

# Karakterizacija ponavljajućih sljedova DNA u dalmatinskom buhaču (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip.)

---

Skuhala, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:741927>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ana Skuhala

Karakterizacija ponavljajućih sljedova DNA u dalmatinskom buhaču (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip.)

Zagreb, 2018.

Prof. dr. sc. Višnji Besendorfer, voditeljici rada, zahvaljujem na susretljivosti, velikoj podršci tijekom izrade rada i mnogobrojnim savjetima.

Dr. sc. Jeleni Mlinarec- Novosel, pomoćnoj voditeljici, zahvaljujem na pomoći u savladavanju tehnika, velikom broju praktičnih savjeta i podršci tijekom izrade rada.

Zahvaljujem ostalim kolegama sa Zavoda za molekularnu biologiju

Veliko hvala Emeriku i mojim prijateljima na beskrajnoj potpori tijekom studiranja, na mnoštvu nezaboravnih trenutaka iz naših studentskih dana I mnogim utješnim riječima u pravom trenutku.

Najveća hvala mojim roditeljima i najbližima na bezgraničnoj ljubavi i podršci koju su mi pružali tijekom cijelog života.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **KARAKTERIZACIJA PONAVLJAJUĆIH SLJEDOVA DNA U DALMATINSKOM BUHAČU (*Tanacetum cinerariifolium* (TREVIR.) SCH. BIP.)**

Ana Skuhala

Prirodoslovno-matematički fakultet, Zavod za molekularnu biologiju,  
Horvatovac 102a, Zagreb, Hrvatska

Ponavljajuće DNA su brzo evoluirajuće te je njihova različitost vrlo važna u određivanju vrsta. Novija istraživanja pokazuju da su važne pri regulaciji diobe stanica te da utječu na veličinu i organizaciju genoma. Usprkos navedenom značaju, ponavljajuće DNA su još uvijek nedovoljno istražene. Dosadašnja istraživanja pokazala su da je rod *Tanacetum* zanimljiv evolucijski model obzirom na veliku varijabilnost u položaju ribosomskih gena među vrstama. Dalmatinski buhač je Hrvatski endem i ima veliku važnost u ekološkoj poljoprivredi. Bez obzira na vrlo važnu primjenu i relativno velike kromosome koji olakšavaju citogenetička istraživanja, dalmatinski buhač je citogenetički neistražena vrsta. U ovom istraživanju odredili smo položaj i organizaciju satelitne, ribosomske i telomerne DNA na kromosomima dalmatinskog buhača. U ovom radu istražen je položaj na kromosomima tri satelitne porodice TcSAT1, TcSAT2 i TcSAT3. Porodice TcSAT1 i TcSAT2 smještene su subtelomerno na kromosomima, dok je TcSAT3 smještena intersticijski na dva akrocentrična kromosomska para. Utvrđena su intersticijska telomerna ponavljanja (ITS) koja se smatraju evolucijski zastarjelim razmještajem na kromosomu. Metodom FISH dokazano je da genom buhača sadrži rijetku L-konfiguraciju 35S/5S rDNA. Provedeno istraživanje ukazuje na plastičnost genoma dalmatinskog buhača te da su subtelomerna područja najdinamičniji dio genoma dalmatinskog buhača.

(47 stranica, 17 slika, 2 tablice, 110 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: dalmatinski buhač *T. cinerariifolium*, ponavljajuće DNA, FISH, L-konfiguracija 35S/5S rDNA

Voditelj: Prof. dr. sc. Višnja Besendorfer

Pomoćni voditelj: Dr. sc. Jelena Mlinarec Novosel

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Višnja Besendorfer, Prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković, Prof. dr. sc. Ines Radanović

Rad prihvaćen: 6.9. 2018. na sjednici povjerenstva za diplomske radove

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation thesis

### **CHARACTERIZATION OF REPETITIVE DNA FAMILIES IN *Tanacetum cinerariifolium* (TREVIR.) SCH. BIP.**

Ana Skuhala

Faculty of Science, Department of Molecular Biology,  
Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia

Repetitive DNAs represent the most evolving DNA and their diversity is very important for determination of species. Recent research showed that they are involved in the regulation of cell division, determination of the genome size and organization. Despite its significance, repetitive DNA is poorly investigated. Genus *Tanacetum* is interesting evolutionary model because of great variability in localization of rRNA genes among species. Dalmatian pyrethrum is endemic to Croatia and has important role in ecological agriculture. Regardless of important role in agriculture and relatively large chromosomes that facilitate cytogenetic research, dalmatian pyrethrum is cytogenetically poorly investigated. Our study aims to identify organization of repetitive DNA in the *T. cinerariifolium* genome using FISH method. Three satellite DNA families were described in *T. cinerariifolium* TcSAT1, TcSAT2 i TcSAT3. TcSAT1 and TcSAT2 satellite DNA families were heterogeneously distributed among different chromosome ends, while TcSAT3 family was exclusively located intercalary on the longer arm of two acrocentric chromosome pairs. FISH analysis has identified interstitial telomeric repeats which are likely evolutionary relics of chromosomal rearrangements. *T. cinerariifolium* exhibited an unusual linked rDNA configuration (L-type). Altogether our data highlights the genome plasticity of *T. cinerariifolium* and confirms that subtelomeres represent one of the most dynamic regions in the genome.

(47 pages, 17 figures, 2 tables, 110 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central biological library.

Key words: Dalmatian pyrethrum, *T. cinerariifolium*, L-type arrangement 35S/5S rDNA, repetitive DNA

Supervisor: Prof. dr. sc. Višnja Besendorfer

Assistant: Dr. sc. Jelena Mlinarec Novosel

Reviewers: Prof. dr. sc. Višnja Besendorfer, Prof dr. sc. Vesna Petrović Peroković , Prof. dr. sc. Ines Radanović

Thesis accepted: 6.9.2018. on Sjednica povjerenstva za diplomske radove

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Porodica glavočika (Asteraceae) .....	1
1.2. Dalmatinski buhač ( <i>Tanacetum cinerariifolium</i> (Trevir.) Sch. Bip.).....	2
1.3. Ponavljajuće sekvence DNA .....	4
1.3.1. Utjecaj ponavljajuće DNA na evoluciju vrsta .....	5
1.3.2. Satelitna DNA .....	6
1.3.3. Telomerna DNA .....	9
1.3.4. Ribosomska DNA (rDNA).....	11
1.4. Cilj istraživanja.....	14
2. MATERIJALI I METODE .....	15
2.1. MATERIJALI .....	15
2.1.1. Osnovne kemikalije i materijali.....	15
2.1.2. Biljni materijal.....	16
2.1.3. Ponavljajuće DNA dobivene sekvenciranjem nove generacije (NGS) .....	17
2.2. METODE .....	19
2.2.1. Izolacija DNA, umnažanje i kloniranje ponavljajuće DNA.....	19
2.2.2. Izrada kromosomskih preparata .....	21
2.2.3. Fluorescencijska hibridizacija <i>in situ</i> .....	21
3. REZULTATI .....	24
3.1. Karakterizacija satelitne DNA u genomu dalmatinskog buhača.....	24
3.2. Položaj <i>Arabidopsis</i> -tip telomernih ponavljanja u genomu dalmatinskog buhača	28
3.3. Broj i položaj 35S/5S ribosomskih (rRNA) gena u genomu dalmatinskog buhača.	30
4. RASPRAVA .....	31
5. ZAKLJUČAK .....	36
6. LITERATURA.....	37
7. ŽIVOTOPIS .....	46

# 1. UVOD

Ponavljajuće DNA su brzo evoluirajuće te je njihova različitost vrlo važna u određivanju vrsta. Smatralo se da ponavljajuće DNA nemaju funkciju u organizmu, ali novija istraživanja pokazuju da su važne pri regulaciji različitih procesa u stanici te da utječu na veličinu i organizaciju genoma. Usprkos navedenom značaju, ponavljajuće DNA su još uvijek neistraženo područje na organizacijskoj i funkcionalnoj razini genoma. Dosadašnja istraživanja pokazala su da je rod *Tanacetum* zanimljiv evolucijski model obzirom na organizaciju gena za ribosomsku RNA i varijabilnost u njihovom položaju između vrsta. Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip) je Hrvatski endem i ima veliku važnost u ekološkoj poljoprivredi zato što se iz njega proizvodi ekološki najvažniji prirodni insekticid, piretrin. Bez obzira na vrlo važnu primjenu i relativno velike kromosome koji olakšavaju citogenetička istraživanja, dalmatinski buhač je citogenetički neistražena biljka. Cilj ovog istraživanja je odrediti položaj i organizaciju ponavljajućih DNA (satelitne, telomerne i ribosomske DNA) na kromosomima. Položaj i organizacija ponavljajućih DNA na kromosomima utvrdit će se fluorescencijskom hibridizacijom *in situ* (FISH).

## 1.1. Porodica glavočika (Asteraceae)

Glavočike (Asteraceae) su jedna od najbrojnijih porodica s više od 25 000 vrsta. Velika raznolikost porodice i široki areal rasprostranjenosti rezultat je prilagodljivosti i otpornosti vrsta. Sve vrste povezuju morfološke značajke kao na primjer glavičasti cvat sastavljen od jednog ili dva tipa cvjetova, nastavak papus na sjemenkama koji služi za rasprostranjivanje i stranooplodnja. Ekonomska važnost ove porodice je velika u prehrani (salata endivija, čičoka, artičoka, cikorija i dr.) i hortikulturi (krizanteme, dalija, cinija i dr.), a zbog sekundarnih metabolita, vitamina i minerala koje proizvode i skladište raznolika je uporaba i proizvodnja mnogih vrsta biljaka iz ove porodice.

## 1.2. Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip.)

Dalmatinski buhač je višegodišnja biljka i pripada porodici glavočika (Asteraceae). Biljka može narasti do 100 cm u visinu i ima dubok razgranati korijen koji prodire do 35 cm u zemlju. Uz glavnu stabljiku koja nosi cvat granaju se i sekundarne stabljike. Cvatovi dalmatinskog buhača karakteristični su za porodicu. Cvatovi se sastoje od dva tipa cvjetova, jezičasti cvjetovi su bijeli te se nalaze na samom rubu glavice, dok su cjevasti cvjetovi žuti i spiralno raspoređeni (slika 1). Žuti cvjetovi su dvospolni tj. sadrže i tučak i prašnike na svakom cvijetu, dok su jezičasti cvjetovi ženski, sadrže samo tučak. Tučak se otvara tek nakon što prašnici otpuste sav zreli pelud te se na taj način onemogućuje samooplodnja. Kod buhača je uočena i sporofitska inkompatibilnost koja onemogućuje klijanje peluda na njuški tučka (Brewer 1968, 1974). U našem podneblju cvatnja započinje sa svibnjem i završava krajem lipnja, a cvjetovi se otvaraju otprilike mjesec dana nakon pojave pupa. Oprašivanje obavljaju kukci tako da zreli pelud jednog cvijeta raznašaju na tučke drugih potpuno otvorenih cvjetova. Stranooplodnja kukcima omogućuje veliku heterozigotnost i varijabilnost u mnogim agronomskim i drugim svojstvima (Singh i sur. 1987). Plod dalmatinskog buhača je jednosjemena, svijetlosmeđa roška s 5-7 brazda. Uz spolno razmnožavanje, dalmatinski buhač se može i vegetativno razmnožavati dijeljenjem busena.





**Slika 1. Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium*/ Trev/Schultz Bip.)**

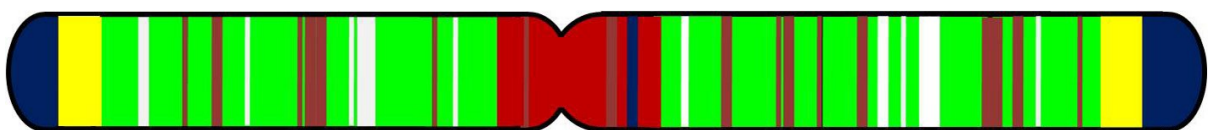
Kao i u većini glavočika, rod *Tanacetum* karakterizira haploidni broj kromosoma  $x=9$ . Dalmatinski buhač je diploidna vrsta s  $2n = 2x = 18$  kromosoma (MacDonald 1995), a opisani su i prirodni triploidi ( $2n = 3x = 27$ ), dok su tetraploidi ( $2n = 4x = 36$ ) uglavnom dobiveni tretiranjem sjemena kolhicinom (Ottaro 1977, MacDonald 1995). Triploidi se razlikuju od diploida i makroskopski; imaju veće i teže cvjetove te im je stabljika deblja i viša. Poliploidija u rodu *Tanacetum* vrlo je česta. Nađena je biljka sa čak deseterostruko ( $10x$ ) više kromosoma od haploidnog broja (Chehregani i Mehanfar 2008). Novija istraživanja koja se bave kariološkom karakterizacijom genoma roda *Tanacetum* pokazuju da je poliploidija vrlo važna za evoluciju vrsta te da neparna ploidija, aneuploidija i B-kromosomi nisu rijetke pojave u ovom rodu.

Rod *Tanacetum* obuhvaća oko 160 vrsta koje su uglavnom rasprostranjene na sjevernoj hemisferi u umjerenim zonama Europe, Azije, Sjeverne Afrike, a najveća koncentracija vrsta je u vegetaciji Sredozemlja i Irano-Turskih regija (Olanj i sur. 2015). U južnoj hemisferi mala je rasprostranjenost vrsta iz roda *Tanacetum* te se mogu naći samo vrste koje su rasprostranjene po cijelom svijetu kao na primjer vrsta *T. parthenium* (L.) Sch. Bip., koja se ponaša kao korov van prirodne rasprostranjenosti (Olanj i sur. 2015). Dalmatinski buhač

endemična je vrsta istočne obale Jadranskog mora, a njezino se prirodno stanište proteže od Italije preko sjeverne Albanije, pa sve do planinskih područja Hrvatske, Bosne i Hercegovine te Crne Gore (Casida i Quistad 1995, Bhat 1995). Element je vegetacije kamenjarskih pašnjaka, kamenitih, skeletnih, jako degradiranih staništa, a može se naći i u svijetlim šumama alepskog bora, u vegetaciji bušika, maslinicima i vinogradima (Kovačić i sur. 2008). Dalmatinski buhač je ekonomski važna biljka zbog proizvodnje sekundarnog metabolita, piretrina koji je učinkovit i ekološki insekticid, trenutno ekonomski najvažniji insekticid biljnog podrijetla (Hedayat i sur. 2009). Piretrin djeluje na živčani sustav kukaca uzrokujući paralizu i smrt te pomaže suzbijanju štetnika bez negativnih utjecaja na okoliš (Casida i Quistad 1995). Piretrin može ući u ljudski organizam kožom, dišnim i probavnim putevima. Kroz probavni sustav ljudi prolazi vrlo brzo, izlučuje se urinom i fekalijama te se ne akumulira unutar organizma (Macan i sur. 2006).

### 1.3. Ponavljajuće sekvence DNA

Obzirom na značajke sekvenci molekule DNA, eukariotski genomi su vrlo kompleksni. Sekvence se mogu uzastopno ponavljati unutar genoma ili mogu biti jedinstvene upute koje se u genomu pojavljuju samo jednom (slika 2). Tako razlikujemo ponavljajuće i neponavljajuće sekvence DNA. Neponavljajuću, jedinstvenu sekvencu DNA čine strukturni geni koji nose uputu za sintezu proteina, a velika većina genoma sastoji se od ponavljajuće DNA za koju se dugo smatralo da ne nosi nikakvu informaciju.



