



Zlatko Liber, Botanički zavod, Biološki odsjek PMF-a,
Marulićev trg 9A

Genetička raznolikost i filogeografija ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.)

Genetic diversity and phylogeography of common sage (*Salvia officinalis* L.)





Projekt Hrvatske
zaklade za znanost

Epigenetička vs. genetička raznolikost prirodnih biljnih populacija: studija slučaja hrvatskih endemičnih kadulja

Temeljna pitanja:

- (1) Koja je razina genetičke, a koja epigenetičke raznolikosti u prirodnim populacijama?
- (2) Postoje li sustavni obrasci između genetičke raznolikosti, epigenetičke raznolikosti i okolišnih čimbenike?
- (3) Kakav je utjecaj evolucijskih događaja kao što je populacijski bottleneck na epigenetičku raznolikost?
- (4) Pokazuju li prirodni hibridi različit obrazac epigenetičke raznolikosti u odnosu na roditeljske vrste?
- (5) ... <http://hirc.botanic.hr/EpiSalvia/En/index.htm>

Ljekovita kadulja (*Salvia officinalis* L.)

- rasprostranjena u Sredozemlju, ali zbog visokovrijednih ljekovitih, aromatičnih i ukrasnih osobina kultivirana na svim kontinentima
- pretpostavke :
 - a) istočna obala Jadrana i južni dio Apeninskog poluotoka područje prirodnog rasprostranjenja
 - b) ostala nalazišta u Mediteranu predstavljaju naturalizirane populacije
- istraživanje genetičke i epigenetičke raznolikosti u prirodnim populacijama te njihovog odnosa prema okolišnim čimbenicima
- širokorasprostranjena stranooplodna vrsta velike genetičke raznolikosti



Kratkozupčasta kadulja (*S. brachyodon* Vandas)

- stenoendem
- tri poznata lokaliteta:
 1. Sv. Ilija, Pelješac
 2. Velji do, Konavli
 3. Vrbanj, Orijen, BiH/
Crna Gora
- u HR gotovo ugrožena (NT),
a u CG ugrožena vrsta (EN)
- mala površina populacija i
mala brojnost jedinki
- velika vjerojatnost prolaska
populacije kroz genetičko
usko grlo (eng. genetic
bottleneck)



Hibridna kadulja (*Salvia x auriculata* Mill.)



S. officinalis



S. x auriculata



S. fruticosa Mill.



- hibrid poznat samo iz uzgoja
- u Hrvatskoj je grčka kadulja prisutna na Visu
- nakon morfološke analize utvrđena mogućnost postojanja hibridizacija ljekovite i grčke kadulje na otoku Visu

Filipović M. 2012. Morfološke značajke hibrida ljekovite i grčke kadulje s otoka Visa. Diplomski rad, PMF, Sveučilište u Zagrebu.

Metode

(1) Genetički biljezi

a) Mikrosateliti

- ponavljajuće jednostavne sekvence
- eng. *Simple Sequence Repeats (SSR)*

b) AFLP

- polimorfizam dužine PCR umnoženih fragmenata
- eng. *Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)*

(2) Epigenetički biljezi

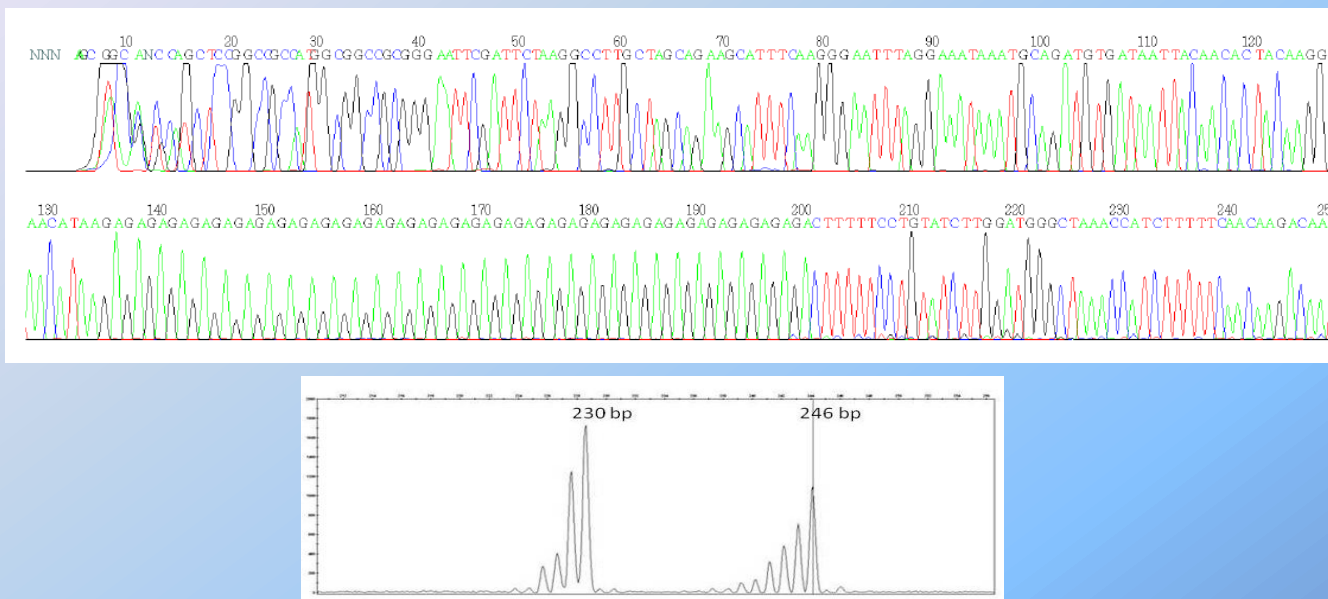
a) MSAP

- polimorfizam dužine PCR umnoženih fragmenata osjetljivih na metilaciju
- *Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP)*

(b) Epigenetičko sekvenciranje (pirosekvenciranje ...)

Dosadašnji rezultati:

Detekcija, izolacija i karakterizacija mikrosatelitnih biljega ljekovite kadulje



An i sur 2010. *Molecular Ecology Resources* 10 (2): 404-408.

Radosavljević i sur. 2011. *American Journal of Botany* 98 (11): 316-318.

