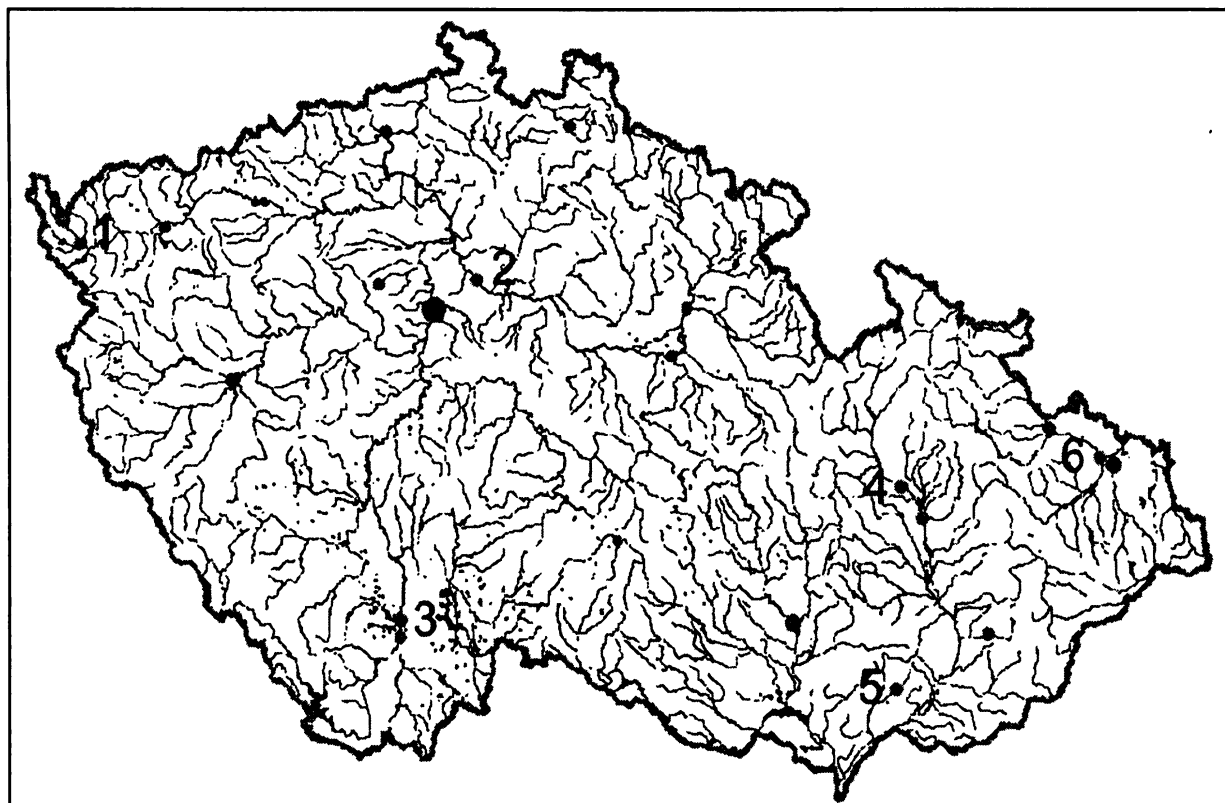
Tato část bakalářské práce slouží jako odrazový můstek pro diplomovou práci, jde především o seznámení se s metodikou mikrosatelitů a základní vhled do celkové bohatosti genotypů *Phragmites australis* u nás. Zároveň jsme chtěli zjistit, zda i na našem území se nacházejí populace složené z více klonů, se kterými bude potřeba v rozsáhlejší studii pro diplomovou práci počítat (a věnovat jim náležitou pozornost).

3.1 Metodika

3.1.1 Sběr materiálu

V rámci bakalářské práce jsem pracovala se 6 populacemi sebranými v průběhu vegetačního období roku 2007 z lokalit z celé České republiky, vybraných náhodně s ohledem na co největší geografický rozptyl a pokryv povodí v rámci říčního systému ČR (obrázek č.6).

Sběry materiálu byly prováděny v rámci jedné oddělené populace, bylo vybráno 6-10 jedinců (od sebe vzdálených cca 1-3m podle velikosti populace) s mladými a nenapadenými listy, jejichž část (3x5cm) byla uchována v označených igelitových sáčkách se silikagelem. Poloha jednotlivých populací byla zaznamenána pomocí GPS souřadnic (popisky obrázek č.6).



