

*Programa IPA INTERREG prekogranične saradnje HR-BA-ME  
2014-2020 za realizaciju projekta „Zaštita i promocija kestena“*

## **GENETIČKI DIVERZITET I VARIJABILITET POPULACIJA PITOMOG KESTENA (*Castanea sativa* Mill.) NA PODRUČJU OPŠTINA BUŽIM I VELIKA KLADUŠA**

**dr Vanja Daničić  
Šumarski fakultet Univerzitet u Banjoj Luci**

**VELIKA KLADUŠA, 22. novembar 2019.**

# UVOD

## UPOTREBA

- tehničko i građevinsko drvo
- kao rudničko drvo, TT stubovi
- u poljoprivredi
- vinogradarstvu, bačvarstvu, tokarstvu, kolarstvu
- taninskoj industriji
- brodogradnji i vodogradnji
- farmaceutska i prehrambena industrija
- medonosna vrsta



# UVOD

Uzgajanje

Kultivisanje

Starogrčka, rimska  
civilizacija

Početak 20. vijeka

Kraj II svjetskog  
rata



# UVOD

✓ *Cryphonectria parasitica*



✓ 1904

✓ 1938

✓ 1961





## CILJ ISTRAŽIVANJA

Bliže upoznavanje biodiverziteta pitomog kestena, na genetičkom nivou s ciljem da se utvrdi genetička varijabilnost populacija

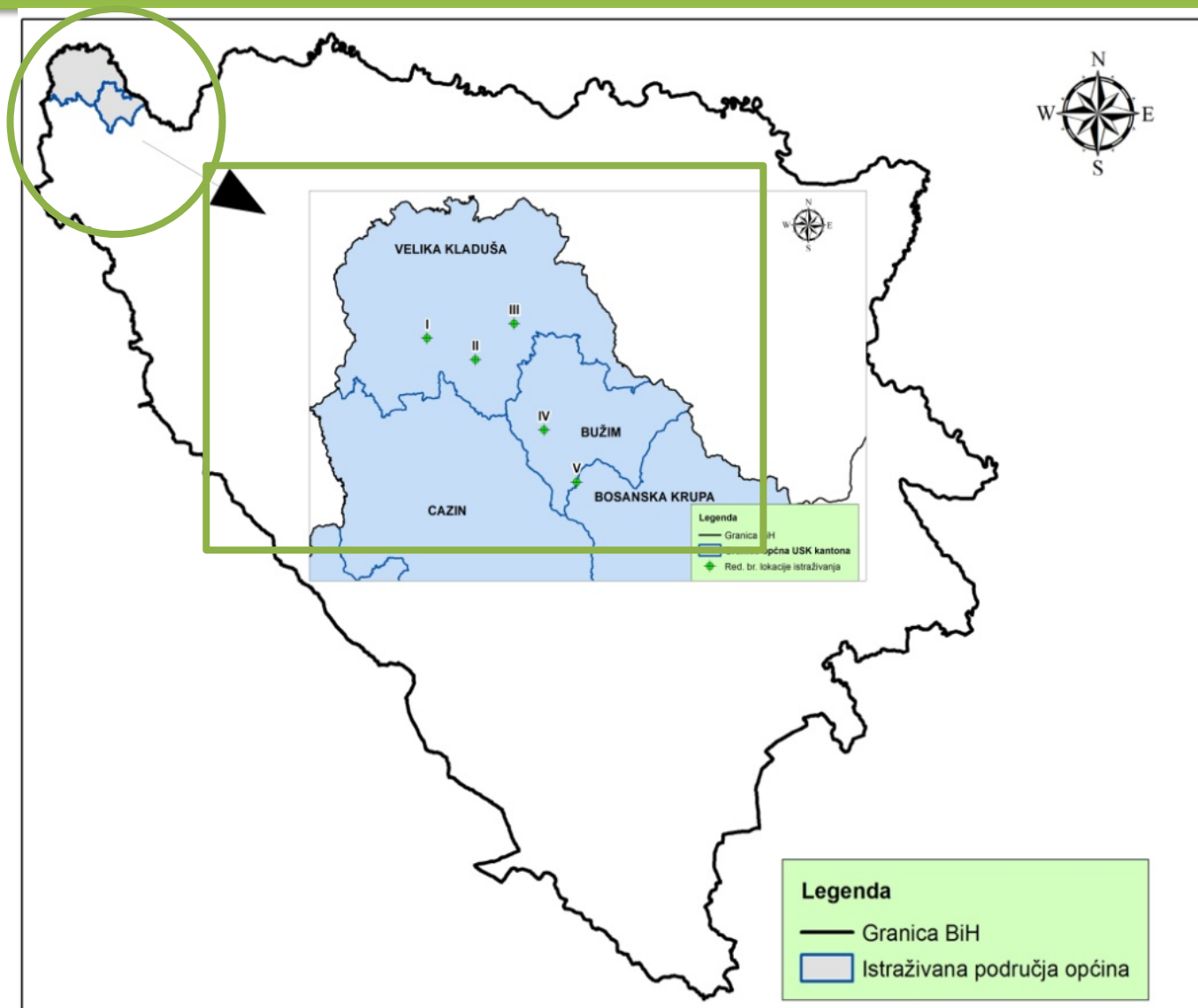


# AREAL PITOMOG KESTENA



# OBJEKAT ISTRAŽIVANJA

Lokalitet	Skraćenica
Karaula	I
Todorovo	II
Šestanovac	III
Velići	IV
Konjodor gaj	V



