

Populacijsko-genetička karakterizacija mikrosatelitnih biljega dalmatinskog buhača (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip.)

Šarančić, Sara Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:644840>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Sara Laura Šarančić

**Populacijsko-genetička karakterizacija
mikrosatelitnih biljega dalmatinskog buhača
(*Tanacetum cinerariifolium*/Trevir./Sch. Bip.)**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Sara Laura Šarančić

**Population-genetic characterization of
microsatellite markers of Dalmatian pyrethrum
(*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir. / Sch. Bip.)**

Master thesis

Zagreb, 2021.

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.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

**POPULACIJSKO-GENETIČKA KARAKTERIZACIJA MIKROSATELITNIH
BILJEGA DALMATINSKOG BUHAČA (*Tanacetum cinerariifolium*
/ Trevir. / Sch. Bip.)**

Sara Laura Šarančić
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Dalmatinski buhač je endemična i zaštićena biljka istočne obale Jadranskog mora iz porodice glavočika (Asteraceae). Ekonomski najvažnija osobina ove vrste je sposobnost sinteze prirodnog insekticida piretrina. Postojanje podataka o genetičkoj raznolikosti i strukturi populacije nužno je za filogeografska istraživanja, programe oplemenjivanja bilja i odgovarajuću zaštitu neke vrste. Danas se za istraživanje genetičke raznolikosti i strukture populacija upotrebljavaju različiti DNA biljezi, a najčešće su upotrebljavani mikrosateliti. Cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi razinu informativnosti i primjenjivost 12 novorazvijenih mikrosatelitskih biljega. Nakon PCR amplifikacije mikrosatelitskih lokusa 96 jedinki iz pet prirodnih populacija i nakon statističke analize dobivenih podataka utvrđena je: dovoljna razina informativnosti za 11 mikrosatelitskih biljega, pozitivna korelacija između genetske raznolikosti i zemljopisnog položaja istraživanih populacija, najveća genetska raznolikost (H_E), prosječni broj alela po lokusu (N_{ar}) i najveći broj jedinstvenih alela (N_{pr}) u tri najjužnije populacije, smanjena heterozigotnost zbog križanja u populaciji Lovćena, kao i širenje u populaciji Trebinje. Novorazvijeni mikrosatelitni biljezi predstavljat će važan alat za utvrđivanje podrijetla uzgajanih populacija, u budućim programima oplemenjivanja, te za generiranje podataka nužnih za učinkovito upravljanje i zaštitu ove biljne vrste.

(50 stranica, 13 slika, 6 tablica, 65 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: dalmatinski buhač, genetička raznolikost i struktura, mikrosatelitni biljezi, oplemenjivanje bilja, prirodni insekticid.

Voditelj: Dr. sc. Zlatko Liber, red. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Zlatko Liber, red. prof.

Dr. sc. Vesna Petrović Peroković, izv. prof.

Dr. sc. Mirela Sertić Perić, doc.

Rad prihvaćen: 25. lipnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

POPULATION-GENETIC CHARACTERIZATION OF MICROSATELLITE MARKERS OF DALMATIAN PYRETHRUM (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir. / Sch. Bip.)

Sara Laura Šarančić
Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* /Trev. / Schultz Bip.) is an endemic and protected plant species from the east Adriatic coast that belong to the aster family (Asteraceae). The most important economic value of this species is its ability to synthesize the natural insecticide pyrethrin. The existence of data on genetic diversity and population structure is necessary for phylogeographic research, plant breeding programs and appropriate protection of a species. Today, various DNA markers are used to research genetic diversity and population structure. Among them, microsatellites are the most used. Determination of the level of the informativity and the applicability of 12 newly developed microsatellite markers was the aim of this graduation thesis. After PCR amplification of microsatellite loci of 96 individuals from five natural populations and after statistical analysis of obtained data, it was determined: sufficient level of the informativity for 11 microsatellite markers, positive correlation between genetic diversity and geographical position of the studied population, the largest genetic diversity (H_E), the average number of alleles per locus (N_{ar}) and the largest number of unique alleles (N_{pr}) in three southernmost populations, reduced heterozygosity due to inbreeding in Lovćen population, as well as expansion in the Trebinje population. Newly developed microsatellite markers will be an important tool for determining the origin of cultivated populations, in future breeding programs, and for generating data necessary for the effective management and protection.

(50 pages, 13 figures, 6 tables, 65 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: Dalmatian pyrethrum, genetic diversity and structure, microsatellite markers, plant breeding, natural insecticide.

Supervisor: Dr. Zlatko Liber, Full Professor

Reviewers: Dr. Zlatko Liber, Full Professor

Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor

Dr. Mirela Sertić Perić, Assistant Professor

Thesis accepted: June 25th 2021

SADRŽAJ RADA

1. UVOD	1
1.1. Taksonomija, morfološka-anatomska obilježja i rasprostranjenost dalmatinskog buhača	2
1.2. Insekticidna svojstva i ekonomska vrijednost dalmatinskog buhača	4
1.3. Mikrosateliti kao DNA biljezi.....	7
1.4. Određivanje informativnosti mikrosatelitnih biljega i genetička raznolikost populacija.....	8
1.5. Mjerila genetičke udaljenosti i grafički prikaz utvrđenih odnosa	12
1.6. Bayesova analiza populacijske strukture	13
2. CILJ RADA	15
3. MATERIJALI I METODE	17
3.6. Biljni materijal	18
3.7. Izolacija ukupne stanične DNA	18
3.8. Umnožavanje mikrosatelitnih lokusa lančanom reakcijom polimerazom i detekcija alela ..	19
3.9. Statistička analiza.....	21
4. REZULTATI	24
4.6. Detekcija i svojstva mikrosatelitnih biljega	25
4.7. Genetička raznolikost prirodnih populacija	25
4.8. Srodstveni odnosi i genetička struktura istraživanih populacija	26
5. RASPRAVA	30
6. ZAKLJUČCI	34
7. ZAHVALA	36
8. POPIS LITERATURE	38
9. ŽIVOTOPIS	43

1. UVOD

1.1. Taksonomija, morfološka-anatomska obilježja i rasprostranjenost dalmatinskog buhača

Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* / Trev. / Schultz Bip.) je višegodišnja zeljasta biljna vrsta, koja prema taksonomiji pripada najbrojnijoj porodici kritosjemenjača Asteraceae (glavočike) (APG IV, 2016.). Porodica Asteraceae broji oko 25 000 vrsta, odnosno 1 500 rodova, a u Republici Hrvatskoj je poznato 120 rodova, to jest 753 vrste (Nikolić, 2013). Rod *Tanacetum* sadrži između 150 i 200 vrsta što ga čini jednim od najvećih rodova tribusa Anthemidae (Abad, 1995).

Tablica 1. Klasifikacija dalmatinskog buhača (*Tanacetum cinerariifolium* /Trev. / Schultz Bip.) unutar porodice Asteraceae.

Naziv	Taksonomska kategorija
Porodica	<i>Asteraceae</i>
Tribus	<i>Anthemideae</i>
Rod	<i>Tanacetum</i> L.
Vrsta	<i>Tanacetum cinerariifolium</i> /Trev. / Schultz Bip.

Ministarstvo zaštite okoliša i prirode donijelo je Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama (Narodne novine 144/2013)¹ u koji je uvršten i dalmatinski buhač. Stoga je, u cilju očuvanja što više populacija ove iznimno vrijedne biljne vrste, zakonom zabranjeno uzimati ga iz prirode. Najbrojnije populacije, ove endemične vrste istočne obale Jadrana, rastu na ekstremno degradiranim staništima plitkih kamenitih tala (Jasprica, 2015). Neke od većih populacija dalmatinskog buhača mogu se naći uzduž dalmatinske obale i otoka, na planinama Biokovo i Velebit te na jugu Istarskog poluotoka (Grdiša i sur. 2009). Također, samoniklo raste i na području Bosne i Hercegovine, Crne Gore i Albanije (Heywood, 1976). Budući da je uništavanje staništa, zbog poljoprivrede, turizma te gradnje infrastrukture i naselja, velika prijetnja opstanku prirodnih populacija dalmatinskog buhača, potrebno je poduzeti različite mjere kako bi se one zaštitile (Frankham i sur. 2017).

Dalmatinski buhač može narasti između 30 i 100 cm visine (Bhat, 1995), a razgranat korijen može prodrijeti u tlo više od 30 cm. U prirodi raste na vrlo degradiranim staništima, kamenitim, vapnenačkim i pjeskovitim tlima koja ne obiluju vlagom (Hedayat i sur. 2009). Nakon nicanja započinje rast u visinu, a iz osnovne stabljike s vremenom se razvijaju mnogo

sekundarnih stabljika (Sl. 1.). Na svim dijelovima biljke mogu se primijetiti sivozelene dlačice. Listovi dalmatinskog buhača oblikuju polugrm malo iznad tla, a prepoznajemo ih prema duguljastom, perasto sastavljenom, obliku (Sl. 2.) (Grdiša, 2011).



Slika 1. Grm dalmatinskog buhača, Biokovo
Autor: M. Grdiša



Slika 2. List dalmatinskog buhača
Autor: Z. Liber

Glavičasti cvat dalmatinskog buhača (Sl. 3.) promjera je između 3 i 5 cm, a sastoji se od dvije vrste cvjetova: rubnih, bijelih, zigomorfnih, sterilnih cvjetova smještenih u dva do tri reda i središnjih žutih, cjevastih, dvospolnih cvjetova smještenih u sredini (Sl. 4.) (Brewer, 1968). Cjevasti cvjetovi sastavljeni su od pet lapova čaške, pet latica vjenčića, pet prašnika kratkih filamenata te podrasle plodnice od dva plodna lista (Kolak, 1999). Svi cvjetni dijelovi su međusobno srasli.



Slika 3. Dvije vrste cvjetova dalmatinskog buhača prilagođeno prema Lybrand, 2020

Cvjetanje dalmatinskog buhača počinje mjesec dana nakon pojave prvih pupoljaka, što obično biva u svibnju, a traje sve do kraja lipnja. Glavni oprašivači ove zeljaste višegodišnje biljke su kukci iz reda Hymenoptera (opnokrilci) (Brewer, 1968). Plod buhača je sivožuta jednosjemena roška koja je pri svojoj osnovi sužena (Sl. 5.) (Nikolić i sur. 2015). U prirodi se dalmatinski buhač razmnožava spolno, a u uzgoju i spolno i nesporno vegetativnim dijeljenjem busenova, kulturom tkiva i reznicama (Hedayat i sur. 2009).