Obrázek 6: mapa české republiky ukazující studované populace Rákosu obecného

1: Kynšperk nad Ohří (50°07'08'' N; 12°31'17'' E) 2: mezi Nymburkem a Poděbrady (50°10'07'' N; 15°04'56'' E) 3: České Budějovice (49°00'28'' N; 14°27'45'' E) 4: Střeň (Litovel) (49°40'58'' N; 17°09'19'' E) 5: Hodonín (48°39'36'' N; 16°55'58'' E) 6. Ostrava (49°53'12'' N; 18°10'11'' E)

3.1.2 Zpracování v laboratoři

Z každé sebrané populace byly náhodně vybrány 4 vzorky k následné analýze v laboratoři DNA Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze (<http://botany.natur.cuni.cz/dna>). Vysušené části listových čepelí byly použity k extrakci DNA metodou CTAB (Doyle et Doyle 1987). Poté byla změřena koncentrace extrahované DNA na spektrofotometru BioPhotometer firmy Eppendorf a DNA byla naředěna na koncentraci 5 ng · μl⁻¹. Takto naředěná DNA byla využita k PCR.

Mikrosatelitová analýza byla provedena s využitím multiplex PCR s fluorescenčně značenými primery (Saltonstall 2003), uvedenými v tabulce 2. Složení směsi pro PCR reakci: sterilní voda 7,42 μl, pufr 1 μl, dNTP 0,2 μl, reverse primer 0,13 μl, forward primer 0,13 μl, Red Taq polymeráza 0,25 μl, DNA 1 μl. Vzhledem k možnému použití 4 různých barev (jedna pro standart – červená) bylo možno nakombinovat jednotlivé primery do 2 multiplexů (Mastermix 1: PaGT4, PaGT8, PaGT9, PaGT14, PaGT16; Mastermix 2: PaGT11, PaGT12, PaGT13, PaGT21, PaGT22). Pro PCR byl použit program dle tabulky 3 v termocykleru Eppendorf Mastercycler Gradient.

Složení směsi pro PCR reakci: sterilní voda 7,42 µl, pufr 1 µl, dNTP 0,2 µl, reverse primer 0,13 µl, forward primer 0,13 µl, Red Taq polymeráza 0,25 µl, DNA 1 µl.

Po PCR byly jednotlivé alely vizualizovány pomocí agarózové elektroforézy s použitím ethidium bromidu ke zviditelnění DNA v UV pomocí kamery Kodak Gel Logic 100. Díky této vizualizaci jsme zjistili, které proužky byly viditelné v odpovídajícím rozsahu a mohli být dále posláni k vizualizaci na automatickém sekvenátoru ABI 3100 Avant v sekvenační laboratoři biologické sekce PŘF UK.

Tabulka 2: přehled selektivních jaderných primerů pro rod *Phragmites australis* (Saltonstall 2003), první řádek označuje jednu ze 3 fluorescenčních barev (čtvrtá byla použita pro standart), následuje název příslušného lokusu, opakující se tandemová repetice DNA, sekvence selektivních primerů (forward a reverse) a na závěr délkový rozsah jednotlivých alel podle práce Saltonstall (2003) a rozdělení do dvou multiplexů podle barev a délek alel.

barva	NED			NED			NED			
lokus	PaGT4	PaGT8	PaGT9	PaGT11	PaGT12	PaGT13	PaGT14	PaGT16	PaGT21	PaGT22
repeat units	(CA)9	(CA)8	(CA)10	(CA)8	(CA)9	(CA)9	(CA)7	(CA)10	(CA)5(AT) 6(CA)6	(AC)8CTT (GA)5
forward primer	TGCTCCC TGCAGTT TCTTG	TCTGAAC ATAATCC TGGTGG	CCATGTG TTAATGTT GTCC	CAACTCC GTGAATG ACATGC	CTTCCTA GGTCAGT ATCATCC	CTCATGC ATCACTT CACAGG	GTTGCAG CAAGTAT TTGG	ACCAATC AGTCAGA CTAGCC	GCTACTCA ACAGGTAT ACGG	TTGAGTG CCTGGTG TATTCG
reverse primer	TATCCAC CCTTCGA AGGCAC	TCTTGTG TGAAGCA GTTCTGC	ATTGAAT CCACACG TTTCCG	CAGTTTG TGCACTA ATGGAC	GTGGCAG CTGATTG ATTTGG	ACACGGA CCTAACA TCAACC	CAAGCAT TCTAGTA GTAGC	GTTCTCA TGTTGGA GAAGCC	ATTGAGG ATTGAGGT GGTGG	AAGCTTC TGTCATG GAACCG
velikost	266-284	170-193	188-224	142-151	151-196	206-224	169-198	231-298	138-199	159-209
multiplex	M I	M I	M I	M II	M II	M II	M I	M I	M II	M II

