



Genetska osnova insekticidnog potencijala dalmatinskog buhača (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Sch. Bip.)

Doc. dr. sc. Martina Grdiša
Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet
E mail: mgrdisa@agr.hr
Web stranica projekta: pyrdiv.agr.hr

Projekt je u cjelovitosti financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost



PROJEKTI TIM



Martina Grdiša
Zlatko Šatović
Filip Varga



Martina Biošić



Zlatko Liber
Ivan Radosavljević



**Marija Jug-
Dujaković**
Tonka Ninčević

Dalmatinski buhač

(*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./Sch. Bip.)

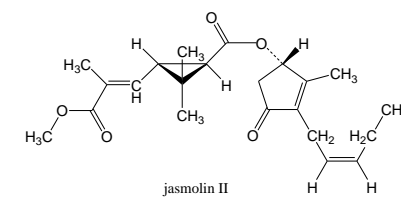
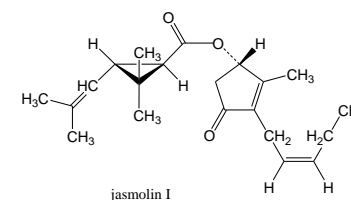
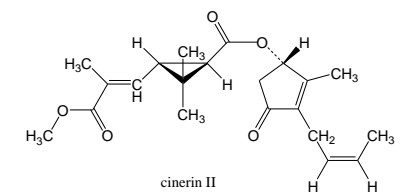
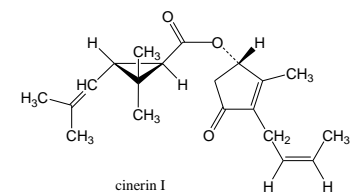
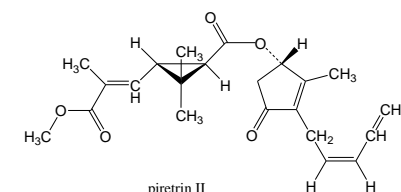
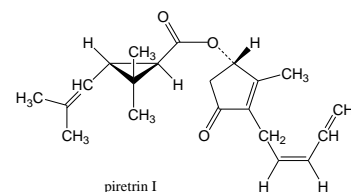


- višegodišnja, stranooplodna
- endemična vrsta istočne obale Jadranskog mora
- prirodno stanište: kamenjarski pašnjaci, kamenita, skeletna, degradirana staništa
- strogo zaštićena biljna vrsta

Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./Sch. Bip.)

PIRETRIN - prirodni insekticid

- piretrin I i II, cinerin I i II, jasmolin I i II
- piretrin I i II najzastupljeniji i najaktivniji
- kontakti insekticid
- djeluje na živčani sustav kukaca
- paraliza i smrt



Dalmatinski buhač

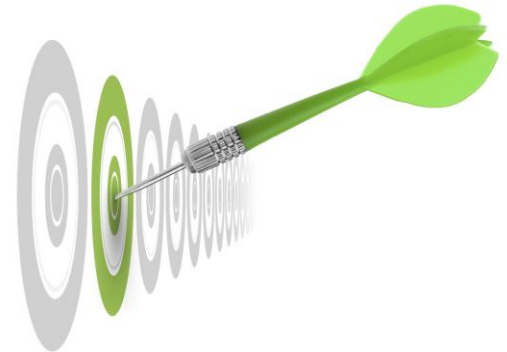
(*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./Sch. Bip.)

- povijest upotrebe i uzgoja
- upotreba osušenih cvatnih glavica u kućanstvima i hrvatskim poljodjelskim sustavima
- oko **1850.** započinje uzgoj u okolici Dubrovnika
- *'Flores Crisanthemi'* – prah osušenih cvatnih glavica
- od **1930.** godine drastično smanjene proizvodnje
- **1945.** godine Kenija vodeći proizvođač dalmatinskog buhača
- 60 - tih godine 20. stoljeća pokušaji revitalizacije uzgoja u Hrvatskoj - bezuspješno



Ciljevi projekta

- (1) Utvrđivanje genetske raznolikosti i strukture prirodnih populacija dalmatinskog buhača.
- (2) Utvrđivanje biokemijske raznolikosti dalmatinskog buhača.
- (3) Otkrivanje AFLP biljega vezanih za gene koji nadziru tvorbu piretrina pomoću pridružujućeg kartiranja.



