

Određivanje ploidnosti i raspodjela heterokromatina u vrstama iz roda *Polystachya* (Orhidaceae)

Šafran, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2012

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:217:926889>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-09**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marko Šafran

Određivanje ploidnosti i raspodjela heterokromatina u vrstama iz roda
Polystachya (Orhidaceae)

Diplomski rad

Zagreb, 2012.

Ovaj diplomski rad, izrađen u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta i Zavodu za sistematiku i evolucijsku botaniku Sveučilišta u Beču, pod vodstvom prof. dr. sc. Višnje Besendorfer, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

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

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

Posebno zahvaljujem Prof. Mary Rosabelle Samuel na velikoj pomoći koju mi je ukazala prilikom mog boravka u Beču, savjetima i podršci.

Zahvaljujem ostalim kolegama sa Zavoda za sistematiku i evolucijsku botaniku Sveučilišta u Beču na ukazanom gostoprimstvu, susretljivosti, tehničkoj pomoći, savjetima i pomoći u radu. Poimence to su: Michael H. J. Barfuss, Anton Russel, Barbara Rupp, Hanna Weiss-Schneeweis, Manfred Speckmaier.

Svim profesorima, docentima i asistentima Zavoda za molekularnu biologiju zahvaljujem na svim lijepim riječima i dobronamjernim savjetima.

Veliko hvala mojim prijateljima na beskrajnoj potpori tijekom studiranja i na mnoštvu nezaboravnih trenutaka iz naših studentskih dana.

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

ODREĐIVANJE PLOIDNOSTI I RASPODJELA HETEROKROMATINA U VRSTAMA IZ RODA *POLYSTACHYA* (ORHIDACEAE)

Marko Šafran

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Rod *Polystachya* Hook. sastoji se od približno 240 vrsta, koje su rasprostranjene na geografski širokom području. Do današnjih dana jako je mali broj objavljenih radova koji se bave problematikom molekularne citogenetike i filogenije roda *Polystachya*. Zadnja citološka analiza napravljena je 1979. godine i to na malom broju vrsta. Ovo istraživanje uključilo je do sada najveći broj vrsta sa svrhom određivanja točnog broja kromosoma unutar roda *Polystachya*. Proučene su ukupno 33 vrste sa širokog geografskog područja, te je ustanovljeno da je rod *Polystachya* vrlo homogen obzirom na broj kromosoma. Osnovni komplement sadrži dvadeset kromosoma ($x=20$). Najveći broj vrsta su diploidi s $2n=2x=40$ kromosoma, dok su 8 vrsta tetraploidi ($2n=4x=80$) i samo jedna vrsta je heksaploid ($2n=6x=120$). Ne postoje velike varijacije u raspodjeli i položaju heterokromatina unutar roda. Najveći broj vrsta ima heterokromatinske blokove u pericentromernom području.

(36 stranica, 10 slika, 3 tablice, 55 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Polystachya*, broj kromosoma, heterokromatin

Voditelj: Prof. dr. sc. Višnja Besendorfer

Pomoćni voditelj: Dr. sc. Jelena Mlinarec Novosel

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Višnja Besendorfer, Prof. dr. sc. Zlatko Liber, Doc. dr. sc. Damjan
Franjević

Rad prihvaćen: IV. redovna sjednica Biološkog odsjeka, 11.01.2012.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation thesis

PLOIDITY LEVEL AND HETEROCHROMATIN DISTRIBUTION IN SPECIES FROM GENUS *POLYSTACHYA* (ORHIDACEAE)

Marko Šafran

Rooseveltovo trg 6, 10000 Croatia

Polystachya Hook. consists of approximately 240 species, ranging over a wide geographic area. Up to now a very small number of papers dealing with molecular cytogenetics and phylogeny of the genus *Polystachya* were published. Last cytological analysis was made in year 1979 but it included only a small number of species. This research has involved the largest number of species so far, analyzing total number of 33 species from wide geographical area with the purpose of determining the correct number of chromosomes within the genus *Polystachya*. It was found that the genus *Polystachya* is very homogeneous in the context of chromosome number. Basic complement contains twenty chromosomes ($x=20$). Most of the species are diploids with $2n=2x=40$ chromosomes, while 8 species are tetraploid ($2n=4x=80$) and only one species is hexaploid ($2n=6x=120$). There are no significant variations in the distribution and position of heterochromatin within the genus. Most of the species possess heterochromatin blocks located in the pericentromeric region.

(36 pages, 10 figures, 3 tables, 55 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central biological library.

Key words: *Polystachya*, chromosome number, heterochromatin

Supervisor: Dr. Višnja Besendorfer, Associate Professor

Assistant: Dr. Jelena Mlinarec Novosel

Reviewers: Dr. Višnja Besendorfer, Dr. Zlatko Liber, Dr. Damjan Franjević

Thesis accepted: Division of Biology, IV. regular Session, 11.01.2012.

SADRŽAJ

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | UVOD | 1 |
| 1.1 | Rod <i>Polystachya</i> (Orhidaceae) | 1 |
| 1.2 | Poliploidnost i njezina uloga u razvoju biljaka | 4 |
| 1.2.1 | Mehanizmi nastanka poliploida | 4 |
| 1.2.2 | Evolucijska važnost poliploidije | 7 |
| 1.3 | Heterokromatin i njegova uloga u genomu | 8 |
| 1.4 | Fluorescentna mikroskopija..... | 10 |
| 1.4.1 | Osnovna načela fluorescencije | 10 |
| 1.4.2 | Fluorescencijski mikroskop..... | 12 |
| 1.5 | Upotreba fluorescencijske mikroskopije u citogenetici..... | 15 |
| 1.6 | Cilj istraživanja..... | 16 |
| 2 | MATERIJALI I METODE | 17 |
| 2.1 | MATERIJALI..... | 17 |
| 2.1.1 | Osnovne kemikalije i materijali | 17 |
| 2.1.2 | Biljni materijal..... | 18 |
| 2.2 | METODE..... | 19 |
| 2.2.1 | Sakupljanje, fiksacija i predtretman biljnog materijala..... | 19 |
| 2.2.2 | Izrada kromosomskih preparata | 20 |
| 2.2.3 | Bojanje fluorescentnom bojom DAPI..... | 20 |
| 2.2.4 | Bojanje kromomicinom A ₃ | 21 |
| 2.2.5 | Vizualizacija kromosomskih preparata i analiza slika | 21 |
| 3 | REZULTATI..... | 22 |
| 3.1 | BROJ KROMOSOMA I STUPANJ POLIPLOIDIJE..... | 22 |
| 3.2 | POLOŽAJ I RASPODJELA HETEROKROMATINA | 24 |
| 4 | RASPRAVA | 27 |
| 5 | ZAKLJUČAK | 31 |
| 6 | LITERATURA | 32 |

1 UVOD

1.1 Rod *Polystachya* (Orhidaceae)

Rod *Polystachya* Hook. sastoji se od otprilike 240 vrsta, koje su rasprostranjene na geografski vrlo širokom području. Staništa ovog roda protežu se kroz cijeli tropski pojas, uz iznimku od nekoliko vrsta koje obitavaju u suptropskom području južne Afrike (Govaerts i sur., 2009). Dressler (1993) ih je smjestio u podtribus *Polystachyinae* zajedno s rodovima *Hederorkis* Thou., *Imerinaea* Schltr. i *Neobenthamia* Rolfe. Daljnjim istraživanjima pokazano je da navedena klasifikacija nije u potpunosti točna. Pokazano je na temelju analize DNA da monotipski rod *Imerinaea* (endemičan rod sa Madagaskara) pripada podporodici Eulophiinae (Cymbideae) (Pridgeon i sur., 2010, neobjavljeno) a analiza DNA roda *Hederorkis* još uvijek nije izrađena zbog manjka materijala. Inače, radi se o rodu koji se sastoji od samo dvije vrste, jedna je endemski primjerak koji se može naći na Sejšelima a druga je također endem karakterističan za Mauricijus. Za rod *Neobenthamia* pokazano je upotrebom molekularnih biljega da je u bliskom srodstvu sa rodom *Polystachya* (Reich, 2006) te će se u svrhu ovog istraživanja koristiti sinonim *Polystachya neobenthamia* Schltr. umjesto *Neobenthamia gracilis* Rolfe.

Na temelju analize morfoloških podataka, Freudenstein i Rasmussen (1999) su pokazali da postoji bliska veza između podtribusa *Polystachyinae* i velikog tribusa *Vandaeae*. To su kasnije potvrdili Cameron (2001), a zatim van den Berg i suradnici (2005) koji su ih okarakterizirali kao sestrinske skupine. No i ovdje nije postignuta u potpunosti suglasnost između autora. Naime, Carlsward i sur. (2006a, 2006b) su se odlučili za ipak nešto striktniju podjelu. U svojim istraživanjima, naglasili su nekoliko bitnih značajki podtribusa *Vandaeae*; monopodijalni habitus, gubitak tilosoma i lučenja mukoznih tvari, prisutnost sferičnih silicijskih tjelešaca u sklerenhimu lista, po čemu se bitno razlikuju od podtribusa *Polystachyinae*. Morfološka obilježja roda *Polystachya* uključuju terminalni cvat koji sadrži cvjetove raspoređene u grozd ili metlicu.

Većina vrsta ovog roda su epifiti ili epiliti, ali par vrsta uključujući i *P. neobenthamia* su terestrijalne vrste. Velika raznolikost unutar roda (Slika 1) može se pratiti preko niza morfoloških obilježja kao što su: veličina same biljke, izgled vršnog meristema, struktura pseudolukovice, veličina i oblik cvata, izgled cvijeta (varijacije u broju cvjetova, njihovoj gustoći, veličini i boji), veličina i oblik cvjetnih organa (posebno velika raznolikost labeluma i mentuma). Ovakva velika raznolikost u građi cvjetnih organa unutar porodice Orchidaceae, objašnjava se specifičnosti prema raznovrsnim životinjskim oprašivačima (Waterman i Bidartondo, 2008). Kod roda *Polystachya* čin samog oprašivanja nije dosada proučavan u detalje, ali je primijećeno da pčele iz reda Hymenoptera posjećuju vrstu *P. rosea* unatoč manjku nektara i hranjivih dlačica (Pettersson i Nilsson, 1993) dok muhe iz porodice Syrphidae posjećuju vrstu *P. concreta*.



Slika 1. Prikaz morfološke raznolikosti kod nekih tipičnih vrsta iz roda *Polystachya*. Redom su prikazane vrste *P. bella* (a), *P. affinis* (b), *P. rosea* (c), *P. bennettiana* (d), *P. eurygnatha* (e).

Do današnjih dana jako je mali broj objavljenih radova koji se bave problematikom klasifikacije i veličine roda *Polystachya*. Zadnje taksonomsko istraživanje kojem je bio cilj pobrojati točan broj vrsta proveo je Kraenzlin u svojoj monografiji 1926. godine. Od 1926., sva taksonomska istraživanja koja su bila provedena, obuhvaćala su manja geografska područja i mali broj vrsta (Cribb, 1978; Geerinck, 1979; Podzorski i Cribb, 1979; Stévant i Nguema, 2004). Zahvaljujući sve većem broju herbarijskih primjeraka došlo je do otkrića novih vrsta. To je naposljetku uvjetovalo brojne promjene u klasifikaciji unutar roda. Prema sustavu predloženom od strane Kraenzlina (1926), Summerhayesa, (Summerhayes 1942, 1947; Brenan, 1954) i Cribba (1978) rod je podijeljen u 15 sekcija koje su objedinile njihove vegetativne značajke te oblik i građu cvijeta. Naprimjer, pseudolukovica s jednim apikalnim listom karakteristika je sekcije *Cultriformes* Kraenzl. dok je gusti cvat s malim cvjetovima karakteristika sekcije *Polychaete* P.J.Cribb. Neke sekcije su okarakterizirane s većim brojem značajki pa se unutar njih nalazi samo nekoliko predstavnika, dok je većina sekcija okarakterizirana s malim brojem značajki te obuhvaćaju puno veći dio roda.