Tabulka 3: program pro selektivní PCR který byl použit pro amplifikaci mikrosatelitových alel, začíná 2minutovou denaturací dsDNA při 94°C, následuje 35 opakování cyklu denaturace (94°, 30 sec) - nasedání selektivních primerů (50°, 30 sec) – elongace (72°, 40 sec), a na závěr 15minutová terminace (72°), kdy dochází k dokončení elongací, po skončení programu přejde cycler na 10°C, což je teplota vhodná pro delší uchování výsledků PCR

teplota [°C]	doba trvání	
94	2 min	iniciální
94	30 sec	35 opakování
50	30 sec	
72	40 sec	
72	15 min	terminační
10	hold	

3.1.3 Vyhodnocení primárních dat

Primární data získaná z automatického sekvenátoru byla analyzována pomocí demo verze programu GeneMarker (<http://www.softgenetics.com/genemarker.html>) a údaje o velikosti jednotlivých alel byly zaznamenány do tabulky, která sloužila jako zdroj pro datové matice k jednotlivým programům. Tyto matice byly vytvářeny podle dvou návodů pro nakládání s allotetraploidními jedinci (Becher et al. 2000, Saltonstall 2003).

Všechny populace byly analyzovány pomocí programu BAPS 3.2 (Corander et Marttinen 2005) a FAMD (Schlüter et Harris 2006). Pro zjištění genetické struktury populací bylo aplikováno Bayesovské clusterování pomocí programu BAPS 3.2 (Corander et Marttinen 2005). Tato metoda nám rozdělila jedince do jednotlivých clusterů bez předchozího zadání informace o původu tohoto jedince. Program FAMD (Schlüter et Harris 2006) spočítal vzdálenost mezi jedinci a pomocí zjištěných dat sestavil fylogenetický strom. Data pro program BAPS byla kodována podle Saltonstall (2003), pro FAMD binárně podle Becher et al. (2000).

3.2 Výsledky

Celkem bylo analyzováno 24 jedinců ze 6 populací, z každé 4 jedinci.

populace č. 2, Kynšperk nad Ohří (50°07'08'' N; 12°31'17'' E), vzorky č. 2_1, 2_3, 2_6, 2_8

populace č. 5, mezi Nymburkem a Poděbrady (50°10'07'' N; 15°04'56'' E), vzorky č. 5_2, 5_6, 5_8, 5_10

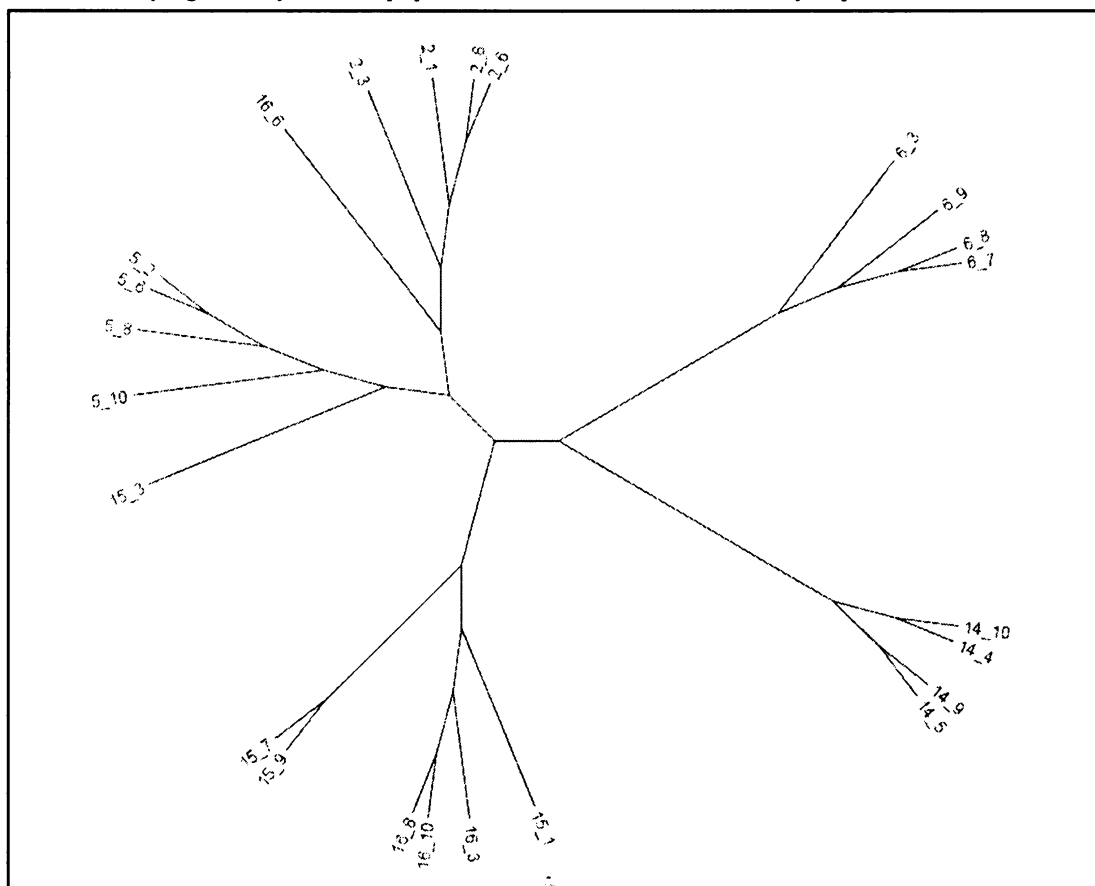
populace č. 6, České Budějovice (49°00'28'' N; 14°27'45'' E), vzorky č. 6_3, 6_7, 6_8, 6_9

