

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

NELA JANTOL I TADIJA KEKIĆ

**Analiza raznolikosti kloroplastne DNA i filogeografija ljekovite
kadulje (*Salvia officinalis* L.)**

Zagreb, 2013.

Ovaj rad je izrađen u laboratoriju za Filogeniju i molekularnu sistematiku Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, pod vodstvom prof.dr. Zlatka Libera u sklopu znanstvenog projekta MZOS pod oznakom 119-1191193-1232: Filogenija i genetska raznolikost endemičnih biljaka dinarsko-jadranskog krša. Rad je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade 03.05.2013. u Zagrebu.

SADRŽAJ RADA

1. UVOD	1
1.1. Filogeografija	2
1.2. Južna Europa: glacialno utočište i izvor genetičke raznolikost cjeelokupne europske flore	4
1.3. Ljekovita kadulja (<i>Salvia officinalis</i> L.)	8
1.3.1. Taksonomija, rasprostranjenost i ekologija	8
1.3.2. Svojstva, ljekovitost i uzgoj	11
1.3.3. Pregled dosadašnjih genetičkih istraživanja prirodnih populacija ljekovite kadulje	12
1.4. Statističke metode u filogeografskim istraživanjima	15
1.4.1. Nested clade filogeografska analiza (NCPA)	16
1.4.2. Metode temeljene na Coalescent teoriji	17
1.4.3. Određivanje srodstvenih odnosa na populacijskoj razini	18
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	20
3. MATERIJAL I METODE	23
3.1. Biljni materijal	24
3.2. Izolacija ukupne stanične DNA	24
3.3. Elektroforeza na agaroznom gelu	27
3.4. Fluorimetrijsko određivanje koncentracije izolirane DNA	27
3.5. Umnožavanje kloroplastnih DNA regija lančanom reakcijom polimerazom	28
3.6. Sekvenciranje PCR umnoženih kloroplastnih DNA regija	30
3.7. Slaganje sekvenci iz dva smjera i višestruko sravnjivanje	30
3.8. Filogeografska analiza	31
4. REZULTATI	33
5. RASPRAVA	42
6. ZAKLJUČAK	46
7. ZAHVALA	49
8. SAŽETAK	51
9. SUMMARY	53
10. LITERATURA	55
11. PRILOG	61

1. UVOD

1.1. Filogeografija

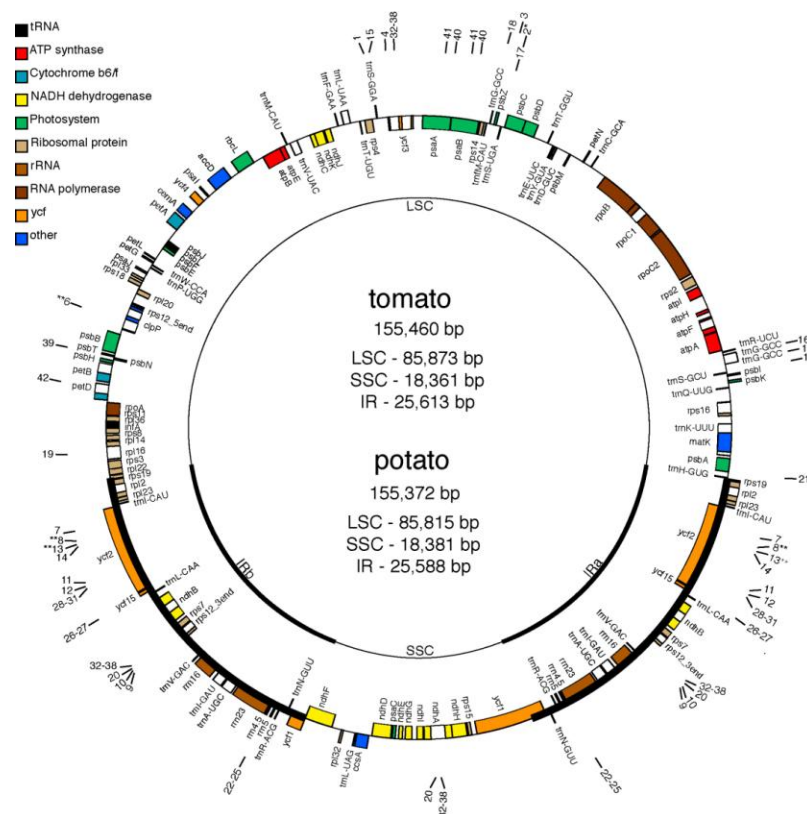
Filogeografija je znanstvena disciplina koja uz pomoć filogenetskih metoda nastoji rekonstruirati povijesne promjene rasprostranjenosti vrsta na Zemlji. Filogeografija u sebi povezuje rezultate molekularne genetike, populacijske dinamike, paleontologije, geologije i evolucijske biologije. Premda su se i prije, pod pojmom biogeografija, radile slične studije, termin filogeografija je prvi put u znanost uveo Avise (1987). Filogeografija se kao znanstvena disciplina počela naglo razvijati u ranim devedesetim godinama prošlog stoljeća kada je srodstveno stablo, dobiveno istraživanjima ljudske mitohondrijske DNA, podrijetlo čovjeka smjestilo u Afriku. Velika većina filogeografskih studija biljaka povezana je s oledbama u Pleistocenu (prije 2,6 milijuna godina do 13000 godina), za koji se smatra da su presudno utjecale na današnji biljni pokrov na Zemlji. Budući da filogeografske studije u obzir uzimaju relativno nedavne evolucijske događaje kao što su: genetičko usko grlo, genetički pomak, prirodna selekcija, specijacija, možemo reći da filogeografija predstavlja svojevrsnu poveznicu između populacijske genetike ili mikroevolucije i filogenije ili makroevolucije. Do prije nekoliko desetljeća fosilni ostaci biljaka bili su jedini izvor za rekonstrukciju njihove rasprostranjenosti u prošlosti. Uz pomoć peludnih ostataka u slojevima Zemljine kore uspješno su detektirane migracije različitih biljnih vrsta i njihova utočišta tijekom glacijacija. Termofilne drvenaste biljke se većinom oprašuju vjetrom pa je nužna njegova velika produkcija. Pelud se oslobađao s matičnih biljaka u prošlosti u tako enormnoj količini da danas postoje velike naslage u slojevima Zemlje koje omogućuju kvalitetne rekonstrukcije prošlih zbivanja. Zanimljivo je da su istraživanja naslaga peluda omogućila vrlo sigurno određivanje brzine migracije pojedinih biljnih vrsta na sjever nakon zadnjeg ledenog doba. Tako je određeno da je brzina migracija obične bukve (*Fagus sylvatica* Mill) bila 150-300 m/godišnje, običnog jasena (*Fraxinus excelsior* L.) 500 m/godišnje, a ljeske (*Corylus avellana* L) i vrsta roda *Pinus* L i do 2000 m/godišnje (Taberlet i sur. 1998).

Rekonstrukcija biljnih areala u prošlosti nije moguća kod većine biljnih vrsta koje se oprašuju entomofilno. Naime, entomofilija podrazumjeva malu produkciju peludnih zrna koja ne stvaraju dovoljne filogeografski vrijedne tragove. Za istraživanje filogeografije entomofilnih vrsta (većina zeljastih vrsta) bilo je potrebno čekati nekoliko desetljeća dok se nisu razvile molekularno-biološke metode upotrebljive za filogeografiju. Primjena molekularnih metoda je dosegla tolike razmjere da danas filogeografiju možemo definirati

kao znanstvenu disciplinu koja proučava povijesti geografske rasprostranjenosti vrsta uz pomoć DNA rodoslovlja recentnih populacija.

Za rekonstrukcije biljnih areala u prošlosti primjenjuju se brojne molekularne metode kao što su: izoenzimi, AFLP (Amplified fragment length polymorphisms), RAPD (Random amplified polymorphic DNA), mikrosateliti (SSR, Simple sequence repeats) i u zadnje vrijeme sekvence DNA jezgre, mitohondrija i kloroplasta.

Budući da se rasprostiranje biljaka vrši pomoću sjemenki koje se razvijaju na majčinskim biljkama, podaci dobiveni proučavanjem kloroplastnih DNA (Slika 1), a koje se nasljeđuje preko jajne stanice i koji u sebi nemaju šumova očinskih DNA iz peluda, osobito su vrijedni za filogeografiju. Proučavanje kloroplastnih DNA za potrebe filogeografije ima i dodatne prednosti kao što je dobivanje nedvosmislenih rezultata za razliku od često oprečnih rezultata nuklearnih DNA nastalih zbog postojanja rekombinacija, duplikacija i velikih rearanžmana kod ovog tipa DNA molekula (Singh 2004).



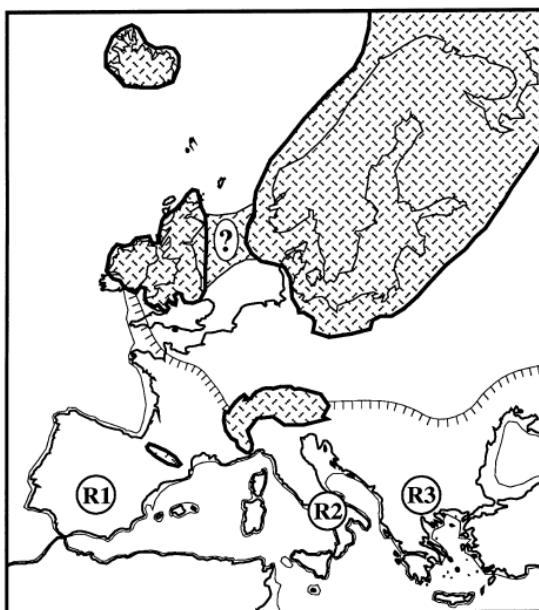
Slika 1. Raspored gena kružne kloroplastne DNA rajčice i krumpira. Kloroplastne DNA su male kružne dvolančane DNA, a u stanici ih je veći broj. Sve kloroplastne DNA u istom organizmu su obično ujednačene i imaju isti redosljed nukleotida. Veličina ovih kružnih DNA je od 120-160 kbp. Jedan dio kloroplastnih gena je tijekom endosimbiotske evolucije završio u jezrenim DNA, dok su oni preostali uglavnom geni za ribosomske proteine, rRNA i odvijanje fotosinteze (<http://unmc.edu/bsbc/glabresearch.htm>).





Imajući u vidu sve prednosti kloroplastne DNA treba navesti i neke mane, od kojih je najveća prevelika evolucijska konzerviranost koja je nekada tako velika da upotrijebljene kloroplastne DNA ne razvijaju polimorfizam niti unutar niti između istraživanih populacija. Danas su više-manje nađeni načini kako riješiti ovaj problem. Prvo rješenje leži u činjenici da je sekvenciranje DNA, kao najdetaljnija analiza molekula DNA, postalo toliko jeftino da se može primijeniti na velike populacijske uzorke te da se može bez problema analizirati više kloroplastnih regija. Drugo rješenje je nađeno u razvoju univerzalnih PCR početnica za nekodirajuće regije veće mutacijske stope (Taberlet i sur. 1991, Dumolin-Lapegue i sur. 1997, Demesure i sur. 1995, Shaw i sur. 2007). Osim što su evolucijski mnogo promjenjivije od kodirajućih regija, ove regije DNA imaju dodatnu prednost u tome što su selekcijski neutralne, a upravo je to jedna od poželjnih osobina dobrog DNA biljega.

1.2. Južna Europa: glacijalno utočište i izvor genetičke raznolikosti cjelokupne europske flore

Prije više od trideset godina prihvaćena je Milankovićeve teorija po kojoj su promjene u Zemljinoj orbiti jedan od glavnih razloga klimatskih promjena na Zemlji (<http://www.ncdc.noaa.gov/paleo/milankovitch.html>). Početkom perioda Kvartera (od prije 2,6 milijuna godina do danas) počeo se formirati ledeni pokrov u sjevernoj Europi. U ovom geološkom periodu neprestano se izmjenjuju glacijacijska i međuglacijacijska razdoblja. Osobite česte promjene glacijacije i interglacijacije su zabilježene u zadnjih 700000 godina, a zadnja oledba, s maksimalnim ledenim pokrovom prije 20000 do 18000 godina, završila je prije 13000 godina (Slika 2).