Slika 4. Glavičasti cvat dalmatinskog buhača

Autor: M. Grdiša



Slika 5. Dalmatinski buhač – plod roška

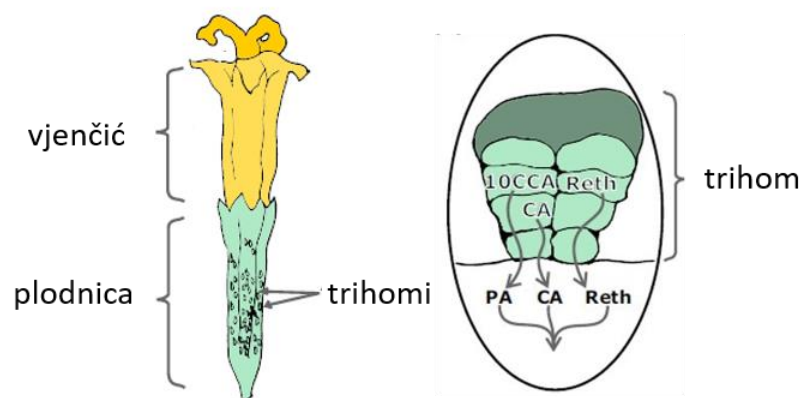
Autor: M. Grdiša

1.2. Insekticidna svojstva i ekonomska vrijednost dalmatinskog buhača

Ljekarnik dubrovačkog podrijetla, Ante Drobac, je sredinom 19. stoljeća uočio vrijedno insekticidno djelovanje dalmatinskog buhača. Sušeni i smrvljeni cvjetovi su na tom području tradicionalno bili upotrebljavani u kućanstvima kao prirodni insekticid. Zaslugom Drobčevog otkrića, samonikle populacije ove zeljaste biljke više nisu mogle zadovoljiti naglo povećanu potražnju te je iz tog razloga, 1845. godine, u okolici Dubrovnika, a zatim i duž jadranske obale, započela proizvodnja (Bakarić, 2005). Tadašnja glavna upotreba buhačevog praha bila je u borbi protiv ušiju na ljudima i životinjama te protiv komaraca, a pod nazivom „*Flores Chrysanthemi*“ prodavao se u ljekarnama diljem Europe (Glynne-Jones, 2001). Početkom 20. stoljeća potražnja za prahom dalmatinskog buhača sve je više jenjavala, a zbog Drugog svjetskog rata je i u potpunosti utihnula. Dobitnik Nobelove nagrade kemičar, Paul Müller je 1945. godine otkrio sintetski insekticid DDT (diklor-difenil-trikloretna) za kojeg se pokazalo

da besprijeckorno odrađuje insekticidni dio posla kojeg je, do maloprije, odrađivao prah buhaća, ali i da je otrovan za sisavce (Spindler, 1983). Sintetički proizvodi, kao što je DDT, su ubrzo preuzeli monopol na tržištu na kojem je do tada vladala selekcija prirodnih proizvoda. U području nesintetičkih insekticida, biljke dalmatinskog buhaća trenutno tvore ekonomski najvažniji insekticid biljnog podrijetla (Hedayat i sur. 2009).

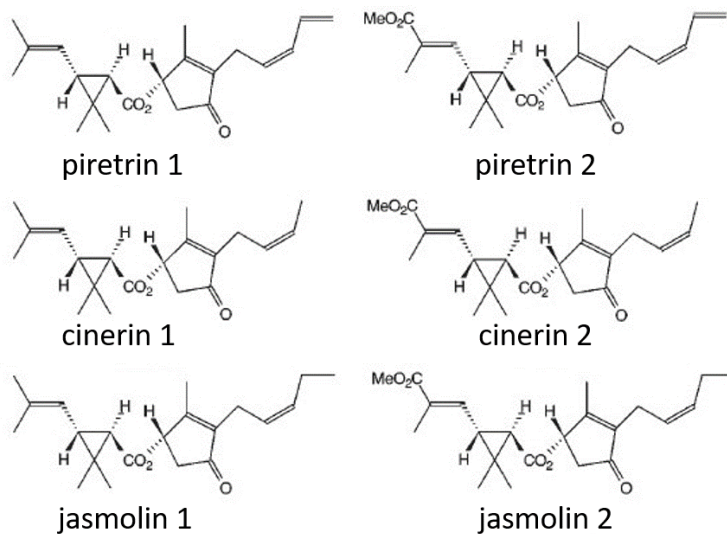
Količina piretrina u biljnoj vrsti ovisi o više čimbenika, a neki od njih su razvojni stadij to jest, fenofaza cvjetova pri ubiranju, genotip i utjecaj klime (Zieg i sur. 1983). Suha stabljika samoniklog dalmatinskog buhaća može imati između 0.1 i 1.15 % piretrina. U bijelim cvjetovima koji čine rub cvata nalazi se 0.2 do 0.4 % piretrina, a plodnica sa sjemenkom može ga sadržavati i do 4.5 % (Kolak, 1998). Piretrini se akumuliraju u nadzemnim dijelovima biljke što znači da je sinteza piretrina u dalmatinskom buhaću prostorno ograničena. Događa se prvenstveno u cjevastim cvjetovima dok su razine piretrina u jezičastim, sterilnim cvjetovima znatno manje. Količine piretrina u tkivima koreliraju s prisutnošću sekrecijskih kanalića koji se u najvećoj mjeri nalaze u žutom dijelu cvata dalmatinskog buhaća. Razina piretrina se povećava razvojem cvjetnih pupova, a maksimum dostiže u ocvalim cvjetnim glavicama. Ekspresija gena zaslužnih za kodiranje konačnog enzima u biosintezi piretrinske kiseline i enzima koji katalizira posljednji korak esterifikacije u biosintezi svih šest piretrina, događa se u tkivu plodnice. Biosinteza prekursora piretrina odvija se u različitim dijelovima biljke. Alkohol retrolon (Reth) i krizantemska kiselina (CA) sintetiziraju se u plodnici žutih cvjetova, dok se sinteza piretrinske kiseline (PA) događa u perikarpu (Sl. 6.) (Lybrand, 2020).



Slika 6. Sinteza piretrina u cvjetovima dalmatinskog buhaća prilagođeno prema Lybrand, 2020

Proizvodi od dalmatinskog buhača bili su dostupni za opću upotrebu mnogo prije nego je otkrivena struktura njegovog aktivnog sastojka piretrina. Ovaj aktivni sastojak prirodna je smjesa šest spojeva koji pripadaju dvjema različitim skupinama spojeva koje možemo pronaći u dalmatinskom buhaču, a to su piretrini I i piretrini II (Kolak, 1999). Njemački kemičar Hermann Straudinger i hrvatski nobelovac Lavoslav Ružička su tijekom rada u Švicarskoj objavili niz članaka o kemiji piretrina kao aktivnog sastojka dalmatinskog buhača. Odgonetnuli su kemijske strukture dvaju estera, piretrina I i piretrina II, za koje se smatra da su razlog insekticidnog svojstva praha buhača (Glynne-Jones, 2001).

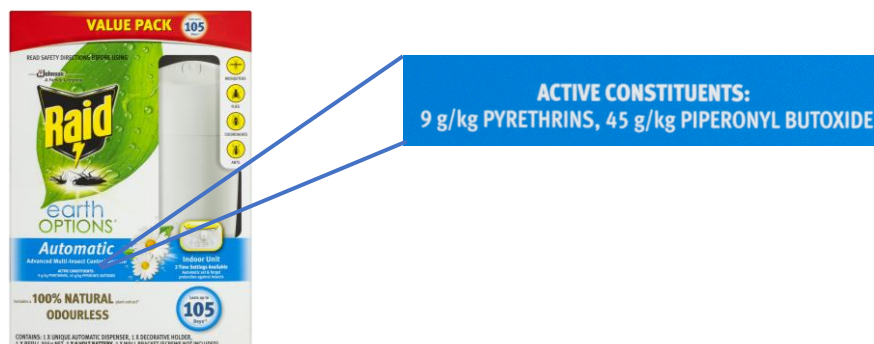
Po kemijskom sastavu piretrini I (cinerin I, jasmolin I i piretrin I) su esteri krizantemske kiseline, a piretrini II (cinerin II, jasmolin II i piretrin II) piretrinske kiseline. Navedene organske kiseline vežu se s jednim od triju alkohola (cinerolon, jasmolon i piretrolon) čime nastaju aktivne sastavnice piretrina (Kolak, 1999). Strukturne formule svih šest sastavnica piretrina prikazane su na Slici 7.



Slika 7. Strukturne formule piretrina I i piretrina II (Crombie, 1995)

Kombinaciju piretrina I i piretrina II često možemo pronaći u proizvodima za suzbijanje velikog broja štetnika kao što su komarci, mravi i žohari što je bilo od izuzetne pomoći u borbi protiv malarije tijekom povijesti. Jedno od takvih repelentnih sredstava koje se koristi u kućanstvima prikazano je na Slici 8. Nakon tretmana sredstvima koja sadrže piretrin, organizam kukaca ulazi u stanje paralize. Piretrin vrlo brzo prodire u njihov organizam, a izravno pogađa centralni i periferni živčani sustav. Natrijevi kanali na živčanim stanicama kukaca prenose natrijeve ione te uzrokuju prijenos živčanog impulsa. Nakon djelovanja

piretrina, živeći se nekontrolirano kontrahiraju što za posljedicu ima podrhtavanje tijela, a natrijevi kanali trajno ostaju otvoreni. Ovakav način obustave normalnog rada živčanog sustava uzrokuje paralizu, a zatim i smrt (Davies, 2007).

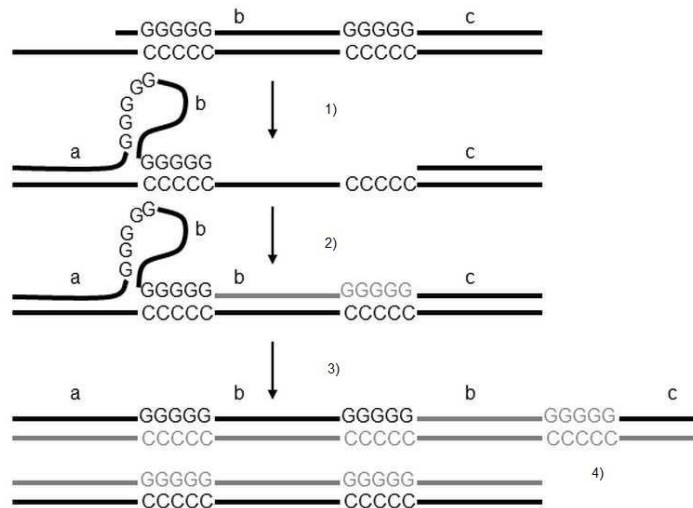


Slika 8. Pakiranje Raid® repelenta protiv insekata²

1.3. Mikrosateliti kao DNA biljezi

Za utvrđivanje genetičke raznolikosti upotrebljavaju se različiti tipovi DNA biljega (eng. *DNA markers*). Mjesto biljega na kromosomu naziva se lokus, a različiti oblici biljega na istom lokusu alelima.

Od mnogobrojnih DNA biljega, mikrosateliti (SSR, eng. *Simple Sequence Repeats*) su zbog svoji dobrih osobina, kao što su kodominantnost i visoka polimorfnost, najčešće upotrebljavani genetički biljezi (Moxon, 1999). Mikrosateliti su dijelovi DNA sastavljeni od ponavljajućih nukleotidnih motiva. U mikrosatelitnim regijama stopa mutacija iznosi od 10^{-2} do 10^{-6} nukleotida po lokusu po generaciji (Radosavljević, 2012). Visoka razina polimorfizma objašnjava se mehanizmom replikacijskog klizanja (eng. *replication slippage*) (Sl. 9.). Tijekom replikacije mikrosatelitne regije dolazi do „proklizavanja“ jednog lanca u odnosu na drugi što dovodi do pogreške u sparivanju baza, a to za posljedicu ima stvaranje petlje. Ukoliko se petlja nalazi na novom lancu, u sljedećem replikacijskom ciklusu doći će do povećanja broja mikrosatelitnih motiva, a ukoliko se petlja nalazi na lancu kalupa, u sljedećem replikacijskom ciklusu će doći do gubitka određenog broja mikrosatelitnih motiva. Područja oko mikrosatelitne regije su mutacijski mnogo konzervativnija pa se upotrebljavaju za konstrukciju PCR-početnica za umnožavanje mikrosatelitnog lokusa. Kada se jednom odrede PCR-početnice za neki mikrosatelitni lokus, laboratorijska analiza mikrosatelita je prilično jednostavna i svodi se na lančanu reakciju polimerazom i detekciju alela na kapilarnoj elektroforezi.