populace č. 14, Střeň (Litovel) (49°40'58'' N; 17°09'19'' E), vzorky č. 14_4, 14_5, 14_9, 14_10

populace č. 15, Hodonín (48°39'36'' N; 16°55'58'' E), vzorky č. 15_1, 15_3, 15_7, 15_9

populace č. 16, Ostrava (49°53'12'' N; 18°10'11'' E), vzorky č. 16_3, 16_6, 16_8, 16_10

Obrázek 7: Fylogenetický strom 6 populací rákosu z území ČR studovaných pomocí 9 mikrosatelitových lokusů;



upravený v programu FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>)

Analýza programu BAPS

Number of clustered individuals: 24

Number of groups in optimal partition: 5

Log(marginal likelihood) of optimal partition: -563.9

Best Partition:

Cluster 1: {2_1, 2_3, 2_6, 2_8, 16_6}

Cluster 2: {5_2, 5_6, 5_8, 5_10}

Cluster 3: {15_1, 15_3, 15_7, 15_9, 16_3, 16_8, 16_10}

Cluster 4: {6_3, 6_7, 6_8, 6_9}

Cluster 5: {14_4, 14_5, 14_9, 14_10}

Changes in log(marginal likelihood) if individual i is moved to group j:

ind	1	2	3	4	5
2_1:	.0	-22.1	-17.8	-33.2	-23.3
2_3:	.0	-22.1	-17.8	-33.2	-23.3
2_6:	.0	-21.9	-17.9	-33.3	-23.4
2_8:	.0	-22.8	-18.0	-33.1	-23.2
5_2:	-20.0	.0	-17.8	-38.8	-21.2
5_6:	-20.2	.0	-15.6	-28.2	-21.3
5_8:	-20.0	.0	-17.8	-38.8	-21.2
5_10:	-18.7	.0	-16.6	-37.4	-19.9
6_3:	-32.9	-32.6	-28.5	.0	-16.1
6_7:	-36.7	-37.3	-34.0	.0	-26.1
6_8:	-36.7	-37.3	-34.0	.0	-26.1
6_9:	-36.7	-37.3	-34.0	.0	-26.1
14_4:	-12.7	-11.4	-15.5	-15.1	.0
14_5:	-12.3	-15.5	-14.1	-14.9	.0

14_9:	-21.4	-19.5	-13.9	-17.2	.0
14_10:	-13.5	-12.1	-4.1	-16.2	.0
15_1:	-14.5	-11.4	.0	-21.1	-13.7
15_3:	-9.7	-5.3	.0	-27.7	-12.4
15_7:	-19.5	-20.6	.0	-27.3	-14.3
15_9:	-13.5	-11.4	.0	-15.8	-6.5
16_3:	-8.1	-12.3	.0	-19.0	-12.1
16_6:	.0	-5.2	-6.4	-28.2	-11.9
16_8:	-10.2	-14.0	.0	-25.1	-14.0
16_10:	-6.7	-14.3	.0	-25.3	-14.0

Probabilities for number of clusters

5 0.9998

6 0.0001739

3.2.1 Diskuze

Program BAPS rozdělil 6 studovaných populací do 5 clusterů s pravděpodobností 99,98 %. Clustery jsou tvořeny v zásadě podle příslušnosti k populaci, spojeny byly populace 15 a 16, což je nejspíše dáno malým počtem dat, ze kterých nelze činit nějaké větší závěry.