# OBJEKAT ISTRAŽIVANJA





# SELEKCIJA



# ISTRAŽIVANJA



## ✓ GENETSKE ANALIZE

✓ SSR MARKERI

✓ 96 INDIVIDUA

✓ 6 NUKLEARNIH MARKERA

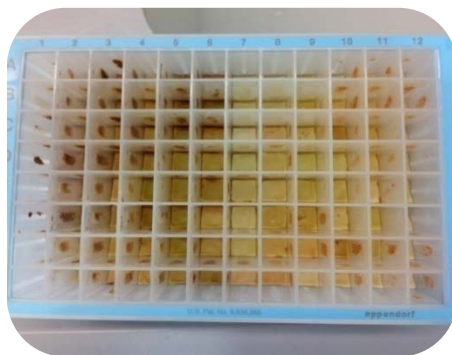
LOKUS	PONAVLJAJUĆI MOTIVI	SEKVENCA (5'-3')
ICMA004	(CT) <sub>37</sub>	F:ACCACAGAGAGAGCCACACC R: TTTTCATGAGCACGAAAGCTG
ICMA007	(AG) <sub>22</sub>	F:TAGTCACGCCTCTCCGTCTT R:GCCATTTGAGGACTGAGGTT
ICMA018	(CT) <sub>25</sub>	F:ACAACGATCCCAGACCAAAG R: CTAGGCGATCGGAGAGAGAC
ICMA020	(CT) <sub>15</sub> (AC) <sub>11</sub>	F:ACACCCACCTCCAAACACAT R: GAAAGTCGTGAGGAGGGAGA
ICMA023	(AG) <sub>14</sub>	F: GCATA CACAAGAATT ACCCTTCA R: AGGCGCCAAATGATGTTTC
QPZAG15	(AG) <sub>23</sub>	F:CGATTTGATAATGACACTATGG R: CATCGACTCATTGTTAAGCAC

# GENETSKA ANALIZE

## METOD RADA



DNK je izolovana iz zamrznutog materijala



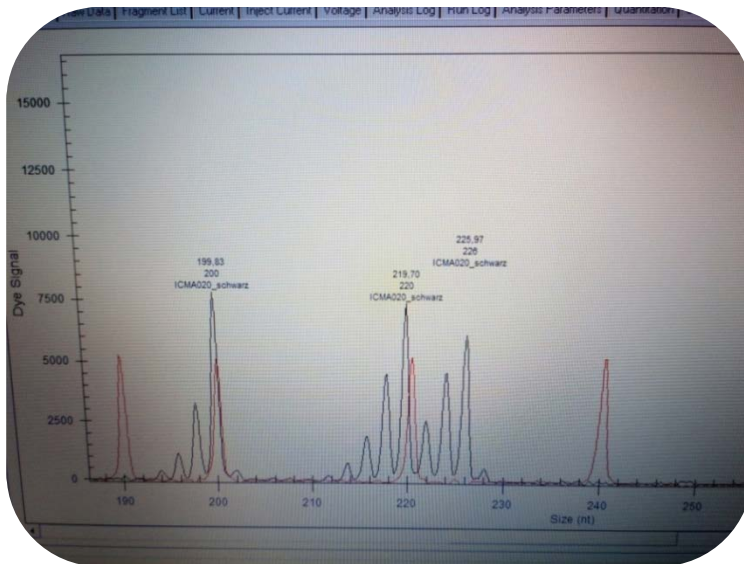
Izolacija DNK rađena je po **ATMAB** metodu

# GENETSKA ANALIZE

## METOD RADA



Višestruka PCR reakcija je obavljena pomoću fluorescentnih markera u dvije kombinacije A i B.



