

Оригинални научни рад

Original scientific paper

UDK: 630*232(496.11)

Александар Лучић¹

Василије Исајев¹

Снежана Младеновић-Дринић²

Љубинко Ракоњац¹

ANALIZA GENETIČKOG DIVERZITETA BELOG (*Pinus sylvestris* L.) I CRNOG BORA (*Pinus nigra* Arn.) U SRBIJI PRIMENOM PROTEINSKIH MARKERA

Izvod: U radu su prikazani rezultati proučavanja polimorfizma proteina semena belog (*Pinus sylvestris* L.) i crnog bora (*Pinus nigra* Arn.) kao najvažnijih ekonomskih vrsta iz roda *Pinus* u Srbiji. To je imalo za cilj bolje upoznavanje genetskog potencijala populacija tih vrsta, što bi omogućilo poboljšanje proizvodnje semena i sadnog materijala, a time i uspeh prilikom pošumljavanja i podizanja namenskih kultura ovih vrsta. Ujedno, dobijeni rezultati pružaju osnovu za bliže upoznavanje veoma varijabilne i specifične unutarvrstne genetičke strukture, što predstavlja polazno sredstvo u planiranju procesa konzervacija i oplemenjivanja vrsta. Polimorfizam proteinskih markera utvrđen je na osnovu odabranih genotipova poreklom iz sedam populacija (beli bor) i šest populacija (crni bor).

Ključne reči: beli bor, crni bor, seme, proteini, polimorfizam

¹ Institute of Forestry, Belgrade

² Maize Research Institute, Zemun Polje, Belgrade

DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY OF SCOTS PINE (*Pinus sylvestris* L.) AND AUSTRIAN PINE (*Pinus nigra* Arn.) IN SERBIA USING PROTEIN MARKERS

Abstract: Protein polymorphism of seeds was researched in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Austrian pine (*Pinus nigra* Arn.), as the most important economic species of the genus *Pinus* in Serbia. This was aimed at the better understanding of the genetic potential of their populations, which would improve the production of seeds and planting stock, and thus the success in afforestation and establishment of special purpose plantations of these species. At the same time, the study results offer the basis for a better knowledge of the highly variable and specific intraspecific genetic structure, which is the initial means in the planning of the species conservation and improvement processes. The polymorphism of protein markers was determined based on the selected genotypes originating from seven populations of Scots pine and six populations of Austrian pine.

Key words: pine, seed, proteins, polymorphism

1. UVOD

Vrste iz roda *Pinus* (beli i crni bor) su više od jednog veka u žiži šumarske naučne i stručne javnosti. Interesovanje za ove vrste vlada, iznad svega, zbog osobina koje ih karakterišu: veliki genetički potencijal i genetski varijabilitet, kao i taksonomska složenost i plastičnost vrste. Njegova zaštitna i meliorativna funkcija uspevanja na najtežim terenima se javila kao posledica izrazito malih zahteva prema staništu. Javljanje borova na velikim površinama zahvaćenim erozionim procesima, ili potpuno degradiranim, ogoljenim površinama na kojima daju odlične rezultate, svrstavaju ih u najvažnije ekonomske vrste korišćene u šumarstvu. Sve ove osobine borova su, pored velike prirodne rasprostranjenosti i disjuktivnosti areala, uzrokovale intenzivno unošenje i na staništa van prirodnog nalazišta, što kao rezultat ima veliki broj podvrsta, varijeteta i prelaznih formi. Rezultat ovakve prirodne varijabilnosti je veliki genetički potencijal koji nam daje osnovu i mogućnost uspešnog oplemenjivanja vrsta.

Imajući u vidu unapređenje koncepcija rasadničke proizvodnje, tj. tendenciju napuštanja proizvodnje sadnog materijala na nivou vrste (*Tucović, A., et al., 1990, Isajev, V., et al., 1998, Mataruga, M., et al., 1998*), a u cilju što efikasnijeg i bržeg ostvarivanja postavljenih zadataka, neophodno je bolje upoznavanje genetskog potencijala populacija belog i crnog bora, kako bi se uz njegovo usmereno korišćenje poboljšala proizvodnja semena i sadnog materijala, a time i uspesi prilikom pošumljavanja i podizanja namenskih kultura ovom vrstom.

