

Ανάλυση γενετικής ποικιλότητας και γονιδιακής
ροής καστανεώνα και απομονωμένου φυσικού
πληθυσμού καστανιάς στη νήσο Λέσβο με
ουδέτερους και μη μοριακούς δείκτες

Νικόλαος Τουρβάς

Οκτώβριος 2018

Εισαγωγή

Η ευρωπαϊκή καστανιά (*Castanea sativa* Mill.) είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα και οικονομικά σημαντικά είδη της λεκάνης της Μεσογείου (cite euforgen). Εκμεταλλεύεται τόσο για τους καρπούς της όσο και για την ξυλεία της και για αυτό το λόγο καλλιεργείται σε περιοχές πλέον της μεσογειακής ζώνης (citation?).

Η μεγάλη εξάρτηση κοινωνιών έχει οδηγήσει... Εξαιτίας της εκτεταμένης ανθρωπογενούς μεταφοράς γενετικού υλικού..., γενετικό υλικό του είδους έχει τύχει εκτεταμένης μεταφοράς (δες στα παπερ για ancient και κάνε cite) εδώ και αιώνες. Επιπλέον η χρήση επιλεγμένων γενοτύπων σε καστανεώνες αλλά και πρεμνοφυής διαχείριση των φυσικών πληθυσμών έχουν επιφέρει σημαντικές απώλειες γενετικών πόρων του είδους (αραβανοπ? - παπαδ). Η πίεση αυτή έχει ισχυροποιηθεί - ενταθεί λόγω προσβολών κυρίως από τους μύκητες *Cryphonectria parasitica* και *Phytophthora cambivora*. + κατακερματισμός απομόνωση γενετικού υλικού

ΔΕΣ Παπαδήμα Καστοριά

Θεωρητικό πλαίσιο

1. Σημασία γενετικής ποικ Long term see introduction (Pollegioni et al., 2011) γανό σελ 20-22 Selection may erode genetic diversity, which is a crucial factor for the success of breeding programs. Γεωργία vs δασοπονία φυσικοί πληθυσμοί και Γανό σελ 19 (Γανόπουλος, 2013) τι γίνεται με τους καστανεώνες, δες Πετρόπουλος. (Πετρόπουλος, 2016)
τι γίνεται με τα coppice → (Aravanopoulos, 2018)

Refugia - Gene flow - Long term (Petit et al., 2003, 2005) Founder effect από ανθρω

(κίνδυνος για γονιδιακή ροή - μόλυνση στον φυσικό πληθυσμό)

Δυο λόγια για τη διεθνή βιβλιογραφία. Υπάρχει ή δεν υπάρχει ποικιλότητα; "Γενικά' έχει βρεθεί ότι ... [...] Συγκεκριμένα στην Ελλάδα...

1. Η λεπτομερής γνώση της δομής και της σύνθεσης της γενετικής παραλλακτικότητας αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την προστασία και διαχείριση των γενετικών πόρων ενός είδους. Στη γεωργία, οι περισσότερες καλλιέργειες, έχουν απολέσει το μεγαλύτερο μέρος των γενετικών πόρων που διέθεταν πριν την βελτιστοποίηση της παραγωγικής διαδικασίας μέσω της επιλογής ποικιλιών και άριστων κλώνων. ...kastanewnes... Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να δυσχερεύεται το έργο των βελτιωτών στην εύρεση κατάλληλων γενοτύπων για διασταυρώσεις και να μειώνεται το δυναμικό προσαρμογής ως προς νέα γνωρίσματα.

Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται στους καστανεώνες της χώρας μας οι οποίοι συνήθως δημιουργούνται με εμβόλια επιλεγμένων κλώνων σε υποκείμενα άγριου τύπου. coppice - πρεμνοφυής διαχείριση - τα πρεμνοφυή δάση αναπαράγονται βλαστικά και αρα αναμένεται να

έχουν χαμηλότερο δραστικό μέγεθος πληθυσμού συγκρινόμενα με όμοιας έκτασης φυσικά δάση καστανιάς που αναπαράγονται εγγενώς (Mattioni et al., 2008). [hill] Το χαμηλότερο δραστικό μέγεθος πληθυσμού υποδεικνύει ότι το γενετικό απόθεμα από το οποίο προκύπτει η εξέλιξη του δάσους είναι μικρό και άρα ενδυνάμει μικρότερο δυναμικό προσαρμογής ή/και πιο αργό βαθμό εξελικτικής προσαρμογής σε περιπτώσεις ταχείας περιβαλλοντικής μεταβολής [47].

refugia - founder effects

γονιδιακή ροή [aravanop2018]

Ερευνητικά ερωτήματα

Προτείνεται η μελέτη δύο πληθυσμών καστανιάς της νήσου Λέσβου. Ο ένας πληθυσμός εντοπίζεται σε φυσική συστάδα η οποία διαχειρίζεται πρεμνοφυώς (βλαστικός πολλαπλασιασμός), ενώ ο δεύτερος αντιπροσωπεύει καστανεώνα (περιοχή Αγιάσου) ο οποίος έχει ιδρυθεί με τη χρήση εμβολίων σε άγριου-τύπου υποκείμενα.

Σκοποί της παρούσας πρότασης είναι:

1. Η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας και διαφοροποίησης δύο πληθυσμών καστανιάς (καστανεώνας - φυσικός πληθυσμός) στη νήσο Λέσβο με τη χρήση μοριακών δεικτών μικροδορυφόρων SSR.
2. Η καταγραφή των κλώνων (multilocus genotypes) που συγκροτούν τον καστανεώνα και κατ' επέκταση την ποικιλία καστώνων Αγιάσου στη νήσο Λέσβο.
3. Η μελέτη γονιδιακής ροής μεταξύ των δύο πληθυσμών.

Μεθοδολογία

Συλλογή φυτικού υλικού & Εκχύλιση DNA

Θα διεξαχθεί δειγματοληψία κατ' ελάχιστον 25-30 ατόμων ανά πληθυσμό. Η εκχύλιση του γενωμικού DNA θα πραγματοποιηθεί με τη μέθοδο CTAB (Doyle and Doyle, 1987).

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης & Γενοτύπηση

Για τη γενετική ανάλυση θα χρησιμοποιηθούν μοριακοί δείκτες SSR (Simple Sequence Repeats). Οι SSR ή μικροδορυφορικοί δείκτες αποτελούνται από αλληλουχίες 2-5 νουκλεοτιδίων που επαναλαμβάνονται 5-100 φορές (Budak et al., 2004). Ο συγκυρίαρχος χαρακτήρας τους σε συνδυασμό με τα υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού που παρουσιάζουν, τους καθιστούν εξαιρετικούς δείκτες για τη μελέτη πρόσφατων μικροεξελικτικών διεργασιών (Wang, 2010). Οι μικροδορυφόροι

μπορούν να διακριθούν σε ουδέτερους και λειτουργικούς. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν εκείνες οι γονιδιακές θέσεις οι οποίες βρίσκονται σε τυχαία τμήματα του γονιδιώματος. Αντίθετα οι λειτουργικοί δείκτες ενισχύουν γονιδιακές θέσεις που εκφράζονται και επομένως σχετίζονται με κάποια βιολογική διεργασία [citation???].

Συγκεκριμένα θα χρησιμοποιηθούν τρεις ουδέτεροι δείκτες SSR (EMCs38, CsCAT3, CsCAT6) (Buck et al., 2003; Marinoni et al., 2003) και πέντε δείκτες EST-SSR (GOT004, GOT021, FIR110, POR042 και WAG004) (Durand et al., 2010). Οι EST-SSR που έχουν επιλεγεί σχετίζονται με την αντοχή των δέντρων σε συνθήκες υδατικής έλλειψης.

Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση θα πραγματοποιηθεί σε περιβάλλον της στατιστικής γλώσσας R (R Core Team, 2018) με χρήση των πακέτων poppr (Kamvar et al., 2014), hierfstat (Goudet, 2005), και genepop (Rousset, 2008). Οι βασικές παράμετροι γενετικής ποικιλότητας (αριθμός αλληλομόρφων, ετεροζυγωτία, συντελεστής ομομιξίας, ισορροπία Hardy-Weinberg κ.α.) θα εκτιμηθούν αφού πρώτα διερευνηθεί η ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ των γονιδιακών θέσεων και η πιθανότητα ύπαρξης μηδενικών αλληλομόρφων.

Η εκτίμηση δραστικού μεγέθους πληθυσμού θα πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τη μέθοδο που έχει προταθεί α... με το πρόγραμμα N_e Estimator (Do et al., 2014),

Επίσης θα υπολογιστεί ο αριθμός των γενοτύπων (multilocus genotypes) που απαντώνται στον υπό μελέτη καστανεώνα.

adegenet (Jombart, 2008) ,pegas,ape,fangorn

-> M ratio -> υποδεικνύει μείωση μεγέθους πληθυσμού σε μεγάλα χρονικά διαστήματα (Aleksic and Geburek, 2014) BOTTLENECK -> πρόσφατες γενετικές στενωπούς ($2 N_e - 4 N_e$ γενεές)

R Notebook - R markdown

διαφοροποίηση

Nei's D_s , Cav-Sf για φυλογενετικά F_{ST} , G''_{ST} , D_{est} PCA, CA AMOVA φυλογενετική ape Cavalli-Sforza - δε χρειάζεται για 2 πληθυσμούς. Αν όμως προστεθούν κ άλλοι STRUCTURE DAPC

Γονιδιακή ροή

δες οπωσδήποτε (Aleksic and Geburek, 2014; Leonarduzzi et al., 2016) Cervus (see SM1 Leonarduzzi) -> ποσοστό παιδιών που οι γονείς τους είναι άτομα του πληθυσμού $N_m = 1/4F_{ST}$ παραδοσιακή μέθοδος STRUCTURE μοντέλο πρόδρομης γνώσης πληθυσμών -> δες (Aleksic and Geburek, 2014; Pritchard et al., 2000) MIGRATE MIGRAINE

With an estimated average mutation rate of roughly $1 = 5 \cdot 10^{-4}$ (Goldstein & Schlotterer 1999; Whitaker et al. 2003)

In many cases gene flow can be safely assumed to be high relative to mutation rate, so in much of the literature GST is used to assess migration rates [Whitlock 2011]

Γενετική τοπίου

IBD - mantel test - adegenet, ape Genetic boundaries γενετικά φράγματα φραγμοί- Monmonier's algorithm sPCA Geneland DIYABC ??? GeneClass2 ???

Αναμενόμενα αποτελέσματα

Τι θα μάθουμε από αυτή τη ### Γενετική τοπίου IBD - mantel test - adegenet, ape Genetic boundaries γενετικά φράγματα φραγμοί- Monmonier's algorithm sPCA Geneland DIYABC ??? GeneClass2 ??? μελέτη... χαρακτηρισμός ποικιλίας Λέσβου gene flow

ΔΕΣ ΔΥΟ παραγράφους outputs στο εδινβουργο!!!

καταγραφή γενετικής ποικιλότητας και δημογραφικών παραγόντων των δύο πληθυσμών. Αυτό θα ενισχύσει την προσπάθεια προστασία των γενετικών πόρων του είδους στο ΒΑ Αιγαίο και την ορθολογική διαχείριση του πολλαπλασιαστικού υλικού

γενετικός χαρακτηρισμός ποικιλία λεσβου Αγιάσου → για την ταυτοποίηση και την ιχνηλασιμότητα πιστοποίηση [δες και γανό]

Βιβλιογραφία

Aleksic, J.M., Geburek, T., 2014. Quaternary population dynamics of an endemic conifer, *Picea omorika*, and their conservation implications. *Conservation Genetics* 15, 87–107. <https://doi.org/10.1007/s10592-013-0523-6>

Aravanopoulos, F.A., 2018. Do Silviculture and Forest Management Affect the Genetic Diversity and Structure of Long-Impacted Forest Tree Populations? *Forests* 9, 14.