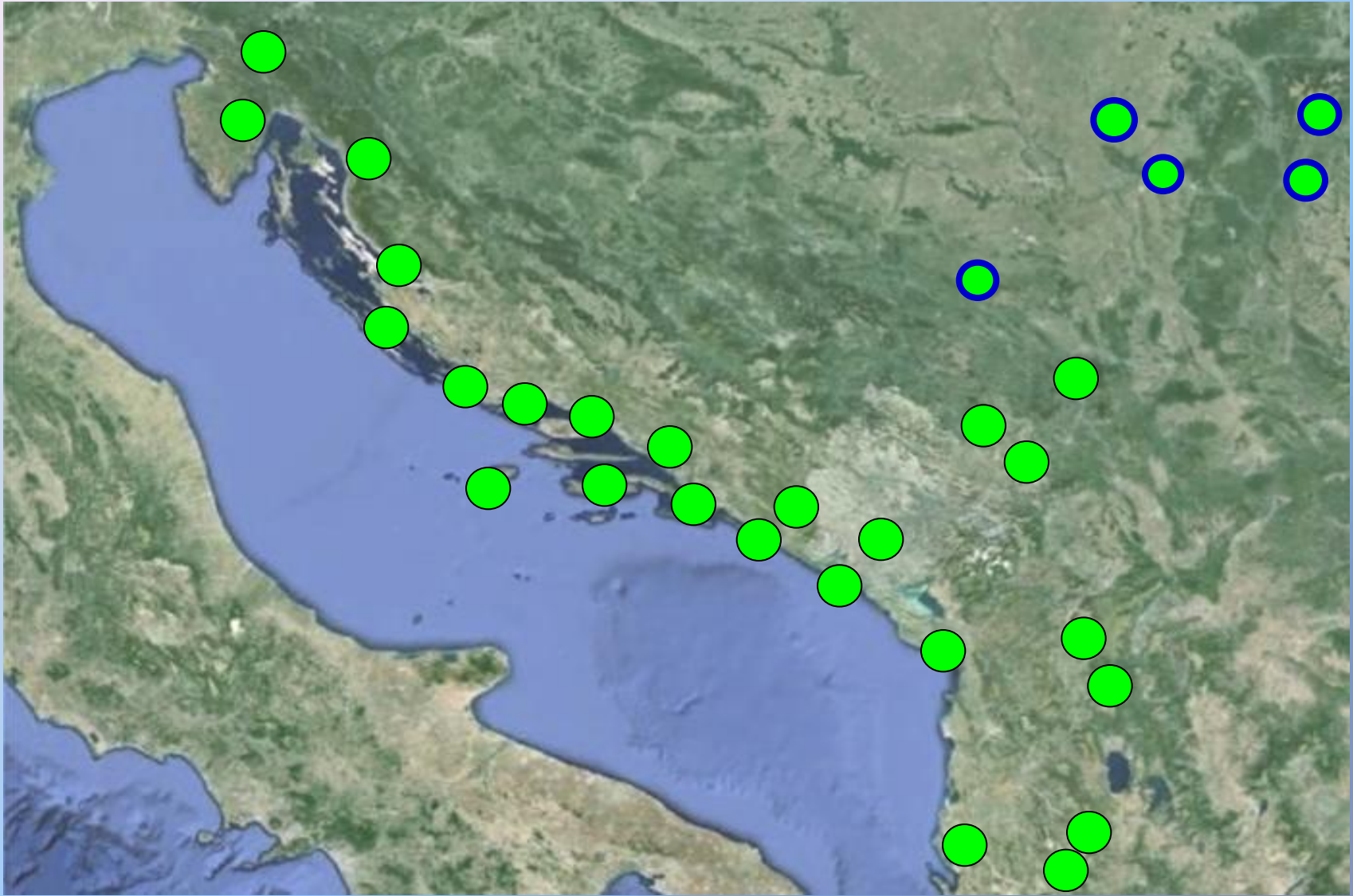
Radosavljević i sur. 2012. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(9): 12082-12093.

Radosavljević 2012. Izolacija i karakterizacija mikrosatelitnih biljega ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L., Lamiaceae). Doktorska disertacija, PMF, Sveučilište u Zagrebu.

Primjena razvijenih biljega u različitim istraživanjima ljekovite kadulje

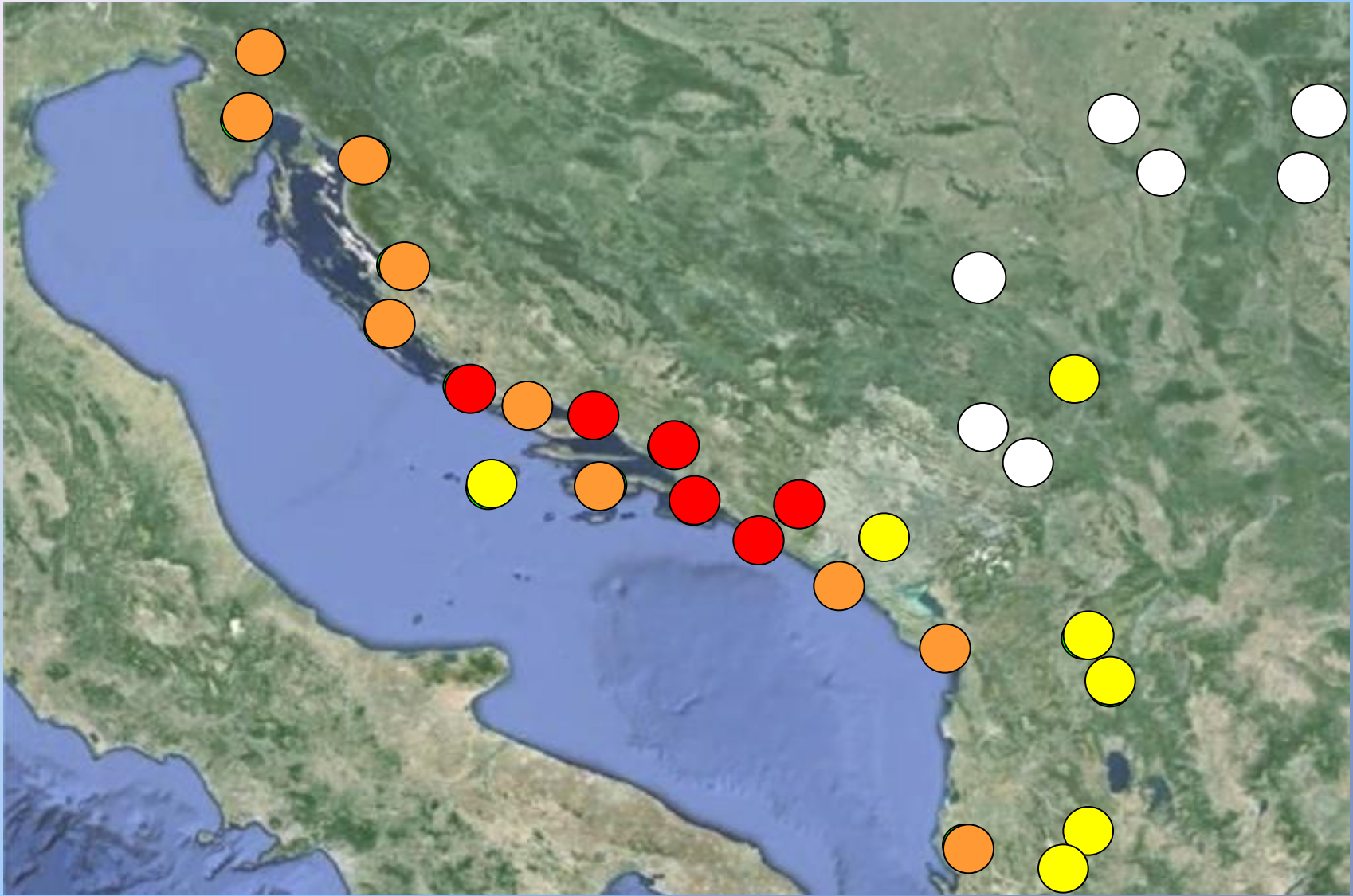
Greguraš D. 2013. Genetička raznolikost i struktura populacija ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.). Doktorska disertacija, PMF, Sveučilište u Zagrebu.