Vizualizacija i očitavanje

# REZULTATI ISTRAŽIVANJA



SOFTVER	SVRHA
<b>PGDSpider version 2.1.1.3.</b>	Formiranje ulaznih podataka Konverzija podataka
<b>GenAlEx version 6.5</b>	Prosječan broj alela Jedinstveni aleli Broj efektivnih alela PCo analiza Nei genetska distanca Mantel test
<b>F-STAT version 2.9.3</b>	Bogatstvo alela Parametri F- statistike Indeks genetičke diferencijacije
<b>Micro-Checker version 2.2.3.</b>	Nul aleli
<b>ARLEQUIN version 3.5.2.2.</b>	Analiza molekularne varijanse Uočena heterozigotnost Očekivana heterozigotnost Fiksacijski indeks, p –vrijednost Matrica vijednosti indeksa genetičke diferencijacije
<b>BOTTLENECK version 1.2.0.2</b>	Genetičko usko grlo
<b>STRUCTURE version 2.3.4.</b>	Procjena genetičke strukture
<b>Structure Harvester</b>	Određivanje najvjerojatnijeg broja klastera
<b>Past 138</b>	Multidimenzionalna ordinacija pomoću MDS
<b>DendroUPGM</b>	Klaster dendrogram iz matrice rastojanja

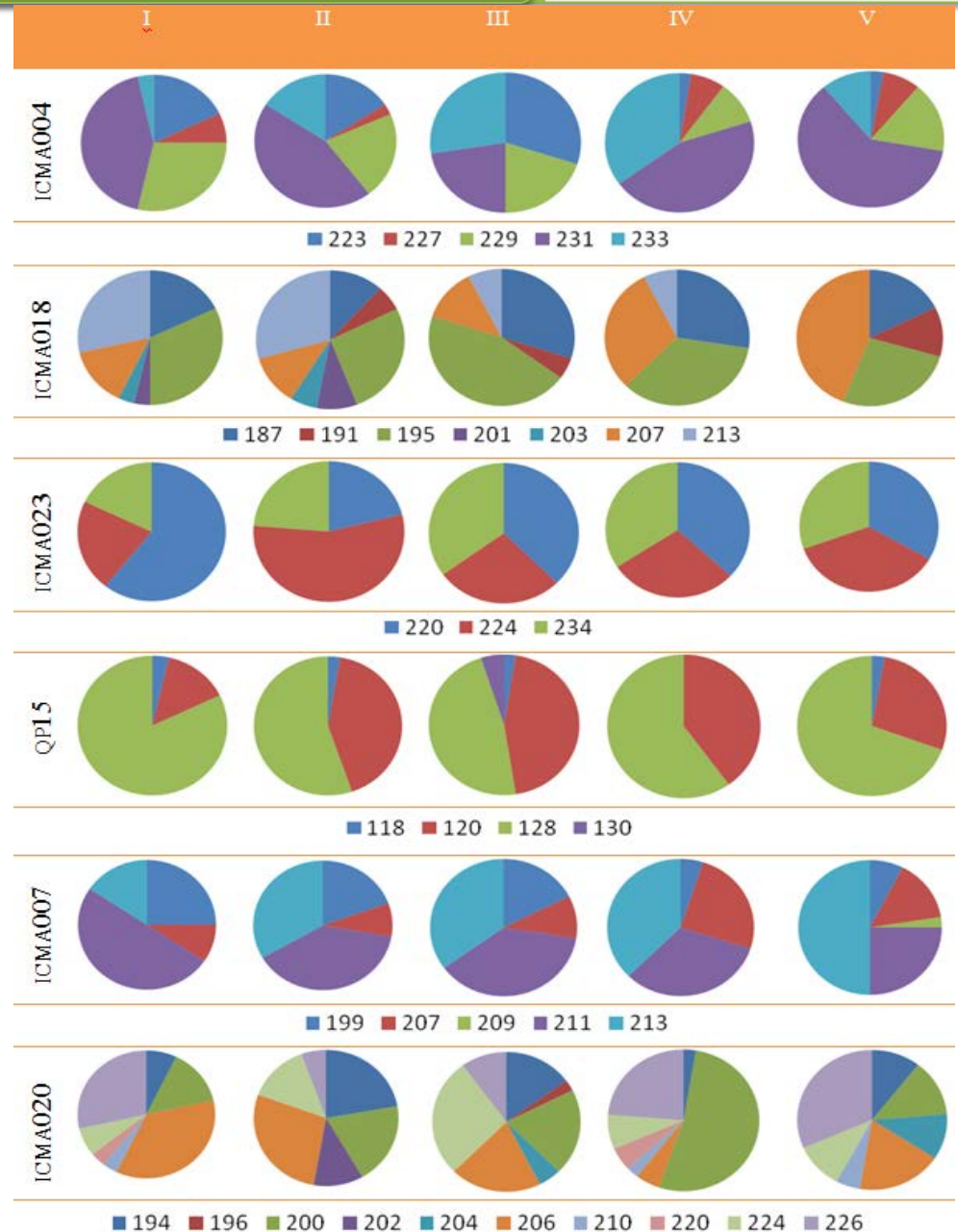
# REZULTATI ISTRAŽIVANJA

## ALELNA FREKVENCIJA

Broj alela po genskom lokusu po populacijama

GENSKI LOKUS	I	II	III	IV	V	UKUPAN
						BROJ ALELA
ICMA004	5	5	4	5	5	5
ICMA018	6	7	5	4	4	7
ICMA023	3	3	3	3	3	3
QPZAG 15	3	3	4	2	3	4
ICMA007	4	4	4	4	5	5
ICMA020	7	6	7	7	7	10
SUMA	28	28	27	25	27	34
PROSJEK	4,67	4,67	4,50	4,17	4,50	5,67