Slika 9. Shematski prikaz replikacijskog klizanja novosintetiziranog lanca³

Znanstveni tim okupljen na ovom projektu uspio je primjenom sekvenciranja nove generacije (NGS, eng. *Next Generation Sequencing*), razviti mikrosatelitne biljege (SSR, eng. *Simple Sequence Repeats*) za ovu vrstu. Nakon NGS-sekvenciranja sintezom (Bentley i sur. 2008) dobiveno je 796 130 142 visokokvalitetnih očitavanja duljine od 151 bp (parova baza) ili ukupno 120 Gbp (milijardi parova baza) molekula DNA. Sekvenciranje sintezom je provedeno uz pomoć uređaja NovaSeq6000 (Illumina®) u DNA-servisu Macrogen Inc. (Seoul, Južna Koreja). Ovako dobivene sekvence su zbog djelomičnog preklapanja (eng. *paired-end sequencing*) spojene (eng. *DNA assembly*) bioinformatičkim alatima u gotovo sedam milijuna duljih sekvenci. Dodatnim filtriranjem ovako dobivenih sekvenci, izdvojeno je 56 sekvenci DNA s mikrosatelitnim motivom za dizajniranje PCR-početnica.

1.4. Određivanje informativnosti mikrosatelitnih biljega i genetička raznolikost populacija

Informativnosti mikrosatelitnih biljega najčešće se procjenjuje se na temelju: broja uočenih alela (N_a), zapažene (H_o) i očekivane (H_E) heterozigotnosti, informacijskog sadržaja polimorfizma (PIC), odstupanja istraživanog lokusa od Hardy-Weinbergove ravnoteže te na prisutnosti ili odsutnosti nul-alela. S druge strane, prilikom utvrđivanja genetičke raznolikosti unutar i između populacija upotrebom mikrosatelitnih biljega obično se izračunavaju alelna bogatstvo (N_{ar}), broj jedinstvenih alela (N_{pr}), zapažena heterozigotnost (H_o), očekivana

heterozigotnost ili genetička raznolikost (H_E), koeficijent križanja u bliskom srodstvu (F_{IS}), indeks genetičke diferencijacije (F_{ST}) te postojanje genetičkog uskog grla.

Broj uočenih alela i zapažena heterozigotnost (H_O , eng. *observed heterozygosity*) ili udio heterozigota u analiziranim populacijama određuju se jednostavno prebrojavanjem nakon provedene kapilarne elektroforeze. Očekivana heterozigotnost (eng. *expected heterozygosity*, H_E) ili genetička raznolikost predstavlja udio jedinki u populaciji koje bi bile heterozigotne nakon jedne generacije nasumične oplodnje. Očekivana heterozigotnost se najčešće izračunava pomoću nepristrane formule prema Neiu (Nei i sur. 1979):

$$H_E = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^I p_i^2 - \frac{H_O}{2n} \right)$$

gdje je:

n – veličina uzorka,

p_i – učestalost alela i u populaciji,

I – ukupan broj alela,

H_O – zapažena heterozigotnost.

Informacijski sadržaj polimorfizma (PIC , eng. *Polymorphism Information Content*) predstavlja mjeru broja i učestalosti alela na nekom lokusu (Botstein i sur. 1980), procjenjuje se na temelju sljedeće jednadžbe:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^I p_i^2 - 2 \sum_{i=j+1}^I p_i^2 \sum_{j=1}^{i-1} p_j^2$$

gdje je:

p_i – učestalost alela i ,

$p_i^2 \times p_j^2$ – umnožak kvadratne učestalosti za svaki par alela,

I – ukupan broj alela.

Koeficijent križanja u bliskom srodstvu (F_{IS} , eng. *inbreeding coefficient*) je mjerilo odstupanja neke populacije od Hardy-Weinbergove ravnoteže, a izračunava se prema formuli:

$$F_{IS} = 1 - \frac{H_O}{H_E}$$

gdje je:

H_O – zapažena heterozigotnost,

H_E – očekivana heterozigotnost.

Ako je koeficijent križanja u bliskom srodstvu jednak nuli, populacija je u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Negativna F_{IS} vrijednosti upućuje na višak heterozigota, dok F_{IS} vrijednost veća od nule ukazuje na nedostatak heterozigota. Najčešći razlog nedostatka heterozigota u populaciji je visok stupanj oplodnje u bliskom srodstvu. Signifikantnost odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže može se utvrditi X^2 testom, Fisherovim egzaktnim testom te neparametrijski pomoću permutacija ili algoritma Markovljevih lanaca (Markov Chain; MC).

Postojanje nul-alela se utvrđuje na temelju broja i učestalosti alela. Naime, moguće je nasumično kreirati genotipove u skupinama iste veličine kao i analizirana populacija. Zapaženi genotipovi se zatim mogu usporediti s raspodjelom nasumično stvorenih genotipova na temelju učestalosti alelna-specifičnih homozigota (Van Oosterhout i sur. 2004). Jednolika raspodjela suviška homozigota po svakom alelu predstavlja znak postojanja nul-alela.

Alelna bogatstvo je broj alela u populaciji kada bi broj jedinki unutar različitih populacija u istraživanju bio jednak (El Mousadik, 1996). Izračunava se prema sljedećoj jednadžbi:

$$N_{ar} = \sum_{i=1}^{n_i} \left[1 - \frac{\binom{2N - N_i}{2n}}{\binom{2N}{2n}} \right]$$

gdje je:

N – broj uzorkovanih jedinki,

$2N$ – broj uzorkovanih alela,

N_i – broj alela i u populaciji,

n – broj poduzorkovanih jedinki (veličina najmanjeg uzorka u analizi),

$2n$ – broj poduzorkovanih alela.

Aleli koji se mogu pronaći u samo jednoj od svih istraživanih populacija nazivaju se jedinstvenim ili privatnim alelima (N_{pa}).

Indeks genetičke diferencijacije F_{ST} (Wright, 1931) je mjerilo smanjenja heterozigotnosti u populaciji uzrokovano razlikama u frekvenciji alela u subpopulacijama, a nastaje zbog smanjenog prijenosa gena između subpopulacija i genetičkog drifta. Upotrebljava se kao mjera populacijske diferencijacije. Ako je vrijednost $F_{ST} = 0$, nema genetičke diferencijacije među podpopulacijama. Potpuno suprotno tome, ako je $F_{ST} = 1$ onda govorimo o potpunoj genetičkoj diferencijaciji. Indeks genetičke diferencijacije izračunava se prema formuli:

$$F_{ST} = 1 - \frac{H_S}{H_T}$$

gdje je:

H_S – prosječna očekivana heterozigotnost subpopulacija,

H_T – očekivana heterozigotnost populacije.

Genetičko usko grlo (eng. *genetic bottleneck*) je termin koji se odnosi na gubitak genetičke raznolikosti uslijed naglog smanjenja brojnosti populacije. Populacije koje su nedavno prošle kroz genetičko usko grlo pokazuju manju genetičku raznolikost od one koja se očekuje u slučaju ravnoteže mutacija i genetskog pomaka (eng. *mutation-drift equilibrium*). Populacije koje su prošle kroz genetičko usko grlo zbog efekta genetskog pomaka gube rijetke alele. Tako se alelna raznolikost smanjuje brže od očekivane heterozigotnosti pa prividno dolazi do suviška očekivane heterozigotnosti u odnosu na onu koja se očekuje u populaciji konstantne veličine i jednakog broja alela. Na temelju zapaženih alelnih učestalosti u analiziranoj populaciji moguće je izračunati očekivanu heterozigotnost, pod pretpostavkom da je populacija u ravnoteži mutacija i drifta to jest, da u svojoj nedavnoj prošlosti nije prošla kroz genetičko usko grlo. Očekivana heterozigotnost u stanju ravnoteže mutacija i pomaka (H_{EQ}) može se zatim usporediti s utvrđenom očekivanom heterozigotnošću (H_E) istraživane

populacije. Ukoliko je $H_E > H_{EQ}$, u analiziranoj populaciji postoji suvišak heterozigotnosti što je znak da je populacija prošla kroz genetičko usko grlo (Greguraš, 2013).

1.5. Mjerila genetičke udaljenosti i grafički prikaz utvrđenih odnosa

Najčešće upotrebljavano mjerilo udaljenosti između jedinki na temelju mikrosatelitnih biljega je genetička udaljenost temeljem udjela zajedničkih alela (eng. *Proportion of Shared Alleles Distance*, DPSAM) (Bowcock i sur. 1994), koja se izračunava prema sljedećoj formuli:

$$D_{SA} = -\ln \left(\frac{\sum_{l=1}^L s}{2L} \right)$$

gdje je:

s – broj zajedničkih alela,

L – broj mikrosatelitnih lokusa.

Za izračunavanje genetičke udaljenosti između populacija na temelju alelnih učestalosti, postoji veći broj mjerila koja se obično dijele na evolucijska i geometrijska mjerila udaljenosti. Od geometrijskih mjerila udaljenosti najčešće se koristi Cavali-Sforza i Edwardsova preinačena tetivna udaljenost (Cavalli-Sforza i Edwards, 1967), koja se izračunava prema formuli:

$$D_{CHORD}^2 = \frac{4 \left(\sum_{l=1}^L \sum_{a=1}^A \sqrt{p_{al1} p_{al2}} \right)}{\sum_{l=1}^L A_l - 1}$$

gdje je:

D_{CHORD} - tetivna udaljenost između populacije 1 i 2,

p_{al1} - učestalost alela a lokusa l u populaciji 1,

a – alel,

A – ukupni broj alela,

I – lokus,

L – ukupan broj lokusa.

Multivarijatne metode se često koriste u svrhu grafičkog prikaza genetičkih odnosa na temelju matrica udaljenosti dobivenih primjenom mjerila genetičkih udaljenosti između jedinki i/ili populacija. Istraživane jedinke ili populacije se mogu prikazati u obliku stabla i/ili u koordinatnom sustavu. Prikaz u obliku stabla omogućuju različiti algoritmi kao što su metoda po Fitchu i Margoliashu (Fitch i Margoliash, 1967) i Neighbor Joining metoda (Saitou i Nei, 1987). Metoda po Fitch i Margoliashu upotrebljava ponderiranu metodu najmanjih kvadrata za grupiranje na temelju genetičke udaljenosti. Faktorijalna analiza korespondencije (eng. *Factorial Correspondence Analysis*) je multivarijatna metoda koja odnose među jedinka i/ili populacijama prikazuje u koordinatnom sustavu. Cilj ove analize je pronaći kompozitne osi dobivene kombinacijom alela, a koje objašnjavaju dio ukupne opažene inercije tablice. Na taj se način jedinke nanose na dvije složene osi koje optimiziraju razlike između analiziranih jedinki koristeći prosječnu inerciju predefiniranih skupina (Dvorski, 2020).