Posljednjih 13000 godina smo u interglacijacijskom razdoblju. Po nekim autorima (Dansgaard i sur. 1993) nagle promjene temperatura unutar glacijacijskih i interglacijacijskih razdoblja su se događale relativno često i naglo uz prosječnu promjenu u temperaturi od 10-14° C kroz 10-20 godina. Kad su jednom nastupila takva razdoblja su trajala između 70 do 5000 godina pa je stabilnost današnjeg interglacijala u posljednjih 8000 godina, a koja je omogućila brzi razvoj ljudske civilizacije, prije izuzetak nego pravilo.



Slika 2. Maksimalni doseg ledenog pokrova u zadnjem ledenom dobu (prije 20000 - 18000 godina). R1, R2 i R3 označavaju tri glavna refugijalna utočišta u Europi.  ledeni pokrivač,  južna granica permafrosta,  danasnja granica kopna,  granica kopna u vrijeme maksimalnog ledenog pokrova (Taberlet i sur. 1998).

Ovakve nagle klimatske promjene imale su velike posljedice na prošlu, ali i današnju brojnost i rasprostranjenost biljnih vrsta u Europi. Na specifičnost europske flore osim klimatskih promjena u Kvarataru utječu dodatni parametri kao što su činjenice da Europa nije kontinent, nego poluotok Azijskog kontinenta, da je cijeli jug Europe omeđen Sredozemnim morem tj. biljkama nepremostivom barijerom, da je na ovom kontinentu jako ograničeno kretanje vegetacije u pravcu sjever-jug zbog visokih i širokih planinskih masiva koji se pružaju u smjeru zapad-istok. Tijekom Kvartara sve su vrste nekoliko puta prošle kroz izmjenično širenje i smanjivanje areala. Populacije na sjeveru su tijekom oledbe izumirale, a južne su preživljavale na krajnjem jugu areala u tzv. glacijalnim utočištima. Glacijalno utočište se definira kao područje gdje različite genetičke linije trajno opstaju zbog mogućnosti ublažavanja velikih klimatskih promjena tijekom Tercijara (prije 65 do 2,6 milijuna godina) i/ili Kvartara (prije 2,6 milijuna godina do danas). Preživljavanje u glacijalnim utočištima je kritičan trenutak za preživljavanje svake vrste jer su areali smanjeni na minimum, a kompeticije među vrstama su izuzetno velike. Neprestano pomicanje areala u pravcu sjever-jug, ovisno o glacijacijskom odnosno interglacijacijskom periodu, dovodi do ponavljajućih genetičkih uskih grla (eng. genetic bottleneck) te efekta osnivača (eng. founder effect), koji se očituju u manjoj genetičkoj raznolikosti sjevernih populacija. Današnja raspodjela unutarvrstne genetičke raznolikosti u Europi moguće je objasniti postojanjem tri glacijacijska

utočišta na jugu te s nekoliko migracijskih puteva kojima su se biljke širile na sjever. U pravilu je genetička raznolikost južnih populacija puno veća s većim brojem jedinstvenih genotipova, dok je ona kod sjevernih populacija manja te uvjetovana kolonizacijskim putovima kojim su se te populacije širile iz južnih utočišta. Sjeverna Europa je primarno kolonizirana s Balkanskog i Iberijskog poluotoka dok je Apeninski migracijski put najvećim dijelom prekinut zbog Alpa. Usporedba kolonizacijskih puteva sugerira postojanje četiri zone njihova sudara (Slika 3).



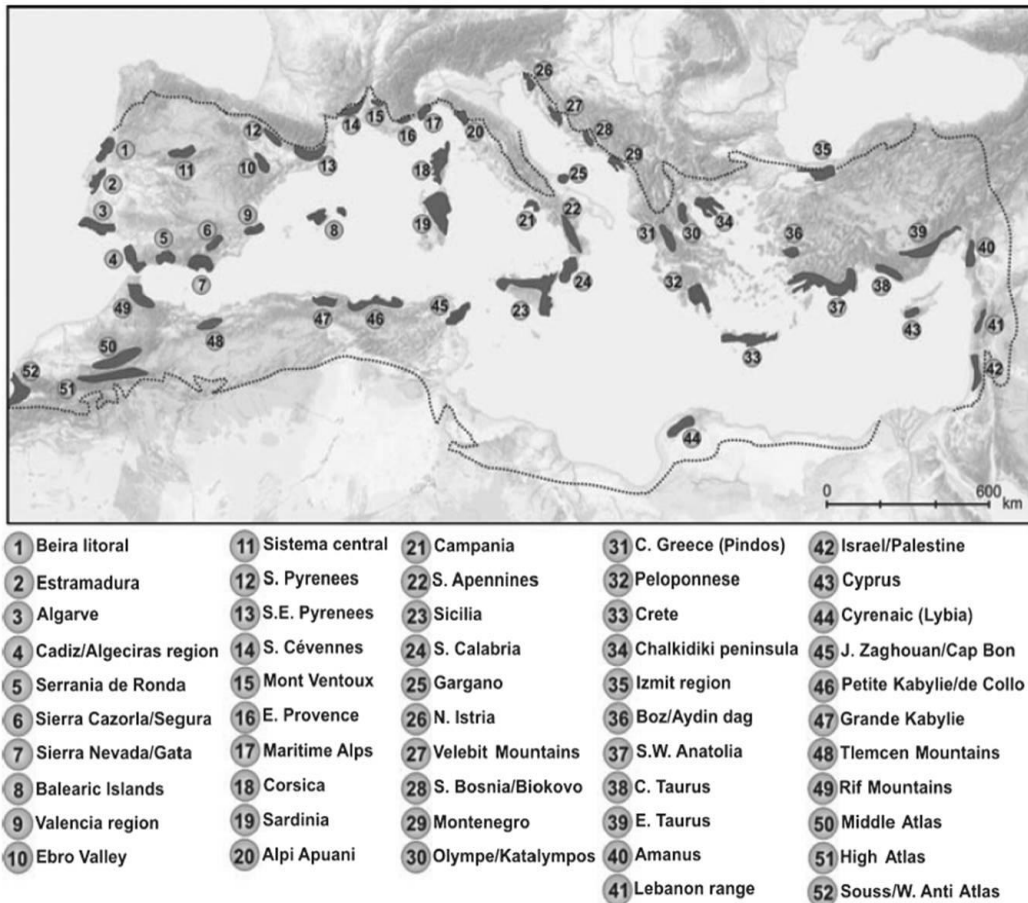
Slika 3. Glavni postglacijacijski kolonizacijski putovi i zone kontakta različitih migracijskih puteva u srednjoj i sjevernoj Europi (Taberlet i sur. 1998).

Za glacijalna utočišta se očekuje da u sebi čuvaju najveći dio unutarvrstne bioraznolikosti umjerenih klimatskih područja. Peludni podaci i makrofosili drvenastih biljaka pokazuju da situacija nije tako jednostavna te da su biljke u vrijeme glacijacije stvarno većim dijelom bile lokalizirane u južnim utočištima, ali isto tako i u većem broju malih sjevernih utočišta na granici s hladnim i suhim područjima tadašnjih stepa i tundra, od kuda su mogle brže osvajati sjeverna područja nakon oledbe (Petit i sur. 2003).

Južna Europa, ili često upotrebljavan izraz Mediteran, jedan je od glavnih svjetskih centara bioraznolikosti (Medail i Diadema 2009). Osobitost mediteranske flore uvjetovana je najviše postojanjem glacijalnih utočišta, ali i činjenicom da je Mediteran biogeografsko križište Europe, Sahare i Irano-Turanske regije. Složene geografske, geološke i klimatske prilike tijekom milijuna godina te različiti događaji kao što su Mezijska kriza (prije 5,8 do 5,3

milijuna godina) i Milankovićeve klimatske oscilacije na kraju Tercijara, dovele su do stvaranja raznolikih uvjeta staništa i velike raznolikosti vrsta s brojnim endemima. Budući da su u nepovoljnim klimatskim uvjetima brojne biljne vrste preživjele samo na jugu, cijeli Mediteran predstavlja mjesto sekundarnog kontakta i hibridizacije tj. specijacije. Kako bi se razjasnila ova priča o migracijama biljaka u prošlosti i glacijacijskim utočistima znanstvenici danas posežu za istraživanjem recentnih populacija upotrebom različitih DNA tehnika. Tijekom zadnjih 20-tak godina veći broj filogeografskih studija nastojao je točnije odrediti položaj refugija u Južnoj Europi. Bilo bi pogrešno razmišljati da sve biljne vrste koje su našle utočište na jugu Europe zahtijevaju slične ekološke uvjete. Situacija nije tako jednostavna, nego predstavlja dinamičan prostorno-vremenski sustav specifičan za svaku pojedinu vrstu. Nažalost, za sigurnije zaključke potrebno je mnogo više znanstvenih istraživanja na različitim biljnim vrstama jer se današnji zaključci temelje uglavnom na istraživanjima anemofilnih drvenastih biljaka (Slika 4).

Glavni prioritet svih programa konzervacije je prepoznati ugroženu jedinstvenost (svojtju ili populaciju) kako bi se sačuvala za buduće generacije. Većina do sada istraživanih vrsta u Mediteranu je imala nekoliko ugroženih populacija s jedinstvenim DNA biljezima. Ovakve genetički jedinstvene populacije predstavljaju žarišta (tzv hotspots) genetičke raznolikosti dotične vrste. Precizno lociranje ovakvih mjesta izuzetno je važno za konzervaciju mediteranskih biljaka kao primarnog izvora cjelokupne biljne raznolikosti Europe. Poseban konzervacijski izazov u Mediteranu leži u činjenici da je ovo područje pod tisućljetnim utjecajem čovjeka. Uspoređujući dosadašnja istraživanja nameće se zaključak kako je istočni dio Mediterana do sada mnogo slabije istraživan filogeografski nego zapadni te da bi novi rezultati filogeografskih istraživanja jugoistoka Europe, uključujući i Hrvatsku, u mnogome promijenili danas prihvaćenu filogeografsku sliku cijele Europe.



Slika 4. Položaj glacijalnih utočišta u Mediteranu određen filogeografskim analizama 82 biljne vrste (Medail i Diadema 2009).

1.3. Ljekovita kadulja (*Salvia officinalis* L.)

1.3.1. Taksonomija, rasprostranjenost i ekologija

Salvia officinalis L. pripada porodici *Lamiaceae* (usnače), podporodici *Nepetoideae*, tribusu *Menthae*, subtribusu *Salviinae*, rodu *Salvia* (Drew i Sytsma 2012). Rod *Salvia* je najbrojniji rod porodice *Lamiaceae* koji sadrži između 700 i 1000 vrsta. Vrste ovog roda mogu biti jednogodišnje i dvogodišnje biljke, ali i trajnice (Sutton 2004). U svjetskim razmjerima rod *Salvia* L. ima tri centra rasprostranjenja: u centralnoj i južnoj Americi, središnjoj Aziji i Mediteranu, te istočnoj Aziji (Walker i sur. 2004).

Ljekovita kadulja, *Salvia officinalis* L., je višegodišnji, vazdazeleni polugrm visine do 60 cm (Slika 5). Donji, stariji dijelovi biljke su odrvenjeli i rjeđe dlakavi, tamno zelene boje, dok su vršni dijelovi zeljasti s gusto skupljenim listovima i gušće dlakavi zbog čega imaju srebrnkasto sivu boju (Slika 5c). Dlake su šuplje ispunjene eteričnim uljima koja biljci daju specifičan intenzivan miris. Listovi su jednostavni, nasuprotni s jednim ili dva režnja pri bazi,

cjelovitog ili blago pilastog ruba, naborane površine, zaobljeni ili lagano ušiljeni. Cvjetovi imaju bijele dlačice, stoje na 2-4 mm dugoj peteljci, a grupirani su u prividne pršljene s 5-10 cvjetova, koji čine prividni klas (Slika 5b). Čaška je duga 10-14 mm, točkasto dlakava s 5 zubaca. Vjenčić je veličine do 35 mm, ljubičasto plave ili ružičaste boje, rjeđe naginje bijeloj. Cijev vjenčića je ravna, gornja usna sadrži dva a donja tri režnja (Hedge 1972, Šilić 1973, Greguraš 2013). Korijenov sustav je dobro razvijen, što joj omogućuje prodiranje u kamenjar. Biljka prezimljuje s dijelom, obično mlađih listova, koji su gusto smješteni na krajevima sterilnih ogranaka (Kušan 1941). Ljekovita kadulja cvijeta između ožujka i srpnja, ovisno o klimatskim uvjetima staništa, a cvjetanje traje oko mjesec dana. Za vrijeme cvjetanja proizvodi veliku količinu nektara što ju čini važnom medonosnom biljkom. Na području Balkana biljku oprašuju medonosne pčele, dvokrilci i rjeđe bumbari (Bubalo i sur. 2010.). Oprašivanje se vrši pomoću „mehanizma poluge“, što uvelike pospješuje efikasnost oprašivanja (Classen-Bockhoff, 2007)(Slika 6). Razmnožavanje je uglavnom generativno, plodić je kalavac, okruglast, malo izdužen, širok 2 mm, dug 2 do 2.5 mm, kad sazrije kestenjaste je do tamnosmeđe boje (Židovec 2004).