Genetička raznolikost ljekovite kadulje

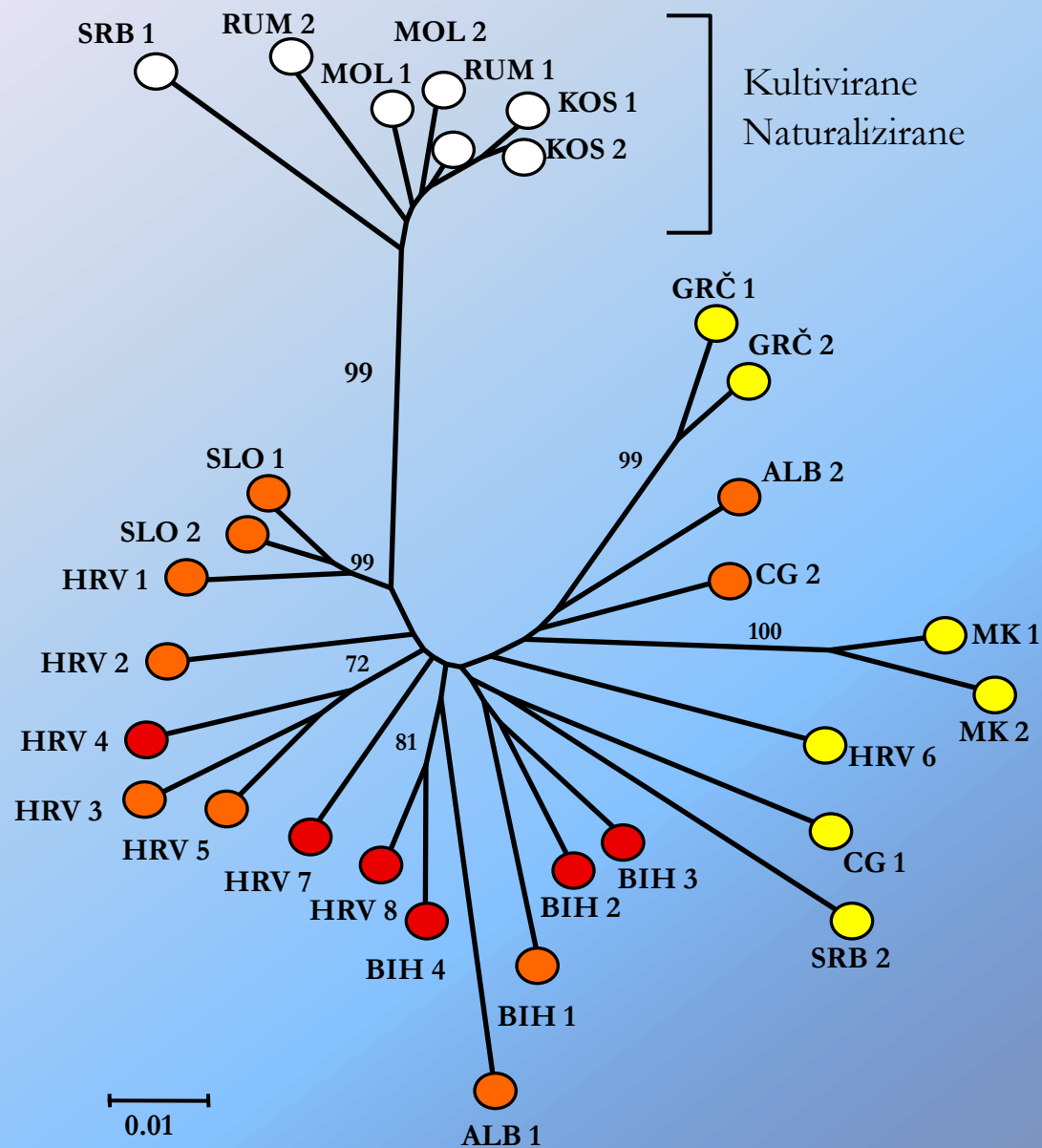


30 populacija ljekovite kadulje sakupljenih uzduž zapadne obale Jadrana i Balkanskog poluotoka (svaka populacija je predstavljena s 25 jedinki ~750 jedinki)

Genetička raznolikost ljekovite kadulje



Alelna bogatstvo 30 populacija ljekovite kadulje utvrđeno analizom osam mikrosatelitnih lokusa



Neighbour-Joining srodstveno stablo temeljeno na Cavalli-Sforza and Edwards' chord genetskoj udaljenosti dobivenoj analizom alela osam mikrosatelitnih lokusa unutar 30 populacija (pouzdanast grana predstavljena je bootstrap vrijednostima iznad 50)

