



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Poslijediplomski doktorski studij „Poljoprivredne znanosti”

Javna obrana teme doktorskog rada

20.11.2020.

Populacijska raznolikost dalmatinskog buhača
(*Tanacetum cinerariifolium* Trevir. /Sch./ Bip.)
na temelju analize sadržaja piretrina i SSR
biljega

STUDENT:

Filip Varga, mag. biol. exp.

STUDIJSKI SAVJETNIK/CI:

Doc. dr. sc. Martina Grdiša

Plan izlaganja

- **Uvod i pregled dosadašnjih istraživanja**
- **Ciljevi i hipoteze**
- **Materijali i metode**
 - Biljni materijal i postavljanje poljskog pokusa
 - Biokemijske analize
 - Razvoj mikrosatelitnih biljega
 - Genetske analize
 - Statistička analiza podataka
- **Očekivani znanstveni doprinos predloženog istraživanja**

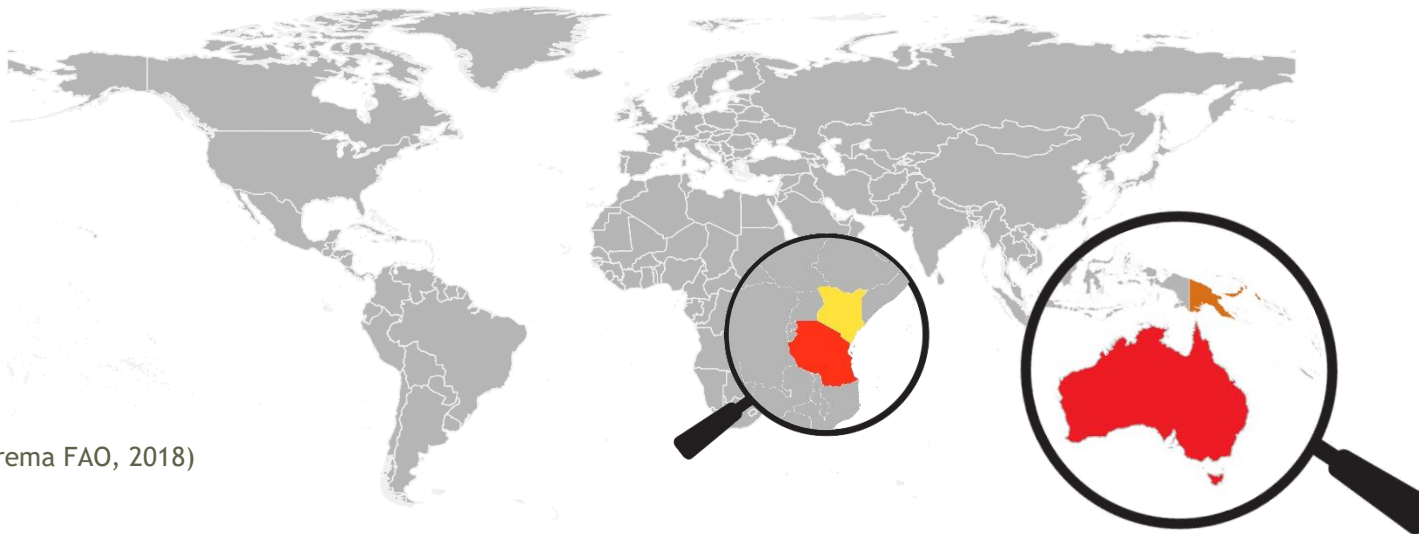


Autor: M. Grdiša

Uvod i pregled dosadašnjih istraživanja

Dalmatinski buhač

- *Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Sch. Bip. (Asteraceae)
- rasprostranjenost (Euro+Med, 2006; Nikolić, 2015), ekologija (Grdiša i sur., 2009) i morfologija vrste (Bhat, 1995)
- povijest uzgoja (Ožanić, 1955) i vodeći svjetski proizvođači (FAO, 2018)



Autor: F. Varga (prema FAO, 2018)

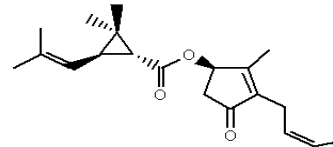


Autor: F. Varga (prema Euro+Med, 2006)