Vrstu *Salvia officinalis* je prvi opisao Carl Linné 1753. godine. Ime roda *Salvia* u doslovnom prijevodu znači “potpuno zdrava”, a latinski epitet *officinalis* se isto odnosi na njezina ljekovita svojstva. Hrvatsko stručno ime za ovu biljku je ljekovita kadulja ili dalmatinska kadulja, a najčešća hrvatska narodna imena su: šalvija, pelin, salima, slavulja, krastatica, pitomi pelin, žalvija, žalfija, prava kadulja (FCD Nikolić 2013).

Prirodni areal ljekovite kadulje prostire se duž sjevernog, srednjeg i južnog Jadrana i bližeg kontinentalnog područja, uključujući dijelove Slovenije, Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Crne gore i Albanije (Ristić i sur., 1999). Staništa ove vrste pronađena su i u kontinentalnim područjima centralnog Balkana (Nikolić i Diklić 1966), gdje je njezina autohtonost upitna zbog izoliranosti staništa i utjecaja čovjeka na njezino širenje (Dweck 2000). Pretpostavka je da su populacije ljekovite kadulje koje se mogu pronaći u Francuskoj, Španjolskoj, kao i na sjeveru Afrike naturalizirane, te da potječu od biljaka koje su odbjegli iz uzgoja (Debbab i sur. 2009)(Slika 7).



Slika 5. Ljekovita kadulja (*Salvia officinalis* L.) a) (gore) prirodno stanište(izvor: <http://www.panoramio.com/photo> b) (dolje lijevo) cvat sastavljen od više prividnih pršljenova karakterističnih zigomorfni cvjetova s proširenom donjom usnom d) (dolje desno) listovi gusto prekrivenim dlakama s eteričnim uljima koje im daju karakterističnu sivo zelenu boju(izvor: <http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/mavica/>).



Slika 6. Mehanizam poluge je osobitost oprašivanja cvijeta ljekovite kadulje (Pisanty, 2012).



Slika 7. Rasprostranjenost ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.) na području Mediterana.

1.3.2. Svojstva, ljekovitost i uzgoj

Aromatični listovi ljekovite kadulje su tradicionalni začin mediteranske kuhinje. Njezini čajevi, pripravci i ekstrakti su korišteni još od grčkih i rimskih vremena zbog svojih protuupalnih, fungicidnih, gastroprotektivnih, baktericidnih, virucidnih, antidijabetičkih, antioksidativnih i antiangiogenih svojstava (Greguraš 2013). Ima protuupalni učinak, zahvaljujući visokom udjelu ursolične kiseline u listovima, koja je i predložena kao parametar kontrole kvalitete u biljnim pripravcima (Baričević i sur 2001). Studija Akhondzadeh i sur. (2003) je pokazala učinkovitost ekstrakta kadulje u povećanju kognitivnih funkcija pacijenata s blagom do umjerenom Alzheimerovom bolesti.

Stabljika i listovi sadrže oko 50 različitih spojeva, a većina njih se nalazi i u cvjetovima. Najzastupljeniji je α -tujon sa 50% u stabljici, 30% u listovima i 18% u cvijetu. Među esencijalna ulja kadulje se ubrajaju α -pinen, β -pinen, kamfen, kamfor, α -humulen, β -kariofilen i viridiflorol (Santos-Gomes i Fernandes –Ferreira 2001).

Med od kadulje se proizvodi u Hrvatskoj u malim količinama zbog relativno ograničenih klimatskih uvjeta i zahtjeva za specifičnom podlogom. Zbog svojih svojstava, med od ove biljke postaje sve više tražen na tržištu, a za njega raste i interes znanstvenika (Lušić i sur. 2007). Ljekovitosti meda pridonose polifenolni sastojci kojih kadulja ima u velikom udjelu, a imaju antioksidativni učinak (Belščak i sur. 2008).

Biljka ima i ukrasnu vrijednost, i često se sadi u vrtovima zbog mirisa, privlačnih listova i cvjetova, dobro uspijeva u uzgoju i nije zahtjevna za održavanje, izvrsno podnosi

sušu i smatramo ju pioninom vegetacije u pošumljavanju krša i sprječavanju erozije (Židovec 2004, Greguraš 2013). Jedna od prijetnji koje bi mogle utjecati na populacije kadulje su nekontrolirano sabiranje i smanjivanje staništa uslijed napuštanja ispaše koza i ovaca koje zamjenjuju garig i makija. Pčelari su prvi koji su primijetili njezino nestajanje u nekim dijelovima Dalmacije (Greguraš 2013).

Do danas se prikupljanje biljnog materijala ljekovite kadulje u velikoj mjeri svodi na divlje skupljanje, pa su porast komercijalne potražnje, slabo regulirana trgovina i gubitak staništa doveli do velikog pritiska na populacije ove vrste u divljini. U svrhu očuvanja genetski najbogatijih populacija vrlo su važne pravovremene konzervacijske mjere, što uključuje formiranje koncepta zaštite, praćenje širenja i smanjenja populacija, poticanje i širenje kultivacije, *ex situ* i *in situ* zaštitu, stvaranje kvalitetnih zakonskih regulacija prodaje i iskorištavanje, kao i zabranu trgovanja najugroženijim populacijama (Lange 1998.). Također, važno je primijetiti da države jugoistočne Europe u velikoj mjeri izvoze neprerađeni biljni materijal, koji u usporedbi sa prerađenim materijalom ima relativno nisku cijenu na tržištu. Poticanjem prerađivanja takvog biljnog materijala i certificiranje održivih ekstrakcijskih izvorišta, države jugoistočne Europe mogle bi postići veću financijsku dobit uz kvalitetniju zaštitu divljeg biofonda.

Imajući u vidu nabrojane mjere zaštite i preporuke za uzgoj, važno je ostvariti neke preduvjete, a poznavanje genetičke raznolikosti jedan je od najvažnijih. Ukoliko poznajemo genetičku raznolikost, srodnost i filogeografiju neke svojte tek tada možemo znati koje su populacije jedinstvene na svijetu, koje su u najboljoj kondiciji, a kojima prijeti izumiranje, koliko je kvaliteta eteričnih ulja uvjetovana genotipom, a koliko uvjetima okoliša. Iz takvih saznanja moguće je provesti pravovremene mjere zaštite, izabrati najvrjednije genotipove za uzgoj, predvidjeti utjecaj budućih klimatskih promjena i budući utjecaj sve brojnije ljudske civilizacije. Istraživanje genetičke raznolikosti prirodnih populacija ljekovite kadulje je posebno vrijedno ako se zna da je ova biljka hrvatski endem i da se u našoj zemlji nalaze najznačajnije populacije za zaštitu i za izbor budućeg uzgojnog materijala u svjetskim razmjerima.

1.3.3. Pregled dosadašnjih genetičkih istraživanja prirodnih populacija ljekovite kadulje

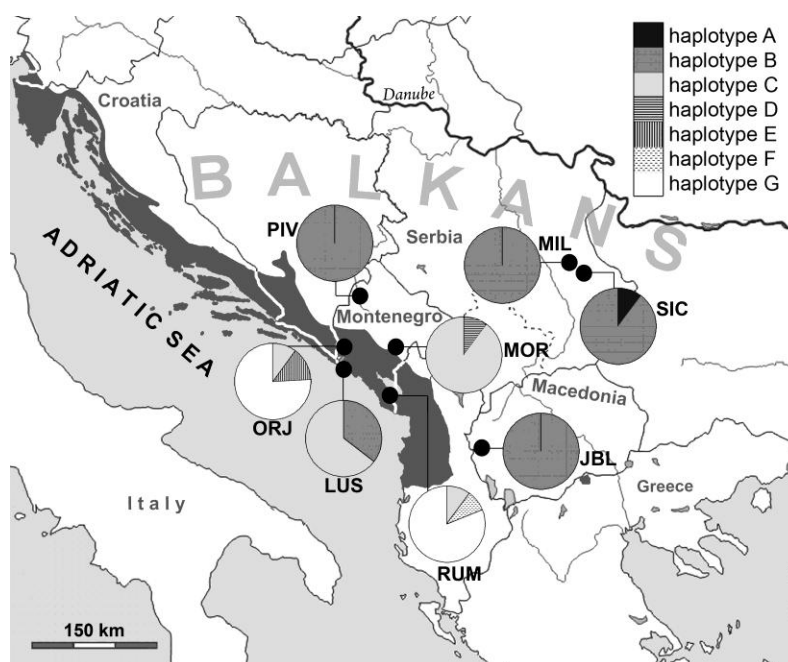
Koristeći RAPD biljege (Random Amplified Polymorphic DNA) Židovec (2004) je bila prva koja je načinila populacijsko-genetičku analizu na prirodnim populacijama ljekovite

kadulje. Najveći udio genetske raznolikosti zabilježen je između jedinki unutar populacije dok je puno manji udio raznolikosti pripadao razlikama među jedinkama različitih populacija. Istražujući genetsku strukturu utvrdila je da deset istraživanih populacija zapravo pripada u pet izvornih populacija. Među istraživanim populacijama utvrđeno je postojanje prostorne autokorelacije i prostorne izolacije (isolation-by-distance).

U svojoj doktorskoj disertaciji Jug-Dujaković (2010) je, upotrebom AFLP biljega (Amplified Fragment Length Polymorphisms) na 625 jedinki iz 25 prirodnih populacija, došla do istih zaključaka vezano uz genetičku raznolikost unutar i između populacija s tim da je ona utvrdila samo dvije izvorne populacije. Populacije Istre i Kvarnera su pripadale genskom skupu A, dok su populacije iz Dalmacije i Hercegovine pripadale genskom skupu B. Rubne populacije (Vratnik i Karlobag) i populacija Međugorje imale su po četiri jedinke iz drugog genskog skupa.