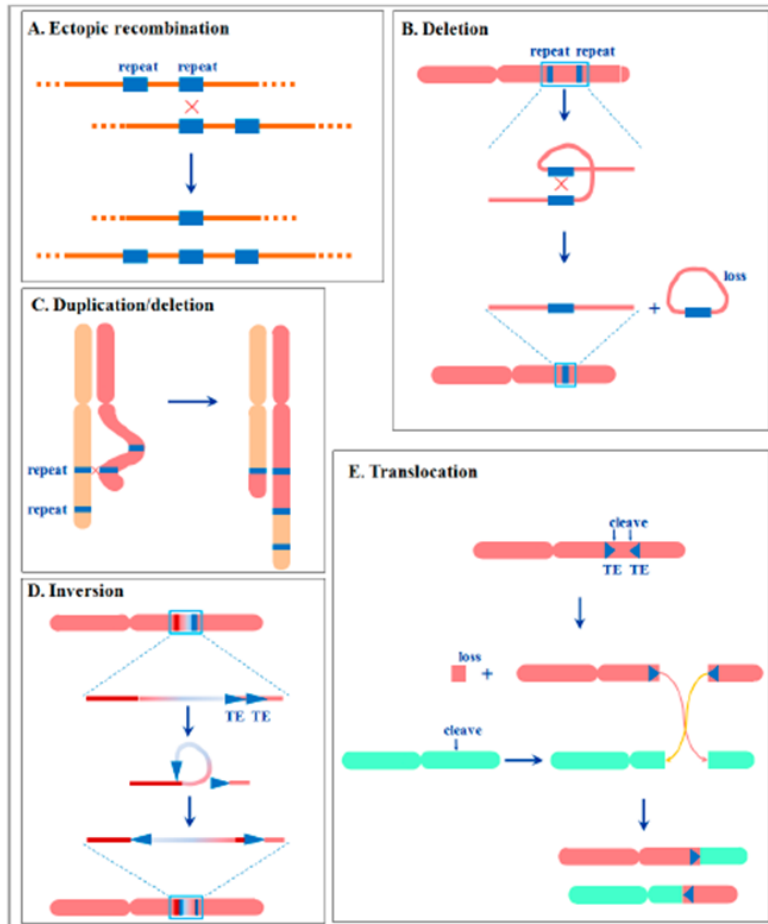
Slika 2. Prikaz položaja ponavljajuće DNA duž kromosoma. Plavom su označene telomerne DNA, žutom subtelomerne, zelenom su prikazane interkalarne ponavljajuće sekvence, smeđom raspršene sekvence, a bijelom su označeni geni i slabo ponavljajuće sekvence (Mehrotra 2014).

Novija istraživanja pokazuju da ponavljajuća DNA ima vrlo važnu regulatornu ulogu i veliki evolucijski značaj te se sve više istražuje. Eukariotski genom sastoji se od puno različitih tipova ponavljajuće DNA. Ponavljajuće DNA mogu biti raspršene duž cijelog kromosoma ili organizirane u skupine. Raspršene ponavljajuće DNA su na primjer pokretni genetički

elementi, transpozoni i retrotranspozoni, dok su uzastopno ponavljajuće DNA organizirane u skupinama kao što su satelitne porodice DNA i ribosomska DNA. Dosadašnja istraživanja su pokazala da se eukariotski genomi razlikuju u veličini genoma. Veličina genoma prikazuje se kroz C-vrijednost koja pokazuje koliko se količinski (izraženo u pikogramima) nalazi DNA u haploidnoj jezgri (gamete). Često se C-vrijednost naziva paradoksom jer nema poveznice s evolucijskom starošću uspoređivanih organizama pa tako neki, evolucijski niži, organizmi imaju veću C-vrijednost od genoma čovjeka. Još uvijek znanost ne može objasniti paradoks C-vrijednost ali se sa sigurnošću može reći da nema poveznice sa složenosti organizma. Pretpostavlja se da su ponavljajuće DNA ključ za rješavanje paradoksa C-vrijednosti. Pokretni genetički elementi imaju najveći utjecaj na razlike u veličini genoma. Tako na primjer transpozoni predstavljaju 45% ljudskog genoma (Lander i sur. 2001). Uz transpozone veliki udio u ponavljajućim DNA sekvencama imaju satelitne sekvence DNA koje su organizirane u skupine visoko ponavljajućih, nekodirajućih kratkih sekvenci.

### 1.3.1. Utjecaj ponavljajuće DNA na evoluciju vrsta

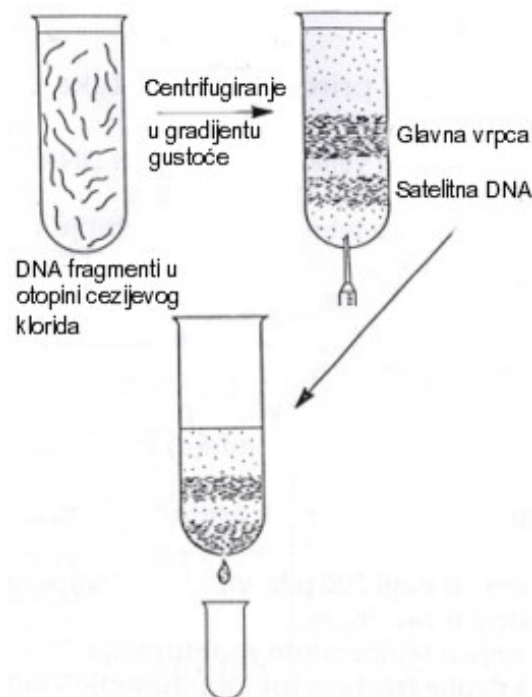
Promjene u kromosomu mogu rezultirati greškama koje onemogućuju normalni rast jedinke, ali isto tako postoji mogućnost da minimalne promjene omoguće stvaranje novih svojstava organizma, te stvaranje nove vrste. Struktura kromosoma može biti promijenjena uslijed translokacija, delecija, duplikacija, insercija, inverzija, fisija i fuzija kromosoma (slika 3). Komparativna citogenetička istraživanja pokazuju znatno premještanje dijelova kromosoma unutar porodica Brassicaceae (Lysak i sur. 2006, Yogeewaran i sur. 2005, Fransz i sur. 2016), Solanaceae (Wu i Tanksley 2010, Lou i sur. 2010) i u nekim porodicama korova (Febrer i sur. 2010, Betekhtin i sur. 2014). Na primjer razlike između vrsta *Arabidopsis lyrata* i *Arabidopsis thaliana* objašnjene su s 10 najvažnijih premještaja unutar kromosoma; pet inverzija, dvije translokacije i tri fuzije/fisije (Yogeewaran i sur. 2005). Istraživanja o premještanju sekvenci unutar kromosoma predlažu da se većina strukturnih promjena u kromosomu događa u području heterokromatina sastavljenog od uzastopno ponavljajućih (satelitnih) sekvenci DNA (Lysak i sur. 2006, Chuzhanova i sur. 2003, Badaeva i sur. 2007, Siljak-Yakovlev i sur. 2017). Širenje ponavljajućih sekvenci DNA, pogotovo transpozona, nastalo je zbog njihovog premještanja unutar i između kromosoma.



Slika 3. Shematski prikaz promjena na kromosomu uzrokovana premještanjem ponavljajućih sekvenci DNA (Shu-Fen i sur. 2017).

### 1.3.2. Satelitna DNA

Satelitna DNA (satDNA) dobila je ime po drugačijem slaganju dušičnih baza duž molekule DNA što rezultira stvaranju sekundarnih, "satelitnih" veza i odvajanju tih sekvenci od ostatka genoma nakon centrifugiranja u gradijentu gustoće  $\text{CsCl}_2$  (slika 4).



Slika 4. Centrifugiranje DNA u gradijentu gustoće CsCl<sub>2</sub> (<http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/>).

Smatra se da satDNA ima poveznicu sa C-vrijednosti genoma. Unutar jedne vrste nalaze se različite porodice satDNA. Na primjer unutar vrste *Pisum sativum* nalazi se 15 porodica satDNA (Macas i sur. 2007), unutar vrste *Locusta migratoria* 62 porodica (Ruiz-Ruano i sur. 2016), dok se u ljudskom genomu nalazi 9 porodica satDNA (Levy i sur. 2007). Bez obzira na brojnost, uvijek postoji dominantna porodica koja čini većinu ukupne satDNA u genomu. Na primjer, u ljudskom genomu dominantna satDNA je centromerna  $\alpha$  satDNA koja predstavlja više od polovine ukupne satDNA u genomu. Pojedine skupine satDNA pojavljuju se u srodnim vrstama u istom obliku i najčešće su to dominantne satDNA. Na primjer, različite vrste kornjaša iz porodice Tenebrionidae dijele jednu do dvije dominantne glavne satDNA unutar genoma (Plohl i sur. 2014). Određena porodica satDNA može se pojaviti na različitim razinama, unutar cijele porodice, unutar reda, razreda ili je ograničena samo na vrstu.

Kao što je prije spomenuto satDNA može imati veliki udio u genomu, ali u biljkama predstavlja od 0,1% do najviše 36% od cijelog genoma. Isto tako u carstvu životinja udio satDNA varira od 0,5% do 50% unutar beskraljeznjaka i kraljeznjaka. S obzirom na variranje udjela satDNA, varira i veličina genoma tj. C-vrijednost. Nekad su varijacije posljedica različitog broja ponavljanja (replikona) određene sekvence satDNA ali i broja različitih satDNA unutar genoma stvara razliku. Na primjer, u vrsti *Drosophila stimulans* udio satDNA

u genomu je 5%, u vrsti *Drosophila erecta* 0,5%, dok je u vrsti *Drosophila virilis* on čak oko 50% (Wei i sur. 2014). Zaključno, udio satDNA određuje i veličinu genoma, no još se ne može objasniti na koji način udio sekvenca varira unutar genoma.

SatDNA je glavna komponenta heterokromatina koji se najčešće nalazi u pericentromernom i subtelomernom području na kromosomu. U carstvu biljaka i životinja, moguće je naći heterokromatin i između pericentromernog i subtelomernog područja na kromosomu (intersticijski heterokromatin). Neke satDNA karakteristične su za spolne kromosome ili su specifične za određeni kromosom. Satelitne DNA se nalaze i u području centromera. Centromerna područja kromosoma su najčešće vrlo kompleksno građena tako da se uz satelitnu DNA tu nalaze i različiti pokretni genetički elementi (Garrido-Ramos 2015, Plohl i sur. 2014)

Većina satDNA u genomu biljaka i životinja građena je od monomera duljine od 150 do 180, odnosno od 300 do 360 parova baza koji se mogu ponavljati od nekoliko stotina do nekoliko tisuća kopija (Garrido-Ramos 2015).

### *Evolucija satelitne DNA*

Uspoređujući različitosti porodica satDNA zaključuje se da je satDNA najbrže evoluirajući dio genoma (Bachmann i Sperlich 1993, Martinsen i sur. 2009). Ukoliko nema razmjene satDNA između dva nehomologa kromosoma moguća je nezavisna evolucija satDNA u različitim kromosomima. Prema hipotezi Ruiz-Ruano (2016) evolucija satDNA započinje *de novo* duplikacijom kratkih sekvenci što dovodi do stvaranja uzastopno ponavljajućih parova baza na specifičnom mjestu u genomu. Formiranje takvog lokusa može se dogoditi na više načina, proklizavanjem jednog DNA lanca tijekom DNA replikacije ili umetanjem sekvence replicirane na kalupu ekstrakromosomske, kružne molekule DNA. U sljedećem koraku ta sekvenca može biti rasprostranjena po genomu mehanizmom reinsercije ili mehanizmom premještanja i na taj način neki lokusi se umnožavaju lokalno te stvaraju velike ponavljajuće sekvence. Potom se prirodnim odabirom i restriktivnim enzimima onemogućuje beskonačno akumuliranje iste sekvence i ograničava se njena prisutnost na određenom lokusu u genomu. Ovaj korak posebno je naglašen u prokariotima. U eukariotima osnovna jedinica ponavljanja (monomer) satDNA može biti lokalno puno puta umnožena tako da se fluorescencijskom hibridizacijom *in situ* (FISH) može točno detektirati mjesto na kromosomu

gdje se nalazi određena satDNA. Uzastopna lokalna amplifikacija može uzrokovati povećanje broja parova baza na dijelu kromosoma što rezultira nesimetričnim crossing-overom tijekom mejoze (Garido-Ramos 2017).

### *Uloge satelitne DNA*

Dugo se u prošlosti molekularne biologije smatralo kako satDNA nema nikakvu ulogu u organizmu, da se ti sljedovi nukleotida ne prepisuju te da ne nosi nikakvu gensku uputu. Heterokromatin i satDNA kao dio heterokromatina nazivali su “junk” DNA ili “selfish” DNA jer se smatralo da su te sekvence samo ostatak, “otpad” te su sve moguće ideje o ulogama satDNA u biološkim procesima bile odbačene. Transkripcijska aktivnost određenih skupina ponavljajućih sekvenci u vodozemcima tijekom emriogeneze potakla je znanstvenike na daljnja istraživanja. Transkripciju satDNA u oocitama vodozemaca objasnili su kao grešku u normalnoj transkripciji zbog pogrešaka u čitanju uzvodno od promotora strukturnih gena. Slične pojave u kromosomima goluba i pilića objasnili su kao posljedicu organizacije genoma. Danas postoje dokazi o utjecaju satDNA na organizaciju genoma i transkripciju određenih gena. Kao što je prije spomenuto satDNA je sastavni dio centromernog i pericentromernog područja, transkripti satDNA dio su kinetohornog aparata, kontroliraju elongaciju telomernih završetaka i utječu na organizaciju kromosoma, spajanje homolognih kromosoma u metafazi te njihovu segregaciju u anafazi mejoze I. SatDNA ima važnu ulogu u regulaciji i održavanju heterokromatina te na taj način ima veliki utjecaj na ekspresiju određenih gena, pogotovo u stresnim uvjetima (Pezer i sur. 2012, Biscotti i sur. 2015, Grenfell i sur. 2017).

### 1.3.3. Telomerna DNA

Telomere se nalaze na krajevima kromosoma i služe za zaštitu kromosomskih krajeva od razgradnje, sljepljivanja ili smanjivanja kromosoma tijekom DNA replikacije. Telomerni krajevi često su konzervirani i u svim biljkama nalazimo slične sljedove parova baza, takozvana TG-bogata mjesta. Najčešća telomerna sekvenca sastoji se od sedam nukleotida TTTAGGG, prvi je puta nađena u genomu *Arabidopsis thaliana* te je nazivamo *Arabidopsis*- ili biljni-tip telomernih sekvenci (Richards i Ausubel 1988). No telomerni završetci mogu biti u

potpunosti ili djelomično zamijenjeni varijacijama kao na primjer TTAGGGG, TTGGGG ili sličnim sekvencama u nekim porodicama biljaka (Adams i sur. 2001, Weiss i Scherthan 2002, Sykorova i sur. 2006). Na primjer, neke vrste reda *Asparagales* i porodice Solanaceae odstupaju od pravila te nemaju klasičan *Arabidopsis*-tip ponavljajućih telomernih sekvenci (Fuchs i sur. 1995, Sykorova i sur. 2003). Novija istraživanja kromosomskih završetaka u rodovima *Aloe* (*Aspodelaceae*), *Othocallis* i *Hycinthella* (*Hycinthaceae*) svi iz reda *Asparagales* imaju TTAGGG ponavljajuće telomerne sekvence koje su inače karakteristične za kralježnjake (Weiss i Scherthan 2002, Puizina i sur. 2003, Weiss- Schneeweiss i sur. 2004). Kao što je spomenuto, telomerne sekvence najčešće nalazimo na krajevima kromosoma, no u manjem udjelu telomerne sekvence mogu se naći i u drugim dijelovima kromosoma ovisno o vrsti (Azzalin i sur. 2001, Kilian i sur. 1999, Schubert i sur. 1995, Tek i Jiang 2004, Uchida i sur. 2002).

#### *Intersticijska telomerna ponavljanja (ITR-ovi)*

Telomerne sekvence ne nalazimo nužno samo na krajevima kromosoma. U vrstama *Silene latifolia* (Uchida i sur. 2002, Tek i Jiang 2004) i *Arabidopsis thaliana* (Uchida i sur. 2002) nađena su telomerna ponavljanja smještena oko centromera kao i intersticijska duž krakova kromosoma. Intersticijska telomerna ponavljanja (ITR-ovi) vjerojatno su nastala fuzijom telomernih završetaka u kromosomu daljnjeg pretka, na način kako su i mikrosatelitne sekvence nastale ili kao rezultat popravka dvolančanog loma (Lin i Yan 2008, Ruiz-Herrera i sur. 2008). Intersticijska telomerna ponavljanja u genomu čovjeka dijelimo u tri skupine: 1. kratki ITR-ovi koji se sastoji od nekoliko TTAGGG parova, 2. subtelomerni ITR-ovi koji se sastoji od nekoliko tisuća parova baza, nastali degeneracijom sljedova u subtelomernom području i 3. fuzija ITR-ova koja rezultira fuzijom kromosoma (Azzalin i sur. 2001).

U genomu vrste *Arabidopsis thaliana* devet je ITR-ova veličine od 300 pb do 1200 pb u centromernom, subtelomernom ili intersticijskom području na kromosomima te su ti ITR-ovi predstavljeni kao ostaci nastali pri premještanju telocentričnih kromosoma u genomu (Uchida i sur. 2002). Sekvenca DNA relativno homologna telomernim sekvencama nađena je u centromernom području i kod nekih drugih eukariota kao na primjer na Y kromosomu vrste *Drosophila melanogaster* (Abad i sur. 2004, Mendez-Lago i sur. 2009), na centromeri B kromosoma u kukuruzu (Alfenito i Birchler 1993, Jin i sur. 2005) i u centromernom području



kromosoma rajčice (Presting i sur. 1996). Smatra se da su neki ITR-ovi vruća mjesta za dvolančane lomove molekule DNA (DBS), rekombinaciju, premještanja ili amplifikaciju u genomu sisavca (Bolzan 2012, Lin i Yan 2008).

