

INSTITUT ZA ŠUMARSTVO • INSTITUTE OF FORESTRY • BEOGRAD

ZBORNİK RADOVA

COLLECTION
TOM 44-45

Yu ISSN 0351-9147



BEOGRAD
2001.

INSTITUT ZA ŠUMARSTVO • INSTITUTE OF FORESTRY • BEOGRAD

ZBORNİK RADOVA

COLLECTION
TOM 44-45

Yu ISSN 0351-9147



BEOGRAD
2001.

INSTITUT ZA ŠUMARSTVO – BEOGRAD

Za izdavača:

Dr Zoran Tomović

•

Redakcioni odbor:

Dr CVETKO IVANOVSKI (BJR Makedonija)

Dr MILOŠ KOPRIVICA, Beograd

Dr RADOVAN MAROVIĆ, Beograd

Dr DANICA MINIĆ, Beograd

Dr NAUM PETKOV, Vraca (Bugarska)

Dr SLOBODAN ŠMIT, Beograd

Mr MILUN TOPALOVIC, Beograd

•

Glavni i odgovorni urednik

Mr MILUN TOPALOVIC, Beograd

•

Urednik-lektor

MILUTIN VUJOVIĆ, novinar

•

Prevod na engleski:

Mr ANA TONIĆ

•

Svi radovi su recenzirani

•

Unos, priprema i računarski slog:

BOJANA SAVIĆ

•

Tiraž:

300 primeraka

•

Štampa: "Želnid", Beograd, Nemanjina 6

SARDŽAJ • CONTENTS

Srđan Bojović, Phillipe Heizmann, Marcel Barbero

DNK PLIMORFIZAM POPULACIJE CRNOG JASENA

(Fraxinus ornus L.) • DNK polymorphism of manna ash.....1

Boro P. Pavlović, Nevenka Pavlović, Dragana Stojičić,

Božica Stević, Dušanka Kukobat

REALIZACIJA BIOTIČKOG POTENCIJALA SVILENE BUBE

PRI ISHRANI LISTOM DUDA IZ ZAGAĐENIH PODRUČJA

• Realization of biotic potential of silkworm feeding on mulberry leaves
in polluted regions.....7

Miloš Koprivica, Vera Lavadinović, Nenad Marković

TABLICE ZA PROCENU ZAPREMINE STABALA DUGLAZIJE MALIH

DIMENZIJA • Tables for volume estimation of Douglas-fir small-size trees.....15

Zoran Miletić, Milun Topalović, Čedomir Burlica

HIDROLOŠKE KARAKTERISTIKE SERPENTINITSKIH ZEMLJIŠTA

I NJIHOVA ERODIBILNOST • Hydrological characteristics of serpentinite soils

and their erodibility21

Pero Radonja

EFIKASNI POSTUPCI IZRAVNAVANJA VISINSKE KRIVE PRIMENOM

METODA VEŠTAČKE INTELIGENCIJE • Eficiency procedure of height curve

fitting using artificial intelligence method.....37

Ljubinko Rakonjac

UTICAJ TEHNOLOŠKIH POSTUPAKA POŠUMLJAVANJA I STANIŠNIH

USLOVA NA RAZVOJ ŠUMSKIH KULTURA CRNOG I BELOG BORA

NA PEŠTERSKOJ VISORAVNI • Effect of technological methods of afforestation

and site factors on the development of forest plantanitions of Austria pine

and Scots pine on Pešterska visoravan51

Slavica Radojičić

UTICAJ EKSPOZICIJE I NAGIBA TERENA NA STEPEN UGROŽENOSTI

KULTURA CRNOG BORA (Pinus nigra Arn.) NA SUVOBORU

• Effect of exposure and slope on the degree of endangerness of Austrian pine

(Pinus nigra Arn.) plantations on Suvobor65

Vesna Golubović-Ćurguz

- NEKI ASPEKTI GLJIVE *Ophiostoma piceae* - IZAZIVAČA VASKULARNE MIKOZE *Quercus petraea* L. • Some aspects of the fungus *Ophiostoma piceae* - agent of *Quercus petraea* L. vascular mycosis79

