

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Fylogenetické vztahy recentních koňovitých

Diplomová práce

Bc. Ludmila Pohlová

Vedoucí práce: Mgr. Jan Robovský

Konzultant: Mgr. Ing. Lubomír Piálek

Katedra zoologie PřF JU

České Budějovice

2011

Pohlová, L., 2011: Fylogenetické vztahy recentních koňovitých. [Phylogenetic relationship of living Equidae. Mgr. Thesis, in Czech.] – 76 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

This thesis deals with a phylogeny of living Equidae based on an available evidence (morphology, behaviour, chromosomes, mitochondrial and nuclear genes) and using maximum parsimony and Bayesian approaches; and ILD, PBS analyses which are able to recognise incongruences between specific character partitions. My results are relatively very robust and rational in comparison with published studies. My thesis consists of a review (literature, GenBank) and obtaining of many sequences by myself.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 28. 4. 2011

Ludmila Pohlová

Poděkování:

Především bych chtěla poděkovat svému trpělivému školiteli Honzovi Robovskému a to nejen za obrovské množství času, které mi věnoval, ale i za pomoc s překlady hlavně německé odborné literatury. Za cenné rady při laboratorní práci a vyhodnocování dat jsem moc vděčná Lubošovi Piálkovi. Za poskytnutí materiálu a veškerou ochotu děkuji Luděkovi Čulíkovi ze Zoo Dvůr Králové, Luboši Melicharovi ze Zoo Liberec, Lence Václavové ze Zoo Plzeň, Jaroslavu Šimkovi ze Zoo Praha a prof. Petru Hořínovi z Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně. V neposlední řadě patří mé velké díky za všeobecnou podporu i mým přátelům a rodině.

Obsah:

1. Úvod	1
1.1 Představení skupiny.....	1
1.2 Taxonomie a její rozpory.....	1
1.3 Fylogeneze a její rozpory.....	3
1.4 Cíle práce.....	7
2. Metodika	8
2.1 Sběr dat.....	8
2.2 Získání vlastních sekvencí pro cytochrom <i>b</i> a 12S rRNA.....	9
2.3 Tvorba kombinované matice.....	12
2.4 Fylogenetické analýzy.....	13
2.5 Testování homogenity dat.....	14
3. Výsledky	15
3.1 Fylogenetické vztahy na základě analýz cytochromu <i>b</i>	15
3.2 Fylogenetické vztahy na základě analýz 12S rRNA.....	18
3.3 Fylogenetické vztahy na základě analýz kombinované matice.....	21
3.4 Fylogenetické vztahy na základě analýz jednotlivých.....	22
3.4.1 Nemolekulární matice.....	22
3.4.2 Mitochondriální geny.....	23
3.4.3 Jaderné geny.....	27
3.5 Výsledky testování homogenity dat.....	41
4. Diskuse	44
4.1 Taxonomická reprezentativnost genů.....	44
4.2 Fylogenetické vztahy recentních koňovitých.....	44
4.2.1 Kombinovaná matice.....	44
4.2.2 Jednotlivé partice.....	45
4.3 Příspěvek mé práce k řešení otázky zebry bezhřívé.....	50
4.4 Evoluční interpretace mých výsledků.....	51
5. Závěr a perspektivy	55
6. Literatura	56
7. Přílohy	62

1. Úvod

1.1 Představení skupiny

Koňovití (Equidae) jsou lichokopytníci (Perissodactyla), stejně jako jejich nejbližší recentní příbuzní nosorožci (Rhinocerotidae) a tapíři (Tapiridae). Oproti nosorožcům a tapírům vynikají koňovití na první pohled hlavně svou relativní štíhlostí a elegancí. Je to velice atraktivní skupina savců, navíc kůň s oslem domácím byli a jsou pro člověka velmi užitečným pomocníkem (Groves 1974, Volf 1980, Clutton-Brock 1992). Díky bohatému fosilnímu záznamu koňovitých můžeme dokonale sledovat jejich postupný vývoj, který se stal jedním z nejslavnějších učebnicových příkladů evolučních proměn (Franzen 1984). I přes veškerou oblibu a historický význam patří však ke značně ohroženým liniím savců (Moehlman 2002). Bohužel je stanovení jasných ochranářských priorit částečně oslabeno nejednotnými pohledy na jejich taxonomii a fylogenezi. I přes to že se jedná o relativně malou skupinu recentních zvířat, jejich třídění a vzájemné vztahy nejsou doposud zcela vyjasněny. Tyto nejasnosti a rozpory byly shrnuty a blíže rozebrány v mé rešeršní bakalářské práci (Pohlová 2008). Má bakalářská práce se snažila v rozporuplných pohledech zorientovat a vymezit cíle, ke kterým by se studium koňovitých z hlediska systematické zoologie mělo ubírat.

