

# Genetička raznolikost i struktura populacija vrste *Gymnocalycium monvillei* (Lem.) Britton & Rose (Cactaceae) duž visinskog gradijenta u planinskom području pokrajine Córdoba (Argentina)

---

Rašić, Dragan

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:985195>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-02**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno - matematički fakultet  
Biološki odsjek

Dragan Rašić

**Genetička raznolikost i struktura populacija  
vrste *Gymnocalycium monvillei* (Lem.) Britton & Rose (*Cactaceae*)  
duž visinskog gradijenta u planinskom području  
pokrajine Córdoba (Argentina)**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za filogeniju i molekularnu sistematiku Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Zlatka Libera i predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

Mami za beskonačnu ljubav, tati za iskrenu podršku, sestri za plemenitu dobrotu i bratu za pravo razumijevanje.

Profesoru Liberu za vrhunsko znanje i darovano vrijeme. Dragoj kolegici Bauk za upoznavanje sa znanstvenom problematikom koju je donijela sa sobom iz Argentine, ali i za velikodušnost i brižljivost tijekom izrade ovog rada.

Bogu za sve.

Neka moj život bude *hvala*.

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno - matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

**GENETIČKA RAZNOLIKOST I STRUKTURA POPULACIJA VRSTE  
*Gymnocalycium monvillei* (Lem.) Britton & Rose (*Cactaceae*)  
DUŽ VISINSKOG GRADIJENTA U PLANINSKOM PODRUČJU  
POKRAJINE CÓRDOBA (ARGENTINA)**

Dragan Rašić  
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U planinskim se područjima povećanjem nadmorske visine mijenjaju klimatski i ekološki uvjeti, a što se zrcali u promjenama u sastavu vegetacije. Budući da se može pretpostaviti kako će vrste sa širokom rasprostranjenosti biti pod manjim utjecajem klimatskih promjena, nego što je to slučaj s usko rasprostranjenim vrstama, proučavanje vrsta tolerantnih na promjenu nadmorske visine osobito je zanimljivo u svjetlu današnjih klimatskih promjena. Cilj je ovog diplomskog rada provesti preliminarna populacijsko-genetička istraživanja triju prirodnih populacija vrste *G. monvillei* (*Cactaceae*) s različitih nadmorskih visina upotrebom AFLP-biljega (eng. *Amplified Fragment Length Polymorphism markers*). Nakon usporedbe dobivenih rezultata s rezultatima već provedenih morfoloških i fizioloških istraživanja, definirat će se opsežnija AFLP istraživanja na većem broju prirodnih populacija. Uočena genetska raznolikost, vrijednosti DW-indeksa (eng. *frequency down-weighted marker*), rezultati analize PCoA (eng. *Principal Coordinate Analysis*) i STRUCTURE analize ukazuju na dugu vremensku izoliranost populacije s najviše nadmorske visine i slobodan protok gena kod dviju populacija na nižim nadmorskim visinama. Jedinke populacija s nadmorske visine od 1250 m, zbog utvrđene najveće genetičke raznolikosti, globularne građe klijanaca, otpornosti na povišenu temperaturu i sušu, velikih plodova i velikog broja sjemenki, najizglednije su u ekološkom optimumu vrste te bi se vjerojatno najlakše prilagodile budućim klimatskim promjenama. U skladu s tim ova populacija predstavlja evolucijski signifikantnu jedinicu koju treba uzeti u obzir u budućim programima zaštite.

(50 stranica, 13 slika, 2 tablice, 63 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: molekularna ekologija, AFLP, kaktusi

Voditelj: prof. dr. sc. Zlatko Liber

Ocjenitelji: 1. prof. dr. sc. Zlatko Liber  
2. prof. dr. sc. Ines Radanović  
3. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Rad prihvaćen: 6. veljače 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### **GENETIC DIVERSITY AND STRUCTURE OF POPULATIONS OF THE SPECIES *Gymnocalycium monvillei* (Lem.) Britton & Rose (Cactaceae) ALONG AN ALTITUDINAL GRADIENT IN THE SIERRAS OF CORDOBA (ARGENTINA)**

Dragan Rašić  
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

In mountain regions, with increasing altitude, climate and ecological conditions change, which reflects in changes of vegetation composition. Since it can be assumed that widespread species will be less affected by climate change, than it is the case with narrowly distributed species, the study of species tolerant to altitude changes is particularly interesting in the light of today's climate change. The aim of this graduation thesis was to conduct a preliminary population genetic study of three natural populations of *G. monvillei* (Cactaceae) from different altitudes using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markers. After comparing obtained results with the already existing results of morphological and physiological studies, a more extensive AFLP studies are going to be defined on a larger number of natural populations. The observed genetic diversity, DW index values (frequency down-weighted marker), PCoA (Principal Coordinate Analysis) and STRUCTURE analyses indicated long-time isolation of the population from the highest altitude and free gene flow in the two populations from lower altitudes. Due to the highest genetic diversity, globular seedlings, resistance to high temperatures and drought, large fruits and large numbers of seeds, the population at 1250 m a.s.l. probably represents an ecological optimum of the species and it would most likely be the easiest population to adapt to future climate changes. Therefore, this population can be recognized as an evolutionarily significant unit in future conservation programs.

(50 pages, 13 figures, 2 tables, 63 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: molecular ecology, AFLP, cacti

Supervisor: Full Professor Zlatko Liber, PhD

Reviewers: 1. Full Professor Zlatko Liber, PhD  
2. Full Professor Ines Radanović, PhD  
3. Associate Professor Vesna Petrović Peroković, PhD

Thesis accepted: 6 February 2020

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. TAKSONOMIJA, EVOLUCIJA I RASPROSTRANJENOST PORODICE Cactaceae .....	2
1.2. MORFOLOGIJA, ANATOMIJA I EKOLOGIJA PORODICE <i>Cactaceae</i> .....	8
1.3. VRSTA <i>Gymnocalycium monvillei</i> (Lem.) Britton & Rose ( <i>Cactaceae</i> ) .....	12
1.4. GENETIČKA RAZNOLIKOST.....	15
1.5. POLIMORFIZAM DULJINA PCR-UMNOŽENIH FRAGMENTA DNA (eng. <i>Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)</i> ) .....	17
2. CILJ RADA .....	18
3. MATERIJALI I METODE.....	20
3.1. BILJNI MATERIJAL .....	21
3.2. IZOLACIJA UKUPNE STANIČNE DNA.....	22
3.3. UMNOŽAVANJE AFLP-LOKUSA LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZOM I DETEKCIJA ALELA.....	24
3.4. STATISTIČKA ANALIZA.....	28
4. REZULTATI .....	29
4.1. DETEKCIJA AFLP-BILJEGA.....	30
4.2. UNUTARPOPULACIJSKA I MEĐUPOPULACIJSKA GENETIČKA RAZNOLIKOST .....	31
4.3. GENETIČKA SRODNOST JEDINKI.....	32
4.4. BAYESOVSKA ANALIZA GENETIČKE STRUKTURE .....	33
5. RASPRAVA .....	35
6. ZAKLJUČCI.....	40
7. POPIS LITERATURE.....	42
8. ŽIVOTOPIS .....	48
9. PRILOZI.....	50

# POPIS KRATICA

**AFLP** (eng. *Amplified Fragment Length Polymorphism*), polimorfizam duljine fragmenata DNA umnoženih lančanom reakcijom polimerazom

**DW** (eng. *frequency down-weighted marker*), vrijednost omjera broja jedinki kod kojih se pojavljuje određeni AFLP-biljeg i broja pojavljivanja istog AFLP-biljega u svim jedinkama svih proučavanih populacija

**PCoA** (eng. *Principal Coordinate Analysis*), analiza glavnih koordinata (multidimenzionalno skaliranje), statistička metoda za uspoređivanje sličnosti među skupinama podataka

**PCR** (eng. *Polymerase Chain Reaction*), lančana reakcija polimerazom, postupak umnožavanja malih dijelova DNA ponavljanjem ciklusa sinteze *in vitro*



## **1. UVOD**

## 1.1. TAKSONOMIJA, EVOLUCIJA I RASPROSTRANJENOST PORODICE *Cactaceae*

Kaktuse je u znanost uveo Carl Linnaeus, predstavivši ih u djelu *Species Plantarum* (1753), jednom od temeljnih djela botaničke nomenklature. U navedenom je djelu Linnaeus njemu poznate vrste organizirao unutar samo jednoga roda – *Cactus*. Riječ *cactus* latinska je izvedenica starogrčkog pridjeva *κάκτος* kojime je Teofrast opisao biljku danas nepoznatog identiteta (Johnson i Smith 1972). Godine 1754. engleski je botaničar Phillip Miller sve poznate vrste opisao u okviru četiriju preoblikovanih rodova, a francuski ih je prirodoslovac Antoine Laurent de Jussieu 1789. konačno smjestio u novu porodicu *Cactaceae* (Anderson 2001). Sve do početka dvadesetog stoljeća Linnaeusov je termin *cactus* bio tumačen i kao oznaka roda i kao oznaka porodice. Stoga je 1905. na Bečkom botaničkom kongresu izbačen iz uporabe, a dotadašnjem tipskom rodu porodice *Cactus* u zamjenu je dodijeljen naziv *Mammillaria*. Kako je Kongres ipak zadržao naziv porodice, tako je nastala neobična situacija da porodica ne sadrži rod po kojemu je nazvana (Anderson 2001). Poteškoće glede taksonomije kaktusa su se nastavile, što zbog nedostatka i nemogućnosti izrade održivih herbarijskih holotipova, što zbog velike uloge vrtlara, cvjećara i hortikulturalista u nomenklaturi kaktusa tijekom stoljeća.

Porodica *Cactaceae* (kaktusovke, kaktusi) skupina je kritosjemenjača unutar središnjih dvosupnica, nadreda *Caryophyllanae* i neosporno reda *Caryophyllales* (APG IV. 2016; Domac 2002). Sestrinska skupina, ujedno i najbliži srodnik porodice *Cactaceae*, jest porodica *Portulacaceae* (Nikolić 2013). Ukupno porodica kaktusa sadrži oko 100 rodova s oko 1400 sukulentnih i nesukulentnih vrsta (Hernández i Gómez-Hinostrosa 2015). Međutim, podaci znatno variraju ovisno o autoru, čak i glede viših taksonomskih jedinica. Pretpostavlja se da velik udio rodova, pa i tribusa, nije monofiletskog porijekla, odnosno ne sadrži sve potomke zajedničkog pretka (Nyffeler i Egli 2010). Porodicu čine četiri potporodice: *Pereskioideae*, *Maihuenioideae*, *Opuntioideae*, *Cactoideae*; s osam tribusa i šest podtribusa (Guerrero i sur. 2019).

Potporodica *Pereskioideae*, s tipskim rodom *Pereskia*, parafiletska je skupina, ishodišna za sve ostale pripadnike porodice (Bárcenas i sur. 2011) (Slika 1). Rod *Pereskia* sadrži niz pleizomorfni osobina nestalih u drugih pripadnika porodice: još uvijek prisutni listovi, nadrasli ginecej, nesukulentna stabljika, više vratova tučka i dr. (Nikolić 2013). Rod *Pereskia* smatran je i jednim rodovima ove potporodice, dok 2012. J. Lodé nije na temelju molekularno-filogenetskih istraživanja DNA jezgara, kloroplasta i mitohondrija iz njega izdvojio, opisao i predstavio istočnobrazilski rod *Lauenbergeria* s osam vrsta (Lodé 2019, Walker i sur. 2018). Rod *Lauenbergeria* nema razvijene stablične puči kao *Pereskia*, što ukazuje na postupni evolucijski prijelaz od pretka koji je koristio listove kao primarni organ fotosinteze do biljke kod koje tu ulogu preuzima stabljika (Edwards i sur. 2005).



**Slika 1.** Prikaz dijela habitusa biljke iz roda *Pereskia* (potporodica *Pereskioideae*) s prisutnim listovima i nesukulentnom stabljikom (D. Rašić - autorska ilustracija)

Druga se potporodica, *Maihuenioideae*, smatra sestrinskom skupinom preostalih dviju, *Cactoideae* i *Opuntioideae*. Monofiletsko porijeklo potonjih poduprto je u više studija (Edwards i sur. 2005; Bárcenas i sur. 2011; Hernández-Hernández i sur. 2011; Vázquez-Sánchez i sur.

2013; Walker i sur. 2018). Potporodica *Maihuenioideae* sadrži dvije vrste: *Maihuenia patagonica* i *M. popoegii* (Sl. 2). Ove vrste naseljavaju hladne i polusuhe regije Patagonije (Guerrero i sur. 2019). Skupinu karakterizira C3 metabolizam, a prisutni su i cilindrični listovi, kao u roda *Pereskia*, koji se smatraju pleizomorfnom osobinom (Anderson 2001).



**Slika 2.** Prikaz dijela habitusa biljke iz roda *Maihuenia* (potporodica *Maihuenioideae*) s prisutnim cilindričnim listovima (D. Rašić - autorska ilustracija)

Potporodica *Opuntioideae* sadrži vrste s filokladijima i listovima preobraženim u trnove, a sa 16 rodova najveća je skupina u porodici (Sl. 3). Naseljava gotovo sva staništa obaju Amerika (pustinje, savane, tropske kišne šume), od razine mora do iznad 4500 m penjući se u Ande Perua (Anderson 2001).



**Slika 3.** Prikaz dijela habitusa biljke iz roda *Opuntia* (potporodica *Opuntioideae*) s listovima preobraženim u trnove (D. Rašić - autorska ilustracija)

Potporodica *Cactoideae* potječe iz centralnih Andi, a na sjever se proširila u nekoliko navrata i neovisno (Hernández-Hernández i sur. 2011). Uglavnom je riječ o manjim, kuglastim kaktusima poput rodova: *Mammillaria*, *Astrophytum*, *Thelocactus* i *Turbinicarpus*, iako pojedine vrste dosežu i veće dimenzije (*Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus cylindraceus*) (Anderson 2001) (Sl. 4). Rod *Mammillaria* uključuje oko 155 vrsta malih, kuglastih kaktusa, rasprostranjenih ponajviše u Meksiku, i jedan je od najvećih rodova

porodice (Hernández i Gómez-Hinostrosa 2015). Ujedno, rod je i među najugroženijim kaktusima, a gotovo polovica vrsta su meksički mikroendemi.



**Slika 4.** Prikaz dijela habitusa biljke iz roda *Mammillaria* (potporodica *Cactoideae*) s izraženim sukulentnim karakteristikama (D. Rašić - autorska ilustracija)

Razjašnjenje srodstvenih odnosa unutar porodice kaktusa, pa i razumijevanje njene raznolikosti, zahtjeva buduća detaljna filogenetska istraživanja, a koja ponajprije uključuju istraživanja odnosa među tribusima i podtribusima u svrhu ispitivanja monofiletskog porijekla, a potom i ispitivanja odnosa među potporodicama. Razjašnjavanje filogenetskih odnosa podrazumijeva i opisivanje evolucijske povijesti skupine, no veliku prepreku na tom putu čini nedostatak fosilnih nalaza, kako samih kaktusa, tako i njihovih bližih srodnika (Arakaki i sur. 2011). Stoga su glavne smjernice proučavanja molekularno-filogenetske i biogeografske prirode. Trenutno prihvaćena teorija postanka kaktusa smješta njihova zadnjeg zajedničkog pretka na južnoamerički kontinent koji je i danas među glavnim središtima njihove raznolikosti (Hernández-Hernández i sur. 2011).