Sjeverni Jadran

Južni Jadran

MKD/GRČ

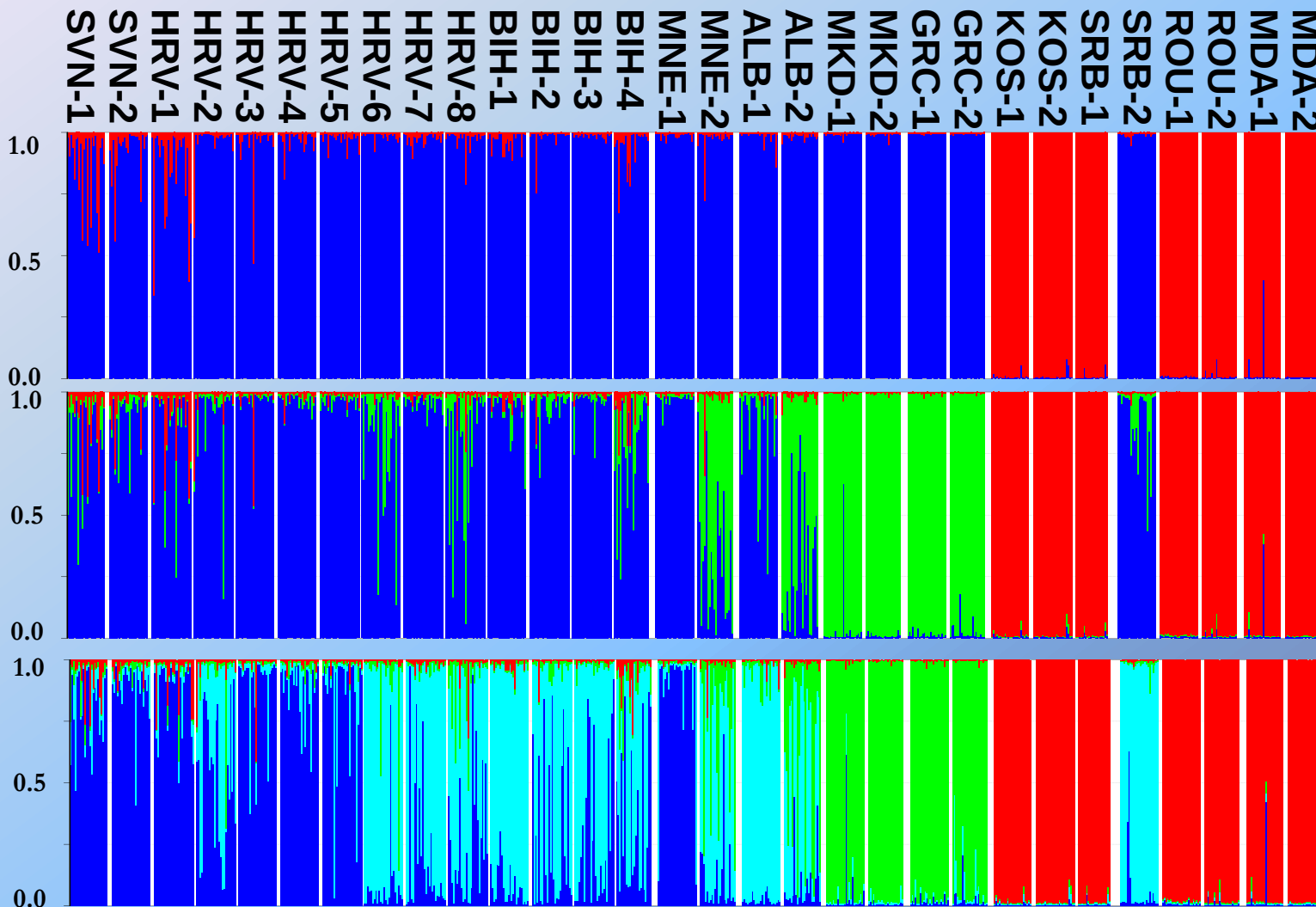
prirodne populacije

kultivirane

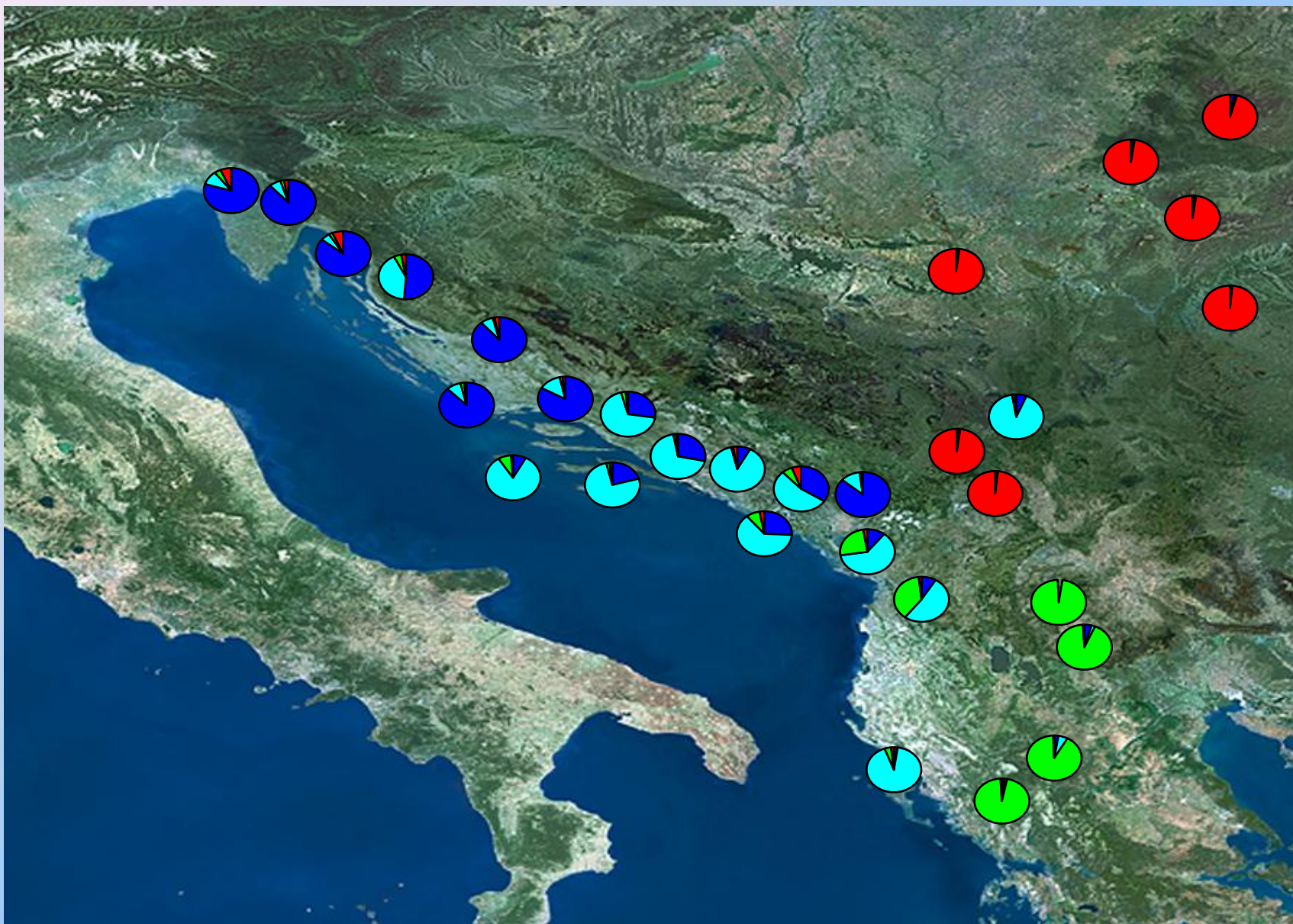
$K = 2$

$K = 3$

$K = 4$

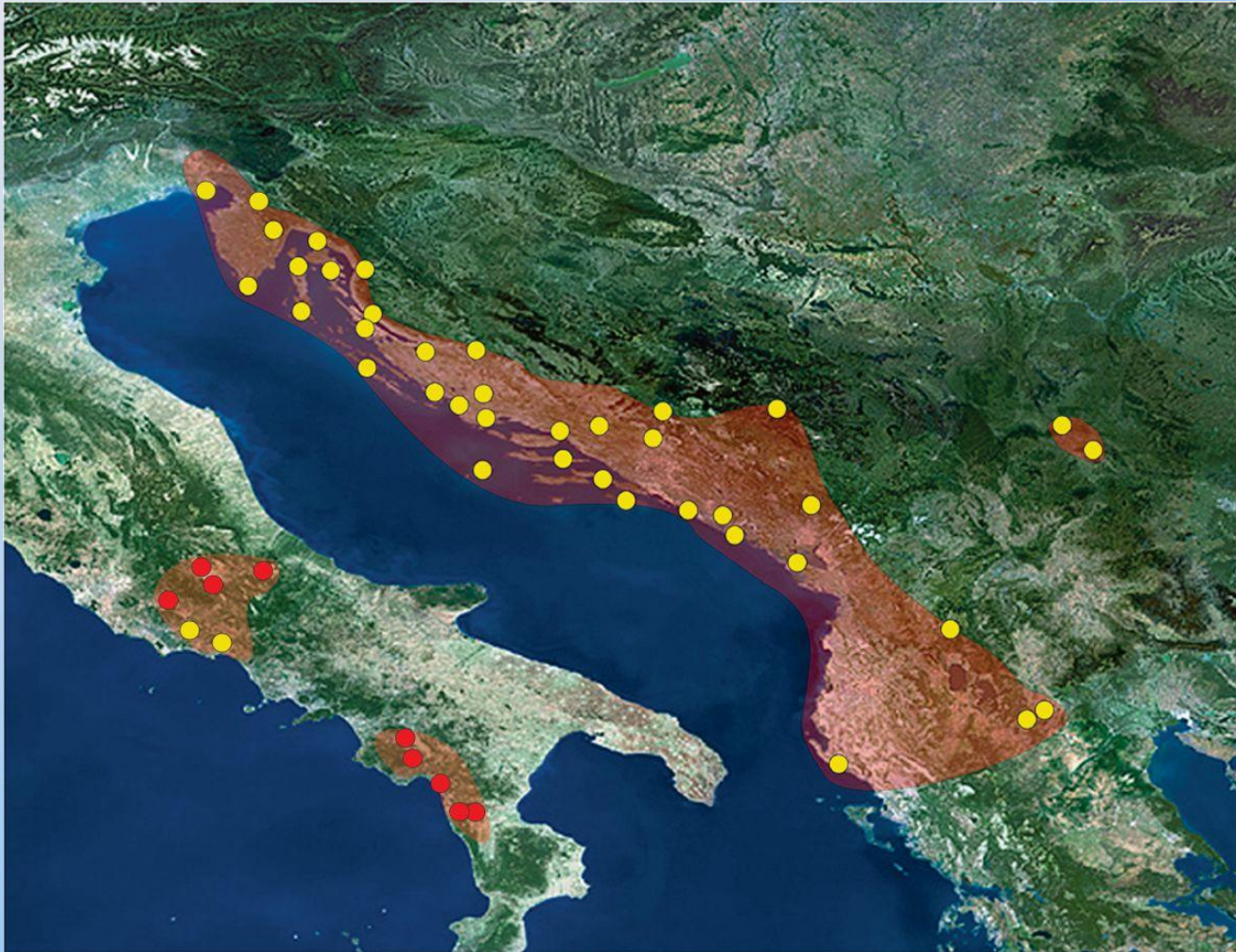


Bayesovska analiza populacijske strukture 30 populacija ljekovite kadulje temeljena na utvrđenim alelima 8 mikrosatelitnih lokusa (računalni program Structure)



