

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet

Ivan Bakšić i Ana Dudaš

**Značajke i evolucija 5S rDNA u vrstama iz roda *Pulsatilla*
(Mill.)**

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod vodstvom prof. dr. sc. Višnje Besendorfer i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018./2019.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Važnost ribosomske DNA (rDNA) u filogeniji.....	1
1.2. Modeli evolucije multigenskih porodica	1
1.3. Značajke roda <i>Pulsatilla</i>	2
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	6
3. MATERIJALI I METODE	7
3.1. Materijal	7
3.1.1. Biljni materijal.....	7
3.2. Metode.....	8
3.2.1. Izolacija genomske DNA iz biljaka roda <i>Pulsatilla</i>	8
3.2.2. Umnožavanje PCR-om, kloniranje i sekvenciranje.....	8
3.2.3. Bioinformatička analiza sekvenci	9
3.2.4. Metode korištene u filogenetskoj analizi.....	9
4. REZULTATI	11
4.1. Rezultati umnažanja 5S rDNA	11
4.2. Karakterizacija jedinica ponavljanja 5S rDNA	12
4.3. Unutarvrсна varijabilnost jedinica ponavljanja 5S rDNA	16
4.4. Filogenetska analiza	19
5. RASPRAVA	24
5.1. Raznolikost jedinica ponavljanja 5S rDNA između ispitivanih vrsta roda <i>Pulsatilla</i>	24
5.2. Evolucija 5S rDNA multigenske porodice u rodu <i>Pulsatilla</i> objašnjena modelom nastanka i nestanka gena	25
5.3. 5S rDNA kao molekularni biljeg u filogenetskoj analizi vrsta iz roda <i>Pulsatilla</i>	27
5.4. Porijeklo aloploidnih vrsta iz roda <i>Pulsatilla</i>	28
6. ZAKLJUČAK	31
7. ZAHVALE	32
8. POPIS LITERATURE	33
9. SAŽETAK	38
10. SUMMARY	39

1. UVOD

1.1. Važnost ribosomske DNA (rDNA) u filogeniji

U većini viših eukariota lokusi gena za 5S ribosomsku RNA (rRNA) organizirani su u velikom broju uzastopnih ponavljanja na jednom ili više kromosoma. U biljkama broj kopija ovih gena može iznositi između 10 000 i 75 000 te se oni u genomu nalaze odvojeno od porodice gena za 35S rRNA (Campell i sur., 1992.). Svaka od ponavljajućih jedinica 5S rDNA sastoji se od kodirajuće sekvence dužine 120 parova baza te od međugenske netranskribirajuće razmaknice (NTS). Geni za 5S rRNA vrlo su konzervirani među svim eukariotima što ih čini dobrim biljezima za filogenetske analize na višim taksonomskim razinama, dok su NTS-i vrlo varijabilni što se tiče slijeda nukleotida i dužine među vrstama. Budući da ne spadaju u kodirajuće sljedove, oni predstavljaju područja u genomu koja vrlo brzo evoluiraju te akumuliraju insercije, delecije i supstitucije nukleotida. Njihove su sekvence, stoga, različite između blisko srodnih vrsta te se istraživanjima pokazalo kako su pogodan izvor biljega specifičnih za vrstu ili populaciju i određivanje filogenetskih odnosa na nižim taksonomskim razinama (Kitamura i sur., 2001.; Volkov i sur., 2001.; Matyašek i sur., 2002.; Garcia i Kovařík, 2013.; Xie i sur., 1994.; Kellogg i Appels, 1995.; Cronn i sur., 1996.). Koristeći 5S rDNA kao molekularni biljeg u filogenetskim analizama, do sada su razjašnjeni evolucijski odnosi između brojnih biljnih vrsta uključujući vrste iz srodnog roda *Anemone* (Mlinarec i sur., 2012a.). Isti autori su upotrebom ovih biljega uspjeli utvrditi porijeklo aloploidnih vrsta *Anemone baldensis* i *Anemone multifida* (Mlinarec i sur., 2012b.).

1.2. Modeli evolucije multigenskih porodica

Multigenske porodice su one čiji geni potječu od zajedničkog pretka, a imaju istu ili sličnu funkciju te nukleotidni slijed. Proučavanjem porodice globinskih gena (Ingram, 1961.), razvijen je koncept evolucije multigenskih porodica koji se naziva model divergentne evolucije. Naime, smatralo se kako se geni u predačkim vrstama dupliciraju, a zatim divergiraju i evoluiraju neovisno jedan o drugom te stječu nove, slične funkcije. Proučavanjem gena za rRNA u rodu *Xenopus*, ustanovljeno je kako su navedeni geni u genomu organizirani u velikom broju uzastopnih ponavljanja. Također je primijećeno kako su sekvence međugenskih regija spomenutih gena sličnije unutar jedne vrste nego što su između dvije srodne vrste (Brown i sur., 1972.). Budući da se navedeno opažanje nije moglo objasniti

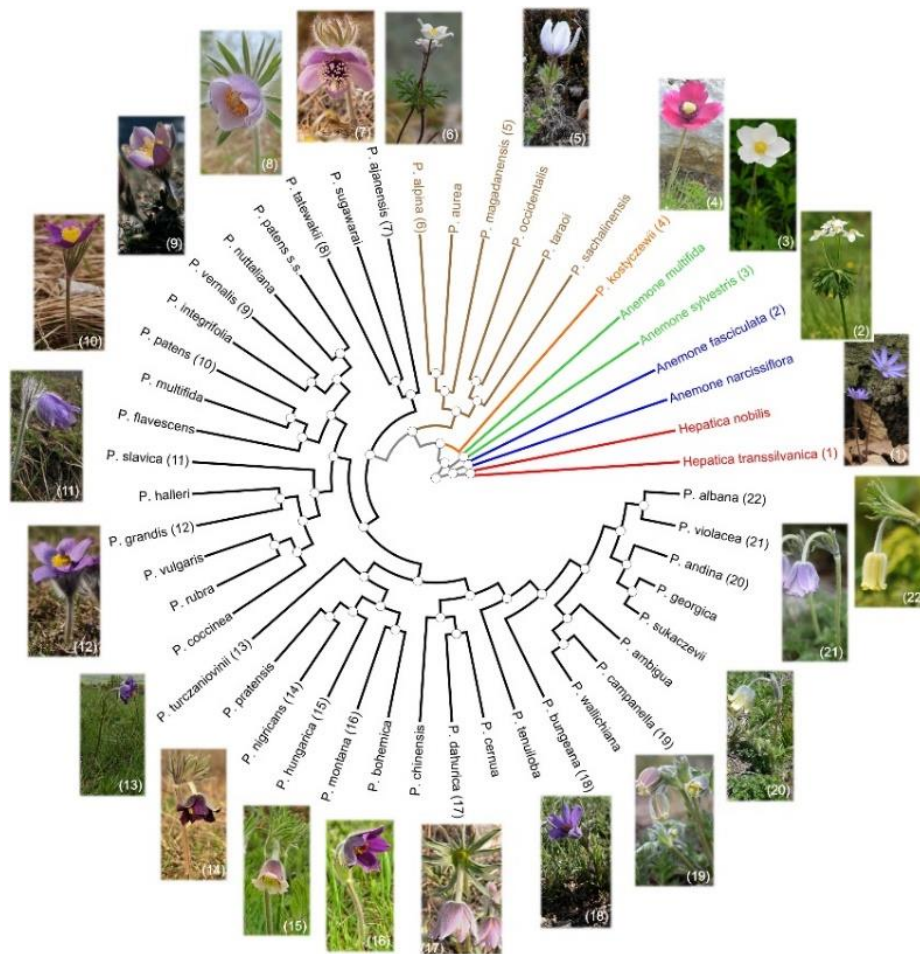
modelom konvergentne evolucije, uveden je novi model usklađene evolucije (Liao, 1999.). Ovaj model objašnjava kako geni iz iste multigenske porodice evoluiraju usklađeno, a ne zasebno te se mutacije koje nastanu u jednom od ponavljajućih gena prenose i na ostale uslijed nesimetričnih crossing overa i genske konverzije što dovodi do homogeniziranja gena unutar genske porodice. Ukoliko se lokusi gena nalaze na više od jedne kromosomske lokacije, kao što je slučaj kod ponavljajućih jedinica 5S rDNA, moguće je da, zbog interkromosomske izmjene, dođe do usklađene evolucije gena na različitim lokacijama, no ukoliko se interkromosomska izmjena ne događa, geni na različitim kromosomima mogu evoluirati neovisno jedni o drugima. To dovodi do pojave gena 5S rRNA specifičnih za pojedini kromosom (Volkov i sur., 2001.; Son i sur., 2012.). Drugi model kojim je objašnjena evolucija multigenskih porodica koja se nije mogla objasniti modelom usklađene evolucije, kao kod porodice gena MHC (*Major Histocompatibility Complex*), je model nastanka i nestanka gena (engl. *birth-and-death evolution*, Nei, 1992.). Ovaj model objašnjava kako novi geni nastaju duplikacijom na različitim mjestima u genomu nakon čega međusobno nalikuju jedan na drugog, ali tijekom evolucije neki se geni zadrže dugo vremena te su oni sličniji predačkim genima nego što bi trebali biti po modelu usklađene evolucije, dok se neki deletiraju ili postaju inaktivni uslijed delecijских mutacija zbog čega se pojedini geni iz predačkih vrsta ne pojavljuju u vrstama koje su iz njih evoluirale. Snažni selektivni pritisak tako dovodi do toga da se sekvence različitih gena iz jedne porodice mogu razlikovati između, ali i unutar vrste. Dva obilježja u genomu koja ukazuju na evoluciju multigenskih porodica po navedenom modelu je prisutnost pseudogena koji nastaju inaktivacijom postojećih gena te obrazac grupiranja gena između vrsta (Nei i Rooney, 2005.; Eirín-López i sur., 2012.). Ipak, istraživanja su pokazala kako brojne multigenske porodice ne pokazuju obilježja isključivo jednog modela evolucije, već su tijekom njihove evolucijske prošlosti oba modela došla do izražaja. Neki od primjera takvih porodica jesu porodica gena *Hsp* u rodu *Caenorhabditis* (Nikolaidis i Nei, 2004.), porodica visoko konzerviranih gena za amilaze u rodu *Drosophila* (Zhang i sur., 2003.), ali i geni 5S rRNA u skupini *Anemoneae* (Mlinarec i sur., 2016.).

1.3. Značajke roda *Pulsatilla*

Sase (*Pulsatilla* Mill.) rod je unutar porodice žabnjaka (*Ranunculaceae*) te spada u skupinu *Anemoneae*, zajedno s rodом *Anemoneae* (Tamura, 1993.). Ova podjela temeljena je na morfološkim razlikama unutar porodice *Ranunculaceae*, dok novija istraživanja temeljena na molekularnoj filogenetici upućuju na smještaj *Pulsatilla* kao sekcije unutar roda *Anemoneae*

(Hoot i sur., 2012.; Jiang i sur., 2017.; Zhang i sur., 2015.). Međutim, u svim je spomenutim radovima ustanovljeno kako je *Pulsatilla* zasebna monofiletska skupina te će se unutar ovog rada sekcija *Pulsatilla* navoditi kao zaseban rod koji ima četrdesetak vrsta. Starost porodice procjenjuje se na 108 milijuna godina (Wang i sur., 2016.) dok se odvajanje roda *Pulsatilla* od *Anemone* s.s. dogodilo prije 24,6 milijuna godina (Sramkó i sur., 2019.). Rasprostranjenost roda ograničena je na sjevernu Zemljinu polutku, poglavito na subarktička i planinska područja te područja umjerene klime (Aichele i Schwegleb, 1957.). Čak 29 vrsta iz roda *Pulsatilla* karakteristične su za azijski kontinent dok je u Europi rasprostranjeno 9 vrsta. U Sjevernoj Americi rasprostranjene su samo dvije vrste roda *Pulsatilla*. Većina vrsta iz ovoga roda preferira vlažne uvjete u proljeće, sušne uvjete ljeti, dok će zimu preživjeti ispod debelog sloja snijega. Vrste imaju ekonomski značaj prvenstveno u medicini, gdje se sekundarni biljni metaboliti poput laktona, saponina, amonina, tanina, te razna ulja koriste za liječenje bolesti (Grey-Wilson, 2014.). Unutar navedenog roda nalaze se četiri vrste aloploidnog podrijetla, *P. vulgaris*, *P. grandis*, *P. styriaca* i *P. rubra* (Tamura, 1995.). Na temelju dosadašnjih istraživanja pretpostavlja se da njihove diploidne roditeljske vrste potječu od loza vrsta *P. turczaninowii* i *P. alpina*. (Sramkó i sur., 2019.).