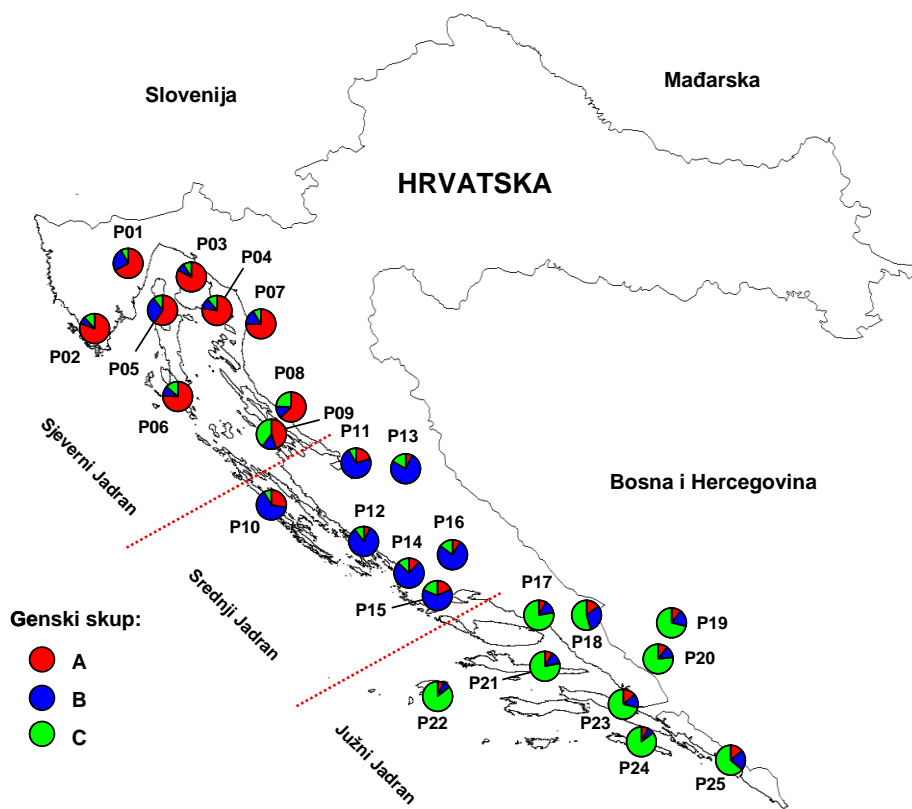
Stojanović i sur.(2013) su istražujući osam populacija iz kontinentalnog dijela centralnog Balkana i crnogorske obale Jadrana te upotrebljavajući sekvence kloroplastnih intergenskih regija pronašli sedam haplotipova (Slika 8). Iz tih 7 kloroplastnih haplotipova uspjeli su jasno razlučiti dvije linije: kontinentalno jadransku i više raznoliku čisto jadransku liniju. Ove linije nisu pokazivale znakove nedavnog demografskog širenja, a preklapaju se na jadranskoj obali. Sve četiri kontinentalne populacije su bile gotovo fiksne za poseban haplotip, a isti je bio rijedak u jadranskoj liniji. Analiza haplotipske mreže je pokazala blisku srodnost tog kontinentalnog haplotipa s ancestralnim haplotipom, te su sve kontinentalne populacije okarakterizirane kao reliktna i refugijalna.

Isti uzorak ljekovite kadulje kao kod Jug-Dujaković je upotrebljen u doktorskoj disertaciji Greguraš (2013) s tim da su kao genetički biljezi korišteni novo razvijeni mikrosatelitni biljezi (SSR, Simple Sequence Repeats), koje su u istom laboratoriju razvili Radosavljević i sur. (2011). Ova disertacija predstavlja dosada najopsežnije populacijsko-genetičko istraživanje prirodnih populacija ljekovite kadulje. Utvrđena je velika unutar populacijska raznolikost u svih populacija. Većina populacija se nalazi u Hardy-



Slika 8. Karta rasprostranjenja prirodnih populacija ljekovite kadulje s prikazom sedam utvrđenih sedam kloroplastnih haplotipova u kontinentalnom dijelu centralnog Balkana i na crnogorskoj obali Jadrana (Stojanović i sur. 2013)

Weinbergovoj ravnoteži. Signifikantno odstupanje je utvrđeno u šest populacija što je objašnjeno učinkom osnivača (eng. founder effect) (populacija Vratnik), geografskom izolacijom (populacija Mljet) te Wahlundovim učinkom (populacije Karlobag, Mostar, Pelješac i Konavle). Dobiveni rezultati ukazivali su na značajnu razinu protoka gena diljem cijelog istraživanog areala, premda je isto tako utvrđeno da kombinacija riječnih barijera u smjeru sjeveroistok-jugozapad (Zrmanja, Cetina) i planinskih masiva u smjeru sjeverozapad-jugoistok (Velebit, Biokovo) predstavlja najveću zapreku protoku gena ljekovite kadulje. Upotrebom Bayesovske analize populacijske strukture utvrđene su tri izvorne populacije (sjeverni Jadran, srednji i južni Jadran) (Slika 9). Ovaj rezultat je protumačen na dva načina: (1) ljekovita kadulja je mogla preživjeti *in situ* na nekoliko mjesta diljem istraživanog područja te se nakon posljednje glacijacije proširila, pri čemu je, ovisno o utvrđenim geografskim barijerama, došlo do ponovnog kontakta izvornih populacija i (2) postoji mogućnost da su kao izvor postglacijalne ekspanzije poslužile samo populacije Južnog Jadrana, odnosno da su sjeverne populacije nastale 'poduzorkovanjem' iz južnih. Autorica u ovom istraživanju između ostalog zaključuje da bi za izvođenje zaključaka o filogeografiji ove vrste bilo dobro kombinirati rezultate njezine mikrosatelitne analize s rezultatima sekvenci jezgrene i kloroplastne DNA.



Slika 9. Struktura izvornih populacija na temelju Bayesovske analize pomoću programa STRUCTURE pri $K = 3$ (maksimalna vrijednost ΔK). Svaka je populacija predstavljena prosječnim postotkom gena (Q) jedinki koji potječe iz određene izvorne populacije (A, B i C). Isprekidanim linijama su odvojene tri utvrđene regije (Sjeverni, Srednji i Južni Jadran) (Greguraš 2013).

1.4. Statističke metode u filogeografskim istraživanjima

Osnovna filogeografska analiza završava konstrukcijom filogenetskih stabla ili mreža. Grane stabla se nakon toga povezuju s demografskim događajima u povijesti. Tako na primjer pojava filogenetskog ogranka koji se može naći samo na jednom određenom geografskom području, može se interpretirati kao dokaz odvajanja u prošlosti te skupine individua od svih ostalih. Isto tako ukoliko jedinke iz dva geografska područja formiraju dva odvojena monofiletska ogranka s izuzetkom manjeg broja jedinki koje završavaju u suprotnoj geografskom ogranku, takve jedinke se mogu interpretirati kao dokaz migracije između ovih područja.

Unutar filogeografske statistike mogu se uočiti dvije struje: filogenetska i populacijsko-genetička. I dok filogenetska struja u dobivenim srodstvenim stablima vidi evolucijske

odnose, populacijsko-genetička struja u njima vidi slučajne populacijsko-genetičke procese. Sukladno ovim gledištima filogenetska struja smatra da se iz filogenetskih stabala može direktno zaključiti o filogeografskim događajima na kladistički način („Nested clade“ filogeografska analiza), dok se populacijska struja protivi ovakvom direktnom očitavanju i poseže za analizom filogenetskih stabala uz pomoć „coalescent“ teorije i nekih drugih statističkih pristupa.

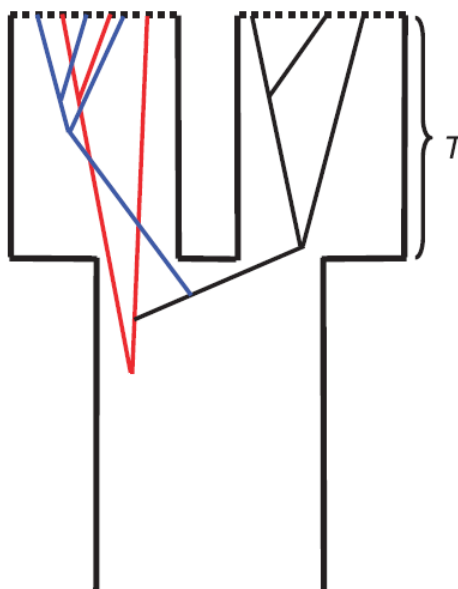
1.4.1. Nested clade filogeografska analiza (NCPA)

NCPA analiza je metoda koja omogućava zaključivanje o demografskoj povijesti populacija na osnovi filogenetskih informacija. Ovu analizu je prvi upotrijebio Templeton i sur (1995), a osniva se na ranijem kladističkom pristupu poznatom kao „Nested clade“ analiza (NCA). Nested clade analiza je dizajnirana s namjerom da proučava povezanost genotipa i fenotipa u kladističkim analizama. U NCPA analizi geografske lokacije se tretiraju kao fenotipske osobine koje koevoluiraju s genomom. Prvi korak u NCPA analizi je konstrukcija haplotipske mreže. Ova mreža se potom koristi za grupiranje haplotipova u ugnježdene filogenetske skupine (eng. nested clades). Dobivenu filogenetsku strukturu se na kraju statistički obradi kako bi se geografski opisao raspored filogenetskih grupa koristeći tzv. inference key (Templeton i sur. 1995).

Učinkovitost NCPA analize je isprobana ili upotrebom simulirajućih podataka ili prirodnih populacija s poznatom poviješću. Zaključak je bio da NCPA analiza nije bila u mogućnosti dokazati pravi scenarij unaprijed poznate alopatričke fragmentacije te da ima visoki stupanj lažno pozitivnih rezultata. Lažno pozitivne rezultate bi mogli povezati s mnoštvom statističkih izračuna nužnim za svaku filogenetsku granu. Međutim za razliku od od simulirajućih studija stvarne studije su pokazale rezultate konzistentne s drugim pristupima. Postoje dva objašnjenja zašto je to tako. Jedno je objašnjenje da su stvarni podaci pogodniji za NCPA analizu nego simulirajuće studije. Pojedini autori smatraju da se geografska povijest populacija događa kroz seriju genetičkih uskih grla (eng. genetic bottleneck) koji daju jaki signal upotrebom NCPA analize. Drugo objašnjenje je povezano sa subjektivnošću prilikom provođenja ove analize jer upravo ona navodi znanstvenike da upotrebljavaju upravo one opcije koje ih dovode do rezultata koje su već vidjeli primjenom drugih metoda.

1.4.2. Metode temeljene na Coalescent teoriji

Suprotno NCPA pristupu populacijsko genetička teorija tzv. „coalescent“ teorija nudi matematički okvir za opisivanje raspodjele gena u populaciji na način da povezuje demografskih model s dobivenim srodstvenim stablima. Ova teorija smatra da su srodstvena stabla populacija slučajno uzorkovanih jedinki stohastički procesi. Prema tome, dobiveno stablo je jako ovisno koje su jedinke sabrane za analizu. Isto tako dobiveno stablo ne uzima u obzir da u stvarnoj populaciji neke genetičke linije izumiru jer ne prenose svoje alele na potomke, dok druge prenose svoje alele i na veći broj potomaka. Činjenica da su dobivena srodstvena stabla utjecana izborom jedinki unutar populacija znači da se slično može očekivati prilikom analize jedinki iz različitih populacija. Tako ako istražujemo jedinke iz dvije populacije koje su potekle iz ancestralne populacije prije T generacija, srodstveno stablo može, ali i ne mora pokazati monofiletsko podrijetlo (Slika 10). U slučaju da filogenetska analiza ne potvrdi monofiletsko podrijetlo tj. ne pronade zajedničkog pretka moguće je krivo zaključiti da su jedinke srodnije između populacija nego unutar. Ako se direktno iz filogenetskog stabla zaključi da geneologija gena reflektira prošlost populacija onda ovaj fenomen poznat kao „lineage sorting“ može zaključke studije odvesti u potpuno krivom smjeru.



Slika 10. Prikaz slučajnosti pri dobivanju srodstvenog stabla na primjeru dvije populacije monofiletskog podrijetla. T = vrijeme u prošlosti kada se jedna ancestralna populacija razdvojila u dvije recentne populacije. Ako su za analizu izabrane „plave“ jedinke onda je filogenetskim stablom moguće detektirati zajedničkog pretka, dok izborom jedinki označenih crveno to nije moguće (Nielsen i Beaumont 2009).

Veliki je broj metoda u populacijskoj genetici koje se baziraju na modelu. Najčešće su ove metode temeljene na vjerodostojnosti (eng. likelihood), a u takve metode se ubrajaju i one temeljene na Bayesovskoj statistici. Matematički se vjerodostojnost prikazuje s $p(X | \Theta)$. Pri čemu X predstavlja podatke, a Θ je vektor koji sadržava parametre od interesa. Tako parametri mogu biti stupanj migracije, efektivna veličina populacije, stupanj rasta populacije itd. Za razliku od filogenetskih metoda koje su razvile metode za povezivanje geografskih podataka sa stablom, coalescent teorija uz pomoć matematičkih metoda povezuje demografske modele (npr. model varirajuće veličine populacije, model s vikarizmom i migracijom, model s vikarizmom, migracijom i populacijskim rastom) sa stablom. Funkcija vjerodostojnosti može biti izračunata uzimajući u obzir sva moguća stabla(T) i demografske modele prema Felsenstein-u (1988):

$$p(x | \Theta) = \int_{\Omega} p(x | T) p(T | \Theta) dT$$

,gdje Ω predstavlja set svih mogućih stabla.

