



Genotypowanie materiału trawy morskiej pochodzącej z różnych miejsc występowania

mgr Magdalena Gonciarz, dr Robert Gromadka i dr Ana Stanković

W projekcie „Restytucja kluczowych elementów ekosystemu Zatoki Puckiej wewnętrznej ZOSTERA” przewidziano analizę genetyczną zostery morskiej (*Zostera marina*) w celu poprawnego przeprowadzenia restytucji, wykonywanej przez Instytut Oceanologii PAN (IOPAN) w Sopocie. Powszechnie akceptowane zasady ochrony gatunkowej zakładają, że restytucję gatunków powinna poprzedzać staranna analiza genetyczna. Jej wyniki stanowiąc będą niezbędny wgląd w stan wiedzy na temat populacji tego gatunku z punktu widzenia realizacji założeń tego projektu.

Zostera morska to gatunek, należący do rodziny zosterowatych (*Zosteraceae*), którego naturalny zasięg w Europie obejmuje strefę klimatu umiarkowanego i podzwrotnikowego. Roślina ta rozmnaża się płciowo przez wytwarzanie nasion oraz wegetatywnie przez tworzenie horyzontalnych kłączy. W Polsce jest gatunkiem objętym ochroną prawną i znajduje się na „Czerwonej liście roślin i grzybów Polski”. U organizmów wodnych, rozmnażających się zarówno wegetatywnie jak i płciowo, takich jak *Zostera* morska, coraz więcej wiadomo o korelacji stopnia klonalności ze wzorem rozmieszczenia geograficznego populacji, jednak wciąż niewiele o jej związku ze zmiennością genetyczną (Diekmann i Serrao, 2012).

Loci mikrosatelitarne (msDNA) ze względu na swój kodominujący charakter, umożliwiają dokładną dyskryminację osobników, co pozwala w rzetelny sposób określić klonalność populacji. W ich przypadku jednak limitująca jest liczba opracowanych markerów dla organizmów niemodelowych, do jakich należy *Zostera* morska. Do tej pory opracowano 12 loci msDNA (Thorsten i in., 1999; Reush, 2000; Diekmann i in., 2012).

Instytut Biochemii i Biofizyki rozpoczął realizację zadania wyznaczonego w ramach projektu „Restytucja kluczowych elementów ekosystemu Zatoki Puckiej wewnętrznej „*Zostera*” w programie operacyjnym „Infrastruktura i Środowisko”. Celem wykonywanych badań jest ochrona zasobów genetycznych kluczowej dla akwenu Zatoki Puckiej populacji zostery morskiej, formującej podwodne łąki. Analizy genetyczne dotyczą wytypowania populacji tej rośliny, która stanowić będzie podstawę do restytucji tego gatunku w Zatoce Puckiej. Dlatego podjęto decyzje o wykonaniu analiz genetycznych nie tylko polskiej populacji, ale także estońskiej i niemieckiej.

W ramach realizacji zamówienia przeprowadzono analizę 75 osobników zostery morskiej, po 25 osobników z każdej populacji z Zatoki Puckiej (Polska), Z. Fińskiej (Estonia) i Z. Greifswaldzkiej



(Niemcy). W analizie zastosowano 12 loci msDNA amplifikowanych w dwóch zoptymalizowanych multipleksach. Określono klonalność, polimorfizm, strukturę genetyczną badanych populacji a także zanalizowano stopień zróżnicowania genetycznego populacji polskiej w stosunku do populacji estońskiej i niemieckiej.

Do analiz genetycznych pobierano fragment liścia i przechowywano w odpowiednich warunkach do czasu izolacji DNA, którą przeprowadzono przy pomocy samodzielnie przygotowanego zestawu odczynników do izolacji genomowego DNA z tkanek roślinnych. Analizy polimorfizmu 3 wymienionych populacji, przeprowadzone zostały na jądrowym DNA (nDNA). Startery znakowane fluorescencyjnie, zgrupowano w 2 podzestawy. Następnie zoptymalizowano i przeprowadzono reakcje multipleks PCR pozwalające na równoczesne uzyskiwanie produktów kilku lub kilkunastu *loci* (Mülhardt, 2007). Produkty amplifikacji poddano elektroforezie kapilarnej w sekwenatorze, (ABI Prism 3730). Korzystając z odpowiedniego oprogramowania, przeprowadzono analizę długości msDNA i analizy statystyczne (Van Oosterhout i in., 2004; Arnaud-Haond i Belkhir, 2007; Peakall and Smouse, 2006; Goudet 2002; Raymond i Rousset 1995; Jensen i in., 2005; Pritchard i in. 2000). Dla każdej grupy scharakteryzowano: strukturę klonalną, prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności genotypów opracowanego zestawu loci msDNA oraz wartości parametrów zmienności genetycznej i dystansu genetycznego.

Ostatecznie DNA udało się wyizolować z 26 roślin w przypadku populacji polskiej, 24 estońskiej 23 niemieckiej. Dla wszystkich wymienionych osobników uzyskano profile mikrosatelitarne składające się z 12 loci. W wyniku przeprowadzonych analiz statystycznych ustalono, że badane populacje zostęry morskiej – polska, estońska i niemiecka – prezentują inny wzór ustrukturyzowania klonalnego. Ich polimorfizm pozostaje na niskim poziomie, aczkolwiek wynik taki był spodziewany ze względu na klonalny charakter tej rośliny. Dystans genetyczny między populacjami był duży i nie powinien być tłumaczony izolacją geograficzną tych grup. Zróżnicowanie genetyczne występujące między nimi należałoby tłumaczyć innymi czynnikami m.in. strukturą klonalną lub odmienną historią tych populacji.