1.2 Taxonomie a její rozpory

Taxonomie stejně jako fylogeneze je dynamický vědní obor. Podléhá změnám, které jdou ruku v ruce se změnou našeho pohledu na věc. Názory se mohou měnit v důsledku odhalování chyb, které byly v rámci určování a popisování zvířat během historie udělány. Potom se také objevují stále nová data, která mají vliv na taxonomické postavení studovaných taxonů. A nakonec se stále setkáváme s otázkami typu: co je to vlastně druh, jaký koncept druhu je nejsprávnější používat (pro review viz Groves 2002), kde jsou hranice jednotlivých taxonomických kategorií a podobně. Proto se různí autoři liší počtem poddruhů, druhů, podrodů i rodů, což je blíže komentováno v mé bakalářské práci.

Pro přehled je zde uveden aktuální pohled na taxonomii (Obr. 1) od C. P. Grovese (2002). Ten umísťuje recentní koňovité do jediného rodu *Equus* a dále je třídí do šesti podrodů: *Equus* (koně), *Hemionus* (asijské osli), *Asinus* (afričtí osli),

Hippotigris (horské zebry), *Quagga* (stepní zebry) a *Dolichohippus* (zebra Grévyho). Sám Groves (Groves a Bell 2004) revidoval svůj pohled na taxonomii zeber a to tak, že potvrdil druhový status horským zebrám (*Equus zebra* a *Equus hartmannae*), zpochybnil možné poddruhy zebry Grévyho a oproti své předchozí revizi ve skupině stepních zeber přibyly další dva poddruhy, a to *Equus quagga chapmani* (zebra Chapmanova) a *Equus quagga borensis* (zebra bezhřívá), a naopak ubyla zebra zambezijská (*Equus quagga zambeziensis*).

Shrnu-li konfliktní body taxonomie koňovitých z posledních let, pak:

- kůň Převalského bývá považovaný buď za východní poddruh tarpana (Groves 1974, 1994) nebo za samostatný druh (Eisenmann 1996), ale dokonce i za zdivočelou formu domácího koně (Ishida a kol. 1995), pro review viz Robovský 2009;
- tarpan lesní bývá buď považovaný za samostatný poddruh tarpana (Heptner a kol. 1988) nebo za populaci stepního tarpana zatlačenou do ne příliš optimálního prostředí lesů (Groves 1994);
- povýšení khura a ašdariho (Groves 2002) zřejmě odráží výrazné rozdíly obou oslů, ale to nijak nemění jejich pravděpodobnou vazbu na zbylé asijské osly a tento pohled zůstává neproověřen (genetické údaje obou oslů chybí);
- štěpení na tři poddruhy kiangů není všemi přijímáno (např. Schaller 1998); podobně je nejasná situace u džigetajů a kulanů+onagerů (Schreiber 2007);
- obě horské zebry byly Grovesem a Bellovou (2004) uznány za samostatné druhy, ale Moodley a Harley (2005) nesouhlasí na základě analýzy mitochondriální kontrolní oblasti a mikrosatelitů;
- zebra kvaga bývala považována za samostatný druh, ať kvůli morfologickým znakům (Azzaroli a Stanyon 1991), tak sympatrickému rozšíření vůči zebře stepní, ovšem tyto zebry zřejmě sympatrické nebyly a i její morfologické znaky jsou spíše vyvrcholením klinální variability zebry stepní napříč africkým kontinentem (Groves a Bell 2004);
- v rámci stepních zeber se vyčleňují samostatné poddruhy jako například zebra bezhřívá (Groves a Bell 2004), ale podle nejnovější genetické studie Lorenzenové (Lorenzen a kol. 2008) jsou morfologicky rozlišované poddruhy jen minimálně odlišné geneticky.