Shodno navedenom problemu koji se postavlja pred savremeno šumarstvo, istraživanja u ovom radu imaju za cilj da se što bolje prouče i upoznaju genotipovi belog i crnog bora u Srbiji kao jednih od najvažnijih ekonomskih vrsta, nezamenjivih u pošumljavanju.

Uopšte četinari se karakterišu veoma visokim nivoom genetičke varijabilnosti *Hamrick* (1979) i mogući faktori za to su a) dug život, slobodno oprašivanje sa visokom plodnošću i b) divergentna selekcija za makro-mikro geografsku adaptaciju. Prema *Scaltsoyiannes* (1994) borove karakteriše visoka ukupna varijabilnost usled visoke unutarpopulacijske genetičke varijabilnosti, što ukazuje na značajnu genetičku diferencijaciju u lokalnim populacijama i mogućnost da isti aleli budu disitribuirani kroz čitav opseg vrsta.

Proteini semena kao genetički markeri su dosta korišćeni u proučavanju genoma crnog bora (*Nikolić et al., 1983; Mataruga, 2006; Isajev, 2007; Lučić et al. 2008*). U tim istraživanjima je ispitivana sistematska pripadnost pojedinih provenijencija, genetska varijabilnost i opravdanost unošenja pojedinih provenijencija na različite lokalitete.

Proučavajući izoenzime belog bora izdvojili su se *Wang* (1991), koji je proučavao izoenzime belog bora tri severno švetske populacije i četiri kineske populacije. *Szmidt* (1992) je u isto istraživanje uključio i četiri populacije belog bora iz Turske. *Plus-Glowacki* (1994) je analizirao 13 populacija belog bora obuhvativši gotovo sve značajne lokalitete u Evropi i istočnoj Aziji. Ti autori ukazuju na postojanje značajne genetičke izdiferenciranosti analiziranih populacija.

2. MATERIJAL I METOD RADA

Posle upoznavanja prirodnog areala i kultura belog i crnog bora u Srbiji, odlučili smo da objekti našeg istraživanja budu odabrane semenske sastojine nastale u prirodnim populacijama, semenske sastojine nastale u starijim kulturama i značajne prirodne populacije.

Na osnovu njihovih morfoloških (fenotipskih) i fizioloških karakteristika odlučili smo da u istraživanju obuhvatimo sedam populacija belog bora (tabela 1) i šest populacija crnog bora (tabela 2). Prostorni raspored populacija prikazan je na slici 1 i 2.

Slika 1: Ispitivane populacija belog bora
 Figure 1: The study Scots pine populations



Slika 2: Ispitivane populacija crnog bora
 Figure 2: The study Austrian pine populations



Tabela 1: Ispitivane populacije belog bora (*Pinus sylvestris* L.)

Table 1: The study Scots pine populations (*Pinus sylvestris* L.)

Redni broj	Populacija belog bora	Geološka podloga	Suma godišnjih padavina (mm)	Prosečna godišnja t (°C)
I	GJ „Dubočica Bare“ 60 a.; ŠG „Golija“ Ivanjica	Serpentinit	722.8	6.1
II	GJ „Šargan“, 25 b.; ŠG „Užice“ Užice	Serpentinit	962	7.1
III	GJ „Radočelo-Crepuljnik“ 4b.; ŠG „Stolovi“ Kraljevo	Serpentinit	716	11.0
IV	GJ „Jablanička reka“ 33 d.; ŠG „Rasina“ Kruševac	Škriljci-peščari	601	11.4
V	GJ „Bukovik-Aleksinački“, 23b, 24g.; ŠG „Niš“, Niš	Mikašist	651	9.8
VI	GJ „Kaluderske bare“, 1a.; NP Tara, Bajina Bašta	Serpentinit	977.3	5.6
VII	GJ „Zlatar I“, 22a.; ŠG „Prijeapolje“, Prijeapolje	Krečnjak	877	7.2

Tabela 2: Ispitivane populacije crnog bora (*Pinus nigra* Arn.)
Table 2: The study Austrian pine populations (*Pinus nigra* Arn.)