Milorad Veselinović

- ZNAČAJ POZNAVANJA MORFOLOŠKIH PROMENA U TOKU RAZVOJA AHENIJA - "SEMENA" BELE LIPE (*Tilia tomentosa* Moench.) ZA ODREĐIVANJE VREMENA BRANJA I SETVE • The importance of recognizing the morphological changes during the development ahenia seed of white linden (*Tilia tomentosa* Moench) for the term determination of its picking and planting87

Radovan Nevenić

- GIS KAO ORUĐE U PRISTUPU EKOLOŠKOG PLANIRANJA • GIS as a tool in ecological planning approach99

Radovan Nevenić

- PLANERSKI PRISTUP USTANOVLJAVANJA PROSTORNIH KONFLIKTNIH SITUACIJA - EKOLOŠKI I PROSTORI MODELI • Identification of open space conflict situation, ecological and open models an planning approach105

Slavko Vlatković, Ljiljana Brašanac

- PRIRODNA HRANA ŠUMSKIH PODRUČJA I ISHRANA SPORTISTA • Natural food from forest areas and sports nutrition.....117

Mara Tabaković-Tošić

- CYNIPIDAE I CECIDOMYDAE U KITNJAKOVIM ŠUMAMA VELIKOG VLAHA I BUKOVIKA • Cynipidae and cecidomydae in sessile oak forests of Veliki Vlah and Bukovik129

UDK 630.165:575:582.931.4 Fraxinus
Originalan naučni rad

DNK POLIMORFIZAM POPULACIJE CRNOG JASENA (*Fraxinus ornus* L.)

Srđan Bojović, Philippe Heizmann, Marcel Barbero

I z v o d: Ispitivana je mogućnost otkrivanja genetičkog varijabiliteta crnog jasena (*Fraxinus ornus* L.) primenom RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) molekularnih genetičkih markera. Konstatovan je varijabilitet među 20 odraslih stabala iz populacije u dolini reke Vezubi, u okolini Nice u Francuskoj, pri testiranju sa 20 prajmera. Polimorfna su 54 (80%) od ukupno 67 lokusa. Veličina fragmenata varira od 0,34 do 2,3 Kb.

K l j u č n e r e č i: genetički varijabilitet, Random Amplified Polymorphic DNA-RAPD, *Fraxinus ornus* L., populacija

DNK POLYMORPHISM OF MANNA ASH (*Fraxinus ornus* L.) POPULATION

A b s t r a c t: The possible genetic differentiation between Manna ash (*Fraxinus ornus* L.) trees was examined by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) molecular genetic markers. Twenty tested RAPD decamer oligodeoxynucleotide primers reveal RAPD variation between 20 adult trees from population in the valley of the river Vésubie (near Nice, France). From 67 loci 54 (80%) was polymorphic. The size of fragments has varied from 0.34 to 2.3 Kb.

K e y w o r d s: genetic diversity, Random Amplified Polymorphic DNA-RAPD, *Fraxinus ornus* L., population.

Dr Srđan Bojović, naučni saradnik, JP "Srbijašume" - Institut za šumarstvo, Beograd; prof. Philippe Heizmann, reconnaissance cellulaire et amélioration des plantes, Ecole normale supérieure, Lion, France; prof Marcel Barbero, Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléocologie, Marseille, France.

1. UVOD

Crni jasen (*Fraxinus ornus* L.) je mediteranska vrsta drveća široke ekološke amplitude i izražene varijabilnosti značajna u pošumljavanju i zaštiti zemljišta od erozije.

Tendencija savremene šumarske nauke je upotreba molekularnih genetičkih markera u istraživanju (bio)diverziteta šumskog drveća (Müller-Stark *et al*, 1992). Poslednjih nekoliko godina sve češće se primenjuju takozvani RAPD markeri nastali 1990. godine (Williams *et al*, 1990). U genetičkim istraživanjima šumskog drveća radi se uglavnom sa četinarima i tropskim vrstama drveća (iz ekonomskih razloga, odnosno većeg interesa za eksploataciju drvne mase) (Nelson *et al*, 1993; Echt *et al*, 1996). Za većinu evropskih listopadnih vrsta drveća genetičke analize su retke ili ne postoje. Genetički polimorfizam roda *Fraxinus* vrlo je retko istraživan (Jandroz and Pugin, 1995, Jandroz *et al*, 1997); sa aspekta RAPD genetičkih markera do sada nepoznat.

Cilj ovoga rada je da se ispita da li RAPD markeri otkrivaju genetički varijabilitet u populaciji crnog jasena (*Fraxinus ornus* L.).