Řád: Perissodactyla Owen, 1848 (lichokopytníci)

Čeleď: Equidae Gray, 1821 (koňovití)

Rod: *Equus* Linnaeus, 1758

Podrod: *Equus* Linnaeus, 1758 (koně)

Druh: *Equus ferus* Boddaert, 1785 (tarpan)

Poddruh: † *Equus ferus ferus* Boddaert, 1785 (tarpan stepní)

Poddruh: † *Equus ferus sylvestris* von den Brincken, 1826 (tarpan lesní)

Poddruh: *Equus ferus przewalskii* Poliakov, 1881 (kůň Převalského)

Druh: *Equus caballus* Linnaeus, 1758 (kůň domácí)

Podrod: *Hemionus* Stehlin and Graziosi, 1935 (asijské osli)

Druh: *Equus kiang* Moorcroft, 1841 (kiang)

Poddruh: *Equus kiang kiang* Moorcroft, 1841 (kiang západní)

Poddruh: *Equus kiang holdereri* Matschie, 1911 (kiang východní)

Poddruh: *Equus kiang polyodon* Hodgson, 1847 (kiang jižní)

Druh: *Equus hemionus* Pallas, 1775 (onager)

Poddruh: *Equus hemionus castaneus* Lydekker, 1905 (džigetaj altajský)

Poddruh: *Equus hemionus hemionus* Pallas, 1775 (džigetaj gobijský)
(dříve *Equus hemionus luteus*)

Poddruh: *Equus hemionus kulan* Groves a Mazák 1967 (kulan)

Poddruh: *Equus hemionus onager* Boddaert, 1785 (onager)

Poddruh: *Equus hemionus blanfordi* Pocock, 1947 (onager Blanfordův)

Druh: *Equus khur* Lesson, 1827 (khur, indický divoký osel)

(dříve *Equus hemionus khur*)

Druh: † *Equus hemippus* I. Geoffroy St. Hilaire, 1855 (ašdari, syrský divoký osel)

(dříve *Equus hemionus hemippus*)

Podrod: *Asinus* Gray, 1824 (afričtí osli)

Druh: *Equus africanus* Heuglin a Fitzinger, 1866 (osel africký)

Poddruh: *Equus africanus africanus* Heuglin a Fitzinger, 1866 (osel nubijský)

Poddruh: *Equus africanus somaliensis* Noack, 1884 (osel somálský)

Poddruh: nepojmenovaný poddruh (osel saharský)

Druh: *Equus asinus* Linnaeus, 1758 (osel domácí)

Podrod: *Hippotigris* C. H. Smith, 1841 (horské zebry)

Druh: *Equus zebra* Linnaeus, 1758 (zebra kapská)

(dříve *Equus zebra zebra*)

Druh: *Equus hartmannae* Matschie, 1898 (zebra Hartmannové)

(dříve *Equus zebra hartmannae*)

Podrod: *Quagga* Shortridge, 1934 (stepní zebry)

Druh: *Equus quagga* Gmelin, 1788 (zebra stepní)

(dříve *Equus burchellii*)

Poddruh: † *Equus quagga quagga* Gmelin, 1788 (kvaga)

Poddruh: *Equus quagga burchellii* Gray, 1824 (zebra Burchellova)

(zahrnuje dříve uvažované poddruhy *Equus burchellii burchellii*, *Equus burchellii chapmani* a *Equus burchellii antiquorum*)

Poddruh: *Equus quagga crawshayi* de Winton, 1896 (zebra Crawshayova)

Poddruh: *Equus quagga zambeziensis* Prazak, 1898 (zebra zambezijská)

Poddruh: *Equus quagga boehmi* Matschie, 1892 (zebra Böhmová)

Podrod: *Dolichohippus* Heller, 1912 (zebry Grévyho)

Druh: *Equus grevyi* Oustalet, 1882 (zebra Grévyho)

Poddruh: *Equus grevyi grevyi* Oustalet, 1882 (zebra Grévyho)

Poddruh: nepojmenovaný poddruh

Obr. 1: Přehled taxonomie koňovitých podle Grovese (2002). České názvy hlavních skupin používané v rámci této práce jsou spíše jen mé vlastní pracovní názvy.

