



**Mend
The
Gap**



GENETSKA DEMOGRAFIJA LJEKOVITE KADULJE: PUTOVANJE U PROŠLOST

Zlatko Šatović

Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet

Znanstveni centar izvrsnosti

za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (CroP-BioDiv)

e-mail: zsatovic@agr.hr

Zagreb, 20. rujna 2018.

PLAN

- (1) Ljekovita kadulja (*Salvia officinalis* L.)
- (2) Genetska raznolikost populacija
- (3) Genetske struktura
- (4) Modeliranje ekoloških niša
- (5) Analiza evolucijske povijesti

PLAN

- (1) Ljekovita kadulja (*Salvia officinalis* L.)
- (2) Genetska raznolikost populacija
- (3) Genetske struktura
- (4) Modeliranje ekoloških niša
- (5) Analiza evolucijske povijesti

(1) LJEKOVITA KADULJA

- vrsta:

Ljekovita kadulja (*Salvia officinalis* L.)

- višegodišnja, stranooplodna biljna vrsta
- eterično ulje: cis- i trans-tujon, kamfor
- raznolikost kemitipova

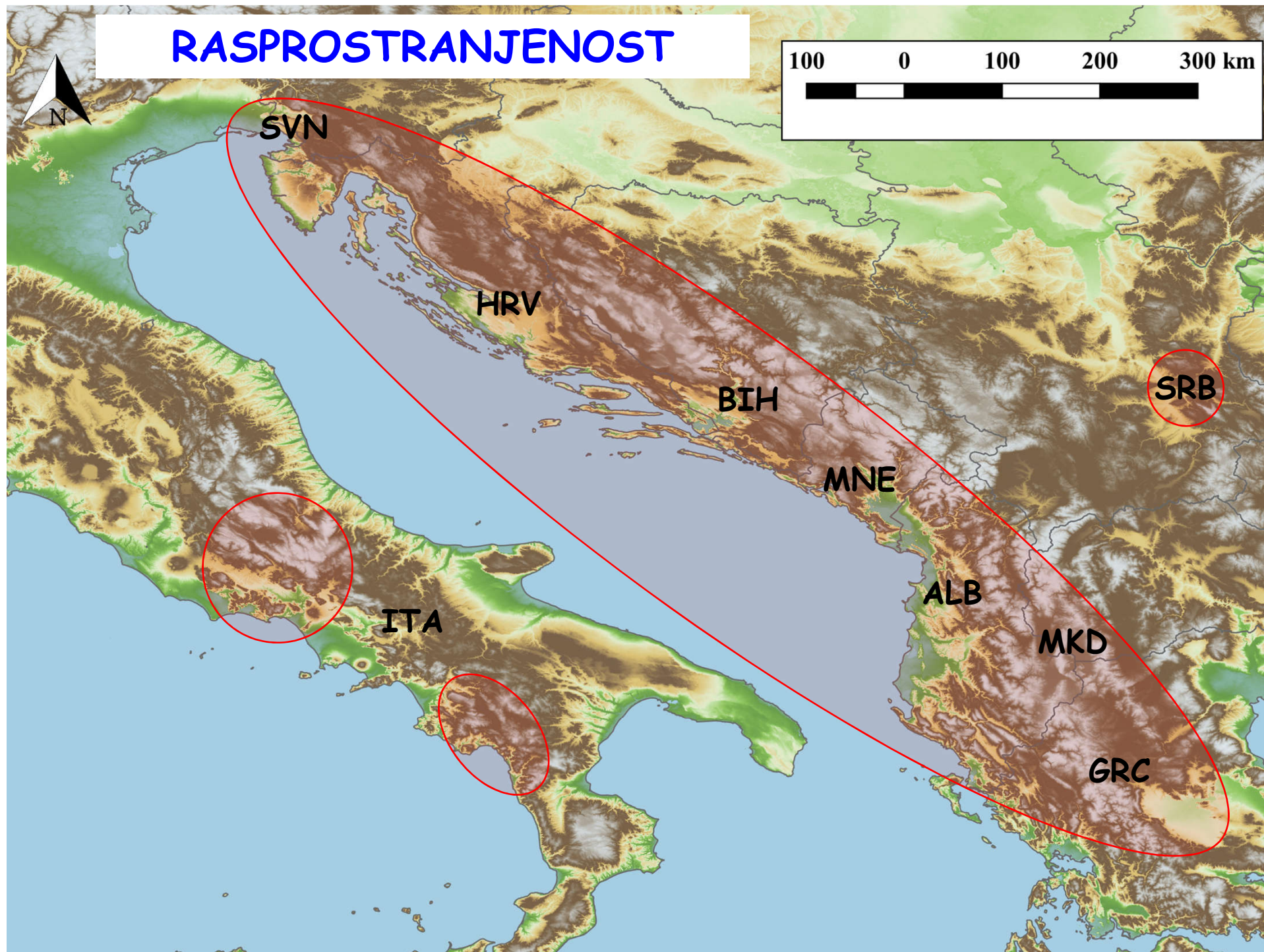
- rasprostranjenost

obalno područje zapadnog Balkana
središnji i južni Apenini

- uzgoj: Sredozemlje, Balkan, Njemačka, SAD, Australija
- prikupljanje u prirodi: Albanija, BiH, Hrvatska
 - negativan utjecaj na bioraznolikost
- naturalizirane (feralne) populacije: Sredozemlje, Balkan
 - biljke koje su pobjegle iz uzgoja

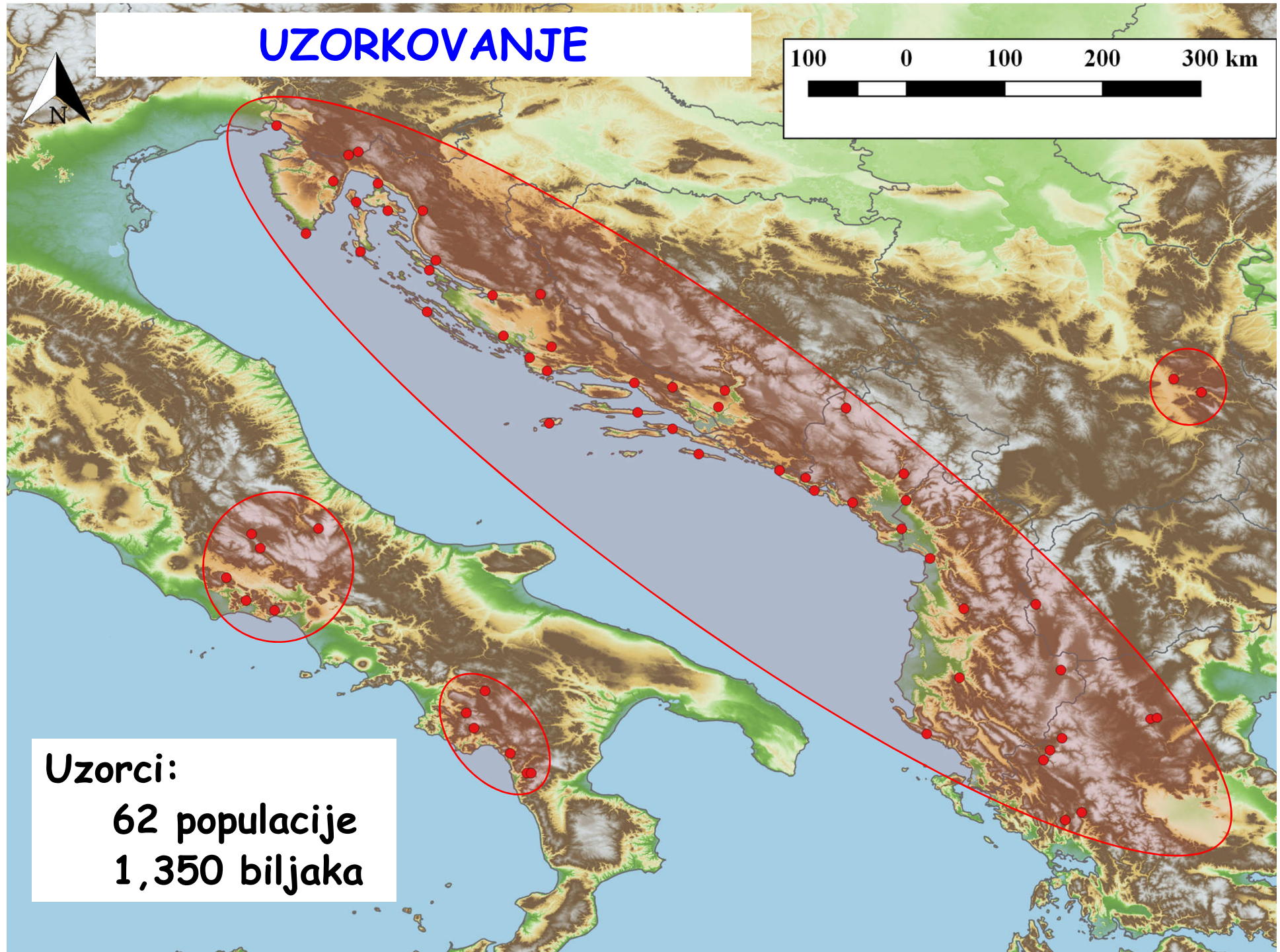


RASPROSTRANJENOST



UZORKOVANJE

100 0 100 200 300 km



Uzorci:
62 populacije
1,350 biljaka



Komiža, otok Vis



Velji Do, Cavtat



KRATKOZUPČASTA KADULJA

- *Salvia brachyodon*
- tri poznata lokaliteta:
 1. Sv. Ilija, Pelješac, HRV
 2. Velji Do, Cavtat, HRV
 - otkriven 2013.
 3. Planina Orjen, BiH/MNE
- razmnažanje
 - generativno (sjeme)
 - vegetativno (vriježe)



UŠKASTA KADULJA

- *S. x auriculata*
- hibridna vrsta:
ljekovita kadulja
(*S. officinalis*)
x
grčka kadulja
(*S. fruticosa*)

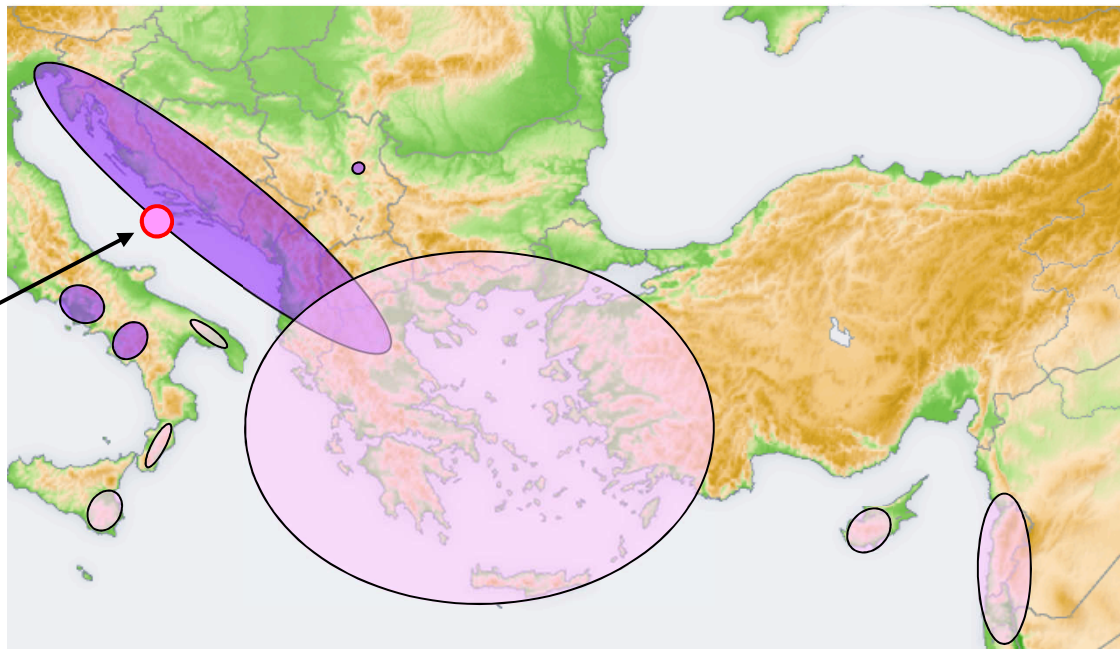


S. officinalis

S. x auriculata

S. fruticosa

- umjetno križanje:
u Izraelu
'Newe Ya'ar No.4'
(Dudai et al., 1999)
- prirodni hibridi:
Komiža, otok Vis