Do sada je izvršena nekolicina molekularno-filogenetskih istraživanja na određenim vrstama roda *Pulsatilla*. Neka od njih bazirana su na nrITS sekvencijskim analizama (Sun i sur., 2014.; Zetsche, 2004.), dok su druga temeljena na varijabilnosti unutar plastidne DNA (Ronikier i sur., 2008.). U radu Wang i sur. (2016.) za filogenetsku analizu korištene su plastidne sekvence i jedna jezgrina sekvenca, dok je kombinacija plastidnih biljega i nrITS sekvenci u radu Jiang i sur. (2017.) dovela do razjašnjenja opsežnijih filogenetskih odnosa unutar roda. Međutim, do sada najveću filogenetsku rezoluciju unutar roda *Pulsatilla* omogućio je rad Sramkó i sur. (2019.) u kojem je opisan filogenetski odnos 36 vrsta iz roda *Pulsatilla* i osam podvrsta na temelju dvije jezgrine i tri plastidne regije (Slika 1).



Slika 1. Filogenetetski odnos između vrsta iz roda *Pulsatilla*. Preuzeto iz rada Sramkó i sur. (2019.).

Ujedno je predložena nova podjela vrsta unutar roda *Pulsatilla* pomoću kojeg su klasificirane vrste korištene u ovom radu (Tablica 1).

Tablica 1. Pregled najnovije klasifikacije roda *Pulsatilla* prema Sramkó i sur. (2019.).

Subgenus <i>Kostyczewianae</i> (Aichele & Schweg.) Grey-Wilson species: <i>P. kostyczewii</i> (Korosh.) Juz.
Subgenus <i>Preonanthus</i> (DC.) Juz. Section <i>Preonanthus</i> (DC.) Spach species: <i>P. alpina</i> Schrank, <i>P. alba</i> Rchb.*, <i>P. aurea</i> (N.Busch) Juz., <i>P. magadanensis</i> Khokhryakov & Vorosch, <i>P. scherfelii</i> (Ullep.) Skalický* Section <i>Preonanthopsis</i> Zämelis & Paegle species: <i>P. taraoi</i> (Makino) Takeda ex Zämelis & Paegle, <i>P. nipponica</i> (Takeda) Ohwi*, <i>P. occidentalis</i> Freyn, <i>P. sachalinensis</i> Hara
Subgenus <i>Pulsatilla</i> Section <i>Tatewakiana</i> Tamura species: <i>P. tatewakii</i> Kudô, <i>P. sugawarai</i> Miyabe & Tatew., <i>P. ajanensis</i> Regel & Tiling Section <i>Pulsatilla</i> Series <i>Patentes</i> (Aichele & Schweg.) Juz. ex Tamura species: <i>P. integrifolia</i> (Miyabe & Tatew.) Vorosch., <i>P. patens</i> (L.) Mill. [incl. subsp. <i>flavescens</i> (Zucc.) Zämelis, subsp. <i>multifida</i> (E.Pritz.) Zämelis, subsp. <i>nuttalliana</i> (DC.) Grey-Wilson], <i>P. vernalis</i> Mill. Series <i>Pulsatilla</i> species: <i>P. vulgaris</i> Mill. [incl. cultivar. 'coccinea', cultivar. 'rubra'], <i>P. grandis</i> L., <i>P. halleri</i> Willd. [incl. subsp. <i>slavica</i> (Reuss) Zämelis, subsp. <i>styriaca</i> (Pritz.) Simonk.], <i>P. rubra</i> (Lam.) Delarbre Section <i>Semicampanaria</i> Zämelis & Paegle Series <i>Pratenses</i> (Aichele & Schweg.) Juz. ex Tamura species: <i>P. pratensis</i> (L.) Mill. [incl. subsp. <i>bohemica</i> Skalicky, subsp. <i>hungarica</i> Soó, subsp. <i>nigricans</i> (Störck) Zämelis], <i>P. montana</i> Rchb., <i>P. turczaninowii</i> Krylov & Serg. Series <i>Semicampanaria</i> Grey-Wilson species: <i>P. cernua</i> (Thunb.) Bercht. & J.Presl, <i>P. chinensis</i> (Bunge) Regel, <i>P. dahurica</i> (Fisch. ex DC.) Spreng., <i>P. tongkangensis</i> Y.N. Lee & T.C. Lee* Series <i>Albanae</i> (Aichele & Schweg.) Juz. ex Tamura species: <i>P. albana</i> Bercht. & J. Presl, <i>P. andina</i> (Rupr.) Grossh., <i>P. georgica</i> Rupr., <i>P. violacea</i> Rupr., <i>P. ambigua</i> Turcz. ex Pritz., <i>P. campanella</i> Fisch. Ex Regel, <i>P. wallichiana</i> Ulbr., <i>P. tenuiloba</i> (Hayek) Juz., <i>P. sukaczewii</i> Juz.*, <i>P. bungeana</i> C.A.Mey. ex Ledeb., <i>P. armena</i> Rupr.*, <i>P. millefolium</i> Ulbr.*

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj ovoga rada bio je rekonstruirati model evolucije gena 5S rRNA u rodu *Pulsatilla* te potvrditi filogenetske odnose između vrsta iz navedenog roda upotrebom 5S rDNA kao molekularnog biljega. Osim toga, specifični cilj ovog rada bio je, upotrebom istog biljega, odrediti porijeklo aloploidnih vrsta iz roda *Pulsatilla*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Biljni materijal

U ovom radu istraživanja su provedena na 16 vrsta iz roda *Pulsatilla* čija je geografska rasprostranjenost i ploidnost navedena u Tablici 2. U analize je uvrštena i vrsta *Anemone apennina* koja je u filogenetskim istraživanjima korištena kao vanjska skupina. Kao biljni materijal za izolaciju genomske DNA korišteni su osušeni ili svježi listovi.

Tablica 2. Podaci o geografskoj rasprostranjenosti i broju kromosoma analiziranih vrsta iz roda *Pulsatilla*.

Vrsta	Geografska rasprostranjenost	Ploidnost (2n)
<i>Pulsatilla ajanensis</i> Regel & Tiling	Rusija, Magadan, Khasyn, Yablonevyi Pass	
<i>P. albana</i> Bercht. & J. Presl	Azerbajdžan, Xinaliq	16
<i>P. alpina</i> Schrank	Austrija, Kalkmagerrasen, Ötscher	16
<i>P. grandis</i> L.	Slovačka, Zadiel	32
<i>P. halleri</i> Willd.	Italija, Fenestrelle, Forte Serre Marie	32
<i>P. halleri</i> Willd. subsp. <i>slavica</i> (G.Reuss) Zämelis	Slovačka, Terchová	32
<i>P. halleri</i> Willd. subsp. <i>styriaca</i> (Pritz.) Zämelis	Potsdam (vrt)	32
<i>P. magadanensis</i> Khokhryakov & Vorosch.	Rusija, Magadan, Ola lijeva obala rijeke Okse	
<i>P. montana</i> Rchb.	Rumunjska, Cluj-Napoca, Italija, Trst, Monte Spaccato	
<i>P. patens</i> (L.) Mill. subsp. <i>nuttalliana</i> (DC.) Grey-Wilson	Kanada, Yukon, Nacionalni park Vuntut, Black Fox Creek drenaža	
<i>P. patens</i> (L.) Mill. subsp. <i>patens</i>	Rumunjska, Rimetea	16
<i>P. rubra</i> (Lam.) Delarbre	München-Nymphenburg; originalno sakupljene u Francuskoj, Bresse (vrt)	32
<i>P. vernalis</i> Mill.	Austrija, Oberdrauburg, Poljska	
<i>P. violacea</i> Rupr.	Oslo (vrt)	16
<i>P. vulgaris</i> Mill.	Göttingen (vrt)	32
<i>P. vulgaris</i> Mill. 'coccinea'	Göttingen (vrt)	32
<i>Anemone apennina</i> L.	Hrvatska, vrtni materijal iz Botaničkog vrta Sveučilišta u Zagrebu (biljni uzorak skupila Mlinarec J.)	16

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija genomske DNA iz biljaka roda *Pulsatilla*

Izolirana je genomska DNA iz pojedinih vrsta unutar roda *Pulsatilla* te iz vrste *Anemone apennina* koja je kasnije korištena kao vanjska skupina u filogenetskim analizama (Tablica 2). Za izolaciju genomske DNA iz listova biljaka korišten je modificirani CTAB-protokol (Doyle i Doyle, 1987.). Između 1 i 30 mg osušenih listova smrvljeno je u tekućem dušiku te resuspendirano u ligacijskom puferu (2% CTAB, 20 mM EDTA, pH 8, 100 mM Tris-HCl, pH 9 i 1,4 mM NaCl). Nakon inkubacije od najmanje 60 minuta pri 65 °C uzorci su centrifugirani pri 20 000 g u trajanju od 5 minuta. Dobiveni supernatant pomiješan je s jednakim volumenom smjese kloroforma i 3-metil-1-butanola (omjera 24:1), resuspendiran pomoću vorteksa i centrifugiran pri 20 000 g 5 minuta. Postupak je ponovljen te je dodan jednak volumen izopropanola i 0,08 volumena 7,5 M amonijeva acetata. Dobivena otopina inkubirana je najmanje 1 sat pri -20 °C kako bi se iz supernatanta istaložila DNA. Nakon inkubacije slijedilo je petominutno centrifugiranje pri 20 000 g. Dobiveni talog DNA dva je puta ispran 70%-tnim etanolom, osušen na sobnoj temperaturi i otopljen u 40 µL Tris pufera (10 mM, pH 8).

3.2.2. Umnožavanje PCR-om, kloniranje i sekvenciranje

Provedene su PCR reakcije s genomskom DNA u reakcijskoj smjesi volumena 50 µL koja je sadržavala 10 ng DNA kalupa, 25 µL reakcijske mješavine za PCR One Taq Quick Load 2X Master Mix sa standardnim puferom (New England BioLabs Inc., SAD) te 0,4 µM početnica. Prilikom umnožavanja jedinice ponavljanja 5S rDNA iz genomske DNA koristile su se početnice P3 (5'GAGTTCTGATGGGATCCGGTG3') i P4 (5'CGCTTGGGCTAGAGCAGTAC3'). Nakon koraka inicijalne denaturacije na 94 °C u trajanju od 3 minute provedeno je 34 ciklusa koji se sastoje od jednominutne denaturacije na 94 °C, prijanjanja početnica na 54 °C od 10 sekundi te elongacije na 72 °C u trajanju od 30 sekundi. Nakon 34 ciklusa provedena je završna elongacija na 72 °C u trajanju od 20 minuta. Produkti PCR-a razdvojeni su elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu te su iz gela pročišćeni korištenjem komercijalnog kompleta Promega Wizard PCR Preps DNA Purification System slijedeći upute proizvođača (Promega Corp., SAD). Produkti reakcije PCR-a su zatim ligirani u vektor pGEM-T Easy prema uputama proizvođača (Promega Corp., SAD). Elektroporacijom su kompetentne stanice bakterije *Escherichia coli* transformirane plazmidima iz ligacijske smjese. Transformirane bakterijske stanice uzgojene su preko noći

na krutoj hranidbenoj podlozi LB s ampicilinom, X-Gal-om i IPTG-om. Narasle bijele bakterijske kolonije uzgojene su potom preko noći u tekućoj podlozi LB s ampicilinom. Plazmidi sa željenim insertom iz uzgojenih su bakterijskih stanica izolirani upotrebom Wizard Plus SV Minipreps Start-Up komercijalnog kompleta prema uputama proizvođača (Promega Corp., SAD). Sekvenciranje izoliranih plazmida provedeno je upotrebom komercijalnog servisa (Macrogen Inc., Južna Koreja).

3.2.3. Bioinformatička analiza sekvenci

Poravnanje sekvenci ponavljajućih jedinica 5S rDNA napravljeno je upotrebom programa ClustalX, verzija 1.81 (Thompson i sur., 1997.). Sekvence su potom uređene u programu BioEdit verzije 7.2 (Hall, 1999.) te vizualizirane u programu GeneDoc (Nicholas, 1997.). Za određivanje međuvrsne i unutarvrsne raznolikosti sekvenci 5S rDNA korišten je program DnaSP, verzija 5.10.01 (Rozas i sur., 2003.) pomoću kojeg je izračunat udio polimorfničkih nukleotidnih mjesta (p_n) te raznolikost nukleotida (π).

3.2.4. Metode korištene u filogenetskoj analizi

U ovome radu korištena su dva tipa filogenetske analize pri izradi filogenetskog stabla. Prvi pristup filogenetskoj analizi bazirao se na Bayesian pristupu pri izgradnji filogenetskog stabla koji se temelji na pregrađenom skupu podataka korištenom u programu MrBayes v.3.2.6 (Ronquist i sur., 2012.). U ovom su pristupu sekvence ponavljajućih jedinica 5S rDNA poravnane pomoću programa MUSCLE (Edgar, 2004.). Iz poravnatih su sekvenci potom uklonjene one s velikim delecijama. Ostale sekvence dodatno su obrađene pomoću programa BMGE (Criscuolo i Gribaldo, 2010.) kako bi se uklonili neinformativni dijelovi sekvenci. S obrađenim je sekvencama zatim formirano početno stablo pomoću programa PhyML (Guindon i sur., 2005.) koji koristi heurističku metodu za procjenu maksimalne vjerodostojnosti. Inicijalno stablo uneseno je u program MrBayes v.3.2.6 zajedno s pregradama i modelom molekularne evolucije (K80+I+G) koje je preporučio program PartitionFinder v.2.1.1 (Lanfear i sur., 2017.) te je provedena filogenetska analiza. Pored grana navedena je vrijednost vjerodostojnosti kao naknadna vjerojatnost (PP, engl. *posterior probability*). Pouzdanost svake grane određena je proizvoljno, pri čemu vrijednost PP između 50% i 90% predstavlja nisku i srednju vjerodostojnost.