1.3 Fylogeneze a její rozpory

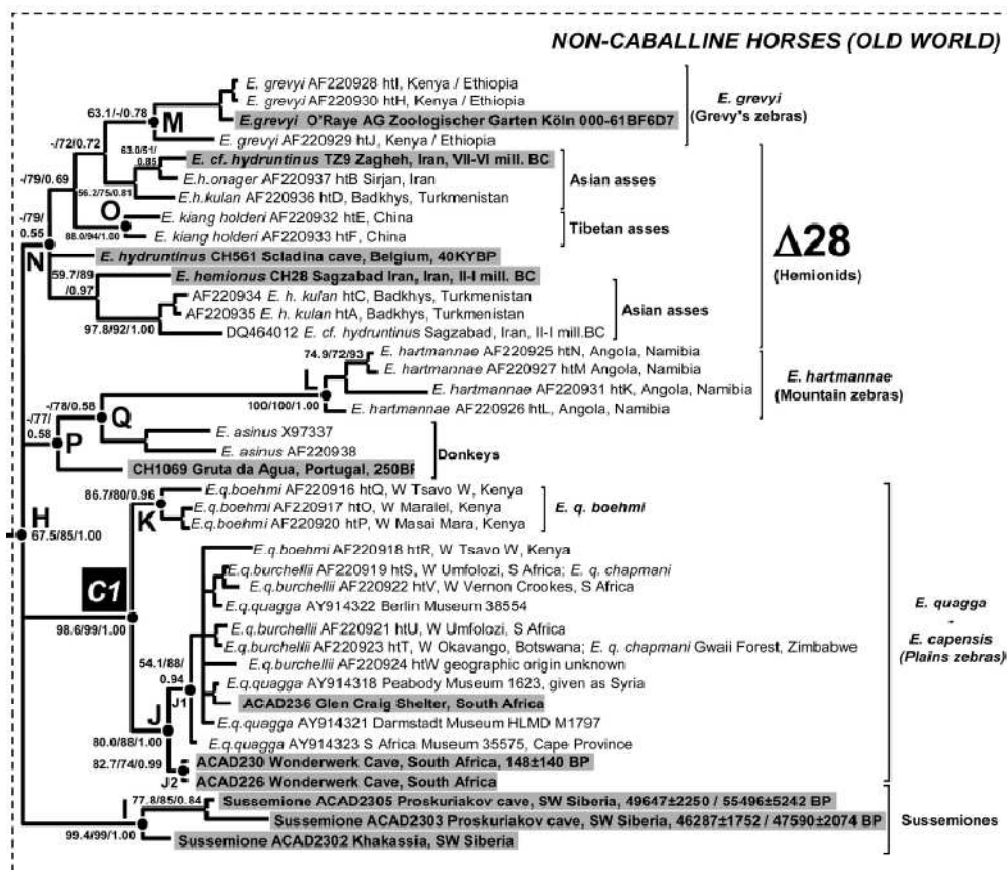
Stejně jako taxonomie, tak ani fylogeneze koňovitých není ujednocená. Téměř platí, že co studie, to jiné fylogenetické vztahy. Koňovití jsou relativně homogenní skupina co se anatomie a morfologie týče, neplatí už to tolik u vzhledu či chování

(Groves a Mazák 1967). Tento fakt má za následek právě výraznou míru nevyjasněných fylogenetických vztahů potažmo i rozporuplnost v taxonomii. Není až takový problém odlišit například zebra od osla nebo koně, ale spíše najít společné znaky pro posouzení jejich vzájemných vztahů. Dříve byla fylogeneze tvořena intuitivně na základě morfologických, případně etologických znaků. Až rozvoj molekulární biologie a standardizace fylogenetických metod odstartoval revoluci v systematické zoologii. Fylogenetickými analýzami lze dnes srovnávat prakticky všechny možné znaky, od morfologie až po molekulární data. Avšak analýzy různých datových souborů, dávají také různé výsledky (pro review viz Pohlová 2008).

Základní otázkou je například to, zda zebry tvoří monofyletickou skupinu. Morfologické studie převážně ukazují, že zebry monofyletickou skupinou nejsou, např. Eisenmann 1979 (lebeční a zubní znaky), Bennet 1980 (hlavně lebeční znaky), Klein a Cruz-Urbe 1999 (proporce lebek). Monofylii naznačují např. Harris a Porter 1980 (znaky postkraniální kostry) nebo Groves a Ryder 2000 (zuby, lebka i poskraniál). Studie na základě chromozomálních dat se také v této otázce rozcházejí. Myka a kol. (2003) ukazují nemonofylii ale Trifonov a kol. (2008) zase monofylii zeber. Ustálenější výsledky můžeme pozorovat v biochemických a zvláště pak sekvenčních fylogenetických analýzách. Převažuje zde mínění o monofylii zeber, např. Kaminski 1979 (proteiny), Lowenstein a Ryder 1985 (imunoreakce), George a Ryder 1986 (restrikční místa na mitochondriální DNA), Oakenfull a Clegg 1998 (sekvence genů pro $\alpha 1$ a $\alpha 2$ globin) nebo Oakenfull a kol. 2000 (sekvence kontrolní oblasti a 12S rRNA). Najdeme ale i několik takových studií, které tvrdí opak, např. Flint a kol. 1990 (polymorfismus restrikčních míst na jaderné DNA) nebo Oakenfull a Clegg 1998 (sekvence pro θ globin).