1.6. Bayesova analiza populacijske strukture

Bayesova analiza populacijske strukture ima za cilj utvrditi optimalan broj skupina u svrhu razvrstavanja jedinki u genetički diferencirane skupine pretpostavljajući Hardy-Weinbergovu razvnotežu kao i ravnotežu vezanosti gena (eng. *linkage equilibrium*) unutar svake skupine (Pritchard i sur. 2000). Analiza se temelji na Bayesovom teoremu:

$$P(H|D) = \frac{P(D|H)P(H)}{P(D)}$$

gdje je:

$P(H|D)$ – posteriorna vjerojatnost hipoteze H istinita uz dane podatke D ,

$P(D|H)$ – uvjetna vjerojatnost podatka D uz danu hipotezu H ,

$P(H)$ – priorna vjerojatnost hipoteze H ,

$P(D)$ – marginalna vjerojatnost podatka D ,

D – multilokusni genotipovi jedinki u analizi.

Nakon što se odredi optimalan broj skupina K , određuje se pripadnost jedinki pojedinim skupinama izračunom udjela genoma svake pojedine jedinke, koji potječe iz određene skupine, odnosno izvorne populacije. Pretpostavlja se postojanje 1 do N skupina K te se za svaku hipotezu provede odgovarajući broj neovisnih prohoda (eng. *run*). Svaki se prohod sastoji od velikog broja ponavljanja (npr. 200 000) tijekom perioda zagrijavanja lanca (eng. *burn-in*), dok se podatci o posteriornoj vjerojatnosti podataka prikupljaju tijekom ponavljanja (npr. 1 000 000) algoritma Markovljevog lanca Monte Carlo (eng. *Markov Chain Monte Carlo*). Usporedbom posteriornih vrijednosti podataka za svaku vrijednost K (Pritchard i sur. 2000) te izračunom stope promjene posteriornih vrijednosti ΔK između uzastopnih vrijednosti K , moguće je odabrati najvjerođostojnije hipoteze, a jedinke pridružiti pojedinim skupinama.

$$\Delta K = \frac{L_{K-1} + L_{K+1} - 2 \times L_K}{sd_K}$$

gdje je:

L_K – prosječna posteriorna vrijednost podataka $[\ln P(X|K)]$ broja skupina K izračunata na temelju više prohoda,

L_{K-1} – prosječna posteriorna vjerojatnost podataka $[\ln P(X|K)]$ broja skupina $K-1$,

L_{K+1} – prosječna posteriorna vjerojatnost podataka $[\ln P(X|K)]$ broja skupina $K+1$,

sd_K – standardna devijacija posteriornih vrijednosti podataka za broj skupina K (Greguraš, 2013).

2. CILJ RADA

Ovim diplomskim radom želi se utvrditi kvaliteta i primjenjivost 12 novorazvijenih mikrosatelitnih lokusa dalmatinskog buhača u budućim populacijsko-genetičkim istraživanjima. Nakon što se provede PCR-umnožavanje lokusa na odabranim uzorcima, statističkom obradom dobivenih podataka izračunat će se informacijski sadržaj polimorfizma, alelno bogatstvo, zapažena i očekivana heterozigotnost te moguća prisutnost nul-alela. Nadalje, provesti će se populacijsko-genetička analiza 98 jedinki iz pet prirodnih populacija kako bi se utvrdila njihova genetička strukturiranost i varijabilnost, moguća prisutnost genetičkog uskog grla i/ili naglog širenja populacija te razina križanja u bliskom srodstvu.

3. MATERIJALI I METODE

3.6. Biljni materijal

Biljni materijal za molekularnu analizu je sakupljen s 98 jedinki u ukupno pet prirodnih populacija dalmatinskog buhača (Tab. 2.). Sakupljeni mladi listovi su odmah na terenu pohranjeni u plastične vrećice sa silika-gelom i kroz nekoliko dana dopremljeni u Laboratorij za filogeniju i molekularnu sistematiku Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka PMF-a Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 2. Geografska pozicija istraživanih populacija dalmatinskog buhača (BIH – Bosna i Hercegovina, CG – Crna Gora, HR – Hrvatska).

Lokalitet	Oznaka populacije	Geografska dužina (decimalni °)	Geografska širina (decimalni °)
Dugi otok (HR)	P1	43.94	15.14
Korčula (HR)	P2	42.95	17.12
Srd (HR)	P3	42.65	18.11
Trebinje (BIH)	P4	42.72	18.30
Lovćen (CG)	P5	42.37	18.88

3.7. Izolacija ukupne stanične DNA

Izolacija ukupne genomske DNA provedena je upotrebom izolacijskog kompleta GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich®). Ukupna stanična DNA svake istraživane jedinke izolirana je iz 25 do 30 mg silika-gel osušenih listova.

1. Izvagano biljno tkivo stavljeno je u plastičnu epruvetu od 2 mL (Safe Lock Eppendorf®) u koju je dodana čelična kuglica (5 mm) za usitnjavanje. Usitnjavanje je provedeno u uređaju Tissue Lyser (Qiagene®) na 30 Hz/s, 1 minutu.
2. Nakon homogenizacije na usitnjeno biljno tkivo dodano je 350 µL otopine A i 50 µL otopine B te je homogenat kratko izmiješan na vrtložnoj miješalici (GVLab- Gilson®).
3. Homogenat je nakon toga inkubiran na 65 °C kroz 10 minuta uz povremeno miješanje na vrtložnoj miješalici.
4. U svaki uzorak je dodano 130 µL *Precipitation solution* otopine, uzorci su promiješani na vrtložnoj miješalici te inkubirani na - 20 °C tijekom sedam minuta.
5. Homogenat je potom 5 minuta centrifugiran pri brzini od 20 000 g (centrifuga Hettich® MIKRO 200).

6. Na membranu *GenElute Filtration* kolone preneseno je 700 μ L supernatanta te je centrifugirano 5 minuta na 20 000 g.
7. Nakon centrifugiranja filtratu je dodano 700 μ L *Binding solution* otopine i promiješano je invertiranjem epruvete. Dodano je 500 μ L *Column preparation solution* otopine na *GenElute MiniPrep Binding* membranu te je centrifugirano 1 minutu na 20 000 g.
8. Nakon centrifugiranja filtrat je bačen te je na tako pripremljenu *GenElute MiniPrep Binding* membranu dodano 700 μ L filtranog homogenata lisnog tkiva pomiješanog s *Binding solution* otopinom te je centrifugirano 1 minutu na 20 000 g. Nakon toga, ovaj postupak je ponovljen još jednom kako bi se kroz kolonu provukao sav preostali homogenata lisnog tkiva pomiješanog s *Binding solution* otopinom.
9. *GenElute MiniPrep Binding* membrana je prenesena u novu epruvetu od 2 mL te je dodano 500 μ L *Wash solution* otopine i centrifugirano 1 minutu na 20 000 g.
10. Filtrat je bačen, a novih 500 μ L *Wash solution* otopine je dodano na *GenElute MiniPrep Binding* kolonu te je centrifugirano 3 minute na 20 000 g. Filtrat je bačen, a *GenElute MiniPrep Binding* membrana je prebačena u novu epruvetu od 2 mL i otvorena ostavljena 5 minuta.
11. Na ovako osušenu *GenElute MiniPrep Binding* membranu dodano je 100 μ L *Elution solution* otopine (zagrijane na 65 °C), inkubirano je 5 minuta kao bi se membrana dobro natopila te je centrifugirano 1 minutu na 20 000 g.
12. *GenElute MiniPrep Binding* membrana je odbačena, a u epruveti je ostala otopina ukupne genomske DNA.
13. Do daljnjih analiza izolirana DNA je pohranjena na - 20 °C.

3.8. Umnožavanje mikrosatelitnih lokusa lančanom reakcijom polimerazom i detekcija alela

Prije umnožavanja mikrosatelitnih lokusa izmjerena je koncentracija izoliranih DNA pomoću spektrofotometra NanoPhotometer P300 (Implen®). Na istom uređaju su izmjerene apsorbancije uzoraka na 260 i 280 nm te je određen omjer 260/280. Ako je ovaj omjer bio između 1.6 i 2.0, izolati DNA su smatrani dovoljno čistim od proteinskih ostataka i kao takvi su upotrijebljeni za umnožavanje mikrosatelitnih lokusa lančanom reakcijom polimerazom.

Lančanom reakcijom polimerazom umnoženo je 12 mikrosatelitnih lokusa. Nazivi mikrosatelitnih lokusa, sekvence početnica, očekivane duljine umnoženih fragmenata i ponavljajući motivi DNA navedeni su u Tablici 3.

PCR otopina za umnožavanje mikrosatelitnih lokusa za jedan uzorak ukupnog volumena 20 μ L imala je sljedeći sastav:

- 9.3 μ L H₂O (sterilizirana, deionizirana)
- 2.0 μ L 10 \times PCR pufer (TAKARA[®])
- 1.6 μ L dNTP (TAKARA[®])
- 1,0 μ L PCR-početnice F (na 5' - kraju florescencijska oznaka Fam, Ned, Vic ili Pet)
- 1,0 μ L PCR početnice R
- 0.1 μ L Taq Hs (TAKARA[®])
- 5.0 μ L otopine DNA (c = 1 μ g/mL)

Umnožavanje mikrosatelitnih SSR regija lančanom reakcijom polimerazom provedeno je u uređaju ProFlex PCR System (Applied Biosystems[®]) prema programu:

- inicijalni korak denaturacije: 5 minuta na 94 °C,
- 5 ciklusa ponavljanja tri temperature: 45 sekundi na 94 °C, 30 sekundi na 60 °C (uz snižavanje temperature u svakom od preostala 4 ciklusa za 1 °C), 90 sekundi na 72 °C,
- 25 ciklusa ponavljanja tri temperature: 45 sekundi na 95 °C, 30 sekundi na 55 °C, 90 sekundi na 72 °C,
- završni korak elongacije od 8 minuta na 72 °C.

Ovako pripremljeni PCR-uzorci poslani su na detekciju kapilarnom elektroforezom na uređaju ABI3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems[®]) u DNA servisu Macrogen Europe (Amsterdam, Nizozemska). Nakon kapilarne elektroforeze rezultati svih analiziranih uzoraka bili su vidljivi u obliku .fsa podataka.

Tablica 3. Nazivi mikrosatelitnih lokusa, ponavljajući SSR motivi i očekivane duljine umnoženih SSR lokusa u parovima baza (bp).

Lokus	Ponavljajući motiv	Raspon duljina PCR-fragmenata (pb)
TcUniZg005	(AC)8	202-206
TcUniZg006	(GA)10	204-256
TcUniZg008	(GT)11	94-122
TcUniZg009	(CA)11	81-97
TcUniZg012	(CA)10	224-264
TcUniZg013	(TA)8	194-244
TcUniZg014	(TG)12	202-212
TcUniZg017	(TA)10	242-258
TcUniZg019	(TA)8	93-107
TcUniZg023	(AC)9	229-235
TcUniZg032	(CAT)8	91-109
TcUniZg038	(TTG)6	132-144

3.9. Statistička analiza

Nakon provedene genotipizacije, provedena je statistička obrada podataka u dva koraka. U prvom koraku, kako bi se potvrdila primjenjivost novorazvijenih mikrosatelitnih biljega u budućim istraživanjima, provedena je generalna karakterizacija umnoženih lokusa na cjelokupnom uzorku od 98 jedinki. U drugom koraku su uzorci jedinki raščlanjeni na prirodne populacije, a zatim je provedena statistička analiza s naglaskom na uobičajenim populacijsko-genetičkim parametrima.