Problem s ovdje prikazanim integralom je u tome da ne može biti direktno riješen ni jednom poznatom metodom pa se upotrebljavaju različite numeričke i simulacijski temeljene metode kao što su npr. metode temeljene na potpunoj vjerodostojnosti, aproksimativne metode bez mutacija, ABC metode, PAC metode itd. (Nielsen i Beaumont 2009).

1.4.3. Određivanje srodstvenih odnosa na populacijskoj razini

Bez obzira na koji će se način filogeografski podaci obraditi (NCPA ili populacijski temeljeno na modelu) prvi korak svih filogeografskih istraživanja je konstrukcija filogenetskih stabala ili filogenetskih mreža. Iako filogenija posjeduje izuzetno moćne metode za određivanje srodstvenih odnosa (geneologija) između svojti i njezinih dijelova (npr. gena) na razini populacija tradicionalne filogenetske metode (maximum parsimony, maximum likelihood, neighbour-joining) nailaze na probleme. Naime, tradicionalne filogenetske metode pretpostavljaju da ancestralni haplotip nije više prisutan u istraživanoj populaciji, a to je upravo suprotno populacijskoj teoriji (coalescent teorija) po kojoj ancestralni haplotip predstavlja najčešći haplotip u populaciji. Tradicionalne filogenetske metode zahtjevaju veliki

broj varijabilnih karaktera za točnu rekonstrukciju filogenije, a tako velikih varijacija unutar populacija najčešće nema. Isto tako rekombinacija je realnost na populacijskoj razini, a to tradicionalne filogenetske metode ne uzimaju u obzir. Iz svega nabrojanog jasno je da su za određivanje geneologija na populacijskoj razini potrebni alternativni filogenetski pristupi. Jedno od rješenja je primjena haplotipskih mreža umjesto tradicionalnih bifurkacijskih stabala. TCS metoda (Templeton i sur. 1992) unutar istoimenog računalnog programa (Clement i sur. 2000) je dosada najčešće upotrebljavana metoda za konstrukciju populacijskih geneologija biljaka kada je varijabilnost genetičkih informacija mala (npr. kloroplastna DNA). TCS računalni program smješta sekvence u haplotipske grupe i računa učestalost pojedinih haplotipova u uzorku. Ove učestalosti se zatim upotrebljavaju za određivanje tzv. haplotip outgroup vjerojatnosti koja korelira sa starošću haplotipova.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Južna Europa, ili često upotrebljavan izraz Mediteran, jedan je od glavnih svjetskih centara bioraznolikosti, refugijalno središte, mjesto specijacije i endemizma. Zaštita flore ovog područja, kao trezora biljne raznolikosti za cijelu Europu, od izuzetne je važnosti. Jedan od prvih koraka u programima zaštite svake vrste je prepoznavanje centara raznolikosti, jedinstvenosti i ugroženosti kroz istraživanje genetičke raznolikosti populacija. Dosadašnja istraživanja su pokazala da su tzv. „hot spots“ biološke raznolikosti u južnoj Europi ujedno i utočišta europske flore tijekom posljednje glacijacije. Prema tome, pronalaženje glacijalnih utočišta, a to se u današnje vrijeme prije svega radi primjenom molekularnih filogeografskih metoda na recentnim populacijama, najbrži je način pronalaženja područja koja imaju prioritet u zaštiti.

Do sada je zapadni dio Mediterana puno više istraživan nego istočni. Dobivanje novih informacija o genetskoj raznolikosti i demografskoj povijesti (filogeografiji) biljnih vrsta istočnog Mediterana mogao bi uvelike promijeniti stavove o demografskim povijesnim promjenama flore u Europi, distribuciji biološke raznolikosti i prioritetima zaštite u širem europskom pa i svjetskom kontekstu. Upravo zbog navedenih razloga pokrenuto je u okviru projekta „Filogenija i genetska raznolikost endemičnih biljaka dinarsko-jadranskog krša“ istraživanje genetičke raznolikosti ljekovite kadulje. Dosadašnja istraživanja upotrebom RAPD, AFLP biljega i mikrosatelita kao i istraživanja raznolikosti eteričnih ulja ukazali su na mnoge populacijsko genetičke fenomene, ali i na potrebu dodatnih filogeografskih istraživanja nužnih za potpuno shvaćanje populacijsko genetičke strukture ove endemične i ekonomski vrijedne biljne vrste istočne obale Jadrana. Kao početni dio mnogo kompleksnije filogeografske studije ljekovite kadulje načinjena su istraživanja prikazana u ovom radu, a ona su definirana postavljanjem sljedećih ciljeva:

1. provesti sekvenciranje dvije nekodirajuće kloroplastne DNA regije na 86 jedinki iz 21 prirodne populacije uzduž istočne jadranske obale,
2. primjenom odgovarajućih statističkih metoda i računalnih programa iz sekvenci kloroplastnih DNA utvrditi broj, populacijski sastav i distribuciju kloroplastnih haplotipova,
3. dobivene sekvence kloroplastnih DNA upotrijebiti za izradu haplotipske mreže kako bi se pratila distribucija haplotipova i mutacijski događaji od ishodišne populacije u prošlosti do danas,

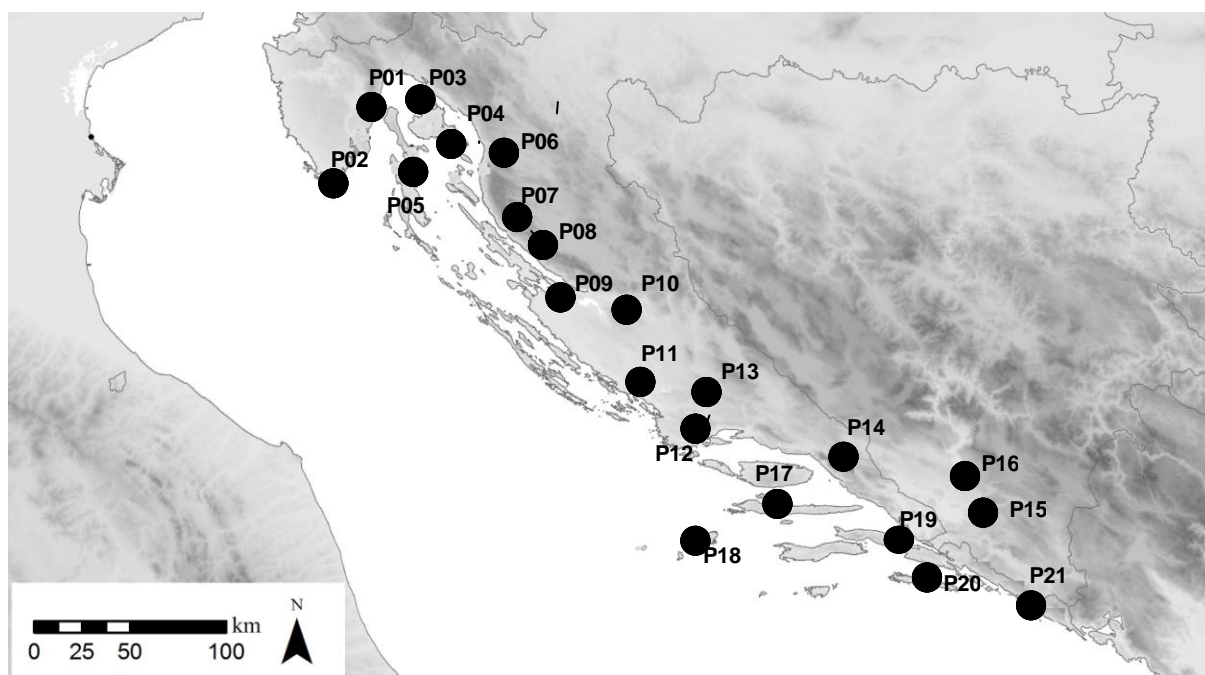
4. procijeniti lokacije glacijacijskih utočišta i migracijski smjer iz tih utočišta nakon zadnje oledbe,
5. utvrditi centre biološke raznolikosti i jedinstvenosti osobito važna za zaštitu i budućem uzgoju ove vrste,
6. procijeniti ljudski utjecaj na širenje ove ekonomski zanimljive vrste.

Smatramo da će realizacija postavljenih ciljeva pomoći u pravilnoj konzervaciji prirodnih populacija ljekovite kadulje te pridonijeti razvoju kvalitetnog i održivog iskorištavanja njezinog vrijednog bio-fonda.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljni materijal

Biljni materijal je sakupljen iz 21 prirodne populacije ljekovite kadulje (Slika 11, Tablica 1, str. 26). Uzorkovane populacije ravnomjerno su raspoređene tako da obuhvaćaju gotovo cijeli prirodni areal ljekovite kadulje. Svaka populacija je predstavljena s jednom do pet jedinki od kojih su prikupljeni mladi listovi za izolaciju DNA. Analizom je obuhvaćeno ukupno 86 jedinki.



Slika 11. Područje istraživanja i uzorkovanja populacija ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.). Populacije: P01. Šušnjeвица; P02. Kamenjak; P03. Krk; P04. Stara Baška; P05. Cres; P06. Vratnik; P07. Karlobag; P08. Pag; P09. Otišina; P10. Zrmanja; P11. Šparadići; P12. Vinišće; P13. Unešić; P14. Runovići; P15. Međugorje (BiH); P16. Mostar (BiH); P17. Hvar; P18. Vis; P19. Pelješac; P20. Mljet i P21. Konavle.

3.2. Izolacija ukupne stanične DNA

Ukupna stanična DNA izolirana je iz 100-120 mg svježeg lisnog tkiva ljekovite kadulje pomoću DNeasy® Plant Mini DNA izolacijskog kompleta (Qiagen®):

1. izvagano lisno tkivo smješteno je u epruvetu od 2 ml (Safe-lock 2 ml tube, Eppendorf®) u koju je dodana sterilizirana čelična kuglica za usitnjavanje,
2. epruvete su čvrsto zatvorene i uronjene u posudu s tekućim dušikom radi smrzavanja biljnog tkiva kako bi se lakše usitnilo,

3. smrznuto tkivo je usitnjeno u uređaju Tissue Lyser (Qiagen[®]), 1 min na frekvenciji od 30 Hz/s,
4. na usitnjeno biljno tkivo je dodano 600 µl prethodno ugrijanog AP1 pufera (otopina deterdženata i proteinaze), 4 µl RNaze, 6 µg polivinilpolipirolidona i 6 µl 2-merkaptoetanola (sprječavanje oksidacije), te je smjesa promiješana na 'vorteks' miješalici GVLab (Gilson[®]),
5. dobiveni homogenat inkubiran je 10 min na 65°C uz povremeno miješanje na 'vorteks' miješalici,
6. dodano je 195 µl AP2 pufera, promiješano, te smješteno 7 min na -20°C (taloženje denaturiranih proteina), a onda centrifugirano 7.5 min na 16100 g (centrifuga 5415D Eppendorf[®]),
7. 650 µl vodenog sloja (sadrži DNA molekule) je preneseno na QIAshredder Mini Spin kolonu, te je centrifugirano 5 min. na 16100,
8. u novu epruvetu od 1.5 ml preneseno je 600 µl filtrata i dodano 900 µl AP3 otopine (omogućuje selektivno vezivanje DNA molekula na membranu DNeasy Mini Spin kolone),
9. 650 µl promiješanog sadržaja nanoseno je na DNeasy Mini Spin kolonu, te centrifugirano 1 min na 9758 g (vezanje DNA molekula na membranu). Filtrat je odliven, a proces je ponovljen još dva puta, koristeći istu kolonu,
10. kolona s DNA je prebačena u novu epruvetu od 2 ml bez poklopca, dodano je 500 µl AW puferske otopine, te centrifugirano 1 min na 9758 g (ispiranje DNA molekula vezanih na koloni). Postupak se ponovio još jednom, ali ovaj put centrifugirano je 4 min. na 16100 g,
11. DNeasy Mini Spin kolona prebačena je u novu steriliziranu epruvetu od 1.5 ml i ostavljena otvorena tijekom 5 min. na sobnoj temperaturi kako bi ishlapio etanol. Zatim je dodano 100 µl AE pufera zagrijanog na 65°C (vodena otopina TRIS-a koja održava pH iznad 8, što je bitno za sprječavanje degradacije DNA kroz duži vremenski period), te ponovno inkubirano tijekom 5 min. u zatvorenoj epruveti pri sobnoj temperaturi (kako bi se membrana kolone dobro natopila), te centrifugirano 1 min na 9758 g,
12. dobiveni filtrat je otopina DNA, koja je zatim pohranjena na -20°C.