Osim opisanih ITR-ova u genomima su prisutni i tzv. telomerni boksovi (eng. Telo-box), kratki intersticijski telomerni motivi, identični biljnim telomernim ponavljajućim sekvencama koji se nalaze u 5' području određenih gena koji se često eksprimiraju u staničnim ciklusima.

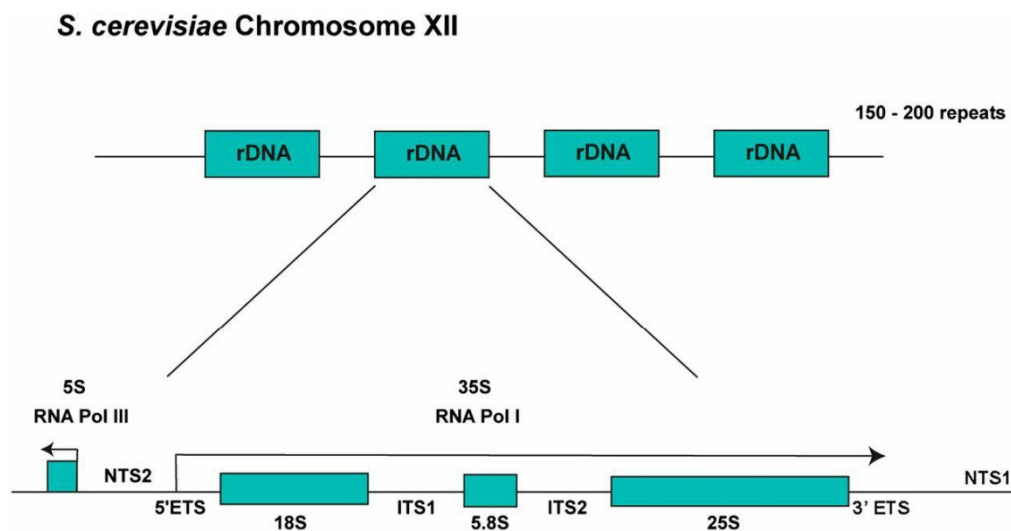
#### 1.3.4. Ribosomska DNA (rDNA)

Ribosomska DNA (rDNA) kodira 5S, 5.8S, 18S i 26S ribosomske RNA (rRNA) te pripada u skupinu najvažnijih gena za regulaciju staničnog metabolizma (Grummt 1999). Ribosomske DNA su visoko ponavljajuće sekvence DNA koje su u biljnom genomu prisutne u sto do više desetaka tisuća identičnih kopija određenog gena. Visoki broj kopija gena važan je za pojačanu transkripciju i translaciju tijekom razvoja organizama (Lawrence i Pikaard 2004) ali i za stabilizaciju stanične jezgre. Sekvence rDNA organizirane su u dvije velike podjedinice: podjedinica 35S sadrži 5.8S, 18S i 26S rDNA, dok je podjedinica 5S rDNA fizički odvojena. Lokus 35S rDNA uglavnom se nalazi terminalno na kromosomu, dok lokus 5S rDNA nema jedinstveno mjesto na kromosomu te može biti smješten terminalno, subterminalno, intersticijski ili pericentromerno na bilo kojem kromosomu u genomu. Pošto su promjene u 35S i 5S rDNA rijetke, a sekvence su relativno konzervirane vrlo su pogodne za istraživanje kromosomskih promjena i evolucije kariotipa (Maluszyńska i sur. 1998).

#### *Organizacija rDNA*

Genom prokariota i eukariota razlikuje se u dvije stvari: podjeli ribosomskih gena i organizaciji podjedinica. Prokariotski genom sadrži samo tri ribosomska gena koji kodiraju 5S, 16S i 23S rRNA, dok eukariotski genom sadrži četiri gena za 5S, 5.8S, 18S i 28S rRNA. Rezultat broja gena je samo u razdvajanju 5'-kraja prokariotskog 23S gena iz kojeg nastaje eukariotski gen za 5.8S rRNA (Nazar 1980). Druga razlika je u razmještanju, kod prokariota svi geni su povezani i nalaze se u jednom lokusu, dok je kod eukariota gen za 5S rRNA odvojen od ostalih gena. Takva organizacija rezultira i drugačijom enzimskom regulacijom pa se tako u prokariotima geni rRNA prepisuju zajedno pomoću enzima RNA polimeraze I, dok se u

eukariotima gen 5S rRNA prepisuje pomoću RNA polimeraze III, a geni 35S rRNA pomoću RNA polimeraze I (Bergeron i Drouin 2008). Samostalna kontrola koju omogućuje različiti enzim za transkripciju vjerojatno je uzrok fizičke razdvojenosti lokusa 35S i 5S rRNA na kromosomu. Ova stroga podjela na razlike u prokariotima i eukariotima ima i prijelazne oblike pa tako u genomu nekih jednostavnih eukariota kao na primjer kvasca, *Saccharomyces cerevisiae*, geni rRNA organizirani su u jedan operon, što je karakteristika prokariota, no i dalje su geni zasebno transkribirani pomoću RNA polimeraze I ili RNA polimeraze III (slika 5). Novija istraživanja pokazuju da se kod nekih biljaka lokus 5S rDNA nalazi unutar lokusa 35S rDNA. Takve iznimke pronađene su u raznim skupinama organizma kao što su nematode (Vahidi i sur. 1991), gljive (Bergeron i Drouin 1987), rakovi (Drouin i sur. 1987), mahovine (Capesius 1997, Sone i sur. 1999) te postoji mogućnost da takvi primjeri pokazuju prijelazni stadij između eukariotskog (razdvojenog) i prokariotskog (nerazdvojenog) lokusa. Uz nematode, gljive, rakove i mahovine i u genomu sjemenjača (rod *Artemisia*, Asteraceae) nađeni su spojeni lokusi 35S i 5S rDNA te postoji mogućnost da ovakav razmještaj lokusa nije karakterističan samo za prokariote i jednostavne eukariote, već se nalaze i u biljnim i životinjskim vrstama (Garcia i sur. 2010).



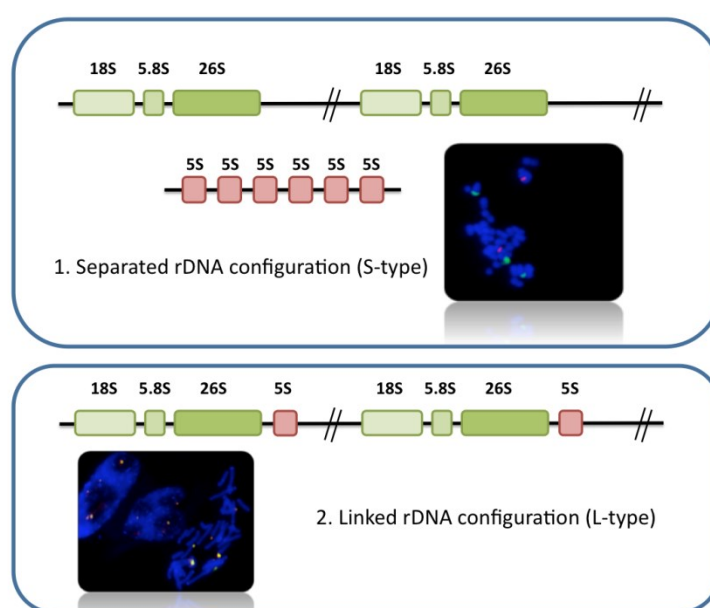
Slika 5. Organizacija rDNA u genomu kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*)

<http://www.genetics.org/content/195/3/643>.

Velika podjedinica (35S) sastoji se od unutarnjih transkribirajućih razmaknica (ITS) koje razdvajaju gene 18S, 5.8S i 26S rRNA. Podjedinice 35S rDNA međusobno su razdvojene međugenskim razmaknicama (IGS) koje se ne prepisuju u molekulu RNA. Gen za 5S rRNA je

najmanji gen kojeg čini svega 120 pb i međusobno su razdvojeni netranskribirajućim međugenskim razmaknicama (NTS). Dužina razmaknica varira od nekoliko nukleotida u prokariotima do nekoliko stotina nukleotida u eukariotima.

Kada govorimo o organizaciji lokusa 5S i 35S rDNA, u biljkama postoje dvije konfiguracije: S- i L-konfiguracija (slika 6). S-konfiguracija je organizacija u kojoj se lokusi 5S rDNA i 35S rDNA nalaze na različitim mjestima na kromosomu i takvu konfiguraciju nalazimo u većini genoma biljaka. L-konfiguracija je organizacija u kojoj se lokus 5S rDNA nalazi unutar lokusa 35S rDNA.



**Slika 6. Usporedba L- i S-konfiguracije shematskim prikazom i mikroskopskim preparatom vizualizirano tehnikom FISH [www.plantrdnadatabase.com](http://www.plantrdnadatabase.com).**

Fizička razdvojenost lokusa 5S i 35S rDNA dominira u genomu *Streptophyta*, *Algae* i evolucijski starijim biljkama kao što su *Bryophyta* (Capesius 1997, Wicke i sur. 2011). Ova istraživanja postavljaju hipotezu da se L-konfiguracija pojavljuje kod predaka kritosjemenjača tijekom odvajanja od evolucijski starijih i jednostavnijih biljaka. L-konfiguracija nađena je i u genomu roda *Artemisia* (Asteraceae) na temelju citogenetičkih istraživanja (Yoshikazu i sur. 2006, Garcia i sur. 2007) te u živom fosilu golosjemenjača *Ginkgo biloba* (Galian i sur. 2012). Na temelju dosadašnjih istraživanja još uvijek se ne može sa sigurnošću utvrditi koja konfiguracija je evolucijski starija te se zastupljenost L-konfiguracije kod kritosjemenjača intenzivno istražuje. U većini genoma s L-konfiguracijom, 5S rDNA

nalazi se u IGS-u 1000 bp dalje od gena 26S rRNA, a transkript te sekvence lociran je isključivo na istom mjestu suprotnog lanca (Gracia i sur. 2010, Mazzella i sur. 2010).

Porodica Asteraceae je najbrojnija vrstama i još se ne može sa sigurnošću reći koliko se često L-konfiguracija pojavljuje unutar nje, odnosno je li L-konfiguracija konzervirana unutar određenih vrsta ili je posljedica kromosomske dinamike i/ili evolucijskog odmaka. Istraživanja pokazuju da bi oko 25% biljaka iz porodice Asteraceae moglo sadržavati u genomu L-konfiguraciju rDNA (Garcia i sur. 2010, Mazzella i sur. 2010).

Do danas je L-konfiguracija utvrđena u dvjema vrstama iz roda *Tanacetum*, vrsti *T. achilleifolium* (M. Bieb.) Sch. Bip. i vrsti *T. parthenium* (Abd El-Twab i Kondo 2012). Takva organizacija tipična je za redove *Arthemideae* i *Helianthae* (Garcia i sur 2010) koji isto pripadaju porodici Asteraceae. Bez obzira na sve više dokaza o postojanju L-konfiguracija još uvijek je većinski zastupljena S-konfiguracija u genomu biljaka. Interesantno je da su Abd El-Twab i Kondo (2012) opisali jedinke s L-konfiguracijom i jedinke sa S-konfiguracijom rDNA unutar iste vrste *T. achilleifolium*.

#### 1.4. Cilj istraživanja

Ponavljajuće sekvence DNA zauzimaju većinu u genomu svih eukariota, imaju važnu ulogu u regulaciji metabolizma i smatra se da imaju veliki evolucijski značaj. Uz sve ove bitne značajke, ponavljajuće sekvence DNA su još uvijek nedovoljno istražene. Rod *Tanacetum* je interesantan obzirom da mnoge vrste ovog roda imaju veliki ekonomski značaj zbog ljekovitih ili insekticidnih svojstava. Unatoč tome, vrste ovog roda su slabo citogenetički istražene. Stoga je cilj ovog diplomskog rada citogenetički istražiti genom dalmatinskog buhača, *Tanacetum cinerariifolium*, koji prirodno sintetizira trenutno najvažniji ekološki insekticid piretrin, a kod kojeg, bez obzira na važnu primjenu, nikad nije istražena organizacija genoma. U tu svrhu odredit će se položaj i organizacija ponavljajućih DNA (satelitne, telomerne i ribosomske DNA) na kromosomima vrste *Tanacetum cinerariifolium*/Trev./Schultz Bip..

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. MATERIJALI

#### 2.1.1. Osnovne kemikalije i materijali

U radu su korištene slijedeće kemikalije i materijali:

- Octena kiselina (Fluka, Njemačka)
- Etanol (Kemika, Hrvatska)
- RNA-za (Qiagen, Njemačka)
- Paraformaldehid (Kemika, Hrvatska)
- Formamid (Sigma, Njemačka)
- Dekstran sulfat (50%) (Sigma, Njemačka)
- Tween (Sigma, Njemačka)
- 4,6 – diamino – 2 – fenilindol (DAPI) (Dako, SAD)
- Vectashield (Dako, SAD)
- Qiagen mini-kit (Hilden, Njemačka)
- Q5<sup>®</sup> High-Fidelity PCR kit (New England Biolabs Inc., SAD)
- Syber Safe (Invitrogen, Eugene, SAD)
- Agaroz (Sigma, Njemačka)
- pGEM-T Easy vector (Promega, SAD)
- 0.05% kolhicin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)
- PCR Clean-up System (Promega Corporation, SAD)
- Aminoallyl-dUTP-Cy3 (Jena Bioscience GmbH, Njemačka)
- Green-dUTP (Abbott Molecular Inc., SAD)
- Nick Translation Reagent Kit (Abbott Molecular Inc., SAD)
- Natrij dodecil sulfat (Kemika, Hrvatska)
- Karmin (Kemika, Hrvatska)
- Zemlja
- Keplerice

- Sterilne folije
- Pokrovna stakalca
- Lupa
- Predmetna stakalca
- Pincete
- Plamenik
- Elektroporator
- Kivete
- Petrijeve zdjelice
- Sterilne čačkalice
- Filter papir
- Mikroskop Olympus BX51
- Digitalna kamera Olympus DP70

### 2.1.2. Biljni materijal

Citogenetička istraživanja rađena su na dalmatinskom buhaču, *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip. ( $2n = 2x = 18$ ). Sjeme je prikupljeno s četiri različita lokaliteta u Hrvatskoj: Konavle (425506N, 0172352E), Osor (445542N, 0145519E), Cres-Merag (443150N, 0142807E) i Cres-Kimen (445739N, 142428E). Osim sjemenki iz prirodnih populacija u istraživanje je uključeno i sjeme iz komercijalnih usjeva uzgajivača CropLife International iz Tanzanije. Sjemenke su sađene u zemlju u plastičnim posudama. Obzirom na veličinu izraslih biljaka presađivane su periodički u veće posude (slika 7). Biljke su uzgajane u komori s kontroliranim uvjetima temperature (24°C) i osvjetljenja (16h svijetla i 8h tame) u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka PMF-a Sveučilišta u Zagrebu, a zatim su održavane u kljajalištu Botaničkog vrta PMF-a Sveučilišta u Zagrebu. Dobro razvijeni korjenčići korišteni su za citogenetička istraživanja. U ovom radu analizirano je ukupno 30 biljaka kako bi se odredio položaj ponavljajućih sekvenci i polimorfizam satDNA.

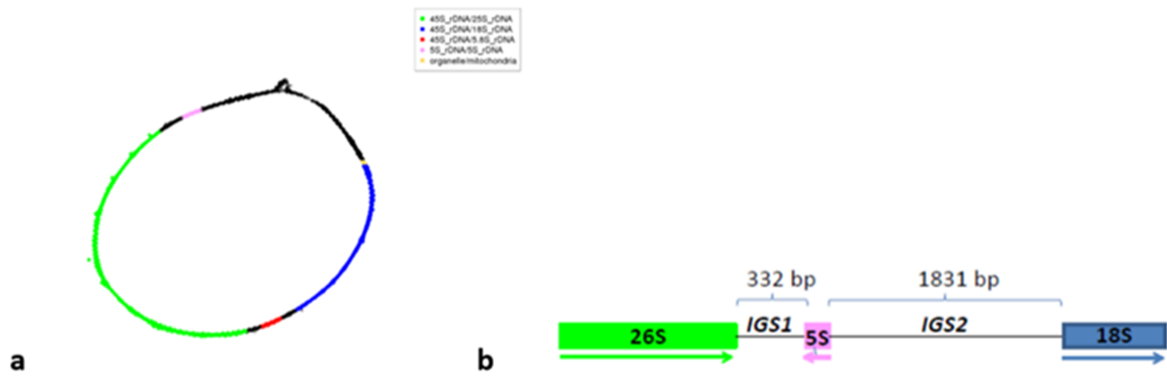


Slika 7. Uzgoj dalmatinskog buhača u kontroliranim uvjetima. (a) proklijale sjemenke mjesec dana nakon sadnje, (b) biljke dovoljno velike za presađivanje, (c) odrasle presađene biljke od kojih su uzimani korjenčići za citogenetička istraživanja.