Sraz umjerenih, subtropskih i tropskih staništa Južne Amerike pruža povoljne ekološke uvjete za pripadnike svih četiriju potporodica, pa su kaktusi rasprostranjeni širom tog kontinenta – od samog juga Patagonije do visokih Anda, nabranog gorja na zapadu Kontinenta. Upravo se Ande Čilea, Argentine i juga Bolivije smatraju mjestom porijekla porodice *Cactaceae*, kao i potporodica *Opuntioideae* i *Cactoideae* (Hernández-Hernández i sur. 2011). Kolonizacija izvan Južne Amerike nastupila je kasnije. Sjeverno su se kaktusi proširili višestruko i neovisno, pa je i Meksiko danas središte raznolikosti kaktusa s brojnim mikroendemima (Hernández i Gómez-Hinostrosa 2015). Može se, dakle, naslutiti izdvajanje kaktusa nakon raspada Gondwane, što je osiguralo njihovo pojavljivanje na područjima Amerika, a što se dogodilo u ranoj kredi (prije 145 do 100 milijuna godina) (Arakaki i sur. 2011). Prema novijim procjenama, izdvajanje kaktusa moralo se dogoditi kasnije, u razdoblju od kasnog eocena do ranog oligocena (prije 35 do 30 mil. god.) (Guerrero i sur. 2019). Premda se porodica odvojila neovisno, to se dogodilo relativno istovremeno s odvajanjem drugih aridnim staništima prilagođenih linija (mlječike – prije 35 mil. god.; agave – prije 25 mil. god.). Vrijeme odvajanja kaktusa podudara se s razdobljem naglog snižavanja razine ugljikovog dioksida u Zemljinoj atmosferi pa se taj događaj smatra i uzrokom prevladavanja CAM metabolizma u skupini kaktusa (Zachos i sur. 2001). Procjenjuje se da su vrste visoke sukulentnosti evoluirale uspinjući se u Ande (prije 25 do 20 mil. god.). Izdvajanje danas prisutnih vrsta kaktusa procjenjuje se na razdoblje kasnog miocena do pliocena (prije 10 do 5 mil. god.) (Arakaki i sur. 2011). Vjerojatno nošene pticama, a kasnije i antropogenim utjecajem, sjemenke kaktusa formirale su populacije i diljem Afrike i Madagaskara, otoka Indijskog oceana (Sejšeli, Mauricijus, Šri Lanka) i Sredozemlja.

## 1.2. MORFOLOGIJA, ANATOMIJA I EKOLOGIJA PORODICE *Cactaceae*

Kaktusi se razvijaju o obliku drveća, grmlja, zeljastog bilja, penjačica ili epifita (naprimjer *Rhipsalis*, *Epiphyllum*). Veličinom se razlikuju od patuljastih (*Blossfeldia liliputana* Werderm.) do golemih stupastih oblika (*Carnegiea gigantea* (Engelm.) Britton. et Rose) (Nikolić 2013). Prepoznatljiva osobina porodice jest sukulentnost. Svi sukulenti posjeduju tkiva za skladištenje vode (u sklopu lista, stabljike i/ili korijena). Evolucijske promjene u postanku sukulenata prepoznatljive su na svim fenotipskim razinama: morfološkoj, anatomskoj, staničnoj i metaboličkoj (Griffiths i Males 2017). Kaktusi su većinom pahikaulične biljke (grč. *παχύς* – debeo; lat. *caulis* – stabljika), dakle širina stabljike im je neočekivano velika u odnosu na visinu. Ta i mnoga druga svojstva osebjne morfologije sukulenata osigurala su kaktusima jedinstvenu prepoznatljivost unutar biljnog carstva pa se i u opisivanju drugih kserofita i sukulenata, poput nekih predstavnika porodica *Euphorbiaceae*, *Didiereaceae* i *Asclepiadaceae*, koriste termini *kaktejski* ili *kaktusiodan*. Ove su evolucijske promjene zapravo nizovi prilagodbi područjima s rijetkim oborinama i visokim temperaturama okoliša. Uočljiva je sličnost ranih razvojnih stadija kaktusa i ostalih kritosjemenjača nakon koje se pojavljuju nagle morfološke preobrazbe (Nikolić 2013): spremišta za vodu oblikuju se uglavnom od parenhima kore, smanjuje se asimilacijska i transpiracijska površina listova, dolazi do snažne redukcije bočnih ogranaka i skraćivanja stabla na kuglast oblik (Nikolić 2013). Kuglast oblik tijela nije rijetka pojava u prirodi, a pojavljuje se zbog matematičkog odnosa obujma i površine kugle. Kaktusi na ovaj način ostvaruju najmanju moguću transpiracijsku površinu u odnosu na obujam tijela. Vezano za skladištenje vode u vodnim tkivima, valja spomenuti i razvitak površinskih bora koje omogućuju mnogoslojnoj hipodermi da se razvuče ili stisne ovisno o količini vode ispod nje, dok visoka površinska rebra bacaju sjenu na stabljiku sprečavajući izravnu izloženost suncu (Nikolić 2013).

Uobičajeni životni uvjeti omogućuju biljkama stalno kruženje vode kroz tkiva, a time i stalnu opskrbu mineralima i nutrijentima potrebnim za fiziološki zdravo stanje biljke. Voda u biljku ulazi korijenskim sustavom, a napušta je u procesu transpiracije preko listova. Stoga se za biljke aridnih područja smanjenje površine listova pokazalo kao pogodna okolnost za očuvanje vode. U većini vrsta porodice *Cactaceae* listovi su reducirani ili modificirani (bodljikavi ili u cijelosti preobraženi u dlake ili bodlje). U nekih vrsta (*Opuntia*) mogu se kod mladenačkih stadija uočiti mali, ljuskavi listovi koji brzo metamorfoziraju u reducirane oblike (Nikolić 2013). Na glavnoj stabljici kaktusa rijetko se javljaju bočni ogranci. Karakteristična je pojava ogranaka kod vrste *Carnegiea gigantea*, ali tek nakon 75 - 100 godina života (Steenbergh i Lowe 1997). Pazušni se pupovi (zameci bočnih ogranaka) često razvijaju u obliku nakupina višestaničnih dlaka ili trnja (areole) (Nikolić 2013). Trnovi su morfološki vrlo raznoliki čak i unutar iste areole: nalik dlakama (*Espositoa*), spljošteni (*Pediocactus*), kukasti



(*Mammillaria*), no većinom su igličasti. U potporodici *Opuntioideae* karakteristični su čuperci sitnokukastih trnova (glohidije). Listovi su samo rijetko dobro razvijeni (*Pereskia*), a najčešće su preobraženi u bodlje. Osim za smanjenje transpiracijske površine, svrha preobrazbe listova je i obrambene prirode – odbijaju žedne životinje koje bi se mogle napojiti iz vodnom bogatih spremišnih tkiva kaktusa. Bodlje mogu biti tvrde ili meke, oštre ili paperjaste, a često posjeduju i mikrobodlje koje rastu u suprotnom smjeru od rasta glavne bodlje. Kod posljednjeg ih je slučaja pri probijanju tkiva životinja teško izvaditi. Razlike u obliku i čvrstoći bodlji korisne su i pri vegetativnom razmnožavanju kaktusa. Prihvaćanjem za životinju mladi se dijelovi biljke odvajaju i na krznu prenose daleko od matične biljke do mjesta gdje će se ukorijeniti kao nova jedinka. U aridnim je područjima često jedini izvor vode vlaga u zraku. Tijelo kaktusa može upijati vlagu iz zraka preko pora i bodlji. Osnovne su fotosintetske funkcije, s obzirom na to da su listovi preobraženi ili izostaju, u većine vrsta prenesene na stabljiku (Nikolić 2013). Evolucijski put kaktusa doveo je do proširenja tijela pa ono nerijetko ima kuglast oblik. Na taj je način najmanja moguća površina izložena izravnom suncu. Ta je osobina naročito važna u sprečavanju gubitka vode. Uz to je stabljika gotovo uvijek prekrivena debelom kutikulom koja smanjuje gubitak vode iz biljke te sprečava ulazak viška vode izvana. Stabljika se između vrsta može morfološki razlikovati, no zadržava iste uloge – sadrži tkiva za skladištenje vode i obavlja fotosintezu.

Osim listovima i stabljikom, kaktusi su se sušnim uvjetima života prilagodili i korijenom. Korijenski sustav može se zasnivati na jakom središnjem korijenu ili razgranatom postranom korijenju. Veliki je središnji korijen uglavnom okomit, ravan i modificiran u organ za skladištenje vode, dok postrano korijenje dominantno raste u širinu, ali plitko. Stoga se tipovi korijenskog sustava mogu podijeliti ovako: (1) plitko horizontalno puzajuće korijenje (*Opuntia*, *Ferocactus*) (korijenske ploče), (2) plitko horizontalno puzajuće korijenje kombinirano sa snažnim okomitim središnjim korijenom (*Pahycereus*), (3) kompaktni sustav tankog postranog korijenja (većinom brojni kuglasti oblici), (4) sočni odebljali korijen koji je često veći od nadzemnog dijela biljke (*Ariocarpus*), (5) mnogostruki gomoljasti korijen (*Pereskia*), (6) adventivno korijenje (epifiti, *Hylocereus*) (Nikolić 2013). Stanice korijena nerijetko sadržavaju visoke koncentracije soli čime je pasivno potpomognut ulazak vode u biljku. Veliki korijen može služiti i u regeneraciji oštećenih dijelova tijela kaktusa iznad zemlje. Otkinuti se pak nadzemni dijelovi kaktusa mogu ukorijeniti na pogodnom mjestu i dugo nakon odvajanja s matične biljke, a zahvaljujući velikoj sposobnosti očuvanja vode.

Cvjetovi se pojavljuju na lateralnim ili apikalnim areolama, najčešće su dvospolni i uglavnom pojedinačni. Dimenzijama se razlikuju od sitnih (*Rhipsalis*, 6 mm) do najvećih među kritosjemenjačama (*Selenicereus*, 40 cm). Simetrijom mogu biti aktinomorfni, blago zigomorfni (najčešće s obzirom na andrecej) ili izrazito zigomorfni. Ocvijeće je organizirano kao tepala

od 200 do 1000 slobodnih ili bazalno sraslih listova.. Cvjetovi su uglavnom vrlo mirisni i intenzivno obojeni pa se stoga i mehanizmi oprašivanja najčešće zasnivaju na različitim oblicima zoofilije. Iz bazalnog dijela hipantija (ili epiginog diska kod *Pereskia*, *Rhipsalis*) izlučuju se obilne količine nektara namijenjene oprašivačima. Bijeli cvjetovi najčešće cvatu noću i oprašuju se noćnim kukcima (*Sphingidae*), žuti cvjetovi pokazuju refleksiju/apsorpciju pojedinih valnih duljina ultraljubičastog zračenja ovisno o kutu upada zrake svjetlosti i uglavnom su entomofilni (melitofilni), crveni cvjetovi najčešće su bez mirisa, ali obiluju nektarom, većinom su crvene boje i zigomorfne simetrije te se oprašuju ornitofilno (*Trochilidae*), visokoprilagođeni cvjetovi s cijevima vjenčića dugim i do 30 cm oprašuju se šišimšima (*Epiphyllum*, *Selenicereus*). Upadljivi cvjetovi mnogih svojti nastaju tijekom ili nakon kišnih razdoblja i potraju od jednog dana do nekoliko dana. Većina kaktusa je proterandrična i autosterilna. Vrste iz rodova *Pilosocereus* i *Melicactus* prepoznatljive su po jasno odvojenim područjima cvatnje na tijelu biljke (cefalijumima). Često je razvijen hipantij, udubljena cvjetna os koja sadrži plodnicu, a ponekad i kao duža cijev pa su cvjetovi često cjevasti i zvonasti. Hipantij često sadrži sukulentne i asimilacijske brakteje i brakteole koje se postupno šire i nastavljaju sve do pravih listića ocvjeća (Nikolić 2013). U cvjetova je uobičajena herkogamija, prostorno odvajanje antera i njuški čime se pospješuje udio rekombinacije, odnosno smanjuje mogućnost samooplodnje.

Andrecej kaktusa građen je od 15 do mnogo uglavnom slobodnih prašnika. Kada je prisutno srašavanje, tada je ono najčešće međusobno (u skupinama), a vrlo rijetko s ocvijećem. Antere se otvaraju introrzno longitudinalnim pukotinama, tapetum je žljezdan, a endotecij sadrži vlaknata odebljanja. Mikrosporogenezom nastaju četverokutne tetrade mikrospora. U prašnicima pojedinih svojti (*Cumulopuntia pulcherrima*) zamjećena su seizmonastična gibanja – podraženi kukcima prašnici se zatvaraju prema središtu cvijeta prenoseći pelud i pospješujući entomofiliju. Peludna zrna posjeduju 3 ili 6 – 15 apertura, a mogu biti kolpatna, pantoporatna ili pantokolporatna (Nikolić 2013).

Ginecej je građen od 3 do mnogo plodnih listova i većinom jednogradne plodnice (parakarpan). U roda *Pereskia* plodnica ima 2 do 15 lokula (nastaju naknadnim razvojem pseudosepti). Ginecej je najčešće sraslih vratova, gotovo uvijek podrastao (nadrastao kod *Pereskia*). Unutar hipantija je prisutan epigini disk. Vrat je dobro razvijen, s 3 do mnogo njuški (koliko i plodnih listova). Njuške su vlažnog tipa i nisu bradavičaste. Placentacija je obično parijetalna ili rjeđe bazalna (*Pereskia*). Sjemenih zametaka u pojedinom lokulu ima 15 – 100 i više. Sjemeni zameci su s drškom, arilusom ili bez njega. Sjemeni zameci su circinotropni, obično kampilotropni ili anatrofni, bitegmički i krasinucelatni. Vanjski integument ne gradi mikropilu. Razvoj embrionske vreće je *Polygonum*-tipa.

Plod kaktusa porijeklom je od zadebljalog, mesnatog tkiva hipantija sraslog s unutrašnjom stijenkom podrasle plodnice, a ne od same plodnice, pa se stoga može reći da daje nepravi plod (najčešće lažna bobica). Najčešće je plod sočni nepucavac (lažna mnogosjemena bobica), a rijetko suhi pucavac (tobolac) (Nikolić 2013). Bobe su ispunjene sočnom pulpom porijeklom od dijelova plodnih listova i placenti. Stijenka ploda nastaje od cvjetišta i morfološki je jednaka kladodijima (s trajnijim glohidijama). Obiluje mukoznim stanicama (Inglese i sur. 2017). Može biti gola (*Mammillaria*), vunenasta (*Selenicereus*), bodljikava (*Armatocereus*) ili ljuskava (*Hylocereus*) (Nikolić 2013). Endosperm izostaje, a rijetko se pojavljuje perisperm. Embrij je aklorofilan, obično karakteristično savinut. Sjemenke se rasprostranjuju različitim vrstama zoohorije – ornitohorijom najčešće, mirmekohorijom u nekoliko rodova, epizoohorio (*Opuntia*) te rijetko, u vrsta s okriljenim sjemenkama, anemohorno. (Nikolić 2013). Veličina ploda u kaktusa ovisi o stopi oplodnje jajnih stanica i broju odbačenih sjemenki. Razlog odbacivanja određenih sjemenki u kaktusa nije utvrđen.

Ekološka uloga kaktusa posebno je važna i uglavnom povezana s njihovim dugim životnim ciklusima (15–200 i više godina). Veliki sukulentni kaktusi predstavljaju osnove pustinjaških ekosustava (i kao izvori hrane i kao skloništa mnogim životinjama). Poznati su i primjeri koevolucije s drugim vrstama. S gotovo trećinom ugroženih vrsta, kaktusi su peta najugroženija biljna porodica na svijetu (Goettsch i sur. 2015).