Zajímavé je, že hned v několika molekulárních studiích Orlando a kolektivu (2003, 2006, 2009) se objevují zebry jako nemonofyletická skupina. Ve všech studiích používají k analyzování kombinaci sekvencí kontrolní oblasti s cytochromem *b* a ve všech vystupují fosilní druhy. Jejich metodika je však bohužel dosti neprůhledná. Jejich nejnovější práce (Orlando a kol. 2009) prezentuje nezakořeněný strom získaný metodou maximum likelihood (Obr. 2). Ten dělí recentní koňovité, ve shodě s obecným názorem (Groves 1974), na dvě skupiny. První je kabaloidní linie (koně a novosvětské fosilní druhy) a druhou je linie stenoidní (osli a zebry a starosvětské fosilní druhy). Zebry vycházejí podivně nemonofyletické. Zebra Grévyho zde vystupuje jako odvozený asijský osel, zebra Hartmannové jako odvozený africký

osel a zebra stepní jako sesterská těmto dvěma zebro-oslím skupinám. Může za tuto topologii malé množství použitých sekvencí, jejich krátká délka, nevhodné metody (např. neighbor-joining) nebo vliv fosilních taxonů?

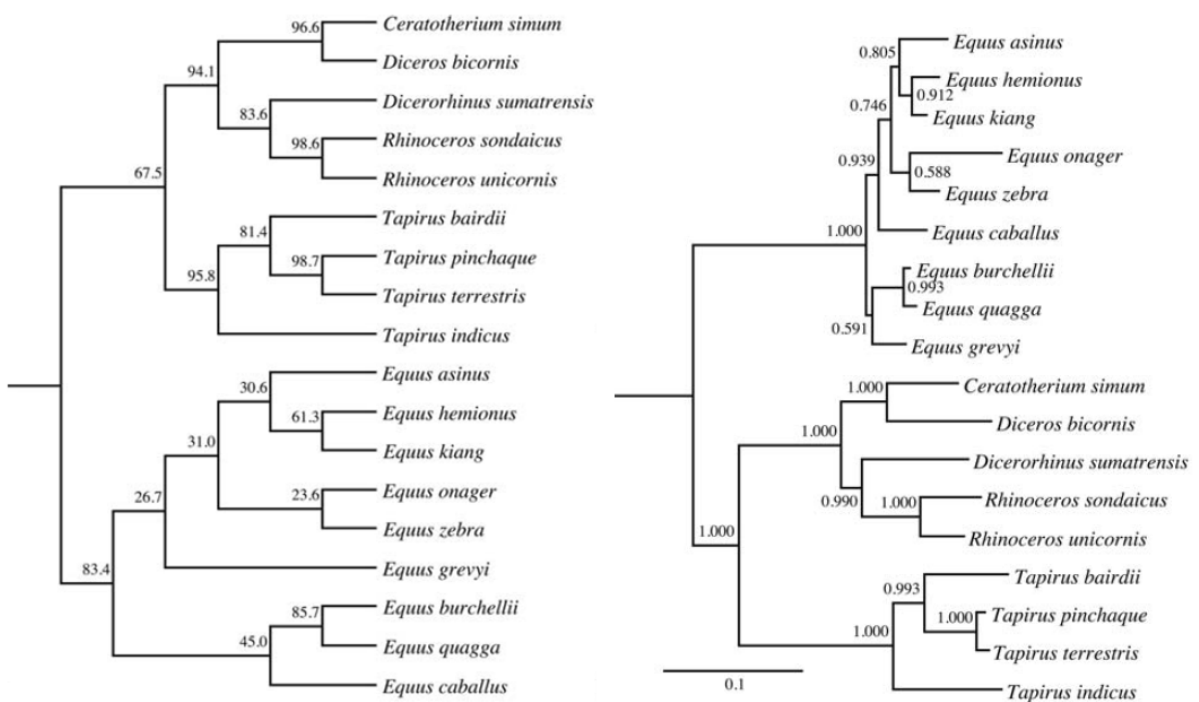


Obr. 2: Část výsledného kladogramu se stenoidní linií, který byl získaný metodou maximum likelihood na sekvencích kontrolní oblasti – nápadná je polyfylie zeber (Orlando a kol. 2009).