### 2.1.3. Ponavljajuće DNA dobivene sekvenciranjem nove generacije (NGS)

U ovom radu za citogenetičke analize satelitne DNA i određivanje organizacije ribosomskih gena (rRNA) korištene su sekvence dobivene pomoću sekvenciranja nove generacije NextSeq 500 System (Illumina®, USA) u Queen Mary Genome Centre te upotrebom klaster analize pomoću programa RepeatExplorer i TAREAN (Novák i sur. 2010).

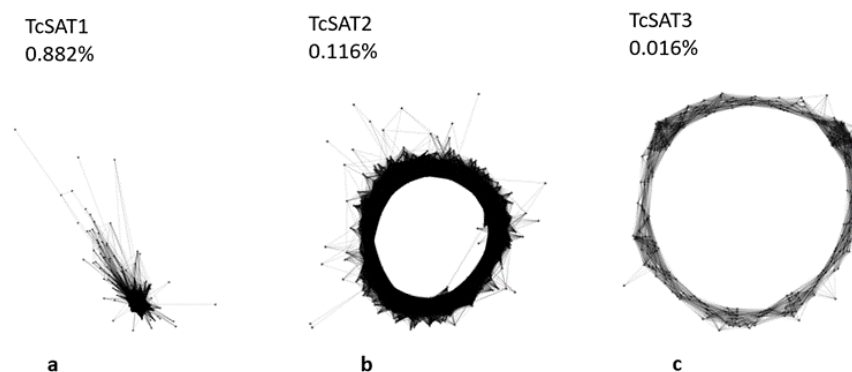
Klaster analiza pokazala je da dalmatinski buhač ima L-konfiguraciju ribosomskih gena (slika 8).



**Slika 8. (a) Grafički prikaz L-tipa organizacije 35S i 5S ribosomskih gena u dalmatinskom buhaču (b) Određen je točan položaj 5S rRNA gena, a strelice pokazuju smjer transkripcija gena rRNA.**

Na slici 8 prikazano je da se gen 5S rRNA nalazi u međugenskoj razmaknici (IGS) između ponavljanja gena 35S (18S-5.8S-26S) rRNA. Obzirom na položaj gena 5S rRNA, IGS je podijeljen na IGS1 i IGS2 regiju, koje se razlikuju u dužini. Ribosomski gen 5S rRNA ima obrnuti smjer transkripcije u odnosu na gen 35S rRNA.

Kružni oblik satelitskih DNA u klaster analizi (slika 9) ukazuju da se sekvence uzastopno ponavljaju što odgovara organizaciji satelitnih DNA. Klaster analiza satelitnih DNA pokazala je da klasteri CL14, CL82 i CL153 odgovaraju porodicama satelitne DNA koje su nazvane TcSAT1, TcSAT2 i TcSAT3. Postoci predstavljaju udio određene satelitne DNA u genomu dalmatinskog buhača pa tako TcSAT1 predstavlja 0,882%, TcSAT2 0,116%, a TcSAT3 predstavlja 0,016% genoma vrste.



**Slika 9. Grafički prikaz klastera koji odgovaraju porodicama satelitne DNA TcSAT1, TcSAT2 i TcSAT3 u genomu dalmatinskog buhača. Točke predstavljaju NGS čitanja, a mostovi sličnost između čitanja.**



## 2.2. METODE

### 2.2.1. Izolacija DNA, umnažanje i kloniranje ponavljajuće DNA

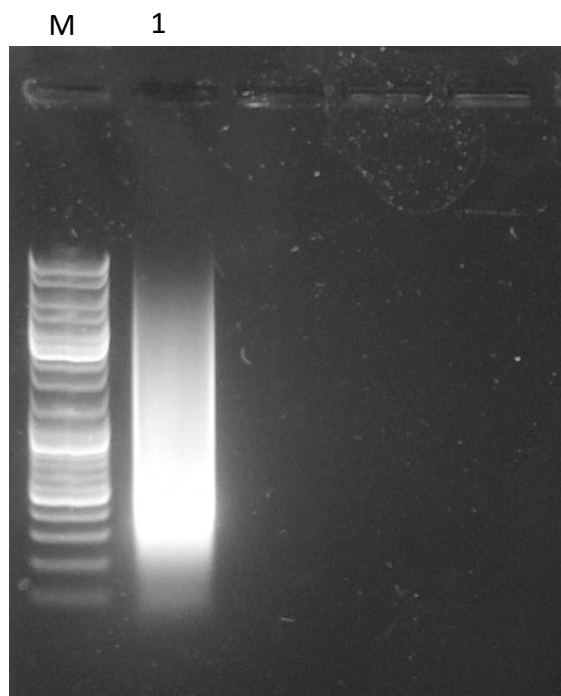
Genomska DNA izolirana je iz mladih listova koji su usitnjeni u tarioniku s tekućim dušikom. Izolacija je rađena upotrebom komercijalnog pripravka Qiagen mini kit (Hilden, Njemačka) prema uputstvima proizvođača. Genomska DNA korištena je za umnažanje satelitnih TcSAT1, TcSAT2 i TcSAT3 DNA koje su ujedno korištene kao sonde za fluorescencijsku hibridizaciju *in situ* (FISH). Ove tri satelitne DNA umnožene su pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR) upotrebom specifičnih početnica dizajniranih prema slijedu nukleotida satelitnih DNA dobivenih klaster analizom (tablica 1). Za sve reakcije PCR korišten je komercijalni pripravak Q5® High-Fidelity PCR kit (New England Biolabs, Inc., SAD): 1x Q5 High-Fidelity Master Mix, 10 pmol svake početnice (Macrogen, Nizozemska) i 1 µL uzorka DNA (16 ng) u ukupnom reakcijskom volumenu od 25 µL. Produkti PCR-a razdvojeni su pomoću elektroforeze na 1%-tnom agaroznom gelu, obilježeni bojom Syber Safe (Invitrogen, Eugene, SAD) i vizualizirani s UV transiluminatorom. Umnoženi fragmenti DNA klonirani su u pGEM.T Easy vector (Promega, SAD) prema instrukcijama proizvođača, nakon čega je slijedilo unošenje plazmida u bakteriju *E. coli* soja JM109 elektorporacijom. Kako bi se potvrdilo odgovara li uklonirani fragment DNA slijedu nukleotida satelitnih DNA, izolirana plazmidna DNA je sekvencirana (Macrogen, Nizozemska).

**Tablica 1. Slijed nukleotida za korištene sekvence satDNA u FISH-u.**

Početnica	Porodica	Sekvenca (5'-3')
TcSAT1_F	TcSAT1	CGTTGATTTCTCTTTGCTTGG
TcSAT1_R	TcSAT1	TTGGGATCGTTTAGGGCTTT
TcSAT2_F	TcSAT2	CAACCCTCAAATGTGAAAACC
TcSAT2_R	TcSAT2	CTGACAATCGGGATCTTTCC
TcSAT3_F	TcSAT3	GGGTCATTGGTTTGAGTTGG
TcSAT3_R	TcSAT3	TTGATCACAGTGCATAATTTGG

*F= naprijed, R= nazad*

Telomerne sekvence koje su korištene u FISH eksperimentima dobivene su umnažanjem *Arabidopsis*-tip telomerne DNA pomoću metode PCR upotrebom konkatamernih početnica (TTTAGGG)<sub>4</sub> i (CCCTAAA)<sub>4</sub> prema protokolu (Ijdo i sur. 1991). Početnice su korištene i kao kalup za umnažanje DNA. Reakcija je rađena u ukupnom volumenu od 50 µl i sadržavala je 25 µl PCR mix-a (pufer 10x PCR, 200 µM dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2U *Taq* polimeraze), 0,1 µM početnice T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub>. Uvjeti umnažanja bili su: 10 ciklusa od 1 min na 94 °C, 30 sek na 55°C i 1 min na 72°C, 30 ciklusa od 1 min na 94°C, 30 sek na 60°C i 90 sek na 72°C i 5 min na 72°C. Nakon umnažanja dobiven je smear telomernih fragmenata veličine od 100 do 3000 pb (slika 10).



**Slika 10. Produkt reakcije PCR *Arabidopsis*-tipa telomerne sekvence DNA. M- molekularni biljeg**

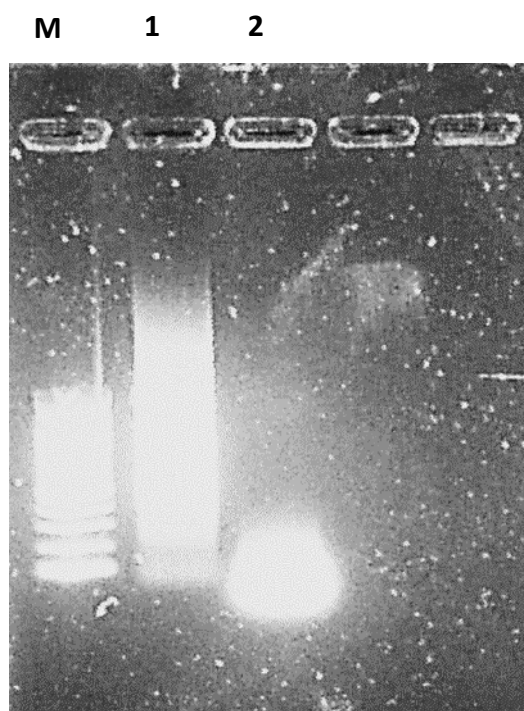
Za izradu sonde 5S rDNA korištene u FISH eksperimentima upotrjebljen je klon 4T bakterije *E. coli* transformiran plazmidom s ugrađenim insertom duljine 475 pb koji je izoliran iz vrste *Artemisia tridentata* (Garcia i sur. 2012; bakterijske stanice su dobivene ljubaznošću dr.sc. Aleša Kovarika). Kao sonda za lokalizaciju lokusa 35S rDNA korišten je *HindIII* fragment duljine 2,4 kb koji sadrži dio 18S rDNA i ITS1 iz vrste *Cucurbita pepo* ukloniran u plazmidni vektor UC19 (Torres-Ruiz i Hembelen 1994).

### 2.2.2. Izrada kromosomskih preparata

Korjenčići biljaka pretretirani su 0,05%-tnim kolhicinom (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) 4h u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon predtretmana korjenčići su fiksirani u otopini etanola i octene kiseline u volumnom omjeru 3:1 najkraće 24h. Za izradu kromosomskih preparata korišteni su meristemski vrškovi korjenčića. Izdvojene meristemske stanice vrška korjenčića bojane su na predmetnom stakalcu u kapi 2%-tnog acetokarmina zagrijavanjem do vrenja. Nakon bojanja acetokarminom preparati su odbojavani 45%-tnom octenom kiselinom. Meristemski vrškovi su usitnjavani, a nakon nanošenja pokrovnice preparati su pripremani primjenom „squash“ tehnike. Preparati su dehidrirani smrzavanjem pomoću ledenog CO<sub>2</sub> nakon čega su odstranjene pokrovnice. Za analizu položaja ponavljajućih sekvenci na kromosomima bilo je potrebno dobiti preparate s dobro raspršenim metafaznim kromosomima. Preparati s najboljim metafaznim pločama korišteni su za fluorescencijsku hibridizaciju *in situ* (FISH).

### 2.2.3. Fluorescencijska hibridizacija *in situ*

Sekvence TcSAT1, TcSAT2, TcSAT3, *Arabidopsis*-tip telomerne DNA i ribosomske 5S i 35S sekvence obilježene su s nukleotidima na koje su direktno vezane fluorescentne boje, crvena, Aminoallyl-dUTP-Cy3 (Jena Bioscience GmbH, Jena, Njemačka) ili zelena, Green-dUTP (Abbott Molecular Inc., SAD; slika 11) pomoću metode pomicanja usjeka (eng. nick translation) prema protokolu proizvođača (Abbott Molecular Inc., SAD) uz jednu modifikaciju: vrijeme inkubacije pri 15°C trajalo je šest sati.



**Slika 11. Produkt PCR reakcija *Arabidopsis*-tipa telomerne sekvence DNA umnožena telomerna DNA prije (1) i nakon obilježavanja (2). M – molekularni biljeg**

Tehnika FISH izvedena je prema protokolu (Mlinarec i sur. 2012b) s malim modifikacijama. Nakon tretmana RNazom (200  $\mu$ L RNaze (10 mg/mL) otopljene u puferu 2x SSC ( 2x natrijev citrat + 0.1% (w/v) natrijev dodecil sulfat) 1 h na 37°C, kromosomski preparati se ispiru u puferu 2x SSC i fiksiraju 10 min u 3,7% paraformaldehidu. Nakon fiksacije slijedi ispiranje u puferu 2x SSC (3x 5 min). Zadnji korak prije pripreme za denaturaciju i hibridizaciju preparati su dehidrirani u seriji etanola od niže prema višoj koncentraciji (70%, 90% i 96%).

Hibridizacijska smjesa sastojala se od 50% formamida, 10% dekstran sulfata, 0,6% natrijevog dodecil sulfata, pufera 2x SSC i 2 ng/ $\mu$ L obilježene sonde u ukupnom volumenu od 20  $\mu$ L. Smjesa je denaturirana na 96°C, 3 min, a zatim naglo ohlađena na ledu. Nakon denaturacije sonde slijedila je denaturacija preparata. Denaturirana sonda (40  $\mu$ L hibridacijske smjese) nakapana je na preparat, stanice su pokrivane sa sterilnom folijom, nakon čega je slijedila denaturacija na 73°C, 5 min.

Nakon preko noćne hibridizacije u inkubatoru u vlažnoj komori na 37°C slijedilo je ispiranje. Ispiranje je rađeno u vodenoj kupelji na 42°C sa slijedećim otopinama: 2x SSC (3x 5min), 0,1x SSC (1x 5 min), 2x SSC (1x 5 min), 4x SSC/Tween (2x 5 min) i 4x SSC/Tween (1x 8 min) na sobnoj temperaturi, a nakon ispiranja preparati su bojani 20 min s 2  $\mu$ g/ml 4, 6–diamino–2–

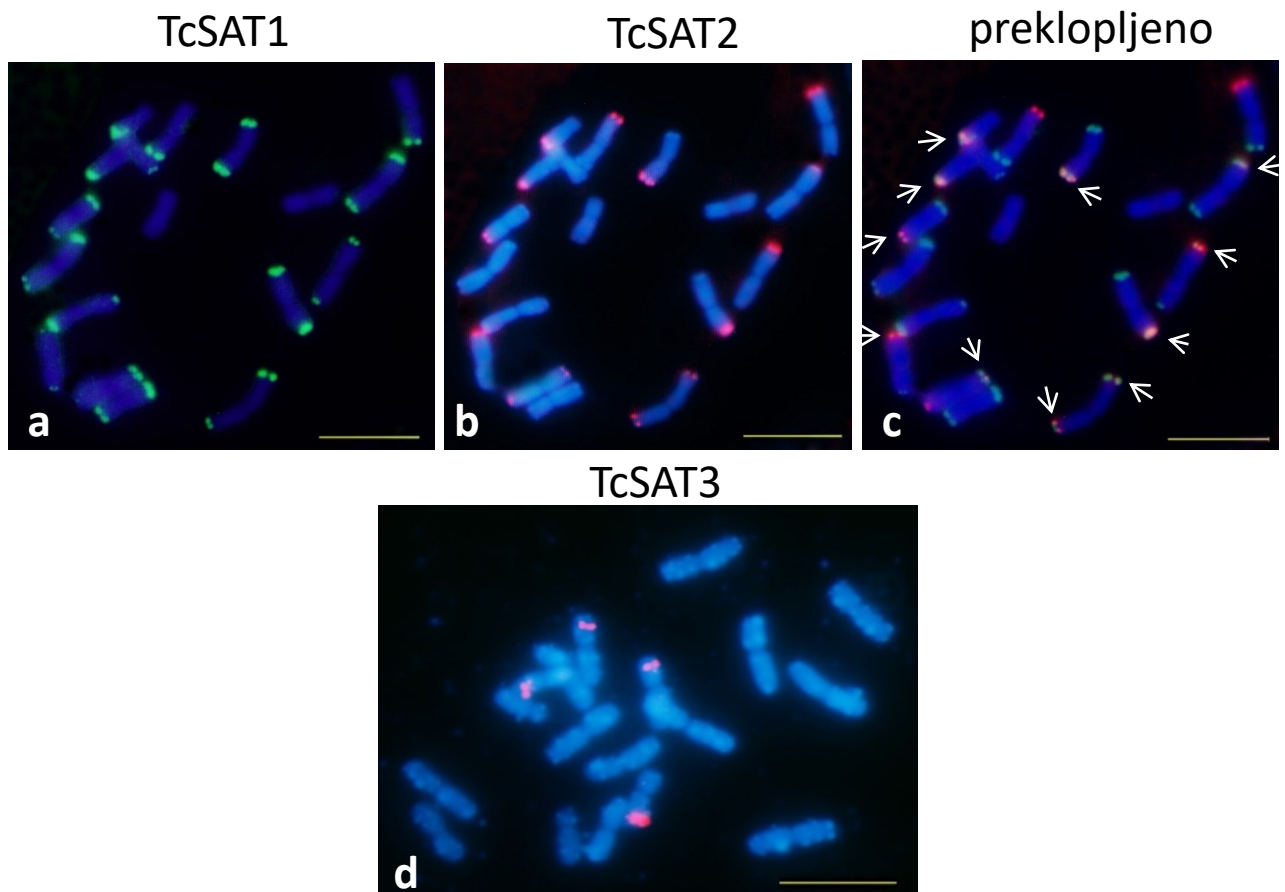
fenilindol (DAPI) kako bi se obojali cijeli kromosomi. Preparati su uklopljeni u Dako Fluorescence Mounting Medium (Dako North America Inc., SAD) i pohranjeni u mraku na 4°C. Signali su vizualizirani pomoću mikroskopa Olympus BX51 uz korištenje filtera za Cy3 (562 nm) i FITC (460 nm – 490 nm) fluorescenciju. Signali su fotografirani pomoću visoko osjetljive digitalne kamere Olympus DP70. Dobivene slike obrađene su uz pomoć programa Adobe Photoshop 6.0 u smislu preklapanja slika, pojačavanja intenziteta signala, te podešavanja kontrasta i svjetlosti. Analizirano je 10 metafaznih ploča s dobro raspršenim kromosomima po jedinki.