S obzirom na broj istraživanih populacija i broj lokusa u prirodnim populacijama pitomog kestena utvrđena je velika raznolikost alela.



# REZULTATI ISTRAŽIVANJA

## JEDINSTVENI ALELI

*Private alleles*

LOKUS	POPULACIJA					UKUPNO
	I	II	III	IV	V	
ICMA004	-	-	-	-	-	0
ICMA018	-	-	-	-	-	0
ICMA023	-	-	-	-	-	0
QPZAG 15	-	-	1	-	-	1
ICMA007	-	-	-	-	1	1
ICMA020	-	1	1	-	-	2
UKUPNO	0	1	2	0	1	4
PROSJEK	0	0,167	0,333	0	0,167	0,133

## BOGATSTVO ALELA

Allelic  
Richness

LOKUS	POPULACIJA					PROSJEK
	I	II	III	IV	V	
ICMA004	5.000	4.700	4.000	4.689	4.793	4.772
ICMA018	6.000	6.901	4.892	3.978	4.000	5.656
ICMA023	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000
QPZAG 15	3.000	2.700	3.615	2.000	2.824	2.775
ICMA007	4.000	3.986	3.995	3.915	4.673	4.128
ICMA020	7.000	6.669	6.393	6.331	6.952	7.152
PROSJEK	4.667	4.659	4.316	3.986	4.374	4.581

# REZULTATI ISTRAŽIVANJA

## EFEKTIVNI BROJ ALELA

*Effective alleles*

LOKUS	POPULACIJA					PROSJEK
	I	II	III	IV	V	
ICMA004	3,294	3,390	3,902	2,930	2,374	3,178
ICMA018	4,170	5,026	3,162	3,404	3,229	3,798
ICMA023	2,240	2,464	2,952	2,971	2,986	2,723
QPZAG 15	1,436	2,069	2,319	1,923	1,785	1,906
ICMA007	2,893	3,256	3,292	3,213	2,930	3,117
ICMA020	4,126	5,023	5,229	2,888	5,348	4,523
PROSJEK	3,027	3,538	3,476	2,888	3,109	3,207

## NUL-ALEL

Ni u jednoj od pet istraživanih populacija, niti ni na jednom od šest lokusa nije utvrđeno postojanje nul-alela.