Metodologija

- (1) Uzorkovanje sjemena prirodnih populacija i postavljanje poljskog pokusa
- (2) Genetske analize (SSR, AFLP, cpDNA)
- (3) Biokemijske analize (MSPD, HPLC-DAD)
- (4) Pridružujuće kartiranje



(1) Uzorkovanje sjemena i postavljanje poljskog pokusa

- areal prirodnog rasprostranjenja u RH
- 10 populacija, u 3 ponavljanja
- ukupno 300 uzoraka
- materijal za daljnje genetske i biokemijske analize
- Kolekcija ljekovitog i aromatičnog bilja
- vaučeri pohranjeni u ZAGR, FCD



(2) Genetske analize

(A) Razvitak mikrosatelitnih biljega (*SSR; Single Sequence Repeats*)

- multialelni, kodominantni i česti u genomu
- neizostavan alat u istraživanju populacijske genetike
- vrsno-specifični, pa ih je za svaku pojedinu biljnu vrstu potrebno razviti *de novo*
- **Sekvenciranja nove generacije** (*Next Generation Sequencing*)
 - omogućuje generiranje velikog broja ulomaka genomske DNA iz kojih je moguće identificirati mikrosatelitne motive i razviti odgovarajuće početnice

(A1) Primjena razvijenih biljega SSR u analizi genetske raznolikosti i strukture prirodnih populacija



(2) Genetske analize

(B) Biljezi AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Polimorfizam dužine umnoženih ulomaka

- sposobnost istovremenog otkrivanja velikog broja polimorfizama u različitim dijelovima genoma
- male količine DNA potrebne za analizu, ponovljivost i visoka rezolucija
- univerzalni i nisu potrebna prethodna znanja o primarnoj strukturi DNA za njihovo umnažanje

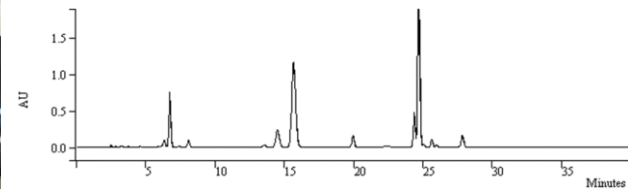
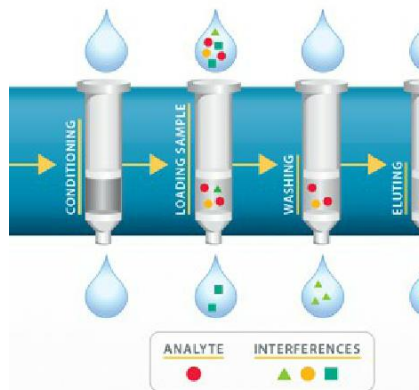
(C) Kloroplastna DNA

- amplifikacija 3 kloroplastne regije pomoću specifičnih početnica



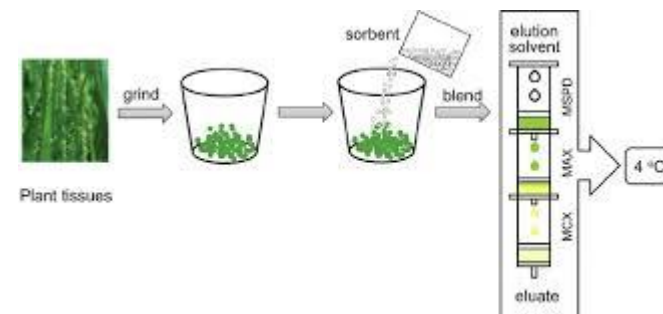
(3) Biokemijske analize

- (1) Optimizacija metode disperzije matrice u čvrstoj fazi (MSPD; *Matrix Solid Phase Dispersion*); volumen i vrsta otapala, vrsta sorbensa, omjer mase uzorka i sorbensa
- (2) Ekstrakcija piretrina iz realnih uzoraka
- (3) Kvalitativno i kvantitativno utvrđivanje šest sastavnica piretrina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)