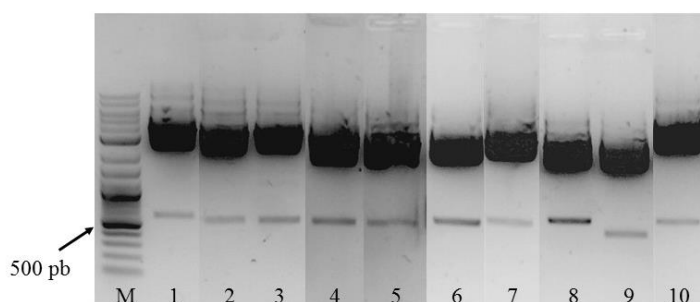
U drugoj filogenetskoj analizi korištena je metoda maksimalne vjerodostojnosti (engl. *Maximum Likelihood method*) baziranoj na modelu Tamura-Nei (Tamura i Nei, 1993.). Dobiveno je konsenzus stablo na temelju 1500 replika (Kumar i sur., 2016.) te kao takvo

predstavlja evolucijsku prošlost analiziranog roda (Kumar i sur., 2016.). Grane koje odgovaraju podjeli dobivenoj kod manje od 50% replika nisu bile uključene u izradu stabla. Pored grana naveden je broj koji označava postotak repliciranih stabala u kojima se takson grupirao u bootstrap testu (Felsenstein, 1985.). Inicijalna stabla za heurističko pretraživanje određena su automatski primjenom Neighbor-Join i BioNJ algoritama na matricu udaljenosti parova koje su prikupljene pomoću Maximum Composite Likelihood pristupa i selekcijom topologije pomoću superiorne log vrijednosti vjerodostojnosti. Pouzdanost svake grane određena je proizvoljno, gdje je vrijednost BS (Bootstrap support) veća ili jednaka 75% okarakterizirana kao „pouzdana“, dok je vrijednost BS manja od 75% označena kao „nepouzdana“. Analizirano je 77 nukleotidnih sekvenci jedinica ponavljanja 5S rDNA. Stablo je ukorijenjeno pomoću vrste *A. apennina* koja je služila kao vanjska skupina. Bilo je ukupno 592 pozicije u konačnom skupu podataka. Evolucijske analize provedene su pomoću programa MEGA 7 (Kumar i sur., 2016.).

4. REZULTATI

4.1. Rezultati umnažanja 5S rDNA

Jedinice ponavljanja 5S rDNA umnožene su upotrebom početnica koje su komplementarne dvjema susjednim kodirajućim regijama tako da su produkti umnažanja 5S rDNA iz genomske DNA sadržavali kodirajuće regije na 5' i 3' – kraju te između njih međugenske netranskribirajuće razmaknice (NTS). Dobiveni produkti PCR-a razdvojeni su elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu (Slika 2). U vrsti *P. alpina* umnoženi su fragmenti koji odgovaraju jedinicama ponavljanja 5S rDNA različitih dužina; jedan fragment dužine nešto veće od 500 parova baza, a drugi otprilike 350 parova baza (pb). U ostalim ispitivanim vrstama bio je umnožen samo jedan fragment, koji je odgovarao jedinicama ponavljanja 5S rDNA nešto dužim od 500 pb. Bioinformatičkom analizom sekvenci određena je točna dužina jedinica ponavljanja 5S rDNA (Tablica 3). U većini istraživanih vrsta dužina jedinice ponavljanja 5S rDNA bila je između 517 i 526 pb pa se te jedinice ponavljanja mogu smatrati tipičnima za rod *Pulsatilla*. Najveća razlika u dužini jedinica ponavljanja 5S rDNA bila je u vrsti *P. alpina* (367-523 pb). U vrstama *P. vulgaris* i *P. styriaca* razlika u dužini jedinica ponavljanja 5S rDNA skoro je upola manja nego u vrsti *P. alpina*, dok kod ostalih vrsta, kod kojih je utvrđena samo jedna varijanta dužine, razlika u dužini iznosi svega nekoliko nukleotida.



Slika 2. Agarozna gel elektroforeza jedinica ponavljanja 5S rDNA dobivenih cijepanjem plazmida s restrikcijskom endonukleazom *EcoRI*. M – marker DNA 1 kb Ladder (New England BioLabs Inc., SAD), 1 – *P. vernalis*, 2 – *P. patens*, 3 – *P. nutalliana*, 4 – *P. ajanensis*, 5 – *P. montana*, 6 – *P. slavica*, 7 – *P. halleri*, 8 i 9 – *P. alpina*, 10 – *P. magadanensis*.

Osim tipičnih jedinica ponavljanja 5S rDNA dobivene su i varijante dužina jedinica ponavljanja 5S rDNA u nekim vrstama (Tablica 3).

4.2. Karakterizacija jedinica ponavljanja 5S rDNA

Unutar jedinica ponavljanja 5S rDNA bioinformatičkom analizom sekvenci otkriveno je kako su 3' i 5' – kodirajuće regije izrazito konzervirane među svim ispitivanim vrstama s rijetkim točkastim mutacijama dok međugenske netranskribirajuće razmaknice (NTS) pokazuju znatno veću varijabilnost u sekvenci i dužini između vrsta. S obzirom na položaj početnica korištenih za umnažanje PCR-om, dužina 5S rDNA genske sekvence bila je kraća za 25 pb (Slika 3). Kodirajuće regije u svim istraživanim vrstama započinju s nukleotidnom sekvencom GGA, a završavaju s CTC (Slika 3). Unutar NTS-a primijećena je očuvanost regulatornih regija gena 5S rRNA. Uzvodno od početka gena nalazi se regulatorna regija TATA koja je važna za početak transkripcije gena 5S rRNA te njena konsensus sekvenca u ispitivanim vrstama roda *Pulsatilla*, kao i kod ostalih vrsta podroda *Anemone*, glasi TGTATATA (Slika 3, podcrtano). Ta se regija u svim ispitivanim vrstama nalazi na poziciji -28 nukleotida. Nizvodno od 5S rRNA gena nalazi se regija za terminaciju transkripcije bogata timinima (Slika 3, podcrtano). Navedene su regulatorne regije pokazale različit stupanj varijabilnosti te je nizvodna regulatorna regija pokazala veću varijabilnost od one uzvodne. Naime, dužina uzvodne regulatorne regije iste je dužine u svim klonovima 16 ispitivanih vrsta, dok ona nizvodne regulatorne regije varira između 28 i 31 pb. Najkraća je u dva klona vrste *P. vulgaris* (Pvul15NTS_a i Pvul13NTS_b), te u jednom klonu vrste *P. vernalis* (Pver3NTS), a najduža kod klonova Pvul15NTS_c i Pver1NTS iz obje spomenute vrste.



Slika 3. Svrnjene sekvence kodirajućih regija 5S rDNA (označeno na slici). Nizvodna regulatorka sekvenka važna za terminaciju transkripcije i uzvodna TATA-regulatorka regija bitna za početak transkripcije gena podcrtnani su na slici.

Unutarvrstna varijabilnost sekvenci ponavljajućih jedinica 5S rDNA prikazana je kao omjer polimorfničkih nukleotidnih mjesta i broja nukleotida u sekvenci (p_n) te kao raznolikost nukleotida (π), a rezultati analize za 76 različitih klonova iz 16 vrsta roda *Pulsatilla* prikazani su u Tablici 3. Među poznatim diploidnim vrstama najveća unutarvrstna p_n vrijednost pokazala se za vrstu *P. alpina*, kod koje ona iznosi 0,2683, te za vrste kojima broj kromosoma do sad nije određen, *P. montana* i *P. vernalis*, čija p_n vrijednost iznosi 0,2793, odnosno 0,2777. Najniže navedene vrijednosti utvrđene su u vrstama *P. patens* i *P. violacea* kod kojih su one iznosile 0,0441, odnosno 0,0345. Znatno veće p_n vrijednosti u odnosu na navedene vrste

pokazuju poliploidne vrste *P. vulgaris* i *P. styriaca*, čije su p_n vrijednosti 0,4750 i 0,3387. Ipak, među poliploidima, vrste *P. halleri* i *P. slavica* pokazuju najniže p_n vrijednosti (0,0305 i 0,0441) te su one svojom vrijednošću bliže onima koje su se pokazale najniže među diploidima nego onima ostalih poliploidnih vrsta. Unutarvrсна raznolikost nukleotida (π) uglavnom odgovara varijabilnosti sekvenci koju je pokazala p_n vrijednost. Kada se izuzmu poliploidne vrste iz serije *Pulsatilla*, najveću π vrijednost (0,2281, 0,2256 i 0,1610) pokazuju vrste *P. montana*, *P. vernalis* i *P. alpina*, dok najmanju pokazuju vrste *P. violacea* i *P. patens* kod kojih je ona iznosila 0,0242, odnosno 0,0225. Poliploidne vrste iz spomenute serije koje pokazuju najveću unutarvršnu vrijednost π (0,1503 i 0,1823) su one koje su pokazivale i najveću p_n vrijednost – *P. vulgaris* i *P. styriaca*. Najniže π vrijednosti među poliploidnim vrstama pokazale su vrste *P. halleri* i *P. slavica* kod kojih navedene vrijednosti iznose 0,0207 i 0,0455.

Istražena je također razina homologije između ponavljajućih jedinica 5S rDNA unutar svake vrste. Homologija sekvenci ponavljajućih jedinica 5S rDNA značajno se razlikuje između različitih ispitivanih vrsta. Najmanja je homologija primijećena u vrsti *P. alpina* kod koje je ona bila između 49% i 98%, a među poliploidnim vrstama najmanju homologiju pokazale su vrste *P. vulgaris* s 64-97% i *P. styriaca* s 65-98%. Kod ostalih vrsta, kao i kod već spomenutih, postotak homologije ponavljajućih jedinica 5S rDNA povezan je s p_n vrijednostima. Naime, porast p_n vrijednosti unutar vrste popraćen je s padom homologije ponavljajućih jedinica 5S rDNA kako kod diploidnih, tako i kod poliploidnih vrsta.

Značajne razlike u udjelu GC baznih parova u jedinicama ponavljanja 5S rDNA nisu primijećene između različitih sekcija i serija unutar roda (Tablica 3). Najveći udio GC baznih parova od 56,92% pokazuje vrsta *P. slavica*, a najmanji vrste iz podroda *Preonanthus*, *P. alpina* i *P. magadanensis*, kod kojih on iznosi 51,94%, odnosno 53,34%, s tim da je najmanji udio GC baznih parova u cijelom rodu *Pulsatilla* opažen u vrsti *P. alpina*.

Tablica 3. Taksoni, njihov broj kromosoma, broj jedinki i klonova za analizu 5S rDNA, udio GC baznih parova u jedinicama ponavljanja 5S rDNA, raspon dužine i varijante dužina jedinica ponavljanja 5S rDNA, broj 5S rDNA mjesta u genomu te pripadne π i p_n vrijednosti.

* taksonomska klasifikacija preuzeta iz Sramkó i sur. (2019.)