Flore du Cameroun (Szlachetko i Olszewski, 2001) i Flore du Gabon (Szlachetko i sur., 2004) koriste drugačiju klasifikaciju nego Flora Zambesiaca (La Croix i Cribb, 1998) i Flora of Tropical East Africa (Cribb, 1984). Neke morfološki različite vrste su razdvojene i smještene u različite rodove (Mytnik-Ejsmont, 2007; Mytnik-Ejsmont i Szlachetko, 2007a,b, 2008a,b,c) ali ne postoje nikakvi filogenetski dokazi za takvu podjelu. Iz svega gore navedenog može se zaključiti da je problem sistematike unutar samog roda *Polystachya* daleko od rješenja.

Prema tome, potrebno je provesti dobro osmišljeno filogenetsko istraživanje koje bi pomoglo riješiti odnose unutar roda i napraviti reviziju postojeće klasifikacije. Takvo istraživanje započeto je 2007. godine od strane istraživača sa Zavoda za sistematiku i evolucijsku botaniku Sveučilišta u Beču uz suradnju Zavoda za molekularnu biologiju Sveučilišta u Zagrebu. Rezultati tog istraživanja dio su ovog diplomskog rada.

Za razliku od ostalih rodova unutar porodice *Orhidaceae*, rod *Polystachya* ima neobično veliku rasprostranjenost vrsta (Pridgeon i sur., 2005). Većina vrsta nalazi se na Afričkom kontinentu, dok se 20 vrsta nalazi na prostorima tropske Amerike, 25 vrsta na otocima Indijskog oceana te 5 vrsta u Gvinejskom arhipelagu (Govaerts i sur., 2009). Većina vrsta ima više ili manje ograničeno stanište, ali neke vrste su jako zastupljene na velikom geografskom području. Najbolji primjer za to je vrsta *Polystachya concreta* čije se stanište proteže kroz šume tropske i neotropске Afrike, do otoka u Indijskom oceanu, južne Indije, Šri Lanke i

jugoistočne Azije. Ali ipak, treba naglasiti da ovakva geografska rasprostranjenost vrste *P. concreta* nije opće prihvaćena zbog toga jer pripadnici sa različitih geografskih područja variraju u svojoj morfologiji. Na ovom primjeru se također vidi i jedan od najvećih problema klasifikacije samog roda, a to je problem granice određene vrste. Vrlo je teško odrediti gdje jedna vrsta počinje a druga završava zbog tako prostorno raširenih populacija.

Poliploidnost je česta značajka većine stablašica, pa je tako nalazimo i unutar roda *Polystachya* i povezana je s razlikama u staništima i prilagodbama na njih. Osnovni broj kromosoma unutar roda je $x=20$ a većina vrsta su diploidni organizmi ($2n=2x=40$). U dosadašnjim istraživanjima pokazano je da su neke vrste unutar roda tetraploidi ($2n=4x=80$) dok se za vrstu *Polystachya pubescens* smatra da je heksaploid ($2n=6x=120$).

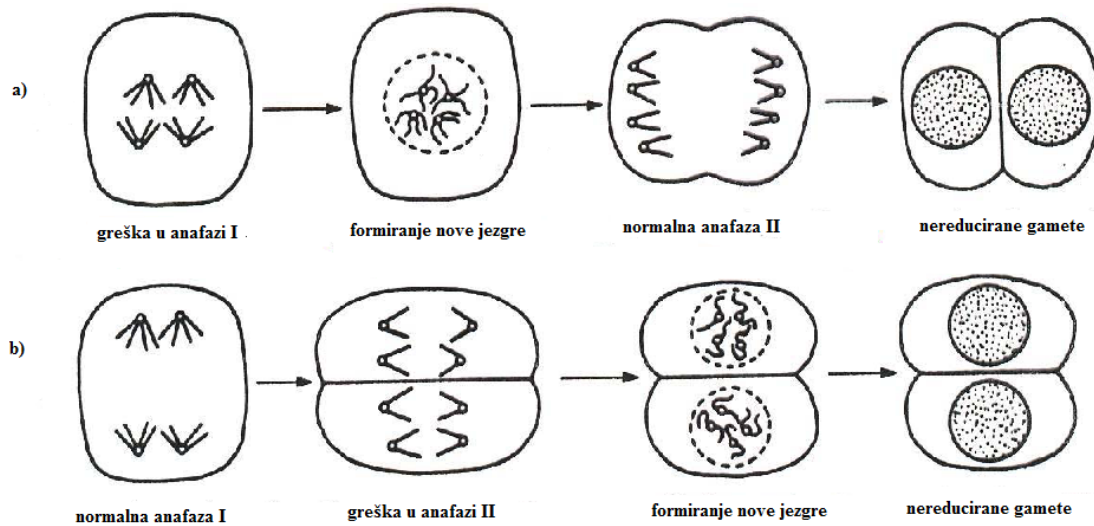
1.2 Poliploidnost i njezina uloga u razvoju biljaka

Poliploidizacija je proces u kojem se broj kromosoma uvećava umnažanjem cijelog kromosomskog seta. Stanice nastale ovim procesom sadrže po tri ili više setova kromosoma koji mogu potjecati od iste (autopoliploidija) ili od dvije različite vrste (alopoliploidija). Takva mutacija u genomu dovodi najčešće do velikih promjena na razini stanice (promjena u metabolizmu, obliku i veličini stanice) ili do promjene fenotipskih značajki jedinke. Te promjene ne moraju biti nužno pozitivne. Usprkos tome poliploidija je prisutna u velikom broju eukariota. Štoviše, većina današnjih stablašica te kraljeznjaka potječe od poliploidnog pretka.

1.2.1 Mehanizmi nastanka poliploida

Kao što je već navedeno, postoje dva osnovna tipa poliploidije, ovisno o porijeklu dupliciranih kromosomskih setova. Ako svi kromosomski setovi potječu od jedne vrste govorimo o autopoliploidiji. Do nastanka autopoliploida može doći na jedan od sljedeća dva načina: spontanom udvostručavanjem kromosoma do kojeg dolazi zbog formiranja nefunkcionalnog diobenog vretena u anafazi I ili anafazi II mejotske diobe (nastaju nereducirane diploidne gamete) ili nastaju somatskim udvostručavanjem kromosoma nakon

oplodnje (Slike 2 i 3). Do ovog procesa može doći spontano, ali se isto tako može inducirati povišenom temperaturom, fizičkim šokom ili raznim citostaticima kao što je npr. kolhicin. Ako se mladi pileći embriji izlože visokim temperaturama na kratko vrijeme, dolazi do nastanka autopoliploidnih embrija (Dorsey, 1936; Müntzing, 1936), a ako se biljke kukuruza izlože temperaturi od 40°C otprilike 24 sata nakon oplodnje nastat će 1,8% tetraploidnog i 0,8% oktaploidnog sjemena (Müntzing, 1936).



Slika 2. Shematski prikaz mehanizma nastanka autopoliploida zbog pogreške tijekom mejoze. Nastanak diploidne gamete zbog pogreške u anafazi I (a) i anafazi II mejotske diobe (b).

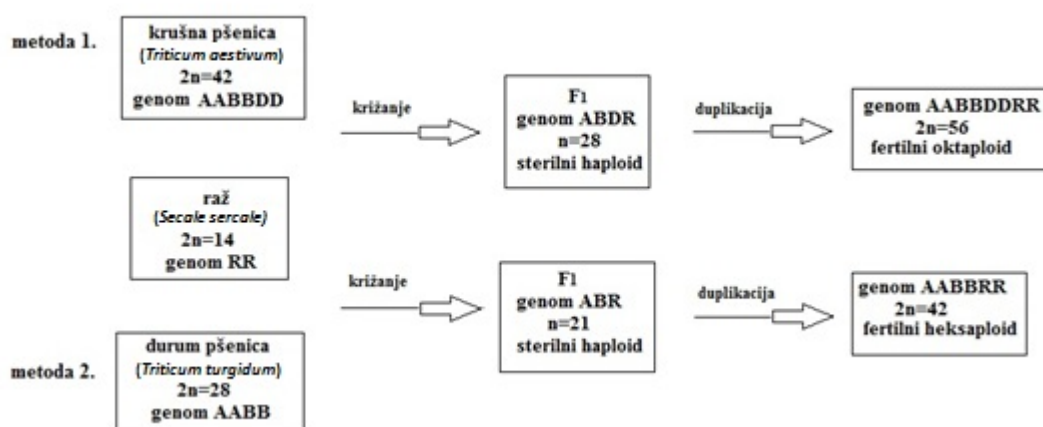


Slika 3. Shematski prikaz mehanizma nastanka autopoliploida zbog procesa somatskog udvostručavanja kromosoma (pogreška u mitozu).

Mnoštvo biljaka koje koristimo u današnje vrijeme, genetički gledano su autoploidoidi. Kultivirani krumpir (*Solanum tuberosum*) je tetraploid sa $2n=4x=48$ dok se krizanteme ($x=9$) javljaju u varijantama s $2n$, $4n$, $6n$, $8n$ i $10n$ brojem kromosoma. Također do autoploidoida se danas dolazi i eksperimentalno u svrhu poboljšanja svojstava i veličine same biljke. Tako na primjer, triploidne lubenice ne stvaraju sjemenke dok tetraploidne jabuke sorte McIntosh proizvode „jumbo“ plodove.

Drugi oblik poliploidije, aloploidoidija, najčešće nastaje procesom hibridizacije tj. križanjem srodnih ili poliploidnih vrsta. Na taj način dobivene su mnoge danas važne agrikulturne biljke poput duhana (*Nicotiana tabacum*, $2n=4x=48$) koji je nastao križanjem vrsta *N. sylvestris* i *N. tamentosiformis*, pšenice (*Triticum aestivum*, $2n=6x=42$) nastale križanjem triju vrsta divljih trava. Proces hibridizacije može biti induciran i od strane čovjeka, ali nije toliko uspješan kao proces proizvodnje autoploidoida i vremenski je puno zahtjevniji jer je najčešće potrebno proći nekoliko ciklusa križanja i selekcije prije negoli se dobije genotip koji stvara zadovoljavajući broj kvalitetnih gameta.

Uspješnost se može povećati pažljivim odabirom potencijalnih roditelja. Pokazano je da korištenje roditelja niske ploidnosti povećava vjerojatnost formiranja fertilnog potomka. Možda najbolji primjer umjetno stvorenog aloploidoida je *Triticale*, hibrid uzgojen križanjem pšenice (*Triticum*) i raži (*Secale*) (Slika 4). Na taj način dobiven je hibrid koji posjeduje sve kvalitete komercijalne pšenice sa otpornošću raži. Potomci nastali ovim križanjem (F1 generacija) su sterilni zbog formiranja univalenata i nepravilne gametogeneze te ne posjeduju nikakva obilježja raži. Tek nakon udvostručavanja broja kromosoma upotrebom kolhicina nastaje vrsta koja može stvarati sjeme.



Slika 4. Shematski prikaz nastanka aloploidoida *Triticale*. Prvom metodom križa se krušna pšenica s raži te nastaje oktaploid, a drugom metodom nastaje heksaploid križanjem durum pšenice i raži.

1.2.2 Evolucijska važnost poliploidije

Primijećeno je da kod novo formiranih poliploida, genom prolazi kroz česte promjene zbog svoje nestabilnosti (Wendel, 2000). Song i sur. (1995) su primijetili značajan rearanžman genoma i gubitak nekih fragmenata unutar prvih pet generacija kod novonastalih poliploida unutar roda *Brassica*. U većini slučajeva radi se o aloploidima a razlog tome je sam proces hibridizacije. Pokretni genetički elementi koji su inaktivirani u roditeljskim linijama, mogu se aktivirati u hibridima i na taj način pridonijeti premještanju gena unutar genoma i nesimetričnom crossing-overu (Josefsson i sur, 2006). Do promjena unutar genoma dolazi i kod autoploida. Primijećena je redukcija u veličini genoma i to u obliku kromosomskih gubitaka kod autotetraploida vrsta *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae* sve do stanja ponovne diploidnosti (Gerstein i sur., 2006). Točan mehanizam ovih redukcija nije poznat, ali slična pojava je primijećena u ljudskim staničnim linijama koje su prošle proces endopoliploidizacije pod učinkom karcinogena (Rajaraman i sur, 2005).