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Biljni materijal

Analizirano je 20 odraslih stabala crnog jasena *Fraxinus ornus* L. iz populacije sa jugoistoka Francuske, okolina Nice, doline reke Vézubi (Vallée de la Vésubie); geografske koordinate: 43° 56' SGŠ i 7° 15' IGD; nadmorska visina: 500 m; podloga: krečnjak; klima: mediteranska; asocijacija: *Ostryo-Seslerietum autumnalis* (Barbero *et al*, 1971)

2.2. Izdvajanje DNK

Približno 5 g lišća je mleveno u fini puder sa kvarcnim peskom. Puder je stavljan u 21 ml ekstrakcionog pufera (0,1M Tris-HCl pH 8; 0,05M EDTA pH 8; 0,1M NaCl; 1% SDS). Homogenat je zatim inkubiran 20 min. na 65°C uz povremeno mešanje.

Sedam ml kalijum acetata 5M (pH 9,25) je dodano i tuba je smeštena 20 min na led (0°C). Posle centrifugiranja (3.500 rpm, 0°C, 20 min), 1ml amonijum acetata 10M pH 7,5 i 1 volumen izopropanola je dodano i smešteno na led 20 min. Talog dobijen posle centrifugiranja (3.500 rpm, 0°C, 10 min) je ispiran sa 70% etanola, sušen i potopljen u 1 ml pufera Tris 50 mM, pH 7,5 / EDTA 10 mM. Rastvor je inkubiran 30 min. na 37°C sa RNase A (100 g/ml) a zatim volumen

dopunjen do 6 ml sa Tris 10 mM, pH 7,5 / EDTA 1 mM i tretiran sa fenol/hloroformom (1:1).

Tečna faza je odstranjena i ostavljen DNK talog dodavanjem 1/10 volumena amonijum acetata 7M (pH 7,35) i 1,5 volumena izopropanola. Da bi se eliminisali tragovi fenola DNK talog je tretiran sa 70% etanola. Finalni talog je sušen u vakumu i rastvoren u 1 ml TE pufera i stokiran na 4°C.

2.3. Amplifikacija DNK

Amplifikacija je ostvarena sa 100 ng DNK za 25 µl totalnog volumena, sa 2, µl reakcionog pufera PC2 10X (Ab Peptides), 5nM dNTP (200 µM), 50 pM svakog oligonukleotidnih graničnika (prajmera) (2 µM) i 3,75U Klen Taq polimeraze (Ab peptides). Testirano je dvadeset RAPD prajmera: (kit H sa 20 prajmera u kitu) nabavljen od Operon Technologies (Alameda, California, USA). Amplifikacija DNK je ponovljena najmanje dva puta kako bi se uverilo u stabilnost fragmenata.

Programom Termociklera kontrolisani su preliminarna denaturacija (3 min na 94°C), ciklusi denaturacije, hibridizacija, sinteza i finalna sinteza (5 min na 72°C). DNK fragmenti su razdvajani elektroforezom na 1,5% skrobnom gelu u TAE puferu (Tris-base 40mM, natrijum acetat 20 mM, EDTA 1mM, pH 7,2).