### 3. REZULTATI

U ovom radu analizirana je organizacija tri vrste ponavljajućih DNA, satelitne, telomerne i ribosomske u genomu vrste *Tanacetum cinerariifolium*. Ribosomska DNA i satDNA TcSAT3 analizirane su na tri jedinke iz populacije Konavle, telomerne sekvence analizirane su na sedam jedinki iz različitih populacija, dok su satDNA TcSAT1 i TcSAT2 analizirane na 27 jedinki iz svih pet populacija. Zaključno, cijelo istraživanje temelji se na 30 analiziranih jedinki iz pet populacija.

#### 3.1. Karakterizacija satelitne DNA u genomu dalmatinskog buhača

Metodom FISH utvrđeno je da se dvije satDNA porodice TcSAT1 i TcSAT2, koje su bogate AT-parovima baza, pojavljuju samo na distalnim krajevima većine metafaznih kromosoma te se obzirom na njihov položaj smatraju subtelomernim satelitnim porodicama (slika 12a, b, označeno strelicom). Obzirom na broj FISH signala utvrđeno je da je subtelomerna porodica TcSAT1 prisutna na većem broju kromosoma u odnosu na TcSAT2. Stoga je nakon dvostruke hibridizacije sa sondama TcSAT1 i TcSAT2 na metafazne kromosome uočeno preklapanje većine ali ne i svih signala na krajevima kromosoma. Osim subtelomernog položaja TcSAT1 i TcSAT2, u populaciji iz lokaliteta Osor uočen je intersticijski signal TcSAT1 na kraćem kraku jednog ili oba kromosoma trećeg kromosomskog para (slika 13a, zvjezdice). Za razliku od TcSAT1 i TcSAT2, satelitna porodica TcSAT3 lokalizirana je intersticijski samo na dva akrocentrična kromosomska para (slika 12 d). Jedan lokus TcSAT3 nalaze se na kraćem kraku sedmog, a drugi na duljem kraku osmog kromosomskog para (slika 17).



Slika 122. Fluorescencijska hibridizacija *in situ* (FISH) na metafaznim kromosomima vrste *Tanacetum cinerariifolium* ( $2n=18$ ). (a,b) Položaj satelitnih porodica TcSAT1 (zeleno) i TcSAT2 (crveno) na metafaznim kromosomima zasebno i (c) nakon dvostruke hibridizacije sa sondama TcSAT1 (zeleno) i TcSAT2 (crveno). Preklopljeni signali označeni su strelicama. (d) Intersticijski položaj satelitne porodice TcSAT3 na akrocentričnim kromosomima. Skala 10  $\mu\text{m}$

S ciljem da se istraži dinamika satelitnih porodica TcSAT1 i TcSAT2 u subtelomernom području, citogenetičkim tehnikama istraženo je 27 jedinki iz pet populacija. Pomoću tehnike FISH pokazan je polimorfizam TcSAT1 i TcSAT2. Obzirom na broj signala na kromosomima TcSAT2 pokazuje veću varijabilnost u usporedbi s brojem signala TcSAT1. Polimorfizam TcSAT1 i TcSAT2 prisutan je i unutar i između populacija (tablica 2). Najviše raznolikosti u broju signala pokazale su kultivirane biljke iz Tanzanije. Broj signala TcSAT1 varirao je između 26 i 30, dok je broj signala TcSAT2 varirao između 12 i 20. Populacija Osor pokazala je najmanje razlike te su u istraživanim jedinkama uočena 28 odnosno 29 signala TcSAT1 i 20 odnosno 21 signal TcSAT2.

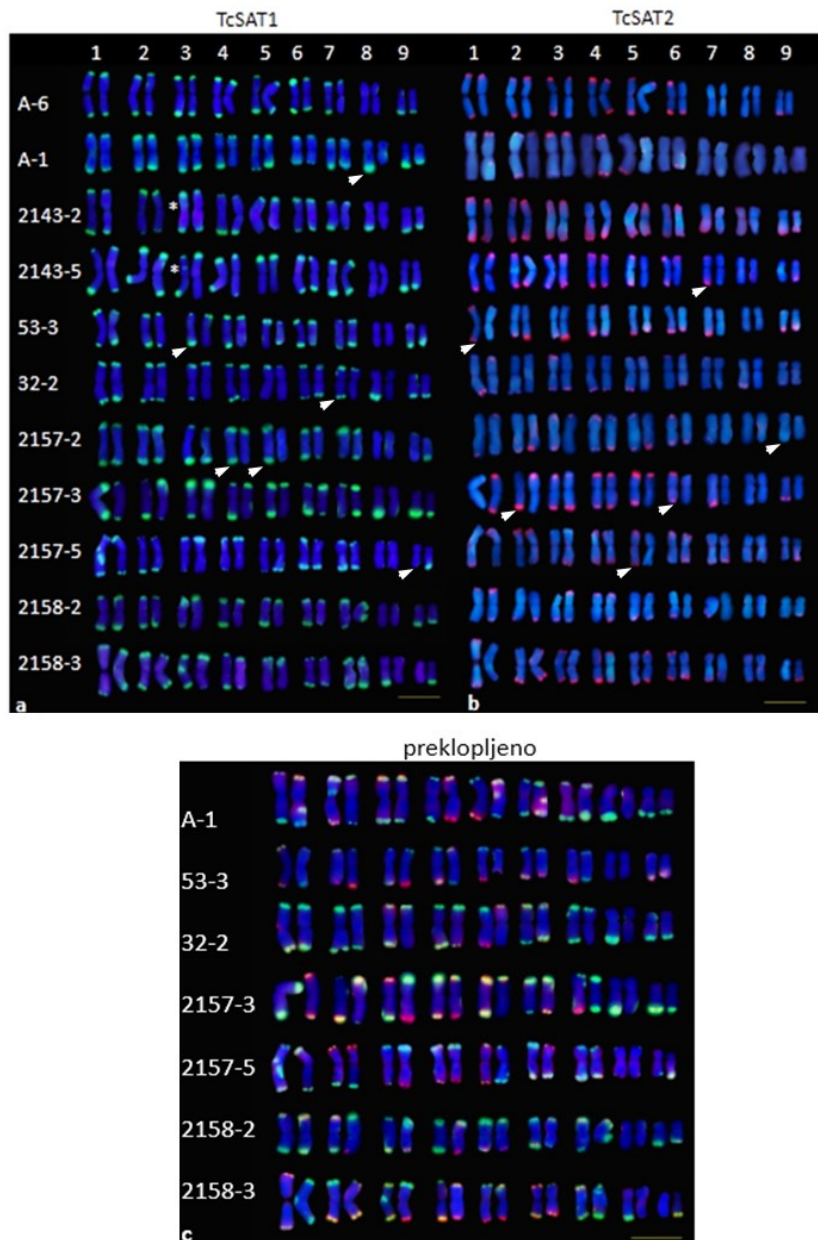
**Tablica 2. Istraživane jedinke i populacije dalmatinskog buhača te broj lokusa 35S/5S rDNA i satDNA porodica TcSAT1, TcSAT2 i TcSAT3.**

Jedinka	Populacija	35S/5S rDNA	TcSAT1	TcSAT2	TcSAT3
20-7	Konavle	5			4
1-3	Konavle	5			
1-4	Konavle				4
2143-1	Osor		27+2*	21	
2143-2	Osor		28+1*	21	
2143-3	Osor		27+1*	21	
2143-4	Osor		27+2*	21	
2143-5	Osor		27+1*	20	
53-3	Konavle	6	26	14	
32-2	Konavle		27	12	4
2146-1	Konavle		25	11	
2146-2	Konavle		26	10	
2146-3	Konavle		26	14	
2146-4	Konavle		26	13	
2146-5	Konavle		26	14	
2157-1	Cres-Merag		29	15	
2157-2	Cres-Merag		26	19	
2157-3	Cres-Merag		27	18	
2157-4	Cres-Merag		26	21	
2157-5	Cres-Merag		27	15	
2158-1	Cres-Kimen		28	18	
2158-2	Cres-Kimen		27	17	
2158-3	Cres-Kimen		28	19	
A-1	Tanzanija		30	12	
A-3	Tanzanija		26	13	
A-5	Tanzanija		26	18	
A-6	Tanzanija		28	20	
A-7	Tanzanija		26	16	
A-9	Tanzanija		28	16	
A-12	Tanzanija		28	14	
<i>*interscijalni signali TcSAT1</i>					

Kako bi se odredila točna distribucija polimorfnih lokusa, 11 jedinki iz pet populacija citogenetički je detaljnije istraženo. Citogenetičke analize su pokazale veliku varijaciju u položaju signala TcSAT1 i TcSAT2 (slika 13) što znači da svaka jedinka ima jedinstvenu organizaciju lokusa TcSAT1 i TcSAT2, a uz to svaka jedinka je heterozigot za barem jedan lokus TcSAT1 ili TcSAT2. Ukupno u svim analiziranim jedinkama utvrđeno je 9 polimorfnih lokusa TcSAT1 i 14 polimorfnih lokusa TcSAT2. Polimorfni lokusi TcSAT1 nalaze se



subterminalno na duljem kraku kromosoma 3, 4, 7, 8 i 9, na oba kraka kromosoma 5 te intersticijski na kraćem kraku kromosoma 3 (slika 13a). Polimorfni lokusi TcSAT2 nađeni su na oba kraja kromosoma 1, 2, 3, 4, 5 i 6 te na duljem kraku kromosoma 7 i 9 (slika 13b). Zaključno, lokusi TcSAT1 su dominantni na krajevima kraćih kromosomskih krakova dok su lokusi TcSAT2 jednako dominantni na krajevima oba kraka kromosoma (slika 13c, slika 17).



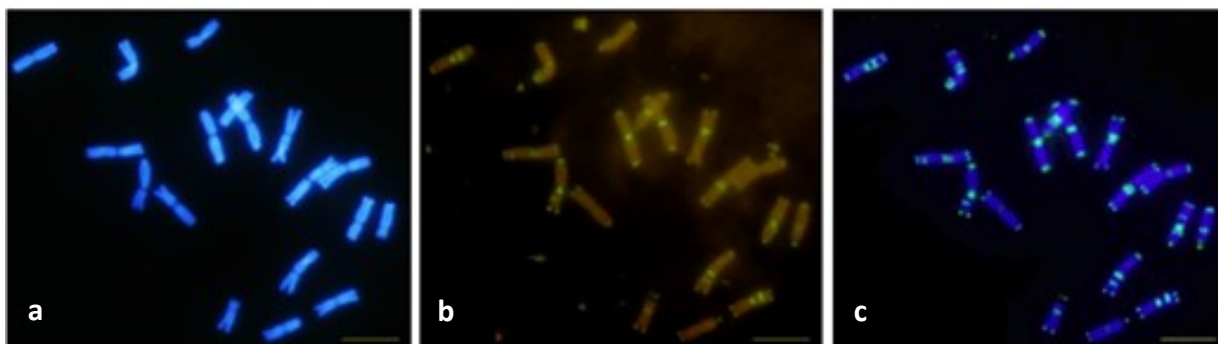
Slika 13. Polimorfizam signala TcSAT1 i TcSAT2 dobivenih FISH-om na metafaznim kromosomima vrste *Tanacetum cinerariifolium* ( $2n=8$ ). Homologni kromosomski parovi identificirani su prema morfologiji i položaju signala nakon hibridizacije sa sondama TcSAT1 (a) i TcSAT2 (b). Heteromorfni kromosomski parovi označeni su strelicama. Slika (c) prikazuje rezultate dobivene dvostrukom hibridizacijom sa sondama TcSAT1 i TcSAT2. Skala 10 μm

Krajevi kromosoma koji nemaju signale TcSAT1/TcSAT2 su kraći krakovi akrocentričnih kromosomskih parova 8 i 9 (slika 13, slika 17) , a jedan kromosom kromosomskog para 8 nema signale niti na jednom kraju kromosoma. Ne može se isključiti mogućnost da se i na tim kromosomima nalaze satelitne porodice TcSAT1/TcSAT2 ali u malim količinama koje nije moguće detektirati pomoću tehnike FISH.

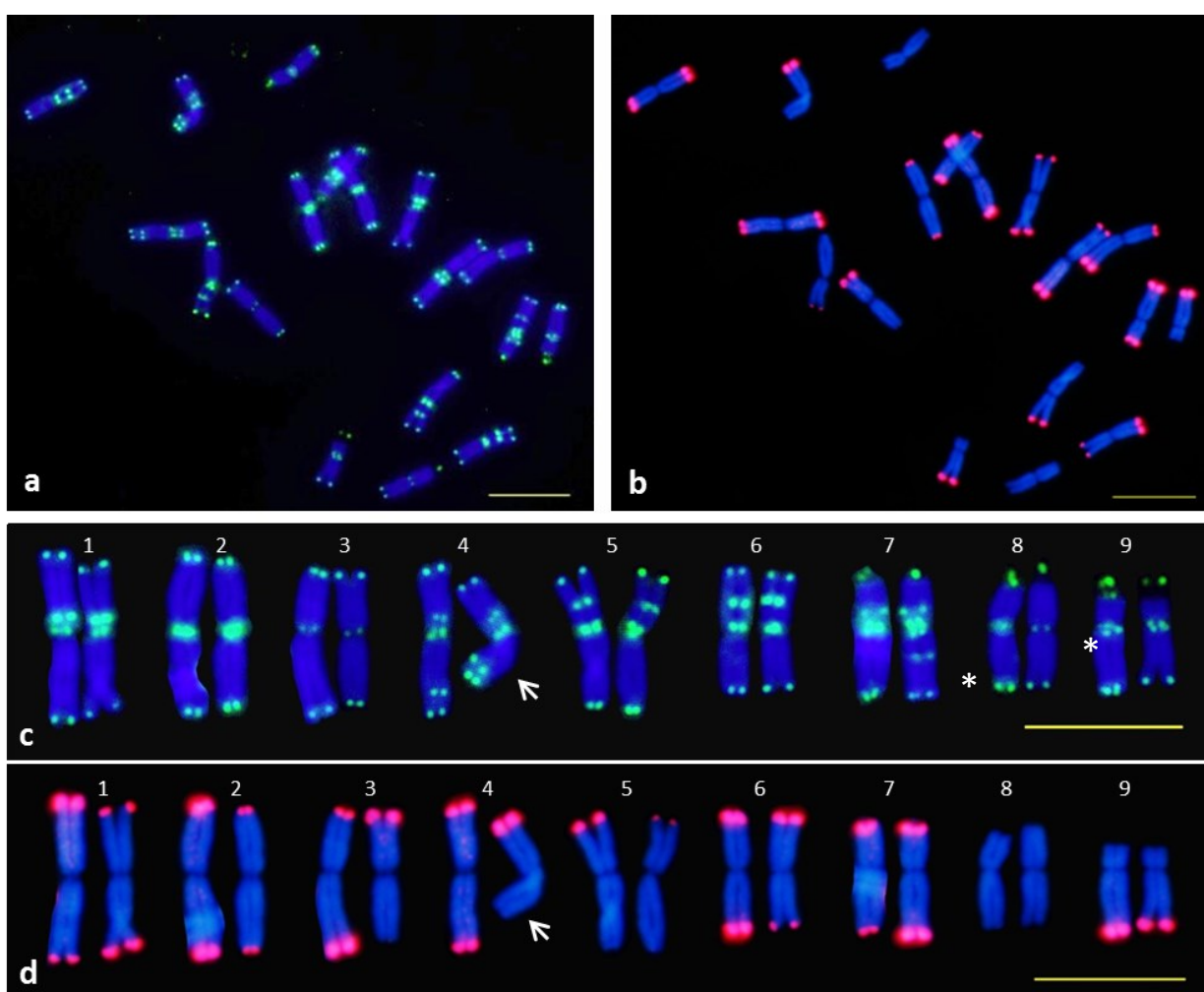
### 3.2. Položaj *Arabidopsis*-tip telomernih ponavljanja u genomu dalmatinskog buhača

*Arabidopsis*-tip telomernih ponavljanja tj. sljedovi (TTTAGGG)<sub>n</sub> utvrđeni su tehnikom FISH na svim kromosomima vrste *T. cinerariifolium* na terminalnim krajevima kromosoma. Intersticijski signali telomerne DNA (ITS) pojavljuju se u intersticijskom i/ili centromernom/pericentromernom području na svim kromosomima (slika 14). Intersticijski signali pojavljuju se u različitim veličinama odnosno intenzitetu fluorescencije i većina tih signala je intenzivnija u odnosu na signale na krajevima kromosoma. Obzirom na položaj telomernih ponavljanja vidljivo je da svaki kromosom ima specifičan raspored ITS-ova. Centromerni/pericentromerni ITS-ovi pojavljuju se na svim kromosomima dok se intersticijski ITS-ovi pojavljuju na 1, 4, 5, 6 i 7 kromosomskom paru (slika 14, slika 17). Kromosomski parovi 7 i 8 pokazuju heteromorfizam u jačini i veličini signala u telomernom području na dužem kraju kromosoma 7 i u pericentromernom/centromernom području kromosoma 8. Signali ITS-ova se također razlikuju u veličini i intenzitetu između homolognih kromosomskih parova što ukazuje na heterozigotnost ITS-ova (slika 14 i slika 15).

