

Populační studie

Kameyama Y. et al. (2001): Patterns and levels of gene flow in *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* revealed by microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 10:205-216



Proč to studovali ?

- zjistit rozložení a rozsah genového toku v rámci a mezi třemi populacemi rododendronu
- zjistit efekt výšky stromu a vzdálenosti na relativní fertilitu dospělých stromů
- zjistit rozložení pylového toku v rámci populací
- využití metody přímého stanovení genového toku – *parentage analysis*

Studovaný druh

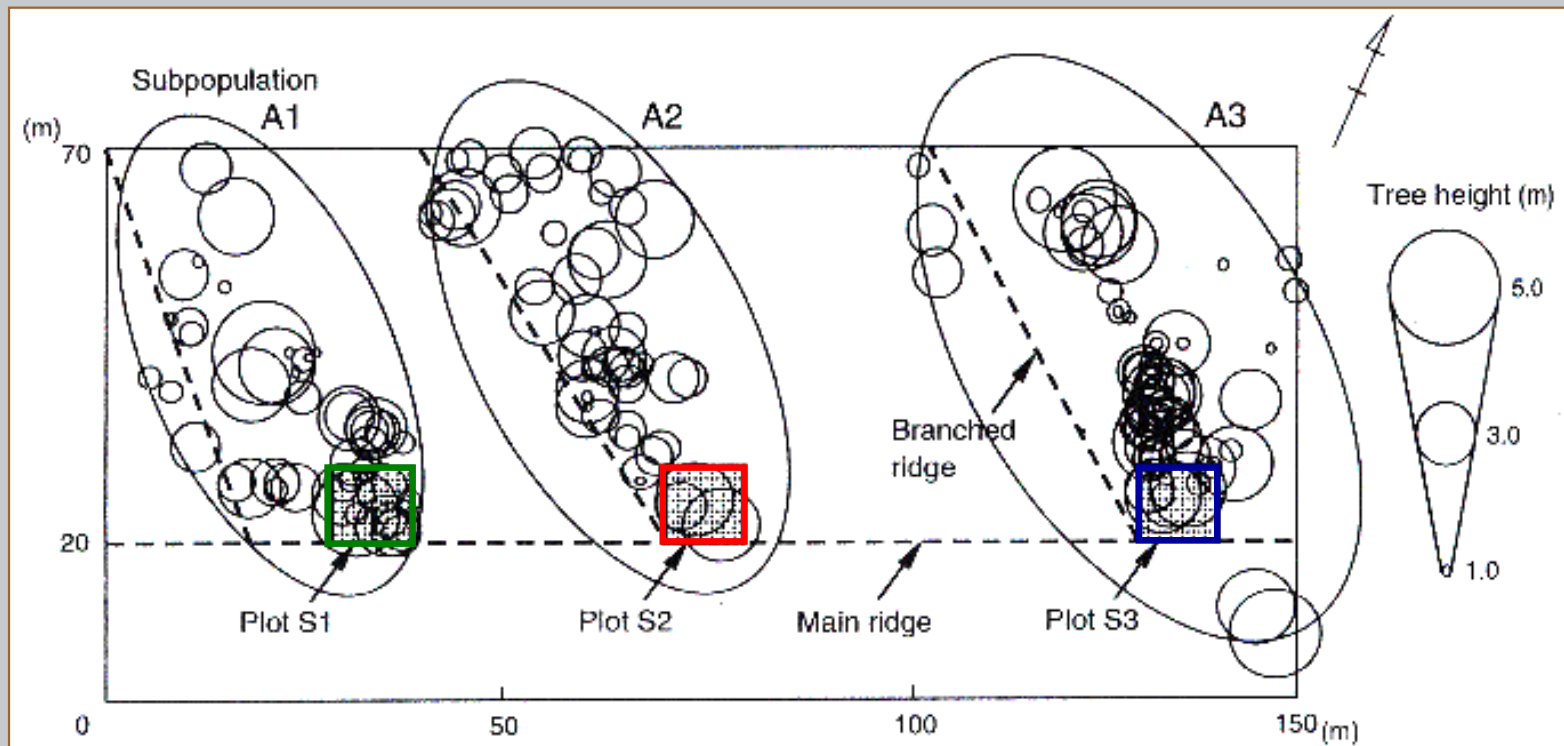
Rhododendron metternichii var. *hondoense*