Redni broj	Populacija crnog bora	Geološka podloga	Suma godišnjih padavina (mm)	Prosečna godišnja t (°C)
I	GJ "Divan-Breze", 27a.; ŠG "Šumarstvo" Raška	Serpentinit	871.2	3.54
II	GJ "Divan-Lokva", 21a.; ŠG "Šumarstvo" Raška	Serpentinit	871.2	3.54
III	GJ "Crni vrh Ljeskovac", 69 c.; ŠG "Prijeopolje" Prijeopolje	Serpentinit	892.0	-
IV	GJ "Šargan", 22 b.; ŠG "Užice" Užice	Serpentinit	1053.0	5.0
V	GJ "Goč-Gvozdac", 92b.; Šumarski fax-Beograd-Goč	Serpentinit	841.0	-
VI	GJ "Studenica-Polumir", 17c, 26a.; ŠG "Stolovi" Kraljevo	Serpentinit	716.0	11.0

Seme je na ovim lokalitetima sakupljeno obaranjem stabala, čiji se broj kretao od 8 do 15 po svakoj populaciji. Sakupljeno je minimalno 100 šišarica po stablu, čije je seme zatim grupisano po stablima. Balk t.j. zbirni uzorak je formiran uzimanjem po 15 semenki od svake jedinke. Izolacija proteina je vršena po metodi Wang *et al*, 1994, dok je SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza izvedena je po metodi Leammli, 1970. Na osnovu dobijenih elektroforegrama utvrđene su kvalitativne i kvantitativne razlike (broj i raspored) proteinskih frakcija. Koeficijenti sličnosti su računati po metodi Sokal-a i Michener-a (SM) (1958).

Sokal i Michener
$$GS_{ij} = a+d/a+b+c+d$$

gde je:

- a** - prisustvo trake u oba genotipa *i* i *j* (1.1)
- b** - prisustvo trake kod genotipa *i* a odsustvo kod genotipa *j* (1.0)
- c** - prisustvo trake kod genotipa *j* a odsustvo kod genotipa *i* (0.1)
- d** - odsustvo trake i kod genotipa *i* i kod genotipa *j* (0.0)

Značajan aspekt na koji treba obratiti pažnju pri izboru koeficijenta, da li razmatra odsustvo traka kod genotipova koji se porede. Izabrana je metoda određivanja koeficijenta genetičke sličnosti po Sokal-u i Michener-u jer uzima u obzir i odsustvo traka kod oba genotipa (komponenta d). Izračunavanje koeficijenata sličnosti i klaster analiza vršeni su u NTSYS-pc softveru (Rofhl, 2000).

3. REZULTATI I DISKUSIJA

Polimorfizam proteinskih markera između populacija crnog i belog bora utvrđen je na osnovu odabranih genotipova unutar svake populacije. Na osnovu dobijenih elektroforegrama izračunati su koeficijenti genetičke sličnosti između ispitivanih populacija, Tabela 3.

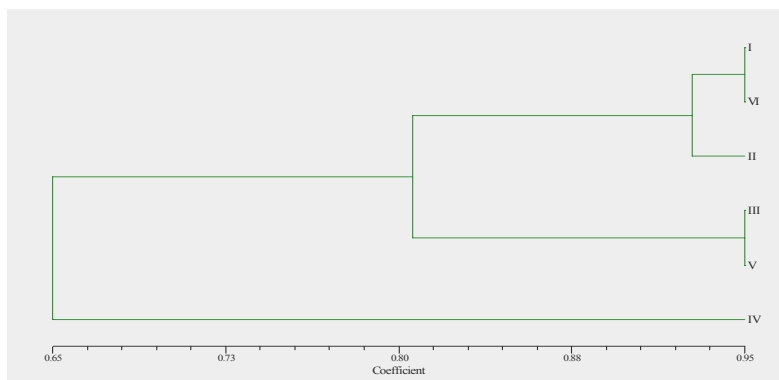
Tabela 3. Koeficijenti sličnosti po Sokal-u i Michener-u za beli i crni bor
 Table 3: Similarity coefficient after Sokal and Michener for Scots pine and Austrian pine

Beli bor \ Crni bor	Koeficijenti sličnosti po Sokal-u i Michener-u						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
I		0.73	0.60	0.67	0.53	0.60	0.73
II	0.91		0.47	0.53	0.53	0.87	0.60
III	0.77	0.77		0.80	0.67	0.47	0.87
IV	0.64	0.64	0.68		0.60	0.67	0.80
V	0.82	0.82	0.95	0.64		0.53	0.53
VI	0.95	0.95	0.82	0.68	0.86		0.60

Koeficijenti genetičke sličnosti za crni bor se javljaju u opsegu od 0.64 do 0.95, dok su koeficijenti genetičke sličnosti za beli bor od 0.47 do 0.87. To nam ukazuje na postojanje većeg genetskog varijabiliteta belog bora nego što je to slučaj sa crnim borom u Srbiji.