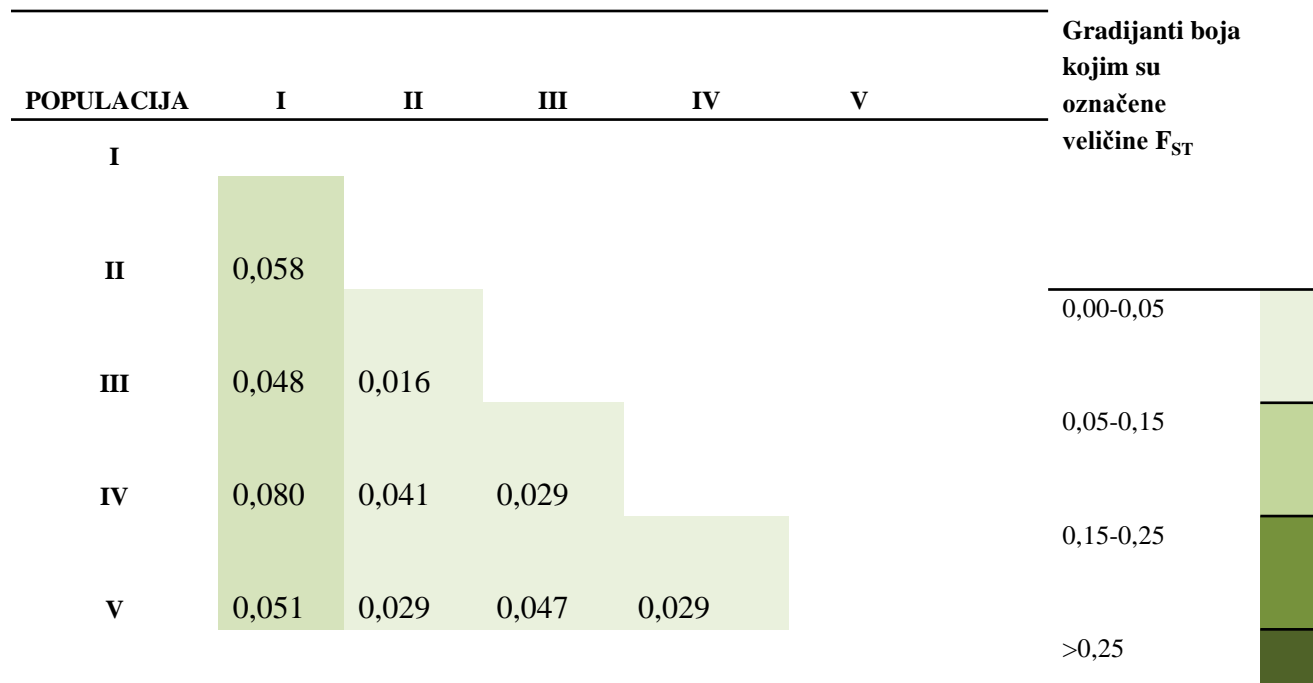


## REZULTATI ISTRAŽIVANJA

POPULACIJA	Ho	He	Fis
I	0,652	0,621	-0,059
II	0,733	0,685	-0,065
III	0,767	0,694	-0,100
IV	0,712	0,642	-0,116
V	0,680	0,641	-0,062
PROSJEK	0,709	0,657	-0,080

Uočena heterozigotnost ( $H_o$ ) u pet populacija je veća od očekivane heterozigotnosti ( $H_e$ ) što je rezultiralo negativnim vrijednostima fiksacionog indeksa ( $F_{IS}$ ).