### 1.3. VRSTA *Gymnocalycium monvillei* (Lem.) Britton & Rose (*Cactaceae*)

Unutar potporodice *Cactoideae* i trubusa *Trichocereeeae* nalazi se rod *Gymnocalycium* Pfeiff. ex Mittler koji obuhvaća oko 50 vrsta (Anderson 2001). Rod je prepoznatljiv po manjim kuglastim predstavnicima s danju cvatućim cvjetovima koji nemaju bodlji na cvjetištu (Demaio i sur. 2011), a rasprostranjen je od juga Bolivije, preko sjevera i jugozapada Paragvaja, do južnih dijelova Brazila i Argentine (Pilbeam 1995). Rod su ponajprije opisivali uzgajivači i kolekcionari kaktusa, pa mu je često, zbog manjih morfoloških razlika među jedinkama u divljini, nestručno dodjeljivan znatno veći broj vrsta nego što zaista sadrži. Stoga danas postoji veliki broj sinonima, kako na razini vrste, tako i ispod nje, pa i velika potreba za razjašnjavanjem taksonomije ovog roda. Slijedeći pravila Međunarodnog kodeksa botaničke nomenklature (eng. ICBN), Schütz je 1968. potvrdio sustav pet podrodova (prateći kriterije koje je ranije postavio A. V. Frič): *Gymnocalycium* (seu. *Ovatisemineum* Schütz), *Macrosemineum* Schütz, *Trichomosemineum* Schütz, *Microsemineum* Schütz i *Muscosemineum* Schütz (Demaio i sur. 2011). Poteškoće u klasifikaciji ispod razine roda zapravo ukazuju na opći taksonomski problem porodice *Cactaceae*, prouzrokovan opisivanjem taksona isključivo prema morfološkim osobinama. Bolji uvid u stvarno stanje pružaju novije studije kombinirajući morfološke i molekularne metode.

Podrod *Microsemineum* Schütz karakteriziraju tamnosmeđe sjemenke promjera manjeg od 1 mm (Demaio i sur. 2011). Unutar ovog podroda nalazi se i vrsta *Gymnocalycium monvillei* (Lem.) Britton & Rose, poznata oko 150 godina i nazvana po francuskom industrijalistu i kolekcionaru biljaka H. B. de Monvilleu (Pilbeam 1995) (Sl. 5).



**Slika 5.** Vrsta *Gymnocalycium monvillei* u periodu cvatnje u prirodnom staništu pokrajine Córdoba (Argentina) (autor K. Bauk)



Vrsta *G. monvillei* u izobilju raste u argentinskim pokrajinama Córdoba (planinska područja poznata kao Sierras Grandes i Chicas de Córdoba) i San Luis (Bauk i sur. 2017). Ova vrsta naseljava stjenovita staništa u širokom visinskom rasponu, od toplijih područja na 700 m, do hladnijih visinskih travnjaka iznad 2000 m nadmorske visine (Bauk i sur. 2017, Demajo i sur. 2011) (Sl. 6–8). Duž visinskog gradijenta javljaju se različite vrijednosti temperature i vlage, odnosno različiti okolišni tipovi, pa se i vegetacijski sastav mijenja – od suptropske suhe šume u donjim dijelovima do hladnih travnjaka u najvišim dijelovima planina. Pojava mraza moguća je tijekom cijele godine. Snijeg se uobičajeno pojavljuje zimi na visinama iznad 1900 m (Bauk i sur. 2017).



**Slika 6.** Stanište vrste *Gymnocalycium monvillei* na nadmorskoj visini od 878 m u planinskom dijelu pokrajine Córdoba (Argentina) (autor K. Bauk)



**Slika 7.** Stanište vrste *G. monvillei* na nadmorskoj visini od 1250 m u planinskom dijelu pokrajine Córdoba (Argentina) (autor K. Bauk)



**Slika 8.** Stanište vrste *G. monvillei* na nadmorskoj visini od 2230 m u planinskom dijelu pokrajine Córdoba (Argentina) (autor K. Bauk)

Jedinke vrste *G. monvillei* rastu u obliku jednostavnih kuglastih formi, i to uglavnom u većim sastojinama. U divljini narastu prosječno do 8 cm u visinu i 20 cm u širinu (Bauk i sur. 2017). Kuglasto tamnozeleno do svijetlozeleno tijelo često je spljošteno pri vrhu i prekriveno mnoštvom grbastih izbočina. Pri vrhu tijela izbočine su vrlo guste pa su im i granice slabije vidljive, a spuštanjem na lateralne strane stabljike poprimaju jasan heksagonski oblik. Izbočine nose izduljene, elipsoidne areole s kratkim bijelim dlačicama. Od areola se odvajaju do 40 mm duge, čvrste, svijetložute i blago ušiljene bodlje s crvenkastim korijenom. Najčešće se na apikalnoj, udubljenoj strani tijela razvijaju pupovi, oblikom jajoliki i blago zašiljeni, a iz njih se u proljeće otvaraju do 9 cm dugi cvjetovi koji potraju 5 do 6 dana (Britton i Rose 1963). Boja cvijeta varira od bijele do ružičaste. Jedinka po sezoni razvija između jednog i sedam zelenih plodova okruglastog, kruškolikog oblika (mnogosjemenih boba), promjera 2 do 3 cm, od kojih svaki nosi između 200 i 4000 sjemenki (Bauk i sur. 2015). Sjemenke su vrlo male mase, a rasprostranjuju se uglavnom mirmekohorijom.

## 1.4. GENETIČKA RAZNOLIKOST

Već su antički filozofi, vođeni metafizičkim pristupima, uvidjeli varijacije među vrstama i odstupanja prirodnih jedinki od idealnog tipa. To se opažanje zadržalo i nije značajnije promijenilo sve do Charlesa Darwina i njegovog opisa varijacija kao esencijalnih aspekata prirode. Darwin je zaključio da su varijacije unutar vrste izravno povezane s varijacijama među vrstama, i to prirodnom selekcijom i izolacijom. U istome stoljeću je Mendel iznio zakone o nasljeđivanju u kojima je predstavio genetičku komponentu varijacije. Ta su nova opažanja i saznanja bila posebno važna za razvijanje teorije populacijske genetike, koju su kasnije prvi iznijeli Fisher, Haldane i Wright, ali i za oblikovanje moderne evolucijske misli: da su evolucijske promjene rezultat genskog odgovora vrsta na ekološke čimbenike, odnosno da se tiču genetičke raznolikosti. Ipak, u odsustvu metoda da se genetička raznolikost istraži drugačije osim na fenotipskoj razini, shvaćanje opsega i osobina ovog svojstva znanosti je ostalo nedostižno, sve do razvitka modernih tehnologija (Ellegren i Galtier 2016).

Biljke su kao zasebno carstvo organizama na Zemlji razvile posebna načela razvoja, razmnožavanja, fiziologije i adaptacije. Vrste se unutar ekosustava razvijaju ovisno o njihovoj sposobnosti prilagodbe. Tako se, tijekom evolucije, razvija niz osobina koje koriste u preživljavanju, a jedna od posljedica je raznovrsnost biljaka na morfološkoj, anatomskoj, fiziološkoj, molekularnoj i svakoj drugoj razini. Iz saznanja o genomima organizama danas je jasno da se gotovo svi oblici raznolikosti zasnivaju na genskoj razini, a budući da genski zapis određuje fenotipske karakteristike kojima vrste i populacije odgovaraju na okolišne uvjete, genetička je raznolikost životno važna osobina svake vrste i populacije (Linløkken 2018). Budući da sadrže dovoljan broj alela za razvijanje prilagodbe na promjenu, vrste i populacije s velikom genetičkom raznolikošću imaju prednost u preživljavanju nad genetički jednolikijim vrstama i populacijama.

Prema definiciji bioraznolikosti Svjetskog fonda za zaštitu prirode (WWF), ona je ukupno bogatstvo života na Zemlji, svih biljaka, životinja i mikroorganizama s genima koje nose i ekosustavima koje sačinjavaju (Çalışkan 2012). Dakle, genetičku raznolikost treba promatrati i kao osnovu bioraznolikosti. Ona odražava prisutnost različitih alela unutar ukupne genske zalihe vrste ili populacije. S obzirom da su vrste i populacije prije svega prirodne zalihe gena, očuvanje vrsta tiče se sprečavanja izumiranja gena. Novi se aleli pojavljuju određenom stopom mutacije koja nije nužno jednaka stopi izumiranja alela, pa su posebno ugroženi niskofrekventni aleli u malim populacijama (Linløkken 2018). Stoga je za razvitak konzervacijskih strategija važno sakupiti podatke o genetičkoj raznolikosti organizama.

Struktura populacija izravno je oblikovana četirima evolucijskim procesima: prirodnom selekcijom, mutacijom, protokom gena i genetičkim pomakom. Danas genetičku raznolikost

proučava, mjeri i opisuje populacijska genetika. Istraživanja su usmjerena na učestalost pojave alela i njihovu interpopulacijsku i intrapopulacijsku razdiobu. Saznanja koja populacijska genetika nudi tiču se ponajprije karakteristika i srodstvenih odnosa među vrstama i populacijama, razine i dinamike genetičke raznolikosti, prostorne dinamike vrsta i reprezentativnosti populacija. Razvijen je velik broj molekularnih metoda kojima je moguće doći do saznanja o genetičkoj raznolikosti, a izbor metode ovisi o vrsti istraživanja. Za slabije istražene genome najčešće se koristi polimorfizam duljine PCR-umnoženih fragmenata DNA (eng. AFLP). Ostale metode uključuju nasumičnu amplifikaciju polimorfne DNA (eng. RAPD), polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (eng. RFLP), jednostavne ponavljajuće sekvence ili mikrosatelite (eng. SSR) i polimorfizam jednog nukleotida (eng. SNP) (Linløkken 2018).

Razvoj populacijske genetike u smjeru očuvanja vrsta danas je vrlo važan. Broj vrsta na Zemlji drastično opada, što je često izravno povezano s utjecajem čovjeka. Osim boljeg općeg uvida u prirodu vrsta, istraživanja genetičke raznolikosti daju i smjernice za oporavak vrsta. Praćenjem genetičkih svojstava određene linije, genotipova roditeljskih generacija, moguće je dobiti podatke korisne u ojačavanju ili oslabljivanju pojedinih svojstava potomaka.



## 1.5. POLIMORFIZAM DULJINA PCR-UMNOŽENIH FRAGMENTA DNA (eng. *Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)*)

Polimorfizam duljina PCR-umnoženih fragmenata DNA (eng. *Amplified Fragment Length Polymorphism*; u daljnjem tekstu: AFLP) je molekularna tehnika koja, upotrebom i restrikcijskih enzima i lančane reakcije polimerazom, omogućuje vizualizaciju velikog broja različitih DNA regija u genomu. Tehnika je prvi put predstavljena 1995. (Vos i sur). Budući da ne zahtjeva prethodno poznavanje ni jedne sekvence DNA u genomu, koristi se za analize slabije istraženih genoma, za utvrđivanje odnosa među bliskim svojstama, kao i analize genetičke raznolikosti i struktura kako na populacijskim tako i na intrapopulacijskim razinama.

Metoda započinje rezanjem izolirane DNA pomoću dvaju različitih restrikcijskih enzima. Budući da je eukariotski genom najčešće bogat adeninskim i timinskim bazama, uglavnom se koristi kombinacija restrikcijskog enzima *MseI* (prepoznaje restrikcijsko mjesto 5'-TTAA-3') i restrikcijskog enzima *EcoRI* (prepoznaje restrikcijsko mjesto 5'-GAATTC-3'). Nakon restrikcije na komplementarne se krajeve fragmenata ligacijom dodaju dvolančani oligonukleotidni adapteri. Na taj način se oblikuju fragmenti DNA s mjestima za vezanje PCR-početnica i mogućnošću umnažanja lančanom reakcijom polimerazom.

Pomoću početnica komplementarnih dodanim adapterima i restrikcijskim mjestima, izvodi se preselektivni PCR (prva PCR reakcija). Svaka preselektivna PCR-početnica na 3' kraju, uz nukleotide restrikcijskog mjesta, sadržava jedan dodatni nukleotid. Zatim se pomoću još selektivnijih početnica provodi selektivni PCR (druga PCR reakcija), u kojoj se kao DNA kalup koristi produkt preselektivne reakcije. Svaka selektivna početnica najčešće sadržava tri dodatna nukleotida na 3' kraju (jedan isti kao kod preselektivne PCR-početnice uz dodatak još dva nova nukleotida). Dodavanje nukleotida na 3' krajeve preselektivnih i selektivnih početnica služi reduciranju broja umnoženih fragmenata (bez dodavanja nukleotida javlja se preveliki broj fragmenata za detekciju kapilarnom elektroforezom). Razdvajanje fragmenata izvodi se kapilarnom elektroforezom, a detekcija se najčešće osigurava upotrebom na 5' kraju fluorescentno označene selektivne PCR-početnice (obično *EcoRI*) i laserskog detektora fluorescencije prisutnog u uređaju za kapilarnu elektroforezu.

Ovom su tehnikom uspješno određeni biljezi iz spora mikoriznih gljiva prosječne mase DNA od 0,1 do 0,5 ng (Rosendahl i Taylor 1997), jer postupak ne zahtjeva veliku početnu količinu DNA. Stoga je tehnika primjenjiva u istraživanjima malih genoma i krajnje malih genetičkih razlika, poput analiza linija koje se razlikuju u samo jednoj regiji na genomu ili utvrđivanja klonskog identiteta jedinki s nespolnim razmnožavanjem. Nedostatak tehnike AFLP je nemogućnost razlikovanja dominantnih homozigota i heterozigota (Mate 2009).

## **2. CILJ RADA**

Istraživanje provedeno u ovom diplomskom radu dio je suradnje Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (CroP-BioDiv) s kolegama na Institutu za multidisciplinarnu biologiju biljaka u Córdobi (Argentina). Cilj ovog diplomskog rada je provesti preliminarna populacijsko-genetička istraživanja triju prirodnih populacija vrste *Gymnocalycium monvillei* (Lem.) Britton & Rose s različitih nadmorskih visina upotrebom AFLP-biljega. Nakon usporedbe AFLP rezultata dobivenih u ovom diplomskom radu definirat će se opsežnija populacijsko-genetička istraživanja na većem broju prirodnih populacija kako bi se zajedno s ostalim već provedenim istraživanjima ploidnosti, veličine genoma, veličine populacija, germinacije i morfologije sjemenki dobio bolji uvid u mehanizme koji podržavaju široku visinsku rasprostranjenost vrsta.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. BILJNI MATERIJAL

Iz ranije prikupljenog biljnog materijala (Karen Bauk, Sveučilište u Córdoba) za potrebe istraživanja u ovom diplomskom radu izabrano je 69 jedinki vrste *Gymnocalycium monvillei* iz tri populacije (od 22 do 24 jedinke po populaciji). Populacije su smještene na nadmorskim visinama od 878, 1250, 2230 m po nacionalnoj ruti br. 20 od grada Cuesta Blanca (31°28'56"S/64°34'21"W) do Pampa de Achala (31°41'02"S/64°50'13"W) u Argentini (u daljnjem tekstu korištene su oznake: P1 – populacija s nadmorske visine od 2230 m, P2 – populacija s nadmorske visine od 1250 m, P3 – populacija s nadmorske visine od 878 m). Već je na terenu 1 g tankih režnjeva stabljike po svakoj jedinci smješten u zasebnu vrećicu sa silika-gelom. Ovako se sakupljeno biljno tkivo potpuno osušilo u roku od 24 sata i na taj način uspješno konzerviralo za izolaciju visokopolimerne ukupne stanične DNA.