- stálezelený keř o výšce až 5m
- montánní oblasti západního Japonska
- opylován hlavně čmeláky



Studované populace

- 3 subpopulace (A1, A2, A3)
 - 49, 50 a 75 dospělých stromů
- čtverec 10×10 m v každé populaci (S1, S2, S3)
 - 70 náhodně vybraných semenáčků v každém



- 12 mikrosatelitových lokusů

Parentage analysis

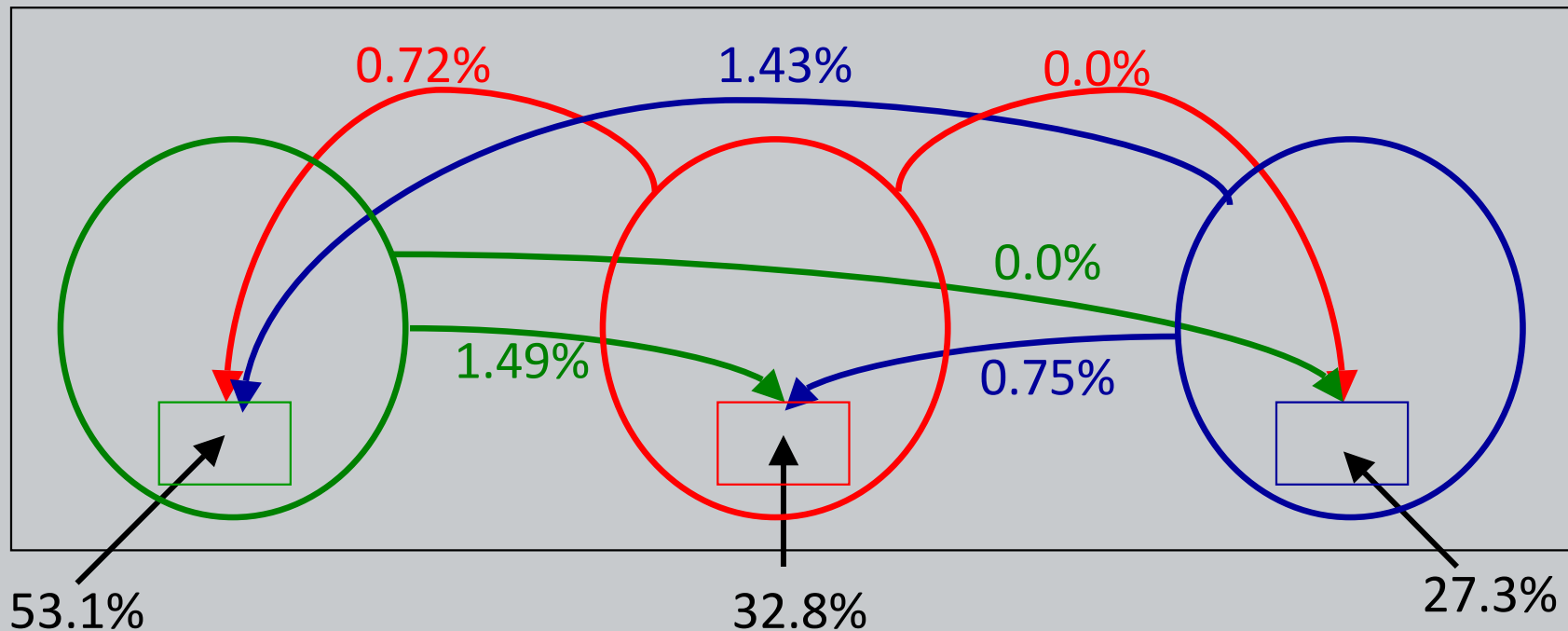
- porovnání genotypů možných rodičů a semenáčků – software CERVUS
- *exact matches* – kombinace pouze dvou haplotypů dospělců mohla vysvětlit genotyp semenáčku (\times *multiple matches*)
- *null alleles* – homozygoti v lokusech s vysokou frekvencí brány jako heterozygoti
- *cryptic gene flow* – pravděpodobnost, že dospělý strom bude přiřazen jako rodič k cizímu semenáčku