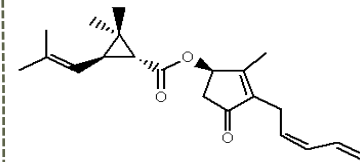
Uvod i pregled dosadašnjih istraživanja Piretrini

- piretrini - kemijski sastav (Casida, 1973) i insekticidno djelovanje (Davies i sur., 2007)
- samonikle populacije 0,36 do 1,3 % s prosjekom 0,86 % (Ambrožić i sur., 2007; Grdiša i sur., 2013)

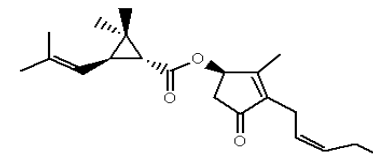
PYRETHRINS I



Cinerin I

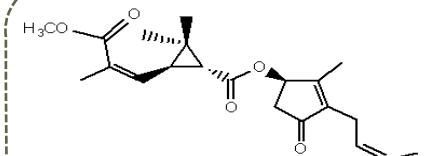


Pyrethrin I

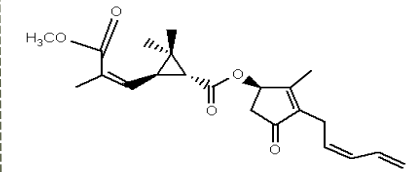


Jasmolin I

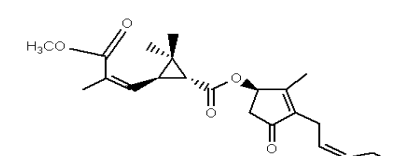
PYRETHRINS II



Cinerin II



Pyrethrin II



Jasmolin II

Uvod i pregled dosadašnjih istraživanja

Metode ekstrakcije piretrina

- utjecaj čimbenika na sadržaj piretrina u ekstraktu (Romdhane i Gourdon, 2002)
- do danas primijenjene metode za ekstrakciju piretrina
 - Soxhlet ili Soxtec (Otterbach i Wenclawiak, 1999; Kiriamiti i sur., 2003)
 - ultrazvučna ekstrakcija (Babić i sur., 2012; Grdiša i sur., 2013)
 - maceracija (Gallo i sur., 2017)
- nedavno optimizirana metoda disperzije matrice u čvrstoj fazi - MSPD (Biošić i sur., 2020)

Uvod i pregled dosadašnjih istraživanja

Genetska raznolikost buhača

- jedino istraživanje genetike samoniklih populacija buhača - AFLP (Grdiša i sur., 2014)
- prednosti mikrosatelitnih biljega (SSR) u odnosu na AFLP sustav biljega (Vieira i sur., 2016)
- izazovi u razvitku SSR-ova - veličina genoma (7,1 Gb), visokoponavljajuće sekvence (Yamashiro i sur., 2019)
- sekvenciranje nove generacije (Next Generation Sequencing - NGS)

Hipoteze i ciljevi

HIPOTEZE

1. Postoji unutar- i međupopulacijska raznolikost samoniklih populacija dalmatinskog buhača u sadržaju šest piretrinskih sastavnica
2. Sekvenciranje nove generacije može biti iskorišteno u razvoju mikrosatelitnih biljega za dalmatinski buhač
3. Samonikle populacije dalmatinskog buhača mogu se razdvojiti u dva zemljopisno odvojena genska skupa.