Buck, E.J., Hadonou, M., James, C.J., Blakesley, D., Russell, K., 2003. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Molecular Ecology Notes* 3, 239–241. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00410.x>

Budak, H., Shearman, R.C., Parmaksiz, I., Dweikat, I., 2004. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs. *Theor Appl Genet* 109, 280–288. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1630-z>

Do, C., Waples, R.S., Peel, D., Macbeth, G.M., Tillett, B.J., Ovenden, J.R., 2014. NeEstimator v2: Re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources* 14, 209–214. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12157>

- Doyle, J., Doyle, J., 1987. Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. *Phytochem Bull* 19, 11–15.
- Durand, J., Bodénès, C., Chancerel, E., Frigerio, J.-M., Vendramin, G., Sebastiani, F., Buonamici, A., Gailing, O., Koelewijn, H.-P., Villani, F., Mattioni, C., Cherubini, M., Goicoechea, P.G., Herrán, A., Ikarán, Z., Cabané, C., Ueno, S., Alberto, F., Dumoulin, P.-Y., Guichoux, E., de Daruvar, A., Kremer, A., Plomion, C., 2010. A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: Oak as a case study. *BMC Genomics* 11, 570. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-570>
- Goudet, J., 2005. Hierfstat, a package for r to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes* 5, 184–186. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00828.x>
- Jombart, T., 2008. Adegnet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24, 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Kamvar, Z.N., Tabima, J.F., Grünwald, N.J., 2014. Poppr : An R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2, e281. <https://doi.org/10.7717/peerj.281>
- Leonarduzzi, C., Piotti, A., Spanu, I., Vendramin, G.G., 2016. Effective gene flow in a historically fragmented area at the southern edge of silver fir (*Abies alba* Mill.) Distribution. *Tree Genetics & Genomes* 12, 95. <https://doi.org/10.1007/s11295-016-1053-4>
- Marinoni, D., Akkak, A., Bounous, G., Edwards, K.J., Botta, R., 2003. Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* (Mill.). *Molecular Breeding* 11, 127–136. <https://doi.org/10.1023/A:1022456013692>
- Mattioni, C., Cherubini, M., Micheli, E., Villani, F., Bucci, G., 2008. Role of domestication in shaping *Castanea Sativa* genetic variation in Europe. *Tree Genetics & Genomes* 4, 563–574. <https://doi.org/10.1007/s11295-008-0132-6>
- Petit, R.J., Aguinagalde, I., De Beaulieu, J.L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M., Mohanty, A., Müller-Starck, G., Demesure-Musch, B., Palmé, A., Martín, J.P., Rendell, S., Vendramin, G.G., 2003. Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300, 1563–1565. <https://doi.org/10.1126/science.1083264>
- Petit, R.J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D., Vendramin, G.G., 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* 14, 689–701. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02410.x>
- Pollegioni, P., Woeste, K., Olimpieri, I., Marandola, D., Cannata, F., Emilia Malvolti, M., 2011. Long-term human impacts on genetic structure of Italian walnut inferred by SSR markers. *Tree Genetics & Genomes* 7, 707–723. <https://doi.org/10.1007/s11295-011-0368-4>
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155, 945–959.
- R Core Team, 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Rousset, F., 2008. Genepop'007: A complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8, 103–106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286>

2007.01931.x

Wang, I.J., 2010. Recognizing the temporal distinctions between landscape genetics and phylogeography. *Molecular Ecology* 19, 2605–2608. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04715.x>

Γανόπουλος, Ι., 2013. Διερεύνηση γενετικής ποικιλότητας, ταυτοποίηση και εφαρμογή λειτουργικών δεικτών στην κερασιά (*Prunus Avium* L.) (Διδακτορική Διατριβή). Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Πετρόπουλος, Σ., 2016. Γενετική ποικιλότητα συμπατρικών πληθυσμών καστανίας (*Castanea Sativa* Mill.) και των καρποφάγων εντόμων αυτής (Μεταπτυχιακή Διατριβή). Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.