Karakterizacija 12 odabranih mikrosatelitnih lokusa provedena je uz pomoć računalnog programa Cervus v.3.0.7. (Marshall i sur. 1998). Kao ulazna tablica pripremljen je csv. dokument s podacima o veličini umnoženih alela za svaki pojedini lokus i jedinku. Upotrebom naredbe *Allele frequency analysis* provedena je analiza na razini pojedinog lokusa, dok je cjelokupni set od 98 uzoraka tretiran kao jedinstvena populacija. Ovakvim pristupom za svaki lokus su dobivene vrijednosti sljedećih parametara: broj alela (N_a), zapažena heterozigotnost (H_O), očekivana heterozigotnost (H_E) i informacijski sadržaj polimorfizma (PIC). Isto tako, za svaki lokus je provjereno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže te utjecaj prisutnost nul-alela na izračunate parametre.

Nakon provedene analize na razini pojedinih lokusa, pristupilo se provedbi populacijsko-genetičke analize na razini uzorkovanih populacija. Za utvrđivanje osnovnih parametara, očekivane i zapažene heterozigotnosti (H_O i H_E), kao i uz njih povezane razine

križanja u bliskom srodstvu (F_{IS} , eng. *inbreeding coefficient*), upotrijebljena je online verzija računalnog programa „Genepop“ (Raymond i sur. 1995, Rousset i sur. 2008). Za dobivanje vrijednosti traženih parametara, upotrijebljena je naredba *Using allele identity* unutar odjeljka *Option 5. Basic Information, Fis and gene diversities*, dok je za utvrđivanje razine signifikantnosti utvrđenih F_{IS} vrijednosti, upotrijebljena naredba *Global test: Heterozygote deficiency/excess* unutar *Option 1. Hardy Weinberg Exact Tests* odjeljka.

Za utvrđivanje broja privatnih alela (N_{pr}) u analiziranim populacijama u MS Excel sučelju primijenjen je računalni paket GenAlEx 6.5 (Peakall i sur. 2012) i unutar njega naredba *Allelic Patterns/Private Alleles List* unutar *Frequency-Based* odjeljka.

Alelna bogatstvo (N_{ar}) je izračunato pomoću R paketa PopGenReport (Adamack i Gruber, 2014). Obzirom da PopGenReport zahtijeva ulazni dokument u genind tipu, za njegovu konstrukciju upotrijebljen je R paket AdeGenet uz naredbu *df2genind*. Kao ulazni dokumenti za konstrukciju željenog genind dokumenta upotrijebljen je txt. dokument s očitanim vrijednostima umnoženih alela te dva zasebna .csv dokumenta. Prvi .csv dokument je sadržavao popis analiziranih jedinki, dok je u drugom bila definirana pripadnost jedinki pojedinim populacijama.

R paket hierfstat (Goudet, 2005) je upotrijebljen za izračunavanje F_{ST} vrijednosti između svih parova populacija kao i za razinu njihove statističke signifikantnosti. Za PopGenReport pripremljen genind dokument trebalo je konvertirati naredbom *genind2hierfstat* u odgovarajući hierfstat format. Izračunavanje F_{ST} vrijednosti provedeno uz naredbu *pairwise.WCfst*, dok je za izračunavanje signifikantnosti zadana naredba *boot.ppfst(file, nboot = 1000, quant = c(0.05, 0.95))*.

Za utvrđivanje prisutnosti genetičkog uskog grla ili nagle ekspanzije populacije upotrebljen je računalni program Bottleneck v. 1.2.02 (Piry i sur. 1999). Algoritam programa se bazira na usporedbi zapažene heterozigotnosti (H_O) i pretpostavljane heterozigotnosti u stanju ravnoteže mutacija i genetskog pomaka (H_{EQ}). Prilikom izračuna pretpostavljen je model postupnih mutacija u 70 % slučajeva, a model beskonačnog broja alela u 30 % uz provedbu 1000 iteracija (Cornuet i Luikart, 1996).

Genetička udaljenost između populacija je određena na temelju preinačene tetivne udaljenosti (Cavalli-Sforza i Edwards, 1967, Felsenstein, 2004). Dobivena matrica genetičke udaljenosti poslužila je za izradu nezakorijenjenog stabla pomoću metode po Fitchu i

Margoliashu (Fitch i Margoliash, 1967), a pouzdanost pojedinih grananja na stablu utvrđena je pomoću metode bootstrap (Felsenstein, 1985). Za dobivanje matrice genetičke udaljenosti i za izradu stabla upotrebljeni su podprogrami SEQBOOT, GENDIST FITCH i CONSENSE programskog paketa PHYLIP ver. 3.6b (Felsenstein, 2004).

Faktorijalna analiza korespondencije (FCA, eng. *Factorial Correspondence Analysis*) je provedena uz pomoć programa Genetix 4.05 (Belkhir i sur. 2004).

Bayesova analiza populacijske strukture provedena je pomoću računalnog programa STRUCTURE (Pritchard i sur. 2000). Broj pretpostavljenih skupina bio je od 1 do 5 ($K = 1 - 5$) te je za svaku hipotezu provedeno 10 neovisnih prohoda (eng. *run*). Svaki se prohod sastojao od 200 000 ponavljanja tijekom razdoblja zagrijavanja lanca (eng. *burn-in*). Podaci o posteriornoj vjerojatnosti podataka prikupljeni su tijekom 1 000 000 ponavljanja algoritma Markov Chain Monte Carlo uz pretpostavku modela koji dozvoljava mješovito podrijetlo jedinki (eng. *admixture model*) i korelirane alelne učestalosti bez uključivanja prethodnih informacija o populacijskoj pripadnosti pojedinih jedinki. Kako bi se odredio broj genetičkih skupova koji najbolje odgovara podacima, rezultati STRUCTURE analize su obrađeni računalnim programom STRUCTURE HARVESTER v0.6.92 (Earl and vanHoldt, 2012).

4. REZULTATI

4.6. Detekcija i svojstva mikrosatelitnih biljega

Analizom 12 mikrosatelitnih lokusa (Tab. 4.) na 98 jedinki dalmatinskog buhača iz pet prirodnih populacija (Dugi otok, Korčula, Srđ, Trebinje, Lovćen) uspješno je identificirano 96 mikrosatelitnih alela. Broj alela se kretao od 3 (Tc005) do 19 (Tc006). Vrijednosti *PIC*-a oscilirale su od 0.394 (Tc023) do 0.835 (Tc005) s prosječnom vrijednosti od 0.608. Osam mikrosatelitnih biljega je pokazalo visoku informativnu vrijednost (*PIC* vrijednost > 0.70), tri umjerenu (0.40 – 0.70) te jedan slabu (Tc023). Zapažena heterozigotnost kretala se od 0.296 (Tc005) do 0.745 (Tc008, Tc012), a očekivana od 0.461 (Tc13) do 0.856 (Tc008). Tri od 12 istraživanih mikrosatelitnih biljega pokazali su signifikantno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže te vjerojatnu prisutnost nul-alela (Tc005, Tc009, Tc23).

Tablica 4. SSR lokus, ukupan broj alela (N_a), informacijski sadržaj polimorfizma (*PIC*), zapažena i očekivana heterozigotnost, odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže, prisutnost nul-alela za 12 mikrosatelitnih lokusa.

Lokus	N_a	<i>PIC</i>	H_o	H_E	<i>HWE</i>	$F_{(Null)}$
Tc005	3	0.415	0.296	0.485	**	0.2631
Tc006	19	0.805	0.735	0.826	NS	0.0607
Tc008	14	0.835	0.745	0.856	NS	0.0695
Tc009	7	0.732	0.571	0.767	*	0.1474
Tc012	12	0.686	0.745	0.731	NS	-0.0171
Tc013	6	0.416	0.357	0.461	NS	0.1211
Tc014	5	0.541	0.469	0.590	NS	0.1162
Tc017	9	0.706	0.622	0.738	NS	0.0801
Tc019	7	0.679	0.663	0.726	NS	0.0501
Tc023	4	0.382	0.327	0.463	*	0.1807
Tc032	5	0.420	0.469	0.462	NS	-0.0341
Tc038	5	0.679	0.571	0.731	NS	0.1218

N_a = broj alela; *PIC* = Informacijski sadržaj polimorfizma; H_o = zapažena heterozigotnost; H_E = očekivana heterozigotnost *HWE* = Hardy-Weinberg ravnoteža; $F_{(Null)}$ = prisutnost nul-alela

4.7. Genetička raznolikost prirodnih populacija

Rezultati unutarpopulacijske raznolikosti svake populacije dalmatinskog buhača prikazani su u Tablici 5. Najniža vrijednost prosječnog broja alela po lokusu (N_{ar}) utvrđena je za populaciju Dugi otok (2.936), a najveća za populaciju Trebinje (4.701). Najveći broj jedinstvenih alela zabilježen je za populaciju Trebinje (9), a najmanji za populaciju Dugi otok (2). Populacija Dugi otok imala je isto tako najmanju zapaženu (0.496) i očekivanu

heterozigotnost (0.474), dok je populacija Trebinje imala najveću zapaženu (0.598), a populacija Lovćen očekivanu heterozigotnost ili genetičku raznolikost (0.587). Značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže s pozitivnom F_{IS} vrijednošću utvrđeno je za populaciju Lovćen ($F_{IS} = 0.094$, $P = 0.01 - 0.05$). Signifikantan nedostatak očekivane heterozigotnosti (H_E) u odnosu na pretpostavljenu heterozigotnosti u stanju ravnoteže mutacija i genetskog pomaka (H_{EQ}) zabilježen je u populaciji Trebinje.

Tablica 5. Mikrosatelitna raznolikost pet prirodnih populacija dalmatinskog buhača.

Populacija	n	N_{ar}	N_{pr}	H_O	H_E	F_{IS}	P	Bottleneck	
								P(E)	P(D)
Dugi otok (HR)	20	2.936	2	0.496	0.474	-0.046	ns	0.288	0.740
Korčula (HR)	19	3.577	4	0.544	0.538	-0.010	ns	0.633	0.395
Srđ (HR)	20	4.320	8	0.581	0.561	-0.034	ns	0.954	0.055
Trebinje (BIH)	20	4.701	9	0.598	0.560	-0.069	ns	0.998	0.003*
Lovćen (CG)	19	4.076	7	0.532	0.587	0.094	*	0.515	0.515

n = veličina uzorka, N_{ar} = prosječan broj alela po lokusu, N_{pr} = broj jedinstvenih alela, H_O = zapažena heterozigotnost, H_E = očekivana heterozigotnost, F_{IS} = koeficijent samooplodnje, P = signifikantnost F_{IS} , Bottleneck P(E) / P(D) = suvišak/nedostatak zapažene heterozigotnosti (H_O) u odnosu na heterozigotnost populacije koja je u ravnoteži mutacija i genetskog pomaka (H_{EQ}).