# GENETIČKA DIFERENCIJACIJA POPULACIJE

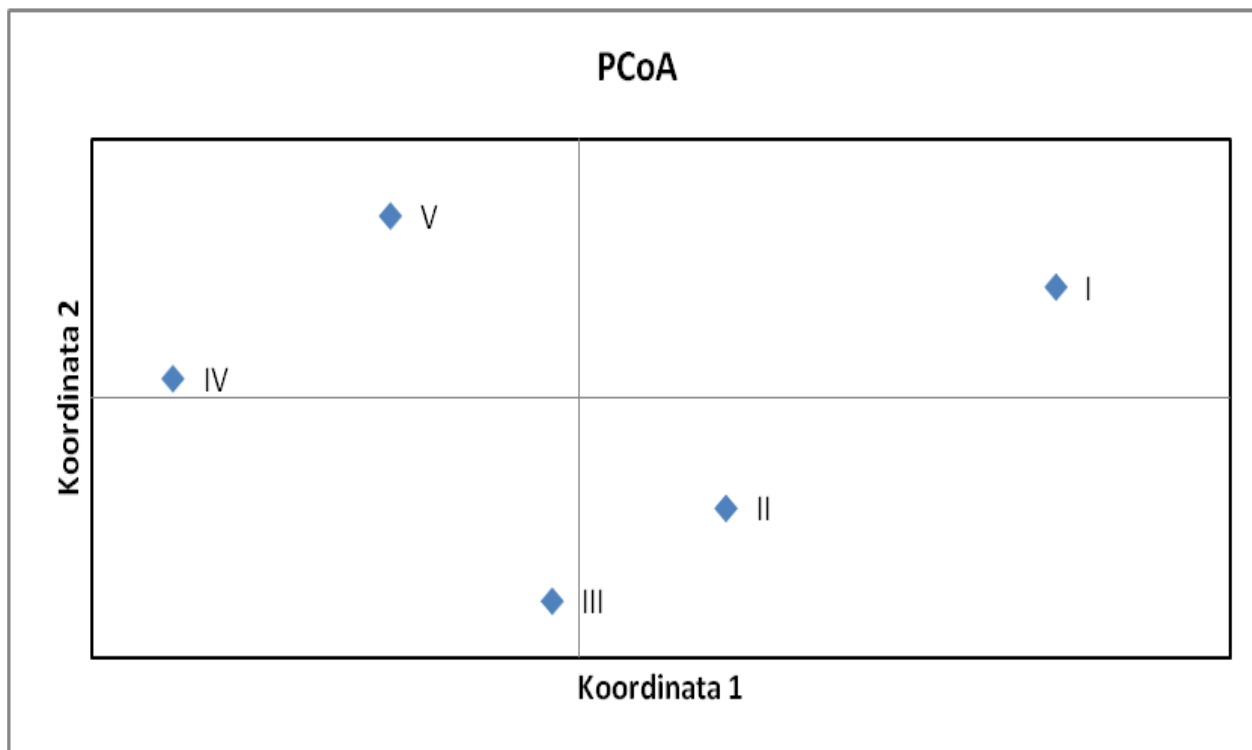


GLOBAL INDEX=0,045

# GENETSKA UDALJENOST

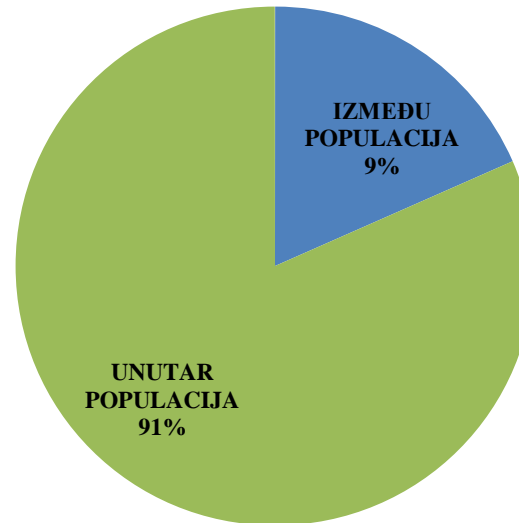
	I	II	III	IV	V	
I	0,000					I
II	0,155	0,000				II
III	0,177	0,109	0,000			III
IV	<u>0,208</u>	0,162	0,120	0,000		IV
V	0,165	0,143	0,174	<u>0,100</u>	0,000	V

# KOORDINATNA ANALIZA (Principal Coordinate Analysis – PCoA)



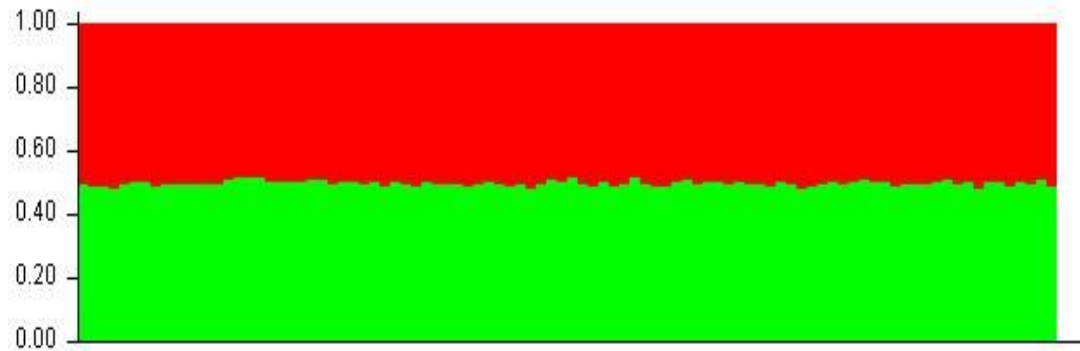
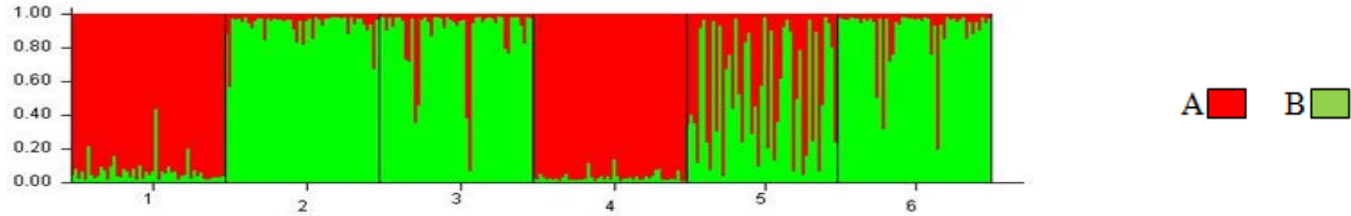
Posmatrajući prve dve koordinatne ose, koje su zajedno opisale 79,93% varijacija od ukupne količine varijacija, ispitivane populacija II i III su genetičke slične i grupišu se u jedan klaster, populacije IV i V čine drugi klaster dok su populacije I i IV najudaljenije.

# MOLEKULARNA VARIJANSA



Kod višegodišnjih drvenastih vrsta ukupna genetička varijabilnost je većim dijelom rezultat unutarpopulacijske varijabilnosti