Sićevačka klisura



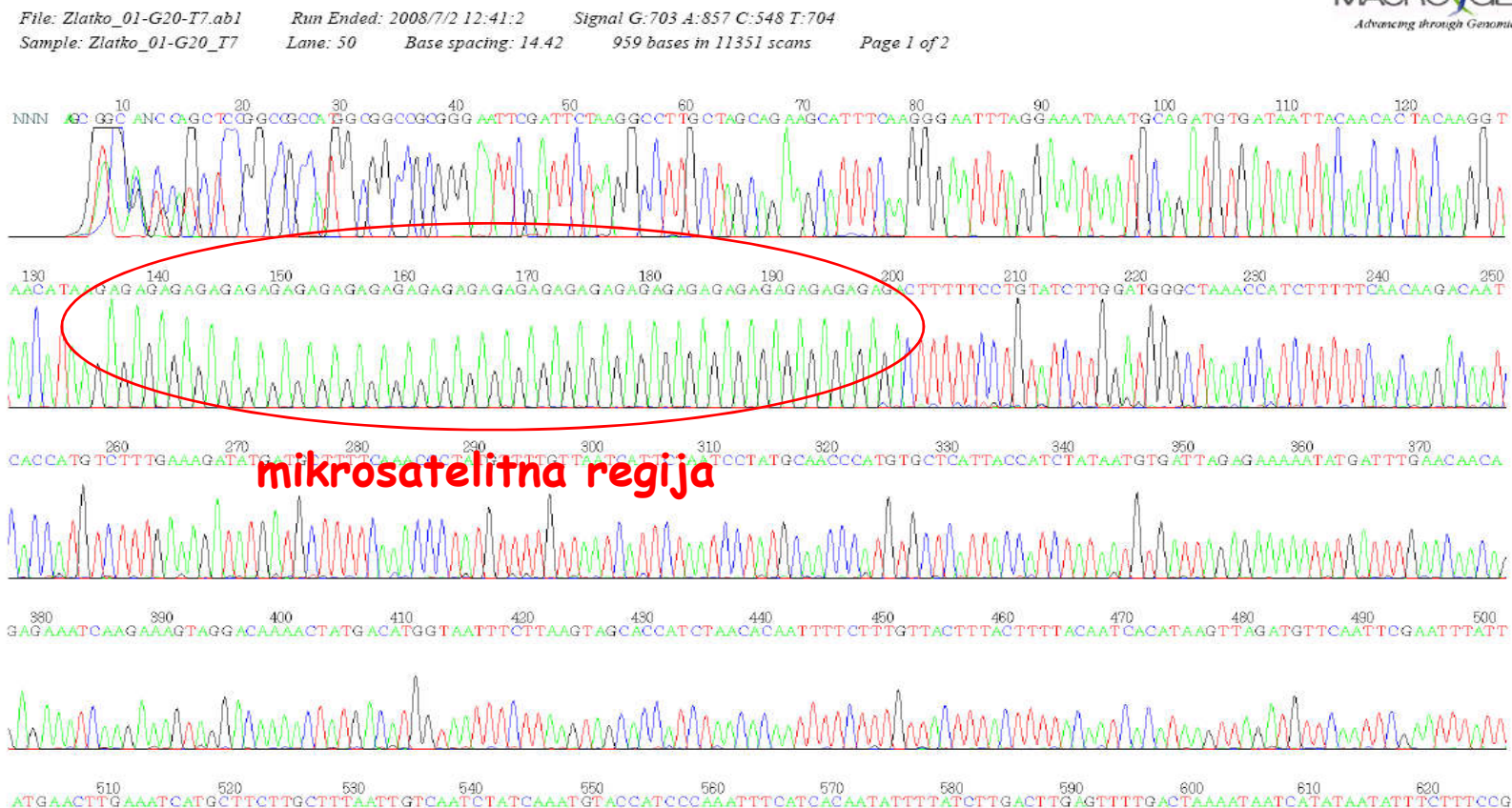
MIKROSATELITNI BILJEZI

- upotreba para oligonukleotidnih početnica (**primers**) komplementarnima sekvencama DNA koje omeđuju ponavljajuću regiju



- početnice su specifične za vrstu (ili skupinu srodnih vrsta)
- ukoliko ne postoje opisane mikrosatelitne početnice za određenu vrstu biljezi se moraju izolirati iz genomnih knjižnica (**genomic library**):
 1. detekcija ulomaka koji sadrže ponavljajuću regiju (**microsatellite-enriched genomic library**)
 2. sekvenciranje ulomaka
 3. izrada specifičnih početnica

MACROGEN
Advancing through Genomics



BAZA PODATAKA NUKLEOTIDNIH SEKVENCI



Mrežna adresa:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

The National Center for
Biotechnology Information
- održava brojne baze podataka

GenBank

- baza podataka sekvenci DNA
- omogućava pohranjivanje i pretraživanje sekvenci
- slobodno dostupna (sekvence se mogu slobodno koristiti u istraživanjima)

Salvia officinalis microsatellite SoUZ001 sequence

GenBank: GQ376512.1

LOCUS GQ376512 782 bp DNA linear PLN 20-DEC-2009

DEFINITION *Salvia officinalis* microsatellite SoUZ001 sequence.

SOURCE *Salvia officinalis* (garden sage)

ORGANISM *Salvia officinalis*

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
asterids; lamiids; Lamiales; Lamiaceae; Nepetoideae; Mentheae;
Salvia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 782)

AUTHORS Radosavljevic,I., Jakse,J., Javornik,B., Satovic,Z. and Liber,Z.

TITLE Isolation and characterization of polymorphic microsatellites loci
from common sage (*Salvia officinalis* L.; Lamiaceae)

JOURNAL Mol Ecol Resour (2010)

ORIGIN

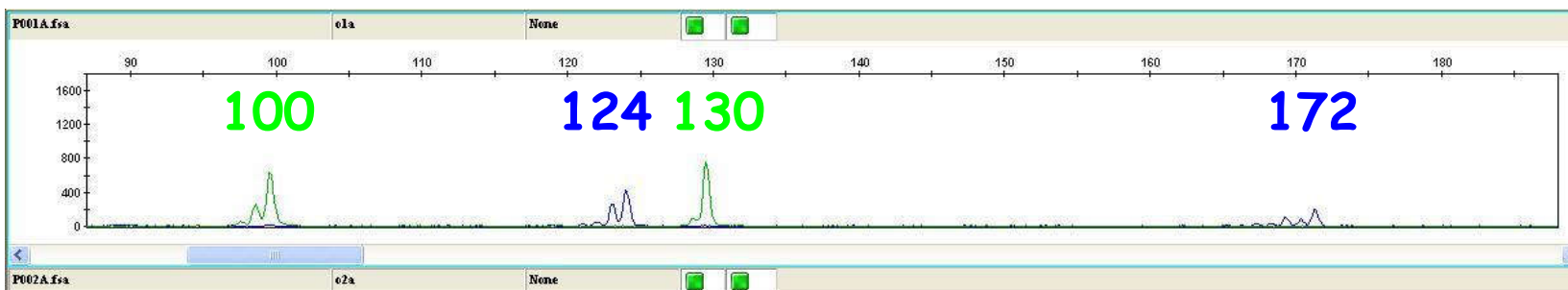
```
1  tgttcagtca acgtagatt ataaatagac tatttttta tgattttaca ctaaaaaaac
61  cccaaaatgt tagttacctt aattatattg aaagcaccgt tggatcagat ttatacatt
121  cegtttttac caaaactaaa tcaacacgga aaaagaaaag caaatatata tgtatgaata
181  tatagttgaa ccaaactgac taaatcttaa ggggcgcata attttcaaag caaccacacc
241  aaatcaccac ccaaaaacgg aagaaatttg aacaataatt ctacaaatcc tgaccgccca
301  tcatgccacg tgtagagegc ctcaacgaga aaaatagaaa gttgccgtca gcgtgacgcc
361  accgtggate ccaccaaca acttcagttg ggteccaca acccactctt ttacatcgct
421  caccaacegc ggcecgccc ggccaacca tctcaccca cccaacggat ggaccactc
481  caccggtccg aaccggacca gagtctaact ataatcagc ctccatttct cacttcaaa
541  atcagcaaac gcatttccc acaacaaca gagagagaga gagagagaga gagagagaga
601  tttgcagaa ccagtaaagc gagagagaag agagatggcg caagcaacag aaaaccagag
661  caggcatcag gaggttgggc acaagagtct ttgcaaagt gatgacctct accaggtatg
721  cgtcataaat gcattcttcc taatttgca acaatttc caatttatc atattccaa
781  ca
```

//

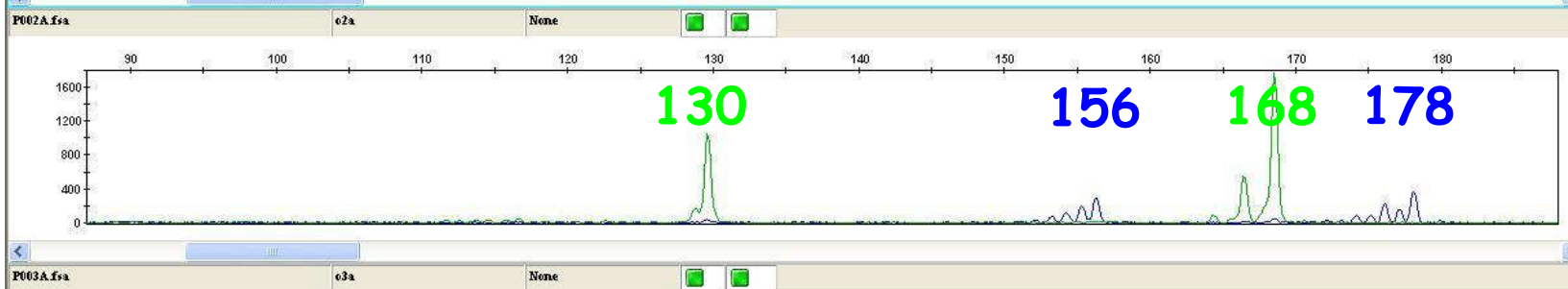
OČITAVANJE POLIMORFIZAMA

Jedinke Biljezi SSR

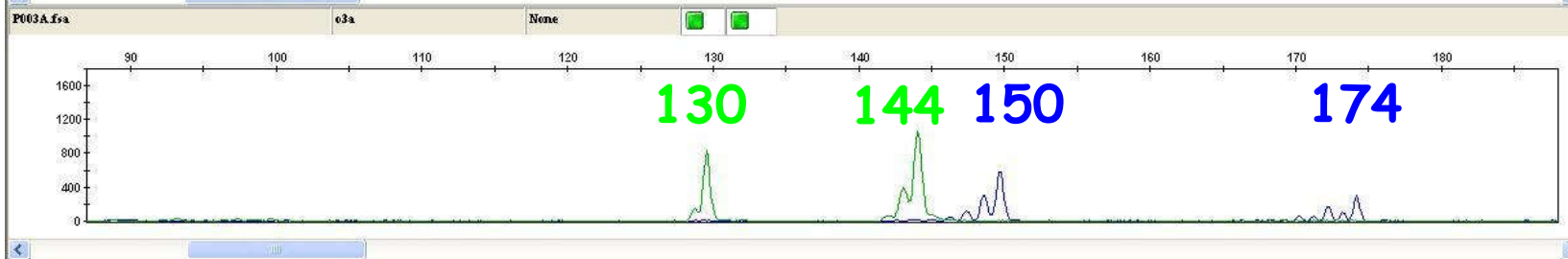
S1



S2



S3



Matrica podataka:

Jedinke

Biljezi

S1

S2

S3

M1

M2

100	130	130	168	130	144
124	172	156	178	150	174

PODACI

Populacija	Jedinka	SoUZ001	SoUZ001	SoUZ002	SoUZ002	...	SoUZ019	SoUZ019
P01	S0001	173	189	183	185		134	150
P01	S0002	165	199	185	185		150	153
P01	S0003	183	185	195	197		150	159
P01	S0004	163	187	189	195		150	150
P01	S0005	165	167	187	195		134	150
P01	S0006	165	183	185	187		134	156
P01	S0007	173	183	185	195		150	159
P01	S0008	165	167	183	195		134	134
P01	S0009	165	171	181	183		147	150
P01	S0010	165	173	195	201		150	159
...								
P62	S1350	161	165	185	195		134	150

INFORMATIVNOST BILJEGA

Biljeg	Ponavljajući motiv	Raspon (pb)	N_a	PIC
SoUZ001	(AG) ₁₅	141-221	41	0.954
SoUZ002	(TG) ₁₁	133-217	23	0.818
SoUZ003	(GT) ₁₃	160-212	22	0.766
SoUZ007	(GT) ₁₁	138-210	13	0.654
SoUZ011	(GA) ₂₅	150-214	30	0.945
SoUZ013	(AAC) ₈	173-218	15	0.836
SoUZ014	(AGA) ₁₀	175-241	22	0.891
SoUZ019	(AGA) ₁₆	132-204	25	0.827
Prosjek			23.88	0.836
Ukupno			191	

- N_a - broj alela
- PIC - informacijski sadržaj polimorfizma

PLAN

(1) Ljekovita kadulja (*Salvia officinalis* L.)

(2) Genetska raznolikost populacija

(3) Genetske struktura

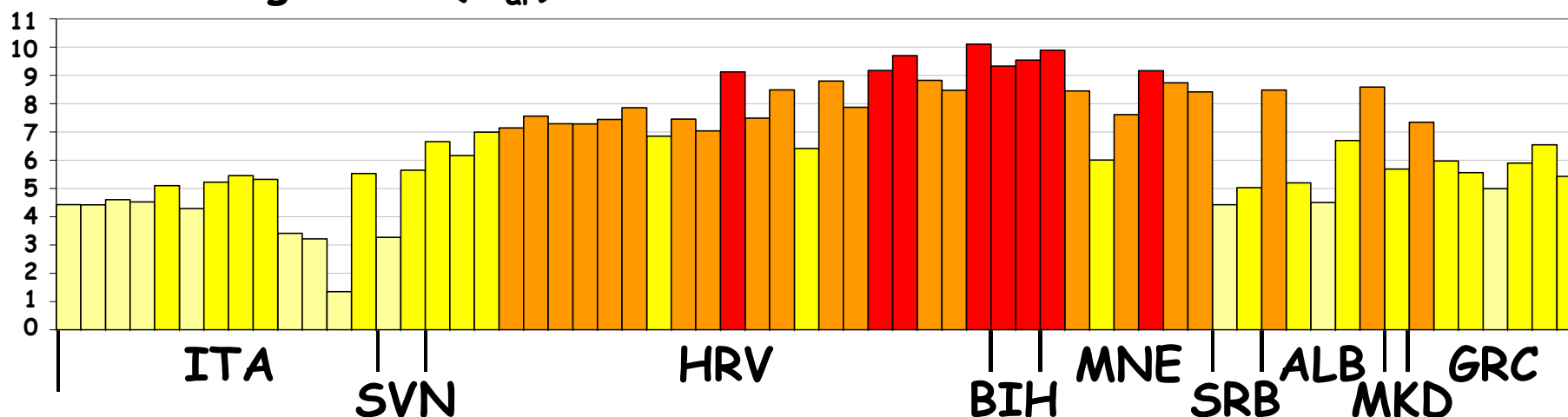
(4) Modeliranje ekoloških niša

(5) Analiza evolucijske povijesti

(2) GENETSKA RAZNOLIKOST POPULACIJA

Parametar	Prosjek	Raspon
Broj alela (N_a)	7.242	1.38-11.48
Alelna bogatstvo (N_{ar})	6.669	1.35-10.11
Zapažena heterozigotnost (H_o)	0.665	0.081-0.832
Očekivana heterozigotnost (H_E)	0.683	0.087-0.846