Geografski prikaz Bayesovske analize populacijske strukture

Genetička raznolikost i filogeografija prirodnih populacija ljekovite kadulje (SSR i cpDNA)



47 prirodnih populacija ljekovite kadulje skupljenih uzduž zapadne obale Jadrana i Balkanskog poluotoka (svaka populacija je predstavljena s 25 jedinki ~1100 jedinki)

SSR (K = 2)



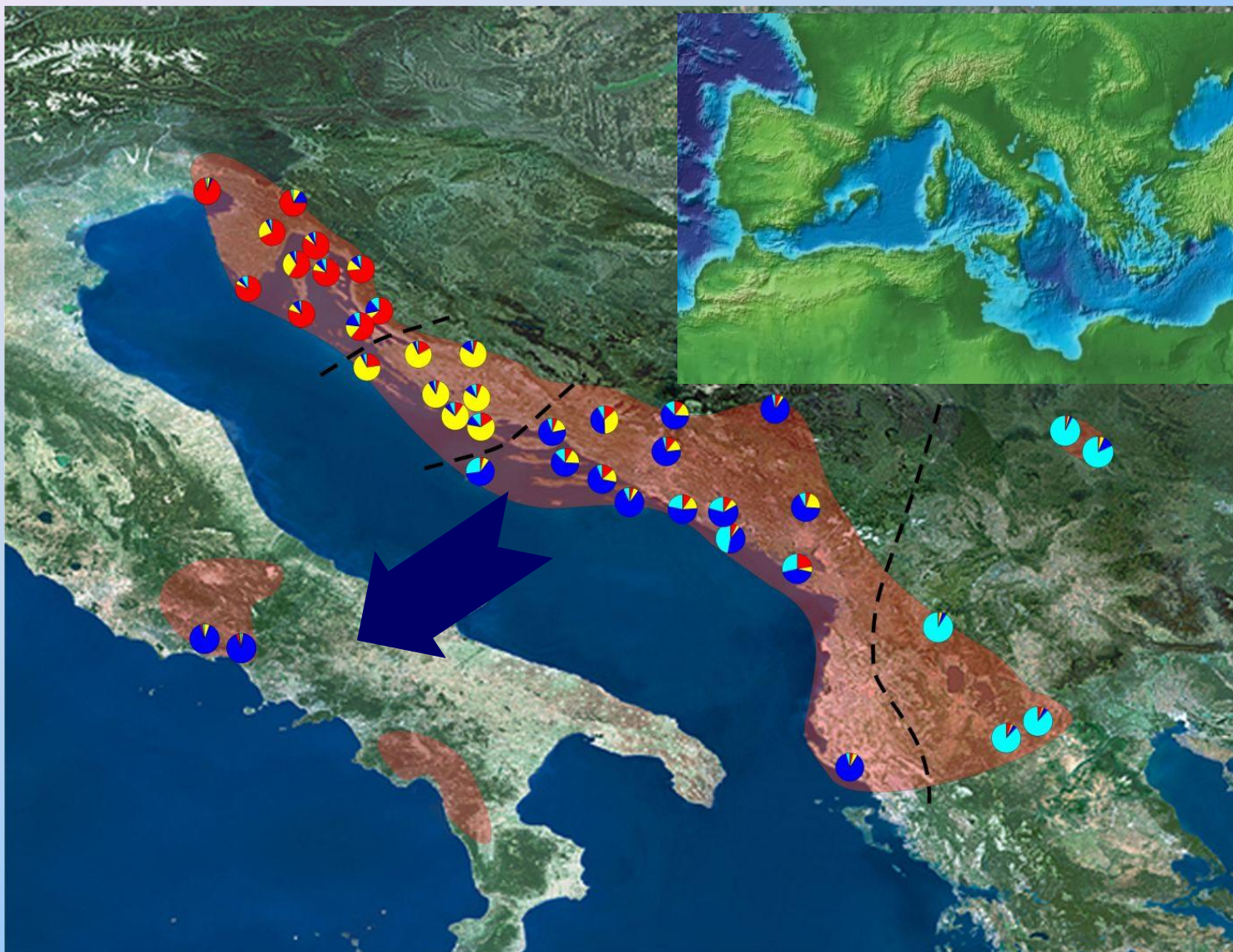
Geografski prikaz Bayesovske analize populacijske strukture na temelju mikrosatelitnih podataka pri K=2, 3, 4

SSR (K = 3)



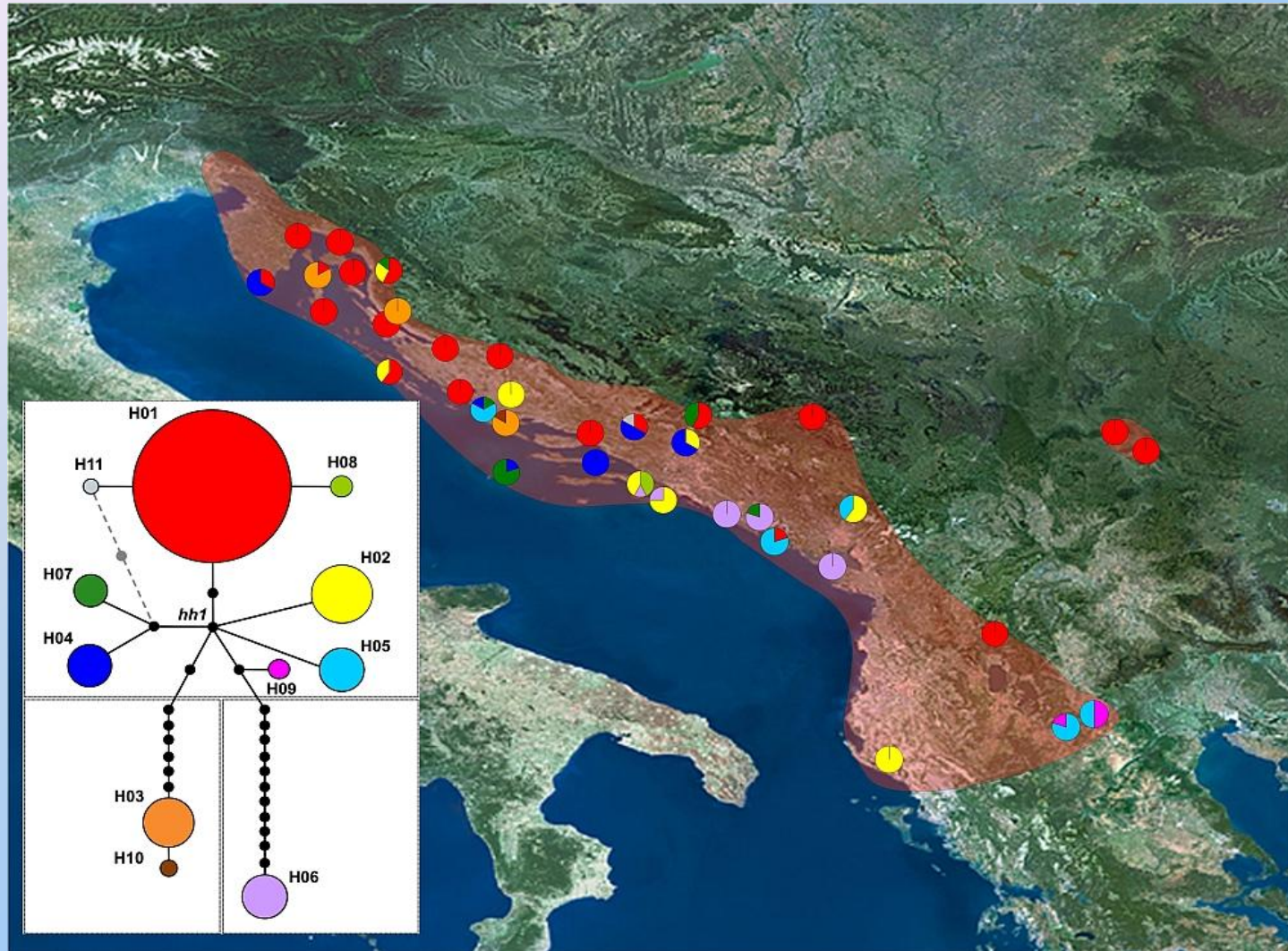
Geografski prikaz Bayesovske analize populacijske strukture na temelju mikrosatelitnih podataka pri $K=2, 3, 4$