Taksonomska klasifikacija*			Takson/naziv klona	Ploidnost	Broj jedinki	Broj klonova	Dužina 5S rDNA jedinica ponavljanja (pb)	GC (%)	Homologija (%)	P_n	π	Broj 5S rDNA mjesta	Varijante dužina jedinica ponavljanja 5S rDNA
Podrod	Sekcija	Serijska											
<i>Preonanthus</i>	<i>Preonanthus</i>		<i>P. alpina</i> /Palp	16	1	8	367-523	51,94	49-98	0,2683	0,1610	4	3
			<i>P. magadanensis</i> /Pmag		1	5	517-521	53,34	90-99	0,1206	0,0576		1
<i>Pulsatilla</i>	<i>Pulsatilla</i>	<i>Patentes</i>	<i>P. patens</i> /Ppat	16	1	4	521-523	55,86	96-98	0,0441	0,0225	2	1
			<i>P. nutalliana</i> /Pnut		1	4	523-526	55,56	89-98	0,0832	0,0439		1
			<i>P. vernalis</i> /Pver		1	3	520-527	54,78	72-92	0,2777	0,2256		1
		<i>Pulsatilla</i>	<i>P. vulgaris</i> /Pvul	32	5	20	451-572	55,40	64-97	0,4750	0,1503	9	4
			<i>P. grandis</i> /Pgra	32	1	3	522-525	56,08	82-96	0,1858	0,1391		1
			<i>P. halleri</i> /Phal	32	1	3	524	56,00	96-99	0,0305	0,0207	8	1
			<i>P. slavica</i> /Pslav	32	1	2	521	56,92	95	0,0441	0,0455		1
			<i>P. styriaca</i> /Pstyr	32	1	7	458-525	55,72	65-98	0,3387	0,1823		3
			<i>P. coccinea</i> /Pcoc	32	1	1	520	54,04				10	
			<i>P. rubra</i> /Prub	32	1	4	522-526	56,44	79-94	0,2261	0,1305	10	1
		<i>Pratenses</i>	<i>P. montana</i> /Pmon		1	3	521-525	53,46	72-94	0,2793	0,2281		1
		<i>Albanae</i>	<i>P. albana</i> /Palb	16	1	3	522	55,11	90-94	0,1130	0,0811	2	1
			<i>P. violacea</i> /Pviol	16	1	3	522-523	54,60	96-98	0,0345	0,0242	2	1
<i>Tatewakianae</i>	<i>P. ajanensis</i> /Paja		1	3	524-525	56,13	93-100	0,0629	0,044		1		

4.3. Unutarvrstna varijabilnost jedinica ponavljanja 5S rDNA

Iako je kod svih ispitivanih vrsta iz roda *Pulsatilla* prisutna varijabilnost u sekvenci, a kod većine i u dužini jedinica ponavljanja 5S rDNA, najveća varijabilnost zabilježena je u vrstama *P. alpina*, *P. montana*, *P. styriaca* i *P. vulgaris* (Tablica 3). U vrsti *P. alpina* analizirano je osam klonova unutar kojih su utvrđena tri tipa sekvenci različitih dužina (Slika 4A). Klon Palp2NTS sadrži deleciju 16 pb unutar 3' – kodirajuće regije. U klonu Palp4NTS delecija od 31 pb također se nalazi unutar 3' – kodirajuće regije. S druge strane, klon Palp3NTS kraći je uslijed delecije 155 pb unutar NTS-a gdje je delecijom zahvaćena regulatorna TATA regija u blizini 5' – kodirajućeg segmenta. Budući da delecije unutar ovih klonova zahvaćaju kodirajuće i regulatorne sljedove gena 5S rRNA, navedeni klonovi mogli bi predstavljati pseudogene. Unutar vrste *P. montana* analizirana su tri klona (Slika 4B). U sva tri klona regije kodirajućih i regulatornih sljedova visoko su konzervirane. Međutim, klon Pmon2NTS razlikuje se od ostala dva po nasumičnim delecijama i supstitucijama od jednog do četiri para baza unutar NTS regije. Ipak, uzevši u obzir konzerviranost kodirajućih i regulatornih regija, mutacije u klonu Pmon2NTS ne bi trebale utjecati na ekspresiju gena 5S rRNA. Od sedam analiziranih klonova vrste *P. styriaca*, tri klona razlikuju se od ostalih po dužini i slijedu nukleotida u NTS regiji (Slika 5A). Klonove Psty1NTS i Psty2NTS karakteriziraju dvije delecije od 48 pb i 13 pb blizu 5' – kraja NTS regije, dok klon Psty7NTS sadrži deleciju od 22 pb blizu 3' – kraja NTS regije. Kao i kod vrste *P. montana*, nije došlo do promjena unutar regulatornih i kodirajućih regija gena 5S rRNA. U vrsti *P. vulgaris*, čijih je dvadeset klonova analizirano, utvrđena je najveća varijabilnost jedinica ponavljanja 5S rDNA među svim ispitivanim vrstama (Slika 5B). U klonu Pvul1NTS_c ta je jedinica duža od ostalih zbog duplikacije unutar NTS regije gdje je došlo do ponavljanja sekvence dužine 49 pb. Klonovi Pvul3NTS_a i Pvul3NTS_e imaju jedinice ponavljanja 5S rDNA kraće dužine zbog delecija 18 pb, odnosno 71 pb unutar NTS regije. Kod obje vrste delecije se nalaze blizu 3' – kodirajuće regije, ali pritom ne zahvaćaju regulatorne regije unutar NTS-a. Klonovi Pvul1NTS_b, Pvul7NTS_c i Pvul4NTS_e dijele promjene u slijedu nukleotida te deleciju od 60 pb bliže 3' – kodirajućoj regiji.

A *P. alpina*

Palp1,5,6,7,8NTS – 518-523 bp



Palp2NTS – 503 bp



Palp4NTS – 488 bp

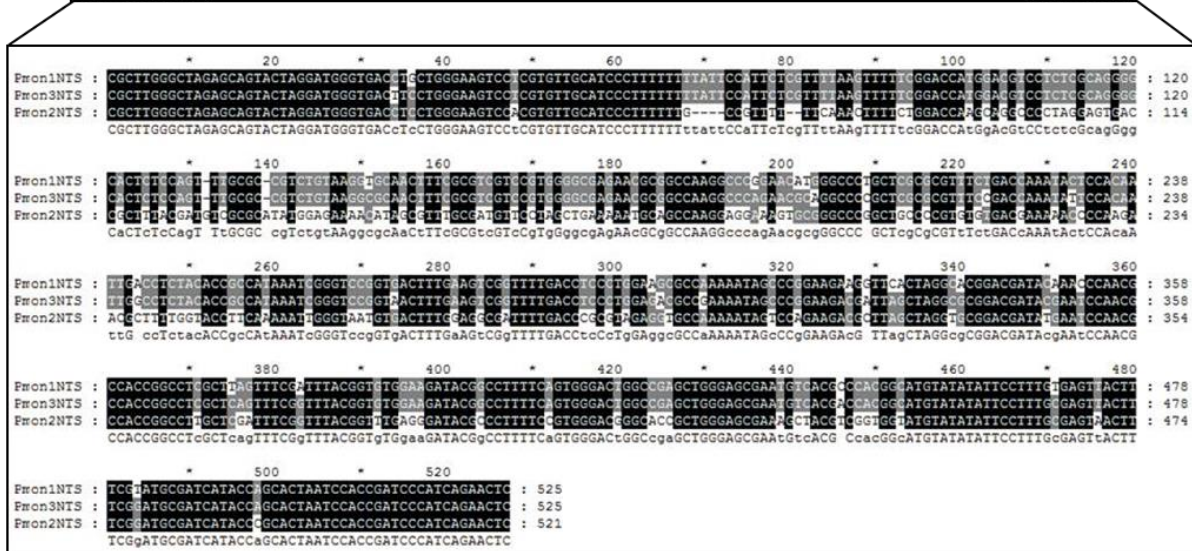


Palp3NTS – 367 bp



B *P. montana*

Pmon1,2,3 – 521-525 bp



— delecija ▨ kodirajuća regija ■ NTS

Slika 4. Shematski prikaz unutarvrnsne varijabilnosti dužine i slijeda nukleotida jedinica ponavljanja 5S rDNA u vrstama *P. alpina* i *P. montana*. Kratica „Palp“ oznaka je za vrstu *P. alpina*, dok je kratica „Pmon“ oznaka za vrstu *P. montana*.

A *P. styriaca*

Psty3,4,5,6NTS – 522-525 bp



Psty1,2NTS – 459, 458 bp
~120 bp



Psty7NTS – 500 bp



B *P. vulgaris*

Pvul1NTS_a,d,e, Pvul2NTS_a,b,c,d,e, Pvul3NTS_b,c,d, Pvul5NTS_c, Pvul6NTS_c, Pvul8NTS_c – 522-525 pb



Pvul3NTS_a – 505 bp



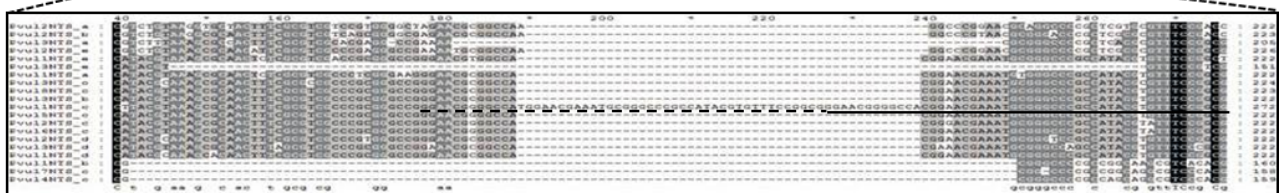
Pvul3NTS_e – 461 bp
~150 bp



Pvul1NTS_b, Pvul4NTS_e, Pvul7NTS_c – 460-461 pb
~140 bp



Pvul1NTS_c – 572 pb



— delecija ▨ kodirajuća regija ■ NTS

Slika 5. Shematski prikaz unutarvrnsne varijabilnosti dužine i slijeda nukleotida jedinica ponavljanja 5S rDNA u vrstama *P. styriaca* i *P. vulgaris*. Kratica „Psty“ oznaka je za vrstu *P. styriaca*, a „Pvul“ oznaka za vrstu *P. vulgaris*. U klonu Pvul1NTS_c regija označena isprekidanom linijom istovjetna je onoj označenoj punom linijom, a označavaju duplicirani segment.

4.4. Filogenetska analiza

Filogenetska analiza, u koju je bilo uključeno ukupno 68 klonova jedinica ponavljanja 5S rDNA iz 16 vrsta roda *Pulsatilla* te vrste *Anemone apennina*, provedena je upotrebom metode maksimalne vjerodostojnosti u programu PhyML čime je dobiveno inicijalno filogenetsko stablo (Slika 6). Ono je potom uključeno u Bayesianisku analizu te je dobiveno konačno filogenetsko stablo na temelju prethodnih analiza (Slika 7). Oba su stabla prikazana u obliku filograma. Iz ovih su filogenetskih analiza uklonjeni klonovi koji su sadržavali velike delecije.

Stablo se u oba slučaja dijeli na dvije monofiletske skupine s visokom pouzdanošću od kojih se jedna (BS 95% odnosno PP 100%) sastoji od jedne skupine (*Preonanthus*), a druga (BS 98% odnosno PP 100%) od tri skupine na inicijalnom stablu (*Pulsatilla* II + *Pratenses*, *Albanae* i *Pulsatilla* I) te pet skupina na stablu dobivenom Bayesianskom analizom (*Pulsatilla* III + *Patentes*, *Tatewakianae*, *Pulsatilla* II + *Pratenses*, *Albanae* i *Pulsatilla* I). Navedene su skupine na oba stabla statistički vrlo pouzdane budući da svaka ima BS vrijednost znatno veću od 75%, odnosno PP vrijednost veću od 90%. Najveću pouzdanost na inicijalnom stablu pokazuju skupine *Pulsatilla* I i *Pulsatilla* II + *Pratenses* (BS 98%), dok se skupina *Albanae* pokazala kao najmanje pouzdana (BS 94%). Na stablu dobivenom Bayesianskom analizom svaka je skupina jednako pouzdana. Svaka od navedenih skupina u pojedinom filogenetskom stablu sastoji se od manjih monofiletskih kladija čije BS, odnosno PP vrijednosti kod nekoliko skupina nerijetko iznose manje od 75%, to jest 90% što ih čini nepouzdanima. Monofiletski kladiji sa znatno najmanjim BS, odnosno PP vrijednostima u oba su stabla oni iz skupine *Pulsatilla* I što ukazuje kako srodstveni odnosi navedenih kladija nisu pouzdani te kako između njih nije prisutna visoka stopa divergencije sekvenci. Najveća skupina na inicijalnom stablu jest *Pulsatilla* II + *Pratenses* koja sadrži nedvojbeno i najviše vrsta, dok je kod stabla dobivenog Bayesianskom analizom najbrojnija skupina *Pulsatilla* I, no najviše je grupiranih vrsta ipak, kao i kod inicijalnog stabla, primijećeno u skupini *Pulsatilla* II + *Pratenses*. Najmanje skupine koje ujedno sadrže i najmanji broj vrsta jesu skupina *Albanae* iz oba stabla te skupina *Tatewakianae* iz stabla dobivenog Bayesianskom analizom.