# GENETIČKA STRUKTURA POPULACIJE

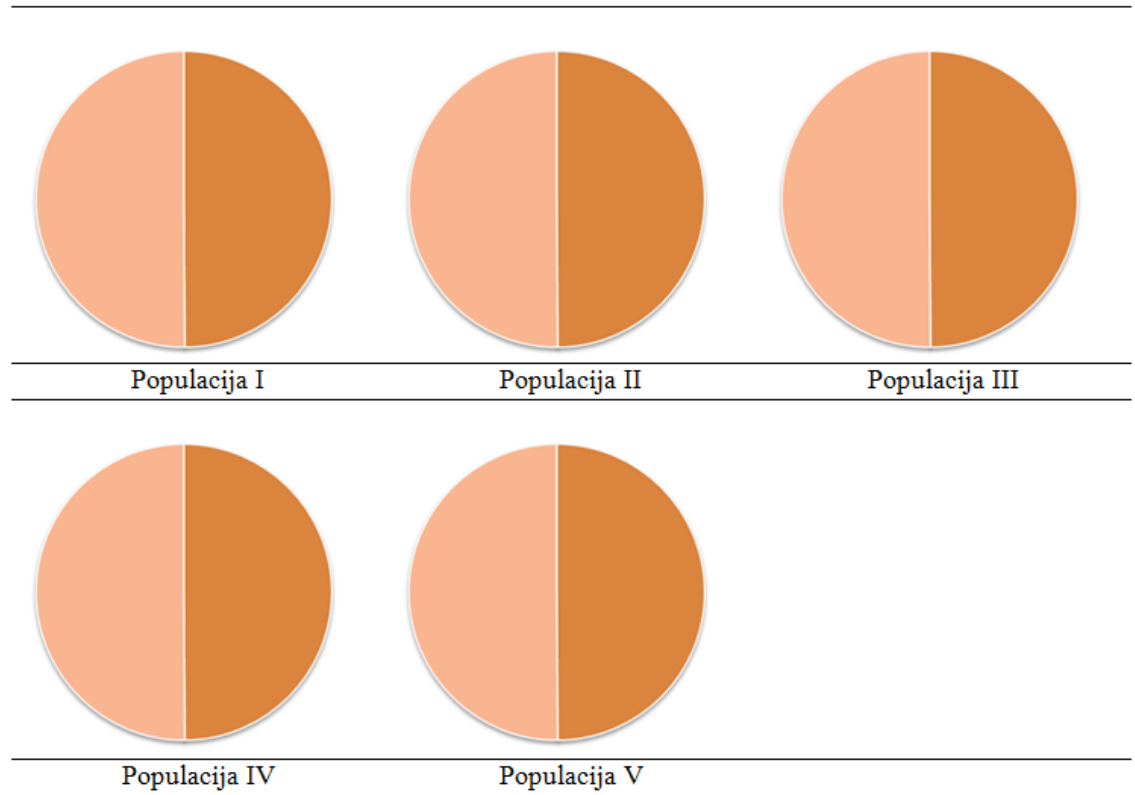


# GENETIČKA STRUKTURA POPULACIJE

POPULACIJA	K=2	
	Q1	Q2
I	0,499	0,501
II	0,496	0,504
III	0,497	0,503
IV	0,503	0,497
V	0,499	0,501

Prosječan udio pripadnosti (Q) istraživanih populacija pitomog kestena izvornim populacijama prikazan je u tabeli i na grafikonu.

## UDIO PRIPADNOSTI ISTRAŽIVANIH POPULACIJA



Kad je udio određene izvorne populacije jednak ili veći od 0,750 pretpostavlja se da jedinke pripadaju jednoj izvornoj populaciji, a ako je manji od 0,750 tada se pretpostavlja da jedinke imaju mješovito porijeklo iz dvije ili više populacija

## UPOREDNA GENETIČKA ANALIZA

Svojstvo	Naša istraživanja	BiH 6P 6L	BiH (2010) 3P 13L	HRVATSKA 10 P 10 L	BUGARSKA 6P 7L	IRAN 4P 10L
Alelna frekvencija	<b>5,67</b>	<b>8,17</b>	5,3	11,7	5,14	2,85
Privatni aleli	<b>4</b>	<b>2-7</b>	3-6	1-7	-	-
Efektivni aleli	<b>3,207</b>	<b>2,632</b>	-	-	3,928	2,163
Inbriding	<b>0</b>	<b>0</b>	-	0	2 od 6P	-
He	<b>0,657</b>	<b>0,588</b>	0,550	0,650	0,720	0,512
Fst	<b>0,045</b>	<b>0,190</b>	0,229	0,111	0,073	-
Molekularna varijansa	<b>91% 9%</b>	<b>82,6% 17,4%</b>	82,6 17,4	88,6% 11,4%	89,2 10,8	-



## UMJESTO ZAKLJUČAKA

- ✓ Pored uskog i isprekidanog rasprostranjenja pitomog kestena u Bosni i Hercegovini, postoji visok stepen njegove genetske varijabilnosti što pokazuje da pitomi kesten posjeduje potencijal za uspješno gajenje na različitim staništima.
- ✓ Poznavanje ekološke, morfološke i genetičke varijabilnosti pitomog kestena može osigurati da se donesu planovi za obnovu šuma pitomog kestena, njenu reintrodukciju, kao i očuvanje genetičke raznolikosti.
- ✓ Neophodno i urgentno je unapređenje povećanja površina pod kestenovim šumama u Bosni i Hercegovini.