Poliploidija ne dovodi samo do promjena u pokretljivosti pojedinih dijelova genoma, nego se javljaju i promjene na razini ekspresije gena. To je najvidljivije na primjerima aloploidima, gdje dolazi do promjene na razini metilacije (Salmon i sur, 2005), narušavanja heterokromatinskih struktura (Josefsson i sur, 2006), promjena u imprintingu i neravnomjerne ekspresije kod homolognih kromosoma (Udall i sur., 2006). Takve promjene u genskoj ekspresiji su najčešće tkivno specifične (Adams i sur, 2003). Uzrok navedenih promjena u genskoj ekspresiji je divergencija između roditeljskih vrsta i sama hibridizacija. Prema tome, za pretpostaviti je da autoploidni, pokazuju puno manju promjenu u genskoj ekspresiji, što je i pokazano „microarray“ analizom na kukuruzu (Guo i sur, 1996) i kvascu (Galitski i sur., 1999), te proteomskom analizom kupusa (Albertin i sur., 2005). Također je pokazano da što je veća razlika između roditeljskih linija, veća je promjena u genskoj ekspresiji (Song i sur., 1995). Prema tome, postoji mogućnost i da autoploidni nastali od jedinke koja je postepeno divergirala unutar svoje vrste, pokazuju promjene na razini genske ekspresije i pokretljivosti genoma.

Pojava poliploidnih jedinki unutar populacije i njihova genetička raznolikost nije dovoljna za preživljavanje i formiranje novih vrsta. Primarni uvjet je da poliploid mora dovoljno dugo živjeti unutar populacije da bi evolucija mogla početi djelovati, a to se može postići samo ako jedinka nije odmah potisnuta od strane svojih diploidnih rođaka. Najveći problem je taj što poliploidija smanjuje fertilitet a na taj način i stopu preživljavanja. Ramsey i Schemske

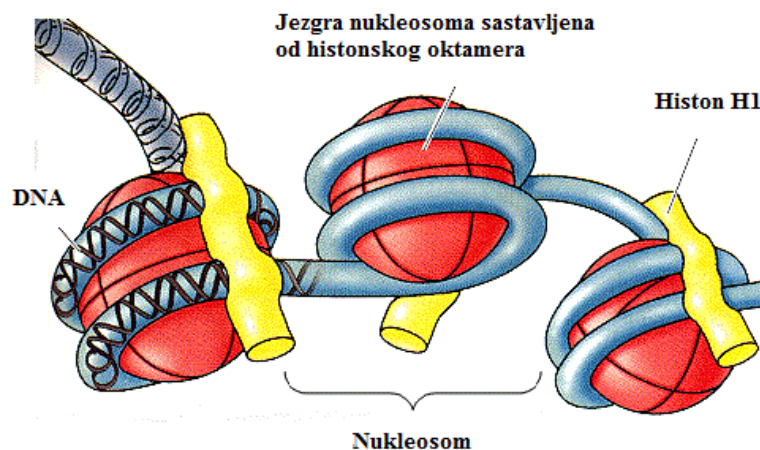
(2002) su otkrili 20% smanjenje viabilnosti peluda i 50% smanjenje u proizvodnji sjemena kod novo formiranih poliploida. No u nekim slučajevima, nove značajke (tolerancija na sušu i patogene) su pogodnije za trenutačno stanje u okolišu ili guraju poliploide u drugu ekološku nišu.

Sljedeća prepreka opstanku poliploida unutar populacije je razmnožavanje. Razmnožavanjem između novonastalog tetraploida i divljeg tipa (diploidna jedinka) nastaje triploidna jedinka s jako niskom stopom preživljavanja. Pokazano je da je klijavost triploidnog sjemena jako niska (Ramsey i Schemske, 1998), vjerojatno zbog neravnoteže u imprintingu majčinih i očevih gena u endospermu (Haig i Westoby, 1991). Čak i ako triploidi prežive i sazriju u odrasle jedinke, njihova fertilnost je opet smanjena zbog proizvodnje aneuploidnih gameta (Ramsey i Schemske, 1998). Međutim poliploidi su razvili nekoliko mehanizama kojima uspješno savladavaju ove prepreke: sposobnost samooplodnje, preživljavanje sve dok se ne nađe prikladan partner, selektivno razmnožavanje na temelju sličnih značajki (veličina, vrijeme cvjetanja, stanište). Pokazano je da genetika i okoliš igraju važnu ulogu u učestalosti pojave poliploida u populaciji, pa je vrlo vjerojatno da ako se pojavio jedan poliploid mora ih biti još.

Iz gore iznesenih argumenata vidi se da je proces opstanka poliploida unutar populacije vrlo složen i zahtjevan proces, ali je vrlo koristan za evoluciju cijele vrste kada do njega dođe zbog toga jer uvodi raznolikost. Pokazano je da poliploidi imaju prednost nad diploidima zbog veće sposobnosti maskiranja letalnih mutacija. Također, poliploidi puno manje pate od smanjenja stope preživljavanja koja nastaje kao rezultat križanja bliskih srodnika (inbreeding), zbog toga jer je vjerojatnost formiranja homozigota znatno smanjena (Ronfort, 1999). Visoka razina ploidnosti povećava ukupan broj kopija gena, što povećava vjerojatnost pojave pozitivne mutacije, koja može dovesti do duplikacije gena te do pojave novih svojstava.

1.3 Heterokromatin i njegova uloga u genomu

Unutar eukariotske stanice, genomska DNA je upakirana zajedno s histonima i nehistskim proteinima u strukturu koja se naziva kromatin. Svaka kromatinska podjedinica (nukleosom) sastoji se od DNA dužine 146 baznih parova omotane oko oktamerne strukture sastavljene od histona (H2A, H2B, H3, H4), a cijelu strukturu drži na okupu histon H1 (Luger i sur., 1997).



Slika 5. Shematski prikaz strukture nukleosoma.

Još 1928. godine, Heitz je na temelju razlike u kompaktnosti primijetio da se interfazna jezgra sastoji od dvije vrste kromatina. Eukromatin je slabo kondenziran i više otvoren prema okolišu što olakšava njegovu transkripciju, dok je heterokromatin jako kondenziran, teško dostupan i ima visok stupanj strukturne organizacije. Kromosomske regije koje sadrže veliku količinu uzastopno ponavljajuće DNA (centromere, telomere) građene su najčešće od heterokromatina. Takve regije ostaju kondenzirane kroz cijeli stanični ciklus, te se nazivaju konstitutivni heterokromatin. Međutim, heterokromatin se može naći unutar regija s reguliranom genskom ekspresijom, gdje njegov nastanak i razgradnja ovisi o staničnim signalima i genskoj ekspresiji. Regije s takvim značajkama nazivaju se fakultativni heterokromatin. Na taj način dolazi do regulacije genske ekspresije unutar čitave regije neovisno o promotorskim sekvencama gena koji se u njoj nalaze. Takav oblik regulacije naziva se utišavanje. Najbolji primjer ovakve regulacije je inaktivacija X kromosoma kod ženki sisavaca, gdje se heterokromatizira cijeli kromosom što uzrokuje njegovu inaktivaciju (Boumil i sur., 2001). Uloga heterokromatina nije samo gensko utišavanje, on obavlja još mnoge važne biološke funkcije. Sprečava proces rekombinacije između raspršenih ponavljajućih DNA elemenata u genomu, te na taj način štiti njegov integritet. Ukoliko se naruši heterokromatinska struktura, centromer postaje nefunkcionalan i dolazi do nepravilne segregacije kromosoma (Allshire i sur., 1995; Kellum i Alberts, 1995). Defekt u heterokromatinu utječe na jezgrinu strukturu i na interakcije između udaljenih cis-djelujućih regulatornih proteina i ciljanih lokusa prilikom razvoja i diferencijacije (Jia i sur., 2004).

Također, postoji i nekoliko primjera gdje je nastanak heterokromatina uvjet za aktivaciju ekspresije gena (Lu i sur., 2000). Pokazano je da sastav i položaj konstitutivnog heterokromatina uvelike varira između vrsta unutar istog roda te se korištenjem tih saznanja može izraditi kariogram specifičan za svaku pojedinu vrstu (Mlinarec i sur. 2012). Na temelju tog karakteričnog položaja konstitutivnog heterokromatina mogu se rekonstruirati razni evolucijski događaji koji su pratili razdvajanje vrsta unutar rodova (Kao i sur., 2001).

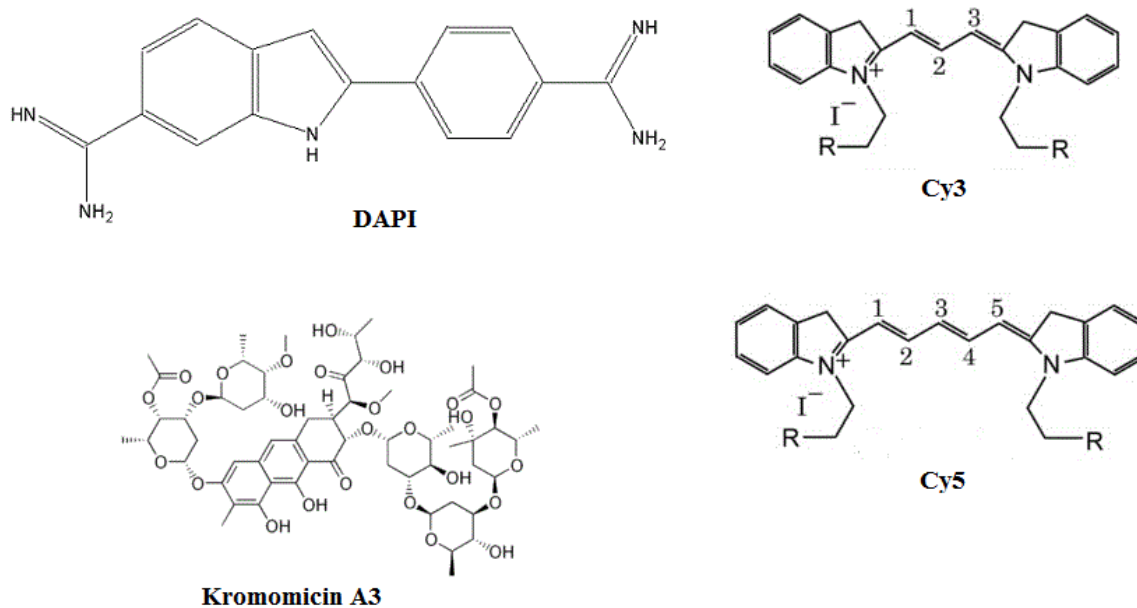
1.4 Fluorescentna mikroskopija

Kako je znanost napredovala, došlo je do potrebe da se biološki sustavi (stanice, tkiva) vizualiziraju na sve kvalitetnije načine jer su objekti promatranja postali sve specifičniji i teško uočljivi upotrebom klasične svjetlosne mikroskopije. U posljednjih nekoliko desetljeća, najviše pažnje se posvećivalo povećanju kontrasta između onog što promatramo (signal) i svega ostaloga (pozadina). Metoda koja najbolje naglašava granicu između signala i pozadine je zasigurno fluorescentna mikroskopija. Njezin cilj je prikazati samo objekt koji promatramo na potpuno tamnoj pozadini, bez smetnji i artefakata. Veliku pomoć ovakvom načinu vizualizacije pružila je organska kemija, koja je proizvela preko 3000 različitih fluorescentnih proba (<http://probes.invitrogen.com/handbook/>; the Molecular Probes Handbook, deseto online izdanje) pomoću kojih je danas moguće obilježiti u potpunosti svaki dio biološkog sustava. Nova tehnološka dostignuća omogućila su dodatnu preciznost prilikom proučavanja bioloških sustava, jer je korištenjem lasersko-skenirajućeg konfokalnog mikroskopa i „two-photon“ mikroskopa omogućeno dodavanje treće dimenzije preparatima. Zbog svih ovih razloga, gotovo je nezamislivo provesti stanično ili molekularno istraživanje bez uvođenja fluorescencije u sustav od interesa.