Výsledky

- 12 mikrosatelitových markerů – 6-33 alel
- *multiple matches* – 6 semenáčků v S1, 3 v S2, 4 v S3 – vyřazeny z dalších analýz
- počty semenáčků vzniklých samoopylením – 2 v S1, 4 v S2, 4 v S3

Genový tok mezi subpopulacemi

- počet rodičů v rámci subpopulace (jeden, oba)
- počet rodičů mimo populaci (jeden, oba)
- genový tok do populace – z jiných subpopulací

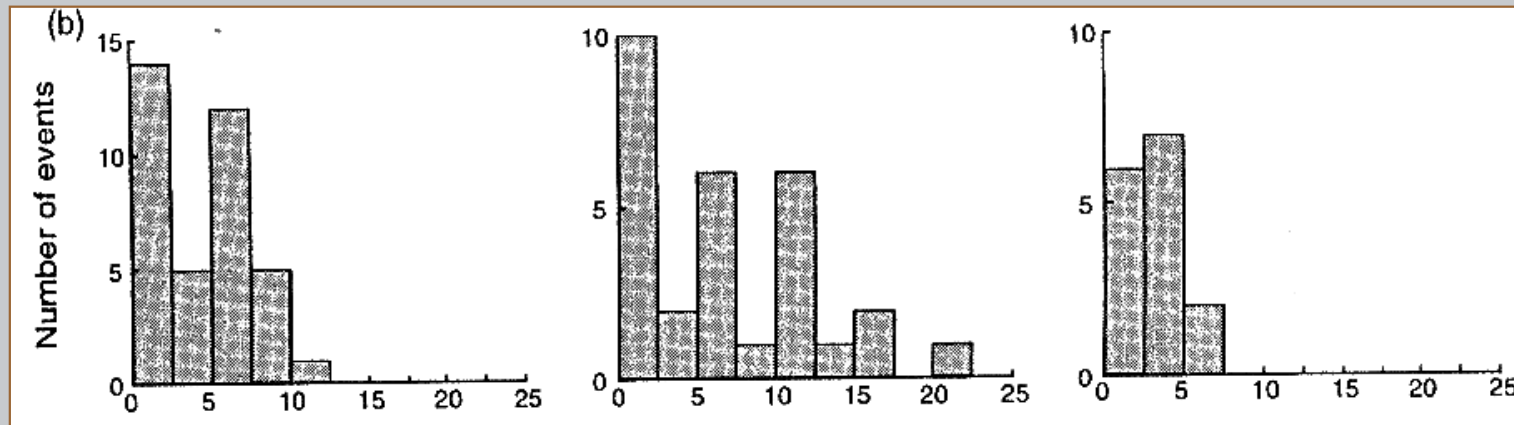


Efekt vzdálenosti a výšky rodičovských stromů

- stromy blízko produkovaly více semenáčků (*Fig.2*)
- *long-distance gene flow* v populaci S2
- v A2 a A3 vyšší stromy produkovaly více semenáčků (*Fig.3*)
- A1: 9 rodičovských stromů blízko semenáčků
- A2: rodičovské stromy i relativně daleko
- A3: 13 rodičovských stromů, 4 vyšší než 3m produkovaly 10 a více semenáčků

Pylový tok v subpopulacích

- odhadnut z pozic rodičovských párů (*Fig.5b*)



- vzdálenost signifikantně větší než vzdálenost k nejbližšímu sousedu (*Fig.5a*)
- ... a signifikantně menší než vzdálenost k náhodnému sousedu (*Fig.5c*)

Diskuse

- dospělé stromy <5m od semenáčků produkovaly extrémně mnoho semen
- žádné stromy >25m neprodukovaly semenáčky
- velikost stromu má vliv na produkci pokud se v okolí vyskytovaly různě vysoké stromy (*Fig.4c*)
- genový tok v rámci subpopulace se liší v závislosti na populační struktuře
- relativně vyšší *pollen flow* v A2 je díky malému počtu dospělých stromů v okolí

Diskuse II.