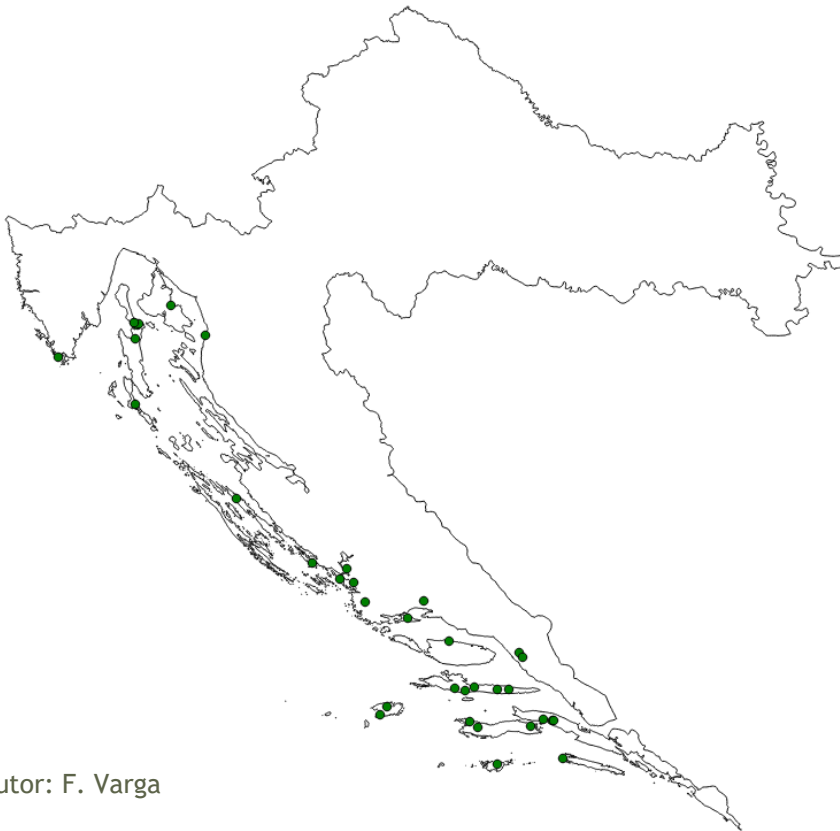
CILJEVI

1. Odrediti sadržaj i sastav šest piretrinskih sastavnica u uzorcima dalmatinskog buhača koristeći optimiziranu MSPD ekstrakcijsku metodu
2. Razviti mikrosatelitne biljege za dalmatinski buhač koristeći sekvenciranje nove generacije
3. Analizirati genetsku raznolikost dalmatinskog buhača na temelju razvijenih mikrosatelitnih biljega

Materijali i metode

Biljni materijal i postavljanje pokusa

PRIKUPLJANJE SJEMENA:



Autor: F. Varga

POLJSKI POKUS:

- uzgoj mladih biljaka u plasteniku u Maksimiru (Zagreb)
- presađivanje na pokušalište Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu
- poljski pokus u dvije repeticije po slučajnom bloknom rasporedu (20 biljaka po populaciji)

Materijal i metode

Biokemijske analize

- uzorkovanje cvatnih glavica
- sušenje u tami do sadržaja vlage 10-12%
- usitnjavanje pomoću Microtrona MB 550
- ekstrahiranje piretrina MSPD metodom (Biošić i sur., 2019)
- kvalitativno i kvantitativno određivanje piretrina - HPLC-DAD
- analiza kemijske raznolikosti



Autor: F. Varga



Izvor: Fisher scientific, 2020)