1.4.1 Osnovna načela fluorescencije

Do pojave fluorescencije dolazi kada objekt promatranja emitira svjetlost svega nekoliko nanosekundi nakon što je došlo do apsorpcije zračenja kraće valne duljine. Da bi promatrani objekt imao svojstvo fluorescencije, na njega je potrebno vezati molekulu zvanu fluorofor

(Slika 6). Većina takvih molekula ima prstenastu strukturu (aromatske molekule) koja sadrži tzv. pi vezu, koja omogućuje veliku pokretljivost vanjskih elektrona. Također, važno svojstvo takvih spojeva je to da je razlika između osnovnog i pobuđenog stanja vrlo mala, pa se takve molekule mogu pobuditi čak i s fotonima vidljive svjetlosti koji imaju malu energiju. Općenito pravilo je, više dvostrukih veza unutar molekule, manja je energija potrebna za ekscitaciju. Ujedno, ako molekula ima veći broj pi veza tada je učinkovitost fluorescencije veća.



Slika 6. Strukturne formule nekolicine komercijalnih fluorofora

Kada molekula fluorofora apsorbira svjetlost, kompletna energija fotona se prenosi na fluorofor. Energija koja je apsorbirana odgovara izrazu:

$$E = \frac{h \times c}{\lambda} ;$$

h – Planckova konstanta
 c – brzina svjetlosti
 λ – valna duljina apsorbiranog fotona

Ovisno o količini apsorbirane energije, elektron će skočiti iz osnovnog u jedno od pobuđenih stanja. Ako je energija dovoljno velika, molekula će također doživjeti promjenu u svojoj vibraciji i rotaciji. Vjerojatnost molekule da apsorbira foton naziva se molarni ekscitacijski koeficijent ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$). Ovom fizikalnom veličinom mjeri se vjerojatnost apsorpcije svjetlosti

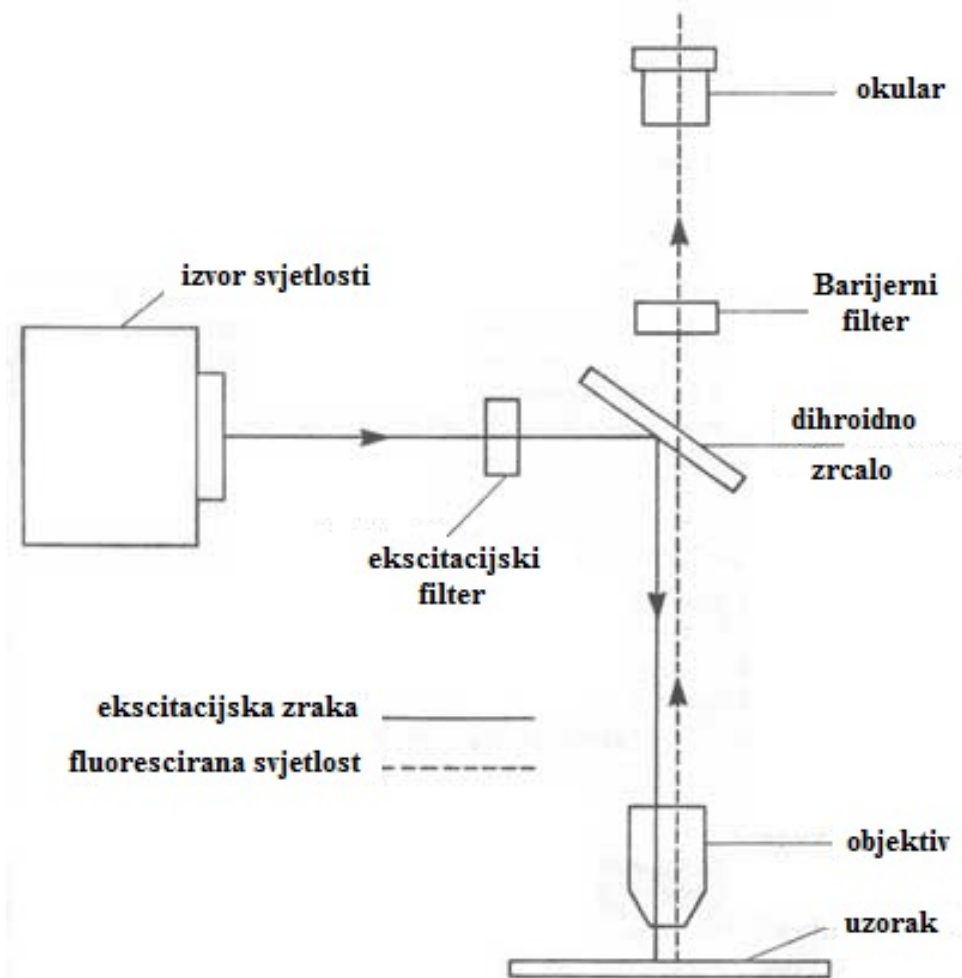
od strane molekule dok ona prolazi kroz medij. Molekula fluorofora može se smatrati „metom“, pa prema tome, što je molekula veća to je veća vjerojatnost da će uhvatiti foton. Većina organskih molekula ima vrijednost molarnog ekscitacijskog koeficijenta između 25 000 i 200 000. Fluorofori s velikim ϵ , su posebno korisni kada je potrebno držati intenzitet svjetla na minimumu (mikroskopiranje živog tkiva) ili kada postoji jako malen broj fluorofora.

Postoji nekoliko načina na koji pobuđena molekula gubi apsorbiranu energiju te se na taj način vraća u osnovno stanje. Kod molekula koje su dobri fluorofori, većina energije se oslobađa u obliku zračenja valne duljine veće od one koja je uzrokovala ekscitaciju. Fotoni koji su nastali prilikom vraćanja molekule u osnovno stanje detektiraju se fluorescencijskim mikroskopom.

1.4.2 Fluorescencijski mikroskop

Pojavu fluorescencije po prvi puta detaljno je proučavao Sir George Gabriel Stokes pomoću sljedećeg pokusa. Upotrijebio je prozorsko staklo obojeno u ljubičasto kako bi filtrirao sunčevu svjetlost koja je obasjavala bocu vodene otopine kinina. Koristeći čašu bijelog vina kao filter (sprečava prolaz ljubičaste svjetlosti), primijetio je da vodena otopina emitira plavu svjetlost. U današnje vrijeme, dizajn fluorescencijskog mikroskopa se značajno promijenio ali fizikalni princip je ostao isti kao i u Stokes-ovom pokusu → osvijetliti preparat jednom valnom duljinom, a zatim uz pomoć filtera proučavati povratnu zraku veće valne duljine.

Danas se u tu svrhu najviše koristi fluorescencijski mikroskop s epi-osvjetljenjem (Slika 7). Kod ovakvog tipa mikroskopa, objektiv uz svoju osnovnu ulogu ima i ulogu kondenzatora koji osvjetljava preparat. Ovaj tip mikroskopa ima prednost naspram transmisijskog fluorescencijskog mikroskopa (pobuđujuće zračenje prolazi kroz kondenzator, a zatim se emisijsko zračenje sakuplja uz pomoć objektiva) u tome što je postotak svjetlosti koja se reflektira od površine uzorka natrag u mikroskop vrlo mala.



Slika 7. Shematski prikaz glavnih optičkih dijelova epi-fluorescencijskog mikroskopa

Problem kod ovakvog tipa mikroskopa je taj da pobuđujuće zračenje i emisijsko zračenje prolaze kroz isti optički put, pa je potreban dodatni dio optike kako bi se ta dva zračenja razdvojila. U tu svrhu se koristi posebna leća zvana dihroidno zrcalo. Njena uloga je razdvojiti pobuđujuću svjetlost od emisijske. Kod epi-fluorescencijskog mikroskopa dihroidno zrcalo se nalazi pod kutom od 45° naspram osi kroz koju prolazi pobuđujuća svjetlost. Također, uz dihroidno zrcalo, najčešće se nalaze još dva dodatna filtera. Ekscitacijski filter (omogućuje prolaz pobuđujuće svjetlosti točno određene valne duljine) te barijerni filter koji dozvoljava samo prolaz svjetlosti veće valne duljine od one koja je uzrokovala fluorescenciju. Takav sustav filtera omogućava vrlo precizne uvjete rada jer samo jedan foton od njih deset tisuća koji stignu do preparata bude pogrešne valne duljine.

U današnje vrijeme, fluorescencijski mikroskopi omogućuju rad na nekoliko „kanala“ tj. mogu vizualizirati emisijske zrake različitih valnih duljina. To se postiže na taj način da se unutar mikroskopa ugradi linearni ili kružni niz nekoliko zasebnih (najčešće između tri i devet) filtarskih kutija koje se zatim mogu ručno ili kompjuterski uz pomoć motora, mijenjati ovisno o potrebi. Zbog tehničkih ograničenja, sve filtarske kutije nisu savršeno poravnate, pa dolazi do malog pomaka slike kod korištenja različitih filtara. Taj problem može se zaobići uz korištenje sofisticiranog sustava optike. Koristi se dihroidno zrcalo okruženo mnogobrojnim filtrima koji vrlo brzo mijenjaju položaj i na taj način propuštaju različite valne duljine svjetlosti. Kod ovoga načina vizualizacije nema pomaka u slici jer se koristi isto dihroidno zrcalo za sve fluorofore.

Još jedan bitan dio mikroskopa je izvor svjetlosti. Kako bi se postigao dovoljno jak intenzitet svjetlosti najčešće se u tu svrhu koriste živine ili ksenonove žarulje. Takve žarulje su vrlo skupe, potencijalno opasne te zahtijevaju posebno dizajnirana kućišta i izvore napajanja. Izbor žarulje ovisi o fizikalnim svojstvima fluorofora koje želimo koristiti. Prednost ksenonove žarulje je ta da jednako kvalitetno pokriva valne duljine unutar UV spektra, vidljive svjetlosti i bliskog infracrvenog spektra. Živina žarulja pokazuje nekoliko spektralnih pikova vrlo jakog intenziteta, pa ako se ti pikovi poklapaju s ekscitacijskim spektrom fluorofora dobit će se vrlo snažno osvjetljenje. Najbolje osvjetljenje se najčešće postiže korištenjem 100-W živine žarulje zbog toga jer je protok svjetlosti po jedinici površine tada najveći. Sa vremenom ovakav tip žarulja se slabije pali zbog istrošenosti katode i anode te osvjetljava preparat različitim intenzitetom pa je potrebno s vremena na vrijeme promijeniti žarulju (životni vijek živine žarulje je 200 h rada, a ksenonove 400 h).

U teoriji molekula fluorofora može „kružiti“ između osnovnog i pobuđenog stanja neograničen broj puta, no to nažalost u praksi nije tako. Zbog toga dolazi do pojave koja se naziva izbjeljivanje tj. do procesa koji uzrokuje da fluorescencijski signal trajno nestane. Pokazano je da čak i najbolji fluorofori imaju rok trajanja od otprilike 10 000 – 40 000 ciklusa prije nego što prestanu fluorescirati. Razlog tome su dugo živuća tripletna stanja koja nastaju ekscitacijom, jer omogućuju pobuđenoj molekuli fluorofora da reagira s drugim molekulama, najčešće kisikom. Pobuđeno tripletno stanje fluorofora prenosi svoju energiju na kisik (koji se u osnovnom stanju nalazi u konfiguraciji tripleta) te nastaje visoko reaktivan pobuđeni kisikov singlet koji može sudjelovati u velikom broju kemijskih reakcija sa organskim molekulama. Te kemijske reakcije kovalentno mijenjaju molekulu fluorofa te je na taj način inaktiviraju.