SSR $K = 4$



Geografski prikaz Bayesovske analize populacijske strukture na temelju mikrosatelitnih podataka pri $K=2, 3, 4$

cpDNA



Rasprostranjenost i haplotipska mreža 11 kloroplastnih haplotipova utvrđenih sekvenciranjem dvije kloroplasne intergenske regije (*rpL32-trnL*, *rps16-trnK*) unutar 36 prirodnih populacija (~180 jedinki) ljekovite kadulje. Napomena! Veličina kruga proporcionalna je broju jedinki s takvim haplotipom)

Dosadašnji rezultati

Detekcija, izolacija i karakterizacija mikrosatelitnih biljega ljekovite kadulje

Primjena razvijenih biljega u različitim istraživanjima ljekovite kadulje

Testovi unakrsnog PCR umnožavanja na srodnim vrstama

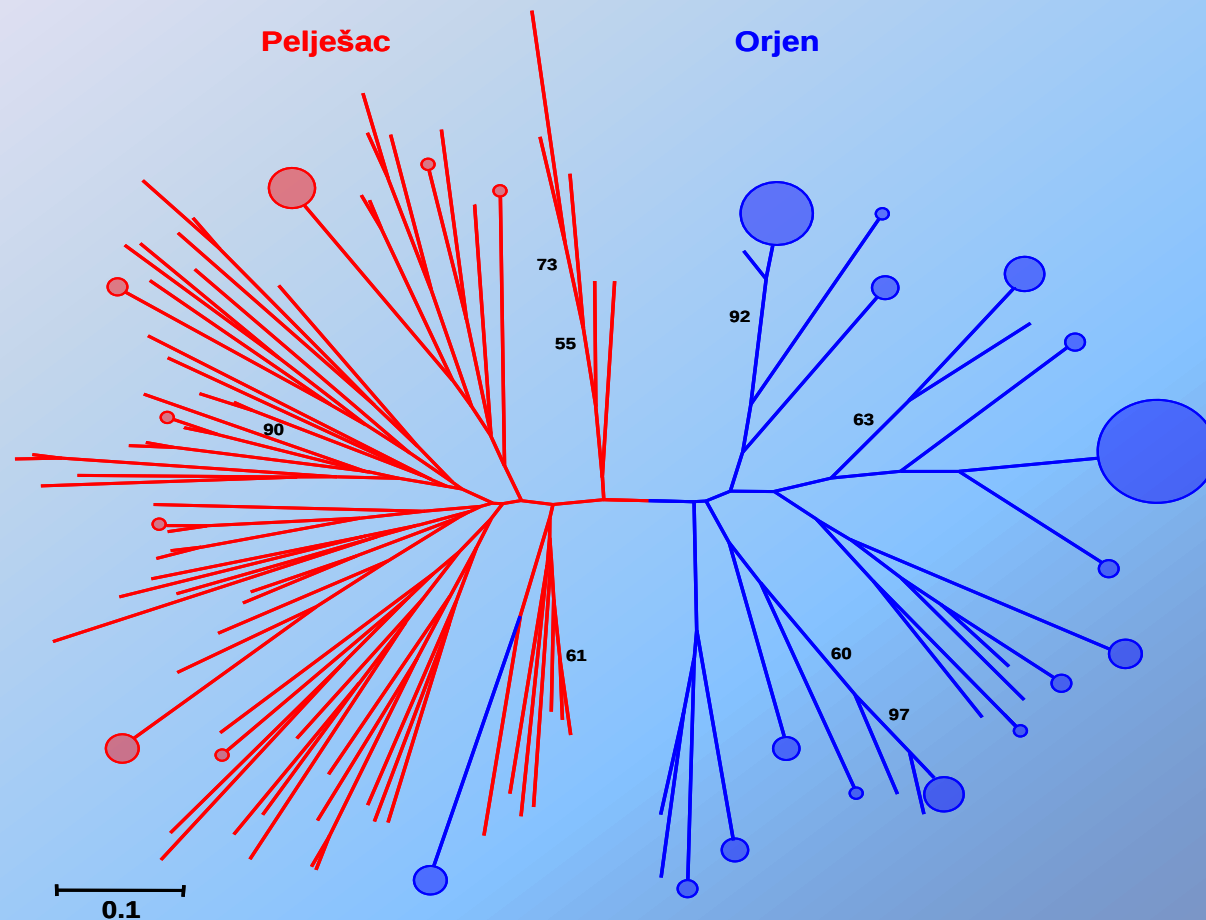
Populacijsko-genetička istraživanja kratkozubčaste kadulje (*S. brachyodon*)

Populacijsko-genetička istraživanja vrsta *S. officinalis*, *S. fruticosa* Mill. i *S. x auriculata* na otoku Visu

Testovi unakrsnog PCR umnožavanja na srodnim vrstama

Microsatellite loci	<i>S.brachyodon</i> Vandas	<i>S. fruticosa</i> Mill.	<i>S. pratensis</i> L.	<i>S. sclarea</i> L.	<i>S. verticilata</i> L.	<i>R. officinalis</i> L.
SoUZ001	+	-	-	-	-	-
SoUZ002	+	-	-	-	-	+
SoUZ003	-	+	-	+	-	-
SoUZ004	+	-	-	-	-	-
SoUZ005	+	+	+	-	-	-
SoUZ006	+	+	+	+	-	-
SoUZ007	+	+	-	-	-	+
SoUZ008	+	-	+	-	+	+
SoUZ009	+	+	+	+	+	+
SoUZ010	-	-	-	-	-	-
SoUZ011	+	-	-	-	-	-
SoUZ012	-	-	-	-	-	-
SoUZ013	+	+	-	-	-	-
SoUZ014	+	+	+	+	+	-
SoUZ015	-	-	-	-	-	-
SoUZ016	-	+	-	-	-	-
SoUZ017	-	-	-	-	-	-
SoUZ018	-	-	-	-	-	-
SoUZ019	-	-	-	-	-	-
SoUZ020	+	+	-	-	+	-