Tablica 1. Osnovni brojevi i geografski podaci istraživanih populacija ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.)

Br.	Populacija	<i>n</i>	Geografska širina	Geografska dužina	Nadmorska visina (m/nm)
P01	Šušnjeвица	2	451508N	0140944E	174
P02	Kamenjak	5	444618N	0135444E	18
P03	Krk	4	451336N	0143421E	135
P04	Stara Baška	5	445832N	0143946E	166
P05	Cres	4	450331N	0142209E	412
P06	Vratnik	5	445900N	0145846E	613
P07	Karlobag	1	443109N	0150554E	9
P08	Pag	5	442538N	0150241E	109
P09	Otišina	5	441210N	0153709E	145
P10	Zrmanja	5	441229N	0160319E	489
P11	Šparadići	2	433749N	0155731E	40
P12	Vinišće	3	433020N	0160655E	182
P13	Unešić	5	434345N	0160935E	375
P14	Runovići	4	432135N	0171629E	425
P15	Mostar (BiH)	5	431959N	0174503E	403
P16	Međugorje (BiH)	3	431030N	0174120E	199
P17	Hvar	5	430756N	0165706E	345
P18	Vis	3	430206N	0160811E	280
P19	Pelješac	5	425831N	0171625E	387
P20	Mljet	5	424450N	0173043E	245
P21	Konavle	5	423548N	0181456E	509
Ukupno		86			

3.3. Elektroforeza na agaroznom gelu

Uspješnost izolacije DNA je provjerena elektroforezom na 0.8% gelu agaroze u 0.5 x TBE puferu (45 mM tris-borata i 1 mM EDTA, pH 8), kroz jedan sat na 100 V (Sambrook i sur. 1989). Uzorci za elektroforezu su pripremljeni tako da je 1 μ l otopine DNA pomiješan s 4 μ l sterilizirane destilirane vode i s 1 μ l boje za nanošenje (30% saharoze, 0.25% brom-fenolnog modrila i 0.25% ksilen-cijanola; Sambrook i sur. 1989). Dobivena otopina je nanešena u jažice agaroznog gela. Kao standard je korištena DNA bakteriofaga λ (Boehringer, Mannheim) u koncentraciji od 250 ng/ μ l. Nakon što je brom-fenolno modrilo iz uzorka putovalo oko 3 cm elektroforeza je prekinuta, a gel je uronjen u otopinu etidij-bromida u 0.5 x TBE puferu (c = 5 μ g/ml) na 25 min. Etidij-bromid se specifično veže uz nukleinske kiseline interkaliranjem između dušičnih baza, a molekule DNA postaju vidljive kada se gel osvijetli UV svjetlom transiluminatora T-2202 (Sigma). Usporedbom debljine i sjaja trake izolirane DNA s trakom DNA bakteriofaga λ bilo je moguće utvrditi prisutnost DNA te procijeniti njezinu degradiranost i okvirnu koncentraciju DNA.

3.4. Fluorimetrijsko određivanje koncentracije izolirane DNA

Točna koncentracija izoliranih ukupnih staničnih DNA je izmjerena pomoću fluorimetra Qubit™ (Invitrogen®) i Quant-iT™ dsDNA BR kompleta za fluorimetrijsko mjerenje koncentracije DNA (Invitrogen®):

1. reagensi Quant-iT dsDNA BR kompleta su zagrijani do sobne temperature,
2. pripremljena je radna otopina boje u omjeru 1:200 (1 μ l Quant-iT™ boje i 199 μ l Quant-iT™ pufera),
3. pripremljeni su Standard 1 i Standard 2 na način da se u jednu epruvetu od 0.5 ml doda 10 μ l standarda 1, a u drugu 10 μ l standarda 2, te u svaku od njih po 190 μ l prethodno pripremljene otopine boje (ukupni volumen 200 μ l)
4. u epruvete od 0.5 ml stavljeno je po 5 μ l uzorka izolirane DNA i dodano je po 195 μ l otopine boje (ukupni volumen 200 μ l)
5. sadržaj svih epruveta je kratko izmiješan na 'vorteks' miješalici, te su sve otopine inkubirane 2-3 min na sobnoj temperaturi
6. fluorimetar je podešen na program Quant-idDNA BR, te je kalibriran standardima 1 i 2, a nakon toga se očitavala koncentracija uzoraka izolirane DNA,

7. stvarna koncentracija DNA (ng/ μ l) se dobila množenjem vrijednosti očitane na fluorimetru s brojem 40.

3.5. Umnožavanje kloroplastnih DNA regija lančanom reakcijom polimerazom

U želji za pronalaženjem najpogodnijeg (najvarijabilnijeg) kloroplastnog DNA biljega 6 kloroplastnih DNA lokusa je testirano na pet jedinki, izabranih nasumično, iz različitih populacija (Tablica 2). Od 6 istraženih lokusa dva su izabrana kao najvarijabilnija i prema tome najpogodnija za analizu cjelokupnog uzorka: *rps16x2F2-trnK^{UUU}* i *rpl32F-trnL^{UAG}* (Slika 12).

Za PCR umnožavanje *rps16x2F2-trnK^{UUU}* i *rpl32F-trnL^{UAG}* kloroplastnih lokusa upotrebene su odgovarajuće početnice (Tablica 2) i sljedeće otopine u ukupnom volumenu od 25 μ l:

- 8.35 μ l sterilizirane deionizirane vode (Qiagen[®]).
- 2.50 μ l 10xPCR Buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂; TaKaRa[®])
- 2.00 μ l dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) mix (2.5 mM; TaKaRa[®])
- 1.00 μ l PCR početnica (PCR otopina 1: *rps16x2F2*; PCR otopina 2: *rpl32F*)
- 1.00 μ l PCR početnica (PCR otopina 1: *trnK^{UUU}*; PCR otopina 2: *trnL^{UAG}*)
- 0.15 μ l Taq HS DNA polymerase (5 U/ μ l; TaKaRa)
- 10.00 μ l DNA (c=0.5 ng/ μ l)

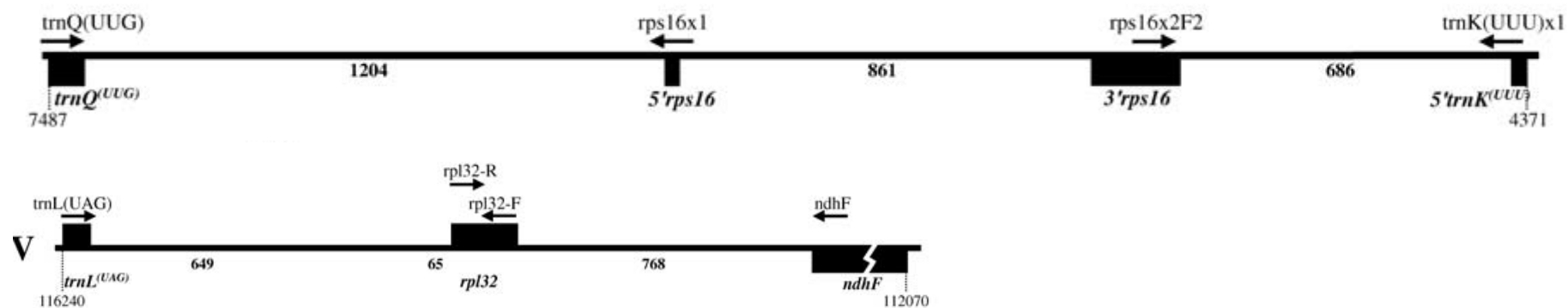
PCR umnožavanje dvije kloroplastnih regije provedeno je u uređaju GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems[®]), uz korištenje sljedećeg PCR programa (Shaw i sur. 2007):

- 80 °C 5 min,
- 30 ciklusa:
 - 95 °C 1 min (DNA denaturacija),
 - 50 °C 1 min (vezanje početnica),
 - „ramp time“ 0.3 °C/s to 65 °C,
 - 65 °C 4 min, (umnožavanje lanca),
- 65 °C 5 min,

Veličina i kvaliteta PCR produkta su provjerene elektroforezom u 1% agaroznom gelu na način opisan prilikom izolacije DNA.

Tablica 2. Istraživani cpDNA lokusi, imena PCR početnica, sekvence PCR početnica i literaturni izvori konstruiranih PCR početnica

Chloroplast DNA region	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Reference
<i>trnQ-5'rps16</i>	trnQ(UUG)	GCGTGGCCAA GYGGTAA GGC	Shaw et al. (2007)
	rpS16x1	GTTGCTTTYTACCA CATCGTTT	Shaw et al. (2007)
3'rps16-5'trnK	rpS16x2F2	AAAGTGGGTTTTTATGATCC	Shaw et al. (2007)
	trnK(UUU)	TTAAAAGCCGAGTA CTCTA CC	Shaw et al. (2007)
<i>rpS16</i> intron	rpS16F	AAACGATGTGGTA RAAAGCAA C	Shaw et al. (2005)
	rpS16R	AACATCWATTGCAASGATTCGATA	Shaw et al. (2005)
<i>ndhF-rpl32</i>	rpL32-R	CCAATATCCCTTYT TTTCCAA	Shaw et al. (2007)
	ndhF	GAAAGGTATKATCCA YGMATATT	Shaw et al. (2007)
rpl32-trnL	trnL(UAG)	CTGCTTCCTA A GA GCA GCGT	Shaw et al. (2007)
	rpL32-F	CAGTCCAAAAA A ACGTACTTC	Shaw et al. (2007)
<i>ycf6-psbM</i>	ycf6F	ATGGATATAGTAAGTCT YGCTTGGGC	Shaw et al. (2005)
	psbMR	ATGGAAGTAAATATTCTYGCATTTATTGCT	Shaw et al. (2005)



Slika 12. Raspored i orijentacija PCR početnica izabranih *rps16x2F2-trnK^{UUU}* i *rpl32F-trnL^{UAG}* kloroplastnih lokusa (Shaw et al. 2007)

3.6. Sekvenciranje PCR umnoženih kloroplastnih DNA regija

Neposredno prije sekvenciranja DNA, a kako bi se iz sekvencijske otopine uklonile nevezane početnice i degradirali nevezani nukleotidi, provedeno je pročišćavanje PCR otopine upotrebom egzonukleaze I (Thermo Scientific[®], #EN0581) i FastAP[™] termosjetljive alkalne fosfataze (Thermo Scientific[®], #EF0651) na sljedeći način:

- pripremljena je sljedeća reakcijska otopina:
 - 5.0 µl PCR produkta
 - 0.5 µl (10 U) egzonukleaze I
 - 1.0 µl (1 U) FastAP[™] termosjetljive alkalne fosfataze
- otopina je promiješana na 'vorteks' mješalici GVLab (Gilson[®]) i inkubirana na 37 °C 15 min
- reakcija je zaustavljena zagrijavanjem otopine na 85 °C 15 min

Bez daljnje obrade 5 µl ovako pročišćenih PCR produkata pomiješano je s 5 µl jedne PCR početnice (c=5 µM) i poslano u Macrogen Service Center (Amsterdam, Netherlands) koristeći EZseq uslugu DNA sekvenciranja. Tzv. Sangerovo dideoksi sekvenciranje je provedeno koristeći BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems[®]) po uputama proizvođača. Kapilarna elektroforeza provedena je na uređaju ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems[®]). Zbog točnosti očitavanja DNA sekvenci svaki PCR uzorak sekvenciran je iz oba smjera.

3.7. Slaganje sekvenci iz dva smjera i višestruko sravnjivanje

Dobivene *rps16x2F2-trnK^{UUU}* i *rpl32F-trnL^{UAG}* kloroplastne sekvence DNA iz oba smjera vizualizirane su (.ab1 format), spojene u jedinstven redoslijed i međusobno sravnjene uz pomoć računalnog programa Genius version 6.1 (<http://www.genious.com>). Predpostavljajući da su oba kloroplastna lokusa nekodirajuća i da imaju jednak evolucijski tempo sekvence oba lokusa su spojene u jedinstveni niz za svaku jedinku. Pod pretpostavkom da je svaka insercija/delecija duža od jednog baznog para jedan evolucijski događaj, svako je takvo mjesto u sekvencama svedeno na jednu baznu promjenu. Sravnjene sekvence spremljene su za daljnju filogenetsku analizu u FASTA formatu.