1.5 Upotreba fluorescencijske mikroskopije u citogenetici

Mnoge metode suvremene citogenetike temelje se na upotrebi fluorescencijskog mikroskopa i raznih bioloških kromofora. Jedna od najraširenijih metoda je zasigurno diferencijalno bojanje kromosoma u kojem se koristi nekoliko kemijskih boja (najčešće dvije) u isto vrijeme. Upotreba višestrukih boja omogućuje bolju diferencijaciju strukturnih komponenti unutar jezgre. Najčešće korišten par fluorescencijskih boja je zasigurno 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) i Kromomicina A₃ (CMA), a osim njih često se još koristi bojanje Hoechst-om i Quinakrin-om. DAPI se izrazito jako veže za heterokromatinske regije bogate parovima baza AT. Vrlo lako prolazi kroz membranu stanica pa se može koristiti za bojanje živih i fiksiranih stanica. Kada je vezan za dvolančanu DNA pokazuje apsorpcijski maksimum na 358 nm (ultraljubičasto područje) a emisijski maksimum na 461 nm (plavo područje). DAPI ima široki emisijski spektar, te se može koristiti i za detekciju RNA molekula ali fluorescencija znatno opada jer se emisija DAPI boje vezane na RNA pomiče na otprilike 500 nm. Kromomicin A₃ (CMA) je antibiotik koji se selektivno veže za heterokromatinska područja bogata parovima baza GC. CMA se uglavnom koristi za određivanje broja i položaja rDNA lokusa (18S–26S rDNA) budući da je heterokromatin unutar ribosomskih gena bogat parovima baza GC.

Druge bitne metode fluorescencijske mikroskopije su fluorescencijska hibridizacija *in situ* (FISH), genomska hibridizacija *in situ* (GISH) i fluorescencija tankih kromatinskih niti (Fiber FISH). Svim metodama je zajedničko da koriste fluorescencijske sonde koje se vežu samo za dijelove kromosoma ili genoma s kojim dijele visok stupanj komplementarnosti. Naspram klasičnih metoda citogenetike, fluorescentna detekcija pokazuje bolju rezoluciju, kontrast, brzinu, sigurnost te mogućnost istovremenog detektiranja više signala. FISH i „Fiber FISH“ su tehnike koje se koriste za detekciju specifičnih DNA ili RNA sekvenci unutar genoma. Razlika između ove dvije tehnike je u rezoluciji. Kod tehnike „Fiber FISH“ kromosomi se razvlače u dugačke tanke niti te se na taj način znatno povećava rezolucija uzorka jer je moguće detektirati genske lokuse koji su međusobno udaljeni manje od 1kb.

1.6 Cilj istraživanja

Rod *Polystachya* Hook. sadrži otprilike 240 vrsta koje su rasprostranjene na geografski velikom području. Do sada je bilo nekoliko pokušaja citoloških analiza unutar roda, ali nisu bili reprezentativni jer su obuhvaćali mali broj vrsta sa uskog geografskog područja. Ovim radom željelo se po prvi put obuhvatiti što veći broj vrsta s različitih područja s ciljem da se istraži: 1) stupanj ploidnosti vrsta iz roda *Polystachya* (Orhidaceae), 2) povezanost ploidije s geografskom rasprostranjenosti vrsta i 3) razlike u organizaciji genoma na temelju raspodjele heterokromatina.

2 MATERIJALI I METODE

2.1 MATERIJALI

2.1.1 Osnovne kemikalije i materijali

U radu su korištene slijedeće kemikalije i materijali:

- 8 – hidroksikinolin (Sigma – Aldrich, Njemačka)
- Fiksativ (alkohol – octena kiselina, volumni omjer 3:1)
- 0,1 M Citratni pufer
- Enzimatska mješavina R (4% celuloza R10, 1% pektolijaza Y23, 4% hemiceluloza u citratnom puferu 0,01 M, pH 4,5)
- DAPI, radna otopina 2 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma – Aldrich, Njemačka)
- Kromomicin A₃, radna otopina 0,1 mg/mL (Sigma – Aldrich, Njemačka)
- Pufer McIlvaine pH 7 (0,018M limunska kiselina i 0,164 M Na₂HPO₄)
- Pufer McIlvaine pH 5,5 (0,018M limunska kiselina i 0,164 M Na₂HPO₄)
- Pufer McIlvaine s dodatkom MgCl₂ pH 7,0 (0,018M limunska kiselina; 0,164 M Na₂HPO₄; 5mM MgCl₂)
- Otopina za uklapanje (glicerol – pufer McIlvaine 7, volumni omjer 1:1)
- Octena kiselina (Medika, Zagreb)
- Limunska kiselina (Medika, Zagreb)
- Natrij – citrat (Kemika, Zagreb)
- Natrij – hidrogen – fosfat (Kemika, Zagreb)
- Glicerol (Kemika, Zagreb)
- HCl (Kemika, Zagreb)
- NaOH (Kemika, Zagreb)
- Predmetna stakalca
- Pokrovna stakalca
- Filtar papir

2.1.2 Biljni materijal

Biljni materijal korišten u izradi ovog diplomskog rada dio je kolekcije orhideja Botaničkog vrta Sveučilišta u Beču (**The Botanical Garden of the University of Vienna, Austria**) i Botaničkog vrta u Kew-u (**The Royal Botanic Garden, Kew, UK**). Popis vrsta iz roda *Polystachya* (Orhidaceae) korištenih u radu i njihovo porijeklo nalazi se u Tablici 1. Svaka od istraživanih vrsta zastupljena je s 1-5 jedinki.

Tablica 1. Popis istraživanih vrsta iz roda *Polystachya* (Orhidaceae).

| Citološki broj | Uzorak | Zemlja porijekla |
|-----------------|-------------------------------|------------------|
| 170/95 | <i>Polystachya adansoniae</i> | Nigeria |
| ORCH 06240 | <i>P. affinis</i> | Nigeria |
| FS 4608 | <i>P. anceps</i> | Madagascar |
| ORCH 07275 | <i>P. bifida</i> | Sao Tome |
| Kew 2003 – 121 | <i>P. bella</i> | Kenya |
| / (ne zna se) | <i>P. caloglossa</i> | Cameroon |
| ORCH 06244 | <i>P. campyloglossa</i> | / (ne zna se) |
| ORCH 07439 | <i>P. clareae</i> | Madagascar |
| ORCH 07278 | <i>P. concreta</i> | Réunion |
| ORCH 07344 | <i>P. concreta</i> | Madagascar |
| / | <i>P. eurygnatha</i> | / |
| Kew 2001 – 4022 | <i>P. fallax</i> | Uganda |
| ORCH 07028 | <i>P. foliosa</i> | Venezuela |
| OR 129 – 2003 | <i>P. fusiformis</i> | Madagascar |
| Kew 1972 – 1958 | <i>P. galeata</i> | Sierra Leone |
| / | <i>P. humbertii</i> | Madagascar |
| ORCH 06412 | <i>P. lawrenceana</i> | Malawi |
| ORCH 07315 | <i>P. laxiflora</i> | / |
| ORCH 06411 | <i>P. longiscapa</i> | Tanzania |
| ORCH 07263 | <i>P. maculata</i> | Burundi |
| ORCH 07214 | <i>P. neobenthamia</i> | / |
| ORCH 06425 | <i>P. nyanzensis</i> | Cameroon |

Tablica 1. (nastavak) Popis istraživanih vrsta iz roda *Polystachya* (Orhidaceae)

| Citološki broj | Uzorak | Zemlja porijekla |
|-----------------------|----------------------|-------------------------|
| / | <i>P. odorata</i> | Nigeria |
| Kew 2005 – 964 | <i>P. ottoniana</i> | / |
| Kew 184 – 4977 | <i>P. paniculata</i> | Ethiopia |
| Kew 2001 – 3977 | <i>P. piersii</i> | Kenya |
| ORCH 06606 | <i>P. pinicola</i> | Brasil |
| Kew 2001 – 3987 | <i>P. polychaete</i> | Congo |
| ORCH 05171 | <i>P. pubescens</i> | / |
| FS 1002 | <i>P. virescens</i> | Madagascar |
| ORCH 06422 | <i>P. virginea</i> | Tanzania |
| Kew 2000 – 4531 | <i>P. vulcanica</i> | Kenya |
| / | <i>P. zambesiaca</i> | Malawi |

2.2 METODE

2.2.1 Sakupljanje, fiksacija i predtretman biljnog materijala

Korijenčići su sakupljeni jednom tjedno i odmah tretirani otopinom 8 – hidroksikinolina (0,0028M). Predtretman je trajao 2 sata u mraku na sobnoj temperature, a zatim 2 sata u hladnjaku na 4°C. Nakon toga korijenčići su isprani destiliranom vodom te fiksirani otopinom etanola i octane kiseline u volumnom omjeru 3:1 najmanje 24 sata.

2.2.2 Izrada kromosomskih preparata

Preparati metafaznih kromosoma pripremani su iz meristemskih stanica vrška korijena koji su bili prethodno tretirani prema slijedećem protokolu:

1. Inkubacija 10 – 15 minuta u 0,1 M citratnom puferu (otopina 4 mM limunske kiseline i 6 mM natrij-citrata, pH 4,8).
2. Digestija u enzimatskoj mješavini R koja je prethodno zagrijana na 37 °C u trajanju od 1 sat i 10 minuta.
3. Inkubacija u 0,1 M citratnom puferu 20 minuta.
4. Izolacija vršnih meristemskih stanica korijena uklanjanjem površinskog nemeristemskog tkiva i usitnjavanje u kapi 60% octene kiseline. Preparati su izrađeni klasičnom tehnikom gnječenja. Preparati koji su sadržavali zadovoljavajući broj metafaznih ploča su smrznuti komprimiranim CO₂ te sušeni na zraku najkraće 24 sata.

2.2.3 Bojanje fluorescentnom bojom DAPI

Kromosomski preparati bojani su bojom 4,6 – diamino – 2 – fenilindol (DAPI) iz dva razloga. Prvi razlog je dobivanje boljeg kontrasta između našeg sustava i okoline te na taj način točnijeg i boljeg prikaza metafaznih kromosoma u svrhu određivanja njihovog točnog broja. Drugi razlog je određivanje položaja i količine heterokromatina bogatog parovima baza A – T budući da se boja DAPI specifično veže za takva heterokromatinska područja.

Osušeni preparati su najprije inkubirani 15 minuta u puferu McIlvaine, pH 7,0 (McI 7,0), višak pufera se zatim odlije i na preparate se nakapa 100 µL otopine DAPI te inkubira 15 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije preparati se ispiru u destiliranoj vodi, osuše i uklapaju u smjesu pufera McIlvaine i glicerola u volumnom omjeru 1:1. Kromosomi bojani bojom DAPI pokazuju plavu fluorescenciju upotrebom pobudne svjetlosti valne duljine 360 nm.

2.2.4 Bojanje kromomicinom A₃

Bojanje kromomicinom izvedeno je prema metodi od Kondo i Hizume (1982) s neznatnim preinakama. Preparati su najprije inkubirani u puferu McIlvaine, pH 7,0 (McI 7,0) 15 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je na stanice nakapano 100 µL kromomicina (0,1 mg/mL) i inkubirano 20 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon bojanja preparati su ispirani u puferu McIlvaine (McI 7,0) a zatim inkubirani u puferu McIlvaine, pH 5,5 (McI 5,5) 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije preparati su kontrastno bojani 0,1%-tnim (v/v) metilenskim zelenilom nekoliko sekundi na sobnoj temperaturi nakon čega su isprani destiliranom vodom, osušeni i uklopljeni u smjesi pufera McIlvaine (pH 7,0 sa Mg²⁺) i glicerola u volumnom omjeru 1:1. Kromosomi bojani kromomicinom pokazuju žutu fluorescenciju upotrebom pobudne svjetlosti valne duljine 436 – 460 nm.

2.2.5 Vizualizacija kromosomskih preparata i analiza slika

Fluorescentni signali vizualizirani su uz pomoć mikroskopa Olympus BX51 uz korištenje filtera za plavu (DAPI) i žutu (kromomicin A₃) fluorescenciju. Valna duljina pobudnog maksimuma za DAPI iznosi 345 nm, a valna duljina emisijskog maksimuma iznosi 425 nm. Valna duljina pobudnog maksimuma za kromomicin A₃ iznosi 436 – 460 nm, a valna duljina emisijskog maksimuma iznosi 470 nm. Preparati su promatrani pod povećanjima od 10x, 40x, 100x. Signali su fotografirani uz pomoć digitalne kamere Olympus DP70 spojene na PC računalo. Slike su dalje analizirane i preklapane u programu Adobe Photoshop CS3 koji je omogućio procesiranje slika u smislu njihovog povećanja i pojačavanja intenziteta signala i kontrasta.