Sljedeći korak u istraživanju bio je utvrditi međusobni položaj telomernih ponavljanja i satelitne porodice TcSAT1 te je u tu svrhu napravljen FISH sa telomernom sondom i sondom TcSAT1 (slika 15 a, b). Rezultati su pokazali da je subtelomerna porodica TcSAT1 smještena uzvodno od telomernih ponavljanja (slika 15 c, d). Osim heteromorfizma u jačini signala između kromosoma u gotovo svim kromosomskim parovima, na kromosomskom paru 4 utvrđena je intersticijska delecija subtelomernog područja vidljiva kroz odsutnost signala nakon hibridizacije sa sondom TcSAT1 (slika 15 c, d; označeno strelicom).



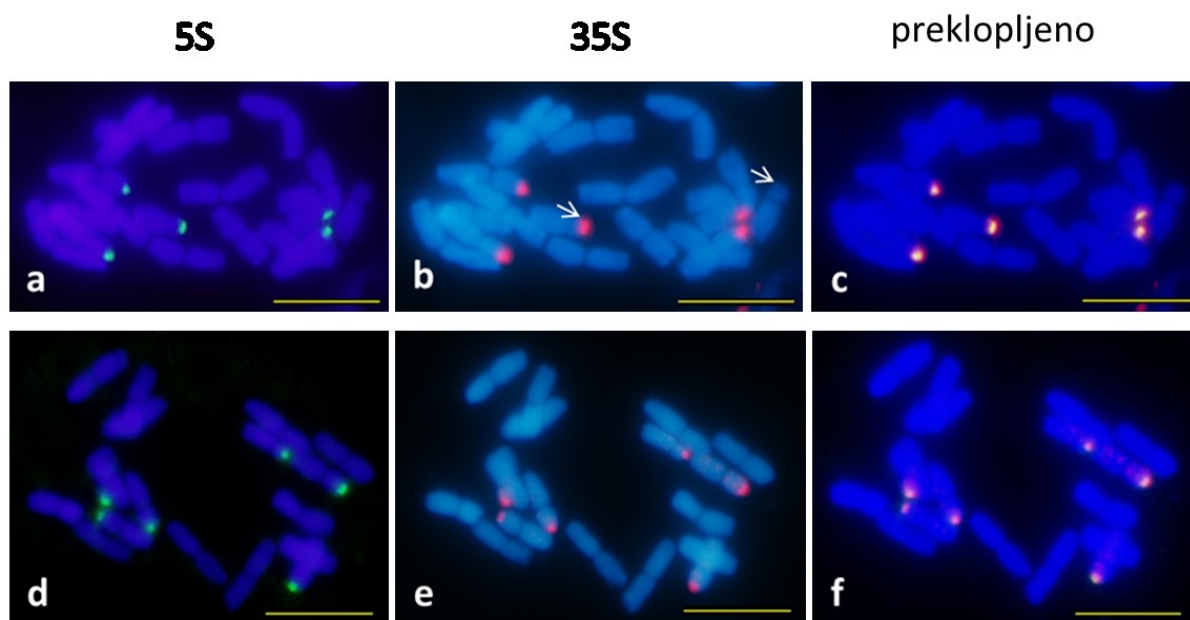
Slika 14. Organizacija *Arabidopsis*-tipa telomernih (TTTAGGG)<sub>n</sub> ponavljanja na kromosomima vrste *T. cinerariifolium* primjenom tehnike FISH. (a) Metafazni kromosomi obojani s DAPI, (b) metafazni kromosomi nakon hibridizacije s telomernom sondom (TTTAGGG)<sub>n</sub> i (c) metafazni kromosomi nakon preklapanja slika a i b. Skala 10 μm



Slika 15. Fluorescencijska hibridizacija *in situ* telomernih sekvenci i sonde TcSAT1 na metafazne kromosome vrste *Tanacetum cinerariifolium*. (a) i (c) Metafazna ploča i pripadajući kariogram nakon hibridizacije s telomernom sondom. (b) i (d) Metafazna ploča i pripadajući kariogram nakon hibridizacije sa sondom TcSAT1. Delecija subteloernog područja na jednom kromosomu kromosomskog para 4 označena je strelicom. Skala 10 μm

### 3.3. Broj i položaj 35S/5S ribosomskih (rRNA) gena u genomu dalmatinskog buhača

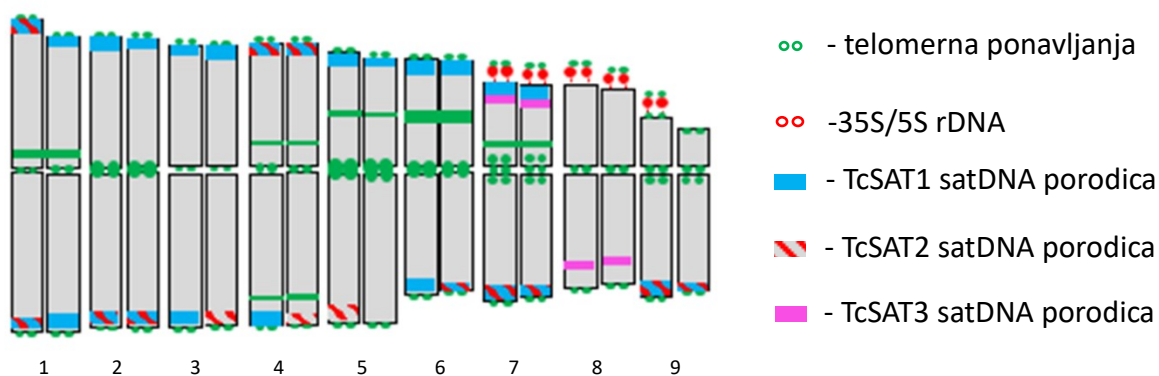
Dvostrukom hibridizacijom sa sondama 35S i 5S potvrđena je L-konfiguracija ribosomske DNA u genomu vrste *T. cinerariifolium* (slika 16 a-f). Utvrđeno je da dalmatinski buhač ima 3 lokusa 35S/5S koji su smješteni na kraćim krakovima 3 akrocentrična kromosomska para 7, 8 i 9 (slika 16d-f). Iako je položaj i broj lokusa 35S/5S određen samo u populaciji Konavle uočene su razlike u broju signala 35S/5S u različitim biljkama. U nekim biljkama prisutno je samo pet signala 35S/5S (slika 16a-c). Razlika u broju signala 35S/5S rezultat je izostanka signala na kraćem kraku jednog kromosoma iz kromosomskog para 9 što je prikazano na slici 16b (označeno strelicama) i idiogramu (slika 17).



Slika 16. Fluorescencijska hibridizacija *in situ* sa sondama 35S i 5S na metafaznim kromosomima vrste *Tanacetum cinerariifolium*. (a – c) Metafazni kromosomi hibridizirani sa sondom 35S (a), 5S (b) i s preklopljenim signalima (c). Kolokalizacija hibridizacijskih signala potvrđuje L-konfiguraciju 35S i 5S rDNA. (a-c) Dobro vidljiva 5 signala 35S/5S. Strelicama je naznačen heteromorfni kromosomski par 9. (d – f) metafaza s 6 signala 35S/5S. Skala 10  $\mu\text{m}$

## 4. RASPRAVA

Ovaj rad predstavlja prvo opsežno citogenetičko istraživanje organizacije i značajki repeatoma dalmatinskog buhača (*Tanacetum cinerariifolium*). Istraživanje je uključilo tri satelitne DNA i ribosomske DNA koje su dobivene klaster analizom pomoću programa RepeatExplorer i TAREAN. Osim njih istražen je i položaj telomernih ponavljanja u genomu dalmatinskog buhača. Položaj lokusa koje zauzimaju pojedine ponavljajuće DNA kao i njihova varijabilnost u genomu dalmatinskog buhača prikazani su na slici 17.



Slika 17. Idiogram vrste *Tanacetum cinerariifolium*. Na idiogramu su prikazani položaji *Arabidopsis*-tipa telomernih ponavljajućih sekvenci, 35S/5S rDNA i satelitnih porodica TcSAT1, TcSAT2 i TcSAT3. Kromosomi su poredani po veličini i morfoloiji. Skala 10  $\mu$ m

U ovom radu utvrđeno je da su dvije satelitne porodice TcSAT1 i TcSAT2 smještene u subteloemnom području na gotovo svim kromosomima, dok je treća TcSAT3 smještena intersticijski na dva kromosomska para. Subtelomerne satelitne porodice opisane su u kultiviranim vrstama kao što su riža (Cheng i sur. 2001), rajčica (Lapitan i sur. 1989), kukuruz (Li i sur. 2009), ječam (Brandes i sur. 1995), duhan (Chen i sur. 1997; Kenton i sur. 1993) ali i u vrstama iz prirodnih populacija kao što je vrsta *Anemone hortensis* (Mlinarec i sur. 2009). Dosadašnja istraživanja pokazala su da se većina subteloemnih satelitnih porodica nalaze blizu jedna drugoj ili čak kolokaliziraju odnosno, naizmjenično su raspoređene duž kromosoma (Brandes i sur. 1995; Chen i sur. 1997; Dechyeva i Schmidt 2006; Vershinin i sur. 1995). Torres i sur. (2011) su u svom radu na genomu krumpira pokazali da su subteloemne satDNA organizirane u samostalni i povezani niz. U ovom radu dvostruka hibridizacija sa

sondama TcSAT1 i TcSAT2, koje su obilježene različitim bojama (crvena i zelena), pokazala je preklapanje hibridizacijskih signala što ukazuje da se TcSAT1 i TcSAT2 pojavljuju u jedinstvenom, povezanom nizu. U genomu čovjeka subtelomerna područja sadrže mozaički niz udvostručenih DNA blokova koji se segmentalno izmjenjuju (Reithmann i sur. 2005). Neki od tih subtelomernih segmenata sadrže i gene te postoji mogućnost da subtelomerne ponavljajuće DNA kao dio heterokromatina utječu na ekspresiju tih gena što može posljedično rezultirati pojavom različitih fenotipova (Linardopoulou i sur. 2005). U ovom radu utvrđena je visoka razina polimorfizma subtelomernog područja u dalmatinskom buhaču što je vidljivo kao prisustvo/odsustvo subtelomernih signala na pojedinim kromosomima određenog kromosomskog para. Detaljna analiza 11 jedinki pokazala je 8 polimorfni lokusa TcSAT1 i 14 polimorfni lokusa TcSAT2. Ovaj rezultat ukazuje na veliku plastičnost odnosno dinamiku subtelomernog područja. Organizacija subtelomernih lokusa TcSAT1 i TcSAT2 na pojedinim kromosomima različita je čak i između jedinki iste populacije. Ovaj rezultat ukazuje da se u subtelomernom području događaju intra- i interkromosomske rekombinacije. Zbog uzastopno ponavljajuće značajke subtelomernih DNA često može doći do pojave asimetričnog crossing-overa što dovodi do umnažanja ili gubitka dijela ili cijelog subtelomernog područja na jednom od kromosomskih parova. Posljedično to dovodi do promjena u organizaciji subtelomernih satelitnih porodica što je slučaj i u primjeru dalmatinskog buhača. Vrlo male varijacije u slijedu nukleotida satelitnih porodica TcSAT1 i TcSAT2 (postotak različitosti u ponavljanjima je 1,5% za TcSAT1 i 0,24% za TcSAT2; neobjavljeni podaci) ukazuju da su interkromosomske rekombinacije evolucijski relativno nedavne. Na to ukazuje i činjenica da svaka jedinka pa i unutar iste populacije ima jedinstvenu organizaciju TcSAT1 i TcSAT2. Plastičnost subtelomernog područja dokazana je i u drugim skupinama organizama kao što je kvasac i parazit koji prenosi malariju, *Plasmodium* (Louis 1995, Freitas-Junior i sur. 2000). U biljkama plastičnost subtelomernog područja nije nađena u modelnoj vrsti *Arabidopsis thaliana* (Heacock i sur. 2004, Kuo i sur. 2006) i prema našim saznanjima zabilježena je samo u krumpiru i grahu (Torres i sur. 2011, Richard i sur. 2013). Stoga ovaj rad predstavlja prvo istraživanje koje pokazuje plastičnost subtelomernog područja u genomu biljaka zasnovano na značajnom broju istraživanih populacija i jedinki.

Populacija Osor se razlikuje od ostale četiri istraživane populacije obzirom da je kod nje jedan lokus TcSAT1 smješten intersticijski na jednom kromosomskom paru. Pojava tog

lokusa može nastati kao rezultat premještanja jednog dijela ponavljajućih sljedova TcSAT1 iz subtelomernog područja u intersticijsko pomoću transpozona ili je nakon kromosomskih lomova došlo do pogreške u popravku koja je rezultirala inverzijom. Obzirom da je ovaj lokus uočen samo u jedinkama jedne populacije najvjerojatnije je da je do njegovog formiranja došlo nakon razdvajanja populacije Osor od ostalih populacija dalmatinskog buhača na jadranskoj obali. Kako ova promjena nije imala utjecaja na reproduktivni fitnes dalmatinskog buhača ona se širila u populaciji kroz spolno razmnožavanje.