Populacijsko-genetička istraživanja kratkozubčaste kadulje (*S. brachyodon*)



Neighbour-Joining srodstveno stablo temeljeno na D_{PSAM} genetskoj udaljenosti i mikrosatelitnim alelima osam lokusa 180 jedinki kratkozupčaste kadulje (pouzdanost grana predstavljena je bootstrap vrijednostima iznad 50; ● = genetički iste jedinke, veličina kruga proporcionalna je broju jedinki)



Population	N	G	R	V	max ng
Pelješac	90	73	0.809	0.800	7
Orjen	90	25	0.270	0.914	18

N - N_{SU} – broj uzorkovanih jedinki

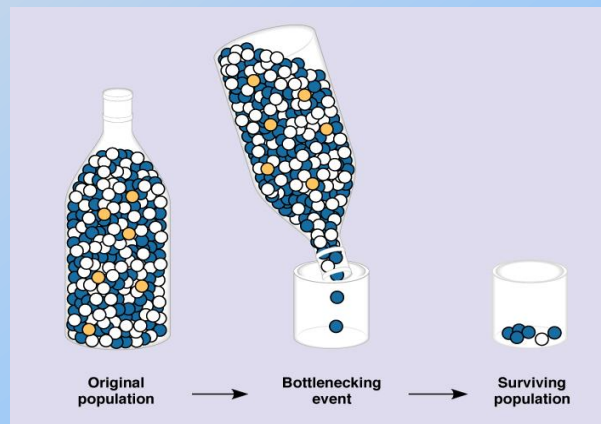
G – broj genotipova

R – genotipsko bogatstvo

V - Simpson's evenness indeks (indeks ravnomjernosti)

max ng - maksimalan broj jedinki u pojedinom genotipu

Bottleneck – populacijsko usko grlo



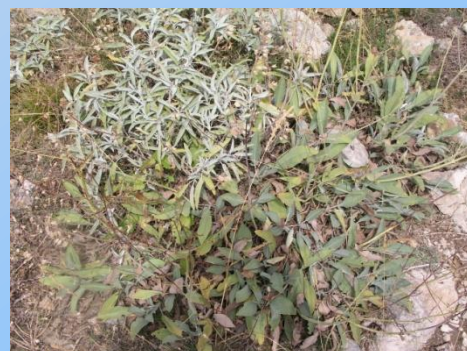
$$H_E > H_{EQ}$$

bottleneck

$$H_E < H_{EQ}$$

ekspanziju

- jako smanjenje veličine populacije dovodi do gubitak rijetkih alela (bitno ne utječu na očekivanu heterozigotnost (H_E))
- povećanje očekivane heterozigotnosti (H_E) tj. genske raznolikosti u slučaju HWE naspram genske raznolikosti u slučaju ravnoteže mutacija i genetičkog drifta (H_{EQ}) = **signal da je populacija prošla kroz bottleneck**

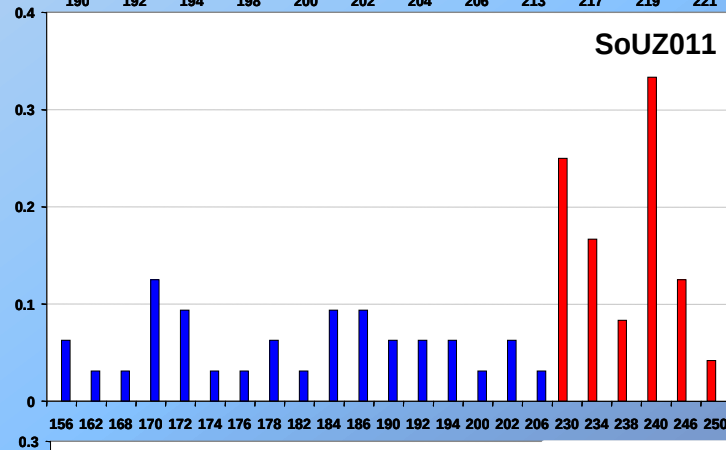
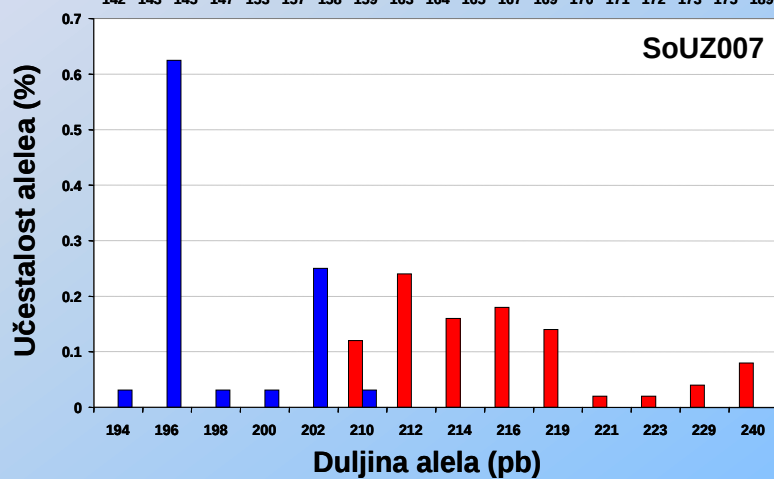
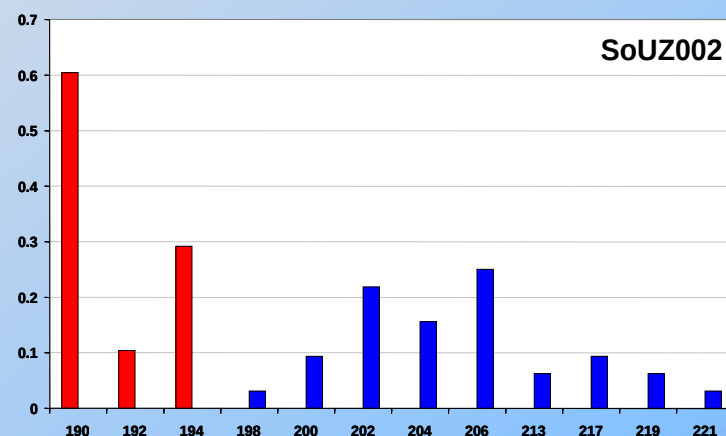
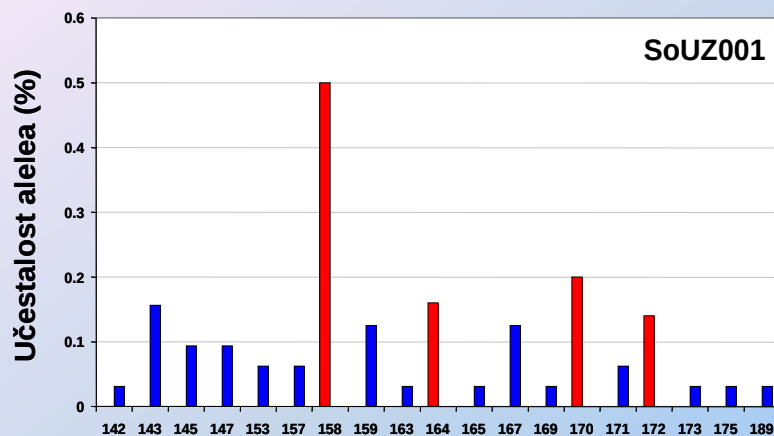


Vjerojatnost Wilcoxonovog testa u svrhu utvrđivanja genetičkog uskog grla u populacijama *S. brachyodon* i *S. officinalis* na poluotoku Pelješcu na temelju četiri mutacijska modela.