Zajímavý je jedinec 16_6, který byl přiřazen do clusteru 1, tedy k populaci č. 2. Nejspíše se jedná o druhý klon v multiklonální populaci nebo migranta.

Clusterování provedené programem BAPS odpovídá shlukování jedinců viditelnému ve fylogenetickém stromě vytvořeném programem FAMD (obrázek 7).

3.2.2 Závěr

Vzhledem k opravdu malému počtu dat je těžké vyvodit nějaké hodnotné závěry. Pro budoucí diplomovou práci mají však i tyto analýzy smysl. Zjistila jsem, že v rámci ČR má cenu studovat genetickou diversitu populací rákosu obecného za pomoci mikrosatelitů a že touto metodou lze odhalit i diversitu v rámci klonů.

4. Plánované téma diplomové práce

Má budoucí diplomová práce bude plynule navazovat na dosavadní práci a měla by prozkoumat celkovou genetickou diversitu rákosu obecného (*Phragmites australis*) v rámci celé České republiky. Bude studována diversita velkých povodí i jednotlivých populací, s důrazem na objasnění role řeky při vzniku nových populací, odhalení odlišností v genomu populací jednotlivých povodí i odhalení variability uvnitř populací. Ke studiu genetické variability bude použito studia mikrosatelitových markerů (Ouborg et al. 1999, 2000), které jsou dostatečně citlivé pro identifikaci jednotlivých genotypů a následné určení příbuznosti jedinců. Tato práce by nám měla pomoci odhalit, jak se tento druh šíří v krajině a jakou roli hraje vektor řeky.

4.1 Otázky a způsob jejich řešení

V rámci diplomové práce bych se ráda zaměřila na odlišnosti rákosů v různých povodích (jsou populace odlišné? nakolik jsou si podobné odlehlé populace?). Pro tento problém byl zvolen sběr materiálu v jednotlivých povodích velkých řek – bude sbíráno nejspíše 10 populací z každého povodí, a to jak podél toku „hlavní řeky“, tak pár populací z přítoků. Povodí bylo zatím vybráno 7 (Ohře, Berounka, Vltava, Sázava, Morava, Opava, Labe) další mohou být přidána v průběhu práce.

Dále se pokusím zjistit roli řeky (a strukturování říčního systému) ve vzniku nových populací (hraje roli, zda je populace po proudu, nebo je *Phragmites* šířen především větrem a řeka tudíž nemá takový význam pro jeho šíření?). Pro tuto problematiku jsme vybrali metodu sběru materiálu v rámci jednoho povodí – jak podél toku řeky, tak z jejích přítoků (bude sebráno nejspíše v jednom z výše uvedených povodí, a to s větším počtem analyzovaných populací).

A v neposlední řadě bych se ráda dozvěděla, zda jsou populace (zejména ty rozsáhlejší) tvořeny jedním nebo více klony. Pro tuto otázku bude proveden transekt na větší populaci (případně více populacích) – hustota odběru zatím nebyla stanovena, rozhodne se až podle jednotlivých výsledků.

Výběr jednotlivých lokalit bude proveden na základě promítnutí seznamu populací z České národní fytoecologické databáze (Chytrý et Rafajová 2003) do programu ArcGIS. Všechny vzorky (tedy čepele zdravých a nejlépe mladých listů *Phragmites australis*) budou po

sebrání a zaznamenání polohy lokality pomocí souřadnic GPS uchovávány v suchém stavu v silikagelu, následně bude extrahována DNA metodou CTAB (Doyle et Doyle 1987). K mikrosatelitovým analýzám budou namnoženy dané části studované DNA pomocí PCR za použití specifického páru primerů (primery č. 4, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 21, 22; Saltonstall 2003; již odzkoušeny v bakalářské práci), bude provedena fragmentační analýza na automatickém sekvenátoru ABI 3100 Avant v sekvenační laboratoři biologické sekce PŘF UK. Postup při analýze primárních dat bude obdobný jako u bakalářské práce – za pomoci demoverze programu GeneMarker (<http://www.softgenetics.com/genemarker.html>), údaje o velikostech jednotlivých alel budou zapsány do tabulky. Statistické programy pro jednotlivé otázky budou teprve vybrány.