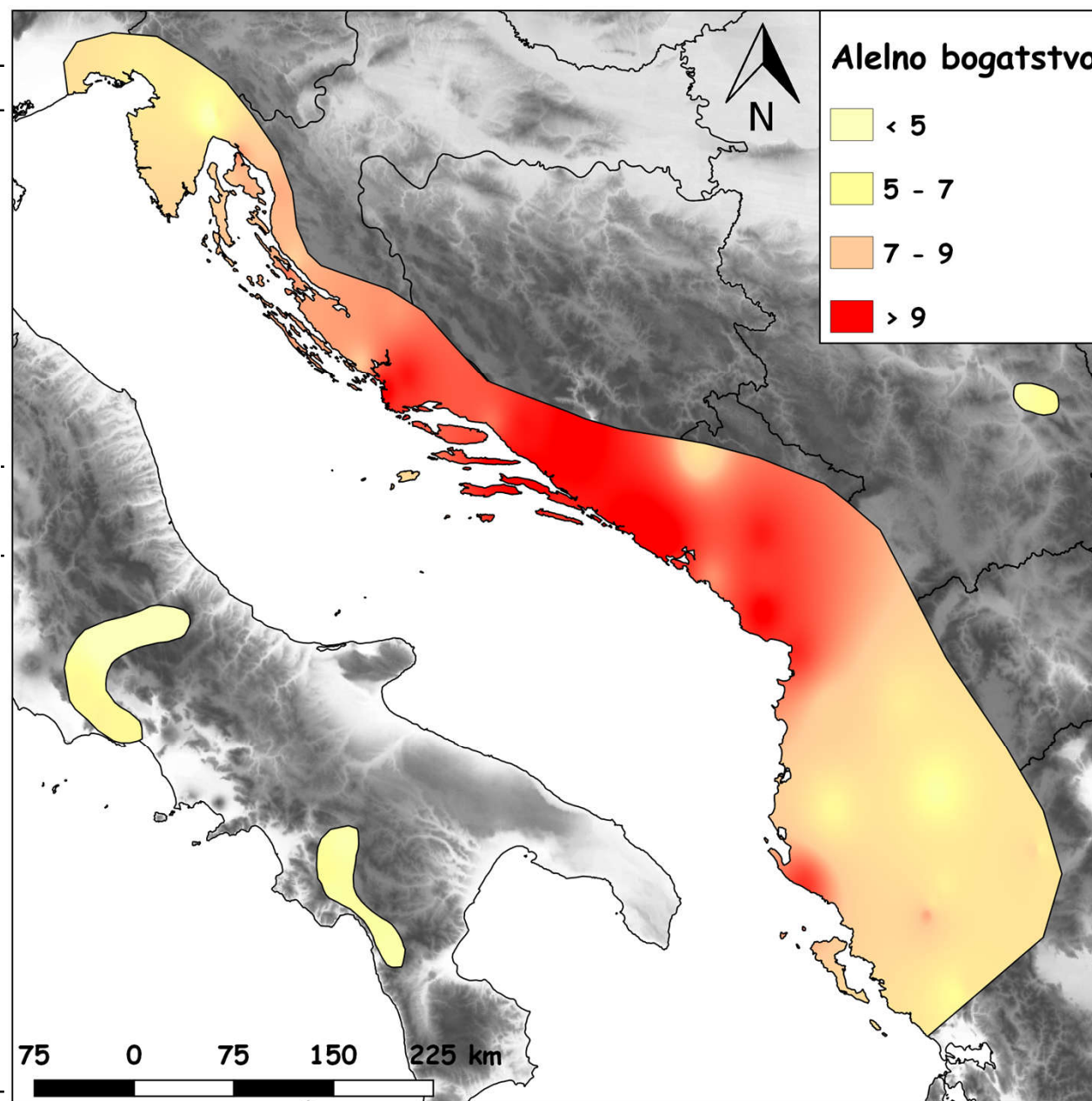
Alelna bogatstvo (N_{ar})



ALELNO BOGATSTVO

■ $N_{ar} > 9$		
Br.	Populacija	Država
P38	Konavle	HRV
P41	Vrbanj	MNE
P35	Pelješac	HRV
P40	Mostar	BIH
P39	Međugorje	BIH
P34	Hvar	HRV
P45	Rumija	MNE
P28	Šparadići	HRV

■ $N_{ar} < 5$		
P59	Arta	GRC
P03	Maratea	ITA
P04	Cilento	ITA
P52	Prespa	ALB
P01	Pollino 2	ITA
P48	Miljkovac	SRB
P02	Pollino 1	ITA
P06	Savoia	ITA
P10	d'Antino	ITA
P14	Novokračine	SVN
P11	M. Salviano	ITA
P12	Maiella	ITA



PLAN

- (1) Ljekovita kadulja (*Salvia officinalis* L.)
- (2) Genetska raznolikost populacija
- (3) Genetske struktura**
- (4) Modeliranje ekoloških niša**
- (5) Analiza evolucijske povijesti**

(3) GENETSKA STRUKTURA

Metoda:

Bayesovska analiza genetske strukture
(Bayesian model-based clustering method)

Software:

STRUCTURE (Pritchard et al., 2000)

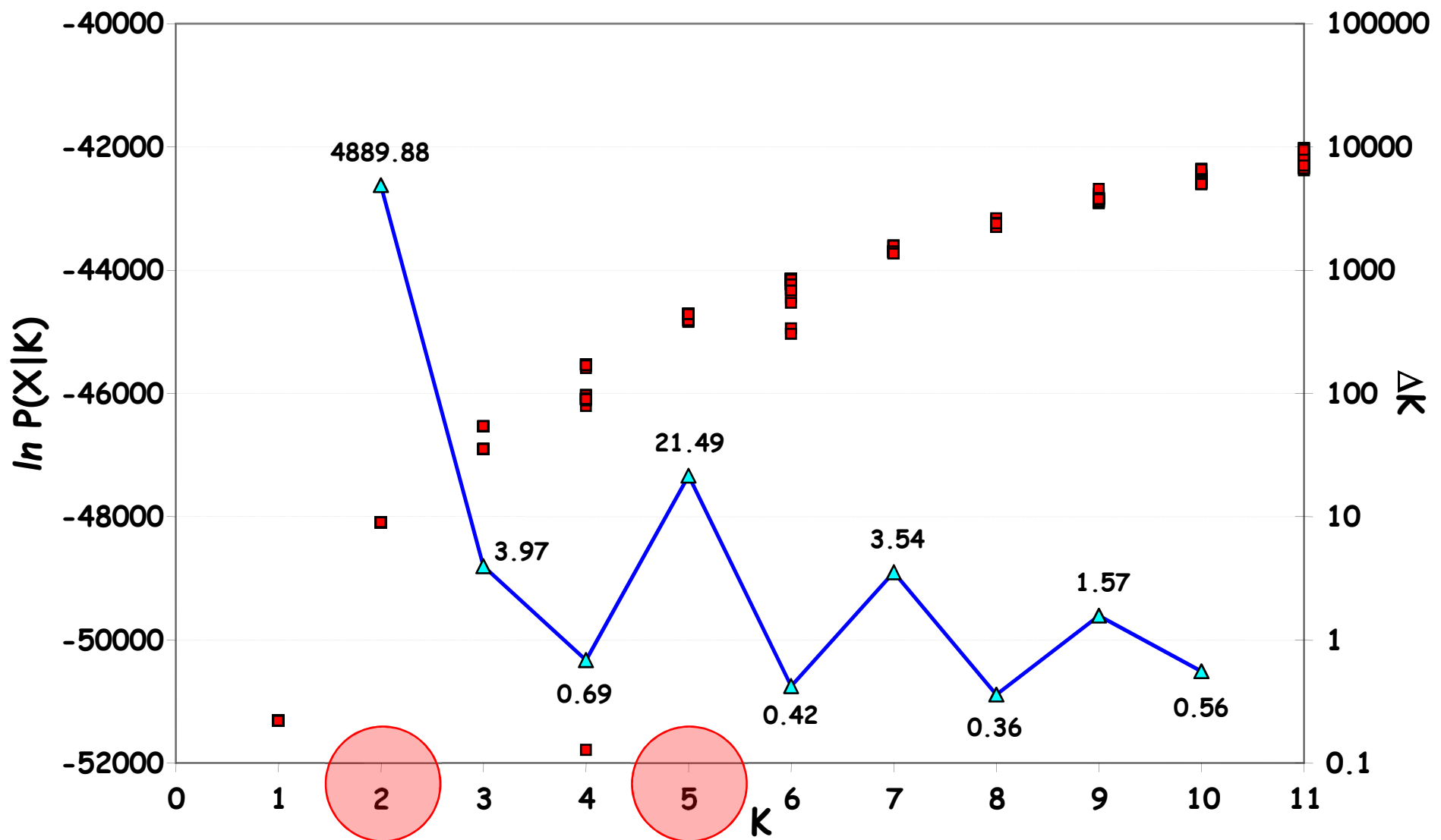
Pretpostavka:

- u analiziranom uzorku postoje jedinke koje pripadaju različitim genetskim skupinama sa svojstvenim alelnim učestalostima

Cilj:

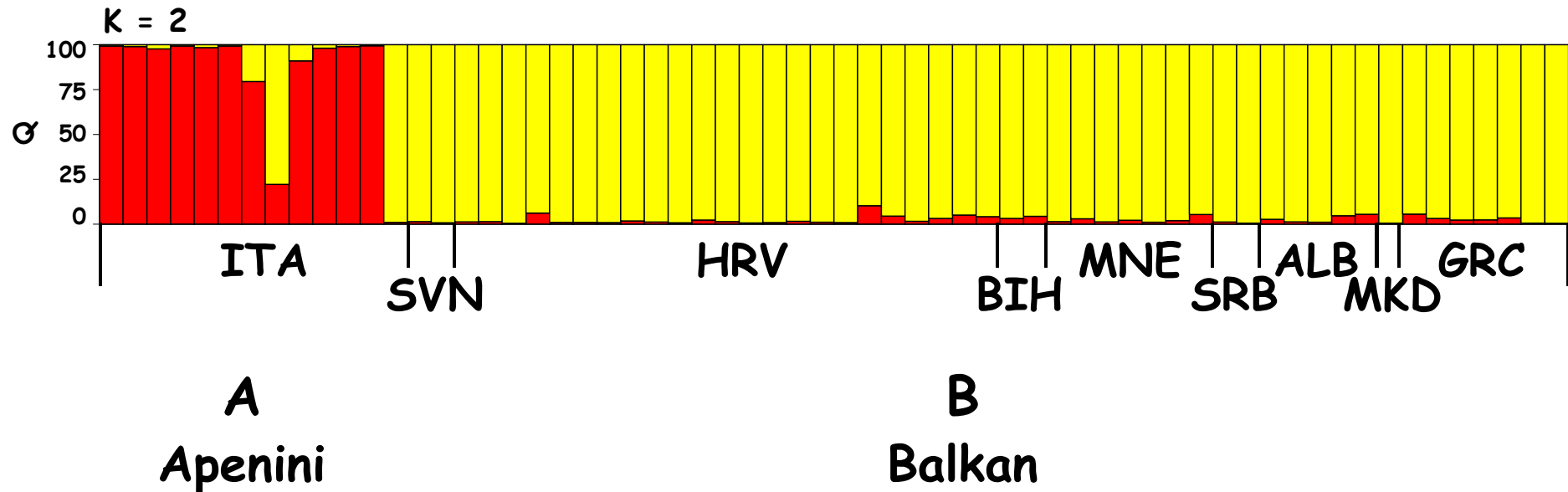
- svrstati jedinke u skupine na takav način da je unutar svake skupine maksimalizirana
 - (A) Hardy-Weinbergova ravnoteža (HWE)
 - (B) ravnoteža vezanosti gena (linkage equilibrium)

BROJ GENETSKIH SKUPINA: $\ln P(X|K)$ i ΔK



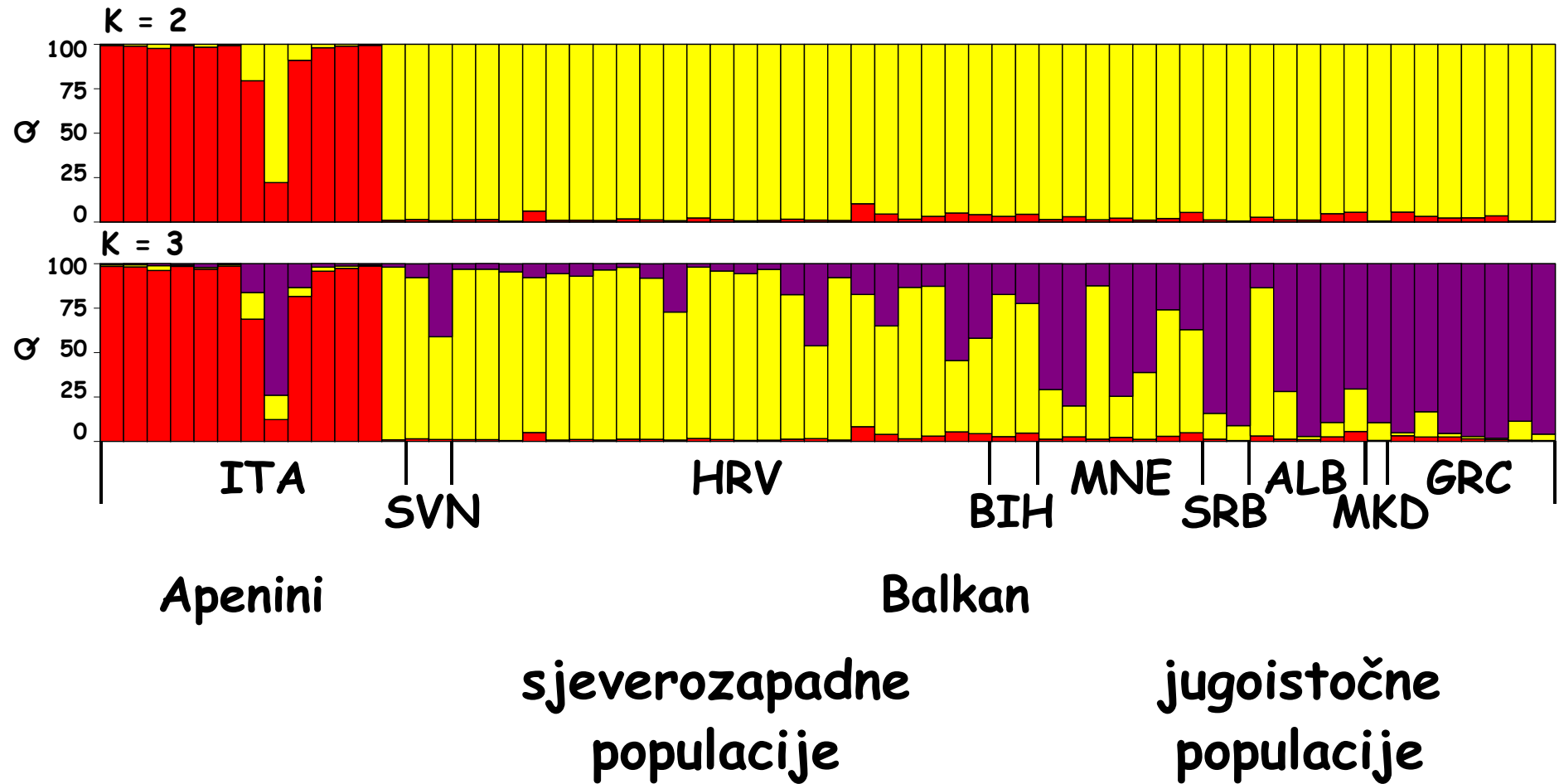
- $\ln P(X|K)$: vjerodostojnost (posteriorna vjerojatnost; 30 prohoda za svaki K)
- ▲ ΔK : stopa promjene vjerodostojnosti između uzastopnih vrijednosti K