U cilju utvrđivanja genetičke bliskosti, odnosno udaljenosti, između proučavanih genotipova urađena je klaster analiza. Matrice koeficijenata genetičke sličnosti predstavljene kroz oblik dendograma daju bolju preglednost bliskosti ili udaljenosti samih populacija u odnosu na same koeficijente predstavljene u Tabeli 3. Međutim, očitavanje samih vrednosti sa diagrama je znatno teže, što opravdava praksu da se paralelno sa klasterima koriste i tabele koeficijenata sličnosti.

Grafikon 1. Dendrogram klaster analize populacija crnog bora po Sokal-u i Michener-u
 Diagram 1. Cluster analysis dendrogram of Austrian pine populations after Sokal and Michener

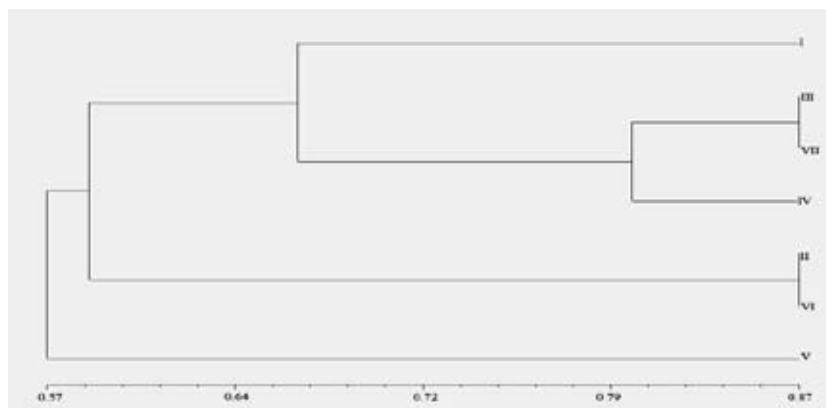


Karakteristično za klaster analize populacija crnog bora jeste izražena genetska raznovrsnost proučavanih populacija ispoljena kroz oblik dendograma. Može se uočiti da se na najmanjim genetičkim distancama nalaze populacije I (GJ “Divan-Breze”; ŠG “Šumarstvo” Raška) i VI (GJ “Studenica-Polumir”; ŠG “Stolovi” Kraljevo), kao i III (GJ “Crni vrh Ljeskovac”; ŠG “Prijepolje” Prijepolje) i V (GJ “Goč-Gvozdac”; Šumarski fax-Beograd-Goč). Populacija II (GJ “Divan-Lokva”; ŠG “Šumarstvo” Raška) je čvršće vezana za populacije I i VI nego III i V. Crni bor na Šarganu-IV je na najvećoj genetičkoj distanci u odnosu na ostale populacije.

Nešto veća genetička sličnost između populacija I, II i VI je bila i očekivana zbog male geografske distance samih populacija. Specifičnost populacije crnog bora na Šarganu IV u odnosu na druge populacije potvrđuje istraživanje Wheller-a (1976) koji preporučuje odgajivačima da traže seme sa karakteristikama koje je sakupljeno što bliže staništu Šargan u Srbiji.

Poređenje matrica sličnosti po Sokal-u i Michener-u urađeno je Mantelovim testom. Utvrđen je visok stepen korelacije između parova matrica koeficijenata sličnosti ($r=0,997$).