Dlatego też ostateczny wniosek w kontekście restytucji zostęry morskiej w Z. Puckiej oraz ewentualnych planów pozyskania materiału nasadzeniowego z innych populacji ze wschodniego i zachodniego Bałtyku wskazuje, że takie plany nie powinny być realizowane. Prawdopodobnie różnorodność genetyczna zachodniej i wschodniej populacji nie zagwarantowałaby sukcesu adaptacyjnego przeniesionych roślin do Z. Puckiej i tym samym podważyłaby założenie o pozytywnym przebiegu i zakończeniu projektu restytucji zostęry morskiej w Z. Puckiej wewnętrznej.



Referencje

- Reusch, T. B., 2000. Five microsatellite loci in eelgrass *Zostera marina* and a test of cross-species amplification in *Z. noltii* and *Z. japonica*. *Molecular Ecology* 9: 371-373.
- Reusch, T. B., W.T. Stam and J. L. Olsen, 1999. Microsatellite loci in eelgrass *Zostera marina* reveal marked polymorphism within and among populations. *Molecular Ecology* 8: 317-321.
- Bjorklund M., T. Aho and L.C. Larsson, 2007. Genetic differentiation in pikeperch (*Sander lucioperca*): the relative importance of gene flow, drift and common history. *Journal of fish biology* 71: 264-278.
- Saisa M., M. Salminen, M-L. Koljonen and J. Ruuhijarvi, 2010. Coastal and freshwater pikeperch (*Sander lucioperca*) populations differ genetically in the Baltic Sea basin. *Hereditas* 000: 001-010.
- Borer S.O., L.M. Miller and A.R. Kapuscinski, 1999. Microsatellites in walleye *Stizostedion vitreum*. *Molecular Ecology* 8: 336-338.
- Wirth T., R. Saint-Laurent and L., 1999. Isolation and characterization of microsatellite loci in the walleye (*Stizostedion vitreum*), and cross-species amplification within the family Percidae. *Molecular Ecology* 8: 1957-1969.
- Leclerc E., Y. Mailhot, M. Mingelbier and L. Bernatchez, 2008. The landscape genetics of yellow perch (*Perca flavescens*) in large fluvial ecosystem. *Molecular Ecology* 17: 1702-1717.
- Li L., H.P. Wang, C. Givens, S. Czesny and B. Brown, 2007. Isolation and characterization of microsatellites in yellow perch (*Perca flavescens*). *Molecular Ecology Notes* 7: 600-603.
- Kohlmann K. and P. Kersten, 2008. Isolation and characterization of nine microsatellite loci from the pike-perch, *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758). *Molecular Ecology Resources* 8: 1085-1087.
- Miller L. M. and A. R. Kapuscinski, 1996. Microsatellite DNA markers reveal new levels of genetic variation in northern pike. *Transactions of the American Fisheries Society* 125: 971-977.
- Hansen M. M., J. B. Taggart and D. Meldrup, 1999. Development of new VNTR markers for pike and assessment of variability at di- and tetranucleotide repeat microsatellite loci. *Journal of Fish Biology* 55: 183-188.



- Aguilar A., J. D. Banks, K. F. Levine and R. K. Wayne, 2005. Population genetics of northern pike (*Esox lucius*) introduced into Lake Davis, California. *Canadian Journal of Fishery Science and Aquaculture* 62: 1589-1599.
- Arnaud-Haond S., M. Duarte, F. Alberto and E. Serrao, 2007. Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology* 16: 5115-5139.
- Kamel S. J., A. R. Hughes, R. K. Grosberg, J. J. Stachowicz, 2012. Fine-scale genetic structure and relatedness in the eelgrass *Zostera marina*. *Marine Ecology Progress Series* 447: 127-137.
- Jensen J.L., A. J. Bohonak and S. T. Kelley, 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 13.
- Arnaud-Haond S. and K. Belkhir, 2007. GENECLONE: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Molecular Ecology Notes* 7: 15-17.
- Pękala M., 2012. Regulacja post-transkrypcyjna genów katabolizmu argininy u *Aspergillus nidulans*: oddziaływanie L-argininy z 5'UTR mRNA arginazy. Rozprawa doktorska, Instytut Genetyki i Biotechnologii, Uniwersytet Warszawski.
- Cornuet J.M. and G. Luikart, 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.
- Diekmann O. E., Serrao E. A. (2012). Range-edge genetic diversity: locally poor extant southern patches maintain a regionally diverse hotspot in the seagrass *Zostera marina*. *Molecular Ecology* 21: 1647–1657.
- Thorsten B., Reusch B., Wytze T. S., Olsen J. L. (1999). Microsatellite loci in eelgrass *Zostera marina* reveal marked polymorphism within and among populations. *Molecular Ecology* 3: 317-321.



Instytut Biochemii i Biofizyki
Polskiej Akademii Nauk

Pawińskiego 5a; 02-106 Warszawa; tel: +48 22 592 21 45; fax: + 48 22 592 21 90; e-mail: secretariate@ibb.waw.pl; <http://www.ibb.waw.pl>