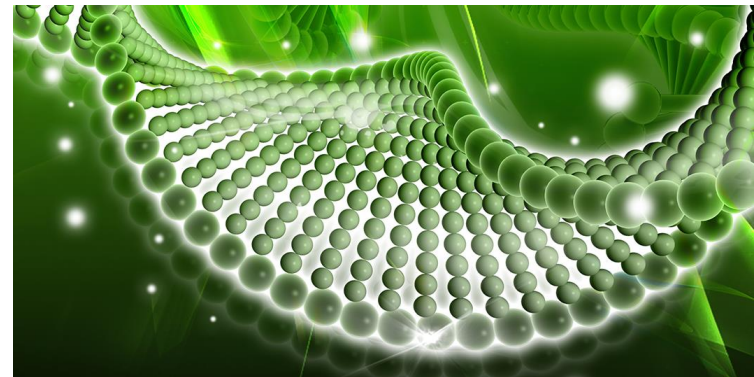
(3) Biokemijske analize

- mehaničko usitnjavanje biljnog materijala s krutim sorbentsom kako bi se u potpunosti usitnio biljni materijal i vezao na površinu sorbensa
- mješavina se zatim prenosi u kolonu i analiti se ispiru s odgovarajućim otapalom
- metoda ekstrakcije disperzijom matrice u čvrstoj fazi do sada nije optimizirana i primijenjena u analizi cvatova dalmatinskog buhača
- značaj u rutinskoj analizi
- **Prednosti:** manje količine otapala (toksičnost, troškovi zbrinjavanja), kratko vrijeme trajanja ekstrakcije, ekološki prihvatljivija, vremenski i financijski manje zahtjevna



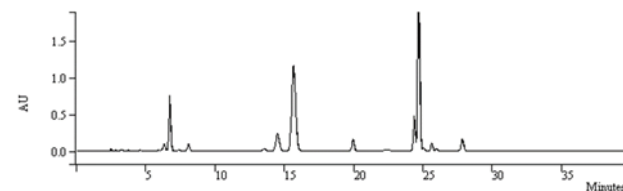
(4) Pridružujuće kartiranje

- utvrđivanje genetske raznolikosti prirodnih populacija dalmatinskog buhača je prvi korak za buduće pridružujuće kartiranje (*Association mapping*)
- povezivanje raznolikosti sadržaja piretrina s genetskom raznolikošću utvrđenom pomoću biljega AFLP, pri čemu će SSR biljezi biti korišteni za kontrolu populacijske strukture



Očekivani rezultati i doprinos

- (1) Razvijeni mikrosatelitni biljezi za dalmatinski buhač
- (2) Optimizirana metoda ekstrakcije disperzijom matrice u čvrstoj fazi (MSPD) za rutinsku analizu cvatova dalmatinskog buhača
- (3) Stečena saznanja o genetskoj i biokemijskoj raznolikosti dalmatinskog buhača koja su nužna za planiranje i razvoj strategija očuvanja ovih vrijednih biljnih genetskih izvora



Očekivani rezultati i doprinos

- (4) Identifikacija gena za sintezu piretrina i pripadajućih molekularnih biljega, što će ubrzati postupak oplemenjivanja dalmatinskog buhača na veća sadržaj piretrina na temelju odabira pomoću biljega (MAS – *Markers Assisted Selection*)
- (5) Doprinos razvoju novih pristupa u praćenju bioraznolikosti i očuvanju biljnih genetskih izvora
- (6) Temelj za razvoj budućih oplemenjivačkih programa i uvođenje dalmatinskog buhača u poljoprivrednu proizvodnju





Genetska osnova insekticidnog potencijala dalmatinskog buhača (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Sch. Bip.)

Doc. dr. sc. Martina Grdiša
Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet
E mail: mgrdisa@agr.hr
Web stranica projekta: pyrdiv.agr.hr