3 REZULTATI

3.1 BROJ KROMOSOMA I STUPANJ POLIPLOIDIJE

Prikupljeni su uzorci od ukupno 33 vrste orhideja iz roda *Polystachya* (Orchidaceae), te je pregledom metafaznih ploča s dobro razdvojenim kromosomima ustanovljeno da se osnovni kromosomski set unutar roda sastoji od dvadeset kromosoma ($x = 20$). Ovisno o stupnju ploidije on se kod nekih vrsta ponavljao dva ($2n = 2x = 40$), četiri ($2n = 4x = 80$) i šest puta ($2n = 6x = 120$) (Tablica 2).

Tablica 2. Broj kromosoma i stupanj ploidije vrsta iz roda *Polystachya*.

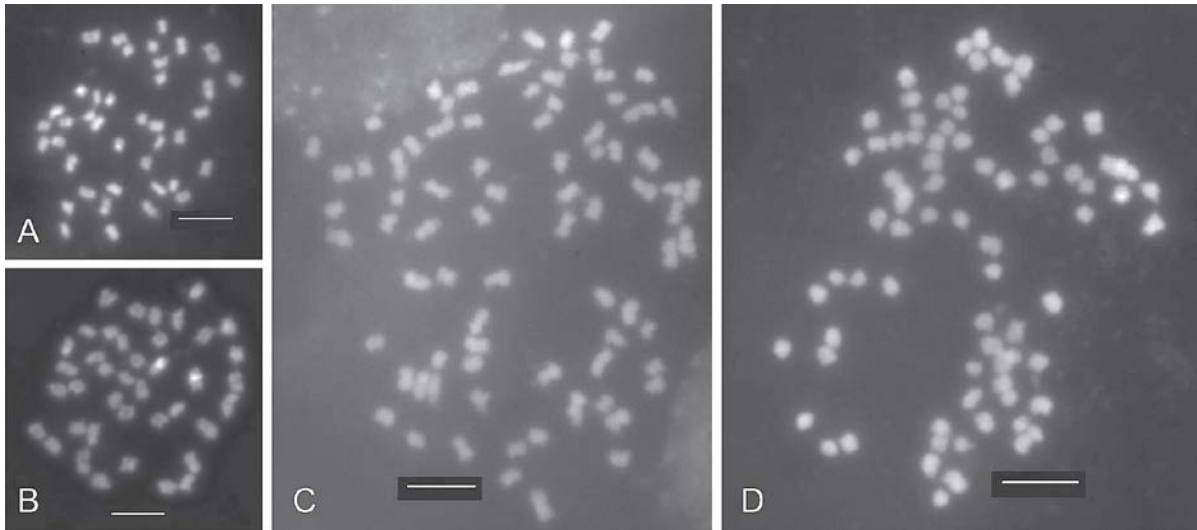
| Vrsta | Broj kromosoma | Poliploidnost |
|-------------------------------|----------------|--------------------------|
| <i>Polystachya adansoniae</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. affinis</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. anceps</i> | 80 | Tetraploid ($2n = 4x$) |
| <i>P. bifida</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. bella</i> | 80 | Tetraploid ($2n = 4x$) |
| <i>P. caloglossa</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. campyloglossa</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. clareae</i> | 80 | Tetraploid ($2n = 4x$) |
| <i>P. concreta</i> | 80 | Tetraploid ($2n = 4x$) |
| <i>P. concreta</i> | 80 | Tetraploid ($2n = 4x$) |
| <i>P. eurygnatha</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. fallax</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. foliosa</i> | 80 | Tetraploid ($2n = 4x$) |
| <i>P. fusiformis</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. galeata</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. humberitii</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |

Tablica 2. (nastavak) Broj kromosoma i stupanj ploidije vrsta roda *Polystachya*.

| Vrsta | Broj kromosoma | Poliploidnost |
|------------------------|----------------|--------------------------|
| <i>P. lawrenceana</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. laxiflora</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. longiscapa</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. maculata</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. neobenthamia</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. nyanzensis</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. odorata</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. ottoniana</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. paniculata</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. piersii</i> | 80 | Tetraploid ($2n = 4x$) |
| <i>P. pinicola</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. polychaete</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. pubescens</i> | 80 | Tetraploid ($2n = 4x$) |
| | 120 | Heksaploid ($2n = 6x$) |
| <i>P. virescens</i> | 80 | Tetraploid ($2n = 4x$) |
| <i>P. virginea</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. vulcanica</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |
| <i>P. zambesiaca</i> | 40 | Diploid ($2n = 2x$) |

Iz Tablice 2. može se uočiti da je rod *Polystachya* po broju kromosoma poprilično homogen tj. ne postoje razlike u broju kromosoma unutar osnovnog seta ($x=20$). Razlike su jedino u broju ponavljanja osnovnog seta unutar genoma pojedinih vrsta. Od proučavanih 33 vrsta njih čak 24 su diploidi s ukupnim brojem kromosoma $2n=2x=40$. Od preostalih 9 analiziranih vrsta njih 8 su tetraploidi s $2n=4x=80$ kromosoma. Oprečni rezultati su se pojavili samo kod vrste *P. pubescens*. Kod ove vrste pregledom preparata nađene su jedinke s $2n=4x=80$ i $2n=6x=120$ kromosoma. Takvi rezultati za vrstu *P. pubescens* bili su objavljeni u prethodnim citološkim analizama (Jones, 1966.). Najveći broj diploidnih vrsta potječe sa područja središnje i istočne Afrike (Nigerija, Kenija, Kamerun, Malawi i Tanzanija). Poliploidne vrste mogu se naći na ekološki izoliranim lokacijama kao što su Madagaskar, Venezuela i Réunion.

Na temelju dobivenih rezultata (Slika 8) može se zaključiti da se radi o rodu koji ima vrlo male kromosome koji otežavaju analizu ako nisu dobro razdvojeni. Veličina pojedinih kromosoma unutar genoma je u prosjeku samo 1,5 – 2,0 μm . Također je primijećeno da se radi o vrstama čija citoplazma obiluje polisaharidima koji su ponekad ometali vizualizaciju kromosoma pod fluorescencijskim mikroskopom.

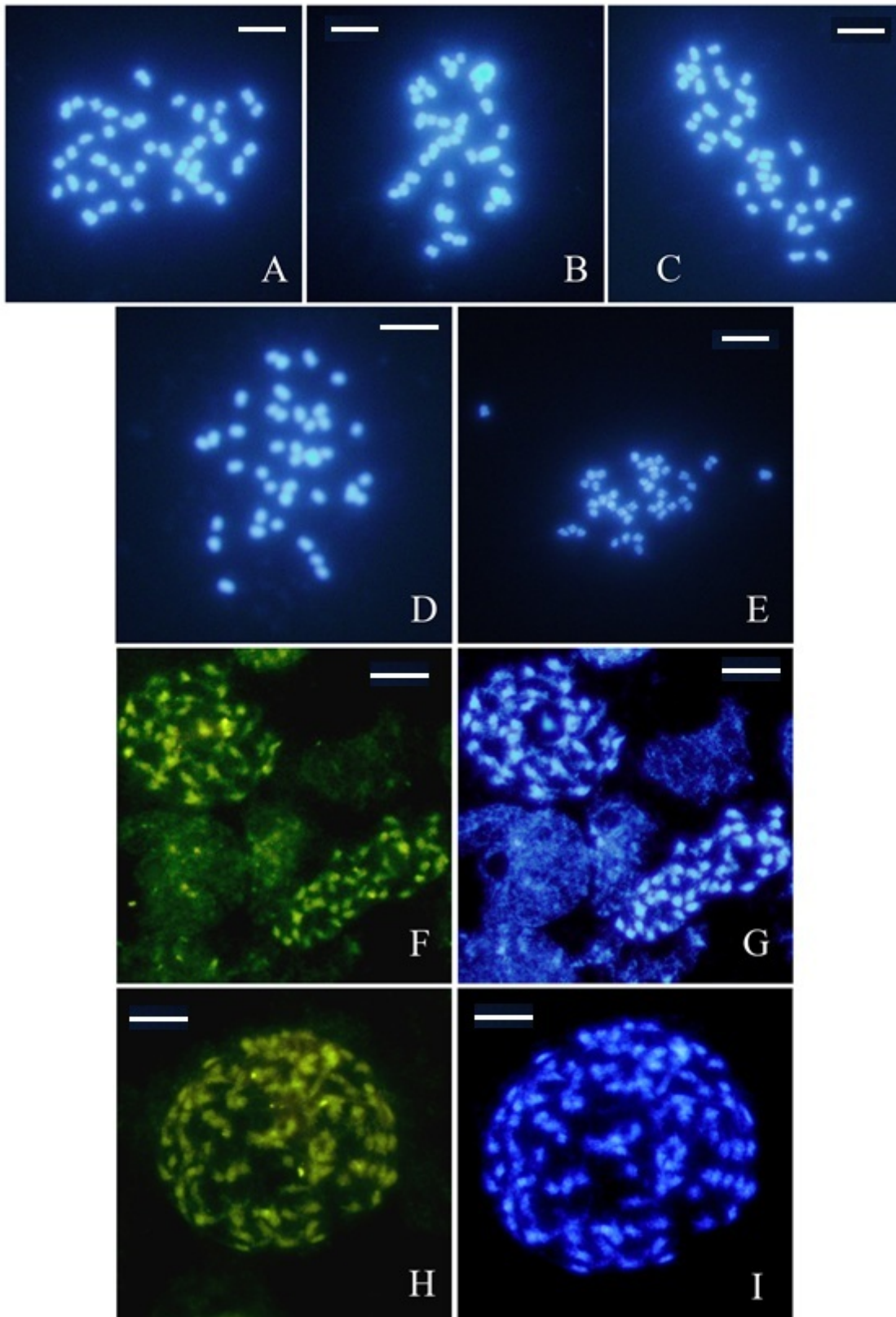


Slika 8. Metafazni kromosomi nekoliko vrsta iz roda *Polystachya* obojani bojom DAPI: **A.** *P. fusiformis* ($2n = 40$); **B.** *P. virginea* ($2n = 40$); **C.** *P. concreta* s Réuniona ($2n = 80$); **D.** *P. concreta* s Madagascara. Duljina prikazane skale na slikama je $5\mu\text{m}$.

3.2 POLOŽAJ I RASPODJELA HETEROKROMATINA

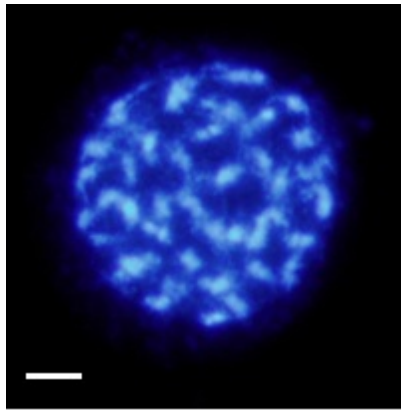
Kromosomi su bojani fluorescencijskim bojama DAPI i CMA i na temelju njihovog specifičnog vezanja za parove baza AT odnosno CG dobiveni su rezultati koji su nam dali uvid u položaj i raspored heterokromatina.

Kao što je već prije bilo navedeno, rod *Polystachya* ima vrlo male kromosome koji otežavaju analizu raspodjele i položaja heterokromatina (Slika 9 A-E). Zbog toga su podaci o položaju heterokromatina primarno dobiveni na temelju prometafaznih kromosoma koji su izduženi, odnosno slabije kondenzirani (Slika 9 F-I).



Slika 9. Metafazni i prometfazni kromosomi nekih vrsta iz roda *Polystachya*: **A.** *P. vulcanica* (DAPI), $2n=40$; **B.** *P. paniculata* (DAPI), $2n=40$; **C.,D.** *P. nyanzensis* (DAPI), $2n=40$; **E.** *P. adansoniae* (DAPI), $2n=40$; **F.** *P. galeata* (CMA), $2n=40$; **G.** *P. galeata* (DAPI), $2n=40$; **H.** *P. pubescens* (CMA), $2n=120(?)$; **I.** *P. pubescens* (DAPI), $2n=120(?)$. Duljina prikazane skale na slikama je $5\mu\text{m}$.

