

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...

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. Παρόμοια τάση παρατηρείται και στους καστανεώνες της χώρας μας οι οποίοι συνήθως δημιουργούνται με εμβόλια επιλεγμένων κλώνων σε υποκείμενα άγριου τύπου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να δυσχερénεται το έργο των βελτιωτών στην εύρεση κατάλληλων γενοτύπων για διασταυρώσεις και να μειώνεται το δυναμικό προσαρμογής ως προς νέα γνωρίσματα.

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 συγκριτικά χαμηλότερο

δραστικό μέγεθος πληθυσμού υποδεικνύει ότι το γενετικό απόθεμα από το οποίο προκύπτει η εξελικτική προσαρμογή του δάσους είναι μικρό και άρα ενδυναμεί 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 μελέτη γονιδιακής ροής μεταξύ των δύο πληθυσμών.
3. Η καταγραφή των κλώνων (multilocus genotypes) που συγκροτούν τον καστανεώνα και κατ' επέκταση την ποικιλία καστώνων Αγιάσου στη νήσο Λέσβο.

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

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.

Γενετική ποικιλότητα εντός πληθυσμών

Η στατιστική 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 ομομειξίας, ισορροπία Hardy-Weinberg κ.α.) θα εκτιμηθούν αφού πρώτα διερευνηθεί η ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ των γονιδιακών θέσεων και η πιθανότητα ύπαρξης μηδενικών αλληλομόρφων.

Τα δραστικά μεγέθη των πληθυσμών θα εκτιμηθούν με το πρόγραμμα N_e Estimator (Do et al., 2014), ενώ η ύπαρξη γενετικών στενωπών στην εξελικτική ιστορία των πληθυσμών θα διερευνηθεί με τα προγράμματα BOTTLENECK (Piry et al., 1999) (πρόσφατο παρελθόν: $2 N_e - 4 N_e$ γενεές) και Arlequin (Excoffier and Lischer, 2010) (M-ratio test, υποδεικνύει παλαιότερες δημογραφικές μεταβολές).

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

Γενετική ποικιλότητα μεταξύ πληθυσμών

Θα υπολογιστεί ο συντελεστής διαφοροποίησης F_{ST} (Nei, 1987), η γενετική απόσταση κατά Nei (1978), καθώς και η γεωμετρική απόσταση Cavalli-Sforza (Cavalli-Sforza and Edwards, 1967) με το πακέτο hierfstat της R (Goudet, 2005). Οι πολυμεταβλητές αναλύσεις PCA, CA και η ανάλυση μοριακής διακύμανσης AMOVA θα διεξαχθούν με το πακέτο adegenet (Jombart, 2008). Το λογισμικό Structure (Pritchard et al., 2000), αλλά και η πολυμεταβλητή ανάλυση DAPC (σε περιβάλλον R) θα χρησιμοποιηθούν για την περαιτέρω διερεύνηση της διαφοροποίησης των δύο πληθυσμών. Η Dapc ενδέχεται να αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη εάν

Γονιδιακή ροή

Ο αριθμός των μεταναστών θα εκτιμηθεί αρχικά σύμφωνα με το κλασσικό μοντέλο $Nm = [(1/F_{ST}) - 1]/4$ (Frankham et al., 2002). Ωστόσο, αποτελεί παραδοχή της μεθόδου ότι η μετανάστευση είναι τάξεις μεγεθους μεγαλύτερη σε σχέση με τις μεταλλάξεις. Λόγω του υψηλού ρυθμού μεταλλάξεων που χαρακτηρίζει τους μικροδορυφόρους (περίπου 5×10^{-4}) (Whittaker et al.,

2003) αυτή η παραδοχή ενδέχεται να παραβιάζεται (Whitlock, 2011). Για το λόγο αυτό, ο αριθμός των μεταναστών θα υπολογιστεί και με τη χρήση των εξειδικευμένων λογισμικών (coalescent-based models) Migrate (Beerli and Felsenstein, 2001) και MIGRAINE (De Iorio et al., 2005).

Αναμενόμενα αποτελέσματα

Η καταγραφή της γενετικής ποικιλότητας των πληθυσμών αναμένεται να συνδράμει στο έργο της διαφύλαξης και διαχείρισης των γενετικών πόρων της καστανιάς στη χώρα μας.

Επιπροσθέτως, η μελέτη της γονιδιακής ροής θα αποσαφηνίσει την έκταση ενός ενδεχομένου φαινομένου γενετικής ρύπανσης του φυσικού πληθυσμού από τον καστανεώνα. Η γνώση αυτή έχει άμεση πρακτική αξία όσον αφορά τις ενέργειες που πρέπει να ληφθούν για την διατήρηση της γενετικής ταυτότητας των φυσικών πληθυσμών της περιοχής.

Ο γενετικός χαρακτηρισμός της ποικιλίας Αγιάσου Λέσβου θα επιτρέψει την ανάπτυξη ελέγχων ταυτοποίησης και ιχνηλασιμότητας για το συγκεκριμένο υλικό.

Βιβλιογραφία

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

Beerli, P., Felsenstein, J., 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in *n* subpopulations by using a coalescent approach. *PNAS* 98, 4563–4568. <https://doi.org/10.1073/pnas.081068098>

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>

Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A.W., 1967. Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. *Evolution* 21, 550–570.

De Iorio, M., Griffiths, R.C., Leblois, R., Rousset, F., 2005. Stepwise mutation likelihood computation by sequential importance sampling in subdivided population models. *Theoretical Population Biology, John maynard smith memorial issue* 68, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2005.02.001>

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>
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Frankham, R., Briscoe, D.A., Ballou, J.D., 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge university press.
- 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>
- 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>
- Nei, M., 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia university press.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583–590. <https://doi.org/10.3390/ijms15010277>
- Petit, R.J., Aguinalde, 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>
- Piry, S., Luikart, G., Cornuet, J.-M., 1999. BOTTLENECK: A Computer Program for Detecting Recent Reductions in the Effective Population Size Using Allele Frequency Data. *The Journal of Heredity Ann Hum Genet* 90, 253–259.

- 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>
- Whitlock, M.C., 2011. G'ST and D do not replace FST. *Molecular Ecology* 20, 1083–1091. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04996.x>
- Whittaker, J.C., Harbord, R.M., Boxall, N., Mackay, I., Dawson, G., Sibly, R.M., 2003. Likelihood-Based Estimation of Microsatellite Mutation Rates. *Genetics* 164, 781–787.
- 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.