## UMJESTO ZAKLJUČAKA

- ✓ Osnova za dalje oplemenjivanje pitomog kestena
- ✓ Osnova za osnivanje *ex-situ* i *in-situ* konzervacijskih jedinica za očuvanje genofonda ovog ugroženog plemenitog lišćara.

## DALJE AKTIVNOSTI

✓ Nema značajne razlike među populacijama

- Ukazuje na potrebu očuvanja pitomog kestena na individualnom nivou kao i daljem testiranju genetičkog diverziteta.
- Dalja istraživanja proširiti na ostale opštine u tom području kao i populacijama koje predstavljaju nastavak populacija sa areala iz Hrvatske
- Kroz sagledavanje genetičkog varijabiliteta dobiće se se jasnija slika unutarvrnsne varijabilosti (potencijalna varijabilnosti) koja će obezbjediti jasnije aktivnosti ne samo u transferu šumskog reproduktivnog materijala već i pravcima očuvanja genetičke raznovrsnosti.

## DALJE AKTIVNOSTI

✓ Dokazane velike međuindividualne razlike

-potrebu uzorkovanja velikog broja individual na populacionom nivou, ukoliko se želi obuhvatiti genetički diverzitet ove vrste prilikom *ex situ* konzervacije

-sakupljanje sjemena sa najmanje 50 stabala po svakoj populaciji ili što bi bilo bolje uzimanje vegetativnih djelova svih stabala u cilju vegetativnog razmnožavanja

## DALJE AKTIVNOSTI

✓ Detaljno definisati stanišne uslove

- Klimatske karakteristike
- Fitocenološke karakteristike
- Pedološke karakteristike
- Kao i svih drugih relevantnih pokazatelja za bliže i bolje upoznavanje stanišnih uslova na kojima se danas od prirode nalazi pitomi kesten

### ✓ Oplemenjivanje

-krjanji praktični cilj kome se teži u oplemenjivanju je stvaranje sjemenskih plantaža, koje će proizvoditi kvalitetno sjeme, gdje će se proizvoditi sadni material i osnivati kulture kvalitetnih tehnoloških svojstava, krupnog ploda, otporne na štetočine i bolesti, izdržljive na visoke i niske temperature, sušu itd.

-Nameće obaveza da se **pronađu i izdvoje sjemenski objekti** pitomog kestena ili sastojine, grupe stabala ili pojedinačna stabla kestena.

Budući radovi treba da idu u pravcu izdvajanja, bonitiranja i registrovanja sjemenski objekata pitomog kestena na području sjevero-zapadne BiH.

### ✓ Osnova za izdvajanje REGIONA PROVINIJENCIJE

-neophodan su detaljnija istraživanja koja bi bila instrument za realizaciju odredaba Zakona, posebno dijela kojim se reguliše promet šumskog reproduktivnog materijala, a koji proističe kao obaveza iz Uputstva Savjeta ministara Evropske zajednice 1999/105/EZ o prometu šumskog reproduktivnog materijala, kao i našeg članstva u OECD šemi šumskog reproduktivnog materijala

-Nameće obaveza da se **pronađu i izdvoje sjemenski objekti** pitomog kestena ili sastojine, grupe stabala ili pojedinačna stabla kestena.

Budući radovi treba da idu u pravcu izdvajanja, bonitiranja i registrovanja sjemenski objekata pitomog kestena na području sjevero-zapadne BiH.

## DALJE AKTIVNOSTI

### ✓ Obnova postojećih sastojina

-potrebno je intenzivirati selekciju, razmnožavanje i testiranje pitomog kestena u cilju dobijanja kvalitetnog sadnog materijala za obnovu postojećih sastojina.

-Neophodna je i selekcija plus varijanti iz mlađih prirodnih populacija, budući da je na ovaj način moguće selekcionisati nove genotipove koji će biti dobro adaptirani na specifična lokalna staništa.



## DALJE AKTIVNOSTI

Ekonomski razlozi i životne prilike u najkraćem vremenskom roku prisliće privatne vlasnike kao i preduzeća šumarstva, da ovoj vrlo korisnoj i vrijednoj vrsti, koja uspijeva u specifičnim prilikama, posvete punu pažnju i preuzmu odgovarajuće šumsko-gospodarske mjere.

**MORA SE NASTOJATI DA SE PROŠIRE POVRŠINE POD KESTENOM.**

Za zaštitu areala pitomog kestena, trebalo bi donijeti i **ZAKONSKE PROPISE** u pogledu uzgoja, njege, zaštite i koršćenja ovog vrijednog, korisnog i dragocijenog drveta.

## DALJE AKTIVNOSTI

Povećanje površina pod kestenom treba posvetiti naručitu pažnju ne samo radi šumarskih principa, nego i u cilju unapređenja privrede i povećanja produktivnih i korisnih sirovinskih izvora.



# HVALA NA PAŽNJI