5. Seznam literatury

- Agarwal, M., Shrivastava, N. & Padh, H. (2008): Advances in molecular marker techniques and their application in plant sciences. - *Plant Cell Rep.*: 27: 617-631.
- Arbogast, B. S. & Kenagy, G. J.: Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. - *Journal of Biogeography*: 28: 7: 819-825.
- Avise, J. C. (1998): The history and purview od phylogeograhya: a personal reflection. - *Molecular Ecology*: 7: 371-379.
- Avise, J. C. (2000): Stability, equilibrium and molecular aspects of conservation in marine species. - *Hydrobiologia*: 420: 11-12.
- Balloux, F. & Lugon-Moulin, N. (2002): The estimation of population differentiation with microsatellite markers. - *Molecular Ecology*: 11: 2: 155-165.
- Barrett, S. C. H., Eckert, C. G. & Husband, B. C. (1993): Evolutionary processes in aquatic plant populations. - *Aquatic botany*: 44: 105-145.
- Becher, S. A., Steinmety, K., Weising, K., Bourz, S., Peltier, D., Renou, J.-P., Kahl, G. & Wolff K. (2000): Microsatelites for cultivar identification in *Pelargonium*. - *Theoretical and Applied Genetics*: 101: 643-651.
- Briggs, D. & Walters, S. M. (2001): *Proměnlivost a evoluce rostlin*. - Cambridge University Press.
- Brown, J. H. & Kodric-Brown, A. (1977): Turnover rates in insular biogeography - effects of immigration on extinction. - *Ecology*: 58: 2: 445-449.
- Bullock, J. M., Shea, K. & Skarpaas, O. (2006): Measuring plant dispersal: an introduction to field methods and experimental design. - *Plant Ecology*: 186: 217-234.
- Cain, M. L., Damman, H. & Muir, A. (1998): Seed dispersal and the holocene migration of woodland herbs. - *Ecological monographs*: 68: 325-347.
- Clevering, O. A. & Lissner J. (1999): Taxonomy, chromosome numbers, clonal diversity and population dynamics of *Phragmites australis*. - *Aquatic Botany*: 64: 185-208.
- Corander, J. & Marttinen, P. (2005): BAPS: Bayesian analysis of population structure. - Manual v.3.1 University od Helsinki, Finland. Available at <http://web.abo.fi/fak/mnf//mate/jz/software/baps.html>.
- Cummins, K. W., Wilzbach, M. A., Gates, D. M., Perry, J. B. & Taliaferro, W. B. (1989): Shredders in riparian vegetation. - *Bioscience*: 39:24-30.
- Eriksson, O. (1992): Evolution of seed dispersal and recruitment in clonal plants. - *Oikos* 63: 439-448.

- Fér, T. (2000): Vztah parametrů generativního šíření vodních rostlin k jejich skutečnému rozšíření podle vodního toku. - Diplomová práce, depon in Knihovna Katedry botaniky PřF UK v Praze.
- Fér, T. & Hroudová, Z. (2008a): Detecting dispersal of *Nuphar lutea* in river corridors using microsatellite markers. - Study of plant dispersal in river corridors using molecular markers. 53-73, Department of botany, Charles University in Prague [Ph.D. Thesis]
- Fér, T. & Hroudová, Z. (2008b): Genetic diversity and dispersal of *Phragmites australis* in a small river system. - Study of plant dispersal in river corridors using molecular markers. 75-94, Department of botany, Charles University in Prague [Ph.D. Thesis]
- Fischer, M., Husi, R., Prati, D., Peintinger, M., van Kleunen, M. & Schmid, B. (2000): RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). - American Journal of Botany: 87 (8): 1128-1137.
- Gorenflot, R., Sanei-Chariat Panahi, & Liebert, J. (1979): Le complexe polyploïde du *Phragmites australis* (cav.) Trin ex Steud.. - en Iran. Rev. Cytol. Biol. Végét.: Bot. 2: 67-81.
- Gorenflot, R., Tahiri, H. & Lavabre, P. (1990): Anomalies méitotiques de la microsporogénèse dans un complex polyploïde: *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex Steud. - Rev. Cytol. Biol. Végét: Bot. 13: 153-172.
- Grant, V. (1981): Plant speciation. - New York, USA: Columbia University Press.
- Hansen, D. L., Lambertini, C., Jampeetong, A. & Brix, H. (2006): Clone-specific difference in *Phragmites australis*: Effects of ploidy level and geographic origin. - Aquatic Botany: 86: 269-279.
- Hartl, D. L. & Clark, A. G. (1997): Principles of population genetics, 3rd edition - Sinauer, USA.
- Haslam, S. (1972): Biological flora of the British Isles. *Phragmites communis* Trin. - J. Ecol.: 60: 585-610.
- Hejný, S. (1960): Ökologische Charakteristik der Wasser- und Sumpfpflanzen in der slowakischen Tiefebene (Donau- und Theissgebiet). - SAV, Bratislava.
- Hennig, W. (1999): Phylogenetic Systematics. - University of Illinois Press.
- Chytrý, M. & Rafajová, M. (2003): Czech national phytosociological database: basic statistic of the available vegetation-plot data. - Preslia, Praha: 75: 1-15.
- Jarne, P. & Lagoda, P. J. L. (1996): Microsatellites from molecules to populations and back. - Trends in Ecology and Evolution: 11(10): 424-429.