3.8. Filogeografska analiza

Filogeografska analiza kloroplastnih sekvenci DNA obuhvaćala je deskriptivnu statistiku, te izradu filogeografske mreže.

Deskriptivna statistika se odnosila na izračun mjerila raznolikosti kao što su nepristrana haplotipska raznolikost i nukleotidna raznolikost. Mjerila su izračunata za svaku populaciju kao i za cjelokupni set podataka pomoću programa Arlequin 3.5 (Excoffier i sur. 2005). Nepristrana haplotipska raznolikost (H_d ; *unbiased haplotype diversity*; Nei, 1987) je izračunata prema formuli:

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

gdje je,

H_d - nepristrana haplotipska raznolikost,

n - veličina uzorka,

p - učestalost haplotipa i ,

I - ukupan broj haplotipova.

Nukleotidna raznolikost (π ; nucleotide diversity; Nei and Li, 1979) je izračunata kao prosječan broj nukleotidnih razlika između svih parova haplotipova po formuli:

$$p = \frac{n}{n-1} \sum_i^K \sum_j^K p_i p_j d_{ij}$$

gdje je,

π - prosječni broj razlika između svih parova haplotipova,

n - veličina uzorka,

p - učestalost haplotipa i ,

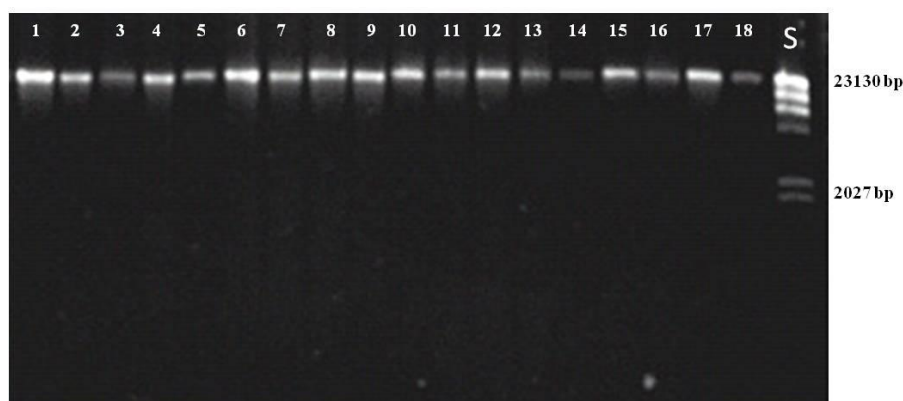
K - ukupan broj haplotipova,

d_{ij} - broj mutacija u koje su se dogodile od odvajanja haplotipa i i j .

Filogeografska mreža između haplotipova je konstruirana po metodi statističke štedljivosti (*statistical parsimony*; Templeton i sur. 1992). Metodom statističke štedljivosti tvori se najkraća razapinjuća mreža (*minimum spanning network*). U prvom se koraku vrhovi grafa koji predstavljaju haplotipove povezuju bridovima ukoliko se haplotipovi razlikuju u samo jednom nukleotidu, a zatim se povezuju svi oni haplotipovi koji se razlikuju u dva, te zatim i više nukleotida sve dok svi vrhovi nisu povezani ili je dosegnuta kritična vrijednost povezivanja (*connection limit*; Templeton i sur. 1992). Kritična vrijednost povezivanja je vjerojatnost nepostojanja nezapaženih supstitucija između haplotipova koja se može procijeniti na temelju broja različitih nukleotida između haplotipova i ukupne duljine sekvence. Filogenetska je mreža konstruirana pomoću programa TCS (Clement i sur. 2000) uz kritičnu vrijednost pozivanja od $P > 0.95$.

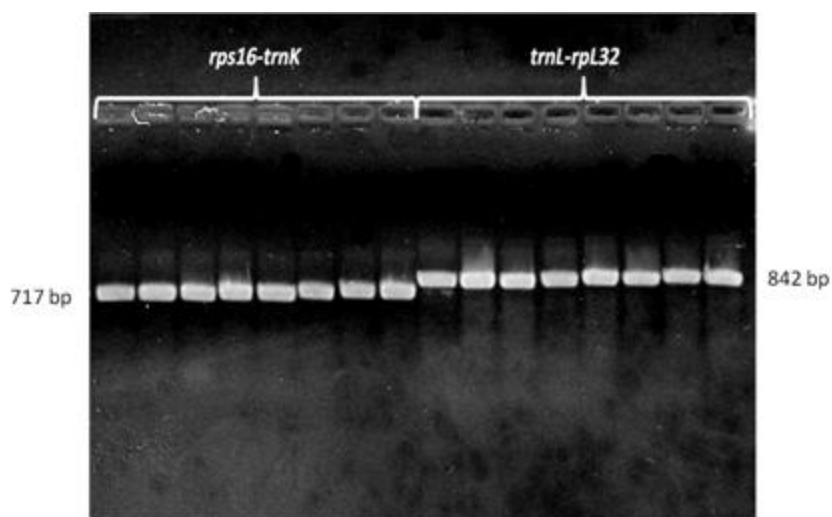
4. REZULTATI

Ukupne stanične DNA su uspješno izolirane. Kvaliteta izolacija određena je pomoću agarozne gel elektroforeze (Slika 13). Trake DNA na gelu, bez velikih repova, jasno su ukazivale na visokopolimerne DNA (preko 20 kb) i čiste izolate bez dodataka sekundarnih biljnih spojeva. Nakon florimetrijskog mjerenja koncentracije prosječna koncentracija svih 86 izoliranih DNA iznosila je 43.2 ng/ μ l.



Slika 13. Elektroforeza ukupnih staničnih DNA 18 jedinki ljekovite kadulje (pruga 1-18). S = veličinski DNA standard II (Roche®).

Duljina obje (*rps16-trnK* i *trnL-rpL32*) regije nakon PCR umnožavanja, pročišćavanja, sekvenciranja i višestrukog sravnjivanja iznosila je 1559 bp (Prilog 1). Pri tome je duljina samo regije *rps16-trnK* bila 717 bp, a *trnL-rpL32* 842 bp (Slika 14, Prilog 1).



Slika 14. Agarozna gel elektroforeza PCR umnoženih i za sekvenciranje pročišćenih *rps16-trnK* i *trnL-rpL32* regija kloroplastne DNA osam jedinki ljekovite kadulje.

Zapaženo je ukupno 9 kloroplastnih haplotipova koji su se razlikovali u ukupno 52 polimorfna mjesta od kojih su 22 predstavljali nukleotidne supstitucije, a 30 insercije/delecije

(Prilog 1). Ukupno je zapaženo osam insercija/delecija duljine od jedne do šest parova baza. Pod pretpostavkom da je svaka insercija/delecija duža od jednog baznog para jedan evolucijski događaj, svako je takvo mjesto u sekvencama svedeno na jednu baznu promjenu (Tablica 3; insercije/delecije duže od 1 pb su označene slovima) tako da je duljina sekvenci za analizu iznosila 1537 parova baza uključujući 30 polimorfnih mjesta (22 supstitucija i 8 insercija/delecija).

Na sjevernom dijelu Jadrana nije zabilježen niti jedan specifičan haplotip, odnosno zabilježene haplotipove 1,2,3,4 i 5 nalazimo i u južnom dijelu Jadrana (Tablica 4). Tri haplotipa (haplotipovi 6,8 i 9) nađeni su samo u Južnom Jadranu uključujući i jedan u populaciji Mostar (haplotip 7). Prema tome, od ukupno devet haplotipova njih četiri su bila jedinstvena za južni dio.

Analizom 86 jedinki ljekovite kadulje utvrđena je učestalost haplotipova od 2.3 % (Hap_6) do 39,5 % (Hap_1). Najčešći haplotip (Hap_1) bio je zapažen kod čak 10 populacija (Tablica 5). Njegova zastupljenost je mnogo manja kod južnih populacija gdje je zastupljen samo kod populacije Runovići i Mostar.

Broj različitih haplotipova zapaženih unutar populacija se kretao od jednog do tri. U 14 populacija zapažen je samo jedan haplotip, dok su kod četiri populacije zabilježena dva, a kod tri populacije tri različita haplotipa. Ukupna nepristrana haplotipska raznolikost iznosila je 0.789 ± 0.032 , a nukleotidna raznolikost 0.0036 ± 0.002 . Nepristrana haplotipska raznolikost populacija se kretala od 0.000 do 0.800 (P19 Mostar), a nukleotidna raznolikost od 0.0000 do 0.0018 (P19 Mostar) (Tablica 6).

Nakon analize statističke štedljivosti na prikazu kloroplastne haplotipske mreže moglo se vidjeti koliko su haplotipovi udaljeni od središnjeg hipotetskog haplotipa pretka te koje su se mutacije dogodile tijekom demografske povijesti ljekovite kadulje na ovom području (Slika 15). Brojevi na linijama koje povezuju haplotipove prikazuju mjesto mutacije u sekvenci (mutacijski korak). Hipotetski haplotip pretka nije pronađen u uzorkovanim jedinkama. Haplotip 1, 2, 3, 5 i 6 su udaljeni za jedan ili dva mutacijska koraka od haplotipa pretka, haplotipovi 7 i 8 su udaljeni tri, haplotip 4 udaljen osam, a haplotip 9 čak trinaest mutacijskih koraka.

Tablica 3. Polimorfna mjesta devet haplotipova zapaženih kod 21 populacije ljekovite kadulje na temelju sekvenci kloroplastnih regija rps16-trnK i rpl32-trnL.

Haplotip	172	335	347	521	547	551	568	701	793	931	979	985	986	998	1002	1006	1007	1008	1009	1037	1068	1145	1161	1168	1264	1344	1370	1380	1459	1464
Hap_1	C	-	C	T	T	-	C	T	C	T	C	T	-	T	T	C	A	A	A	C	C	A	-	d	A	T	A	-	f	G
Hap_2	C	-	T	T	T	-	C	T	C	T	C	T	-	T	T	C	A	A	A	C	G	G	-	d	A	T	A	-	f	C
Hap_3	C	-	T	T	T	-	C	T	C	T	C	T	-	T	T	C	A	A	A	T	G	G	-	d	A	T	A	-	f	G
Hap_4	T	-	C	T	T	-	T	T	A	T	T	T	-	T	T	C	A	A	A	C	G	G	-	-	-	C	T	-	f	G
Hap_5	C	a*	C	T	T	-	C	T	C	T	C	T	-	T	T	C	A	A	A	C	G	G	-	d	A	T	A	-	f	G
Hap_6	C	-	C	T	C	-	C	T	C	T	C	T	-	T	T	C	A	A	A	C	G	G	-	d	A	T	A	-	f	G
Hap_7	C	-	T	T	T	-	C	G	C	T	C	T	-	T	T	C	A	A	A	T	G	G	-	d	A	T	A	-	f	G
Hap_8	C	-	C	T	T	-	C	T	C	G	C	T	-	T	T	C	A	A	A	C	C	A	-	d	A	T	A	-	f	G
Hap_9	C	-	C	C	T	T	C	T	C	T	C	G	b	A	C	T	T	G	G	C	G	G	c	d	A	T	A	e	-	G

*Insercije/delecije duže od 1 para baza označene su slovima kako slijedi: a - motiv TTCTTT, b - motiv GGAA, c - motiv ATA, d - motiv AGTAC, e - motiv TTGAAT, f - motiv TTGT

Tablica 4. Raspodjela broja jedinki unutar populacija po haplotipovima

	Populacija	Haplotip									Broj jedinki	Broj haplotipova
		Hap_1	Hap_2	Hap_3	Hap_4	Hap_5	Hap_6	Hap_7	Hap_8	Hap_9		
P01	Šušnjeвица	2									2	1
P02	Kamenjak	1	3	1							5	3
P03	Krk	4									4	1
P04	Stara Baška	5									5	1
P05	Cres				4						4	1
P06	Vratnik	3				2					5	2
P07	Karlobag				1						1	1
P08	Pag	5									5	1
P09	Otišina	5									5	1
P10	Zrmanja	5									5	1
P11	Šparadici						2				2	1
P12	Vinišće				3						3	1
P13	Unesić					5					5	1
P14	Runovići	2	2								4	2
P15	Mostar (BiH)	2		2				1			5	3
P16	Međugorje (BiH)		2			1					3	2
P17	Hvar		5								5	1
P18	Vis			3							3	1
P19	Pelješac					1			3	1	5	3
P20	Mljet					4				1	5	2
P21	Konavle									5	5	1
UKUPNO		34	12	6	8	13	2	1	3	7	86	9

Tablica 5. Učestalost devet haplotipova zapaženih kod 21 populacije ljekovite kadulje.