No	Vrsta	IAM	TPM	SMM
1	<i>S. brachyodon</i>	0.016	0.016	0.031
2	<i>S. officinalis</i>	0.109	0.313	0.594

IAM - model beskonačnog broja alela, TPM - dvofazni model s 30% mutacija po modelu IAM, SMM - model postupnih mutacija. Kurzivom i bold su označene signifikantne ($P < 0.05$) vrijednosti Wilcoxonovog testa ($H_E > H_{EQ}$)

- Pruša M. 2011. Genetička raznolikost i rasprostranjenost vrsta: *Salvia brachyodon* Vandas vs. *Salvia officinalis* L. Studentski rad nagrađen Rektorovom nagradom PMF, Sveučilište u Zagrebu.
- Pruša M. 2012. Morfološka analiza populacija kratkozubčaste kadulje. Diplomski rad, PMF, Sveučilište u Zagrebu.



Legenda:

■ *Salvia brachyodon*

■ *Salvia officinalis*

Histogrami alelnih učestalosti četiri mikrosatelitna biljega u populacijama kratkozupčaste (*S. brachyodon*) i ljekovite kadulje (*S. officinalis*) s poluotoka Pelješca

Populacijsko-genetička istraživanja vrsta *S. officinalis*, *S. fruticosa* i *S. x auriculata* na otoku Visu

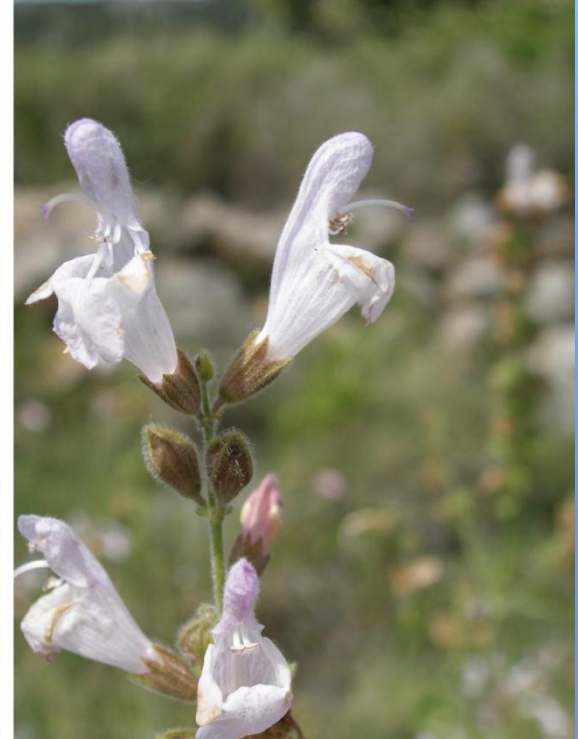
S. officinalis



S. auriculata ???



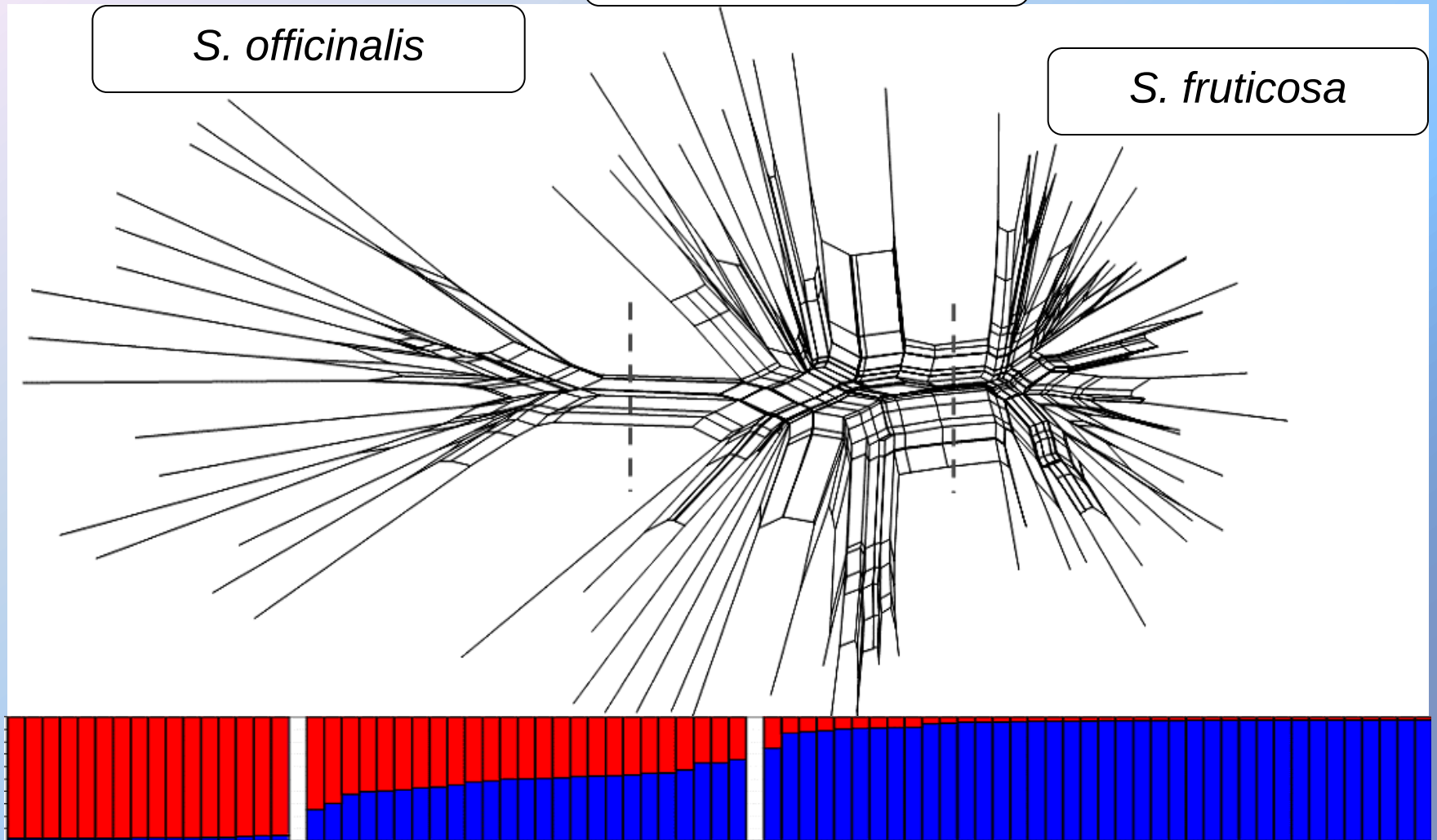
S. fruticosa



S x auriculata

S. officinalis

S. fruticosa



Neighbour Net diagram i Bayesovska analiza populacijske strukture 79 istraživanih jedinki *S.officinalis*, *S. fruticosa* i njihovog potencijalnog križanca na otoku Visu dobiveni analizom osam mikrosatelitnih lokusa