### 3.2. IZOLACIJA UKUPNE STANIČNE DNA

Izolacija ukupne stanične DNA iz osušenog biljnog tkiva provedena je upotrebom *GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep* izolacijskog kompleta (Sigma®) prema sljedećim koracima:

1. Svaki uzorak biljnog tkiva izvagan je na oko 25 mg i smješten u čistu epruvetu od 2 mL (*Safe-Lock*, Eppendorf®). U epruvetu je potom dodatna čelična kuglica promjera 5 mm za usitnjavanje u uređaju *Tissue Lyser* (Qiagene®).
2. Homogenizacija uzorka provedena je tijekom 1 min, na 30 Hz/s u uređaju *Tissue Lyser* (Qiagene®).
3. U epruvetu je dodano po 350 µL otopine *Lysis Solution A*, 50 µL otopine *Lysis Solution B*, 4 mg polivinilpirolidona (*PVP40*, Sigma®), 4 mg LiCl i 4 µL β-merkaptotanol, te je sadržaj izmiješan na vrtložnoj miješalici (*GVLab*, Gilson®). Epruveta je inkubirana 10 min na 65 °C uz povremeno miješanje na vrtložnoj miješalici.
4. U epruvetu je dodano 130 µL otopine *Precipitation Solution*, sadržaj je promiješan na vrtložnoj miješalici i inkubiran 5 min na ledu. Epruveta je centrifugirana 5 minuta pri najvećoj brzini (13200 okretaja/min, centrifuga *5415 D*, Eppendorf®).
5. Supernatant je pipetom prenesen na membranu *GenElute™ Filtration* kolone. U već spomenutoj centrifugi provedeno je centrifugiranje od jedne minute pri najvećoj brzini.
6. Nakon što je odstranjena *GenElute™ Filtration* kolona u filtrat je dodano 700 µL otopine *Binding Solution*.
7. Na membranu *GenElute™ MiniPrep Binding* kolone dodano je 500 µL otopine *Column Preparation Solution*. Provedeno je centrifugiranje od jedne minute pri najvećoj brzini.
8. Na pripremljenu *GenElute™ MiniPrep Binding* kolonu dodano je 700 µL otopine pripremljene u koraku 6. Provedeno je centrifugiranje od jedne minute pri najvećoj brzini. Filtrat je odbačen, a na *GenElute™ MiniPrep Binding* kolonu pipetom je dodan preostali volumen otopine pripremljene u točki 6. Provedeno je centrifugiranje od jedne minute pri najvećoj brzini.
9. *GenElute™ MiniPrep Binding* kolona je prenesena u novu epruvetu od 2 mL te je dodano 500 µL otopine *Wash*. Provedeno je jednominutno centrifugiranje pri najvećoj brzini. Dobiveni filtrat je odbačen.
10. Na istu *GenElute™ MiniPrep Binding* kolonu dodano je još 500 µL otopine *Wash* i provedeno trominutno centrifugiranje pri maksimalnoj brzini u svrhu sušenja kolone. Nakon centrifugiranja epruveta je ostavljena otvorena 5 minuta kako bi se kolona potpuno osušila.
11. *GenElute™ MiniPrep Binding* kolona je prebačena u novu epruvetu od 1,5 mL te je dodano 100 µL otopine *Elution Solution*. Nakon 10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi provedeno je jednominutno centrifugiranje.

12. *GenElute™ MiniPrep Binding* kolona je odbačena, a u epruveti je zaostala otopina DNA. Koncentracija i čistoća DNA izmjerene su spektrofotometrijski u uređaju *Nanophotometer P330* (Implen®). Do daljnjih analiza, otopina DNA je pohranjena na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3. UMNOŽAVANJE AFLP-LOKUSA LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZOM I DETEKCIJA ALELA

#### 3.3.1. Restrikcija ukupne stanične DNA i ligacija adaptera

1) Postupno su na 4 °C otopljeni:

- 10 x T4 DNA ligaza pufer s ATP-om
- 0,5 M NaCl
- 1 mg/mL BSA (eng. *Bovine Serum Albumin*; albumin goveđeg seruma)

2) Uzorci izolirane ukupne stanične DNA razrijeđeni su na 100 ng / 16,5 µL i razdijeljeni u 69 epruveta PCR-pločice od 96 spojenih epruveta od 0,2 mL. Šest je uzoraka DNA ponovljeno dvaput unutar PCR-pločice (kontrolne DNA), a dodana su i četiri uzorka kod kojih je DNA zamijenjena steriliziranom deioniziranom vodom (slijepe kontrole). Ove kontrole su nužne za finalni izbor alela za statističku analizu te za izračun razine greške (eng. *error rate*) AFLP analize u programu *scanAFLP* ver. 1.2 (Herrmann i sur. 2010).

3) Priprema restriktijsko-enzimske otopine (eng. *restriction enzyme mix*) za 80 uzoraka:

- 24,00 µL 10 x T4 DNA ligaza pufera s ATP-om
- 24,00 µL 0,5 M NaCl
- 12,00 µL 1mg/mL BSA
- 24,00 µL *EcoRI* (koncentracije 50 U/µL) (Fermentas®)
- 4,80 µL *MseI* (koncentracije 50 U/µL) (Fermentas®)
- 8,00 µL T4 DNA ligaze (koncentracije 30 U/µL) (Fermentas®)
- 143,20 µL H<sub>2</sub>O

Svi su sastojci promiješani pipetiranjem, a zatim je otopina pohranjena na 4 °C do upotrebe.

4) Priprema 207 µL otopine *EcoRI* i 207 µL *MseI* adaptera, pri čemu je pomiješano:

a) za otopinu *EcoRI* adaptera (koncentracije 2,5 µM):

- 6,00 µL 100 µM *EcoRI* 1 adaptera (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3')
- 6,00 µL 100 µM *EcoRI* 2 adaptera (5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3')
- 228,00 µL H<sub>2</sub>O

b) za otopinu *MseI* adaptera (koncentracije 2,5 µM):

- 30,00 µL 200 µM *MseI* 1 adaptera (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3')
- 30,00 µL 200 µM *MseI* 2 adaptera (5'-TACTCAGGACTCAT-3')
- 180,00 µL H<sub>2</sub>O



Otopine *EcoRI* i *MseI* adaptera odvojeno su promiješane pipetiranjem, zatim ugrijane 5 minuta na 95 °C i ohlađene 10 minuta pri sobnoj temperaturi.

5) Priprema restrikcijsko-ligacijske otopine (eng. *restriction ligation mix*):

- 240,0 µL 10 x T4 DNA ligaza pufer s ATP-om
- 240,0 µL 0,5 M NaCl
- 120,0 µL 1 mg/mL BSA
- 240,0 µL otopine *EcoRI* adaptera
- 240,0 µL otopine *MseI* adaptera
- 240,0 µL restrikcijske enzimске otopine (iz točke 5.)

Po 16,5 µL restrikcijsko-ligacijske otopine razdijeljeno je u 79 epruveta PCR-pločice s 96 mjesta (0,2 µL) u koje je ranije razdijeljeno po 16,5 µL svakog od ukupno 69 uzorka razrijeđene DNA (100 ng) i 16,5 µL 10 različitih kontrola. Svaka je otopina promiješana pipetiranjem.

6) Otopine su inkubirane 2 sata na 37 °C i 16 sati na 23 °C u uređaju za provođenje lančane reakcije polimerazom *Thermal cycler, GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems®).

### 3.3.2. Preselektivni PCR

1) Za preselektivno umnožavanje, a kako bi se smanjio broj umnoženih AFLP-alela i omogućila optimalna detekcija kapilarnom elektroforezom, na 3' kraj PCR početnice dodan je jedan nukleotid u suvišku. Po 4 µL svake restrikcijsko-ligacijske otopine razrijeđeno je s 92 µL sterilizirane deionizirane vode. Zatim je pripremljena preselektivna PCR-otopina:

- 792,0 µL H<sub>2</sub>O
- 160,0 µL 10 x PCR pufera (TaKaRa®)
- 128,0 µL dNTP (TaKaRa®)
- 96,0 µL *EcoRI* preselektivne početnice 5'-GACTGCGTACCAATTC+A (5 µM)
- 96,0 µL *MseI* preselektivne početnice 5'-GATGAGTCCTGAGTAA+C (5 µM)
- 8,0 µL *Taq* HS polimeraze (TaKaRa®)

Po 16 µL preselektivne PCR-otopine razdijeljeno je u 79 epruveta unutar jedne PCR-pločice, a u svaku od njih je dodano po 4 µL razrijeđene restrikcijsko-ligacijske otopine.

2.) Uzorci su podvrgnuti lančanoj reakciji polimerazom u *Thermal Cycler* uređaju *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems®), prema PCR-programu:

- 94 °C, 2 min
- 20 ciklusa: 94 °C, 20 s; 56 °C, 30 s; 72 °C, 2 min
- 60 °C, 30 min

3.) Uspješnost preselektivnog umnožavanja provjerena je horizontalnom elektroforezom na agaroznom gelu. Po 8 µL dobivenog preselektivnog PCR-produkta pomiješano je s 2 µL boje za nanošenje (30 % saharoza, 0,25 % bromfenolno modriilo i 0,25 % ksilencijanoli) i nanoseno u jažice gela. Upotrebljen je 1,5 % agarozni gel u 0,5 x TBE puferu (Sambrook i sur. 1989), a postupak se odvijao pri naponu od 100 V u trajanju od 30 minuta. Nakon bojanja u trajanju od 30 minuta u fluorescentnoj boji *Gel/Red*<sup>TM</sup> (Biotium<sup>®</sup>), gel je fotografiran digitalnom kamerom pod ultraljubičastim svjetlom transiluminatora (*T-2202*, Sigma<sup>®</sup>).

### 3.3.3. Selektivni PCR

Selektivni PCR bio je multipleks-PCR odnosno u istoj su se PCR-otopini nalazila 4 para *EcoRI* i *MseI* selektivnih početnica. *EcoRI* početnice bile su označene fluorescencijskim bojama FAM, NED, VIC i PET na 5' kraju kako bi bila moguća odvojena detekcija AFLP-alela svakog lokusa odnosno para PCR-početnica. AFLP-aleli detektirani su kapilarnom elektroforezom u uređaju *ABI Prism 3730xl* (Applied Biosystems<sup>®</sup>). Na 3' kraju svake selektivne PCR-početnice dodana su još dva nukleotida kako bi se smanjio broj umnoženih AFLP-alela i na taj način omogućila kvalitetnija detekcija kapilarnom elektroforezom.

1.) Po 10 µL svakog preselektivnog PCR-produkta razrijeđeno je s 190 µL sterilizirane deionizirane vode. Zatim je pripremljena selektivna PCR-otopina:

- 584 µL H<sub>2</sub>O
- 160 µL 10 x PCR pufera (TaKaRa<sup>®</sup>)
- 128 µL dNTP (TaKaRa<sup>®</sup>)
- 80 µL *EcoRI* selektivne početnice FAM-5'-GACTGCGTACCAATTC+ACA-3' (5 µM)
- 80 µL *EcoRI* selektivne početnice NED-5'-GACTGCGTACCAATTC+AGA-3' (5 µM)
- 80 µL *EcoRI* selektivne početnice VIC-5'-GACTGCGTACCAATTC+ACG-3' (5 µM)
- 80 µL *EcoRI* selektivne početnice PET-5'-GACTGCGTACCAATTC+ACC-3' (5 µM)
- 80 µL *MseI* selektivne početnice GATGAGTCCTGAGTAA+CGA (5 µM)
- 8 µL *Taq* HS polimeraze (TaKaRa<sup>®</sup>)

Po 16 µL selektivne PCR-otopine razdijeljeno je u 79 epruveta (0,2 µL) PCR-pločice u koje je nakon toga dodano po 4 µL razrijeđenog preselektivnog PCR-produkta.

2.) Uzorci su podvrgnuti lančanoj reakciji polimerazom u *Thermal cycler* uređaju *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems®) prema sljedećem programu:

- 94 °C, 2min
- 10 ciklusa: 94 °C, 20 s; 66 °C, 30 s; 72 °C, 2 min (u svakom je od 10 ciklusa temperatura vezanja početnica snižavana za 1 °C)
- 20 ciklusa: 94 °C, 20 s; 56 °C, 30 s; 72 °C, 2 min
- 60 °C, 30 min

### 3.3.4. Detekcija umnoženih AFLP-fragmenata

Ukupno 1,5 µL umnoženih AFLP-produkata smješteno je u PCR-ploče s 96 epruveta, a zatim je svaki uzorak pomiješan s 10 µL formaldehida i 0,5 µL DNA standarda *GS500 Liz* (Applied Biosystems®). Uzorci su 3 minute denaturirani na 95 °C te neposredno nakon toga smješteni na led. Nakon kapilarne elektroforeze fragmenata DNA, u uređaju *ABI Prism 3130 Genetic analyser* (Applied Biosystems®), rezultati svih analiziranih uzoraka bili su vidljivi u obliku *.fsa* podataka. Pregledavanje *.fsa* podataka i određivanje AFLP-alela izvršeno je u programu *GeneMapper® 4.0* (Applied Biosystems®). Ukupno je analizirano 276 grafičkih prikaza, u rasponu od 50 do 500 bp, pri maksimumu (eng. *peak*) od najmanje 100 rfu jedinica. AFLP-aleli (fragmenti) su iz programa *GeneMapper* eksportirani kao tablica veličina (bp) i jačine signala u rfu jedinicama. Ova je tablica korištena kao ulazna za program *scanAFLP* kojim su uz prisutne ponovljene uzorke finalno odabrani AFLP-aleli za daljnju statističku analizu te je određena razina pogreške (eng. *error rate*).

### 3.4. STATISTIČKA ANALIZA

Za utvrđivanje unutarpopulacijske raznolikosti za svaku je populaciju u programu *AFLPdat* (Ehrich 2006) izračunat broj polimorfnih biljega, broj jedinstvenih biljega (eng. *private alleles*) te *frequency down-weighted marker* vrijednost (Schönswetter i Tribsch 2005). Uz ove parametre izračunat je Shannonov informacijski indeks (Lewontin 1972), te u programu *PAST ver. 2.01* (Hammer i sur. 2001) prosječna udaljenost po Diceu (Nei i Li 1979) između jedinki.

Analizom je molekularne varijance (AMOVA; Excoffier i sur. 1992) raščlanjena ukupna fenotipska varijanca u sastavnicu uzrokovanu razlikama između populacija, te sastavnicu uzrokovanu razlikama između jedinki unutar populacija. Analiza je provedena na matrici udaljenosti po Diceu upotrebom računalnog programa *Arlequin ver. 2.0* (Schneider i sur. 2000).

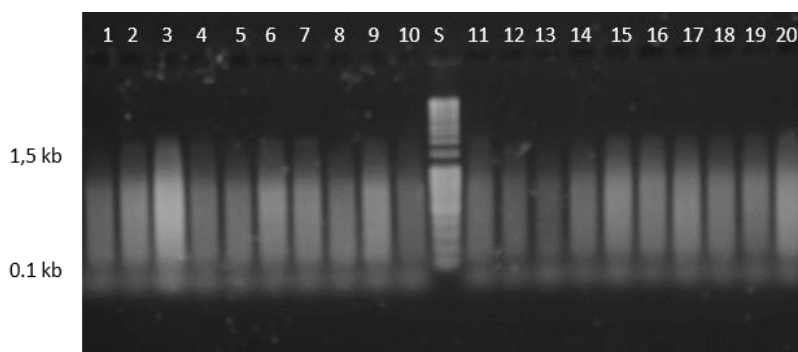
Analiza glavnih koordinata (eng. *Principal Coordinate Analysis*; PCoA; Gower 1966) je multivarijatna metoda srodna analizi glavnih sastavnica (eng. *Principal Component Analysis*) koja prikazuje višedimenzionalni hiperprostor kao dvodimenzionalni ili trodimenzionalni pri čemu minimalizira gubitak informacija sadržanih u izvornim podacima. Kod analize glavnih koordinata ulazni je podatak matrica udaljenosti (ili sličnosti) između uzoraka. Navedena matrica služi za izračunavanje svojstvenih vrijednosti (eng. *eigenvalues*) i svojstvenih vektora (eng. *eigenvectors*), te ekstrakciju k-linearnih kombinacija nekoreliranih svojstava (glavne koordinate), pri čemu vrijednosti svojstvenih vektora svakog uzorka predstavljaju točke pojedinih uzoraka u koordinatnom sustavu zadanom prvom i drugom glavnom koordinatom. Tako je omogućeno grafičko predstavljanje uzoraka u reduciranom broju dimenzija. PCoA je provedena na temelju matrice udaljenosti po Diceu u programu *PAST ver. 2.01* (Hammer i sur. 2001).

Za bayesovsku analizu genetičke strukture istraživanih jedinki i populacija, pri čemu populacijsko podrijetlo jedinki nije korišteno kao priorna informacija, upotrijebljena je metoda STRUCTURE (Pritchard i sur. 2000) i računalni program *STRUCTURE 2.3.1* (Falush i sur. 2003). Analizirano je po 10 prohoda za svaki broj izvornih populacija (K) od 1 do 7. Svaki se prohod sastojao od faze ugrijavanja (eng. *burn-in period*) duljine 200 000 koraka, te 1 000 000 ponavljanja algoritma Markovljevih lanaca Monte Carlo (eng. *Markov Chain Monte Carlo*, MCMC) uz model mješovitog podrijetla jedinki (eng. *admixture model*) i korelirane alelne učestalosti. Broj izvornih populacija (K) odabran je na temelju  $\Delta K$ -vrijednosti (Evanno i sur. 2005).