Rezultati izračuna indeksa genetičke diferencijacije prirodnih populacija dalmatinskog buhača (F_{ST}) prikazani su u Tablici 6. Vrijednosti indeksa F_{ST} za sve parove populacija bile su signifikantne pri $P < 0.01$. Najveća vrijednost F_{ST} zabilježena je između populacija Dugi otok i Lovćen (0.299), dok je najmanja zabilježena između populacija Srđ i Trebinje (0.064).

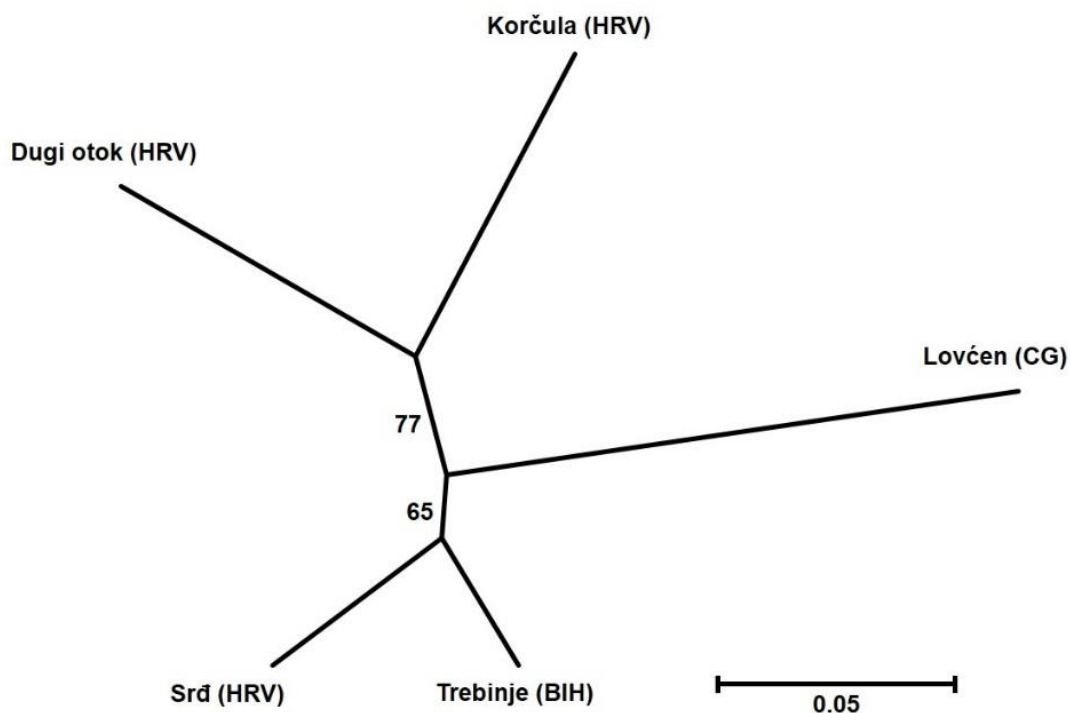
Tablica 6. Matrica vrijednosti F_{ST} između prirodnih populacija dalmatinskog buhača.

Populacija	Dugi otok/ (HR)	Korčula	Srđ	Trebinje	Lovćen
Dugi otok (HR)		**	**	**	**
Korčula (HR)	0.188		**	**	**
Srđ (HR)	0.250	0.208		**	**
Trebinje (BIH)	0.200	0.166	0.064		**
Lovćen (CG)	0.299	0.245	0.162	0.201	

Signifikantnost F_{ST} : ** $0.001 < P(F_{ST}) < 0.01$

4.8. Srodstveni odnosi i genetička struktura istraživanih populacija

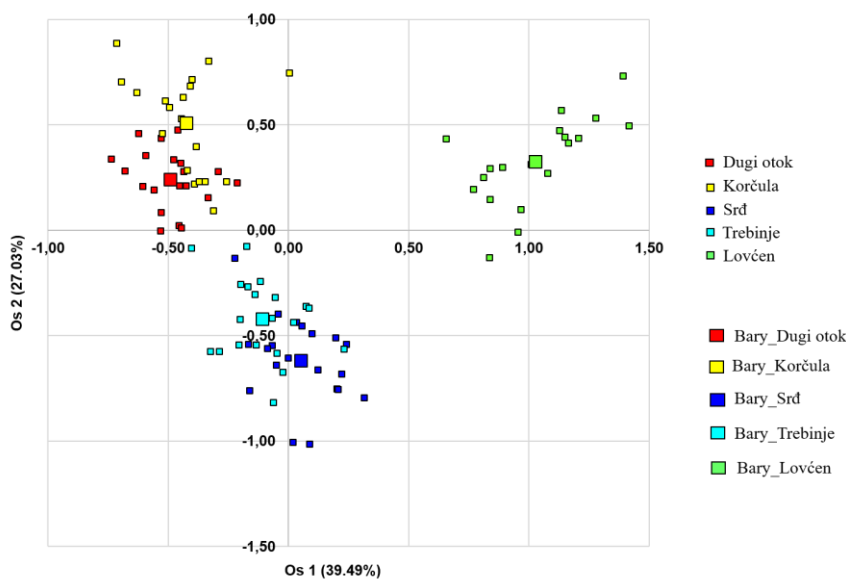
Nezakorijenjeno srodstveno stablo populacija po Fitch-Margoliashu je izrađeno na temelju matrice Cavalli-Sforza i Edwards genetičkih udaljenosti (Sl. 10.).



Slika 10. Nezakorijenjeno Fitch-Margoliash stablo srodnosti prirodnih populacija dalmatinskog buhača izrađeno na temelju matrice genetičke udaljenosti Cavalli-Sforza i Edwards

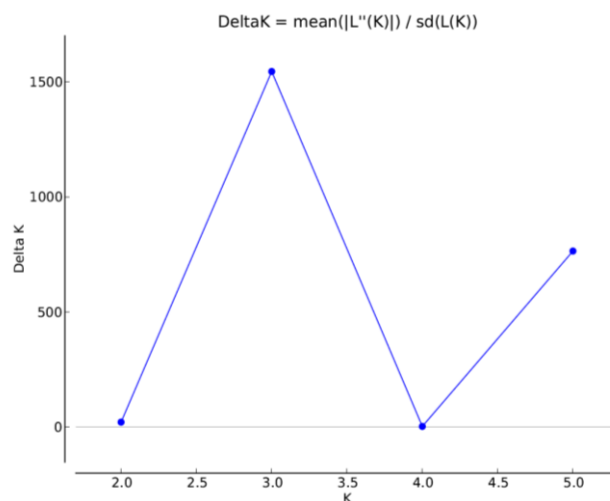
Na stablu je vidljivo grupiranje jedinki u tri skupine. Prvu skupinu čine dvije otočne, u istraživanju najsjevernije populacije, Dugi otok i Korčula, a drugu skupinu dvije južne populacije Srđ, Trebinje. Populacija Lovćen srodstveno je odvojena od populacija Srđ i Trebinje, ali ipak srodnija njima nego otočnim populacijama.

Faktorijalnom analizom korespondencije (FCA) prikazani su odnosi između 98 jedinki dalmatinskog buhača (Sl. 11.). Prve dvije osi objašnjavaju gotovo 62.52 % ukupne varijance, s tim da prva os iznosi 39.49 %, a druga 27.03 % ukupne varijance, ukazujući na veliku razinu raznolikosti između i unutar istraživanih populacija. Prva os razdvaja jedinke populacije Lovćen od svih ostalih populacija. Druga os razdvaja jedinke populacija Srđ i Trebinje od ostalih populacija.



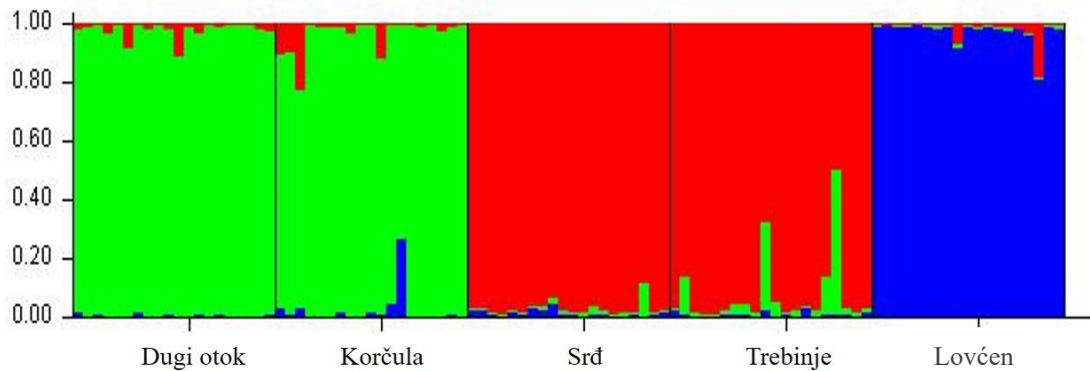
Slika 11. Prikaz odnosa između 98 jedinki iz pet prirodnih populacija dalmatinskog buhača u koordinatnom sustavu određenom prvim dvjema osima faktorijalne analize korespondencije (FCA). Pojedinačni genotipovi prikazani su malim kvadratima, a baricentri populacija i skupine kultivara većim kvadratima

Bayesovom analizom populacijske strukture utvrđen je optimalan broj skupina, uz prethodnu pretpostavku (hipoteze) da postoji od jedne do 6 skupina (Sl. 12.). Na temelju usporedbe posteriornih vjerojatnosti podataka [$\ln P(X|K)$] za svaku vrijednost K i izračunom vrijednosti ΔK utvrđena je najveća vrijednost za $K = 3$.



Slika 12. Vrijednosti ΔK dobivene računalnim programom STRUCTURE HARVESTER na temelju rezultata Bayesove analize unutar programa STRUCTURE

Kod $K = 3$, podjele s najvišim ΔK , vidljiva je podjela u skupinu koju čine jedinke iz populacija Dugi otok i Korčula te kao kod Fitch-Margoliash srodstvenog stabla, skupinu Srđ i Trebinje te zasebne populacije Lovćen. (Sl. 13.). Unutar svih populacija jedinke nisu potpuno genetički uniformne, nego je vidljiv veći ili manji genetički upliv iz drugih populacija. Drugim riječima, potvrđen je protok gena među istraživanim populacijama.



Slika 13. Struktura izvornih populacija na temelju Bayesove analize pomoću programa STRUCTURE pri $K = 3$. Svaka je jedinka predstavljena stupcem dok su sabrane populacije predstavljene pravokutnikom koji sadržava onoliko stupaca koliko je jedinki sabrano iz te populacije. Boja odgovara postotku genoma (Q) jedinke koji potječe iz određene izvorne populacije

5. RASPRAVA

Premda je dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* /Trev. / Sch. Bip.) izvor najčešće korištenog prirodnog insekticida (Jeran i sur. 2020), vrlo je malo genetičkih podataka dostupno o ovoj vrsti, kako u znanstvenim publikacijama (Khan i sur. 2017, Mlinarec i sur. 2019, Yamashiro i sur. 2019) tako i u javnim bazama podataka (npr. NCBI, *National Center for Biotechnology Information*⁴). U NCBI bazama podataka kao što su Blast, Nucleotide, i Genome dostupno je samo 381 zapis nukleotida dalmatinskog buhača što je zanemarivo u usporedbi s drugim ekonomski vrijednim mediteranskim vrstama (npr. bosiljak /25216 zapisa/ ili maslina /470493 zapisa/). Tako mala količina genetičkih podataka upućuje na potrebu intenziviranja istraživanja na ovoj ekonomski vrijednoj, ali isto tako endemičnoj i zaštićenoj vrsti.