- Johansson, M. E. & Nilsson, Ch. (1993): Hydrochory, population dynamics and distribution of the clonal aquatic plant *Ranunculus lingua*. - Journal of ecology: 81, 81-91.
- Johansson, M. E., Nilsson, Ch. & Nilsson, E. (1996): Do rivers function as corridors for plant dispersal? - Journal of Vegetation Science: 7: 593-598.
- Keller, B. E. M. (2000): Genetic variation among and within populations of *Phragmites australis* in the Charles River watershed. - Aquatic Botany: 66: 195-208.
- Kihara, H. & Ono, T. (1926): Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der *Rumex* - Arten. - Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie: 4: 475-481.
- Klekowski, E. J. (2003): Plant clonality, mutation, diplontic selection and mutational meltdown. - Biological Journal of the Linnean Society: 79, 61-67.
- Les, D. H. (1988): Breeding systems, population structure, and evolution in hydrophilus angiosperms. - Ann. Mo. Bot. Gard.: 75: 819-835.
- Les, D. H., Crawford, D. J., Kimball, R. T., Moody, M. L. & Landolt, E. (2003): Biogeography of discontinuously distributed hydrophytes: a molecular appraisal of intercontinental disjunction. - International Journal of Plant Sciences: 164: 6: 917-932
- Loxdale, H. D. & Lushai, G. (2003): Rapid changes in clonal lines: the death of a "sacred crow". - Biological Journal of the Linnean Society: 79: 3-16.
- Lundin, L. G. (1993): Evolution of the vertebrate genome as reflected in paralogous chromosome regions in man and the house mouse. - Genomics: 16: 1-19.
- Marks et al. (1993): Element Stewardsjip Abstract for *Phragmites australis*. - <http://tncweeds.ucdavis.edu/esadocs/documnts/phraaus.html>
- Marks, M., Lapin, B., Randall, J. (1994): *Phragmites australis* (*P. communis*): Threats management and monitoring. - Nat. Areas J.: 14: 285-294.
- Markwith, S. H., Stewart, D. J. & Dyer J. L. (2006): Tetrasat: a program for the population analysis of allotetraploid microsatellite data. - Molecular Ecology Notes: 6: 586-589.
- Metzgar, D., Bytof, J. & Wills, C. (2000): Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. - Genome Res.: 10: 72-80.
- Müller-Schneider, P. & Lhotská, M. (1971): Zur Terminologie der Verbreitungsbiologie der Blütenpflanzen. - Folia Geobot. Phytotax. 6(4): 407-417.
- Nathan, R., Horn H.S., Chave J. & Levin, S. A. (2002): Mechanistic models for tree seed dispersal by wind in dense forests and open landscapes. In: Levey, D. J., Silva, W. R. & Galetti, M. (eds): Seed dispersal and frugivory: ecology, evolution and conservation. - CABI International: 69-82.