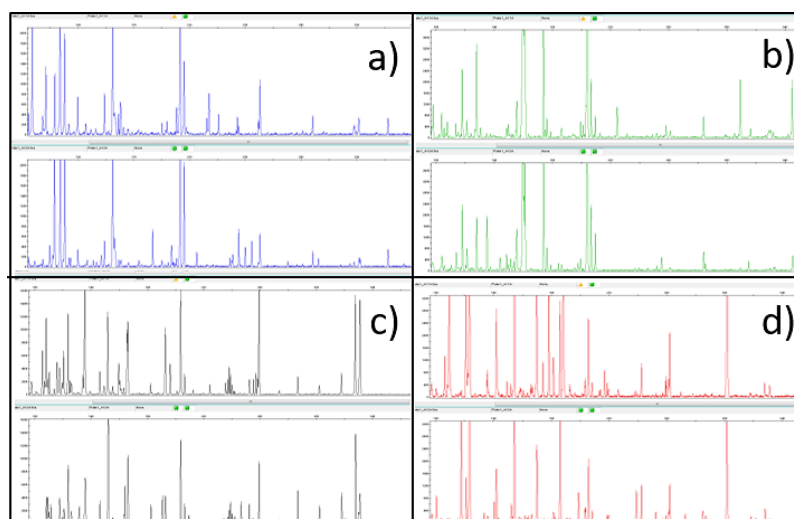
## **4. REZULTATI**

#### 4.1. DETEKCIJA AFLP-BILJEGA

Svi su koraci AFLP-analize provedeni uspješno: restrikcija, ligacija, preamplifikacija i selektivna amplifikacija, što je vidljivo iz elektroforeze preamplifikacijskih produkata, a koji su pokazivali karakterističan razmaz fragmenata u rasponu od 100 do 1500 bp (Sl. 9). Na ovaj se način potvrđuje potpunost restrikcije i uspješnost ligacije jer u suprotnom ne bi došlo do uspješnog umnožavanja lančanom reakcijom polimerazom, a pruga bi na gelu s takvim uzorkom, osim PCR-početnica ispod 100 bp, bila u potpunosti bez vidljivih tragova DNA fragmenata. Isto je tako elektroforegram dobiven kapilarnom elektroforezom selektivno amplificiranih fragmenata pokazivao dobro uočljive fragmente kod svih kombinacija PCR-početnica u rasponu od 100 - 500 bp (Sl. 10).



**Slika 9.** Agarozna gel-elektroforeza produkata preselektivnog AFLP-a 10 jedinki iz populacije P1 (populacija s nadmorske visine od 2230 m) (pruga 1-10) i 10 jedinki iz populacije P3 (populacija s nadmorske visine od 878 m) (pruga 11-20). S = DNA veličinski standard (*MassRuler DNA Ladder Mix*, Thermo Fisher Scientific®).



**Slika 10.** Elektroforegram produkata selektivnog AFLP-a (jedinka br. 24 iz populacije P1 i jedinka br. 1 iz populacije P3) dobiven upotrebom četiri kombinacije selektivnih AFLP-početnica (preuzeto iz računalnog programa *GeneMapper*, Applied Biosystems®). a) FAM-5'gactgcgtaccaattcaca3' i 5'gatgagtctgagtaacga3'; b) VIC-5'gactgcgtaccaattcacg3' i 5'gatgagtctgagtaacga3'; c) NED-5'gactgcgtaccaattcaga3' i 5'gatgagtctgagtaacga3'; d) PET-5'-gactgcgtaccaattcacc3' i 5'gatgagtctgagtaacga3'.

## 4.2. UNUTARPOPULACIJSKA I MEĐUPOPULACIJSKA GENETIČKA RAZNOLIKOST

Ukupno je detektirano 395 polimorfnih AFLP-fragmenta (= AFLP-lokusa) uz utvrđenu razinu pogreške od 4,65 %.

Postotak polimorfnih AFLP-fragmenta i Shannonov informacijski indeks pokazivali su isti trend. Najviše su vrijednosti bile zabilježene kod populacije P2 koja predstavlja središnji pojas rasprostranjenosti s obzirom na nadmorsku visinu, a iste su se vrijednosti postupno smanjivale prema ekstremnijim populacijama na nižoj i višoj nadmorskoj visini. Broj privatnih alela i *frequency down-weighted marker* vrijednost pokazivali su upravo suprotan trend, najviše su vrijednosti bile zabilježene kod po nadmorskoj visini ekstremnijih populacija, P3 i osobito P1, a najniže kod populacije P2 koja pripada središnjem pojasu rasprostranjenosti (Tablica 1).

**Tablica 1.** Osnovni populacijsko-genetički parametri triju populacija vrste *Gymnocalycium monvillei*; oznaka populacije, nadmorska visina, broj jedinki po populaciji, postotak polimorfnih AFLP lokusa (%P), Shannonov informacijski indeks (I), broj privatnih alela ( $N_{pr}$ ), *frequency-down-weighted marker* vrijednost (DW)

Populacija	Nadmorska visina (m)	n	%P	I	$N_{pr}$	DW
P1	2230	24	66.33	0.367	37	747.08
P2	1250	22	75.19	0.421	21	562.71
P3	878	23	74.18	0.413	22	638.18
Srednja vrijednost				0.400		
Ukupno		69			80	

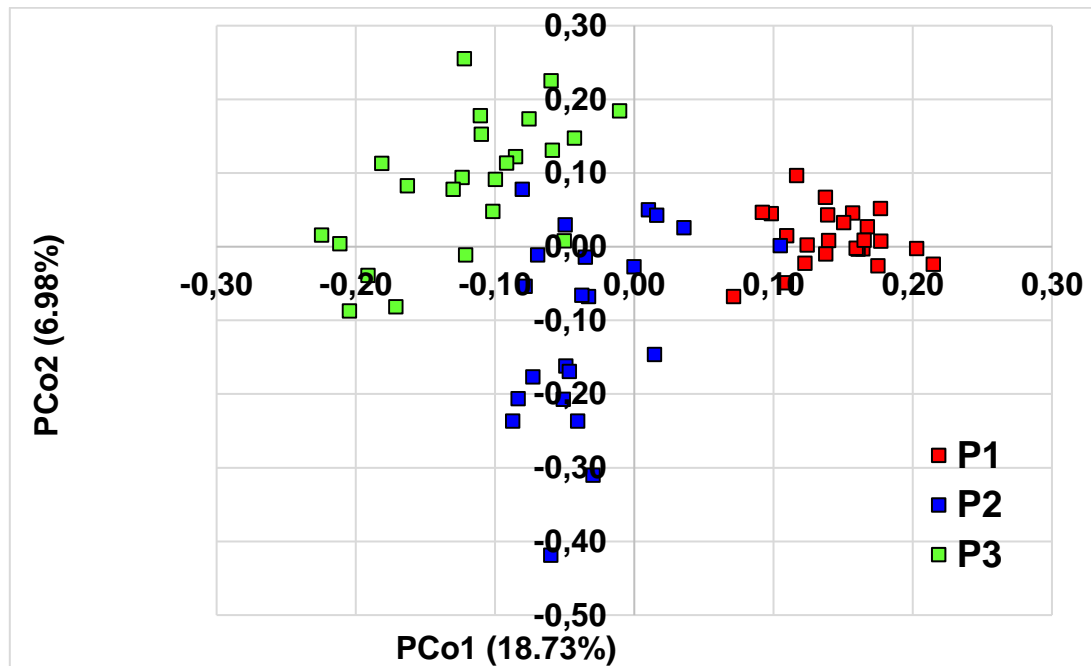
Analiza molekularne varijance (AMOVA) pokazala je da je većina genetičke raznolikosti distribuirana unutar populacija (85 %), premda je i vrijednost varijance između populacija (15 %) ukazivala na prisutnu genetičku diferencijaciju odnosno genetičku specifičnost istraživanih populacija vjerojatno ovisnu o nadmorskoj visini u kojoj se istraživana populacija nalazi (Tablica 2).

**Tablica 2.** Rezultati analize molekularne varijance (AMOVA)

Izvor varijacije	df	Komponente varijance	Postotak varijance
Između populacija	2	6.240	15.04 %
Unutar populacija	66	35.256	84.96 %

### 4.3. GENETIČKA SRODNOST JEDINKI

Genetička je srodnost 69 istraživanih jedinki utvrđena izračunom udaljenosti po Diceu među svim mogućim parovima jedinki (Prilog 1.), a radi bolje vizualizacije dobivena je DICE-matrica podvrgnuta analizi glavnih koordinata (*Principal Coordinate Analysis*) (Sl. 11).



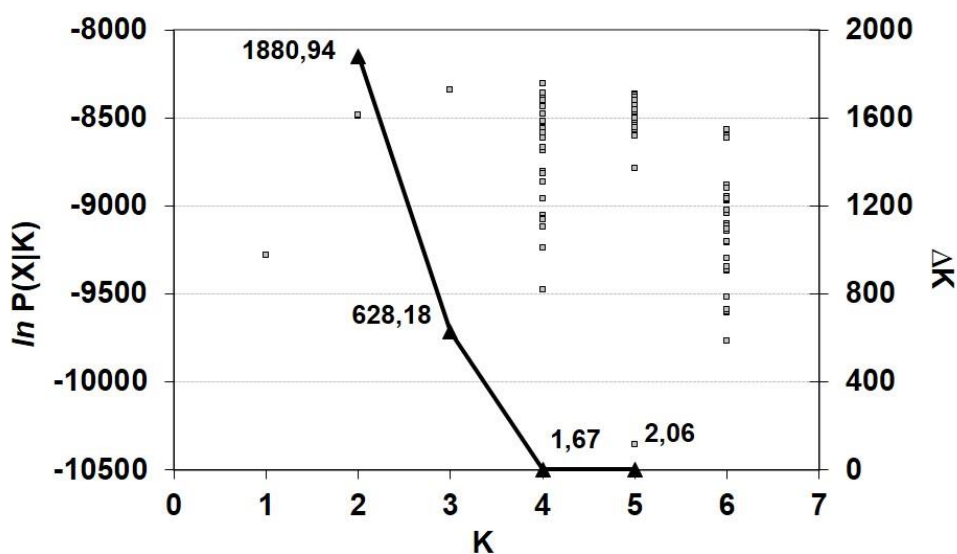
**Slika 11.** Analiza glavnih koordinata (*Principal Coordinate Analysis*; PcoA) jedinki iz triju populacija (P1, P2, i P3; Tablica 1) vrste *Gymnocalycium monvillei*.



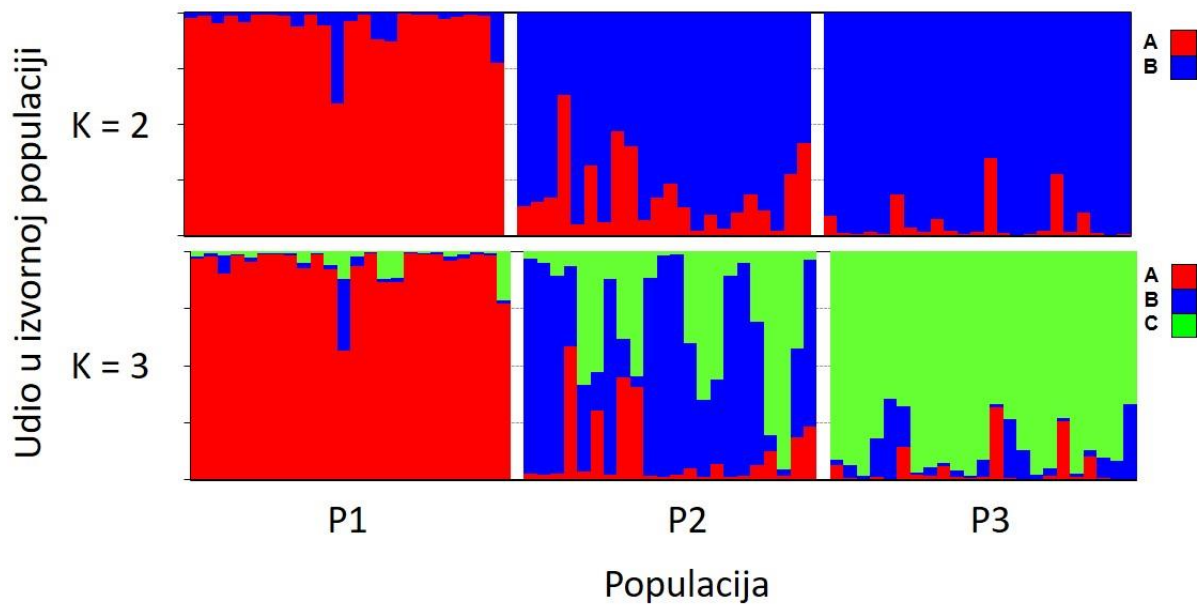
#### 4.4. BAYESOVSKA ANALIZA GENETIČKE STRUKTURE

Izbor najvjerojatnijeg broja genskih skupova ( $K$ ) temeljem AFLP-podataka za 69 jedinki vrste *Gymnocalycium monvillei* obavljen je izračunom vrijednosti  $\ln P(X|K)$  za svaku od deset neovisnih analiza po svakom pretpostavljenom broju genskih skupova ( $K = 1$  do  $K = 7$ ), te izračuna vrijednosti  $\Delta K$  za svaki  $K$ . Prosječna je, kao i maksimalna vrijednost  $\ln P(X|K)$ , rasla s porastom pretpostavljenog broja genskih skupova do  $K = 4$ , dok je najveća vrijednost  $\Delta K$  utvrđena za  $K = 2$  (Sl. 12).

Računalnim programom *STRUCTURE* izračunati su udjeli genoma za svaku pojedinu jedinku za pripadnost pretpostavljenoj izvornoj populaciji od  $K = 2$  do  $K = 7$ . Na slici 13 prikazan je rezultat za onaj broj izvornih populacija koji je imao najvišu vrijednost  $\Delta K$  ( $K = 2$  i  $K = 3$ ). Pri  $K = 2$  utvrđena je većinska pripadnost genskom skupu A za sve jedinke populacije P1 (2230 m), dok je većinska pripadnost genskom skupu B utvrđena za gotovo sve jedinke populacija P2 i P3 (1250 i 878 m). Iznimku čine jedna jedinka populacije P2 koja većinski pripada izvornoj populaciji A, a još pet jedinki u istoj populaciji predstavlja hibride izvornih populacija A i B. Pri  $K = 3$  jedinke iz populacije P1 i dalje ostaju unutar iste izvorne populacije A, dok se izvorna populacija B cijepa u dvije nove izvorne populacije B i C. Unutar ove dvije novoformirane izvorne populacije sve jedinke iz populacije P3 većinski pripadaju izvornoj populaciji C, 11 jedinki populacije P2 većinski pripada izvornoj populaciji B, četiri izvornoj populaciji C, jedna izvornoj populaciji A, a šest jedinki pokazuje izraziti hibridni karakter između sve tri izvorne populacije (Sl. 13).



**Slika 12.** Odnos vrijednosti  $\ln P(X|K)$  i  $\Delta K$  na temelju 10 neovisnih analiza po svakom pretpostavljenom broju genskih skupova ( $K$ ). ■  $\ln P(X|K)$ -vrijednost (5 neovisnih analiza za svaki  $K$ ; primarna y-os; lijevo); ▲ □  $K$ -vrijednosti za svaki  $K$  (sekundarna y-os; desno)



**Slika 13.** Grafički prikaz postotnog udjela svake izvorne populacije u genomu 69 jedinki nakon STRUCTURE analize pri  $K = 2$  i  $K = 3$ . Izvorne populacije: A, B i C. P1 = populacija vrste *Gymnocalcium monvillei* s nadmorske visine 2230 m, P2 = populacija vrste *G. monvillei* s nadmorske visine 1250 m, P3 = populacija vrste *G. monvillei* s nadmorske visine 878 m.