3. REZULTATI I DISKUSIJA

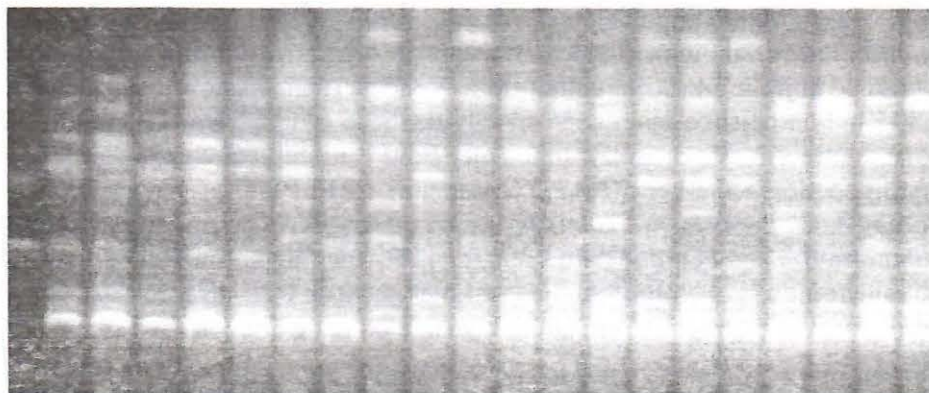
Pronađeni su prajmeri koji otkrivaju individualni varijabilitet crnog jasena (tab. 1). Ovo je do sada, koliko nam je poznato, prva konstatacija RAPD varijabiliteta u prirodnim populacijama *Fraxinus ornus* L. Među 20 oligonukleotida raspoloživih u laboratoriji selekcionisano je 4 informativna prajmera sa 67 lokusa od kojih je 54 (80%) polimorfnih. Veličina fragmenata varira od 0,34 do 2,30 Kb. Ponovljeni eksperimenti su dali identične rezultate što je potvrdilo njihovu upotrebljivost. U istraživanju genetičkog varijabiliteta 2 vrste topola sa 3 vrste genetičkih markera (RAPD, izoenzimi i RFLP) Liu and Furnier (1993) kod *Populus tremuloides* otkrivaju 61 RAPD fragmenta (100% polimorfnih) i kod *Populus grandidentata* 49 RAPD fragmenata (od čega 87,5% polimorfnih) sa veličinom fragmenata koja varira od 0,33 do 2,75 Kb. Njihov otkriveni RAPD genetički varijabilitet veći je od onog dobijenog sa izoenzimima ili RFLP markerima.

Umnožavanje nasumičnih DNK sekvenci – RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) je jedna od varijanti *in vitro* reakcije lančanog umnožavanja DNK sekvenci-PCR-a (*Polymerase Chain Reaction*). Za razliku od PCR-a umnožavanje nije selektivno, odnosno fragment koji se umnožava nije unapred poznat, što je gotovo pravilo kad je šumsko drveće u pitanju. Neki autori već su

potvrdili upotrebljivost ovih markera u izučavanju individualnog varijabiliteta šumskog drveća: *Isabel et al* (1993) kod *Picea mariana* (Mill.) B.S.P., *Jermstad et al* (1994) kod *Pseudotsuga menziessi* (Mirb) Franco, *Binelli and Bucci* (1994) kod *Picea abies* Karst., *Vicario et al* (1995) kod *Abies alba* Mill. i *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei, *Khasa and Dancik* (1996) kod *Picea glauca* (Moench) Voss i *Picea engelmannii* Parry, *Wang et al* (1994) kod *Paulownia taiwaniana* Hu and Chang, *Sale et al* (1996) kod *Eucalyptus amygdalina* Labill. i *E. risdonii* Hook.f., *Verhaegen and Plomion* (1996) kod *Eucalyptus urophylla* i *E. grandis*. Tendencija savremene šumarske nauke je upravo upotreba molekularnih genetičkih markera u istraživanju diverziteta šumskog drveća (*Müller-Stark et al*, 1992) čija saznanja bi trebalo da budu inkorporirana u strategiju očuvanja šumskih genetičkih resursa.

Tabela 1.- Svojstva četiri selekcionisana RAPD prajmera

Prajmer	Nukleotidna sekvenca 5' do 3'	% GC sadržaj	Broj svih fragmenata	Broj polimorfnih fragmenata	Veličina fragmenata u intervalu (Kb)
OPH-07	CTGCATCGTG	60	11	6	0,42–0,83
OPH-10	CCTACGTCAG	60	14	12	0,51–1,30
OPH-11	CTTCCGCAGT	60	25	24	0,34–1,55
OPH-15	AATGGCGCAG	60	17	12	0,46–2,30
Total			67	54	
Srednja vrednost broj fragmenata po prajmeru			16,7	13,5	



Slika 1.- RAPD produkti umnožavanja DNK izolirane iz *Fraxinus ornus-a* korišćenjem prajmera OPH-11 (20 stabala, kolona 1-20; M= marker za veličinu-Smart Ladder, Eurogentec)

4. ZAKLJUČCI

RAPD markeri otkrivaju individualni varijabilitet crnog jasena. Genetička istraživanja bi trebalo nastaviti ne samo na ekonomski značajnim vrstama već i na vrstama drveća koje pored ekonomskog imaju istaknut ekološki i teoretski značaj, što je slučaj sa *Fraxinus ornus*. Sadašnje i buduće informacije o genetičkoj varijabilnosti šumskog drveća trebalo bi da budu inkorporirane u strategiju očuvanja genetičkih resursa planete.

