

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. Εκμεταλλεύεται τόσο για τους καρπούς της όσο και για την ξυλεία της και για αυτό το λόγο καλλιεργείται σε περιοχές πλέον της μεσογειακής ζώνης (Fernández-López and Alia, 2003).

Η εκτεταμένη καλλιέργεια και μεταφορά φυτογενετικού υλικού καστανιάς από τον άνθρωπο ήδη από την αρχαιότητα από τον έχει αφήσει το στίγμα της στην εξελικτική πορεία του 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 άριστων κλώνων. Αυτή η τάση παρατηρείται και στους καστανεώνες της χώρας μας οι οποίοι συνήθως δημιουργούνται με εμβόλια επιλεγμένων κλώνων. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι οι εγκαθεδρυμένες φυτείες να έχουν μικρά περιθώρια προσαρμογής σε περιβαλλοντικές διαταραχές, αλλά και βελτίωσης ως προς νέα γνώρισμα (Reed and Frankham, 2003). Ένα άλλο πρόβλημα που είναι δυνατόν να προκύψει από την καλλιέργεια καστανεώνων σε μια περιοχή είναι η πιθανότητα εισαγωγής ξένου γενετικού υλικού σε φυσικούς πληθυσμούς μέσω της ροής γονιδίων. Το υλικό αυτό δύναται να αυξήσει το γενετικό φορτίο των φυσικών συστάδων μειώνοντας έτσι την προσαρμοστικότητά τους. (Lefèvre, 2004; Olden et al., 2004)

Η ικανότητα των δασών καστανιάς να αναπαράγονται βλαστικά έχει επιτρέψει στον άνθρωπο να διαχειρίζεται αυτά τα οικοσυστήματα με μικρούς περίτροπους χρόνους. Ωστόσο στα πρεμνοφυή δάση παρεμποδίζεται η φυσική αναγέννηση άρα και η δράση της φυσικής επιλογής σε αυτό το εξελικτικό στάδιο. Επιπλέον τα πρεμνοφυή δάση αναμένεται να έχουν χαμηλότερο δραστικό μέγεθος πληθυσμού συγκρινόμενα με αντίστοιχα φυσικά δάση καστανιάς που αναπαράγονται εγγενώς (Mattioni et al., 2008). Τα παραπάνω στοιχεία συνηγορούν στο γεγονός ότι τα δάση αυτά έχουν εν δυνάμει μικρότερο δυναμικό προσαρμογής ή/και πιο αργό ρυθμό προσαρμογής σε περιπτώσεις ταχείας περιβαλλοντικής μεταβολής (Aravanopoulos and Drouzas, 2003).

Μελετητής με ισον

Η κατακερματισμένη εξάπλωση του είδους στη Μεσόγειο καθιστά απαραίτητη την μελέτη και προστασία των γενετικών αποθεμάτων απομονωμένων πληθυσμών, ώστε να μετριαστεί η αρνητική επίδραση της γενετικής εκτροπής

Σήμερα κρίνεται αναγκαία η μελέτη των ελλ πληθ

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.

## Σκοπός

Σκοποί της παρούσας πρότασης είναι:

1. Η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας και διαφοροποίησης δύο πληθυσμών καστανιάς (καστανιώνας - 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 καστανιόνα 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 οι παραδοχές που απαιτεί το Structure δεν ικανοποιούνται (π.χ. ανισορροπία Hardy-Weinberg).

## 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 φυτογενετικό υλικό.

## Βιβλιογραφία

- Aravanopoulos, F.A., Drouzas, A.D., 2003. Does forest management influence genetic diversity in chestnut (*Castanea Sativa* Mill.) Populations?, in: 11th Pan-Hellenic Forest Science Conference. Olympia, Greece, pp. 329–337.
- 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 (Ne) 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>
- Fernández-López, J., Alia, R., 2003. Castanea sativa - Technical guidelines for genetic conservation and use for chestnut.
- 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>
- Lefèvre, F., 2004. Human impacts on forest genetic resources in the temperate zone : An updated review 197, 257–271. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2004.05.017>
- Marinoni, D., Akkac, 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>
- Olden, J.D., LeRoy Poff, N., Douglas, M.R., Douglas, M.E., Fausch, K.D., 2004. Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.09.010>
- 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.
- 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*.
- Reed, D.H., Frankham, R., 2003. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology* 17, 230–237. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2003.01236.x>
- 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.