Grafikon 2. Dendogram klaster analize populacija belog bora po Sokal-u i Michener-u
Diagram 2. Cluster analysis dendrogram of Scots pine populations after Sokal and Michener



Analizom dobijenog dendograma za beli bor jasno se uočava da se na najmanjim genetičkim distancama nalaze populacije III (GJ “Radočelo-Crepuljnik” ŠG “Stolovi” Kraljevo) i VII (GJ “Zlatar I”, ŠG “Prijepolje”, Prijepolje), kao i II (GJ “Šargan”, ŠG “Užice” Užice) i VI (GJ “Kaluderske bare”, NP “Tara”, Bajina Bašta). Populacije IV (GJ “Jablanička reka”, ŠG “Rasina” Kruševac) i I (GJ „Dubočica Bare“ ŠG „Golija“ Ivanjica) su čvršće vezane za populacije III i VII nego za II i VI, pri čemu se većom distancom karakteriše populacija I. Populacija V je na najvećoj genetičkoj distanci u odnosu na ostale populacije.

Grupisanje populacije **III**, **VII** i **IV** u zoni veće bliskosti, možemo reći, obeleženo geografskom blizinom njih samih. Isti slučaj je i sa populacijama **II** i **VI**. Na drugoj strani, specifična je nešto veća genetička distanca populacije **I** u odnosu na ostale. To se objašnjava ne tako velikom geografskom distancom već izuzetnom izolovanošću populacije **I** Peštarskom visoravni kao i njenom gravitiranju ka šumama Crne Gore. Populacija **V** pokazuje najveću genetičku distancu u odnosu na ostale populacije. Istraživaajući šta je uzrok tome, došlo se do saznanja da je ta populacija podignuta pre oko 90 godina na oglednim površinama prve šumarske škole u Srbiji u Aleksincu, koja je bila pod patronatom Belgije i koju su zvali „belgijska šumarska škola“. Velika genetička distanca ide u korist pretpostavke da je ova populacija podignuta semenom koje vodi poreklo iz Belgije.

Poređenje matrica sličnosti po *Sokal-u* i *Michener-u* urađeno je Mantelovim testom. Utvrđen je visok stepen korelacije između parova matrica koeficijenata sličnosti ($r=0.95888$).

4. ZAKLJUČAK

Dobijeni rezultati analize indeksa sličnosti proteina semena ispitivanih populacija crnog bora pokazuju veliku varijabilnost, koja se kreće od 0.64 do 0.95, dok se kod belog bora javlja u diapazonu od 0.47 do 0.87. To nam ukazuje na postojanje većeg genetskog varijabiliteta belog bora nego što je to slučaj sa crnim borom u Srbiji.

Presudno na grupisanje populacija unutar klaster analize koeficijenata sličnosti za beli i crni bor je geografska blizina populacija. One populacije koje su geografski udaljene ili izolovane pokazuju značajnu genetičku distancu, kao što je to slučaj sa populacijom **I** belog bora u Dubočica Bare i populacijom **IV** crnog bora na Šarganu. Takođe, značajna genetička distanca populacije **V** belog bora u Aleksincu se javlja kao posledica podizanja šuma u periodu kada se nije obraćala pažnja na poreklo semena.

Dobijeni rezultati u ovom radu ukazuju na:

- Snažan uticaj geografske distance i izolovanosti populacija na genetičku izdiferenciranost.
- Postojanje značajne genetičke varijabilnosti populacija belog i crnog bora.

Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima istraživanja drugih autora, koji su mnogim provenijentnim testovima u svetu i kod nas pokazali kvalitet populacija crnog i belog bora sa ovih prostora, koje su ocenjene kao najbolje, najotpornije i sa najvećim genetskim varijabilitetom.

S aspekta komercijalnog šumskog semenarstva dobijeni rezultati iz ovog rada su od značaja jer ukazuju na činjenicu da su genetičke distance između analiziranih semenskih sastojina takve da to može imati uticaja na budući promet semenskog materijala u smislu njegove upotrebe u namenskoj rasadničkoj proizvodnji.

Takođe, dobijeni rezultati pružaju osnovu za bliže upoznavanje veoma varijabilne i specifične unutarvrzne genetičke strukture belog i crnog bora u Srbiji, što predstavlja polazno sredstvo u planiranju procesa konzervacija i oplemenjivanja vrsta.