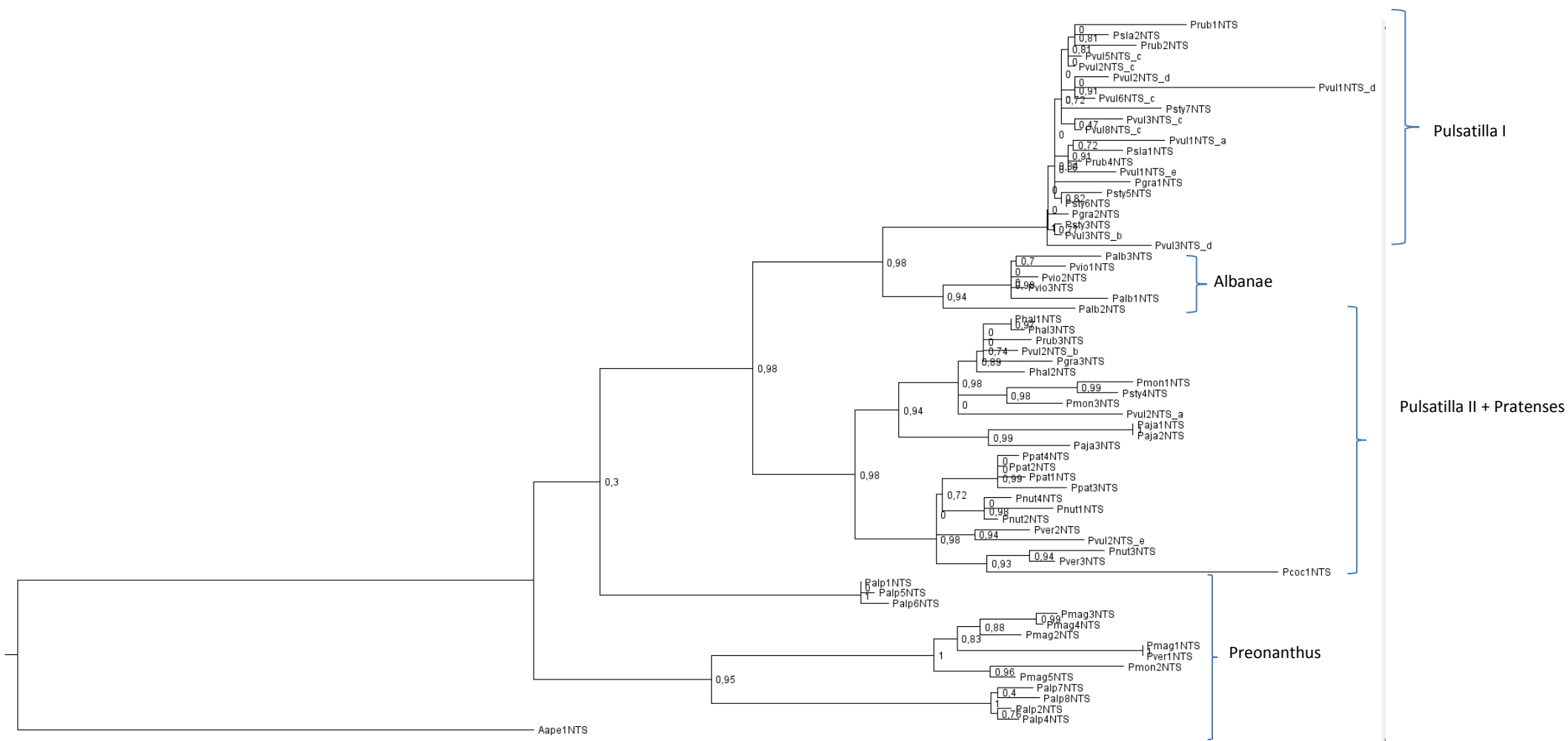
Većina vrsta grupira se u kladije koji odgovaraju taksonomskoj podjeli vrsta na razini serija. Ipak, postoje vrste koje se grupiraju u razne skupine s vrstama iz različitih taksonomskih kategorija. Takve vrste, kod kojih je na oba filogenetska stabla primijećeno grupiranje klonova u više skupina, jesu vrste *P. rubra* i *P. grandis*, čiji se klonovi grupiraju u skupine *Pulsatilla* I i II, zatim vrste *P. vulgaris* i *P. styriaca*, čiji se klonovi grupiraju u skupine

Pulsatilla I i II na inicijalnom, odnosno Pulsatilla I, II i III na stablu koje je rezultat Bayesianske analize, te vrste *P. montana* i *P. vernalis* čiji se klonovi na oba stabla, osim u skupine koje odgovaraju njihovoj seriji, grupiraju i u skupinu Preonanthus.

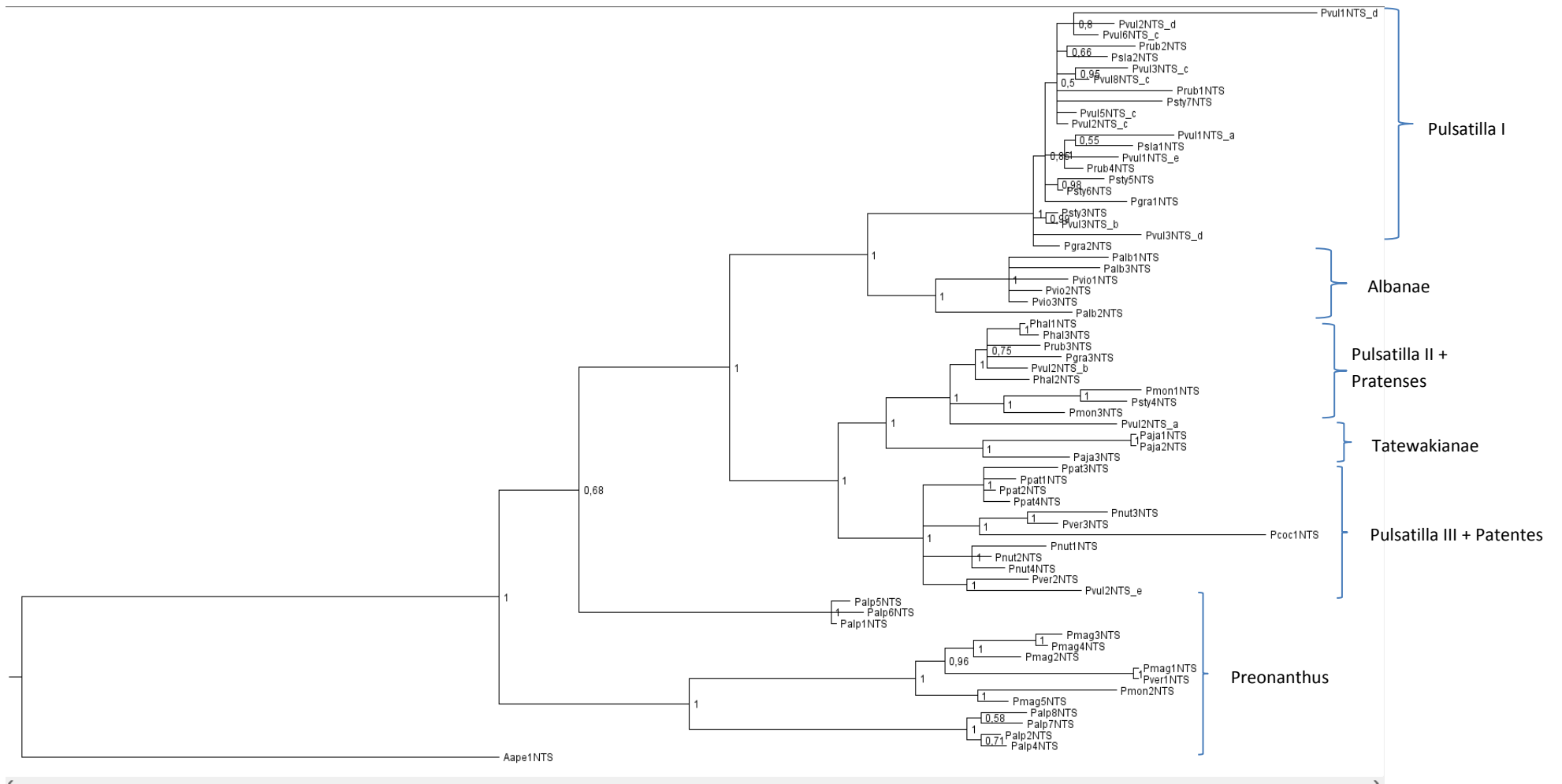
Provedena je također i filogenetska analiza u koju je bilo uključeno svih 77 klonova jedinica ponavljanja 5S rDNA iz 16 različitih vrsta roda *Pulsatilla* te vrste *Anemone apennina* koja je u analizu uključena kao vanjska skupina.

Stablo maksimalne vjerodostojnosti roda *Pulsatilla* prikazano je u obliku kladograma (Slika 8). U 47% unutarnjih grana BS je veći ili jednak 75% što navedene grane čini pouzdanima. Stablo se u ovom slučaju također dijeli na dvije glavne monofiletske skupine s visokom pouzdanšću od kojih se jedna (BS 92%) sastoji od šest skupina (Alpina, Pulsatilla III + Patentes, Tatewakianae, Pulsatilla II + Pratenses, Albanae te Pulsatilla I), a druga (BS 86%) od dvije skupine (Preonanthus i Pulsatilla IV + Preonanthus). Skupine su različitih veličina te uglavnom statistički vrlo pouzdane (BS>75%). Najveću pouzdanost imaju skupine Pulsatilla I, Pulsatilla II + Pratenses, Tatewakianae, Alpina i Preonanthus (BS 99%), dok je pouzdanost najmanja u skupini Pulsatilla III + Patentes (BS 70%). Same skupine, kao i kod prethodnih filogenetskih stabala, sastoje se od manjih monofiletskih kladija. Unutar skupine Pulsatilla I gotovo svi monofiletski kladiji imaju BS vrijednosti manju od 75% te ne pokazuju pouzdane srodstvene odnose. Ostale skupine uglavnom sadrže statistički pouzdane monofiletske podskupine. Ujedno se na stablu može primijetiti kako brojnost vrsta unutar skupine uglavnom slijedi njenu veličinu. Ipak, skupina Pulsatilla II + Pratenses, koja je manja od skupine Pulsatilla I, najbogatija je vrstama. S druge strane, najmanje skupine Alpina i Tatewakianae sastoje se od samo jedne vrste – *P. alpina*, odnosno *P. ajanensis*.

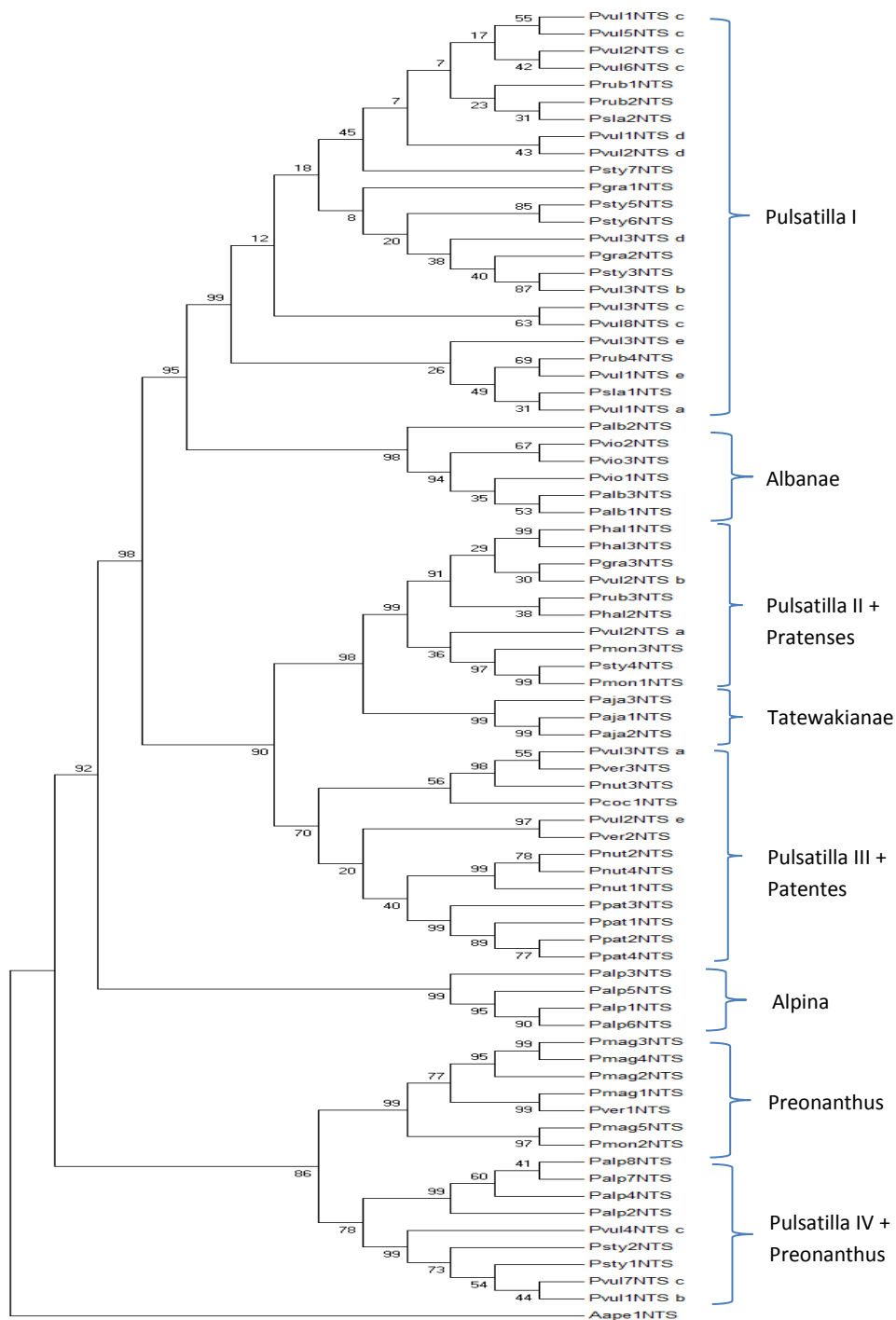
Na ovom filogenetskom stablu grupiranje vrsta također odgovara njihovoj podjeli u serije unutar roda, no može se opaziti i grupiranje već prije spomenutih vrsta u više različitih skupina s vrstama iz različitih serija. Tako se varijante vrste *P. vulgaris* i *P. styriaca* mogu pronaći unutar skupina Pulsatilla I, II, III i IV, vrste *P. vernalis* unutar skupina Preonanthus i Patentes, vrste *P. rubra* i *P. grandis* unutar Pulsatilla I i II, vrste *P. montana* unutar skupina Pratenses i Preonanthus te one vrste *P. alpina* unutar skupina Alpina i Pulsatilla IV + Preonanthus.