## **5. RASPRAVA**

Istraživanje u ovom diplomskom radu su preliminarna istraživanja genetičke raznolikosti i strukture populacija vrste *Gymnocalycium monvillei* (*Cactaceae*) upotrebom AFLP biljega. Ovo je istraživanje dio suradnje Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja s kolegama na Institutu za multidisciplinarnu biologiju biljaka u Córdoba (Argentina). Rezultati ovog diplomskog rada potvrdili su mogućnost opsežnije primjene AFLP-biljega unutar multidisciplinarnih istraživanja prirodnih populacija vrsta tolerantnih na široki gradijent nadmorskih visina, a što je tema doktorske disertacije kolegice Karen Bauk s Instituta u Córdoba. Naime, glavni je cilj njezine disertacije istražiti mehanizme prilagodbe biljaka velikim i naglim promjenama u okolišu s posebnim osvrtom na aktualne klimatske promjene. Nakon usporedbe AFLP rezultata u ovom diplomskom radu s rezultatima već provedenih morfoloških i fizioloških istraživanja, za potrebe disertacije definirat će se opsežnija AFLP istraživanja na većem broju prirodnih populacija.

U planinskim područjima povećanjem nadmorske visine dolazi i do promjena u okolišu poput smanjenja temperature, povećanja vlažnosti, jačanja vjetrova, jačanja sunčevog zračenja i smanjenja količine kisika, a to nužno dovodi do izmjena u sastavu vegetacije. Pojedine vrste imaju vrlo širok raspon rasprostranjenosti s obzirom na promjenu nadmorske visine, a kaktusi (porodica *Cactaceae*) svakako spadaju među njih. Proučavanje genetike, fiziologije, anatomije i morfologije vrsta tolerantnih na promjenu nadmorske visine osobito je aktualno u današnje vrijeme naglih klimatskih promjena (Gurvich i sur. 2002), kada se od znanstvenika očekuju odgovori na pitanja kao što su: *Kako spriječiti izumiranje vrsta?* ili *Kako smanjiti moguće smanjenje prinosa agronomski važnih svojti?*. Prilikom istraživanja utjecaja klimatskih promjena na biološku raznolikost, većina studija kao objekt istraživanja pretpostavlja vrste pri čemu se ignorira intraspecijska genetska varijabilnost. Održavanje optimalne genetske raznolikosti unutar vrste presudno je za njezinu sposobnost preživljavanja (Frankham i sur. 2004). Tako genetske osobine populacija, kao što su veličina genoma ili razina poliploidije, mogu varirati od populacije do populacije ili čak od jedinke do jedinke unutar iste populacije, ovisno o okolišnim faktorima (Knight i Ackerly 2002). S druge strane, mnoga su istraživanja uspjela povezati promjene u veličini genoma s promjenama morfoloških osobina (Slovák i sur. 2009), s različitim tipovima staništa (Leitch i sur. 2009) i rasprostranjenošću unutar areala vrste (Bennett i sur. 1998), sugerirajući da veličina genoma može pridonijeti lokalnoj prilagodbi (Levin 2002). Istraživanje genetske raznolikosti unutar i među populacijama zahtijeva upotrebu molekularnih biljega s visokom razinom polimorfности (Frankham i sur. 2004). Metoda AFLP trebala bi biti pogodna za ovakav tip istraživanja jer u sebi ujedinjava visoku varijabilnost i reproducibilnost. Proučavajući tri populacije vrste *Gymnocalycium monvillei* s tri prirodna lokaliteta na različitim nadmorskim visinama upotrebom AFLP-biljega dobiven je prvi uvid u promjenu genetske raznolikosti i strukture ove vrste s promjenom nadmorske visine.

Budući da je genetska raznolikost bila najveća kod populacija na najnižim i središnjim nadmorskim visinama (P2 i P3), može se zaključiti da staništa na nadmorskim visinama između 875 i 1250 m vjerojatno predstavljaju ekološki optimum za ovu vrstu, a da nadmorske visine od 2230 m (populacija P1) predstavljaju granične klimatske uvjete koji omogućavaju preživljavanje samo ograničenog broja genotipova.

Dodatna je važnost AFLP analize utvrđivanje broja privatnih alela i vrijednosti DW (eng. *frequency-Down-Weighted marker value* (Schönswetter i Tribsch 2005) za istraživane populacije. U svrhu dobivanja još vjerodostojnijih rezultata o izoliranosti populacija, protoku gena (eng. *gene flow*), raspodjeli ukupne raznolikosti na onu uzrokovanu razlikama između i unutar populacija kao i o njihovoj srodnosti i evolucijskoj prošlosti, obično se u istom istraživanju utvrđuju oba ova parametra, a provodi se i analiza molekularne varijance (AMOVA), klaster i/ili PCoA analiza te bayesovska analiza populacijske strukture (Pritchard i sur. 2000).

Broj privatnih alela je broj AFLP biljega koji se pojavljuju u samo jednoj populaciji, pa tako u slučaju da su uzorkovane dvije populacije koje su međusobno vrlo slične, ali potpuno različite od ostalih populacija u istraživanju, ni jedna ni druga neće imati jedinstvene biljege jer se ti biljezi pojavljuju u obama populacijama. Izračunom vrijednosti DW ovaj se problem rješava. Naime, vrijednost DW broj je jedinki kod kojih se neki AFLP-biljeg pojavljuje u toj populaciji podijeljen s brojem pojavljivanja tog AFLP-biljega u svim jedinkama svih istraživanih populacija. Za konačnu vrijednost DW za neku populaciju potrebno je zbrojiti vrijednosti DW svih biljega u toj populaciji (Schönswetter i Tribsch 2005). U tom slučaju obje će ranije u ovoj raspravi pretpostavljene populacije, za razliku od privatnih biljega, imati visoku vrijednost DW jer je učestalost mnogih biljega puno veća kod te dvije populacije od učestalosti istih biljega kod svih populacija u analizi. Isto tako, budući da se vrijednost privatnih alela osniva na prebrojavanju, a vrijednost DW na učestalosti, moguć je slučaj da je jedan biljeg prisutan u svim jedinkama neke populacije i u samo jednoj jedinci druge populacije. U tom slučaju taj biljeg neće biti privatna za prvu populaciju, ali će prilično povećati vrijednost DW za tu istu populaciju. Dakle, broj se privatnih biljega jednostavno navodi kao slučajno činjenično stanje, a vrijednost DW kao mjerilo koje je izračunato na razini uzorka, ali se interpretira tako da vrijedi za cjelokupnu populaciju odnosno kao da su u analizu bile uključene sve jedinke i svi polimorfizmi koji postoje u genomu. AFLP istraživanje u ovom radu, vjerojatno zbog analize samo triju populacija, nije pokazalo ovakvo odstupanje između privatnih alela i vrijednosti DW. Usporedbom privatnih alela i vrijednosti DW moguće je zaključiti da je gotovo dvostruko veći broj privatnih alela i vrijednost DW, a time i najveća genetska izoliranost, zabilježena u populaciji na najvišoj nadmorskoj visini (P1). Ostale dvije populacije na nižim nadmorskim visinama imale su podjednake vrijednosti za ova dva populacijsko-genetička parametra.

Nakon izračunate genetske raznolikosti i vrijednosti DW za tri istraživane populacije bilo je moguće očekivati najviše četiri kombinacije ovih dvaju parametara iz kojih se može zaključiti sljedeće: (1) visok  $H_E$ /visok DW – populacije davno izolirane od ostatka populacija iste vrste, ali dovoljno velike da nije došlo do smanjenja raznolikosti uslijed oplodnje u srodstvu, (2) visok  $H_E$ /nizak DW – skorašnje populacije, postoji slobodan protok gena iz susjednih, genetski različitih populacija, (3) nizak  $H_E$ /visok DW – populacije koje su davno odvojene, genetski izolirane i male, pa dolazi do oplodnje u srodstvu, (4) nizak  $H_E$ /nizak DW – populacije nastale skorašnjim širenjem koje su upravo prošle kroz genetsko usko grlo (Grdiša i sur. 2014). U ovom su istraživanju, ograničenom na svega tri populacije, utvrđena dva od četiri navedena slučaja. Populacija s najviše nadmorske visine (P1) mogla bi se opisati kao slučaj nizak  $H_E$ /visok DW, a ostale dvije populacije s nižih nadmorskih visina (P2 i P3) kao slučaj visok  $H_E$ /nizak DW. U skladu s tim, AFLP rezultati populacije s najviše nadmorske visine ukazuju na dugu vremensku izoliranost pri čemu je došlo do akumulacije specifičnih mutacija uz vjerojatno povećano oprašivanje i oplodnju u bliskom srodstvu. U drugom slučaju AFLP rezultati populacija s nižih nadmorskih visina ukazuju na slobodniji protok gena kako između ove dvije populacije, tako i s nekim drugim populacijama koje nisu istraživane u ovom diplomskom radu. Nešto niža genetska raznolikost populacija na najnižoj nadmorskoj visini od one u središnjem dijelu, kao i neznatno veći broj privatnih alela i DW vrijednost, mogli bi se povezati sa sukcesijom prema drvenastim vrstama izraženom na ovom staništu (Sl. 6).

Dobiveni su rezultati genetske raznolikosti, broja privatnih alela i vrijednosti DW potvrđeni analizom AMOVA te PCoA i STRUCTURE analizom. Analiza AMOVA ukazala je na raspodjelu ukupne genetske raznolikosti na onu uzrokovanu razlikama između populacija i onu unutar populacija. Većina ukupne genetske raznolikosti pripada unutarpopulacijskoj raznolikosti (85 %), dok manji dio (15 %) pripada raznolikosti između populacija. Dobiveni rezultati ukazuju na umjerenu genetsku diferencijaciju između populacija (Wright 1951) i u skladu su sa jasnom diferencijacijom populacije s najviše nadmorske visine, ali i s neznatnom diferencijacijom populacija na nižim nadmorskim visinama. Entomofilija i mirmekohorija, zabilježene kao dominantne kod ove vrste (Bregman 1988; Lengyel i sur. 2010), očito nisu u mogućnosti genetički povezati populacije u staništima koja se jako razlikuju u nadmorskim visinama. S druge strane, visoka je varijabilnost unutar populacija tipična za alogamne biljne vrste, kao što su kaktusi, koji posjeduju izrazito zoofilne cvjetove. Dok PCoA analiza podržava rezultat koji se odnosi na izoliranost jedne populacije te međusobnu veću srodstvenu povezanost dviju populacija na nižim nadmorskim visinama, bayesovska analiza populacijske strukture jasno ukazuje na stvarno postojanje samo dviju izvornih populacija. Isto tako ova analiza omogućuje detekciju hibridnih jedinki u analizi. I dok jedinke populacije na najvećoj nadmorskoj visini pokazuju priličnu genetsku uniformiranost, s izuzetkom samo jedne hibridne

jedinke, i pripadnost samo jednom izvornom genetskom skupu, jedinke iz dviju populacija na nižim nadmorskim visinama su genetski znatno manje uniformne. Ovo je još jedan dokaz postojanja protoka gena među ovim populacijama te protoka gena iz populacija na višim nadmorskim visinama u populacije na nižim nadmorskim visinama, ali slabog ili gotovo nikakvog protoka gena u suprotnom smjeru.

Uspoređujući ovo istraživanje s objavljenim i još neobjavljenim rezultatima suradničkog tima iz Argentine, moguće je uočiti neke zajedničke trendove. Klijanci u dvije populacije na nižim nadmorskim visinama imaju kuglasti oblik, dok je onaj iz populacije na najvišoj nadmorskoj visini cilindričan i viši (Bauk i sur. 2015). Po nekim autorima (Leishman i sur. 2000, Sosa Pivatto i sur. 2014) cilindrični su klijanci mnogo bolji u kompeticiji za svjetlost, ali su manje otporni na visoke temperature i sušu od onih koji su kuglastog oblika. Da je to najvjerojatnije potvrđuju i laboratorijski rezultati Bauk i suradnika (2017) po kojima visoka temperatura i niski vodeni potencijal (suša) smanjuju klijavost sjemenki kod svih populacija osim kod onih na najnižim nadmorskim visinama. Ostale germinativne osobine kao što su broj plodova po biljci i broj sjemenki po plodu (Bauk 2019, osobna komunikacija), a koje su vrlo važne za povećanje gustoće neke populacije (Barthlott i Hunt 2000), u skladu su s dobivenim AFLP rezultatima. Tako genetski najraznolikiju populaciju u ovom diplomskom radu (P2, 1250 m) čine jedinke s velikim brojem plodova i velikim brojem sjemenki u plodovima, dok su te vrijednosti za populaciju s najviše nadmorske visine (P1, 2230 m) izrazito male.

Klimatske promjene utječu na organizme širom svijeta, a razumijevanje odnosa vrste i okoliša pomoglo bi u predviđanju odgovora pojedinih vrsta (Gurvich i sur. 2002; Aragón-Gastélum i sur. 2014). Može se pretpostaviti da će vrste sa širokom rasprostranjenošću, kao što je vrsta *G. monvillei* rasprostranjena u širokom pojasu nadmorskih visina, biti pod manjim utjecajem klimatskih promjena nego što je to slučaj s usko rasprostranjenim vrstama (Ureta i sur. 2012). Rezultati prikazani u ovom radu, ali i drugi objavljeni i još neobjavljeni rezultati morfoloških i fizioloških istraživanja vrste *G. monvillei*, pokazuju da će u slučaju globalnih klimatskih promjena barem jedan dio populacije sa širokom rasprostranjenošću imati izgled za opstanak. Od tri populacije u ovom istraživanju, može se reći da populacija P2 (1250 mnm), zbog njezine najveće genetičke raznolikosti, genetičke strukture jedinki, globularne građe klijanaca, otpornosti na povišenu temperaturu i uvjete suše, velikih plodova i brojnih sjemenki, predstavlja populaciju koja bi se od svih istraživanih najvjerojatnije najlakše prilagodila novonastalim uvjetima u okolišu. U skladu s tim ova populacija predstavlja evolucijski signifikantnu jedinicu (Moritz 1994) koju bi svakako trebalo uzeti u obzir u budućim programima zaštite.

## **6. ZAKLJUČCI**



Na temelju provedene populacijsko-genetičke analize upotrebom AFLP-biljega na trima prirodnim populacijama vrste *Gymnocalycium monvillei* (Cactaceae) s triju različitih nadmorskih visina u planinskom području pokrajine Córdoba (Argentina) može se zaključiti sljedeće:

- rezultati ovog diplomskog rada potvrdili su mogućnost opsežnije primjene AFLP-biljega unutar multidisciplinarnih istraživanja prirodnih populacija vrste *Gymnocalycium monvillei* (Cactaceae),
- budući da je genetska raznolikost bila najveća kod najniže i središnje populacije, staništa nadmorskih visina između 875 i 1250 m vjerojatno predstavljaju ekološki optimum za ovu vrstu,
- nadmorske visine od 2230 m predstavljaju granične klimatske uvjete koji omogućavaju preživljavanje samo ograničenog broja genotipova,
- genetska raznolikost i vrijednost DW ukazuju na dugu vremensku izoliranost populacije s najviše nadmorske visine pri čemu je došlo do akumulacije specifičnih mutacija uz vjerojatno povećano oprašivanje i oplodnju u bliskom srodstvu,
- uobičajeno za stranooplodne vrste većina ukupne genetske raznolikosti pripada unutarpopulacijskoj raznolikosti (85 %), dok manji dio (15 %) pripada raznolikosti između populacija,
- bayesovska analiza populacijske strukture jasno ukazuje na stvarno postojanje samo dviju izvornih populacija,
- jedinke populacije na najvišoj nadmorskoj visini pokazuju priličnu genetsku uniformnost, s izuzetkom samo jedne jedinke koja podjednako pripada u obje izvorne populacije, dok su jedinke iz dviju populacija na nižim nadmorskim visinama genetski znatno manje uniformne,
- jedinke populacije P2 (1250 m), zbog utvrđene najveće genetičke raznolikosti, globularne građe klijanaca, otpornosti na povišenu temperaturu i sušu, velikih plodova i velikog broja sjemenki, trebale bi se smatrati najotpornijim na buduće klimatske promjene,
- populacija P2 predstavlja evolucijski signifikantnu jedinicu koju svakako treba uzeti u obzir pri budućim programima zaštite.