Molekularni biljezi vrijedan su alat u studijama raznolikosti i programima oplemenjivanja bilja. U procjeni genetičke raznolikosti prirodnih populacija dalmatinskog buhača do sada su upotrebljavani samo AFLP (Vos i sur. 1995) molekularni biljezi (Grdiša i sur. 2014). Ovo istraživanje je omogućilo grubu procjenu genetičke raznolikost prirodnih populacija dalmatinskog buhača uzduž jadranske obale, ali su dominantna svojstva AFLP biljega (ne razlikovanje dominantnih homozigotnih i heterozigotnih jedinki) ograničavajuća za njihovu primjenu u detaljnoj analizi genetičke raznolikosti i strukture populacija, a posebno u programima oplemenjivanja bilja. Budući da bi postojanje sustava kodominantnih molekularnih biljega specifičnih za dalmatinski buhač otklonio sva ograničenja koja imaju dominantni biljezi, razvoj kodominantnih molekularnih biljega bio je jedan od glavnih ciljeva istraživanja projekta Hrvatske zaklade za znanost: “Genetska osnova insekticidnog potencijala dalmatinskog buhača (*Tanacetum cinerariifolium* /Trev. / Sch. Bip.)”. Poslije PCR-testiranja ovako dizajniranih početnica na uzorcima DNA pet jedinki dalmatinskog buhača iz različitih populacija izabrano je 12 mikrosatelitnih biljega (=lokusa) (Tc005, Tc006, Tc008, Tc009, Tc012, Tc013, Tc014, Tc017, Tc019, Tc023, Tc032, Tc038) koji su pokazali lako očitavanje PCR-fragmenata (=alela) i polimorfnost. Iako SSR biljezi, za razliku od dominantnih molekularnih biljega, imaju poželjna svojstva za populacijsko-genetička istraživanja i mapiranje gena kao što su višealelna varijacija, reproduktivnost, slučajna raspodjela kroz genom i kodominantno nasljeđivanje (Cai i sur. 2013), bez njihovog testiranja u barem jednoj populaciji nije moguće biti siguran u njihovu informacijsku vrijednost.

U ovom diplomskom radu testirana je informacijska vrijednost 12 izabranih mikrosatelitnih biljega na pet prirodnih populacija. Informacijski sadržaj polimorfizma (*PIC*) varirao je od 0.382 (TcUniZg023) do 0.835 (TcUniZg008) s prosjekom od 0.608. Pet mikrosatelitnih biljega (TcUniZg006, TcUniZg008, TcUniZg009 i TcUniZg017) s visokom

informativnošću ($PIC > 0.70$) i šest s umjerenom informativnošću ($PIC 0.40 - 0.70$) prošli su test za primjenu u opsežnijim populacijsko genetičkim istraživanjima, dok jedan lokus s izuzetno niskom informacijskom vrijednošću (TcUniZg023) nije prošao ovaj test. Budući da je kod ovog lokusa, ali i kod još dva (Tc005 i Tc009) utvrđeno signifikantno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže i vjerojatna prisutnost nul-alela, niti ova dva lokusa nisu se pokazala prikladna za buduću upotrebu u analizi genetičke raznolikosti i programima oplemenjivanja. Međutim, imajući na umu činjenicu da testnu populaciju predstavljaju jedinke iz pet populacija koje pokrivaju veliki dio areala vrste, uočeni nedostatak heterozigota kod lokusa TcUniZg009 s visokom PIC vrijednošću mogao bi biti više zbog strukture populacije nego zbog pojave nul-alela. U skladu s tim preporuka je u budućim istraživanjima isključiti samo dva lokusa: TcUniZg005 i TcUniZg023.

Kod preostalih deset dovoljno informativnih mikrosatelitnih lokusa opažena heterozigotnost je varirala od 0.357 (TcUniZg013) do 0.745 (TcUniZg008) s prosjekom 0.547, dok je očekivana heterozigotnost varirala od 0.461 (TcUniZg013) do 0.856 (TcUniZg008) s prosjekom od 0.653. Zabilježena visoka prosječna vrijednost uočene i očekivane heterozigotnosti kod ovih lokusa vjerojatno je povezana s generativnom reprodukcijom i stranooplodnjom kod višegodišnjih zeljastih biljaka u koje spada i vrsta *T. cinerariifolium* (Baruca Arbeiter i sur. 2021).

Premda je u ovom diplomskom radu analizirano samo pet prirodnih populacija uočena je veza između genetičke raznolikosti i srodnosti istraživanih populacija s geografskom rasprostranjenošću. Dvije geografski najbliže populacije Srđ i Trebinje, po klaster, FCA i Bayesovoj analizi grupiraju se zajedno, populacija Lovćen srodstveno se nastavlja na njih uz jasnu diferencijaciju u skladu s najvećom udaljenošću od mora i posebno s najvišom nadmorskom visinom, dok dvije u analizi najsjevernije populacije formiraju zasebnu srodstvenu skupinu. U skladu s ovim rezultatom su i utvrđeni indeksi genetičke diferencijacije populacija (F_{ST}). Najveća F_{ST} vrijednost zabilježena je među geografski najudaljenijim populacijama Dugi otok i Lovćen (0.299), a najmanja među geografski najbližim populacijama Srđ i Trebinje (0.064). Nadalje, tri najjužnije populacije pokazuju najveću genetičku raznolikost (H_E), najveći prosječni broj alela po lokusu (N_{ar}) te najveći broj jedinstvenih alela (N_{pr}), a sve su to parametri koji ukazuju na refugijalno područje iz kojeg je ova vrsta mogla postepeno migrirati prema sjeveru u zadnjih 11 000 godina nakon zavšetka oledbe. Važno je naglasiti kako ovaj posljednji zaključak treba uzeti s rezervom budući da se temelji na analizi malog broj jedinki i populacija.

Signifikantno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže s pozitivnom F_{IS} vrijednošću utvrđeno je za populaciju Lovćen. Ovakav rezultat ukazuje na manji broj heterozigota u populaciji nego što bi se očekivalo da je populacija u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži, to jest na pojavu izraženog križanja u bliskom srodstvu (eng. *inbreeding*). U budućim istraživanjima dalmatinskog buhača trebalo bi dobro istražiti razne osobine ove populacije (njezinu veličinu, demografski trend, mogući negativan utjecaj čovjeka i sl.) kako bi se odredio točan razlog smanjenog udjela heterozigotnih jedinki. Signifikantno manja vrijednost očekivane heterozigotnosti (H_E) u odnosu na pretpostavljenu heterozigotnosti u stanju ravnoteže mutacija i genetskog pomaka (H_{EQ}) zabilježen je u populaciji Trebinje. Ovaj rezultat ukazuje na ekspanziju ove populacije odnosno na stanje suprotno genetičkom uskom grlu (eng. *genetic bottleneck*). Očito je da se u vrlo kratkom periodu broj jedinki značajno povećao što je rezultiralo i pojavom zamjetnog broja novih alela, dok istovremeno genetski pomak još nije stigao ukloniti većinu tih novonastalih mutacija zbog nedovoljnog broja proteklih generacija. Za očekivati je da će, kada se nagli rast populacije zaustavi, i genetički signal ekspanzije ubrzo iščeznuti.

Postojanje genetičke raznolikosti i strukture pri analizi samo pet prirodnih populacija ukazuje na mogućnost postojanja raznolikosti drugih osobina, pa tako i kemijske raznolikosti unutar ove vrste, odnosno mogućnost pronalaska kemotipova s različitim udjelom sastavnica piretrina. Mogućnost postojanja jedinki s različitim udjelom sastavnica piretrina jako je zanimljivo za programe oplemenjivanja ove vrste. Osim što bi novorazvijeni SSR biljezi mogli uvelike poboljšati proučavanje odnosa genotip i kemotip, oni su jako važan alat za proučavanje genetičke raznolikosti biljaka iz različitih zemljopisnih regija, osobito ako se zna da je najveći uzgoj dalmatinskog buhača i najveća proizvodnja piretrina smještena daleko od prirodnih populacija ove vrste (Kenija, Tanzanija, Ruanda, Tasmanija). Analiza SSR biljezima ne bi samo dala uvid u razliku u genetičkoj raznolikosti prirodnih i uzgojnih populacija, nego bi mogla precizno definirati podrijetlo uzgajanih populacija. Budućom SSR-analizom genetičke varijabilnosti prirodnih populacija dalmatinskog buhača te programima oplemenjivanja moguće je biranim križanjima i različitim drugim tehnikama uvesti gene za otpornost na različite abiotske i biotske čimbenike u uzgojene populacije koje su na njih, zbog smanjene genetičke raznolikosti, osobito osjetljive.

Na kraju je važno naglasiti da novorazvijeni mikrosatelitni biljezi za dalmatinski buhač predstavljaju važan alat konzervacijske biologije u generiranje prijeko potrebnih podataka za učinkovito upravljanje i zaštitu ove endemične i zakonom zaštićene biljne vrste (Schaal i sur. 1998).

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih populacijsko-genetičkih analiza na 12 mikrosatelitnih lokusa na 98 jedinki iz pet prirodnih populacije dalmatinskog buhača može se zaključiti sljedeće:

- 11 mikrosatelitnih biljega dovoljno je informativno za primjenu u opsežnijim populacijsko-genetičkim i oplemenjivačkim istraživanjima,
- uočena je veza između genetičke raznolikosti i srodnosti istraživanih populacija s geografskim položajem istraživanih populacija,
- kod tri najjužnije populacije zabilježena je najveća genetičku raznolikost (H_E), najveći prosječni broj alela po lokusu te najveći broj jedinstvenih alela (N_{pr}), a to bi mogao bit znak nekadašnjih refugija na ovom području,
- signifikantno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže s pozitivnom F_{IS} vrijednošću kod populacije Lovćen ukazuje na smanjeni broj heterozigota u ovoj populaciji uslijed križanja u bliskom srodstvu (eng. *inbreeding*),
- signifikantano manju vrijednost očekivane heterozigotnosti (H_E) u odnosu na pretpostavljenu heterozigotnosti u stanju ravnoteže mutacija i genetskog pomaka (H_{EQ}) kod populacije Trebinje ukazuje na ekspanziju ove populacije,
- novorazvijeni mikrosatelitni biljezi za dalmatinski buhač predstavljaju važan alat za utvrđivanje podrijetla uzgajanih populacija, u budućim programima oplemenjivanja, ali i u konzervacijskoj biologiji kroz generiranje prijeko potrebnih podataka za učinkovito upravljanje i zaštitu ove endemične i zakonom zaštićene biljne vrste.

7. ZAHVALA

Od srca se zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Zlatku Liberu na ogromnoj strpljivosti, razumijevanju, nesebičnoj pomoći, utrošenom vremenu i svim dragocjenim savjetima.

Veliko hvala doc. dr. sc. Ivanu Radosavljeviću na pomoći pri statističkoj obradi podataka i susretljivosti.

Zahvaljujem i svojoj obitelji, a posebno mami Snježani, tati Jelisiju i braći Nenadu i Davidu, koji su uvijek bili tu za mene i vjerovali u moj uspjeh čak i kada sama nisam.