Slika 6. Molekularna filogenetska analiza napravljena metodom maksimalne vjerodostojnosti u programu PhyML upotrebom 5S rDNA kao molekularnog biljega vrsta *P. alpina* (Palp), *P. magadanensis* (Pmag), *P. patens* (Ppat), *P. nutalliana* (Pnut), *P. vernalis* (Pver), *P. vulgaris* (Pvul), *P. grandis* (Pgra), *P. halleri* (Phal), *P. slavica* (Psla), *P. styriaca* (Psty), *P. coccinea* (Pcoc), *P. rubra* (Prub), *P. montana* (Pmon), *P. albana* (Palb), *P. violacea* (Pvio) i *P. ajanensis* (Paja). Brojevi u nodijima grana označuju Bootstrap vrijednost (BS). Kao vanjska skupina u filogenetskoj analizi odabrana je vrsta *A. apennina* (Aape).



Slika 7. Molekularna filogenetska analiza napravljena Bayesijskom analizom upotrebom 5S rDNA kao molekularnog biljega vrsta *P. alpina* (Palp), *P. magadanensis* (Pmag), *P. patens* (Ppat), *P. nutalliana* (Pnut), *P. vernalis* (Pver), *P. vulgaris* (Pvul), *P. grandis* (Pgra), *P. halleri* (Phal), *P. slavica* (Psla), *P. styriaca* (Psty), *P. coccinea* (Pcoc), *P. rubra* (Prub), *P. montana* (Pmon), *P. albana* (Palb), *P. violacea* (Pvio) i *P. ajanensis* (Paja). Brojevi u nodijima grana označuju naknadnu vjerojatnost (PP). Kao vanjska skupina u filogenetskoj analizi odabrana je vrsta *A. apennina* (Aape).



Slika 8. Molekularna filogenetska analiza napravljena metodom maksimalne vjerodostojnosti (Maximum Likelihood method) upotrebom 5S rDNA kao molekularnog biljega vrsta *P. alpina* (Palp), *P. magadanensis* (Pmag), *P. patens* (Ppat), *P. nutalliana* (Pnut), *P. vernalis* (Pver), *P. vulgaris* (Pvul), *P. grandis* (Pgra), *P. halleri* (Phal), *P. slavica* (Psla), *P. styriaca* (Psty), *P. coccinea* (Pcoc), *P. rubra* (Prub), *P. montana* (Pmon), *P. albana* (Palb), *P. violacea* (Pvio) i *P. ajanensis* (Paja). Brojevi u nodijima grana označuju Bootstrap vrijednost (BS). Kao vanjska skupina u filogenetskoj analizi odabrana je vrsta *A. apennina* (Aape).

5. RASPRAVA

5.1. Raznolikost jedinica ponavljanja 5S rDNA između ispitivanih vrsta roda *Pulsatilla*

U ovom radu provedeno je, do sada, najopsežnije istraživanje evolucije i karakterizacije 5S rDNA u vrstama iz roda *Pulsatilla*. Dosadašnja istraživanja provedena su na samo 4 vrste, *P. violacea*, *P. rubra*, *P. grandis* i *P. albana* (Mlinarec i sur., 2016.). U ovom radu obuhvaćeno je 16 vrsta iz roda *Pulsatilla* uključujući i prethodno istraživane vrste. Uspoređujući rezultate analize jedinica ponavljanja 5S rDNA vrsta iz ovog rada s onima iz rada Mlinarec i sur. (2016.), potvrđeno je da dužina jedinice ponavljanja 5S rDNA tipična za sve istraživane vrste iznosi oko 520 pb. Međutim, ovo istraživanje je pokazalo da u nekim vrstama (*P. vulgaris*, *P. styriaca* i *P. alpina*) postoje i druge varijante dužina jedinica ponavljanja 5S rDNA. Umnožavanjem 5S rDNA iz genomske DNA, te razdvajanjem produkata PCR-a u agaroznom gelu, fragmenti koji odgovaraju jedinicama ponavljanja 5S rDNA različitih dužina opaženi su samo u vrsti *P. alpina*. Naime, razlika u dužinama različitih varijanti spomenutih jedinica u vrstama *P. vulgaris* i *P. styriaca* nedovoljno je velika kako bi se fragmenti, koji odgovaraju jedinicama ponavljanja 5S rDNA različitih dužina, mogli razlučiti elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu, dok u vrsti *P. alpina* njihova dužina varira između 367 i 523 pb što je dovoljna razlika kako bi se različiti fragmenti mogli razlučiti gel elektroforezom.

Jedinica ponavljanja 5S rDNA sastoji se od kodirajuće regije i NTS-a koji sadrži regulatorne regije. Prijašnja istraživanja bazirala su se na analizi jedinica ponavljanja 5S rDNA brojnih vrsta srodnih rodova, poput *Anemone* i *Hepatica* te nekoliko vrsta iz roda *Pulsatilla* (Mlinarec i sur., 2016.). Unutar roda *Pulsatilla*, kao i kod rodova *Anemone* i *Hepatica*, kodirajuće i regulatorne regije pokazale su visoku konzerviranost u slijedu nukleotida zbog njihove važnosti u ekspresiji gena i funkcionalnosti genskog produkta. Ujedno je primijećeno kako unutar vrsta rodova *Anemone* i *Pulsatilla* gen započinje nukleotidima GGA, dok u vrstama roda *Hepatica* on započinje nukleotidima GGG. U vrstama iz sva tri roda gen završava nukleotidima CTC. Također rodovi *Pulsatilla* i *Anemone* međusobno imaju više sličnosti u sastavu uzvodnih i nizvodnih regulatornih regija nego što to imaju s rodom *Hepatica* te ova analiza dodatno doprinosi tvrdnji da je rod *Pulsatilla* u većoj evolucijskoj srodnosti s rodom *Anemone* nego što je to s rodom *Hepatica* (Hoot i sur., 2012.; Mlinarec i sur. 2012a., 2016.; Zhang i sur., 2015.). Jedino je u regulatornoj regiji za terminaciju transkripcije bogatoj timinima primijećena unutarvrstna i međuvrstna varijabilnost dužine same regije (Slika 3,

podcrtano). Uzrok navedenim varijacijama u dužini moglo bi biti replikacijsko proklizavanje DNA polimeraze koje je karakteristično za kratka uzastopna ponavljanja prisutna i u spomenutoj regulatornoj regiji (Cronn i sur., 1996.). To dovodi do zaključka kako dužina regulatorne regije bogate timinima nije odgovorna za njezinu funkcionalnost kod vrsta analiziranih u ovome radu.

Iako su u prijašnjim radovima primijećene delecije u jedinicama ponavljanja 5S rDNA unutar vrsta iz rodova *Anemone* i *Pulsatilla* te insercije uzrokovane transpozonomima unutar roda *Hepatica* (Mlinarec i sur., 2016.), u ovom radu detaljno su okarakterizirane mutacije u jedinicama ponavljanja 5S rDNA u vrstama iz roda *Pulsatilla*. Tako su utvrđene značajne varijacije u dužini ili slijedu nukleotida jedinica ponavljanja 5S rDNA u vrstama *P. alpina*, *P. montana*, *P. styriaca* i *P. vulgaris*. Najveći broj mutacija zabilježen je u dijelu NTS regije koji nema regulatornu ulogu, stoga se može smatrati da promjene u ovoj regiji ne utječu na ekspresiju gena. Tako su u toj regiji u klonovima vrste *P. styriaca* uočene delecije, a u onima vrste *P. montana* česte točkaste mutacije. U vrsti *P. vulgaris* je, uz delecije, koje su kod pojedinih klonova obuhvaćale različite dijelove NTS-a, zabilježen klon Pvul1NTS_c s dupliranim segmentom unutar NTS regije koji bi mogao biti posljedica replikacijskog proklizavanja (Chen i sur., 2005.). Međutim, varijante dužina u vrsti *P. alpina* posljedica su delecija koje obuhvaćaju kodirajuće regije, prvenstveno 3' – kodirajuću regiju i regulatorne regije zbog čega se može pretpostaviti da klonovi u kojima su delecije primijećene predstavljaju pseudogene, odnosno gene koji su izgubili svoju funkciju. Tijekom evolucije vrste, pseudogeni mogu biti u potpunosti deletirani iz genoma ili će divergirati od roditeljskog gena dok više neće postojati sličnosti (Zhang, 2003.).

5.2. Evolucija 5S rDNA multigenske porodice u rodu *Pulsatilla* objašnjena modelom nastanka i nestanka gena

Analizirajući jedinice ponavljanja 5S rDNA u 16 vrsta iz roda *Pulsatilla* kako bi se rekonstruirala evolucija gena 5S rRNA, dobiveni su rezultati koji ukazuju na veliku unutarvrstnu varijabilnost navedenih jedinica u svim ispitivanim vrstama. Iz njih se, naime, može zaključiti kako su sile usklađene evolucije kod ispitivanih vrsta iz roda *Pulsatilla* bile relativno slabe. Dosadašnja istraživanja, u kojima je rekonstruiran model evolucije gena 5S rRNA u vrstama iz skupine *Anemoneae*, pokazala su također veliku unutarvrstnu varijabilnost jedinica ponavljanja 5S rDNA (Mlinarec i sur., 2016.). U provedenom su istraživanju

odabrane vrsta iz rodova *Anemone*, *Hepatica* te nekoliko vrsta iz roda *Pulsatilla*. Uspoređujući rezultate iz ovog rada s onima iz rada Mlinarec i sur. (2016.) može se primijetiti kako istraživane vrste iz roda *Pulsatilla* pokazuju zamjetno najveću unutarvrstnu varijabilnost jedinica ponavljanja 5S rDNA u odnosu na vrste iz rodova *Anemone* i *Hepatica*. Različita jakost homogenizacijskih sila, kojima bi se mogao objasniti različit stupanj unutarvrstne varijabilnosti jedinica ponavljanja 5S rDNA u vrstama iz različitih rodova skupine *Anemoneae*, najvjerojatnije ovisi o kromosomskom položaju regije na koju te sile djeluju. Naime, homologna rekombinacija je suprimirana u centromernom i pericentromernom području budući da bi nesimetričnim crossing overima i genskom konverzijom u regijama oko centromera mogle nastati nefunkcionalne gamete, pa se zato ona puno češće odvija na terminalnim područjima kromosoma (Kellogg i Appels, 1995.; Wendel i sur., 1995.; Cronn i sur., 1996.; Fulneček i sur., 2002.; Lan i Albert, 2011.; Mahelka i sur., 2013.). U prethodnim istraživanjima pokazano je kako su u pojedinim vrstama iz roda *Pulsatilla* 5S rDNA lokusi na kromosomima smješteni subterminalno (Mlinarec i sur., 2012a.). Iz navedenog podatka dalo bi se zaključiti kako su homogenizacijske sile u vrstama ovoga roda jake te kako bi jedinice ponavljanja 5S rDNA u tom slučaju trebale pokazivati manju unutarvrstnu varijabilnost i slijediti model usklađene evolucije. Ipak, u ovom radu pokazana je veća unutarvrstna varijabilnost u vrstama iz roda *Pulsatilla* nego u vrstama *A. apennina*, *A. ranunculoides*, *A. nemorosa*, *H. nobilis* i *H. transsilvanica* kod kojih su 5S rDNA lokusi smješteni oko centromernog područja (Mlinarec i sur., 2016.). Može se stoga zaključiti kako su homogenizacijske sile u vrstama iz roda *Pulsatilla* bile relativno slabe usprkos subterminalnom položaju 5S rDNA lokusa na kromosomima. Također se na temelju usporedbe unutarvrstnih varijabilnosti jedinica ponavljanja 5S rDNA vrsta iz rodova *Anemone*, *Hepatica* i *Pulsatilla* može primijetiti kako sile usklađene evolucije različito djeluju u različitim vrstama iz skupine *Anemoneae*, s tim da su najmanji utjecaj imale na evoluciju gena 5S rRNA u vrstama iz roda *Pulsatilla*.

Nadalje, u prethodnim je istraživanjima u pojedinim vrstama iz roda *Pulsatilla* otkrivena prisutnost varijanti dužina jedinica ponavljanja 5S rDNA u jednom 5S rDNA lokusu (Mlinarec i sur., 2012a.). U ovom je radu analiziranjem jedinica ponavljanja 5S rDNA u vrstama *P. alpina*, *P. vulgaris* i *P. styriaca* također otkriveno više varijanata dužine jedinica ponavljanja koje su uglavnom rezultati delecija. Osim toga, ovim je, ali i prethodnim istraživanjima, otkrivena prisutnost mogućih pseudogena u svakom od rodova *Anemone*, *Hepatica* i *Pulsatilla* iz skupine *Anemoneae*. U istraživanju Mlinarec i sur. (2016.) mogući su

pseudogeni otkriveni u diploidnim vrstama *Anemone apennina* i *A. narcissifolia* te poliploidnim vrstama *A. multifida* var. *saxicola*, *A. multifida* var. *multifida*, *A. baldensis*, *Hepatica transsilvanica* i *H. yamatutai*, dok su u ovom radu oni otkriveni u diploidnoj vrsti *P. alpina*. Rezultati su uglavnom delecija u 3' – kodirajućim regijama jedinica ponavljanja 5S rDNA.