5. LITERATURA

- Hamrich, J.L., Linhart. Y.B., Mitton, J.B., (1979): Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. Annual review of ecology and systematics 10: pp.173-200
- Isajev, V., Tucović, A., Mataruga, M. (1998): Unapređenje tehnologije pošumljavanja degradiranih staništa. Savetovanje 'Neki problemi šuma i voda i moguća rešenja'. JP Srbijašume, Beograd.
- Isajev, V. i Radotić, K., (2007). Varijabilnost aktivnosti peroksidaza i sadržaja teških metala u četinama linija polusrodnika crnog bora (*Pinus nigra Arnold*). Genetika“ Vol. 39, broj 2 (2007), str: 241-250:
- Laemlli, V. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: pp. 680 - 685.
- Lučić, A., Mladenović-Drinić, S., Isajev, V., Lavadinović, V., (2008): Polimorfizam proteina semena populacija crnog bora (*Pinus nigra Arnold*) u Srbiji. Peti naučno-stručni simpozijum iz selekcije i semenarstva. Vrnjačka Banja
- Mantel, N., (1967): The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research* 27: pp. 209-220
- Mataruga, M., (2006): Crni bor na stijenama, varijabilnost i mogućnost korišćenja. Šumarski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci. Banja Luka.
- Mataruga, M., Isajev, V. (1998): Mogućnosti testiranja i očuvanja biodiverziteta crnog bora (*Pinus nigra Arn.*) u specijalizovanim kulturama. *Zaštita prirode - Časopis Zavoda za zaštitu prirode*. Beograd. pp. 63-69.
- Nikolić, Đ., Tucić, N., (1983): Isoenzyme variation within and among population of European Black pine (*Pinus nigra Arnold*) *Silvae genetica* 32: pp. 80-89.

- Prus-Growacki, W., and Bernard, E., (1994): Allozyme variation in populations of *Pinus sylvestris* L. from a 1912 provenance trial in Pulawy (Poland). *Silvae Genetica* 43:pp.132-138
- Rohlf F. J., (2000): NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.0 Exeter Software, Setaket, N.Y.
- Scaltsoyiannes, A.,Rohr, R.,Panetsos, K., (1994):Allozyme frequency distribution in five european populations of black pine (*Pinus nigra* Arnold) *Silvae genetica* 43. 1 pp. 20-25.
- Sokal, R.R. and C.D. Michener (1958): A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ Kans Sci Bull* 38: pp. 1409-1438
- Szmidt, A. E., Wang, X. R., Lu, M. Y. (1992): Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L.) using haploid tissue analysis. *Heredity* 76: pp. 412-420
- Tucović, A., Isajev, V. (1990): Oplemenjivanje semena i sadnog materijala i pošumljavanje. Savetovanje: Savremene metode pošumljavanja, nege i zaštite u očuvanju i proširenju šumskog fonda Srbije. Zbornik radova, Arandelovac. pp. 72 – 81.
- Wang, C., K. Bian, H. Zhang, Z. Zhou and J. Wang (1994): Polyacrylamide gel electrophoresis of salt soluble proteins for maize variety identification and genetic purity assessment. *Seed Sci. Tech.* 21 (51).
- Wang, X-R., Szmidt, A., and Lindgren, D. (1991): Aozime differentiation among populations of *Pinus sylvestris* from Sweden and China. *Hereditas* 114: pp. 219-226
- Wheeler, N.C., Kriebel, H.B., Lee, C.H., Read, R. A., Wright, J. W. (1976): 15-Year Performance of European Black Pine in Provenance Test in North Central United States. *Silvae Genetica* 25.

DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY OF SCOTS PINE
(*Pinus sylvestris* L.) AND AUSTRIAN PINE (*Pinus nigra* Arn.) IN
SERBIA USING PROTEIN MARKERS

Aleksandar Lučić
Vasilije Isajev
Snežana Mladenović-Drinić
Ljubinko Rakonjac

Summary

*Protein polymorphism of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Austrian pine (*Pinus nigra* Arn.) seeds was researched. The genetic differentiation was analysed in seven Scots pine populations and six Austrian pine populations in Serbia. The study results confirm the existence of significant genetic variability of Scots pine and Austrian pine populations. The genetic differentiation of Scots pine populations was higher compared to Austrian pine populations. The results show a significant effect of geographic distance and isolation of the populations on genetic differentiation.*

The study results are significant because they offer the basis for a better knowledge of the highly variable and specific intraspecific genetic structure of Scots pine and Austrian pine in Serbia, which is the initial point in the planning of the species conservation and improvement processes. Also, they are the base of further research aiming at the improvement of seeds and planting stock production, and thus the success in afforestation and establishment of special-purpose plantations of these species.