Hvala i voljenim članovima šire obitelji Ani, Mariji, Vitomiru, Tomici, Marini, Damjanu i Lauri na mnogo strpljenja i razumijevanja, a najviše hvala Sandri na pomoći s najtežim ispitima. Hvala Ana-Mariji i Nikolini za svaku toplu riječ.

Posebnu zahvalu dugujem mojem Filipu. Hvala na beskonačnom ohrabrenju i radovanju svakom mom uspjehu.

Veliko hvala i dugogodišnjim prijateljicama, Luciji i Jeleni koje su bile moj oslonac u svakom trenutku. Hvala vam drage moje što ste bile uz mene kada je bilo najteže, ali i najljepše.

Također, zahvaljujem kolegici Petri, Ani i Klari bez kojih studij ne bi bio isti. Hvala vam drage cure što ste mi bile potpora i uljepšale studentske dane.

8. POPIS LITERATURE

1. Abad M.J., Bermejo P., Villar A. 1995. An approach to the genus *Tanacetum* L. (Compositae): Phytochemical and pharmacological review. *Phytotherapy Research* 9, 79-92.
2. Adamack A.T., Gruber B. 2014. PopGenReport: simplifying basic population genetic analyses in R. *Methods in Ecology and Evolution* 5(4), 384-387.
3. APG IV. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *APG IV. Botanical Journal of the Linnean Society* 161, 10-121.
4. Bakarić P. 2005. Buhač-prirodni insekticid. *Gospodarski list* 17, 41-45.
5. Baruca Arbeiter A., Hladnik M., Jakše J., Bandelj D. 2021. First set of microsatellite markers for immortalé (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don): A step towards the selection of the most promising genotypes for cultivation. *Industrial Crops and Products* 162, 113-298.
6. Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. 2004. Genetix 4.05, logiciel sous Windows pour la géométrie des populations. Laboratoire Genome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
7. Bentley D.R., Balasubramanian S., Smith A.J. 2008. Accurate Whole Human Genome Sequencing using Reversible Terminator Chemistry. *Nature* 456(7218), 53-59.
8. Bhat B. K. 1995. Breeding Methodologies Applicable to Pyrethrum. In: *Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology and Uses* (JE Casida, GB Quistad, eds Oxford University Press, New York, 67-94.
9. Botstein D., White R.L., Sholnick M., David R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32, 314-331.
10. Bowcock A.M., Ruiz - Linares A., Tomfohrde J., Minch E., Kidd J.R., Cavalli-Sforza L.L., 1994. High resolution human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368, 455-457.
11. Brewer J. K. 1968. Flowering and seedsetting in pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.). A review. *Pyrethrum Post* 9(4), 18-21.
12. Cai G., Leadbetter C.W., Muehlbauer M.F., Molnar T.J., Hillman B.I. 2013. Genome-Wide Microsatellite Identification in the Fungus *Anisogramma anomala* Using Illumina Sequencing and Genome Assembly. *Plos One* 8(11).
13. Cavalli-Sforza L.L., Edwards A.W.F. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution* 32, 550-570.
14. Cornuet J.M., Luikart G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144, 2001-2014.
15. Crombie L. 1995. Chemistry of Pyrethrins. Chapter 8 in 'Chemistry of Pyrethrins in the Book "Pyrethrum Flowers – Production, Chemistry, Toxicology and Uses'. Ed. J. E. Casida and G. B. Quistad. Oxford University Press.
16. Davies T.G.E., Field L.M., Usherwood P.N.R., Williamson M.S. 2007. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life* 59, 151-162.
17. Dvorski M. 2019. Usporedba genetičke raznolikosti između i unutar kontinentalnih i primorskih populacija pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Hrvatskoj. Diplomski rad, PMF, Sveučilište u Zagrebu.
18. Earl D.A., van Holdt B.M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4, 359-361.

19. El Mousadik A., Petit R.J. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* (L) Skeels) endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.* 92, 832-839.
20. Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenesis: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
21. Felsenstein J. 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5, 164-166.
22. Felsenstein J. 2004. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
23. Fitch W.M., Margoliash E. 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science* 155, 279-284.
24. Frankham R., Ballou J.D., Ralls K., Eldridge M., Dudash M.R., Fenster C.B., Lacy R.C., Sunnucks P. 2017. Genetic management of fragmented animal and plant populations. Oxford University Press, Oxford.
25. Glynne-Jones A. 2001. Pyrethrum. *Pesticide Outlook* 12, 195-198.
26. Goudet J. 2005. hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes* 5, 184-186.
27. Grdiša M. 2011. Morfološka, kemijska i genetska raznolikost dalmatinskog buhača (*Tanacetum cinerariifolium* /Trev. / Schultz Bip.). Doktorski rad. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
28. Grdiša M., Carović-Stanko K., Kolak I., Šatović Z. 2009. Morphological and biochemical diversity of dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip.). *Agriculturae conspectus scientificus* 74(2), 73-80.
29. Grdiša M., Liber Z., Radosavljević I., Carović-Stanko K., Kolak I., Šatović Z. 2014. Genetic Diversity and Structure of Dalmatian Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* Trevir. /Sch./ Bip., Asteraceae) within the Balkan Refugium. *PLoS ONE* 9(8).
30. Greguraš D. 2013. Genetička raznolikost i struktura populacija ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.). Doktorska disertacija, PMF, Sveučilište u Zagrebu.
31. Gruber B., Adamack A.T. 2015. Landgenreport: a new R function to simplify landscape genetic analysis using resistance surface layers, *Molecular Ecology Resources* 15(5), 1172-1178.
32. Hedayat M., Abdi G., Khosh-Khui M. 2009. Regeneration via Direct Organogenesis from Leaf and Petiole Segments of Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Schultz- Bip.). *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science* 6(1), 81-87.
33. Heywood V.H. 1976. *Tanacetum*. In: *Flora Europaea, Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae)*. Volume 4. (TG Tutin, VH Heywood, NA Burges, DM Moore, DH Valentine, SM Walters, DA Webb, ur.). Cambridge University Press, Cambridge, 169-171.
34. Jasprica N. 2015. *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip. In Nikolić T., Milović M., Bogdanović S., Jasprica N. *Endemic plants in Croatian flora*. Alfa d.d., Zagreb, 434-437.
35. Jeran N., Grdiša M., Varga F., Šatović Z., Liber Z., Dabić D., Biošić M. 2020. Pyrethrin from Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./Sch. Bip.): biosynthesis, biological activity, methods of extraction and determination. *Phytochemistry Reviews* (early access).
36. Jombart T. 2008. "adeget: a R package for the multivariate analysis of genetic markers." *Bioinformatics* 24, 1403-1405.

37. Khan S., Upadhyay S., Khan F., Tandon S., Shukla R.K., Ghosh S. 2017. Comparative transcriptome analysis reveals candidate genes for the biosynthesis of natural insecticide in *Tanacetum cinerariifolium*. *BMC Genomics* 18(54).
38. Kolak I., Šatović Z., Rukavina H., Filipaj B. 1999. Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium*). *Sjemenarstvo*. 16(5), 425-440.
39. Kolak I. 1999. Osnove ljekovitog i aromatičnog bilja. Skripta. Zagreb-Mostar
40. Kolak I., Rozić I. 1998. Droge i metabolite ljekovitog, aromatičnog i medonosnog bilja. Praktikum II. Zagreb-Mostar.
41. Lybrand D. B., Xu H., Last R.L., Pichersky E. 2020. How Plants Synthesize Pyrethrins: Safe and Biodegradable Insecticides. *Trends in Plant Science*.
42. Marshall T.C., Slate J., Kruuk L.E.B., Pemberton J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7, 639-655.
43. Mlinarec J., Skuhala A., Jurković A., Malenica N., McCann J., Weiss-Schneeweiss H., Bohanec B., Besendorfer V. 2019. The Repetitive DNA Composition in the Natural Pesticide Producer *Tanacetum cinerariifolium*: Interindividual Variation of Subtelomeric Tandem Repeats. *Frontiers Plant Science* 10, 613.
44. Moxon E.R., Wills C. 1999. DNA Microsatellites: Agents of Evolution? *Scientific American* 280, 72-77.
45. Nei M., Wen-Hsiung L. 1979. "Mathematical Model for Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonucleases". *PNAS*. 76(10), 5269-73.
46. Nikolić T. (2013): Sistematska botanika. Raznolikost i evolucija biljnog svijeta. Alfa d.d. Zagreb, 786-795.
47. Nikolić T., Milović M., Bogdanović S., Jasprica N. (2015): Endemi u hrvatskoj flori. Alfa d.d., Zagreb, 434-436.
48. Peakall R., Smouse P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
49. Piry S., Luikart G., Cornuet J.M. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* 90(4), 502-2503.
50. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
51. Radosavljević I. 2012. Izolacija i karakterizacija mikrosatelitnih biljega ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L., Lamiaceae). Doktorska disertacija, PMF, Sveučilište u Zagrebu.
52. Raymond M., Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248-249. (<https://genepop.curtin.edu.au/>)
53. Rousset F. 2008. Genepop'007: a complete reimplement of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8, 103-106.
54. Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
55. Schaal B.A., Hayworth D.A., Olsen K.M., Rauscher J.T., Smith W.A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* 7 (4), 465-474.
56. Spindler M. 1983. DDT: Health aspects in relation to man and risk/benefit assessment based thereupon. In: Gunther F.A., Gunther J.D. (eds) *Residue Reviews*. Residue Reviews 90. Springer, New York.

57. Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535-538.
58. 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.
59. Wright S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16, 97-159.
60. Yamashiro T., Shiraishi A., Satake H., Nakayama K. 2019. Draft genome of *Tanacetum cinerariifolium*, the natural source of mosquito coil. *Scientific Reports* 9(18249).
61. Zieg R., Zito S., Staba E. 1983. Selection of High Pyrethrin Producing Tissue Cultures. *Planta Medica*, 48(06), 88-91.

Izvori s web stranica:

1. Narodne novine. 2013. Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama. NN 144/2013 https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2013_12_144_3086.html (pristupljeno 22. 4. 2021.)
2. Sc Johnson Professional. Raid® earth OPTIONS® Automatic Advanced Multi-Insect ControlSystem. <https://www.scjohnsonprofessional.com/enau/products/brands/raid/raid-earth-options> (pristupljeno 22. 4. 2021.)
3. Frozen Evolution. <https://www.frozevolution.com/vi224multiplicationcanalsobeproductnucleotideslip-ped-strand-mispairing-mechanism> (pristupljeno 22. 4. 2021.)
4. National Center for Biotechnology Information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (pristupljeno 14. 3. 2021.)

9. ŽIVOTOPIS

Sara Laura Šarančić rođena je 24. travnja 1997. godine u Zagrebu. Pohađala je OŠ Brezovica. Srednjoškolsko obrazovanje stekla je u Zagrebu u 1. gimnaziji, pohađajući opći smjer, u periodu od 2012. do 2016. godine. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu (integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije; smjer: nastavnički) upisuje 2016. godine. Odlično piše, čita i govori engleski jezik, a vrlo dobro njemački jezik. U mlađoj dobi intenzivno se bavila sportom što je doprinijelo razvoju upornosti i dosljednosti. Biološko područje interesa joj je botanika, a u budućnosti bi se voljela baviti znanošću ovog područja.