$K = 2$

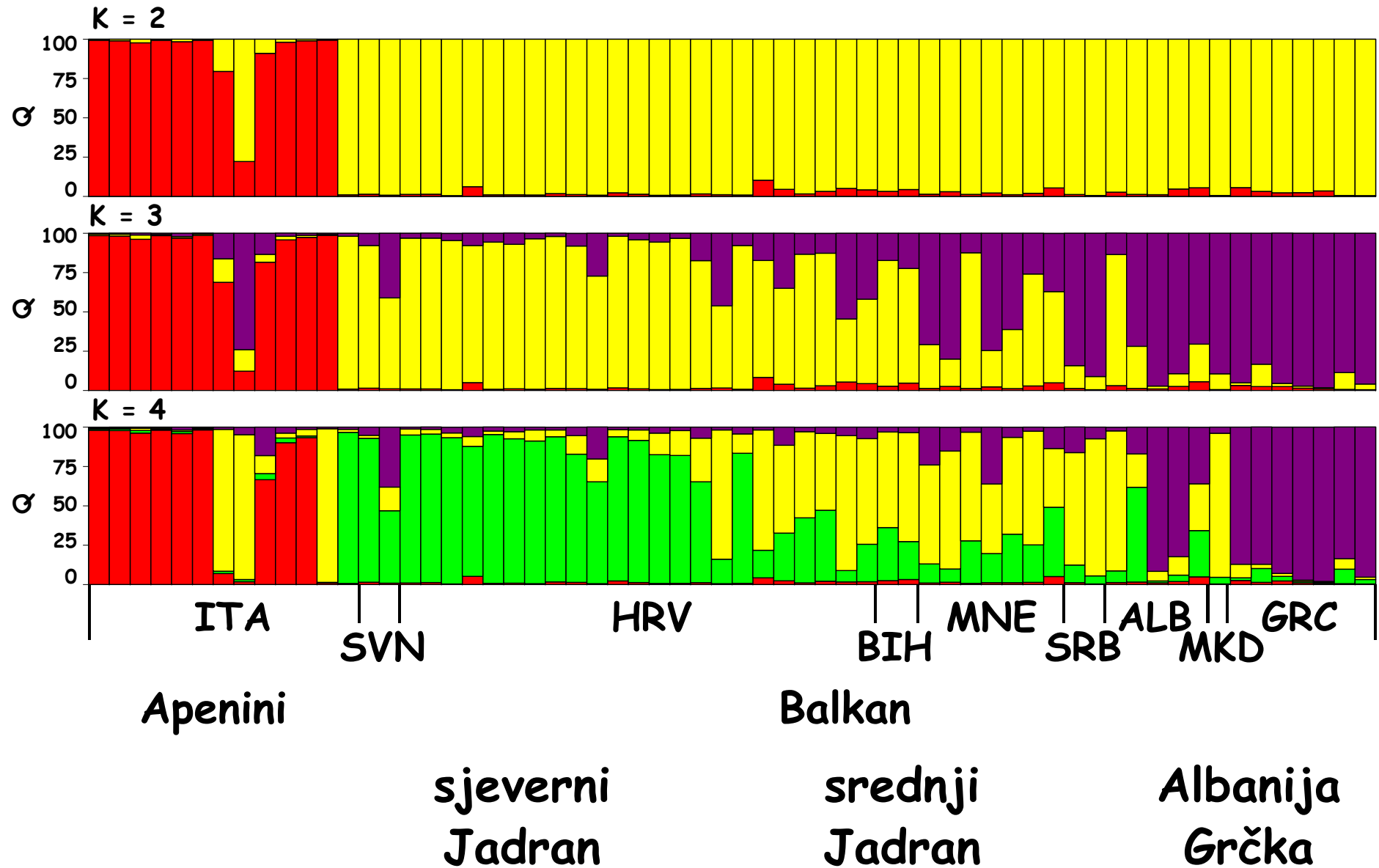


- izračun % genoma (Q) svake jedinke koji potječe iz određenog genetske skupine (izvorne populacije)
- svaka je populacija predstavljena stupcem, a boja odgovara prosječnom % genoma jedinki u uzorkovanoj populaciji koji potječe iz određene genetske skupine (izvorne populacije)

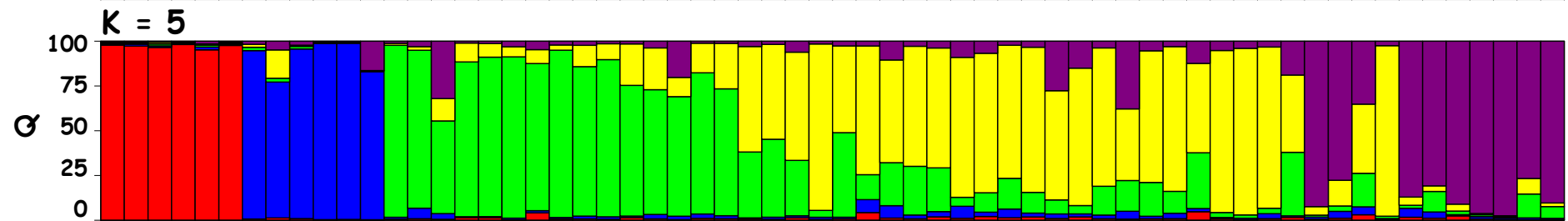
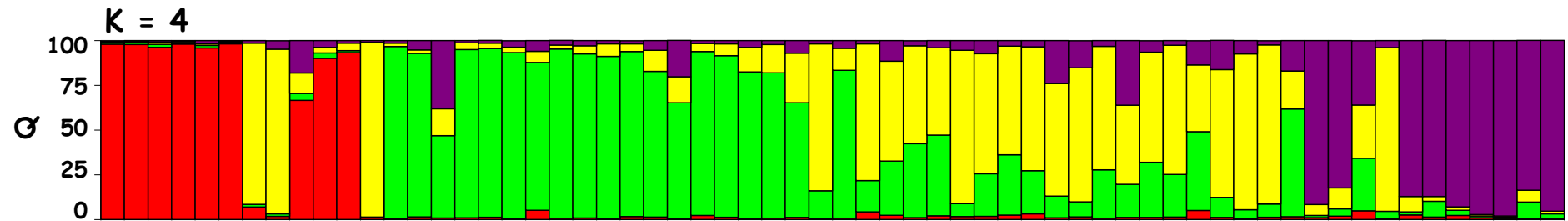
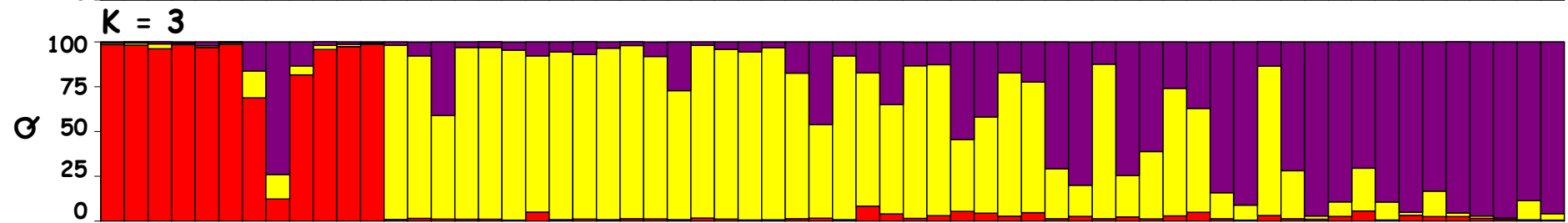
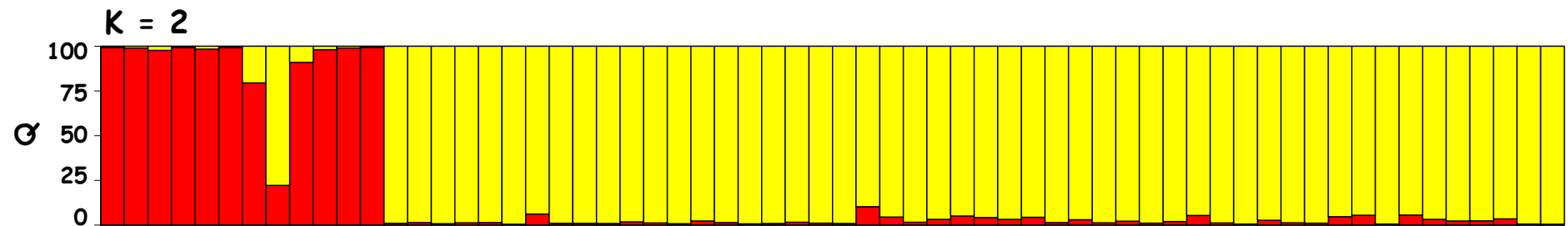
$K = 3$



$K = 4$



$K = 5$



A B

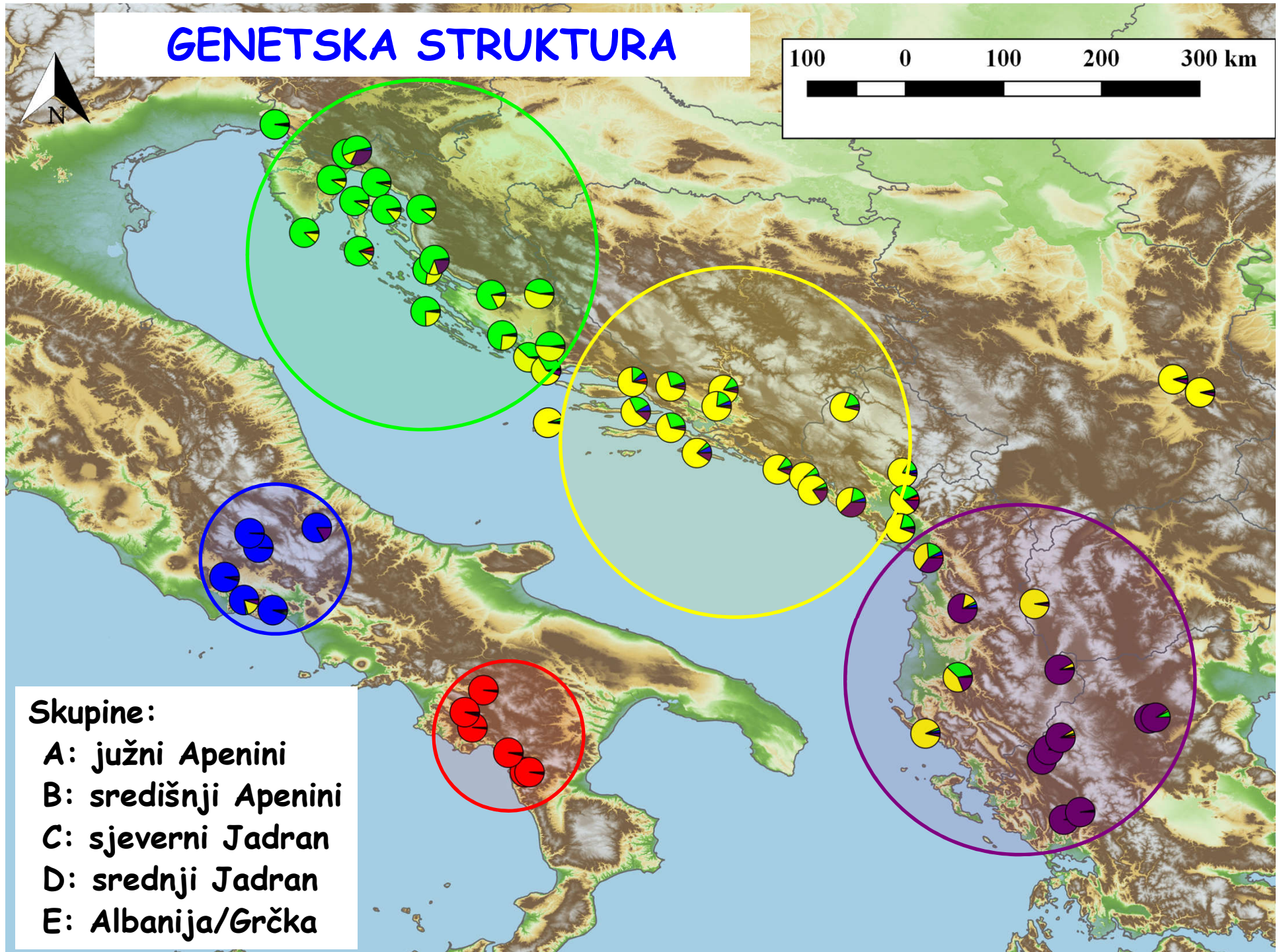
C

D

E

GENETSKA STRUKTURA

100 0 100 200 300 km



Skupine:

A: južni Apenini

B: središnji Apenini

C: sjeverni Jadran

D: srednji Jadran

E: Albanija/Grčka

RAZNOLIKOST GENETSKIH SKUPINA

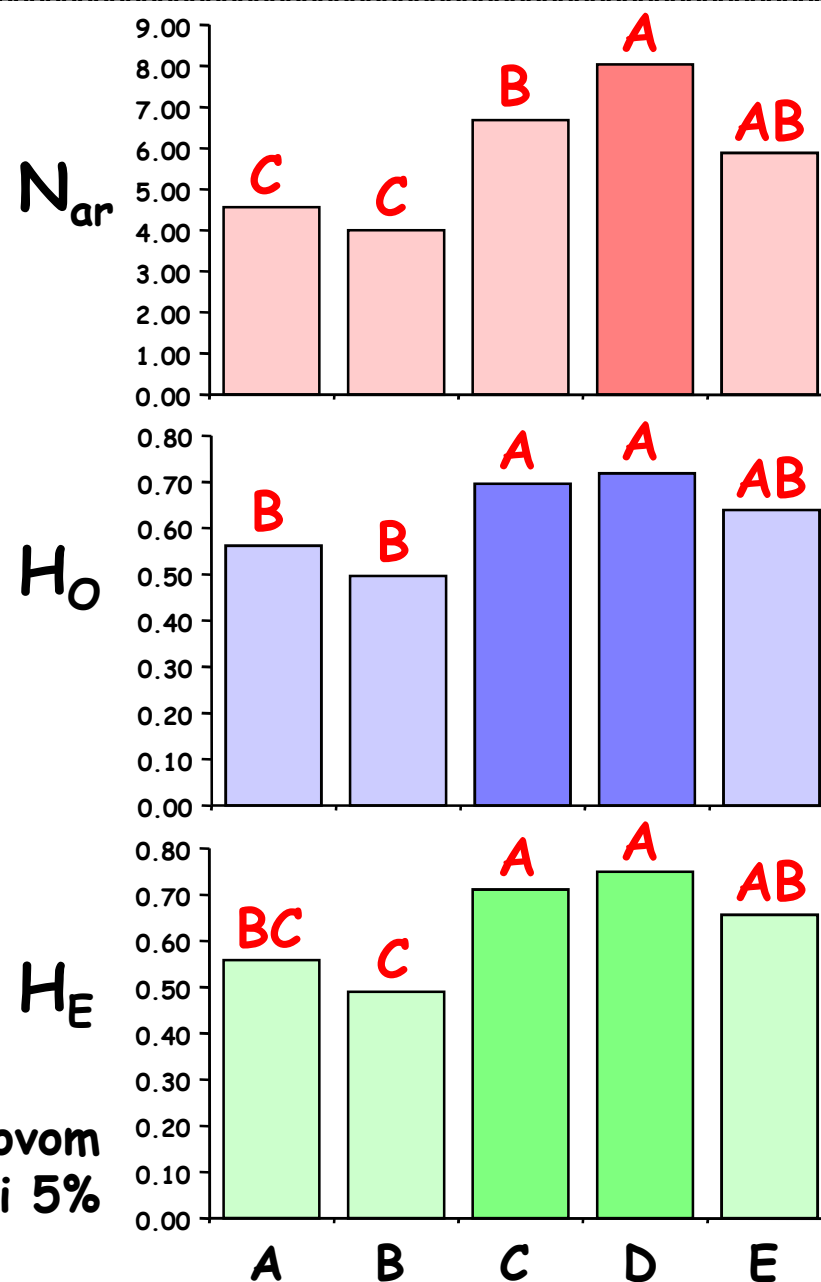
Cluster	No. populations	N_{pr}
A Južni Apenini	6	6
B Središnji Apenini	6	0
C Sjeverni Jadran	15	2
D Središnji Jadran	26	26
E Albanija/Grčka	9	9

N_{pr} - broj jedinstvenih alela

N_{ar} - alelno bogatstvo

H_O - zapažena heterozigotnost

H_E - očekivana heterozigotnost



Vrijednosti označene istim slovom
signifikantno se ne razlikuju na razini 5%

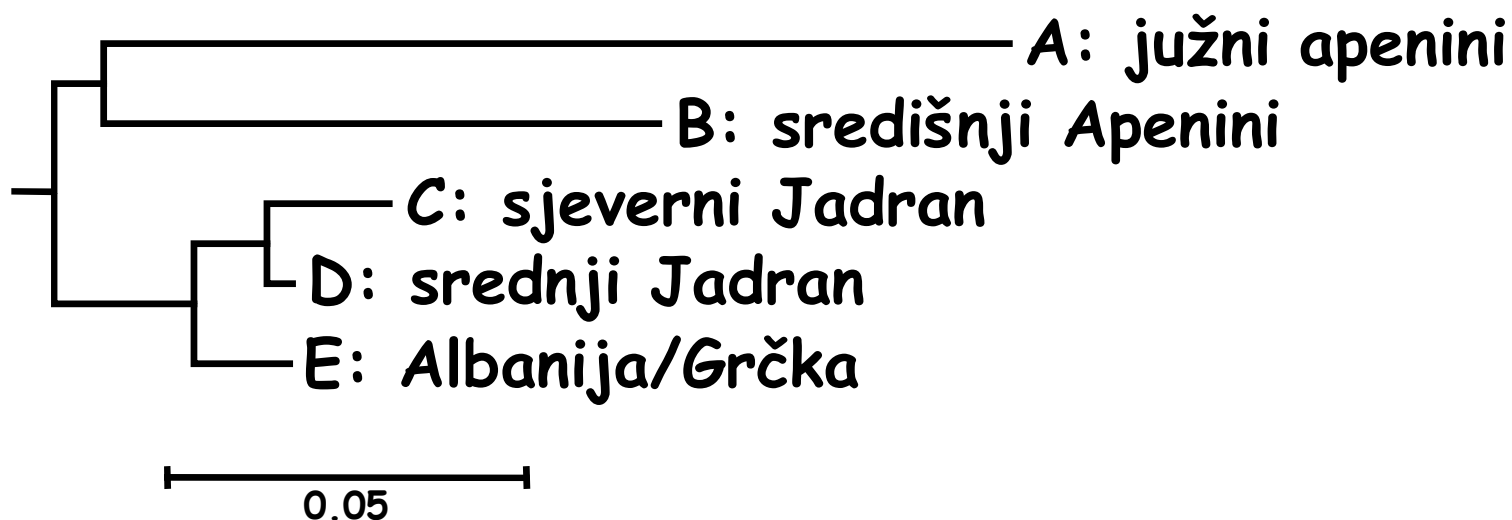
GENETSKI ODNOSI IZMEĐU SKUPINA

Mjerilo udaljenosti:

Nukleotidna udaljenost (**net nucleotide distance**)

Izrada stabla:

Metoda sparivanja susjeda (**Neighbor-Joining method**)



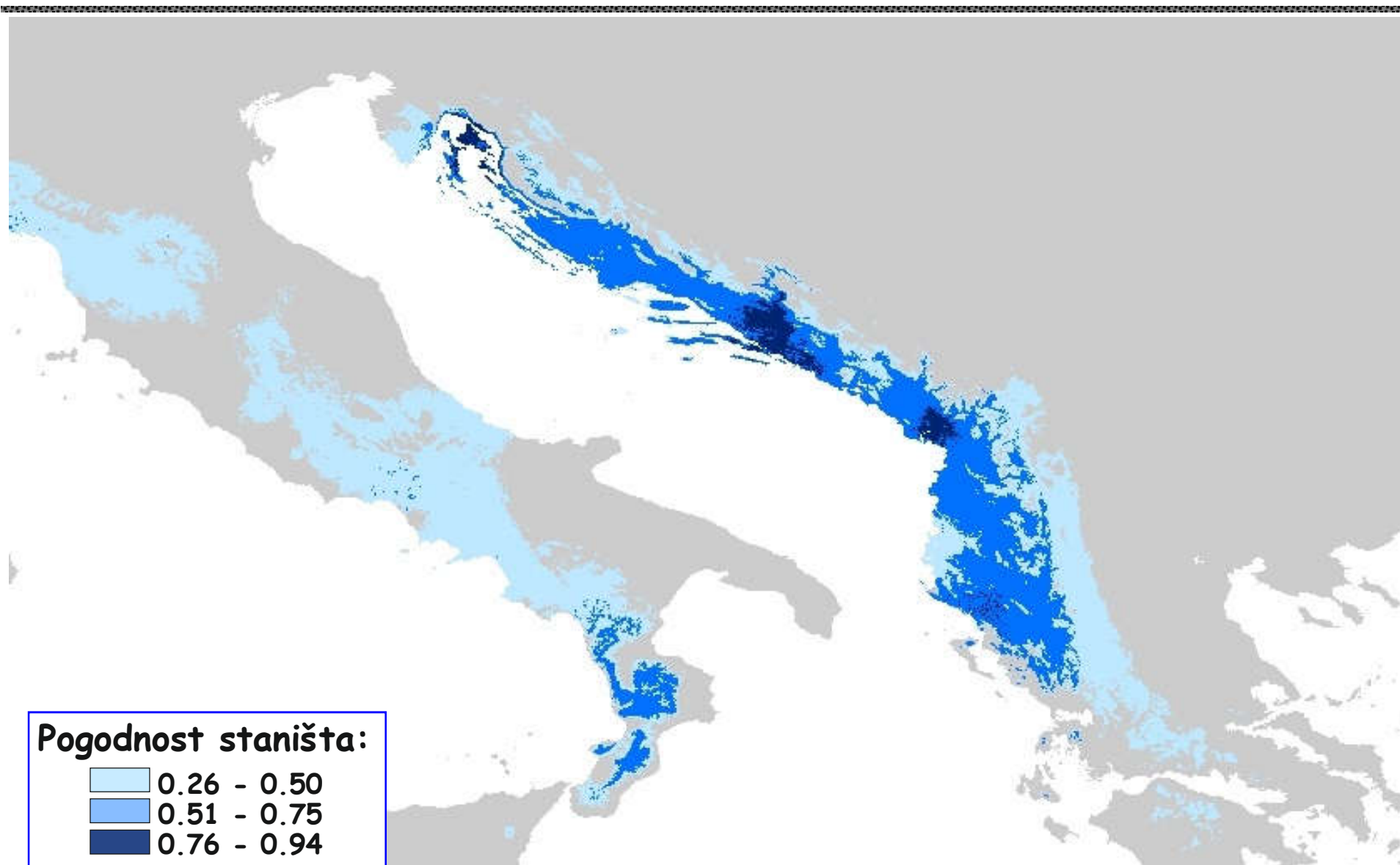
PLAN

- (1) Ljekovita kadulja (*Salvia officinalis* L.)
- (2) Genetska raznolikost populacija
- (3) Genetske struktura
- (4) Modeliranje ekoloških niša**
- (5) Analiza evolucijske povijesti**

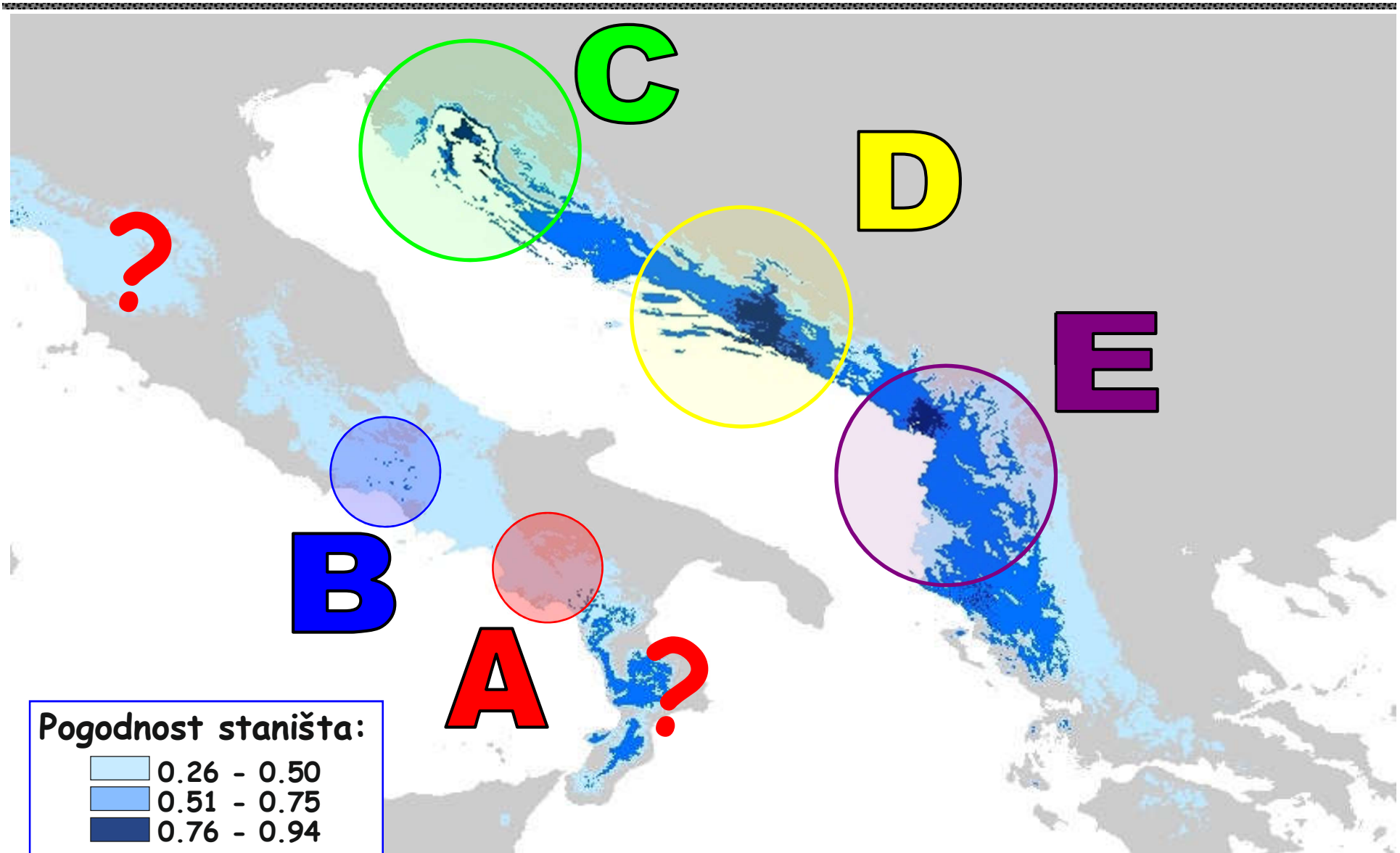
(4) MODELIRANJE EKOLOŠKIH NIŠA

- Modeliranje ekoloških niša
(Ecological Niche Modelling; ENM)
- Modeliranje rasprostranjenosti vrsta
(Species Distribution Modelling; SDM)
 - procijeniti odnos između rasprostranjenosti vrste po određenim nalazištima i okolišnih uvjeta tih nalazišta
 - procijeniti pogodnost staništa za vrstu
 - izraditi model rasprostranjenosti vrste
(= utvrditi povoljno stanište za vrstu)
- ulazni podaci:
 - (1) zemljopisna rasprostranjenost
90 podataka o rasprostranjenosti
 - (2) okolišni uvjeti nalazišta
19 bioklimatskih parametara (WorldClim database)
 - 11 temperaturnih- i 8 oborinskih parametara
 - predstavljaju godišnja kretanja, sezonske promjene, te temperaturne i oborinske ekstreme