- Nathan, R., Perry, G., Cronin, J. T., Strand, A. E. & Cain, M. L. (2003): Methods for estimating long-distance dispersal. - *Oikos*: 103: 261-273.
- Nilsson, Ch., Gardfjell, M. & Grelsson, G. (1991): Importance of hydrochory in structuring olant communities along rivers. - *Can. J. Bot.*:vol. 69, 2631-2633.
- Ostendorp, W., Dienst, M. & Schmieder, K. (2003): Disturbance and rehabilitation of lakeside *Phragmites* reeds following an extreme flood in Lake Constance (Germany). - *Hydrobiologia*: 506-509: 687-695.
- Ouburg, N. J., Piquot, Y. & van Groenendael (1999): Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. - *Journal of Ecology*: 87: 551-568.
- Palmé, A. E. & Vendramin, G. G. (2002): Chloroplast DNA variation, postglacial recolonization and hybridization in hazel, *Corylus avellana*. - *Molecular Ecology*: 11, 1769-1779.
- Petit, R. J., Pineau, E., Demesure, B., Bacilieri, R., Ducouso, A. & Kremer, A. (1997): Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. - *Population Biology*: Vol. 94, 9996-10001.
- Robledo-Arnuncio, J.J. & Gil, L. (2005): Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus Sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. - *Heredity*: 94: 13-22.
- Sádlo, J., Pokorný, O., Hájek, P., Dreslerová, D. & Cílek, V. (2005): Krajina a evoluce: významné přelomy ve vývoji kulturní krajiny českých zemí. - Malá skála, Praha
- Saltonstall, K. (2002): Cryptic invasion by a non-native genotype of the common reed, *Phragmites australis*, into North America. - *PNAS*:99:4:2445-2449.
- Saltonstall, K. (2003): Microsatellite variation within and among North American lineages of *Phragmites australis*. - *Molecular Ecology*: 12: 1689-1702.
- Santamaría, L. (2002): Why are most aquatic plants widely distributed? Dispersal, clonal growth and small-scale heterogeneity in a stressful environment. - *Acta Oecologica*: 23: 137-154.
- Scribner, K. T. & Pearce, J. M. (2000): Microsatellites: evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population, and phylogenetic levels. - Pages 235-273 in A. Baker (ed.), *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science, Ltd., Oxford, U.K.
- Sculthorpe C. D. (1967): *The biology of aquatic vascular plants*, - London.
- Schlötteter, C. & Tautz D. (1992): Slippage synthesis of simple sequence DNA. - *Nucleic Acid Res*:20:2211-2215.

- Schlütter, P. M. & Harris, S. A. (2006): Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. - *Molecular Ecology*: 6:2:569-572.
- Silvertown, J. (1991): Dorothy's dilemma and the unification of plant population biology.- *Trends in Ecology and Evolution*: 6: 346-348.
- Soltis, D. E., Rieseberg, L. H. (1986): Autopolyploidy in *Tolmiea Menziesii* (Saxifragaceae): evidence from enzyme electrophoresis. - *American Journal of Botany*: 73: 310-318.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S. & Tate, J. A. (2003): Advances in the study of polyploidy in Plant speciation. - *New phytologist*: 161: 173-191.
- Sun, G.-L., Díaz, O., Salomon, B. & von Bothmer, R. (1999): Genetic diversity in *Elymus caninus* as revealed by isozyme, RAPD, and microsatellite markers. - *Genome*: 42: 420-431.
- Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. - *Nucleic Acids Research*: 17: 6463-6471.
- Thiébaud, G. (2007): Invasion succes of non-indigenous aquatic and semi-aquatic plants in their and introduced ranges. A comparison between their invasiveness in North America and in France. - *Biological Invasions*: 9: 1-12.
- Tribsch, A., Schonswetter, P. & Stuessy, T. F. (2002): *Saponaria pumila* (Caryophyllaceae) and the Ice Age in the European Alps. - *American Journal of Botany*: 89 (12): 2024-2033.
- Uchytel, R. J. (1992): *Phragmites australis*. - In: U. S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fore Sciences Laboratory, Fre Effects Information System, <http://www.fs.fed.us/database/feis/palnts/graminoid/phraus/all.html>.19p.
- van der Pijl, L. (1982): Principles od dispersal in higher plants, third revised and axpanded edition. - Springer-Verlag.
- Voelker, R. A., Schaffer H. E. & Mukai, T. (1980): Spontaneus allozyme mutations in *Drosophila melanogaster*: rate of occurance and nature of the mutants. - *Genetics*: 94: 961-968.
- White, D. A., Hauber, D. P. & Hood, C. S. (2004): Clonal differences in *Phragmites australis* from the Mississippi river delta. - *Southeastern Naturalist*: 3(3): 531-544
- White, M. J. D. (1973): Animal cytology and evolution. - Cambridge University Press.
- Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: review. - *Molecular Ecology*: 11: 1-16.