## **7. POPIS LITERATURE**

- Anderson E. F. 2001. The Cactus Family. Pentland, Oregon.
- APG IV. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**: 105-121.
- Aragón-Gastélum J. L., Flores J., Yáñez-Espinosa L., Badano E., Ramírez-Tobías H. M., Rodas-Ortíz J. P., González-Salvatierra C. 2014. Induced climate change impairs photosynthetic performance in *Echinocactus platyacanthus*, an especially protected Mexican cactus species. *Flora* **209**: 499-503.
- Arakaki M., Christin P., Nyffeler R., Lendel A., Eggli U., Ogburn R., Spriggs E., Moore J. M., Edwards J. E. 2011. Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108(20)**: 8379-8384.
- Bárcenas R. T., Yesson C., Hawkins A. J. 2011. Molecular systematics of the Cactaceae. *Cladistics* **27**: 470-489.
- Barthlott W. i Hunt D. 2000. Seed-diversity in *Cactaceae* subfam. *Cactoideae*. Succulent Plant. ResearchEdition: Vol. 5. Milborne Port, England.
- Bauk K., Flores J., Ferrero C., Pérez-Sánchez R., Las Peñas L., Gurvich E. D. 2017. Germination characteristics of *Gymnocalycium monvillei* (*Cactaceae*) along its entire altitudinal range. *Botany* **95**: 419-428.
- Bauk K., Pérez-Sánchez R., Zeballos S. R., Las Peñas M. L., Flores J., Gurvich D. E. 2015. Are seed mass and seedling size and shape related to altitude? Evidence in *Gymnocalycium monvillei* (*Cactaceae*). *Botany* **93(8)**: 529-533.
- Bennett D. M., Leitch I. J., Hanson L. 1998. DNA Amounts in two samples of angiosperm weeds. *Annals of Botany* **82**: 121-134.
- Bregman, R. 1988. Forms of seed dispersal in Cactaceae. *Acta Botanica Neerlandica* **37**: 395-402.
- Britton L. N., Rose N. J. 1963. The *Cactaceae*. Descriptions and Illustrations of Plants of the Cactus Family. Dover Publications, INC. New York.
- Çalışkan M. 2012. Genetic Diversity in Plants. InTech. Rijeka, Croatia.
- Demaio H. P., Barfuss H. J. M., Kiesling R., Till W., Chiapella O. G. 2011. Molecular phylogeny of *Gymnocalycium* (*Cactaceae*): Assessment of alternative infrageneric systems, a new subgenus, and trends in the evolution of the genus. *American Journal of Botany* **98**: 1841-1854.
- Domac R. 2002. Flora Hrvatske: priručnik za određivanje bilja, 2. izdanje. Školska knjiga. Zagreb.
- Edwards J. E., Nyffeler R., Donoghue M. J. 2005. Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (*Cactaceae*) paraphyly for the transition to the cactus life form. *American Journal of Botany* **92**: 1177-1188.

- Ehrich D. 2006. AFLPdat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Molecular Ecology Notes* **6**: 603-604.
- Ellegren H., Galtier N. 2016. Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews, Genetics* **17**: 422-433.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**: 2611-2620.
- Excoffier L., Smouse P. E., Quattro J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics* **131**: 479-491.
- Falush D., Stephens M., Pritchard J. K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164(4)**: 1567-1587.
- Frankham R., Ballou J. D., Briscoe D. A. 2004. *A primer of conservation genetics*. University Press, Cambridge.
- Goettsch B., Hilton-Taylor C., Cruz-Piñon G., Gaston J. K. i sur. 2015. High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nature Plants* **1**: 15142.
- Gower J. C. 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* **53**: 325-338.
- Grdiša M., Liber Z., Radosavljević I., Carović-Stanko K., Kolak I., Šatović Z. 2014. Genetic diversity and structure of dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerarifolium* Trevir. (Sch.) Bip., *Asteraceae*) within the Balkan Refugium. *PlosOne*.
- Griffiths H., Males J. 2017. Succulent Plants. *Current Biology* **27**: 890-896.
- Guerrero C., Majure C. L., Cornejo-Romero A., Hernández-Hernández T. 2019. Phylogenetic relationships and evolutionary trends in the cactus family. *Journal of Heredity* **1**: 4-21.
- Gurvich D. E., Díaz S., Falczuk V., Pérez-Harguindeguy N., Cabido M., Thorpe C. 2002. Foliar resistance to simulated extreme temperature events in contrasting plant functional and chorological types. *Global Change Biology* **8**: 1139-1145.
- Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan P. D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**: 9.
- Hernández H. M., Gómez-Hinostrosa C. 2015. *Mapping the cacti of Mexico, Part II, Mammillaria*. México DF (México): dh Books, Conabio.
- Hernández-Hernández T., Brown J. W., Schlumpberger B. O., Eguiarte L. E., Magallón S. 2014. Beyond aridification: multiple explanations for the elevated diversification of cacti in the New World Succulent Biome. *New Phytologist* **202**: 1382-1397.
- Hernández-Hernández T., Hernández H. M., De-Nova J. A., Puente R., Eguiarte L. E., Magallón S. 2011. Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American Journal of Botany* **98**: 44-61.

- Herrmann D., Poncet B. N., Manel S., Rioux D., Gielly L., Taberlet P., Gugerli F. 2010. Selection criteria for scoring amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) positively affect the reliability of population genetic parameter estimates. *Genome* **53(4)**: 302-10.
- Inglese P., Mondragon C., Sáenz C. 2017. Crop Ecology, Cultivation and uses of cactus pear. Food and Agriculture Organization of the United Nations, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas.
- Johnson A. T., Smith H. A. 1972. Plant Names Simplified: Their pronunciation derivation and meaning. Buckenhill, Herefordshire. Landsmans Bookshop.
- Knight A. C. i Ackerly D. D. 2002. Variation in nuclear DNA content across environmental gradients: a quantile regression analysis. *Ecology Letters* **5**: 66-76.
- Leishman M. R., Wright I. J., Moles A. T., Westoby M. 2000. The evolutionary ecology of seed size. In *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*. Edited by M. Fenner. CABI Publishing. Wallingford.
- Leitch I. J., Kahandawala I., Suda J., Hanson L., Ingrouille M. J., Chase M. W., Fray M. F. 2009. Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. *Annals of Botany* **104**: 469-481.
- Lengyel S., Gove A. D., Latimer A. M., Majer J. D., Dunn R. R. 2010. Convergent evolution of seed dispersal by ants, and phylogeny and biogeography in flowering plants: a global survey. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **12**: 43-55.
- Levin D. A. 2002. The role of chromosome change in plant evolution. Oxford University Press, Oxford.
- Lewontin R. C. 1972. Testing the theory of natural selection. *Nature* **236**: 181-182.
- Linløkken N. A. 2018. Genetic diversity in small populations. IntechOpen. London, United Kingdom.
- Linnaeus C. 1753. *Species Plantarum: exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas*. Impensis Laurentii Salvii, Stockholm.
- Lodé J. 2019. *Leuenbergeria*, a new genus in *Cactaceae*. *Cactus-aventures International* **97**: 25-27.
- Mate A. 2009. Genetička raznolikost velebitske degenije (*Degenia velebitica* (Degen) Hayek). Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek. Zagreb.
- Moritz C. 1994. Defining „Evolutionary Significant Units“ for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **9**: 373-375.
- Nei M., Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 5269-5273.

- Nikolić T. 2013. Sistematska botanika – Raznolikost i evolucija biljnog svijeta. Alfa d.d., Zagreb.
- Nyffeler R., Eggli U. 2010. Disintegrating Portulacaceae: a new familial classification of the suborder *Portulacineae* (*Caryophyllales*) based on molecular and morphological data. *Taxon* **59**: 227-240.
- Pilbeam J. 1995. *Gymnocalycium*, A Collector's Guide. A. A. Balkema, Rotterdam.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.
- Rosendahl S., Taylor J. W. 1997. Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP. *Molecular ecology* **6**: 821-829.
- Sambrook E., Frisch F., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Press. New York.
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L. 2000. ARLEQUIN Version 2.000: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory of the University of Geneva.
- Schönswetter P., Tribsch A. 2005. Vicariance and dispersal in the alpine perennial *Bupleurum stellatum* L. (*Apiaceae*). *Taxon* **54(3)**: 725-732.
- Slovák M., Vit P., Urfus T., Suda J. 2009. Complex pattern of genome size variation in a polymorphic member of the Asteraceae. *Journal of Biogeography* **36**: 372-384.
- Sosa Pivatto M., Funes G., Ferreras A. E., Gurvich D. E. 2014. Seed mass, germination and seedling traits for some central Argentinian cacti. *Seed Science Research* **24**: 71-77.
- Steenbergh W. F., Lowe H. C. 1997. Ecology of the saguaro, II: reproduction, germination, establishment, growth and survival of the young plant. National Park Service scientific monograph: no. 8.
- Ureta C., Martorell C., Hortal J., Fornoni J. 2012. Assessing extinction risks under the combined effects of climate change and human disturbance through the analysis of life-history plasticity. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* **14**: 393-401.
- Vázquez-Sánchez M., Terrazas T., Arias S., Ochoterena H. 2013. Molecular phylogeny, origin and taxonomic implications of the tribe Cacteeae (Cactaceae). *Systematics and Biodiversity* **11**: 103-116.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zubeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nuclear Acids Research* **23(21)**: 4407-4414.
- Walker J. F., Yang Y., Feng T., Timoneda A., Mikenas J., Hutchinson V. Edwards C., Wang N., Ahluwalia S., Olivieri J., Walker-Hale N., Majure L. C., Puente R., Kadereit G., Lauterbach M., Eggli U., Flores-Olvera H., Ochoterena H., Brockington S. F., Moore M.

- J., Smith S. A. 2018. From cacti to carnivores: Improved phylotranscriptomic sampling and hierarchical homology inference provide further insight into the evolution of Caryophyllales. *American Journal of Botany* **105**: 446-462.
- Wright S. 1951. The Genetical of Populations. *Annals of Eugenics* **15**: 323-354.
- Zachos J., Pagani M., Sloan L., Thomas E., Billups K. 2001. Trends, rhythms and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science* **292**: 686-693.

## **8. ŽIVOTOPIS**



Dragan Rašić (Slovenj Gradec, 1. IV. 1995). Maturirao pri Nadbiskupskoj klasičnoj gimnaziji u Zagrebu 2014. godine. Iste godine upisuje nastavnički studij biologije i kemije na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija aktivan na Zavodu za animalnu fiziologiju – za trajanja treće i četvrte godine studija sudjeluje u izvođenju praktikumske nastave kolegija Histologija i embriologija kao demonstrator, a kasnije i kao volonter u laboratorijskom radu iste katedre. Za studiranja sudjeluje u Danima otvorenih vrata Fakulteta i na Biološkom i na Kemijskom odsjeku. Posebno zanimanje gaji prema botanici i filogeniji života na Zemlji. Diplomski rad u području filogenije bilja i molekularne ekologije upisuje pri Laboratoriju za filogeniju i molekularnu sistematiku Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka pod vodstvom prof. dr. sc. Zlatka Libera. Uz prirodoslovlje, proučava i umjetnost, a posebice glazbenu i likovnu. Povezivanje umjetnosti i znanosti ostvaruje proučavanjem bioloških osnova glazbe kao umjetničkog i fizikalnog konstrukta, kao i izučavanjem botaničke ilustracije. Drugi su mu interesi stari jezici i filozofija znanosti.

## **9. PRILOZI**

**Prilog 1. Genetička srodnost 69 istraživanih jedinki utvrđena izračunom udaljenosti po Diceu među svim mogućim parovima jedinki.**