POGODNOST STANIŠTA: SADAŠNJOST



POGODNOST STANIŠTA: SADAŠNJOST



POGODNOST STANIŠTA: EDAFSKA SVOJSTVA

Soil Atlas of Europe

Klasifikacija: The World Reference Base for Soil Resources (WBR)

(1) Balkan

■ Leptosol

Plitka tla
na vapnencu
- kamenjar
- rendzina
- ranker

(2) Apennines

■ Kambisol

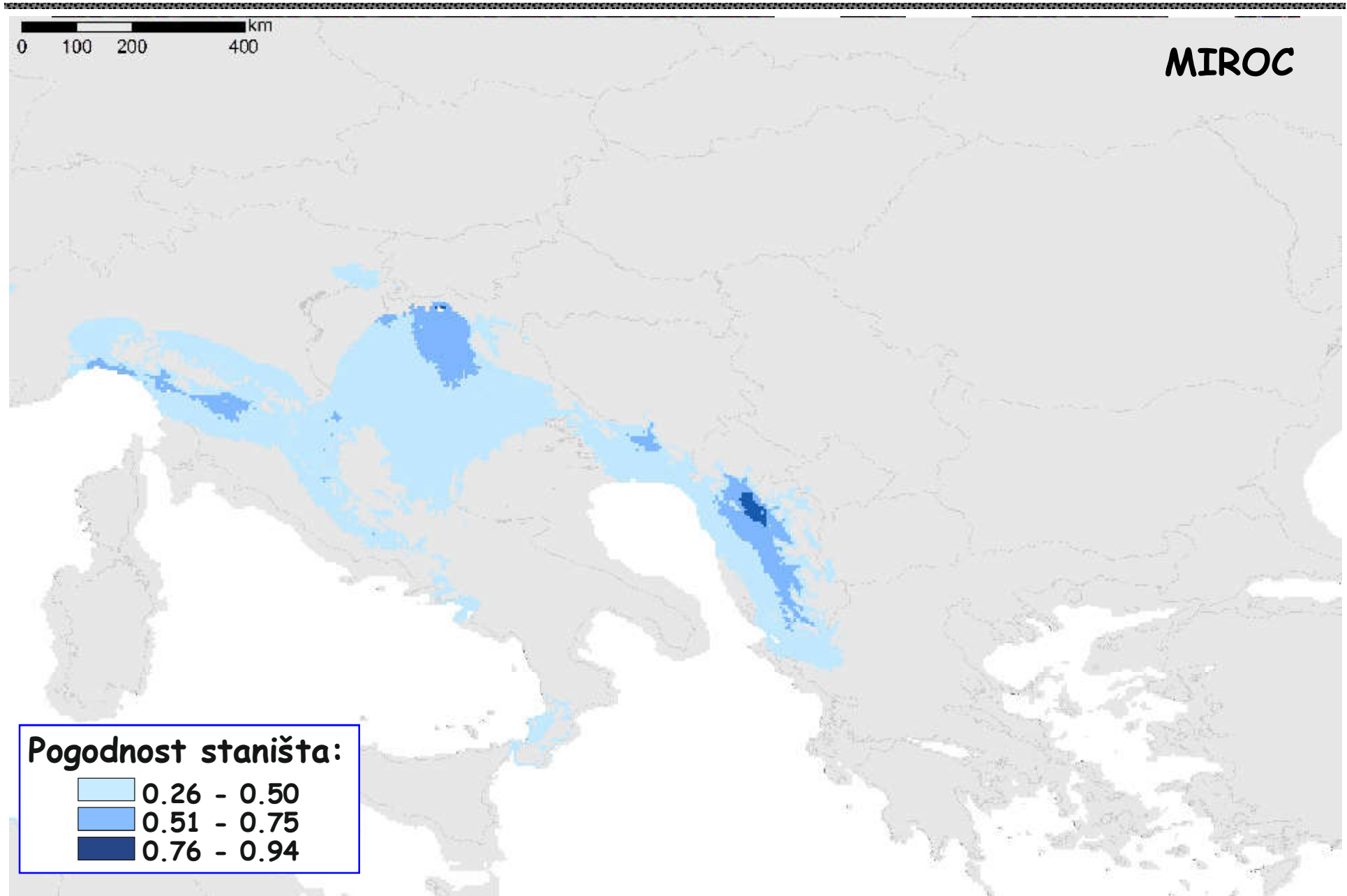
Slabo do srednje
razvijena tla
- smeđa tla
- crvenica



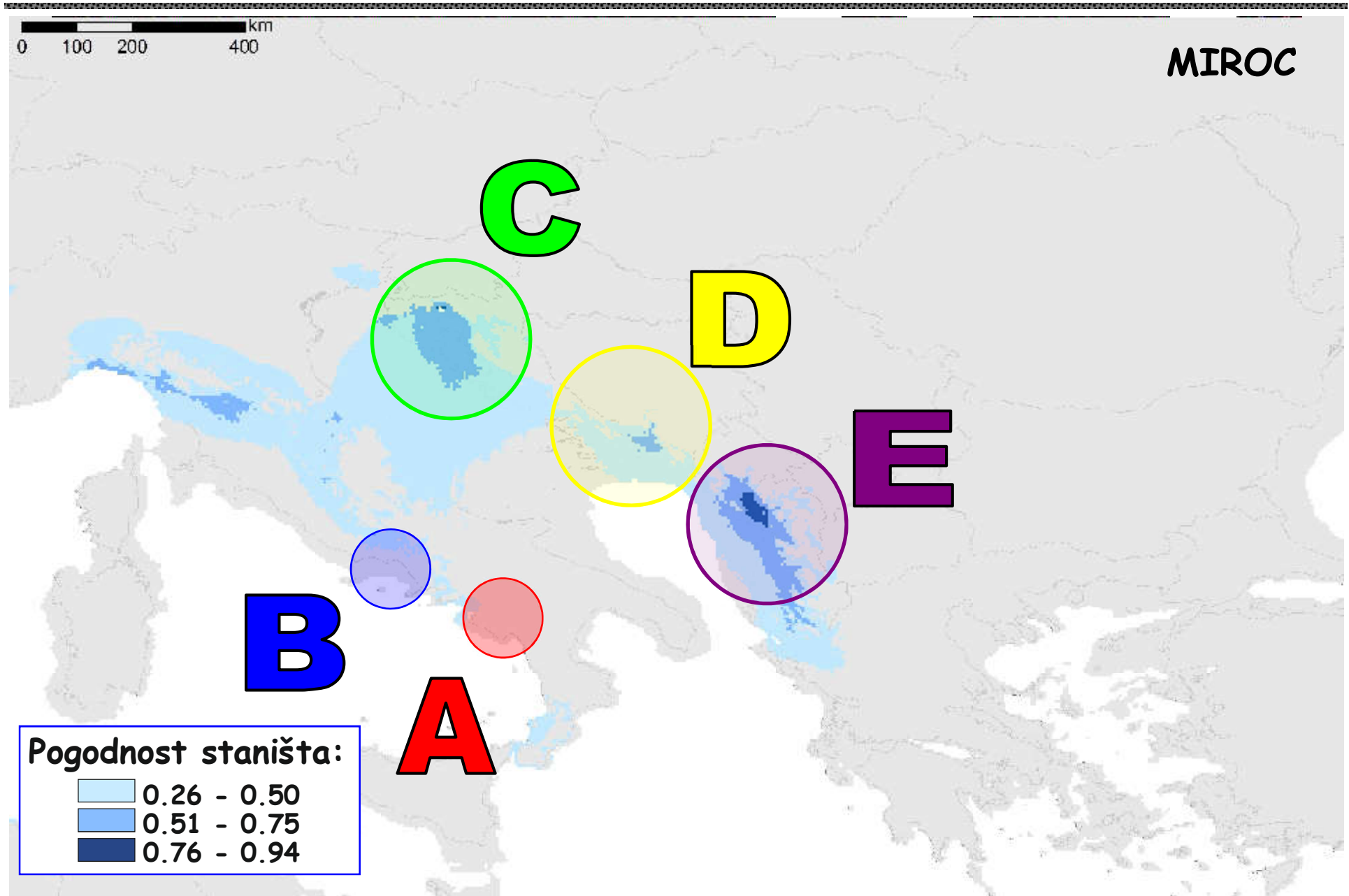
POVIJESNO RASPROSTRANJENJE

- modeliranje rasprostranjenosti vrste u vrijeme posljednjeg glacijalnog maksimuma
(**Last Glacial Maximum**; LGM; ~26,500. g. BP)
- BP - before present (prije sadašnjolsti; 1950.)
- otkrivanje mogućih glacijalnih refugija vrste
- glacijalni refugij (**glacial refugium**) - regija u kojoj je određena vrsta preživjela ledeno doba
- ulazni podaci:
 - (1) model za sadašnje stanja
 - (2) klimatski uvjeti u prošlosti
 - 19 bioklimatskih varijabli
 - bioklimatski podaci za LGM razvijeni u okviru projekta Paleoclimate Modelling Intercomparison Project Phase II
- dva modela:
 - CCSM (Community Climate System Model; USA)
 - MIROC (Model for Interdisciplinary Research on Climate; Japan)

ENM: POSLJEDNJI GLACIJALNI MAKSIMUM



ENM: POSLJEDNJI GLACIJALNI MAKSIMUM



PLAN

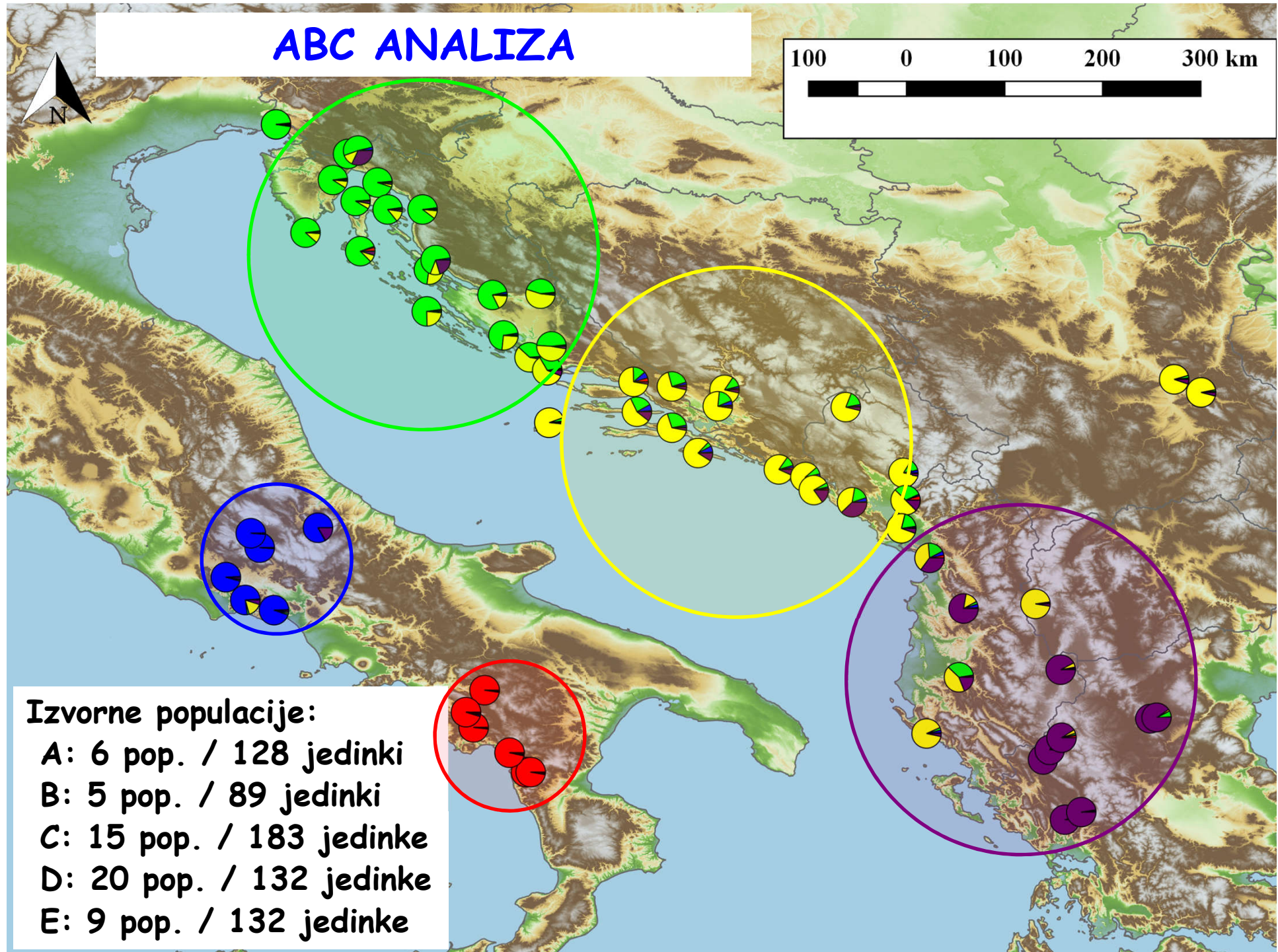
- (1) Ljekovita kadulja (*Salvia officinalis* L.)
- (2) Genetska raznolikost populacija
- (3) Genetske struktura
- (4) Modeliranje ekoloških niša
- (5) Analiza evolucijske povijesti

(5) ANALIZA EVOLUCIJSKE POVIJESTI

- Apsoksimativna Bayesovske analiza
(Approximate Bayesian Computation; ABC)
- ulazni podaci:
 - molekularni podaci
 - scenariji koji opisuju demografsku povijest
- postupak:
 - simulirati veliki broj setova podataka za svaki scenarij
 - usporediti simulirane setove s stvarnim podacima
 - simulirani set najbliži stvarnim podacima je najvjerojatniji
- cilj:
 - usporediti alternativne scenarije na temelju posteriorne vjerojatnosti svakog scenarija
 - procijeniti parametre za jedan ili više scenarija:
efektivna veličina populacije; vrijeme razdvajanja

ABC ANALIZA

100 0 100 200 300 km



Izvorne populacije:

A: 6 pop. / 128 jedinki

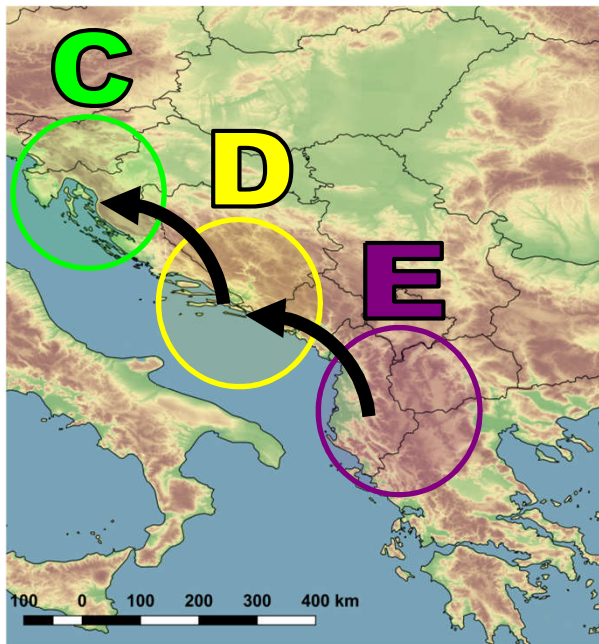
B: 5 pop. / 89 jedinki

C: 15 pop. / 183 jedinke

D: 20 pop. / 132 jedinke

E: 9 pop. / 132 jedinke

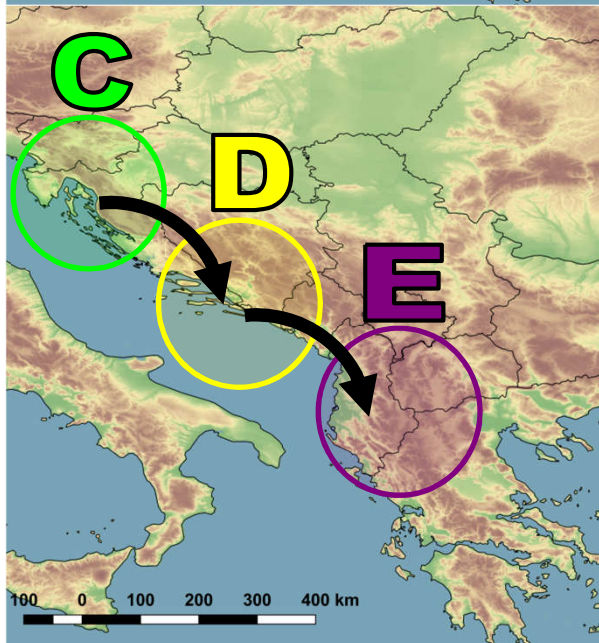
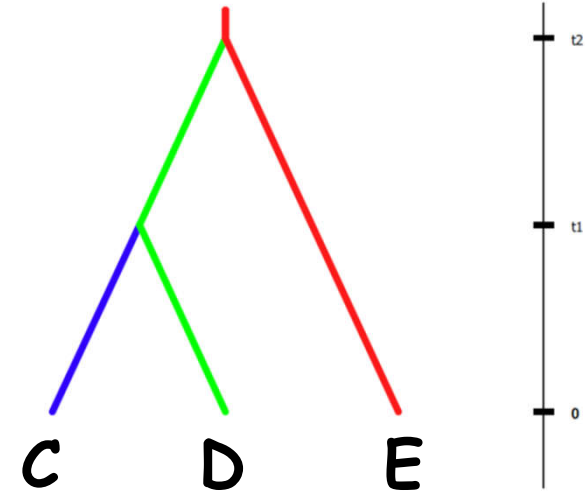
BALKAN: PET POVIJESNIH SCENARIJA



Scenarij 1

Populacija C je nastala iz populacije D, koja je nastala iz populacije E

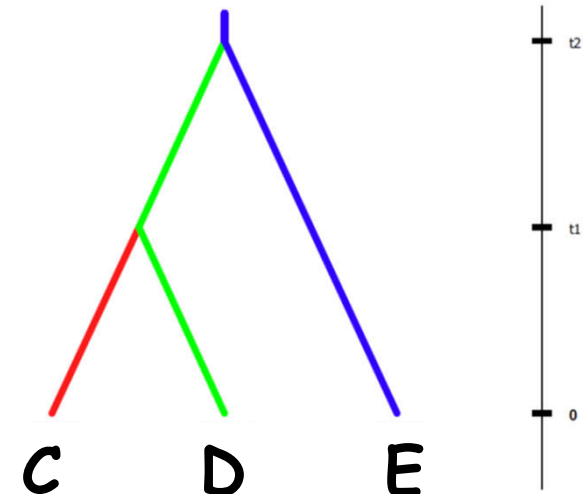
N1
N2
N3



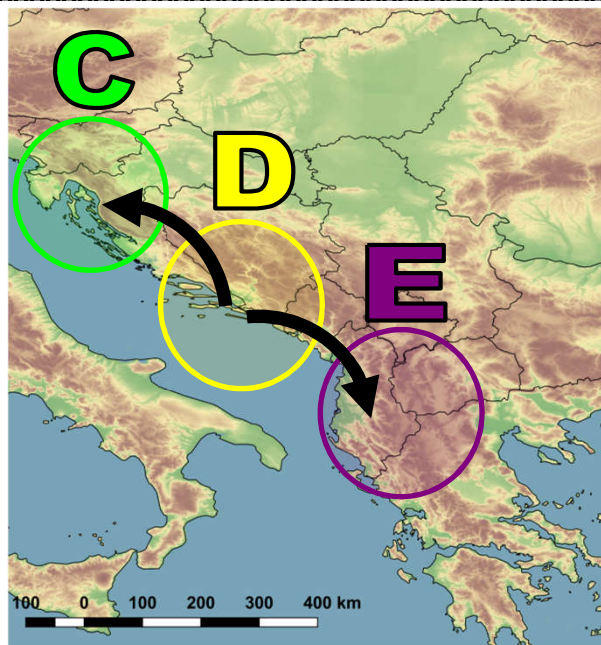
Scenarij 2

Populacija E je nastala iz populacije D, koja je nastala iz populacije C

N1
N2
N3



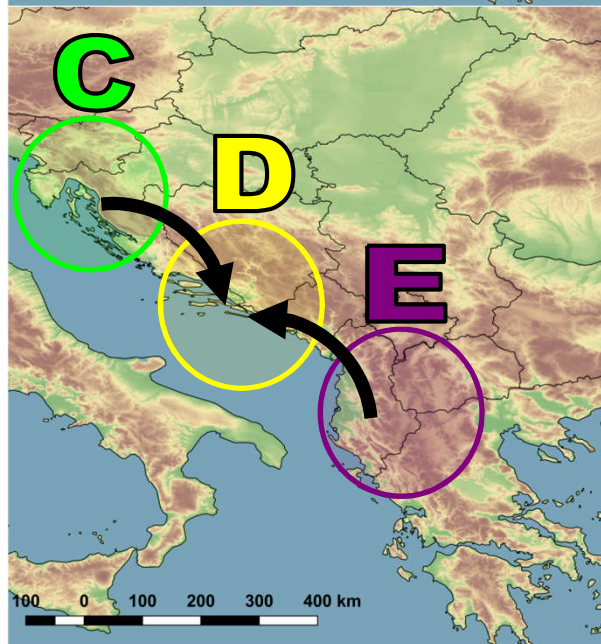
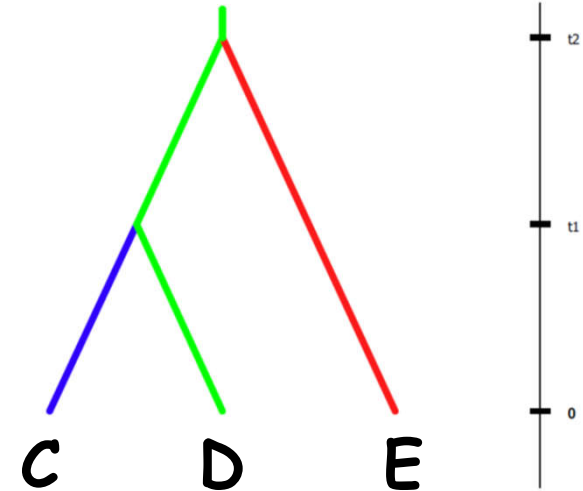
BALKAN: PET POVIJESNIH SCENARIJA



Scenarij 3

Populacije C i E
su nastale iz
populacije D

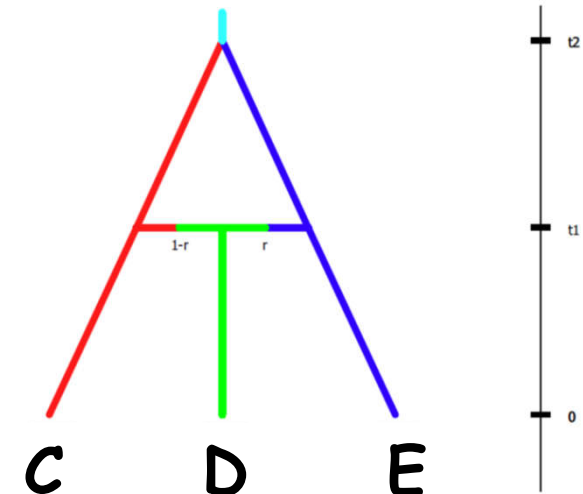
N1
N2
N3



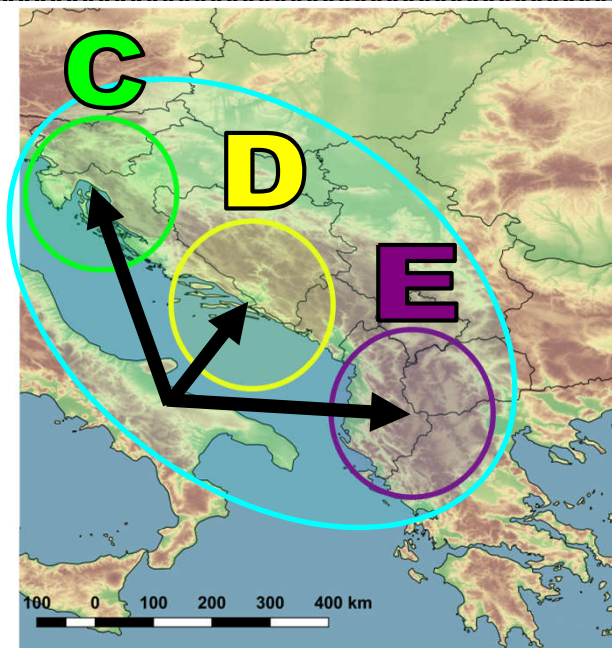
Scenarij 4

Populacija D je
nastala miješanjem
populacija
C i E

N1
N2
N3
NA

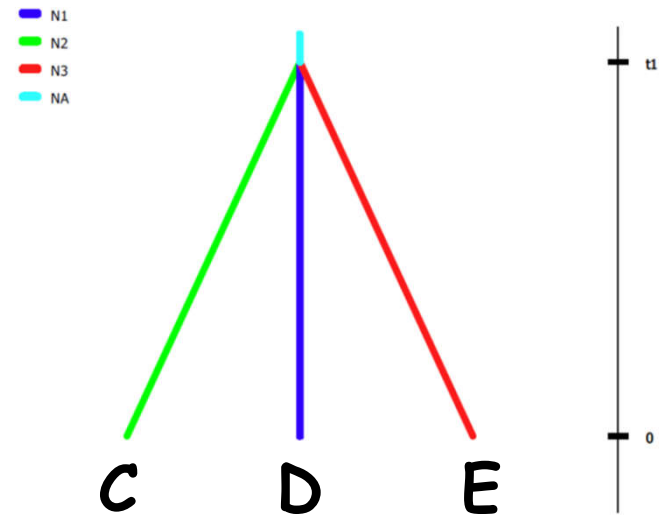


BALKAN: PET POVIJESNIH SCENARIJA



Scenarij 5

Sve su se
tri populacije
razdvojile u isto
vrijeme



REZULTATI:

Scenarij	Posteriorna vjerojatnost
1	0.114
2	0.009
3	0.107
4	0.007
5	0.764

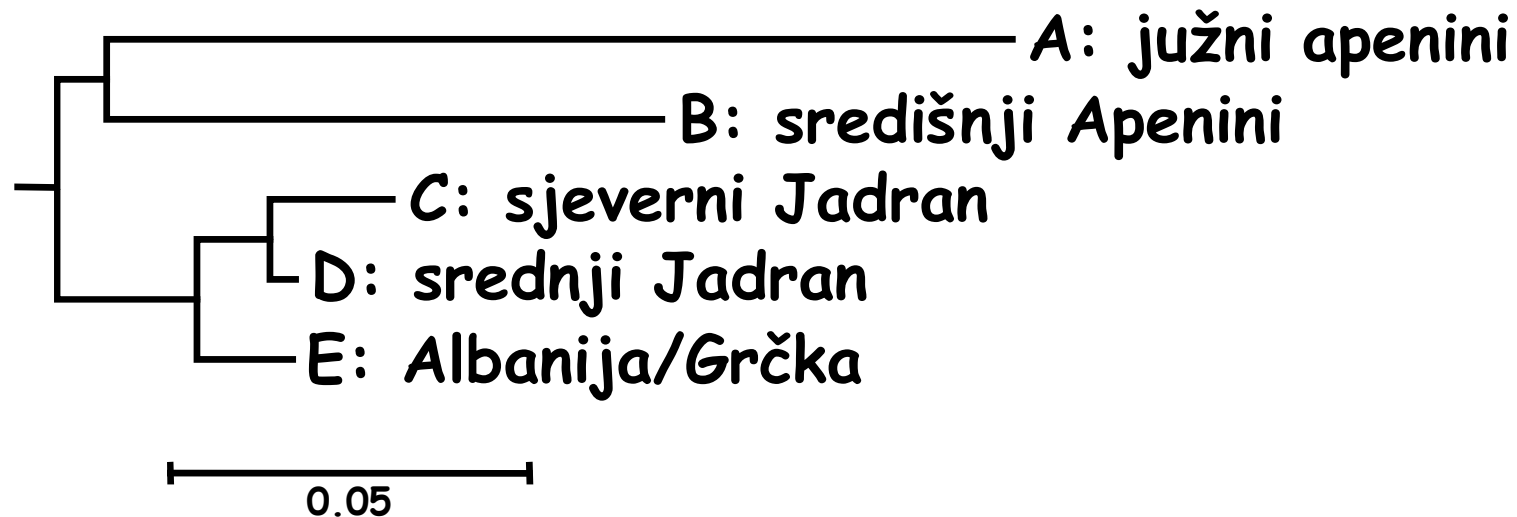
APENINI + BALKAN: POVIJESNI SCENARIJ?