Monofylie zeber je sice jen jedním z mnoha rozporů fylogeneze koňovitých. Na něj ale navazují další neshody. Komu jsou zebry v případě monofylie jako skupina nejbližší? Pokud monofyletické nejsou, ke komu a jak se rozpadají? Kdo je vůbec bazální skupina koňovitých? Jak vypadá druhová a poddruhová úroveň v jednotlivých skupinách? Co fosilní zvířata? V souhrnu je také zřejmé, že morfologická data a různá data molekulární dávají různé výsledky o fylogenezi koňovitých. Co se stane, když se různé datové soubory zkombinují dohromady?

O komplexní fylogenezi s kombinovanými datovými soubory se pokusili zatím jen Price a Bininda-Emonds (2009). Jednalo se o fylogenezi všech recentních lichokopytníků. Použili dva nezávislé soubory dat. Prvním byl soubor sekvencí 39 různých genů, kdy každý gen musel mít sekvenci alespoň u tří druhů. Tento soubor

byl podroben analýzám jak na principu „supertree“, tak na principu „supermatrix“. Druhým souborem byly kladogramy posbírané z odborné literatury, ze kterých vytvořili „supertree“. Všechny metody shodně potvrdily tradiční pohled na členění lichokopytníků, tedy že máme větev s koňovitými (Hippomorpha) a jí sesterskou větev s nosorožci a tapíry (Ceratomorpha). Na tyto datové soubory, jak se ukázalo, se však nehodily fylogenetické analýzy neighbour joining a minimum evolution, protože v jejich výsledcích nebyla ani jedna z čeledí monofyletická. Žádný soubor dat, ani metoda tvorby stromů však nedokázala uspokojivě vyřešit právě sporné vztahy mezi recentními koňovitými. Důležité je, že žádný gen nebyl osekvenován pro všechny druhy. Nicméně ve všech výsledcích různých fylogenetických analýz genové „supermatrix“ se spolehlivě objevily *Equus quagga* a *E. burchellii* jako sesterské taxony. Zebry jako takové se v analýzách ale nikdy neobjevily jako monofyletické. Dále *E. onager* nebyl nikdy umístěn jako sesterský taxon *E. hemionus*. Pro ilustraci jsem z této práce vybrala dva kladogramy, které jsou výsledkem analýz genové „supermatrix“ (Obr. 3). Hlavním problémem této práce je použití pouze omezeného množství sekvencí (jedna sekvence na taxon) a použití mnoha genů s nízkým reprezentativním druhovým zastoupením do matice.



Obr. 3: Vlevo výsledek nevážené parsimonní analýzy s bootstrapovými hodnotami a vpravo výsledek Bayesovské analýzy s hodnotami posteriorních pravděpodobností (Price a Bininda-Emonds 2009).

1.4 Cíle práce

Zde předkládaná diplomová práce se snaží změnit stávající stav nevyjasněné fylogeneze takto relativně malé a atraktivní skupiny zvířat. Jejím cílem je:

- vytvořit co nejkompletnější kombinovanou matici nemolekulárních (zuby, lebka, postkraniální kostra, vnější vzhled, chromosomy, chování, srst) a molekulárních dat (sekvence mitochondriálních i jaderných genů);
- doplnit databázi o vlastní sekvence pro cytochrom *b* a 12S rRNA a provést fylogenetické analýzy všech dostupných sekvencí pro tyto dva mitochondriální geny (metodou maximální parsimonie a bayesovským přístupem);
- provést fylogenetické analýzy jak celé kombinované matice, tak i jednotlivých částí (metodou maximální parsimonie a bayesovským přístupem);
- odhalit konfliktní chování dílčích datových souborů v kombinované matici (ILD, PBS);
- přispět ke sjednocení názoru na fylogenezi koňovitých.