Ne postoje velike varijacije u raspodjeli i položaju heterokromatina unutar roda. Većina vrsta ima jako izražene heterokromatinske blokove u pericentromernu području svih kromosoma, unutar kojeg se AT bogata područja obojana s bojom DAPI i GC bogata područja obojana s CMA preklapaju (Slika 9 F-I). Kod diploidnih vrsta primijećen je jedan kromosomski par s jakim CMA signalima koji vjerojatno odgovaraju položaju nukleolarnog organizatora (NOR, nucleolus organizer region) odnosno položaju 18S-26S rRNA gena, a broj tih signala raste sa stupnjem ploidije. Za vrstu *P. virginea* ($2n = 40$) karakterističan je par kromosoma s izrazitim DAPI signalima u pericentromernom području (Slika 8 B). Od svih proučavanih vrsta jedino vrsta *P. neobenthamia* ne posjeduje samo DAPI heterokromatinske blokove u pericentromernom području već i duž krakova kromosoma (Slika 10).



Slika 10. Prometafazni kromosomi vrste *P. neobenthamia* s AT bogatim heterokromatinom u pericentromernom položaju te duž krakova kromosoma. Duljina skale na slici je 5 μm .

4 RASPRAVA

Rod *Polystachya*, unatoč svojoj širokoj geografskoj rasprostranjenosti i velikim morfološkim razlikama u građi same biljke, pokazuju vrlo veliku sličnost i konzerviranost između vrsta na razini broja kromosoma i položaju heterokromatina. Značajka svih vrsta su pericentromerno smješteni AT bogati heterokromatinski blokovi. Kod većine vrsta oni se nalaze na svim kromosomima dok su kod drugih specifični samo za neke kromosome. Takav primjer je vrsta *P. virginica* kod koje samo jedan par kromosoma ima AT bogati pericentromerni heterokromatin. Kod vrste *P. neobenthamia* također je utvrđen drugačiji uzorak raspodjele heterokromatina. Osim pericentromernog ova vrsta ima heterokromatin smješten duž krakova kromosoma. Ova vrsta je u prošlosti bila klasificirana kao *Neobenthamia gracilis* Rolfe i smještena u podtribus *Neobenthamia* zbog svoje velike morfološke razlike. Nedavna DNA analiza pokazala je da je *N. gracilis* u bliskom srodstvu s rodom *Polystachya* te je predloženo ime *P. neobenthamia*. Obzirom da je citogenetička analiza provedena u ovom radu ukazala da se ova vrsta razlikuje u odnosu na vrste iz roda *Polystachya* potrebna su dodatna istraživanja koja bi obuhvatila karakterizaciju heterokromatinskih DNA porodica odnosno satelitnih DNA i utvrđivanje njihovog položaja na kromosomima.

Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu i prijašnjih istraživanja (Jones, 1968; Podzorski i Cribb, 1979; Fedorov, 1969; Reich, 2006) može se zaključiti da rod *Polystachya* karakterizira osnovni broj kromosoma $x=20$. Većina analiziranih vrsta ima diploidan broj kromosoma ($2n=40$), a samo neke su tetraploidi i heksaploidi. Zapravo jedina vrsta s heksaploidnim brojem kromosoma je *P. pubescens*. Međutim, to se ne može sa sigurnošću tvrditi obzirom da su kod ove vrste primijećene i tetraploidne jedinice. Taj rezultat se može objasniti na nekoliko načina: 1) Svi kromosomi kod ovog roda su izrazito mali i jako kondenzirani, te je tako otežana analiza i određivanje njihovog točnog broja. To posebno dolazi do izražaja kod poliploidnih vrsta gdje se na malome prostoru nalazi izrazito velik broj malih kromosoma koji ako nisu kvalitetno razdvojeni ne može se sa sigurnošću odrediti njihov broj. 2) Veliki udio polisaharida u citoplazmi otežava izradu kvalitetnih preparata s dobro vidljivim i raspršenim kromosomima što otežava ne samo kromosomske već i molekularne analize (Russel i sur., 2008). Da bi se taj problem riješio, kod izrade preparata korištena je snažnija enzimatska razgradnja ali se na taj način povećala opasnost od narušavanja strukture kromosoma i njihov gubitak. 3) U ovom istraživanju korištene su jedinice s raznih lokacija (botanički vrtovi u Beču

i Londonu, privatne kolekcionarske zbirke, primjerci sakupljeni na terenu). Zbog tolike raznolikosti izvora, mogla se dogoditi pogreška prilikom sakupljanja i obilježavanja uzoraka, pogotovo kod biljaka koje su tek bile sakupljene na terenu i nisu još bile sa sigurnošću klasificirane. Međutim, malo je vjerojatno da je došlo do zabune u uzorkovanju i determinaciji vrste *P. pubescens*. To se može potkrijepiti s dva neovisna istraživanja. Podzorski i Cribb (1979) su također opisali tetraploidne i heksaploidne jedinke. Novije istraživanje Rupp i sur. (2008) koje se temeljilo na veličini genoma kod biljaka iz roda *Polystachya* pokazalo je da postoji vrlo velika korelacija između broja kromosoma i veličine genoma. Ti rezultati se dobro poklapaju s ovim istraživanjem (Tablica 3.).

Tablica 3. Podaci o stupnju ploidijske i veličine genoma kod analiziranih vrsta iz roda *Polystachya*

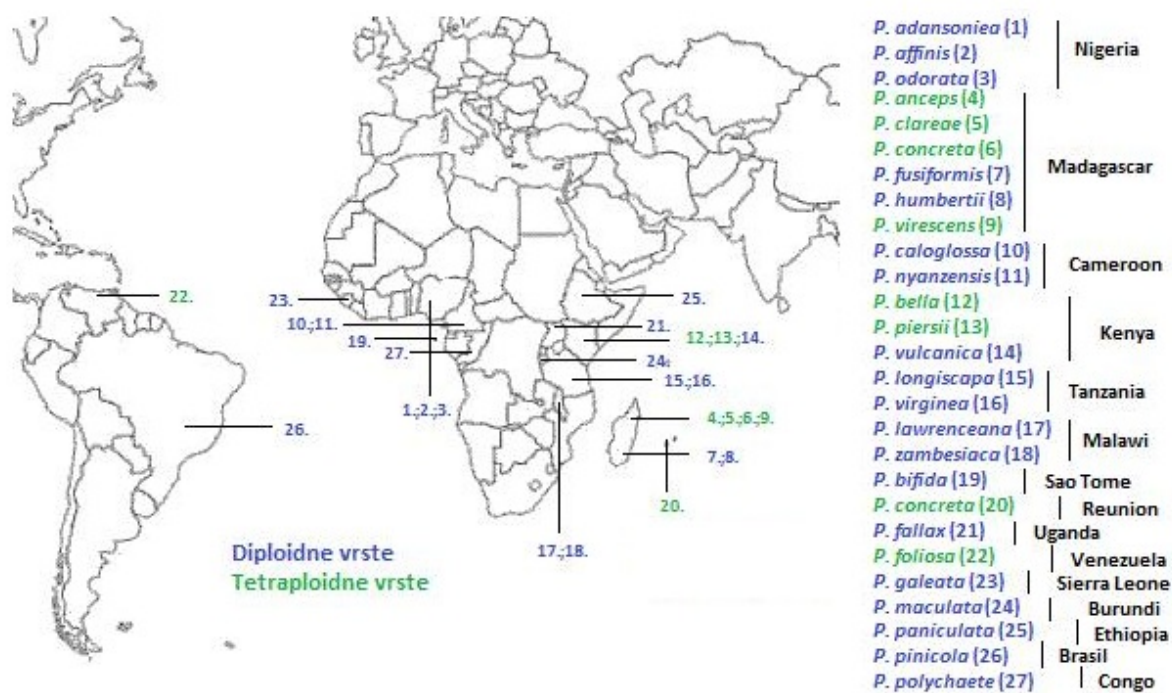
| Vrsta | Stupanj poliploidije | Veličina genoma, 1C[pg] |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <i>P. adansoniae</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,60–0,85 |
| <i>P. affinis</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,81–0,83 |
| <i>P. anceps</i> | Tetraploid ($2n = 4x$) | 1,47 |
| <i>P. bifida</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,61 |
| <i>P. bella</i> | Tetraploid ($2n = 4x$) | 1,75–1,80 |
| <i>P. caloglossa</i> | Diploid ($2n = 2x$) | nema podataka |
| <i>P. campyloglossa</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,69–0,74 |
| <i>P. clareae</i> | Tetraploid ($2n = 4x$) | 1,45 |
| <i>P. concreta</i> | Tetraploid ($2n = 4x$) | 1,33–1,54 |
| <i>P. concreta</i> | Tetraploid ($2n = 4x$) | 1,39–1,43 |
| <i>P. eurygnatha</i> | Diploid ($2n = 2x$) | nema podataka |
| <i>P. fallax</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,70–0,71 |
| <i>P. foliosa</i> | Tetraploid ($2n = 4x$) | 1,40–1,49 |
| <i>P. fusiformis</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,67–0,70 |
| <i>P. galeata</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,73–0,83 |
| <i>P. humbertii</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,75 |
| <i>P. lawrenceana</i> | Diploid ($2n = 2x$) | nema podataka |
| <i>P. laxiflora</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,72 |
| <i>P. longiscapa</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,64 |
| <i>P. maculata</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,61 |
| <i>P. neobenthamia</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,64 |
| <i>P. nyanzensis</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,79–0,82 |
| <i>P. odorata</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,81–0,92 |
| <i>P. ottoniana</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,70–0,77 |
| <i>P. paniculata</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,64 |

Tablica 3. (nastavak) Podaci o stupnju ploidiije i veličine genoma kod analiziranih vrsta iz roda *Polystachya*

| Vrsta | Stupanj poliploidije | Velčina genoma, 1C[pg] |
|----------------------|---|------------------------|
| <i>P. piersii</i> | Tetraploid ($2n = 4x$) | nema podataka |
| <i>P. pinicola</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,74 |
| <i>P. polychaete</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,60 |
| <i>P. pubescens</i> | Tetraploid ($2n = 4x$), Heksaploid ($2n = 6x$) | 1,38–1,80 |
| <i>P. virescens</i> | Tetraploid ($2n = 4x$) | 1,55 |
| <i>P. virginea</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,67 |
| <i>P. vulcanica</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,74–0,76 |
| <i>P. zambesiaca</i> | Diploid ($2n = 2x$) | 0,68 |

Iz Tablice 3. može se vidjeti da velčina genoma kod jedinki vrste *P. pubescens* varira između 1,38 i 1,80 što se može povezati s razlikom u ploidnosti pojedinih jedinki.

Područja Afrike poznata kao „Pleistocenska skloništa“ bila su središta razdvajanja današnjih vrsta na nova područja. Vrlo rano su se dogodila širenja vrsta unutar samog kontinenta, najprije na područja istočne Afrike a zatim i na područja zapadne Afrike (Russel i sur., 2008). Vjeruje se da je širenje u područja središnje Amerike, Azije i Indonezije (područje neotropa) došlo tek u novijoj geološkoj povijesti. Takav način širenja vjerojatno vrijedi i u slučaju vrsta iz roda *Polystachya*. Naime, većina diploidnih vrsta iz roda *Polystachya* potječe sa područja Afrike i to većinom iz središnje i istočne Afrike (Nigerija, Kenija, Kamerun, Malavi i Tanzanija), dok se tetraploidne vrste uglavnom nalaze u ekološki drugačijim područjima na Madagaskaru, Venezueli i Réunion (Slika 11). Iz toga se može pretpostaviti da je do poliploidije kod tih vrsta došlo uslijed prilagodbe na novo područje. Da je to stvarno tako, može se zaključiti iz dosadašnjih istraživanja koja pokazuju veliku korelaciju između nastanka poliploidije i širenja na nova područja kod mnogih biljaka (Brochmann i sur.,2004; Lowry i Lester, 2006; Hijmans i sur., 2007). Na temelju navedenog može se zaključiti da, bez obzira na veliku geografsku rasprostranjenost, sve vrste iz roda *Polystachya* potječu sa jednog užeg geografskog područja a kasnijim širenjem došlo je do kolonizacije na druga područja afričkog kontinenta a zatim i na druge kontinente.