- proč je tok uvnitř subpopulací vysoce omezen, když genový tok do studované oblasti dosahuje 50%?
 - rozdíly ve fenologii – asynchronní kvetení
 - preference pylu z větší dálky? *inbreeding depression*?
- proč je genový tok mezi subpopulacemi extrémně malý (0-2%) přestože tok z okolní oblasti je vysoký?
 - hřebeny mezi subpopulacemi jsou bariéry pro šíření semen?
 - opylovači se spíše pohybují podél subpopulací?

Systematická studie

Provan J. et al. (1999): Polymorphic chloroplast simple sequence repeat primers for systematic and population studies in the genus *Hordeum*. *Molecular Ecology* 8:505-511



Proč to studovali ?

- vyvinout primery k amplifikaci mikrosatelitových oblastí
- polymorfismus mikrosatelitů využít ke studiu variability a vztahů v rámci rodu *Hordeum*

Studovaný materiál

- 31 vzorků ze 24 „divokých“ druhů r. *Hordeum*
- 51 vzorků *H. vulgare* ssp. *spontaneum*
- 125 vzorků *H. vulgare* ssp. *vulgare* („landraces“)
- 101 vzorků *H. vulgare* ssp. *vulgare* („cultivars“)

- diploidi, tetraploidi, hexaploidi

Metody

- nalezení mononukleotidových opakování
 - prohledání EMBL database (8 a více bp)
- design primerů (software PRIMER)
- PCR amplifikace
- elektroforéza – denaturovaný polyakrylamidový gel
- radioaktivní vizualizace fragmentů

Vyhodnocení

- definování jednotlivých cpSSR haplotypů
 - zkombinováním přítomnosti alel
- genetická vzdálenost mezi individui
 - proporce sdílených alel mezi cpSSR haplotypy
 - program MICROSAT
- neighbour-joining tree

Výsledky

- design sedmi párů primerů
- celkem nalezeno 25 haplotypů (kombinací všech lokusů)
- *Hordeum* spp.
 - 21 ze 31 vzorků unikátní haplotyp
- *H. vulgare* ssp. *spontaneum*
 - nalezeno 11 haplotypů (mezi 51 vzorky)
 - 5 polymorfních lokusů – 2-3 alely v každém

Výsledky

- *H. vulgare ssp. vulgare* („landraces“)
 - pouze jeden polymorfní lokus
 - 2 haplotypy (stejně nalezeny u *H. spontaneum*)
 - 1 haplotyp u všech evropských kultivarů
 - bottleneck způsobený domestikací

Fylogenetické vztahy

- největší odlišnost mezi divokými druhy r. *Hordeum* a ostatními (*H. ssp. vulgare* a *spontaneum*) - Fig.1
- uvnitř *Hordeum* spp. – geografické oddělení (Afrika & Evropa, Amerika & Asie)
- *H. flexuosum*, *erectifolium*, *euclaston*, *stenostachys* – stejný haplotyp × morfologická odlišnost ?
- různé ploidie *H. brachyantherum* – velmi odlišné haplotypy – možná evidence retikulátní evoluce a mnohonásobné cytoplazmatické introgrese
- naopak – 4n a 6n *H. murinum ssp. leporinum* – stejný haplotyp

Závěr

- větší rozlišovací schopnost cpSSRs než RFLP
- schopnost kvantifikovat intraspecifickou variabilitu v chloroplastovém genomu