Sva su filogenetska stabla pokazala prisutnost više tipova 5S rDNA sekvenci u istraživanim vrstama iz roda *Pulsatilla* što je karakteristična pojava u multigenim porodicama koje su evoluirale slijedeći model nastanka i nestanka gena. To je najviše izraženo u filogenetskom stablu u izradu kojeg su bili uključeni svi klonovi. Naime, u tom stablu sve vrste iz podroda *Pulsatilla* nalaze se grupirane u 4 skupine zajedno s vrstama iz različitih sekcija i serija. Takav raspored klonova vjerojatno je posljedica izostanka usklađene evolucije zbog djelovanja slabih homogenizacijskih sila. Slabe homogenizacijske sile koje dovode do velike unutarvrstne varijabilnosti jedinica ponavljanja 5S rDNA, prisutnost različitih varijanata dužine jedinica ponavljanja u pojedinim vrstama iz roda *Pulsatilla*, prisutnost pseudogena te grupiranje tipova sekvenci 5S rDNA između ispitivanih vrsta ukazuju kako je 5S rDNA multigena porodica u ispitivanim vrstama iz roda *Pulsatilla* evoluirala slijedeći model nastanka i nestanka gena tijekom evolucijske prošlosti. Istraživanje evolucije 5S rDNA multigenske porodice u vrstama unutar skupine *Anemoneae*, u koje spada i rod *Pulsatilla*, također je pokazalo kako je osim modela usklađene evolucije u oblikovanje multigenske porodice 5S rDNA uključen i model nastanka i nestanka gena (Mlinarec i sur., 2016.). Ipak, dobiveni rezultati u ovom radu ukazuju kako je u rodu *Pulsatilla* model nastanka i nestanka gena imao puno veći utjecaj na oblikovanje 5S rDNA multigenske porodice nego u ostalim vrstama iz skupine *Anemoneae*.

5.3. 5S rDNA kao molekularni biljeg u filogenetskoj analizi vrsta iz roda *Pulsatilla*

U ovom istraživanju provedena je filogenetska analiza u kojoj se kao molekularni biljeg koristila 5S rDNA za do sada najveći broj vrsta iz roda *Pulsatilla*. U dosadašnja filogenetska istraživanja, u kojima je 5S rDNA korištena kao molekularni biljeg, bile su uključene samo četiri vrste, diploidne vrste *P. albana* i *P. violacea* te poliploidne vrste *P. grandis* i *P. rubra* (Mlinarec i sur., 2016.). Za filogenetsku analizu u ovom radu odabrano je 16 vrsta kako bi se pokušali razjasniti srodstveni odnosi između ispitivanih vrsta te kako bi se 5S rDNA ispitala kao biljeg u filogenetskim analizama vrsta iz ovoga roda.

Na filogenetskim stablima, dobivenim nakon uklanjanja klonova s velikim delecijama iz filogenetske analize, mogu se opaziti četiri, odnosno šest skupina u koje se klonovi grupiraju ovisno o tipu 5S rDNA sekvenci koje su zastupljene u pojedinoj vrsti, dok se na stablu u kojemu se nalaze svi klonovi oni grupiraju u čak osam skupina. Na filogenetskim se stablima prvo odvajaju skupina *Preonanthus* te skupine *Pulsatilla* IV + *Preonanthus* i *Alpina* koje su prisutne samo na stablu u čiju su izradu bili uključeni svi klonovi istraživanih vrsta. Zatim se odvajaju skupine *Pulsatilla* III + *Patentes*, *Tatewakianae*, *Pulsatilla* II + *Pratenses*, *Albanae* te konačno skupina *Pulsatilla* I. Do sada je u istraživanju Mlinarec i sur. (2016.), u kojemu je analiziran filogenetski odnos četiri vrsta, *P. albana*, *P. violacea*, *P. rubra* i *P. grandis*, pokazano kako filogenetske analize temeljene na sekvencama 5S rDNA odgovaraju taksonomskoj podjeli. U ovom radu to je samo djelomično potvrđeno. Naime, srodne vrste iz serije *Albanae*, *P. albana* i *P. violacea*, grupirale su se u zasebnu skupinu na svim filogenetskim stablima kao što je to pokazano u radu Mlinarec i sur. (2016.). Jedina vrsta iz sekcije *Tatewakianae*, *P. ajanensis*, također se u stablu, u čiju su izradu uključeni svi klonovi te onog koje je napravljeno koristeći Bayesian pristup, grupirala u zasebnu skupinu. Jedan dio klonova vrste *P. alpina* nalazi se u istoj skupini s vrstom *P. magadanensis* iz podroda *Preonanthus*, dok su tri klona grupirana zajedno s vrstama iz sekcije *Pulsatilla*. Za razliku od vrsta u spomenutim sekcijama i serijama, vrste iz sekcije *Pulsatilla* grupirane su u više različitih skupina ovisno o metodi korištenoj za izradu filogenetskog stabla. Poliploidne vrste iz serije *Pulsatilla* grupirale su se na početnom filogenetskom stablu napravljenom pomoću programa PhyML u dvije skupine, *Pulsatilla* I i *Pulsatilla* II, dok su se na filogenetskom stablu napravljenom upotrebom Bayesian pristupa grupirale u tri skupine, *Pulsatilla* I, *Pulsatilla* II te *Pulsatilla* III. Na filogenetskom stablu, u čiju su izradu uključeni svi klonovi ispitivanih vrsta, poliploidne su vrste grupirane, osim u navedene tri skupine, u dodatnu četvrtu skupinu *Pulsatilla* IV + *Preonanthus*. Grupiranje različitih vrsta iz serije *Pulsatilla* u različite skupine s vrstama iz serije *Patentes* i *Pratenses* ukazuje da je ono posljedica prisutnosti više različitih tipova sekvenci 5S rDNA u vrstama iz ove taksonomske skupine.

5.4. Porijeklo alopoliploidnih vrsta iz roda *Pulsatilla*

Pokazano je u prethodnim istraživanjima kako je 5S rDNA pogodan biljeg za rekonstrukciju evolucijske povijesti alopoliploidnih vrsta (Mlinarec i sur., 2012b.; Mahelka i sur., 2013.). Do sada još nije istraživano porijeklo alopoliploidnih vrsta iz roda *Pulsatilla*, točnije iz serije

Pulsatilla, pa je stoga jedan od ciljeva ovoga rada bio odrediti njihove diploidne roditeljske vrste. Naime, u aloploidnim vrstama očekivala se prisutnost različitih tipova sekvenci 5S rDNA koje su porijeklom iz roditeljskih vrsta. U tom bi se slučaju navedene sekvence grupirale u više različitih skupina na filogenetskom stablu sa sekvencama diploidnih roditeljskih vrsta iz koje one potječu. U dosadašnjim je istraživanjima primijećeno razdvajanje klonova poliploidnih vrsta *P. rubra* i *P. grandis* u dvije skupine na temelju 5S rDNA sekvenci (Mlinarec i sur., 2016.). U ovom istraživanju klonovi navedenih poliploidnih vrsta također su grupirani u dvije skupine, Pulsatilla I i Pulsatilla II, što ukazuje da su, budući da se u njihovom genomu nalaze dva različita tipa 5S rDNA sekvenci, ove vrste hibridnog, to jest aloploidnog porijekla. Isto je primijećeno i u poliploidnim vrstama *P. styriaca* i *P. vulgaris*, za koje se također pretpostavlja aloploidno porijeklo. Klonovi ovih vrsta se na filogenetskom stablu, u čiju su izradu uključeni svi klonovi, grupiraju u četiri skupine, Pulsatilla I, II i III te Pulsatilla IV, dok se na stablima, iz kojih su klonovi s velikim delecijama uklonjeni, grupiraju samo u skupine Pulsatilla I i II, odnosno Pulsatilla I, II i III. Interesantno je da se tri klona vrste *P. alpina* grupiraju u zasebnu skupinu Alpina koja je povezana s poliploidnim vrstama *P. vulgaris* i *P. styriaca*, koje se nalaze u skupini Pulsatilla IV + Preonanthus, odnosno povezana s vrstama iz sekcije *Pulsatilla*. Ovaj rezultat ukazuje da bi vrsta *P. alpina* mogla biti jedan od roditelja poliploidnih vrsta *P. vulgaris* i *P. styriaca*. Na aloploidno porijeklo vrsta *P. grandis*, *P. rubra*, *P. styriaca* i *P. vulgaris* iz serije *Pulsatilla* ukazali su rezultati istraživanja koje su proveli Sramkó i sur. (2019.) koji su pokazali da te vrste sadrže dva diploidna kromosomska seta koji se razlikuju po morfologiji, veličini i položaju rDNA. Budući da poliploidne vrste iz serije *Pulsatilla* imaju 5S rDNA lokus na kraćem kraku submetacentričnih kromosoma, pretpostavljalo se kako je jedna od njihovih roditeljskih vrsta *P. alpina* kod koje su, od svih ispitivanih diploidnih vrsta, pronađeni submetacentrični kromosomi na kojima se nalazi 5S rDNA lokus. Filogenetskom analizom provedenom u ovom radu upotrebom 5S rDNA kao biljega pokazano je da bi vrsta *P. alpina* mogla biti jedna od roditeljskih vrsta poliploidnih vrsta *P. vulgaris* i *P. styriaca* iz serije *Pulsatilla*.

Zaključno, pregledom razdvajanja 5S rDNA sekvenci ispitivanih vrsta u više različitih skupina, može se primijetiti kako filogenetska analiza provedena na većem broju vrsta iz roda *Pulsatilla* upotrebom 5S rDNA kao molekularnog biljega za većinu vrsta odgovara najnovijoj taksonomskoj podjeli koja je predložena na temelju opsežnih filogenetskih analiza u kojima su kao molekularni biljezi korištene dvije jezgrine i tri plastidne regije (Sramkó i sur., 2019.).

Naime, 5S rDNA se već pokazala kao dobar biljeg za filogenetske analize unutar roda *Anemone* (Mlinarec i sur., 2012a.). Ipak, u pojedinim vrstama primijećeno je grupiranje 5S rDNA sekvenci u više skupina s vrstama iz različitih taksonomskih kategorija. To može biti posljedica hibridnog porijekla vrsta ili slabe homogenizacije 5S rDNA sekvenci kao posljedice evolucije prema modelu nastanka i nestanka gena.

6. ZAKLJUČAK

U provedenom istraživanju rekonstruiran je model evolucije 5S rDNA gena u 16 istraživanih vrsta iz roda *Pulsatilla*. Naime, podaci u ovom radu ukazuju kako su oba evolucijska modela, model usklađene evolucije i model nastanka i nestanka gena uključeni u oblikovanje 5S rDNA. Osim toga, 5S rDNA se pokazala kao relativno dobar molekularni biljeg za razjašnjavanje srodstvenih odnosa između ispitivanih vrsta iz roda *Pulsatilla* budući da se filogenetskim analizama pokazalo grupiranje vrsta uglavnom prema njihovoj taksonomskoj podjeli. Također se 5S rDNA pokazala kao potencijalni biljeg za rekonstrukciju porijekla aloploidnih vrsta iz roda *Pulsatilla*. U ovom radu potvrđena je hipoteza prema kojoj je vrsta *P. alpina* potencijalni diploidni roditelj aloploidnih vrsta *P. vulgaris* i *P. styriaca*.

7. ZAHVALE

Zahvaljujemo prof. dr. sc. Višnji Besendorfer na ukazanoj prilici, iskazanom trudu, strpljenju, pomoći i vremenu uloženom u ispravljanje i poboljšavanje ovoga rada te na ukazanoj potpori tijekom pisanja istog.

Također se zahvaljujemo dr. sc. Jeleni Mlinarec Novosel na potpori i pomoći iskazanoj tijekom laboratorijskog rada, strpljenju kada rezultati nisu bili dobri, ali i pomoći prilikom obrađivanja dobivenih rezultata.

Zahvaljujemo dr. sc. Gaboru Sramkó sa Sveučilišta u Debrecenu koji je velikodušno pomogao u filogenetskim analizama.

Osim toga, veliko hvala i svom osoblju Zavoda za molekularnu biologiju na svakoj ukazanoj pomoći i podršci prilikom provođenja eksperimentalnog dijela ovoga rada.

8. POPIS LITERATURE

Aichele, D., Schwegleb, H.W., (1957). Die Taxonomie der Gattung *Pulsatilla*. *Repertorium novarum specierum regni vegetabilis* 60, 1–230.

Brown, D. D., Wensink, P. C., & Jordan, E. (1972). A comparison of the ribosomal DNA's of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. *Journal of molecular biology*, 63(1), 57-73.

Campbell, B. R., Song, Y., Posch, T. E., Cullis, C. A., & Town, C. D. (1992). Sequence and organization of 5S ribosomal RNA-encoding genes of *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 112(2), 225-228.

Chen, J.-M., Chuzhanova, N., Stenson, P. D., Férec, C., & Cooper, D. N. (2005). Meta-Analysis of gross insertions causing human genetic disease: Novel mutational mechanisms and the role of replication slippage. *Human Mutation*, 25(2), 207–221.

Criscuolo, A., Gribaldo, S. (2010). BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC evolutionary biology*, 10(1), 210.