	P2J30	P2J31	P2J32	P2J33	P2J34	P2J35	P2J36	P2J37	P2J38	P2J39	P2J40	P2J41	P2J42	P2J43	P2J44	P2J45	P2J46	P3J47	P3J48	P3J49	P3J50	P3J51	P3J52	P3J53	P3J54	P3J55	P3J56	P3J57	P3J58
P1J01	0,435	0,441	0,403	0,360	0,542	0,539	0,432	0,436	0,422	0,440	0,433	0,470	0,449	0,421	0,455	0,393	0,395	0,511	0,466	0,471	0,481	0,513	0,489	0,471	0,448	0,419	0,452	0,475	0,495
P1J02	0,424	0,420	0,404	0,372	0,527	0,514	0,453	0,447	0,423	0,418	0,443	0,510	0,449	0,432	0,414	0,438	0,416	0,518	0,455	0,510	0,469	0,530	0,487	0,480	0,487	0,492	0,482	0,505	0,472
P1J03	0,414	0,376	0,351	0,330	0,497	0,472	0,355	0,436	0,390	0,418	0,433	0,405	0,372	0,355	0,393	0,371	0,344	0,468	0,414	0,439	0,395	0,461	0,433	0,429	0,385	0,398	0,430	0,454	0,441
P1J04	0,439	0,446	0,397	0,394	0,492	0,534	0,436	0,453	0,416	0,389	0,458	0,486	0,463	0,425	0,439	0,409	0,420	0,473	0,460	0,455	0,421	0,476	0,483	0,433	0,411	0,478	0,467	0,481	0,467
P1J05	0,418	0,412	0,407	0,393	0,506	0,550	0,460	0,453	0,461	0,422	0,470	0,511	0,495	0,425	0,462	0,385	0,387	0,520	0,495	0,511	0,477	0,522	0,462	0,456	0,454	0,492	0,503	0,552	0,492
P1J06	0,399	0,436	0,326	0,386	0,525	0,511	0,427	0,410	0,407	0,424	0,429	0,465	0,474	0,438	0,409	0,356	0,371	0,495	0,430	0,455	0,465	0,477	0,473	0,424	0,454	0,447	0,457	0,508	0,468
P1J07	0,445	0,452	0,403	0,380	0,486	0,539	0,432	0,436	0,401	0,418	0,454	0,459	0,420	0,399	0,435	0,398	0,446	0,457	0,403	0,471	0,470	0,492	0,444	0,439	0,448	0,441	0,441	0,464	0,430
P1J08	0,402	0,419	0,359	0,368	0,535	0,485	0,466	0,414	0,422	0,394	0,422	0,483	0,460	0,420	0,413	0,390	0,372	0,481	0,457	0,484	0,449	0,505	0,491	0,462	0,459	0,453	0,486	0,511	0,464
P1J09	0,405	0,411	0,354	0,314	0,486	0,484	0,433	0,427	0,393	0,387	0,384	0,471	0,450	0,401	0,405	0,341	0,367	0,438	0,426	0,461	0,439	0,462	0,402	0,409	0,408	0,411	0,463	0,487	0,474
P1J10	0,399	0,415	0,358	0,347	0,448	0,489	0,405	0,388	0,418	0,380	0,408	0,465	0,474	0,416	0,430	0,356	0,350	0,463	0,440	0,466	0,422	0,466	0,451	0,414	0,292	0,436	0,436	0,508	0,457
P1J11	0,410	0,416	0,410	0,396	0,497	0,482	0,429	0,445	0,453	0,471	0,441	0,492	0,407	0,383	0,475	0,400	0,390	0,456	0,464	0,470	0,458	0,514	0,477	0,470	0,424	0,494	0,438	0,520	0,506
P1J12	0,461	0,362	0,451	0,396	0,492	0,533	0,427	0,432	0,439	0,413	0,469	0,493	0,435	0,395	0,409	0,433	0,442	0,505	0,490	0,476	0,465	0,528	0,484	0,445	0,443	0,479	0,511	0,481	0,426
P1J13	0,412	0,374	0,380	0,337	0,486	0,494	0,441	0,412	0,421	0,371	0,442	0,503	0,458	0,374	0,422	0,356	0,372	0,489	0,422	0,492	0,425	0,481	0,420	0,427	0,404	0,451	0,462	0,497	0,462
P1J14	0,451	0,447	0,378	0,366	0,481	0,533	0,438	0,421	0,429	0,391	0,448	0,487	0,445	0,405	0,430	0,389	0,401	0,505	0,451	0,497	0,455	0,497	0,429	0,424	0,454	0,447	0,468	0,514	0,489
P1J15	0,432	0,472	0,443	0,375	0,520	0,541	0,463	0,434	0,475	0,460	0,462	0,514	0,508	0,406	0,432	0,376	0,433	0,456	0,464	0,481	0,503	0,492	0,477	0,425	0,457	0,461	0,438	0,497	0,438
P1J16	0,417	0,402	0,367	0,365	0,519	0,495	0,455	0,429	0,395	0,400	0,426	0,440	0,470	0,455	0,397	0,355	0,399	0,480	0,437	0,442	0,430	0,453	0,457	0,401	0,440	0,443	0,454	0,476	0,433
P1J17	0,412	0,462	0,412	0,378	0,554	0,506	0,453	0,480	0,464	0,438	0,474	0,514	0,488	0,453	0,487	0,391	0,414	0,543	0,497	0,546	0,536	0,545	0,489	0,470	0,489	0,484	0,538	0,564	0,527
P1J18	0,441	0,470	0,409	0,395	0,494	0,526	0,449	0,432	0,451	0,412	0,439	0,478	0,505	0,427	0,441	0,364	0,379	0,497	0,419	0,522	0,467	0,500	0,474	0,467	0,465	0,436	0,448	0,517	0,492
P1J19	0,433	0,451	0,422	0,408	0,531	0,540	0,464	0,469	0,475	0,438	0,474	0,525	0,458	0,397	0,476	0,425	0,435	0,511	0,455	0,514	0,503	0,545	0,466	0,503	0,468	0,484	0,473	0,497	0,495
P1J20	0,439	0,466	0,480	0,405	0,500	0,541	0,447	0,462	0,427	0,455	0,467	0,505	0,453	0,394	0,449	0,410	0,390	0,461	0,449	0,485	0,453	0,485	0,427	0,433	0,442	0,497	0,487	0,511	0,508
P1J21	0,436	0,455	0,403	0,379	0,527	0,500	0,468	0,462	0,480	0,477	0,489	0,497	0,462	0,422	0,459	0,405	0,427	0,506	0,459	0,531	0,463	0,519	0,447	0,475	0,484	0,466	0,511	0,549	0,511
P1J22	0,473	0,458	0,429	0,424	0,529	0,550	0,471	0,488	0,506	0,445	0,524	0,545	0,465	0,460	0,505	0,420	0,462	0,553	0,505	0,556	0,500	0,565	0,485	0,522	0,519	0,503	0,525	0,563	0,537
P1J23	0,444	0,451	0,433	0,378	0,509	0,529	0,441	0,424	0,443	0,404	0,463	0,470	0,458	0,374	0,444	0,379	0,414	0,478	0,465	0,503	0,470	0,503	0,466	0,459	0,468	0,484	0,484	0,508	0,484
P1J24	0,389	0,404	0,389	0,327	0,470	0,500	0,449	0,443	0,376	0,402	0,438	0,465	0,474	0,373	0,399	0,378	0,421	0,400	0,399	0,403	0,444	0,436	0,451	0,414	0,292	0,436	0,436	0,449	0,426
P2J25	0,457	0,371	0,427	0,365	0,444	0,398	0,330	0,407	0,374	0,421	0,307	0,347	0,433	0,403	0,407	0,387	0,379	0,480	0,417	0,401	0,399	0,389	0,447	0,421	0,390	0,464	0,402	0,476	0,423
P2J26	0,413	0,352	0,446	0,430	0,430	0,392	0,352	0,402	0,389	0,394	0,358	0,427	0,450	0,398	0,446	0,415	0,415	0,481	0,435	0,418	0,416	0,452	0,445	0,473	0,427	0,475	0,408	0,511	0,443
P2J27	0,426	0,333	0,372	0,411	0,443	0,417	0,344	0,371	0,380	0,441	0,414	0,418	0,402	0,389	0,362	0,337	0,396	0,492	0,404	0,409	0,429	0,421	0,458	0,409	0,418	0,443	0,399	0,489	0,430
P2J28	0,436	0,486	0,404	0,442	0,489	0,548	0,511	0,483	0,500	0,475	0,508	0,516	0,422	0,444	0,468	0,417	0,458	0,568	0,436	0,516	0,440	0,505	0,503	0,495	0,492	0,519	0,443	0,522	0,454
P2J29	0,392	0,341	0,348	0,389	0,456	0,476	0,410	0,322	0,367	0,360	0,380	0,383	0,411	0,318	0,348	0,333	0,384	0,449	0,337	0,363	0,406	0,388	0,365	0,374	0,440	0,443	0,352	0,410	0,386
P2J30		0,401	0,375	0,353	0,478	0,531	0,478	0,418	0,372	0,355	0,426	0,484	0,442	0,435	0,365	0,397	0,357	0,450	0,385	0,442	0,462	0,464	0,481	0,389	0,420	0,401	0,401	0,424	0,444
P2J31	0,401		0,369	0,357	0,417	0,425	0,374	0,401	0,355	0,371	0,358	0,359	0,379	0,363	0,390	0,345	0,382	0,489	0,412	0,395	0,348	0,397	0,432	0,449	0,340	0,418	0,451	0,453	0,396
P2J32	0,375	0,369		0,353	0,533	0,475	0,435	0,396	0,362	0,432	0,446	0,430	0,433	0,359	0,365	0,307	0,347	0,439	0,406	0,421	0,462	0,495	0,459	0,400	0,420	0,401	0,433	0,435	0,465
P2J33	0,353	0,357	0,353		0,492	0,500	0,409	0,403	0,330	0,344	0,373	0,395	0,419	0,347	0,284	0,351	0,356	0,465	0,403	0,367	0,415	0,438	0,421	0,377	0,356	0,378	0,378	0,430	0,408
P2J34	0,478	0,417	0,533	0,492		0,497	0,430	0,424	0,455	0,404	0,366	0,448	0,459	0,419	0,522	0,473	0,489	0,514	0,433	0,506	0,414	0,385	0,444	0,494	0,459	0,520	0,486	0,512	0,440
P2J35	0,331	0,425	0,475	0,500	0,497		0,345	0,444	0,451	0,494	0,418	0,410	0,487	0,497	0,486	0,446	0,421	0,580	0,508	0,469	0,457	0,436	0,512	0,480	0,489	0,552	0,563	0,602	0,540
P2J36	0,478	0,374	0,435	0,409	0,430	0,345		0,391	0,367	0,417	0,358	0,382	0,440	0,364	0,435	0,357	0,340	0,558	0,457	0,440	0,438	0,409	0,410	0,429	0,416	0,497	0,497	0,489	0,464
P2J37	0,418	0,401	0,396	0,403	0,424	0,444	0,391		0,360	0,376	0,449	0,443	0,444	0,379	0,374	0,385	0,387	0,441	0,429	0,433	0,398	0,446	0,392	0,367	0,377	0,492	0,424	0,471	0,458
P2J38	0,372	0,355	0,362	0,330	0,455	0,451	0,367	0,360		0,363	0,361	0,374	0,373	0,344	0,319	0,360	0,365	0,438	0,351	0,333	0,396	0,358	0,412	0,333	0,323	0,399	0,410	0,433	0,377
P2J39	0,355	0,371	0,432	0,344	0,404	0,494	0,417	0,376	0,363		0,344	0,435	0,417	0,371	0,366	0,341	0,369	0,500	0,388	0,425	0,356	0,416	0,384	0,370	0,370	0,404	0,438	0,429	0,371
P2J40	0,426	0,358	0,446	0,373	0,366	0,418	0,358	0,449	0,361	0,344		0,407	0,422	0,401	0,405														

## Prilog 1. nastavak

	P3J59	P3J60	P3J61	P3J62	P3J63	P3J64	P3J65	P3J66	P3J67	P3J68	P3J69
P1J01	0,379	0,538	0,569	0,509	0,426	0,479	0,424	0,470	0,443	0,526	0,540
P1J02	0,431	0,523	0,553	0,521	0,456	0,427	0,445	0,458	0,473	0,523	0,536
P1J03	0,389	0,495	0,503	0,481	0,394	0,458	0,391	0,481	0,454	0,505	0,497
P1J04	0,383	0,533	0,520	0,497	0,430	0,463	0,418	0,486	0,490	0,511	0,535
P1J05	0,448	0,582	0,558	0,535	0,464	0,464	0,474	0,420	0,459	0,536	0,528
P1J06	0,375	0,543	0,530	0,519	0,421	0,443	0,409	0,444	0,490	0,521	0,545
P1J07	0,368	0,495	0,514	0,509	0,394	0,438	0,402	0,459	0,464	0,516	0,529
P1J08	0,399	0,520	0,517	0,529	0,436	0,438	0,435	0,427	0,455	0,563	0,556
P1J09	0,361	0,516	0,492	0,470	0,406	0,408	0,426	0,418	0,434	0,515	0,518
P1J10	0,354	0,511	0,497	0,508	0,400	0,454	0,366	0,412	0,439	0,500	0,492
P1J11	0,374	0,562	0,549	0,491	0,400	0,457	0,420	0,446	0,473	0,538	0,542
P1J12	0,427	0,553	0,530	0,497	0,463	0,526	0,484	0,487	0,449	0,500	0,503
P1J13	0,398	0,538	0,537	0,492	0,424	0,447	0,422	0,459	0,442	0,495	0,508
P1J14	0,365	0,521	0,530	0,497	0,432	0,443	0,409	0,444	0,459	0,521	0,534
P1J15	0,385	0,562	0,561	0,509	0,411	0,500	0,420	0,458	0,452	0,516	0,542
P1J16	0,333	0,526	0,513	0,471	0,388	0,400	0,396	0,409	0,416	0,495	0,508
P1J17	0,387	0,626	0,605	0,548	0,489	0,479	0,456	0,459	0,537	0,570	0,585
P1J18	0,395	0,558	0,568	0,545	0,443	0,476	0,397	0,422	0,471	0,535	0,560
P1J19	0,398	0,604	0,582	0,525	0,446	0,489	0,456	0,470	0,474	0,548	0,585
P1J20	0,426	0,571	0,581	0,538	0,430	0,442	0,439	0,453	0,437	0,549	0,521
P1J21	0,456	0,591	0,591	0,556	0,438	0,516	0,471	0,497	0,489	0,533	0,525
P1J22	0,459	0,559	0,616	0,593	0,441	0,497	0,486	0,500	0,514	0,569	0,551
P1J23	0,409	0,571	0,593	0,548	0,435	0,479	0,444	0,459	0,474	0,548	0,530
P1J24	0,406	0,543	0,508	0,454	0,432	0,485	0,398	0,465	0,469	0,469	0,524
P2J25	0,455	0,433	0,418	0,429	0,429	0,500	0,406	0,451	0,366	0,424	0,405
P2J26	0,475	0,453	0,460	0,483	0,436	0,481	0,401	0,438	0,476	0,432	0,467
P2J27	0,433	0,464	0,416	0,449	0,395	0,460	0,381	0,418	0,445	0,455	0,457
P2J28	0,455	0,563	0,584	0,539	0,438	0,524	0,436	0,451	0,497	0,572	0,543
P2J29	0,356	0,432	0,392	0,415	0,326	0,462	0,368	0,314	0,370	0,411	0,424
P2J30	0,403	0,508	0,484	0,473	0,450	0,492	0,416	0,441	0,477	0,466	0,479
P2J31	0,387	0,495	0,469	0,446	0,380	0,468	0,411	0,414	0,389	0,430	0,410
P2J32	0,372	0,497	0,451	0,462	0,386	0,461	0,373	0,409	0,446	0,508	0,489
P2J33	0,360	0,449	0,424	0,372	0,374	0,426	0,381	0,405	0,353	0,480	0,462
P2J34	0,497	0,520	0,506	0,518	0,458	0,492	0,410	0,540	0,475	0,441	0,420
P2J35	0,517	0,506	0,503	0,527	0,500	0,544	0,500	0,538	0,495	0,494	0,451
P2J36	0,464	0,475	0,437	0,471	0,436	0,470	0,435	0,472	0,422	0,454	0,444
P2J37	0,414	0,503	0,465	0,465	0,397	0,399	0,360	0,432	0,373	0,481	0,461
P2J38	0,412	0,432	0,416	0,382	0,405	0,439	0,392	0,396	0,393	0,401	0,424
P2J39	0,352	0,449	0,434	0,445	0,367	0,413	0,364	0,401	0,398	0,418	0,441
P2J40	0,443	0,432	0,438	0,395	0,375	0,469	0,404	0,365	0,374	0,433	0,445
P2J41	0,449	0,481	0,455	0,466	0,399	0,519	0,441	0,500	0,407	0,438	0,440
P2J42	0,420	0,507	0,515	0,485	0,376	0,502	0,423	0,446	0,412	0,469	0,461
P2J43	0,377	0,397	0,402	0,379	0,304	0,405	0,345	0,371	0,337	0,399	0,433
P2J44	0,393	0,412	0,363	0,352	0,386	0,409	0,351	0,376	0,344	0,403	0,415
P2J45	0,348	0,483	0,467	0,420	0,307	0,444	0,337	0,387	0,374	0,461	0,406
P2J46	0,405	0,487	0,452	0,452	0,420	0,503	0,397	0,442	0,377	0,456	0,438
P3J47	0,426	0,565	0,486	0,497	0,387	0,474	0,374	0,464	0,385	0,489	0,514
P3J48	0,382	0,455	0,429	0,451	0,302	0,420	0,341	0,387	0,364	0,340	0,372
P3J49	0,386	0,438	0,389	0,311	0,305	0,455	0,322	0,348	0,326	0,365	0,366
P3J50	0,373	0,425	0,432	0,398	0,311	0,422	0,330	0,433	0,354	0,351	0,297
P3J51	0,378	0,439	0,413	0,402	0,403	0,477	0,348	0,436	0,371	0,316	0,326
P3J52	0,456	0,534	0,485	0,497	0,382	0,418	0,414	0,429	0,424	0,411	0,412
P3J53	0,312	0,449	0,378	0,322	0,316	0,403	0,301	0,359	0,347	0,386	0,376
P3J54	0,354	0,436	0,388	0,388	0,389	0,423	0,323	0,412	0,327	0,385	0,407
P3J55	0,355	0,484	0,401	0,356	0,370	0,447	0,400	0,436	0,432	0,398	0,464
P3J56	0,398	0,429	0,412	0,379	0,370	0,457	0,300	0,392	0,347	0,387	0,421
P3J57	0,366	0,531	0,437	0,391	0,403	0,438	0,412	0,438	0,369	0,432	0,489
P3J58	0,366	0,429	0,424	0,424	0,337	0,415	0,378	0,436	0,389	0,333	0,399
P3J59		0,484	0,448	0,425	0,309	0,406	0,283	0,373	0,361	0,432	0,444
P3J60	0,484		0,254	0,379	0,380	0,479	0,411	0,459	0,400	0,409	0,432
P3J61	0,448	0,254		0,337	0,419	0,443	0,394	0,455	0,395	0,359	0,427
P3J62	0,425	0,379	0,337		0,352	0,464	0,371	0,398	0,384	0,370	0,393
P3J63	0,309	0,380	0,419	0,352		0,379	0,286	0,355	0,313	0,415	0,395
P3J64	0,406	0,479	0,443	0,464	0,379		0,419	0,369	0,408	0,427	0,492
P3J65	0,283	0,411	0,394	0,371	0,286	0,419		0,352	0,309	0,348	0,359
P3J66	0,373	0,459	0,455	0,398	0,355	0,369	0,352		0,397	0,470	0,451
P3J67	0,361	0,400	0,395	0,384	0,313	0,408	0,309	0,397		0,392	0,361
P3J68	0,432	0,409	0,359	0,370	0,415	0,427	0,348	0,470	0,392		0,251
P3J69	0,444	0,432	0,427	0,393	0,395	0,492	0,359	0,451	0,361		0,251