Hibridizacija *Arabidopsis*-tipa telomerne sekvence (TTTAGGG)<sub>n</sub> na metafazne kromosome dalmatinskog buhača pokazala je da se telomerne sekvence nalaze na svakom kraju kromosoma što je i nužno jer one štite krajeve kromosoma i odgovorne su za stabilnost genoma. Međutim, telomerna ponavljanja na kromosomima dalmatinskog buhača ne nalaze se isključivo na krajevima kromosoma već i u centromernom/pericentromernom i/ili intersticijski duž krakova kromosoma. Svaki homologni kromosom ima jedinstven položaj intersticijskih telomernih ponavljanja (ITS) što omogućuje razlikovanje svakog pojedinog kromosomskog para. Stoga ITSovi predstavljaju dobar kromosomski biljeg za istraživanje evolucije kariotipa vrsta iz roda *Tanacetum*. Intersticijska telomerna ponavljanja nađena su i u genomu vrste *T. ptarmiciflorum* (Shibata i Hizume 2011) kao i u dvije duge vrste u redu Anthemideae (*Matricaria* i *Anacyclus*) koje su bliske rodu *Tanacetum* (Sonboli i sur. 2012, Vitales i sur. 2018). S druge strane u četiri istražene vrste iz roda *Argyranthemum* (isto iz reda Anthemideae, ali nisu usko vezane uz rod *Tanacetum*) (Borgen i sur. 2003) nije nađen niti jedan ITS (Oberprieler 2004). Kako bi objasnili ovakvu distribuciju ITSova u redu Anthemideae, Rosato i sur. (2018) postavili su hipotezu da je ITS nastao razdvajanjem Euroazijskog reda Anthemideae (Oberprieler i sur. 2009), nakon čega je uslijedilo njihovo mnogostruko umnažanja i širenje u genomu ili je došlo do njihove redukcije. Distribucija telomernih sekvenci može biti vrlo korisna u proučavanju mehanizma evolucije kariotipa (Fuchs i sur. 1995). Neke telomerne DNA sekvence ili sekvence slične telomerama smještene u intersticijskim regijama na kromosomu posljedica su razmještanja DNA sekvenci tijekom evolucije kromosoma (Uchida i sur. 2002; Tek i Jiang 2004). Jedan od mehanizama kojim mogu nastati ITSovi je popravak dvolančanih lomova pomoću telomeraze. Isto tako moguće je da se ITSovi formiraju kao posljedica fuzije kromosoma ili inverzije dijelova kromosoma što je također posljedica popravka dvolančanih lomova (Fuchs i sur. 1995). Osim toga, moguće je da ITSovi nastaju integracijom ekstrakromosomskih kružnih telomernih

ponavljanja u kromosom ili su telomerni sljedovi premješteni pomoću transpozona (Cherry i Blackburn 1985; Murnane i Yu 1993; Flint i sur. 1994, Azzalin i sur. 2001). Dosadašnja citogenetička istraživanja vrsta iz reda Anthemideae pokazala su da je svima zajednički osnovni broj kromosoma  $x=9$ , da nemaju telocentričnih kromosoma, a akrocentrici nose lokuse 35S i 5S. Ove značajke upućuju da fuzija kromosoma vjerojatno nije mehanizam koji bi mogao biti uključen u formiranje ITSova kod ovog reda pa tako i u vrstama iz roda *Tanacetum*. Prema Ruiz-Herrera i sur. (2008) kratki ITSovi u genomu kralježnjaka nastaju insercijom telomernih ponavljanja kao posljedica popravka dvolančanih lomova tijekom evolucije. Daljnja istraživanja trebala bi objasniti točan mehanizam evolucije ITSova i objasniti ima li telomeraza ulogu u mehanizmu insercije ITSova u kromosomima reda Anthemidae ili su neki drugi mehanizmi, kao što su inverzije ili ugradnja kružne telomerne izvanskromosomske DNA, uključeni u evoluciju kariotipa.

Obzirom na veličinu signala može se reći da ITSovi zauzimaju puno veći dio na kromosomu od tipičnog telomernog područja. Red Anthemideae okarakteriziran je velikom varijabilnosti u broju i poziciji ITSova (Vitales i sur. 2018). Na primjer u rodu *Anacyclus* broj signala ITS varira od 2 do 45 (Vitales i sur. 2018,) dok se u dalmatinskom buhaču pojavljuje 34-35 signala ITS. Štoviše, u rodu *Anacyclus* varijabilnost ITSova značajna je unutar ali i između populacija (Rosato i sur. 2018). U vrsti *A. pyrethrum* broj signala ITS varira od 26 do 45 unutar jedne populacije, dok je u rodu *Anacyclus* nađeno 12 polimorfnih signala.

Ribosomska DNA sastoji se od dvije velike podjedinice 35S i 5S koje su u većini eukariotskih genoma odvojene razmaknicama (S-konfiguracija). Novija istraživanja pokazala su da u genomima biljaka određenih porodica možemo naći i L-konfiguraciju, tj. da su 35S i 5S podjedinice na istom lokusu (Garcia i sur. 2010). L-konfiguracija prvi je puta u višim biljkama nađena u rodu *Artemisia* (Garcia i sur. 2009), a zatim je pokazano da najmanje 25% vrsta iz porodice Asteraceae ima L-konfiguraciju. Neke vrste iz roda *Tanacetum* pokazale su L-tip organizaciju genoma te je naš cilj bio istražiti njihov položaj na vrsti *Tanacetum cinerariifolium*. Klaster analiza pomoću programa RepeatExplorer i TAREAN pokazala je da se 5S rDNA nalazi u međugenskoj razmaknici između 26S i 18S rDNA što je potvrdilo L-konfiguraciju u 35S i 5S rDNA u dalmatinskom buhaču. Dvostruka hibridizacija sa sondama 5S i 35S rDNA pokazala je preklapanje hibridizacijskih signala i na citogenetičkoj razini te potvrdila L-konfiguraciju rDNA na sva 3 akrocentrična kromosomska para. U nižim eukariotima (kvasci i ostale gljive) postoje vrste sa strogom S-konfiguracijom, ali isto tako i



genomi s L-konfiguracijom (Bergeron 2008). Zanimljivo je da su Garcia i sur. (2010) pokazali velike varijacije u organizaciji rDNA u porodici Asteraceae čak i između vrsta koje su se relativno nedavno razdvojile. Na temelju molekularnog sata, porodica Asteraceae nije starija od 50 milijuna godina (Magallon 1999), što ukazuje da su se vrste relativno nedavno razdvojile (Oberprieler 2005). Stoga je za očekivati da su u ovoj porodici promjene u organizaciji rDNA također dinamične. Iz rezultata dosadašnjih istraživanja ne može se zaključiti da je razmještaj gena rRNA karakteristika porodice, već da promjene u razmještaju vjerojatno počinju na nižim taksonomskim razinama kao što je rod (Garcia 2010). Rod *Tanacetum* je relativno neistražen ali su autori Abd El-Twab i Kondo (2012) pokazali da u vrstama *T. achillefolium* i *T. parthenium* postoji L-konfiguracija. Zanimljivo je da su u genomu vrste *T. achillefolium* prisutna oba L- i S-konfiguracijska tipa, dok su u vrsti *T. parthenium* prisutni samo oni L-konfiguracije. Citogenetička istraživanja na vrstama iz roda *Tanacetum* pokazala su da postoji varijabilnost u broju 35S/5S signala što su pokazali i rezultati dobiveni u ovom radu. Naime, dalmatinski buhač ima tri 35S/5S lokusa koji su smješteni na tri akrocentrična kromosomska para. Međutim, u populaciji Konavle nađena je jedinka s pet 35S/5S signala. Radilo se o izostanku 35S/5S signala na jednom kromosomu akrocentričnog kromosomskog para 9. Da li je ova razlika u broju 35S/5S signala značajka populacije Konavle ili je prisutna i u drugim populacije treba još istražiti.

Rezultati dobiveni u ovom radu pokazuju kako je genom dalmatinskog buhača izrazito plastičan i dinamičan obzirom na varijabilnost položaja ponavljajućih DNA u genomu. Buduća istraživanja pokazat će mehanizme koji dovode do različitosti organizacije ponavljajućih DNA unutar i između populacija dalmatinskog buhača.

## 5. ZAKLJUČAK

Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium*) pripada porodici Asteraceae koju karakteriziraju dinamični i plastični genomi što su potvrdili i rezultati istraživanja u ovom radu. Fluorescencijskom hibridizacijom *in situ* ustanovljen je položaj i organizacija satelitnih, telomernih i ribosomskih sekvenci DNA.

- Polimorfizam satelitnih porodica TcSAT1 i TcSAT2 smještenih u subtelomernom području pokazuje da je to područje najdinamičniji dio genoma dalmatinskog buhača. Njihov različit položaj na kromosomima između jedinki iste populacije ukazuju da je varijabilnost subtelomernog područja vjerojatno posljedica interkromosomskih rekombinacija. Značajna varijabilnost subtelomernih područja na kromosomima i niska varijabilnost na razini slijeda nukleotida satelitnih porodica TcSAT1 i TcSAT2 ukazuju da su one nastale evolucijski relativno nedavno.
- *Arabidopsis*-tip telomerne sekvence nalazi se na kraju svakog kromosoma, ali i intersticijski na kromosomima dalmatinskog buhača. Intersticijske telomerne sekvence dokaz su promjena u genomu koje su tijekom evolucije genoma dalmatinskog buhača vjerojatno nastale prilikom popravka dvolančanih lomova molekule DNA.
- Dokazana je L-konfiguracija 35S/5S rDNA u dalmatinskom buhaču što je rijetka organizacija rRNA gena u biljnim genomima. Osim toga, na citogenetičkoj razini utvrđena je varijabilnost i tog dijela genoma.

## 6. LITERATURA

Abad J.P., de Pablos B., Agudo M., Molina I., Giovinazzo G., Martin-Gallardo A., Villasante A. (2004): Genomic and cytological analysis of the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*: telomere-derived sequences at internal regions. *Chromosoma* **113**:295–304.

Abd El-Twab M., Kondo K. (2012): Physical mapping of 5S and 45S rDNA in *Chrysanthemum* and related genera of the *Anthemideae* by FISH, and species relationships. *J Genet* **91**:245–9.

Adams S.P., Hartman T.P., Lim K.Y., Chase M.W., Bennett M.D., Leitch I.J. i Leitch A.R. (2001): Loss and recovery of *Arabidopsis*-type telomere repeat sequences 5'-(TTTAGGG)-3' in the evolution of a major radiation of flowering plants. *Proc. Biol. Sci.* **268**: 1541-1546.

Alfenito M.R., Birchler J.A. (1993): Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. *Genetics* **135**:589– 597.

Azzalin C.M., Nergadze S.G., Giulotto E. (2001): Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin. *Chromosoma* **110**:75–82.

Bachmann L., Sperlich D. (1993): Gradual evolution of a specific satellite DNA family in *Drosophila ambigua*, *D. tristis*, and *D. obscura*. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 647–659.

Badaeva E.D., Dedkova O.S., Gay G., Pukhalskyi V.A., Zelenin A.V., Bernard S., Bernard M. (2007): Chromosome rearrangements in wheat: Their types and distribution. *Genome* **50**: 907–926.

Bergeron J., Drouin G. (2008): The evolution of 5S ribosomal RNA genes linked to the rDNA units of fungal species. *Curr Genet*, **54**(3):123-131.

Betekhtin A., Jenkins G., Hasterok R. (2014): Reconstructing the evolution of *Brachypodium* genomes using comparative chromosome painting. *PLoS ONE* **9**(12): e115108.

Bhat B.K. (1995): Breeding Methodologies Applicable to Pyrethrum. In: *Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology and Uses* (JE Casida, GB Quistad, eds) Oxford University Press, New York, str. 67-94.

Biscotti M.A., Canapa A., Forconi M., Olmo E., Barucca M. (2015): Transcription of tandemly repetitive DNA: Functional roles. *Chromosome Res.* **23**: 463–477.

Bolzan A.D. (2012): Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. *Mutagenesis* **27**:1–15.

Borgen L., Leitch L., Santos-Guerra A. (2003): Genome organization in diploid hybrid species of *Argyranthemum* (Asteraceae) in the Canary Islands. *Bot. J. Linn. Soc.* **141**: 491–501.

Brandes A., Roder M.S., Ganai M.W. (1995): Barley telomeres are associated with two different types of satellite DNA sequences. *Chromosome Res.* **3**: 315–320.

- Brewer J.G. (1968): Flowering and seed setting in pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.). *Pyrethrum Post* **9**(4): 18-21.
- Brewer J.G. (1974): Incompatibility relationship in pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.). *Euphytica* **23**: 45-47.
- Capesius I. (1997): Analysis of the ribosomal RNA gene repeat from the moss *Funaria hygrometrica*. *Plant. Mol. Biol.* **33**(3):559-564.
- Casida J.E., Quistad G.B. (1995): *Pyrethrum flowers: production, chemistry, toxicology, and uses*. Oxford University Press, New York.
- Chehregani A., Mehanfar N. (2008): New chromosome counts in the tribe *Anthemideae* (Asteraceae) from Iran, *Cytologia (Tokyo)* **73**:189-96.
- Chen C.M., Wang C.T., Wang C.J., Ho C.H., Kao Y.Y. i sur (1997): Two tandemly repeated telomere-associated sequences in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Chromosome Res.* **5**: 561–568.
- Cheng Z.K., Stupar R.M., Gu M.H. i Jiang J.M. (2001): A tandemly repeated DNA sequence is associated with both knob-like heterochromatin and a highly decondensed structure in the meiotic pachytene chromosomes of rice. *Chromosoma* **110**: 24–31.
- Cherry J.M., Blackburn E.H. (1985): The internally located telomeric sequences in the germline chromosomes of *Tetrahymena* are at the ends of transposon-like elements. *Cell* **43**: 747–758.
- Chuzhanova N., Abeyasinghe S.S., Krawczak M., Cooper D.N. (2003): Translocation and gross deletion breakpoints in human inherited disease and cancer II: Potential involvement of repetitive sequences elements in secondary structure formation between DNA ends. *Hum. Mutat.* **22**, 245–251.
- Dechyeva D., Schmidt T. (2006): Molecular organization of terminal repetitive DNA in Beta species. *Chromosome Res.* **14**: 881–897.
- Drouin G., Hofman J.D., Doolittle W.F. (1987): Unusual ribosomal RNA gene organization in copepods of the genus *Calanus*. *J Mol Biol* **196**(4):943-946.
- Febrer M., Goicoechea J.L., Wright J., McKenzie N., Xong X., Lin J., Collura K., Wissotski M., Yu Y., Ammiraju J.S.S. (2010): An integrated physical, genetic and cytogenetic map of *Brachypodium distachyon*, a model system for grass research. *PLoS ONE* **5**:e13461.
- Flint J., Craddock C.F., Villegas A., Bentley D.P., Williams H.J., Galanello R., Cao A., Wood W.G., Ayyub H., Higgs D.R. (1994): Healing of broken human chromosomes by the addition of the telomeric sequences. *Am. J. Hum. Gen.* **55**: 505–512.

Fransz P., Linc G., Lee C.R., Aflitos S.A., Lasky J.R., Toomajian C., Ali H., Peters J., van Dam P., Ji X. (2016): Molecular, genetic and evolutionary analysis of a paracentric inversion in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **88**:159–178.

Freitas-Junior L. H., Bottius E., Pirrit L. A., Deitsch K. W., Scheidig C., Guinet F. i sur. (2000): Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature* **407**:1018–1022.

Fuchs J., Brandes A., Schubert I. (1995): Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. *Plant Syst. Evol.* **196**:227–241.

Galian J.A., Rosato M., Rosello J.A. (2012): Early evolutionary colocalization of the nuclear ribosomal 5S and 45S gene families in seed plants: evidence from the living fossil gymnosperm *Ginkgo biloba*. *Heredity (Edinb)* **108**(6):640–646.

Garcia S., Crhák Khabitová L., Kovařík A. (2012): Expression of 5 S rRNA genes linked to 35 S rDNA in plants, their epigenetic modification and regulatory element divergence. *BMC Plant Biology*, **12**:95.

Garcia S., Garnatje T., Hidalgo O., McArthur E.D., Siljak-Yakovlev S., Valles J. (2007): Extensive ribosomal DNA (18S-5.8S-26S and 5S) colocalization in the North American endemic sagebrushes (subgenus *Tridentatae*, *Artemisia*, Asteraceae) revealed by FISH. *Plant Syst Evol* **267**(1-4):79–92.

Garcia S., Lim K.Y., Chester M., Garnatje T., Pellicer J., Valles J., Leitch A.R., Kovarik A. (2009): Linkage of 35 S and 5 S rRNA genes in *Artemisia* (family Asteraceae): first evidence from angiosperms. *Chromosoma*. **118**(1):85–97.

Garcia S., Panero J.L., Siroky J., Kovarik A. (2010): Repeated reunions and splits feature the highly dynamic evolution of 5 S and 35 S ribosomal RNA genes (rDNA) in the Asteraceae family. *BMC Plant Biol.* **10**:176.

Garrido-Ramos M.A. (2015): Satellite DNA in plants: more than just rubbish. *cytogenet. Genome Res.* **146**:153–170.

Garrido-Ramos M.A. (2017): Satellite DNA: an evolving topic. *Genes* **8**:230.

Grenfell A.W., Strzelecka M., Heald R. (2017): Transcription brings the complex(ity) to the centromere. *Cell Cycle* **16**:235–236.

Grummt I. (1999): Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **62**:109–154.

Heacock, M., Spangler, E., Riha, K., Puizina, J., and Shippen, D. E. (2004): Molecular analysis of telomere fusions in *Arabidopsis*: multiple pathways for chromosome endjoining. *EMBO J.*, **23**:2304–2313.