Autor: F. Varga



Autor: F. Varga

Materijal i metode

Razvoj mikrosatelitnih biljega

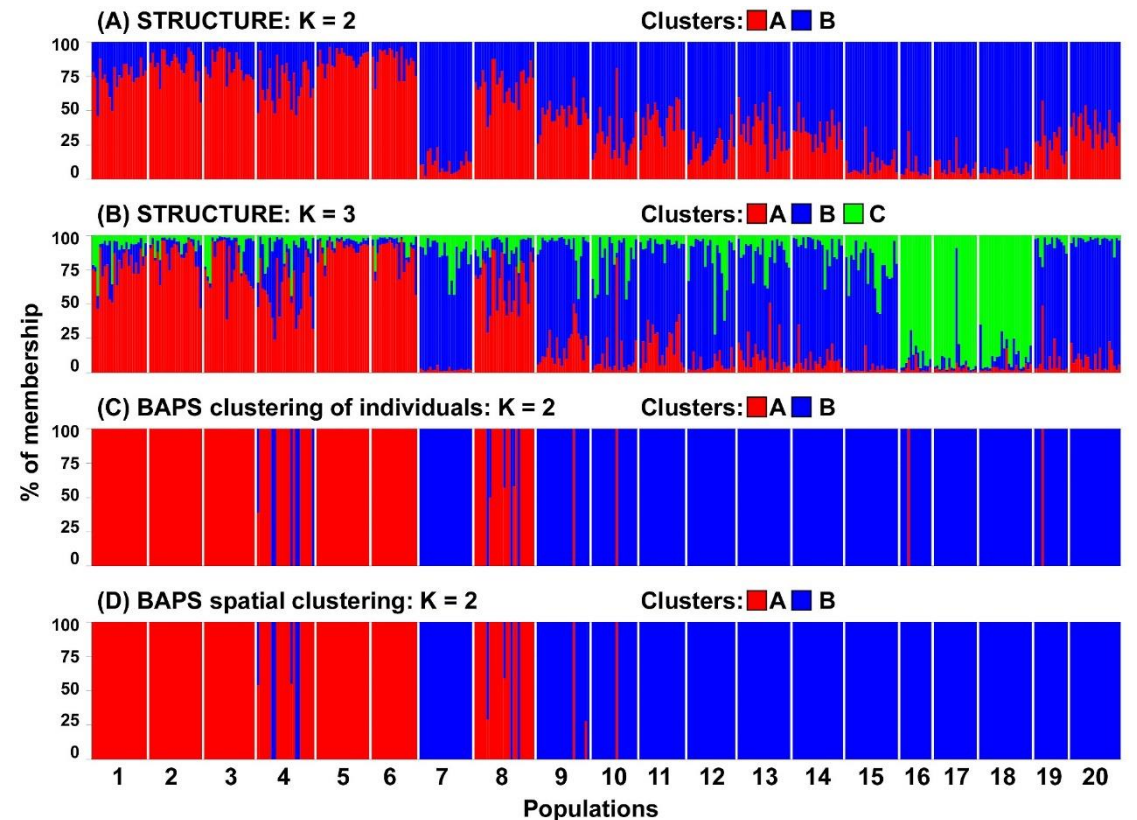
- Izolacija DNA (GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit)
- Sekvenciranje (NovaSeq6000 Illumina sekvencer)
- Identifikacija SSR biljega (MicroSATellite identification tool)
- Testiranje novorazvijenih biljega na polimorfizam (jedna populacija)



Izvor: Illumina, 2020

Materijal i metode Genetske analize

- novorazvijeni mikrosatelitni biljezi (15 SSR-ova) - najviša razina polimorfizma
- procjena genetske raznolikosti i strukture dalmatinskog buhača



Izvor: Grdiša i sur., 2014

Materijali i metode

Statistička analiza podataka

- U analizi podataka bit će uključena:

1. Analiza varijance, analiza glavnih komponenti, diskriminantna analiza na temelju sadržaja piretrina
2. Zapažena i očekivana heterozigotnost, informacijski sadržaj polimorfizma (PIC) i prosječni broj alela po lokusu za novorazvijene SSR-e
3. Procjena parametara populacijske genetike, unutarpopulacijske raznolikosti, izračun genetske udaljenosti između jedinki i populacija, AMOVA, analiza genetske strukture i procjenu broja genetskih skupova

- U svrhu analize podataka koristit će se sljedeći računalni programi:

1. SAS (SAS Institute Inc., 2004), PAST (Hammer i sur., 2001)
2. PowerMarker (Liu i Muse, 2005), Genepop (Raymond i Rousset, 1995)
3. Genepop (Raymond i Rousset, 1995), PHYLIP (Felsenstein, 2002), Arlequin (Schneider i sur., 2000), STRUCTURE (Pritchard i sur., 2000)

Očekivani znanstveni doprinos predloženog istraživanja

- poznavanje biokemijske i genetske raznolikosti dalmatinskog buhača presudno je u upravljanju i očuvanju biljnih genetskih izvora ove endemske i ekonomski značajne biljne vrste
- veliko genetsko i biokemijsko bogatstvo samoniklih populacija predstavlja potencijal za buduće oplemenjivačke programe usmjerene prema razvoju otpornosti na klimatske promjene, pogotovo u zemljama s dugom tradicijom uzgoja buhača

Hvala na pozornosti!