Cronn, R. C., Zhao, X., Paterson, A. H., & Wendell, J. F. (1996). Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons. *Journal of Molecular Evolution*, 42(6), 685-705.

Doyle, J.J., Doyle, J.L., (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11–15.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.

Eirín-López, J. M., Rebordinos, L., Rooney, A. P., & Rozas, J. (2012). The birth-and-death evolution of multigene families revisited. In *Repetitive DNA* (Vol. 7, pp. 170-196). Karger Publishers.

Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783–793.

Fulneček, J., Lim, K. Y., Leitch, A. R., Kovařík, A., & Matyašek, R. (2002). Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species. *Heredity*, 88(1), 19.

- Garcia, S., & Kovařík, A. (2013). Dancing together and separate again: gymnosperms exhibit frequent changes of fundamental 5S and 35S rRNA gene (rDNA) organisation. *Heredity*, *111*(1), 23.
- Grey-Wilson, C. (2014). Pasque-flowers. The genus *Pulsatilla*. The Charlotte-Louise Press, Kenninghall.
- Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P., & Gascuel, O. (2005). PHYML Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic acids research*, *33*(suppl_2), W557-W559.
- Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000..
- Hoot, S.B., Meyer, K.M., Manning, J.C., (2012). Phylogeny and reclassification of *Anemone* (*Ranunculaceae*), with an emphasis on austral species. *Syst. Bot.* *37*, 139–152.
- Ingram, V. M. (1961). Gene evolution and the haemoglobins. *Nature*, *189*(4766), 704.
- Jiang, N., Zhou, Z., Yang, J.-B., Zhang, S.-D., Guan, K.-Y., Tan, Y.-H., Yu, W.-B., (2017). Phylogenetic reassessment of tribe *Anemoneae* (*Ranunculaceae*): Non-monophyly of *Anemone* s.l. revealed by plastid datasets. *PLoS ONE* *12*, e0174792.
- Kellogg, E. A., & Appels, R. (1995). Intraspecific and interspecific variation in 5S RNA genes are decoupled in diploid wheat relatives. *Genetics*, *140*(1), 325-343.
- Kitamura, S., Inoue, M., Shikazono, N., & Tanaka, A. (2001). Relationships among *Nicotiana* species revealed by the 5S rDNA spacer sequence and fluorescence in situ hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*, *103*(5), 678-686.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(7), 1870–1874.
- Lan, T., & Albert, V. A. (2011). Dynamic distribution patterns of ribosomal DNA and chromosomal evolution in *Paphiopedilum*, a lady's slipper orchid. *BMC Plant Biology*, *11*(1), 126.
- Lanfear, R., Frandsen, P.B., Wright, A.M., Senfeld, T., Calcott, B. (2017) PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molec. Biol. Evol.* *34*, 772–773.
- Liao, D. (1999). Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. *American journal of human genetics*, *64*(1), 24.

- Mahelka, V., Kopecký, D., & Baum, B. R. (2013). Contrasting patterns of evolution of 45S and 5S rDNA families uncover new aspects in the genome constitution of the agronomically important grass *Thinopyrum intermedium* (Triticeae). *Molecular biology and evolution*, 30(9), 2065-2086.
- Matyašek, R., Fulnecek, J., Lim, K. Y., Leitch, A. R., & Kovarik, A. (2002). Evolution of 5S rDNA unit arrays in the plant genus *Nicotiana* (Solanaceae). *Genome*, 45(3), 556-562.
- Mlinarec, J., Šatović, Z., Mihelj, D., Malenica, N., & Besendorfer, V. (2012a). Cytogenetic and phylogenetic studies of diploid and polyploid members of tribe *Anemoninae* (Ranunculaceae). *Plant biology*, 14(3), 525-536.
- Mlinarec, J., Šatović, Z., Malenica, N., Ivančić-Baće, I., & Besendorfer, V. (2012b). Evolution of the tetraploid *Anemone multifida* (2n = 32) and hexaploid *A. baldensis* (2n = 48) (Ranunculaceae) was accompanied by rDNA loci loss and intergenomic translocation: Evidence for their common genome origin. *Annals of botany*, 110(3), 703-712.
- Mlinarec, J., Franjević, D., Bočkor, L., & Besendorfer, V. (2016). Diverse evolutionary pathways shaped 5S rDNA of species of tribe *Anemoneae* (Ranunculaceae) and reveal phylogenetic signal. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 182(1), 80-99.
- Nei, M. (1992). Balanced polymorphism and evolution by the birth-and-death process in the MHC loci. In *11th Histocompatibility workshop and conference, 1992*. Oxford University Press.
- Nei, M., & Rooney, A. P. (2005). Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu. Rev. Genet.*, 39, 121-152.
- Nicholas, K. B. (1997). GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnew. news*, 4, 14.
- Nikolaidis, N., & Nei, M. (2004). Concerted and nonconcerted evolution of the Hsp70 gene superfamily in two sibling species of nematodes. *Molecular biology and evolution*, 21(3), 498-505.
- Ronikier, M., Costa, A., Aguilar, J.F., Feliner, G.N., Küpfer, P., Mirek, Z., (2008). Phylogeography of *Pulsatilla vernalis* (L.) Mill. (Ranunculaceae): chloroplast DNA reveals two evolutionary lineages across central Europe and Scandinavia. *J. Biogeogr.* 35, 1650–1664.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P. (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542.

- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X., & Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, *19*(18), 2496-2497.
- Son, J. H., Park, K. C., Lee, S. I., Jeon, E. J., Kim, H. H., & Kim, N. S. (2012). Sequence variation and comparison of the 5S rRNA sequences in *Allium* species and their chromosomal distribution in four *Allium* species. *Journal of Plant Biology*, *55*(1), 15-25.
- Sramkó G., Laczkó L., Volkovac P.A., Batemane R.M., Mlinarec J., (2019). Evolutionary history of the Pasque-flowers (*Pulsatilla*, *Ranunculaceae*): Molecular phylogenetics, systematics and rDNA evolution. *Mol. Phylogenetics Evol.* *135*, 45–61.
- Sun, Y.-L., Park, W.-G., Oh, H.-K., Hong, S.-K., (2014). Genetic diversity and hybridization of *Pulsatilla tongkangensis* based on the nrDNA ITS region sequence. *Biologia* *69*, 24–31.
- Tamura, M., (1993). *Ranunculaceae*. In: Kubitzki, K., Rohwer, J., Bittrich, V. (Eds.), Flowering Plants · Dicotyledons. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 563–583.
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, *10*(3), 512-526.
- Tamura, M., (1995). II. Systematic Part. In: Hiepko, P. (Ed.), Die Natürlichen Pflanzenfamilien nebst ihren Gattungen und wichtigsten Arten, insbesondere den Nutzpflanzen. Band 17 a IV. *Angiospermae: Ordnung Ranunculales, Fam. Ranunculaceae*. Duncker & Humboldt, Berlin, pp. 223–519.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1997). CLUSTAL X multiple sequence alignment program. *European Molecular Biology Organization, Hamburg, Germany*.
- Volkov, R. A., Zanke, C., Panchuk, I. I., & Hemleben, V. (2001). Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, *103*(8), 1273-1282.
- Wang, W., Lin, L., Xiang, X.-G., Ortiz, R.d.C., Liu, Y., Xiang, K.-L., Yu, S.-X., Xing, Y.-W., Chen, Z.-D. (2016). The rise of angiosperm-dominated herbaceous floras: insights from *Ranunculaceae*. *Sci. Rep.* *6*, 27259.
- Wendel, J. F., Schnabel, A., & Seelanan, T. (1995). Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(1), 280-284.

- Xie, H., Bain, O., & Williams, S. A. (1994). Molecular phylogenetic studies on filarial parasites based on 5S ribosomal spacer sequences. *Parasite, 1*, 141.
- Zetzsche, H., 2004. Die Phylogeographie des Artkomplexes *Pulsatilla alpina* (*Ranunculaceae*). Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), p. 161.
- Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology & Evolution, 18*(6), 292–298.
- Zhang, Z., Inomata, N., Yamazaki, T., & Kishino, H. (2003). Evolutionary history and mode of the amylase multigene family in *Drosophila*. *Journal of molecular evolution, 57*(6), 702–709.
- Zhang Y, Hong Y, Ren C, Tang M, Hoot SB, Yang QE., (2015). Palynology, cytology, and molecular systematics of *Anemone* section *Begoniifolia* (*Ranunculaceae*). *Plant Syst Evol. 301*, 411–24.

9. SAŽETAK

Ivan Bakšić i Ana Dudaš

Značajke i evolucija 5S rDNA u vrstama iz roda *Pulsatilla* (Mill.)

Rod *Pulsatilla* (Mill.) sastoji se od četrdesetak vrsta te je smješten unutar skupine *Anemoneae*. U provedenom je istraživanju odabrano 16 vrsta iz navedenog roda te su iz njihove genomske DNA umnožene jedinice ponavljanja 5S rDNA koje su potom analizirane kako bi se rekonstruirao model evolucije 5S rDNA gena u rodu *Pulsatilla*. Rezultati bioinformatičkih analiza jedinica ponavljanja 5S rDNA pokazali su velike unutarvrstne varijabilnosti u nukleotidnom slijedu koje se znatno razlikuju za svaku ispitivanu vrstu. Analiziranjem unutarvrstne varijabilnosti jedinica ponavljanja 5S rDNA u vrstama koje su pokazale najveću varijabilnost primijećene su najviše stope mutacija u međugenskoj netranskribirajućoj razmaknici (NTS) koja ne sadrži regulatorne regije gena. Kod nekih klonova vrste *P. alpina* mutacije su pak uočene i u kodirajućoj i regulatornoj regiji te bi takvi klonovi mogli predstavljati pseudogene. U ovom se radu 5S rDNA pokazala kao dobar molekularni biljeg za filogenetska istraživanja. Filogenetskom je analizom pokazano grupiranje sekvenci 5S rDNA između istraživanih vrsta iz roda *Pulsatilla* u 6 skupina. Također je primijećeno kako se različiti tipovi sekvenci 5S rDNA iz poliploidnih vrsta *P. grandis*, *P. rubra*, *P. vulgaris* i *P. styriaca* pojavljuju u različitim skupinama što ukazuje na njihovo hibridno porijeklo. Grupiranje sekvenci poliploidnih vrsta *P. vulgaris* i *P. styriaca* s onima vrste *P. alpina* dovodi do zaključka kako bi *P. alpina* mogla biti jedna od roditeljskih vrsta navedenih aloploidna. Geni iz multigenskih porodica koje su evoluirale slijedeći model nastanka i nestanka gena pokazuju veliku unutarvrstnu varijabilnost u nukleotidnom slijedu, različite varijante dužina sekvenci, prisutnost pseudogena te grupiranje različitih tipova genskih sekvenci između vrsta. Dobiveni rezultati u ovom radu pokazuju kako je porodica gena 5S rDNA u ispitivanim vrstama iz roda *Pulsatilla* evoluirala slijedeći oba evolucijska modela, model nastanka i nestanka gena i model usklađene evolucije.

KLJUČNE RIJEČI: jedinice ponavljanja 5S rDNA, *Pulsatilla*, evolucijski model nastanka i nestanka gena, usklađena evolucija, aloploidne vrste

10. SUMMARY

Ivan Bakšić i Ana Dudaš

Characteristics and evolution of 5S rDNA unit arrays in species of the genus *Pulsatilla* (Mill.)

Genus *Pulsatilla* (Mill.) consists of approximately 40 species and belongs to the tribe *Anemoneae*. In conducted research 16 species of this genus have been chosen and 5S rDNA unit arrays were amplified from their genomic DNA which were then analyzed in order to reconstruct the evolution of 5S rDNA genes in genus *Pulsatilla*. The results of bioinformatic analysis of 5S rDNA unit arrays have shown great intraspecies sequence variability of the arrays which differ significantly for every investigated species. By analyzing intraspecies 5S rDNA unit arrays variability in species that showed the greatest variability, majority of mutations were detected in nucleotide sequence of NTS nonregulatory region. However, in some clones of species *P. alpina* mutations were detected in both coding and regulatory regions of 5S rDNA unit arrays which could result in occurrence of pseudogenes. In this research the 5S rDNA unit array has proved to be a useful molecular marker in the phylogenetic research. Phylogenetic analysis has shown interspecific clustering of 5S rDNA sequences in six different groups. This analysis has also showed the emergence of different types of 5S rDNA sequences from species *P. grandis*, *P. rubra*, *P. vulgaris* and *P. styriaca* in different sequence groups, which indicates their hybrid origin. Clustering of 5S rDNA sequences from polyploid species *P. styriaca* and *P. vulgaris* with those from species *P. alpina* indicates that *P. alpina* could be one of the parental species of these allopolyploids. The genes from multigene families that have evolved following the birth-and-death evolutionary model show a great intraspecies variability in nucleotide sequence, sequence length variants, presence of pseudogenes and an interspecific gene clustering pattern. Results obtained here therefore indicate that 5S rDNA multigene family in species of genus *Pulsatilla* evolved following both evolutionary models, the birth-and-death evolutionary model and concerted evolution.

KEYWORDS: 5S rDNA unit arrays, *Pulsatilla*, birth-and-death evolutionary model, concerted evolution, allopolyploid species