Slika 11. Shematski prikaz geografske rasprostranjenosti vrsta iz roda *Polystachya*. Diploidne vrste su označene plavom a tetraploidne zelenom bojom.

Da bi se moglo sa sigurnošću tvrditi o procesima nastanka poliploidije unutar ovog roda potrebno bi bilo napraviti daljnja citogenetička istraživanja koja bi rasvijetlila neke od tih procesa. Ta istraživanja bi trebala obuhvatiti određivanje broja i položaja rRNA gena primjenom tehnike fluorescentne hibridizacije *in situ* (FISH) te karakterizaciju satelitnih DNA obzirom da sve vrste posjeduju velike količine heterokromatina.

5 ZAKLJUČAK

Rod *Polystachya*, unatoč širokoj geografskoj rasprostranjenosti, pokazuje vrlo veliku sličnost između vrsta na razini broja kromosoma i raspodjele heterokromatina. Od ukupno 33 uzoraka, pregledom metafaznih ploča ustanovljeno je da se osnovni kromosomski set sastoji od 20 kromosoma ($x=20$). Čak 24 vrste su diploidi ($2n=2x=40$), a preostale vrste su tetraploidi ($2n=4x=80$) i u slučaju *P. pubescens* heksaploidi ($2n=6x=120$). Unutar roda može se pokazati velika korelacija između broja kromosoma i geografskog položaja jedinke. Vrste koje nastanjuju područje središnje i istočne Afrike su diploidne, dok su geografski izolirane vrste (rasprostranjene na području Madagaskara, Venezuele i Réuniona) poliploidne. Do poliploidije je vjerojatno došlo uslijed prilagodbe na nove ekološke uvjete. Pericentromerno smješteni AT bogati heterokromatinski blokovi su karakteristični za sve vrste roda *Polystachya*. Kod nekih vrsta oni se nalaze na svim kromosomima, dok se kod drugih nalaze samo na nekim kromosomima.

6 LITERATURA

- Adams K.L., Cronn R., Percifield R., Wendel, J.F. (2003): Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 4649–4654.
- Albertin W., Brabant P., Catrice O., Eber F., Jenczewski E., Chevre A.M., Thiellement H. (2005): Autopolyploidy in cabbage (*Brassica oleracea* L.) does not alter significantly the proteomes of green tissues. *Proteomics* **5**: 2131–2139.
- Allshire R.C., Nimmo E.R., Ekwall K., Javerzat J.P., Cranston G. (1995): Mutations derepressing silent centromeric domains in fission yeast disrupt chromosome segregation. *Genes & Development* **9**: 218–233.
- Boumil R.M., Lee J.T. (2001): Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation. *Human Molecular Genetics* **10**: 2225–2232.
- Carlsward B.S., Stern W.L., Bytebier B. (2006a): Comparative vegetative anatomy and systematics of the angraecoids (Vandaeae, Orchidaceae) with an emphasis on the leafless habit. *Botanical Journal of the Linnean Society* **92**: 1025-1032.
- Carlsward B.S., Whitten W.M., Williams N.H., Bytebier, B. (2006b): Molecular phylogenetics of Vandaeae (Orchidaceae) and the evolution of leaflessness. *American Journal of Botany* **93**: 770–786.
- Cribb P.J. (1978): Studies in the genus *Polystachya* (Orchidaceae) in Africa. *Kew Bulletin* **32**: 743–766.
- Cribb P.J. (1984). *Polystachya*. Pp. 333–402 in: Polhill R.M. (ed.), *Flora of tropical East Africa: Orchidaceae, part 2*. Rotterdam: Balkema.
- Dorsey E. (1936): Induced polyploidy in wheat and rye. *Journal of Heredity* **27**: 155-160.
- Freudenstein J., Rasmussen F. (1999): What does morphology tell us about orchid relationships? A cladistic analysis. *American Journal of Botany* **86**: 225-248.

- Galitski T., Saldanha A.J., Styles C.A., Lander E.S., Fink G.R. (1999): Ploidy regulation of gene expression. *Science* **285**: 251–254.
- Geerinck D. (1979): Notes taxonomiques sur des Orchidacées d’Afrique centrale VI: *Polystachya* Hook. sect. *Cultriformes* Kraenzl. *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique* **49**: 409–420.
- Gerstein A.C., Chun H.E., Grant A., Otto S.P. (2006): Genomic convergence toward diploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS Genetics* **2**: e145.
- Govaerts R., Campacci M.A., Holland Baptista D., Cribb P.J., George A., Kreuz K., Wood J. (2009): World checklist of Orchidaceae. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://apps.kew.org/wcsp/> (accessed 31 January 2009).
- Guo M., Davis D., Birchler J.A. (1996): Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. *Genetics* **142**: 1349–1355.
- Haig D., Westoby M. (1991): Genomic imprinting in endosperm: Its effect on seed development in crosses between species, and between different ploidies of the same species, and its implications for the evolution of apomixis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **333**: 1–13.
- Jia S., Yamada T., Grewal S.I. (2004): Heterochromatin regulates cell type-specific long-range chromatin interactions essential for directed recombination. *Cell* **119**: 469–480.
- Josefsson C., Dilkes B., Comai L. (2006): Parent-dependent loss of gene silencing during interspecies hybridization. *Current Biology* **16**: 1322–1328.
- Kao Y.Y., Chang S.B., Lin T.S., Hsieh C.H., Chen Y.H., Chen W.H., Chen C.C. (2001): Differential accumulation of heterochromatin as a cause for karyotype variation in *Phalaenopsis* orchids. *Annals of Botany* **87**: 387–395.
- Kellum R., Alberts B.M. (1995): Heterochromatin protein 1 is required for correct chromosome segregation in *Drosophila* embryos. *Journal of Cell Science* **108**: 1419–1431.
- Kondo T., Hizume M. (1982): Banding for the chromosomes of *Cryptomeria japonica* D. Don. *Journal of the Japanese Forestry Society* **64**: 356–356.

- Kraenzlin F. (1926) Monographie der Gattung *Polystachya* Hook. Feddes Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis. Beiheft. Berlin **39**: 1-136.
- La Croix I., Cribb P.J. (1998): *Polystachya*. Pp. 321–363 in: Pope G.V. (ed.), *Flora Zambesiaca*, **vol. 11, part 2**. Kew: Royal Botanic Gardens.
- Lichtman J.W., Conchello J.A. (2005): Fluorescence microscopy. *Nature methods*, **vol. 2**: 910-919.
- Lu B.Y., Emtage P.C., Duyf B.J., Hilliker A.J., Eissenberg J.C. (2000): Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in *Drosophila*. *Genetics* **155**: 699–708.
- Luger K., Mader A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. (1997): Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251–260.
- Mlinarec J., Šatović Z., Mihelj D., Malenica N., Besendorfer V. (2012): Cytogenetic and phylogenetic studies of diploid and polyploid members of the tribe Anemoninae (Ranunculaceae). *Plant Biology* doi:10.1111/j.1438-8677.2011.00519.x
- Müntzing A. (1936): The evolutionary significance of autopolyploidy. *Hereditas* **21**: 263-378.
- Mytnik-Ejsmont J. (2007a): Contribution à la révision de Polystachyinae Schlechter (Orchidaceae). 1. *Szlachetkoella* Mytnik. *Richardiana* **7**: 55–60.
- Mytnik-Ejsmont J., Szlachetko D.L. (2007b): Contribution à la révision de Polystachyinae Schlechter (Orchidaceae). 2. *Geerinckia* Mytnik, Szlachetko. *Richardiana* **7**: 61–63.
- Mytnik-Ejsmont J., Szlachetko D.L. (2007c). Contribution à la révision de Polystachyinae Schlechter (Orchidaceae). 3. *Disperanthoceros* Mytnik, Szlachetko. *Richardiana* **7**: 64–66.
- Mytnik-Ejsmont J., Szlachetko D.L. (2008a): Contribution à la révision de Polystachyinae Schlechter (Orchidaceae). 4. *Epiphorella* Mytnik, Szlachetko. *Richardiana* **8**: 12–17.
- Mytnik-Ejsmont J., Szlachetko D.L. (2008b): Contribution à la révision de Polystachyinae Schlechter (Orchidaceae). 5. *Unguiculabia* Mytnik, Szlachetko. *Richardiana* **8**: 18–22.
- Mytnik-Ejsmont J., Szlachetko D.L. (2008c): Contribution à la révision de Polystachyinae Schlechter (Orchidaceae). 6. *Dendrobianthe* Mytnik, Szlachetko. *Richardiana* **8**: 23–27.

- Pettersson B., Nilsson O. (1993): Floral variation and deceit pollination in *Polystachya rosea* (Orchidaceae) on an inselberg in Madagascar. *Opera Botanica* **121**: 237–245.
- Podzorski A.C., Cribb P.J. (1979): A revision of *Polystachya* sect. *Cultriformes* (Orchidaceae). *Kew Bulletin* **34**: 147–186.
- Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase M.W., Rasmussen, F.N. (2005): *Genera Orchidacearum*, **vol. 4**, Epidendroideae, part 1. Oxford University Press.
- Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase M.W., Rasmussen, F.N. (In press): *Genera Orchidacearum*, **vol. 5**, Epidendroideae, part 2. Oxford University Press.
- Rajaraman R., Rajaraman M.M., Rajaraman S.R., Guernsey D.L. (2005): Neosis – a paradigm of self-renewal in cancer. *Cell Biology International* **29**: 1084–1097.
- Ramsey J., Schemske D.W. (1998): Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *The Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **29**: 467–501.
- Ramsey J., Schemske D.W. (2002): Neopolyploidy in flowering plants. *The Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **33**: 589–639.
- Reich D. (2006): Molecular phylogenetics of *Polystachya*. Diploma thesis, University of Vienna.
- Ronfort J. (1999): The mutation load under tetrasomic inheritance and its consequences for the evolution of the selfing rate in autotetraploid species. *Genetics Research Cambridge* **74**: 31–42.
- Russell A., Samuel R., Rupp B., Barfuss M.H.J., Šafran M., Besendorfer V., Chase M.W. (2010): Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandeeae, Orchidaceae): Evidence from plastid DNA sequence data. *Taxon* **59**, **2**: 389–404.
- Salmon A., Ainouche M.L., Wendel J.F. (2005): Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Molecular Ecology* **14**: 1163–1175.
- Song K., Lu P., Tang K., Osborn T.C. (1995): Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **92**: 7719–7723.

- Stévant T., Nguema N. (2004): Trois espèces et trois combinaisons nouvelles de *Polystachya* (Orchidaceae) du Cameroun, de Guinée Équatoriale et du Gabon. *Adansonia* **26**: 217–233.
- Summerhayes V.S. (1942): African orchids: XII. *Botanical Museum Leaflets* **10**: 257–299.
- Summerhayes V.S. (1947): African orchids: XVII. *Kew Bulletin* **2**: 123–133.
- Szlachetko D.L., Olszewski S. (2001): *Polystachya*. Pp. 493–591 in: Achoundong G., Morat P. (eds.), *Flore du Cameroun*, vol. **35**. Orchidacées II. Yaoundé: Ministère de la Recherche Scientifique et Technique (MINREST).
- Szlachetko D.L., Sawicka M., Kras-Łapińska M. (2004): *Polystachya*. Pp. 244–302 in: Morat P. (ed.), *Flore du Gabon*, vol. **37**, Orchidaceae II. Paris: Muséum National d'Histoire Naturelle.
- Udall J.A., Swanson J.M., Nettleton D., Percifield R.J., Wendel J.F. (2006): A novel approach for characterizing expression levels of genes duplicated by polyploidy. *Genetics* **173**: 1823–1827.
- Van den Berg C., Goldman D.H., Freudenstein J.V., Pridgeon A.M., Cameron K.M., Chase M.W. (2005): An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **92**: 613–624.
- Waterman R.J., Bidartondo M.I. (2008): Deception above, deception below: Linking pollination and mycorrhizal biology of orchids. *Journal of Experimental Botany* **59**: 1085–1096.
- Wendel J.F. (2000): Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* **42**: 225–249