LITERATURA

- Barbero, M., Gruber, M., Loisel, R. (1971): Les forêts caducifoliées de l'étagé collinéen de Provence, des Alpes Maritimes et de Ligurie Occidentale, Annales de l'Université de Provence, XLV, 157–202.
- Binelli, G., Bucci, G. (1994): A genetic linkage map of *Picea abies* Karst., based on RAPD markers, as tool in population genetics. *Theoretical and Applied Genetics*, 88, 283–288.
- Echt, CS, May-Marquardt, P., Hsieh, M., Zahorchak, R. (1996): Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome*, 39, 1102–1108.
- Isabel, N., Tremblay, L., Michaud, M., Tremblay, F.M., Bousquet, J. (1993): RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. *Theoretical and Applied Genetics*, 86, 81–87.
- Jeanroz, S., Pugin, A. (1994): Ribosomal DNA genes in *Fraxinus*: organisation and detection of hybridization between *F. excelsior* L. and *F. oxyphylla* Bieb with rDNA spacer probes. *Techniques et utilisations des marqueurs moléculaires*. Montpellier (France), 29–31 mars 1994. Ed. INRA, Paris 1995 (Les Colloques, 72).
- Jeanroz, S., Roy, A., Bousquet, J. (1997): Phylogeny and phylogeography of the circumpolar genus *Fraxinus* (Oleaceae) based on internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol 7, iss 2, 241–251.
- Jermstad, K.D., Reem, A.M., Henifin, J.R., Wheeler, N.C., Neale, D.B., (1994): Inheritance of restriction fragment length polymorphisms and random amplified polymorphic DNAs in coastal Douglas-fir. *Theoretical and Applied Genetics*, 89, 758–766.
- Khasa, P.D., Dancik, B.P. (1996): Rapid identification of white-Engelmann spruce species by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 92, 46–52.
- Liu, Z., Fournier, G.R. (1993): Comparison of allozyme, RFLP and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigrooth aspen. *Theoretical and Applied Genetics*, 87, 97–105.
- Müller-Starck, G., Baradat, Ph., Bergmann, F. (1992): Genetic variation within European tree species. *New Forests*, 6, 23–47.

- Nelson, C.D., Nance, W.L., Doudrick, R.L. (1993): A partial genetic linkage map of slash pine (*Pinus elliottii* Engelm. var. *elliottii*) based on random amplified polymorphic DNAs. *Theoretical and Applied Genetics*, 87, 145–151.
- Sale, M.M., Potts, B.M., West, A.K., Reid, J.B. (1996): Molecular Differentiation within and between *Eucalyptus risdonii*, *E. amygdalina* and their Hybrids using RAPD Markers. *Australian Journal of Botany*, 44, 559–569.
- Verhaegen, D., Plomion, C. (1996): Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis* using RAPD markers. *Genome*, 39, 1051–1061.
- Vicario, F., Vendramin, G.G., Rossi, P., Lió, P., Giannini, R. (1995): Allozyme, chloroplast DNA and RAPD markers for determining genetic relationships between *Abies alba* and the relic population of *Abies nebrodensis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 90, 1012–1018.
- Wang, W.Y., Pai, R.C., Lai, C.C., Lin, T.P. (1994): Molecular evidence for the hybrid origin of *Paulownia taiwaniana* based on RAPD markers and RFLP of chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 89, 271–275.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531–6536.

DNK POLYMORPHISM OF MANNA ASH (*Fraxinus ornus* L.) POPULATION

Srdan Bojović, Philippe Heizmann, Marcel Barbero

Summary

RAPD markers reveal the genetic polymorphism of Manna ash (*Fraxinus ornus* L.). Genetic variability of 20 adult Manna ash trees (population in the valley of the river Vezubi, near Nice, France) was detected during the testing with 20 primers. 54 (80%) loci of the total of 67 loci are polymorphic. Fragment size varies from 0.34 to 2.3 Kb. Genetic research should be intensified not only with economically significant species, but also with tree species which, in addition to economical, have a prominent ecological and theoretical significance, which is the case with Manna ash. Present and future information on the genetic variability of forest trees should be incorporated in the genetic resources conservation strategy of the planet.