Mjerilo udaljenosti:

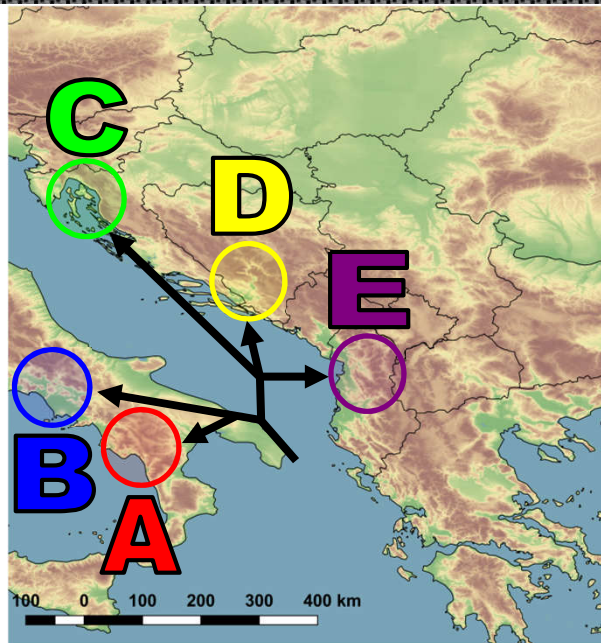
Neto nukleotidne udaljenost (**net nucleotide distance**)

Izrada stabla:

Metoda sparivanja susjeda (**Neighbor-Joining method**)

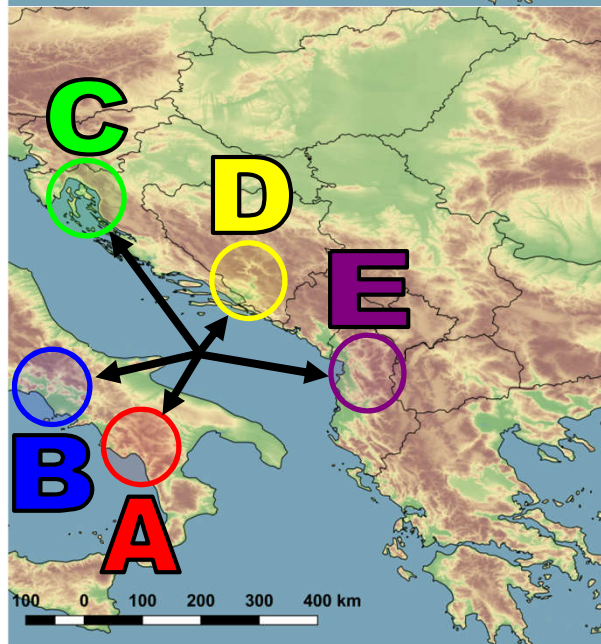
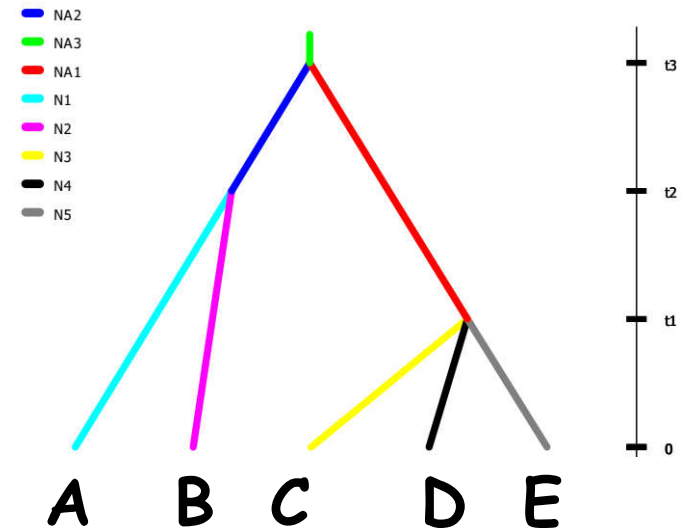


APENINI + BALKAN: POVIJESNI SCENARIJI



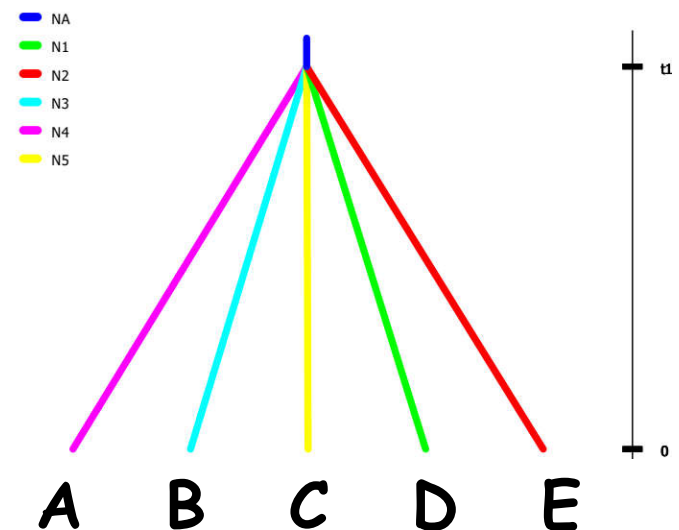
Scenarij 1

Apeninske
populacije (A,B)
su se razdvojile od
Balkanskih (C,D,E)



Scenarij 2

Svih pet populacija
se razdvojilo
u isto vrijeme



POSTERIORNA VJEROJATNOST SCENARIJA

Scenarij	Posteriorna vjerojatnost (PP)
1	0.384 (0.307-0.462)
2	0.616 (0.538-0.693)

- Scenarij 2: sve su se populacije razdvojile u istovremeno
- procjena parametara modela (Scenarij 2):
 - efektivna veličina populacija
(izvorna populacija + današnje populacije)
 - vrijeme razdvajanja (broj generacija)

POVIJESNA REKONSTRUKCIJA: DAVNA PROŠLOST



Rasprostranjenost vrste
prije posljednjeg ledenog doba (?)

Efektivna veličina populacija:

Izvorna pop. 9,280 jedinki

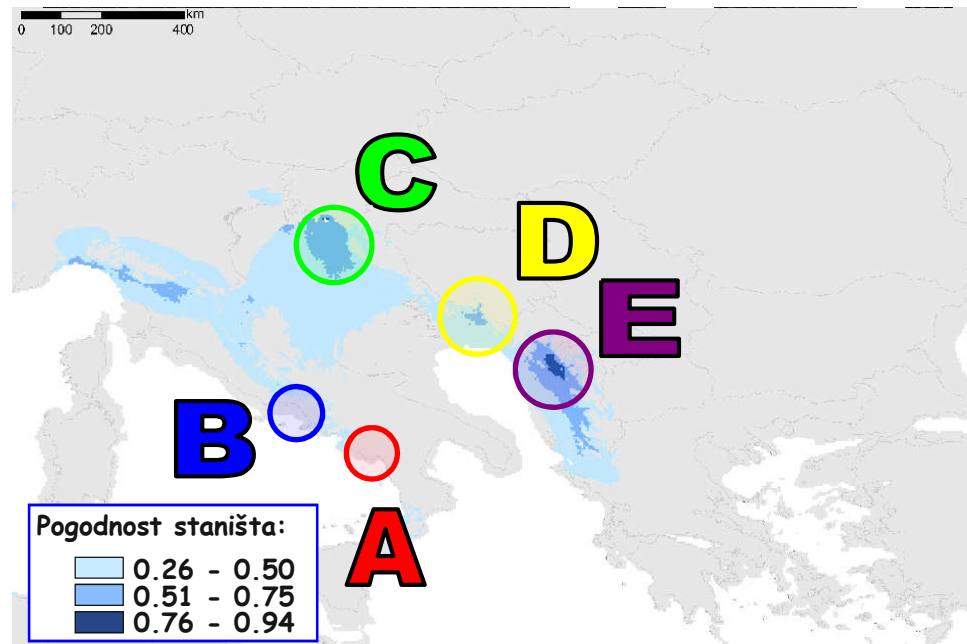
A 1,140 jedinki

B 940 jedinki

C 4,360 jedinki

D 8,330 jedinki

E 5,220 jedinki

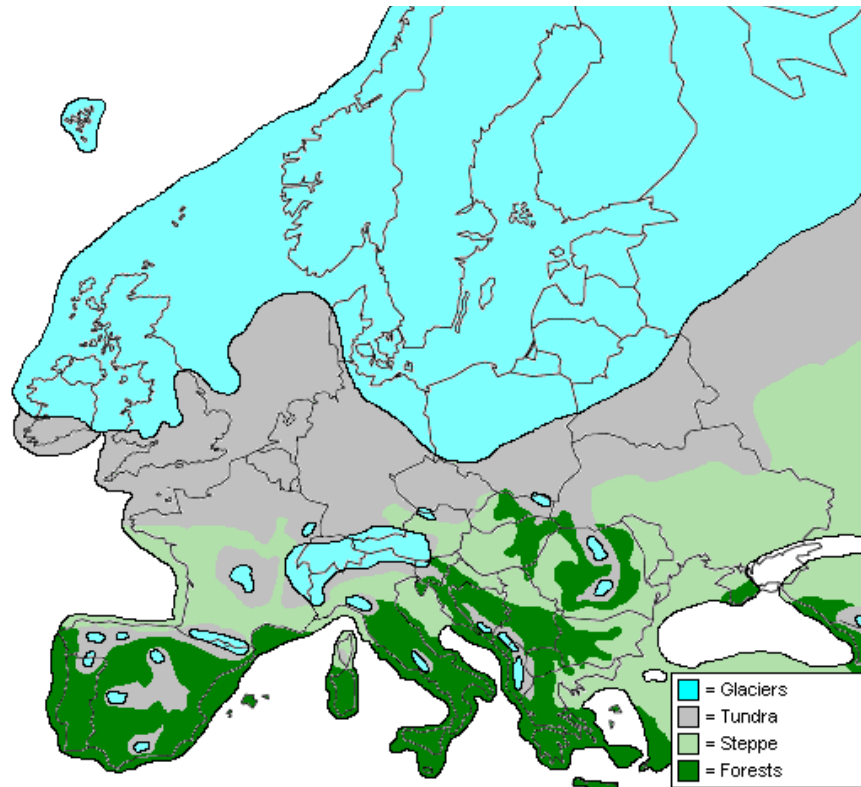


Rasprostranjenosti vrste
u vrijeme posljednjeg ledenog doba

(**Last Glacial Maximum; LGM;**
~26,500. g. BP)

POVIJESNA REKONSTRUKCIJA: LEDENO DOBA

Vegetacijska karta u posljednjem ledenom dobu



Glacijalni refugiji:

1. Iberijski poluotok
2. Apeninski poluotok
3. Balkanski poluotok

Glacijalni refugiji u Sredozemlju

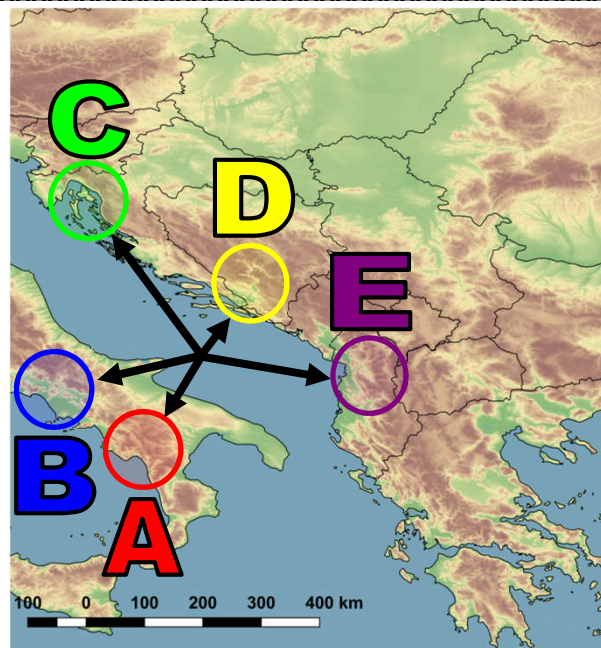


Médail and Diadema (2009)

Glacijalni (mikro)refugiji:

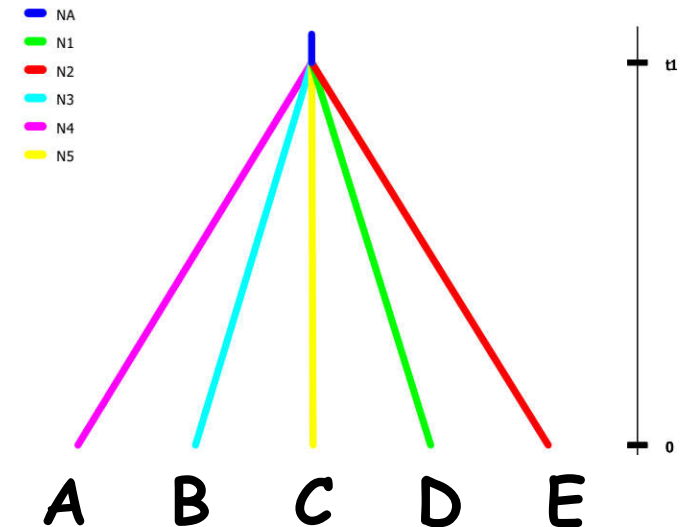
- | | |
|----|-------------------------|
| A? | 22. južni Apenini |
| B? | 21. Kampanija |
| C | 26. sjeverna Istra |
| D | 28. južna Bosna/Biokovo |
| E | 29. Crna Gora |

POVIJESNA REKONSTRUKCIJA: VRIJEME RAZDVAJANJA



Scenarij 2

Svih pet populacija
se razdvojilo
u isto vrijeme



Vrijeme razdvajanja (t_1):

prije 1,220 generacije

Posljednji glacijalni maksimum (LGM):

prije 26,500 godina

Generacijsko vrijeme (**generation time**) ljekovite kadulje:

~20 godina (?)



**Mend
The
Gap**



GENETSKA DEMOGRAFIJA LJEKOVITE KADULJE: PUTOVANJE U PROŠLOST

Zlatko Šatović

Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet

Znanstveni centar izvrsnosti

za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (CroP-BioDiv)

e-mail: zsatovic@agr.hr

Zagreb, 20. rujna 2018.