- Hedayat M., Abdi Gh., Khosh-Khui M. (2009): Regeneration via direct organogenesis from leaf and petiole segments of pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Schultz- Bip. ). American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. **6**(1): 81-87.
- Ijdo J.W., Wells R.A., Baldini A., Reeders S.T. (1991): Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)<sub>n</sub> generated by PCR. Nucleic Acids Res **19**:545.
- Jin W.W., Lamb J.C., Vega J.M., Dawe R.K., Birchler J.A., Jiang J.M. (2005): Molecular and functional dissection of the maize B centromere. Plant Cell **17**:1412–1423.
- Kilian A., Kudrna D., Kleinhofs A. (1999): Genetic and molecular characterization of barley chromosome telomeres. Genome **42**:412–419.
- Kenton A., Parokony A.S., Gleba Y.Y., Bennett M.D. (1993): Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. Mol. Gen. Genet. **240**: 159–169.
- Kovačić S., Nikolić T., Ruščić M., Milović M., Stamenković V., Mihelj D., Jasprica N., Bogdanović S., Topić J. (2008): Flora jadranske obale i otoka. 250 najčešćih vrsta. Školska knjiga, Zagreb, str. 206-207.
- Kuo H. F., Olsen K. M., Richards E. J. (2006): Natural variation in a subtelomeric region of *Arabidopsis*: implications for the genomic dynamics of a chromosome end. Genetics **173**:401–417.
- Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J. i ostali (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature **409**(6822): 860-921.
- Lapitan N.L.V., Ganai M.W. i Tanksley S.D. (1989): Somatic chromosome karyotype of tomato based on *in situ* hybridisation of the TGR1 satellite repeat. Genome **32**:992-998.
- Lawrence R.J., Pikaard C.S. (2004): Chromatin turn ons and turn offs of ribosomal RNA genes, Cell Cycle **3**(7):880-883.
- Levy S., Sutton G., Ng P.C., Feuk L., Halpern A.L., Walenz B.P., Axelrod N., Huang J., Kirkness E.F., Denisov G. (2007): The diploid genome sequence of an individual human. PLoS Biol. **5**:e254.
- Li J., Yang F., Zhu J., He S. i Li L.J. (2009): Characterization of a tandemly repeated subtelomeric sequence with inverted telomere repeats in maize. Genom **52**:286-293.
- Lin K.W., Yan J. (2008): Endings in the middle: current knowledge of interstitial telomeric sequences. Mutat. Res. **658**:95–110.
- Linardopoulou E.V., Williams E.M., Fan Y.X., Friedman C., Young J.M. i sur. (2005): Human subtelomeres are hot spots of interchromosomal recombination and segmental duplication. Nature **437**: 94–100.

- Lou Q., Iovene M., Spooner D.M., Buell C.R., Jiang J. (2010): Evolution of chromosome 6 of *Solanum* species revealed by comparative fluorescence *in situ* hybridization mapping. *Chromosoma* **119**:435–442.
- Louis E. J. (1995): The chromosome ends of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **11**:1553–1573.
- Lysak M.A., Berr A., Pecinka A., Schmidt R., McBreen K., Schubert I. (2006): Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *PNAS* **103**(13): 5224-5229.
- Macan J., Varnai V. M. i Turk R. (2006): Zdravstveni učinci piretrina i piretroida. *Arh Hig Rada Toksikol* **57**: 237-243.
- Macas J., Neumann P., Navratilova A. (2007): Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula*, *BMC Genom* **8**:427.
- MacDonald W.L. (1995): Pyrethrum flowers—production in Australia. In: pyrethrum flowers: production, chemistry, toxicology, and uses (JE Casida, GB Quistad, eds). Oxford University Press, New York, str. 55-66.
- Magallon S, Crane PR, Herendeen PS (1999): Phylogenetic pattern, diversity, and diversification of eudicots. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **86**(2):297-372.
- Maluszyńska J., Hasterok R., Weiss H. (1998): RNA genes – their distribution and activity in plants, *Plant Cytogenetics*, Silesian University Press, Katowice, Poland 75-95.
- Martinsen L., Venanzetti F., Johnsen A., Sbordoni V., Bachmann L. (2009): Molecular evolution of the pDo500 satellite DNA family in Dolichopoda cave crickets (*Rhaphidophoridae*). *BMC Evol. Biol.* **9**:301.
- Mazzella C., Rodriguez M., Vaio M., Gaiero P., Lopez-Carro B., Santinaque F.F., Folle G.A., Guerra M. (2010): Karyological Features of *Achyrocline* (Asteraceae, Gnaphalieae): Stable Karyotypes, Low DNA Content Variation and Linkage of rRNA Genes. *Cytogenet Genome Res* **128**(1-3):169-176.
- Mehrotra S., Goyal V. (2014): Repetitive sequences in plant nuclear DNA: types, distribution, evolution and function. *GPB* **12**:164–171.
- Mendez-Lago M., Wild J., Whitehead S.L., Tracey A., de Pablos B., Rogers J., Szybalski W., Villasante A. (2009): Novel sequencing strategy for repetitive DNA in a *Drosophila* BAC clone reveals that the centromeric region of the Y chromosome evolved from a telomere. *Nucleic Acids Res.* **37**:2264–2273.
- Mlinarec J., Chester M., Siljak-Yakovlev S., Papeš D., Leitch A.R., Besendorfer V. (2009): Molecular structure and chromosome distribution of three repetitive DNA families in *Anemone hortensis* L. (Ranunculaceae). *Chromosome Res.* **17**: 331-346.

- Mlinarec J., Papeš D.A., Besendorfer V. (2006): Ribosomal, telomeric and heterochromatin sequences localization in the karyotype of *Anemone hortensis*. Bot. J. Linn. Soc. **150**: 177–186.
- Mlinarec J., Šatović Z., Mihelj D., Malenica N., Besendorfer V. (2012b): Cytogenetic and phylogenetic studies of diploid and polyploid members of Tribe *Anemoninae* (Ranunculaceae). Plant Biol. **14**: 525–536.
- Murnane J.P., Yu L.C. (1993): Acquisition of telomere repeat sequences by transfected DNA integrated at the site of a chromosome break. Mol. Cell. Biol. **13**: 977–983.
- Nazar R.N. (1980): A 5.8S rRNA-like sequence in prokaryotic 23S rRNA. FEBS Lett **119**:212–214.
- Novák P., Ávila Robledillo L., Koblížková A. i sur. (2017): TAREAN: a computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. Nucleic Acids Res. **45**(12):e111.
- Novák P., Neumann P., Macas J. (2010): Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. BMC Bioinform. **11**:378.
- Oberprieler C. (2005): Temporal and spatial diversification of Circum- Mediterranean *Compositae-Anthemideae*. Taxon **54**(4):951-966.
- Oberprieler C., Himmelreich S., Källersjö M., Vallès J., Watson L.E., Vogt R. (2009): Evolution and biogeography of the Compositae. IAPT. 631–666.
- Olanj N., Garnatje T., Sonboli A., Vallès J., Garcia S. (2015): The striking and unexpected cytogenetic diversity of genus *Tanacetum* L. (i): a cytometric and fluorescent *in situ* hybridisation study of Iranian taxa. BMC Plant Biol.**15**: 174.
- Ottaro W.G.W. (1977): The relationship between the ploidy level and certain morphological characteristics of *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. Pyrethrum Post **14**(1): 10-14.
- Pezer Z., Brajković J., Feliciello I., Ugarković D. (2012): Satellite DNA-Mediated Effects on Genome Regulation. Genome Dyn. **7**:153–169.
- Plohl M., Meštrović N., Mravinac B. (2014): Centromere identity from the DNA point of view. Chromosoma **123**(4):313-25.
- Presting G.G., Frary A., Pillen K., Tanksley S.D. (1996): Telomere homologous sequences occur near the centromeres of many tomato chromosomes. Mol. Gen. Genet. **251**:526–531.
- Puizina J., Weiss-Schneeweiss H., Pedrosa-Harand A., Kamenjarin J., Trinajstić I., Schweizer D. (2003): Characterization of pericentromeric and sticky intercalary heterochromatin in *Ornithalum longibracteatum* (Hyacinthaceae). Chromosoma **110**: 1224-1233.
- Reithmann C., Remp T., Hoffmann E., Matis T., Wakili R., Steinbeck G. (2005): Different patterns of the fall of impedance as the result of heating during ostial pulmonary vein ablation: implications for power titration. Pacing Clin Electrophysiol. **28**(12):1282-91



Richard M.M.S., Chen N.W.G., Thareau V., Pflieger S., Blanchet S., Pedrosa-Harand A., Iwata A., Chavarro C., Jackson S.A., Geffroy V. (2013): The subtelomeric khipu satellite repeat from *Phaseolus vulgaris*: lessons learned from the genome analysis of the Andean genotype. *Plant Science*, **4**:109.

Richards E.J., Ausubel F.M. (1988): Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **53**: 127–136.

Rosato M., Álvarez I., Nieto Feliner A., Rosselló J. (2018): Inter- and intraspecific hypervariability in interstitial telomeric-like repeats (TTAGGG)<sub>n</sub> in *Anacyclus* (Asteraceae). *Annals of Botany* mcy079.

Ruiz-Herrera A., Nergadze S.G., Santagostino M., Giulotto E. (2008): Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenet Genome Res* **122**:219–228.

Ruiz-Ruano F.J., López-León M.D., Cabrero J., Camacho J.P.M. (2016): High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Sci. Rep.* **6**:28333.

Schubert I., Rieger R., Fuchs J. (1995): Alteration of basic chromosome number by fusion–fission cycles. *Genome* **38**:1289–1292.

Shibata F., Hizume M. (2011): Survey of *Arabidopsis*- and human-type telomere repeats in plants using fluorescence *in situ* hybridisation. *Cytologia* **76**: 353–360.

Shu-Fen L., Ting S., Guang-Qian C., Bing-Wiao W., Xu Li, Chuan-Liang D. i Wu-Jun G. (2017): Chromosome evolution in connection with repetitive sequences and epigenetics in plants. *Genes*, **8**:290.

Siljak-Yakovlev S., Godelle B., Zoldos V., Vallès J., Garnatje T., Hidalgo O. (2017): Evolutionary implications of heterochromatin and rDNA in chromosome number and genome size changes during dysploidy: A case study in *Reichardia* genus. *PLoS ONE*, **12**:e0182318.

Singh S.P., Rajeswara Rao B.R., Sharma J.R., Sharma S. (1987): Genetic improvement of pyrethrum I. Assessment of genetic variability and clonal selection. *Pyrethrum Post* **16**(4): 120-124.

Sonboli A., Stroka K., Osaloo S.K., Oberprieler C. (2012): Molecular phylogeny and taxonomy of *Tanacetum* L. (Compositae, Anthemideae) inferred from nrDNA ITS and cpDNA trnH–psbA sequence variation. *Plant Syst. Evol.* **298**: 431–444.

Sone T., Fujisawa M., Takenaka M., Nakagawa S., Yamaoka S., Sakaida M., Nishiyama R., Yamato K.T., Ohmido N., Fukui K. (1999): *Bryophyte* 5S rDNA was inserted into 45S rDNA repeat units after the divergence from higher land plants. *Plant. Mol. Biol.* **41**(5):679-685.

Sykorova E., Fajkus J., Mezinkova M., Lim K.Y., Nepelchova K., Blattner F.R., Chase M.W. i Leitch A.R. (2006): Minisatellite telomeres occur in the family Alliaceae but are lost in allium, *Am. J. Bot.* **93**:814-823.

- Sykorova E., Yoong Lim K., Fajkus J., Leitch A.R. (2003): The signature of the *Cestrum* genome suggests an evolutionary response to the loss of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeres. *Chromosoma* **112**: 164-172.
- Tek A.L., Jiang J.M. (2004): The centromeric regions of potato chromosomes contain megabase-sized tandem arrays of telomere-similar sequence. *Chromosoma* **113**:77– 83.
- Torres G. A., Gong Z., Iovene M., Hirsch C. D., Buell C. R., Bryan G. J., ... Jiang, J. (2011): Organization and Evolution of Subtelomeric Satellite Repeats in the Potato Genome. *G3*, **2**:85-92.
- Torres-Ruiz R.A., Hembelen V. (1994): Pattern and degree of methylation in ribosomal RNA genes of *Cucurbita pepo* L. *Plant Mol. Biol.* **26**: 1167–1179.
- Uchida W., Matsunaga S., Sugiyama R., Kawano S. (2002): Interstitial telomere-like repeats in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Genes Genet. Syst.* **77**:63–67.
- Vahidi H., Purac A., LeBlanc J.M., Honda B.M. (1991): Characterization of potentially functional 5S rRNA-encoding genes within ribosomal DNA repeats of the nematode *Meloidogyne arenaria*. *Gene* **108**(2):281-284.
- Vershinin A.V., Schwarzacher T., Heslop-Harrison J.S. (1995): The large-scale genomic organization of repetitive DNA families at the telomeres of rye chromosomes. *Plant Cell* **7**: 1823–1833.
- Vitales D., Nieto Feliner G., Vallès J., Garnatje T., Firat M., Álvarez I. (2018): A new circumscription of the Mediterranean genus *Anacyclus* (Anthemideae, Asteraceae) based on chloroplast and nuclear DNA markers. *Phytotaxa* **349**: 1–17.
- Wei K.H.C., Grenier J.K., Barbash D.A., Clark A.G. (2014): Correlated variation and population differentiation in satellite DNA abundance among lines of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**:18793–18798.
- Weiss H., Scherthan H. (2002): *Aloe* spp.-plants with vertebrate-like telomeric sequences. *Chromosome Res.* **10**:155-164.
- Weiss-Schneeweiss H., Riha K., Jang C.G., Puizina J., Scherthan H., Schweizer D. (2004): Chromosome termini of the monocot plant *Othocallis siberica* are maintained by telomerase, which specifically synthesizes vertebrate-type telomere sequences. *Plant J.* **37**: 484-493.
- Wicke S., Costa A., Muñoz J., Quandt D. (2011): Restless 5S: the re-arrangement(s) and evolution of the nuclear ribosomal DNA in land plants. *Mol Phylogenet. Evol.* **61**(2):321-332.
- Wu F., Tanksley S.D. (2010): Chromosomal evolution in the plant family Solanaceae. *BMC Genom.* **11**:182.
- Yogeeswaran K., Frary A., York T.L., Amenta A., Lesser A.H., Nasrallah J.B., Tanksley S.D., Nasrallah M.E. (2005): Comparative genome analyses of *Arabidopsis* spp.: Inferring chromosomal rearrangement events in the evolutionary history of *A. thaliana*. *Genome Res.* **15**:505–515.

Yoshikazu H., Matoba H., Kondo K. (2006): Physical mapping of ribosomal RNA genes in the genus *Artemisia* L. (Asteraceae). *Caryologia* **59**(4):312-318.

## 7. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI

**Ime i prezime:** Ana Skuhala

**Mjesto i godina rođenja:** Varaždin, 1994.

**Kontakt:** askuhala@stud.biol.pmf.hr

### OBRAZOVANJE

2013.- 2018. Prirodoslovno- matematički fakultet, Zagreb, smjer: biologija i kemija nastavnički

2009.- 2013. Prva gimnazija Varaždin, opći smjer

2001.- 2009. III. osnovna škola Varaždin

### NAGRADE I PRIZNANJA

2017. izdan znanstveni rad u časopisu *Inorganica Chimica Acta* (koautor)- Utjecaj bakrova(II) kompleksa na vodenu leću (*Lemna minor*)

### VANNASTAVNI PROGRAM

2014.- Sudjelovanje na Noći biologije (ZMB)

2015.- Sudjelovanje na Noći biologije, predstavnik radionice (ZMB)

2016.- Sudjelovanje na Noći biologije, predstavnik radionice (ZMB)

- Dodatni upis kolegija Laboratorijska praksa – početak znanstvenog rada

- Gost predavač na Simpoziju studenata biologije- predavljanje znanstvenog rada

- Izdavanje znanstvenog plakata na temu Utjecaj bakrova(II) kompleksa na vodenu leću

- Predavljanje znanstvenog plakata na XII. susret mladih kemijskih inženjera

- Osmišljavanje i provođenje radionice „Na mladima svijet ostaje: ZELENA BUDUĆNOST“, financirane od strane Sveučilišta u Zagrebu; u osnovnim školama Zagreba

- Organizacija i provođenje istraživačko-edukacijskog projekta udruge BIUS (Mura-Drava)

2017.- Sudjelovanje na Otvorenim danima Kemijskog odsjeka

- Organizacija i provođenje istraživačko-edukacijskog projekta udruge BIUS (Dugi otok)

- Član povjerenstva za Nagradu Srećko Jelenić

2018.- Rad u Osnovnoj školi Kajzerica kao nestručna zamjena

- Sudjelovanje na Otvorenim danima Kemijskog odsjeka

### HOBII INTERESI

2017. godine dobila certifikat od učilišta Magistra za fitnes trenera uz glazbu

2017.- 2018.- rad u aerobic centru Amika kao fitnes trener