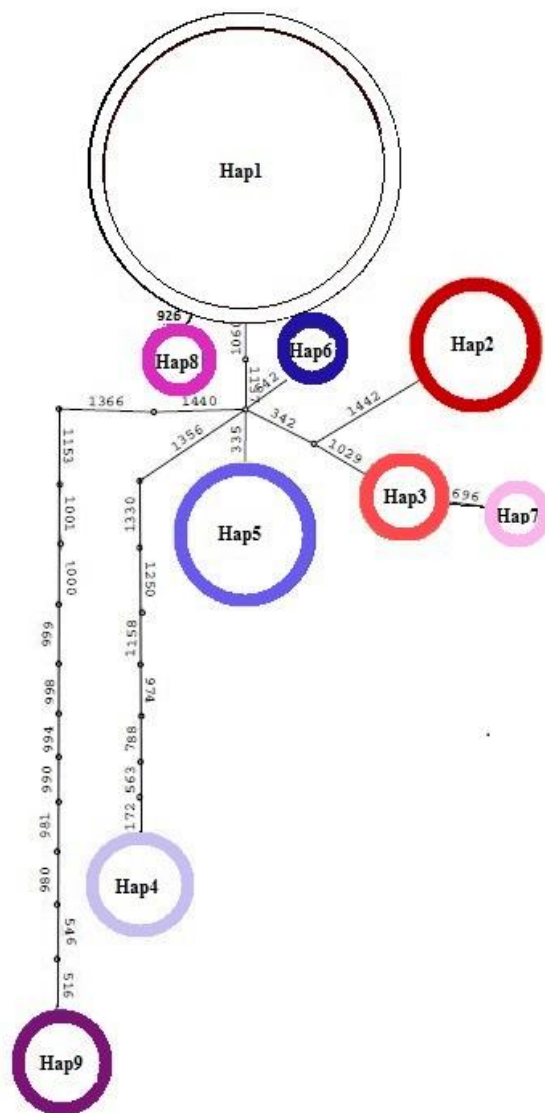
Haplotip	Broj jedinki	Učestalost	Populacije u kojima je pojedini haplotip zapažen									
			P01	P02	P03	P04	P06	P08	P09	P10	P14	P15
Hap_1	34	0.395	P01	P02	P03	P04	P06	P08	P09	P10	P14	P15
Hap_2	12	0.140	P02	P14	P16	P17						
Hap_3	6	0.070	P02	P15	P18							
Hap_4	8	0.093	P05	P07	P12							
Hap_5	13	0.151	P06	P13	P16	P19	P20					
Hap_6	2	0.023	P11									
Hap_7	1	0.012	P15									
Hap_8	3	0.035	P19									
Hap_9	7	0.081	P19	P20	P21							
Ukupno	86	1.000										

Tablica 6. Raznolikost haplotipova kloroplastne DNA kod 21 populacije ljekovite kadulje.

Br.	Populacija	Broj jedinki	Broj haplotipova	H_d	SE	□	SE
P01	Šušnjeвица	2	1	0.000	0.000	0.0000	0.000
P02	Kamenjak	5	3	0.700	0.218	0.0014	0.001
P03	Krk	4	1	0.000	0.000	0.0000	0.000
P04	Stara Baška	5	1	0.000	0.000	0.0000	0.000
P05	Cres	4	1	0.000	0.000	0.0000	0.000
P06	Vratnik	5	2	0.533	0.172	0.0010	0.001
P07	Karlobag	1	1	-	-	-	-
P08	Pag	5	1	0.000	0.000	0.0000	0.000
P09	Otišina	5	1	0.000	0.000	0.0000	0.000
P10	Zrmanja	5	1	0.000	0.000	0.0000	0.000
P11	Šparadici	2	1	0.000	0.000	0.0000	0.000
P12	Vinišće	3	1	0.000	0.000	0.0000	0.000
P13	Unešić	5	1	0.000	0.000	0.0000	0.000
P14	Runovići	4	2	0.667	0.204	0.0017	0.001
P15	Mostar (BiH)	5	3	0.800	0.164	0.0018	0.001
P16	Međugorje (BiH)	3	2	0.667	0.314	0.0013	0.001
P17	Hvar	5	1	0.000	0.000	0.0000	0.000
P18	Vis	3	1	0.000	0.000	0.0000	0.000
P19	Pelješac	5	3	0.700	0.218	0.0048	0.003
P20	Mljet	5	2	0.400	0.237	0.0036	0.002
P21	Konavle	5	1	0.000	0.000	0.0000	0.000
UKUPNO		86	9	0.789	0.032	0.0036	0.002

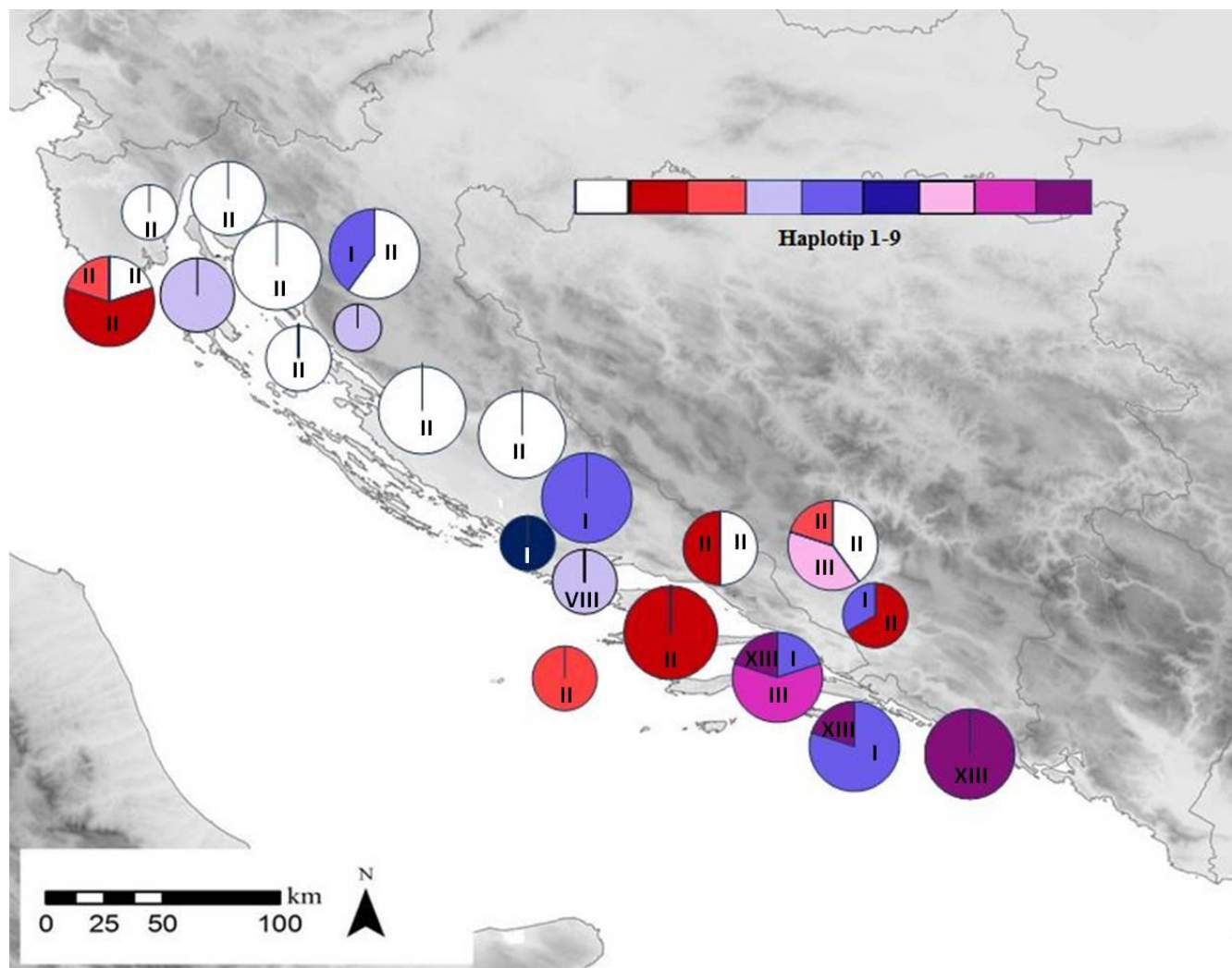
H_d - nepristrana haplotipska raznolikost i standardna pogreška (SE)

□ - nukleotidna raznolikost i standardna pogreška (SE)



Slika 15. Prikaz haplotipova dobivenih analizom statističke štedljivosti u TCS računalnom programu; Veličina krugova odgovara broju jedinki kojima pripada pojedini haplotip. Ishodišnom haplotipu ne pripada niti jedna uzorkovana jedinka. Brojevi prikazuju odgovarajuće mjesto mutacije (mutacijski korak)

Cjelokupna rasprostranjenost kadulje je prikazana na geografskoj karti, a lokacije sakupljanja jedinki predstavljene su statističkim krugovima koji prikazuju sastav kloroplastnih haplotipova (Slika 16). Areal kadulje se proteže duž Jadranske obale i unutrašnjosti, a haplotipovi se također mijenjaju smjerom jug-sjever. Iznimke su populacije Vratnika i Kamenjaka koje imaju neočekivane haplotipove s obzirom na geografsku poziciju. Broj uzorkovanih jedinki po populaciji se razlikovao od jedan do pet, pa su prema tome oblikovane veličine prikaza statističkih krugova da bi se što vjerodostojnije moglo zaključiti o stvarnoj pouzdanosti rezultata.



Slika 16. Raspodjela devet kloroplastnih haplotipova u 21 istraživanoj populaciji ljekovite kadulje. Položaj krugova odgovara lokalitetima skupljenih uzoraka prikazanim na slici 11. Veličina krugova odgovara broju uzorkovanih jedinki po pojedinoj populaciji, rimski brojevi (I, II, III, VIII, XIII) označavaju broj mutacijskih promjena od hipotetskog haplotipa pretka.

5. RASPRAVA

Aromatične i farmaceutski važne biljke često su znanstveno proučavane zbog njihovih eteričnih ulja i ljekovitih kemijskih spojeva (npr. Ramawat i Merillon 2008, Arora 2011). S druge strane, genetičke i filogeografske studije prirodnih populacija ovih biljaka su rijetke, (npr. Volz i Renner 2009; Yuan i sur. 2010), iako se dobro zna da su one nužne za zaštitu i buduće oplemenjivačke programe.

Naša genetička studija je jedna od rijetkih populacijsko-genetičkih studija na ljekovitoj kadulji (Židovec 2004, Jug-Dujaković 2010, Greguraš 2013), a kada se u razmatranje uzmu filogeografske studije onda je jedna od ukupno dvije poduzete do sada (Stojanović i sur. 2013). Prema istraživanju Walker-a (2004) uzorci koje smo imali u analizi gotovo u cijelosti pokrivaju prirodnu rasprostranjenost ljekovite kadulje. Prema dobivenim rezultatima moguće je zaključiti da je povijest ljekovite kadulje na ovom prostoru bila podložna dinamičnim populacijskim promjenama i fenomenima kao što su naglo širenje, fragmentacija staništa, genetički pomak (eng. genetic drift), efekt osnivača (eng. founder effect) i genetičko usko grlo (eng. genetic bottleneck). Ovakav zaključak je izveden prije svega zbog strukture zvijezde kod haplotipske mreže (Slika 15). Naime, dinamičke povijesno-demografske promjene dovele su do nestanka hipotetskog haplotipskog pretka, koji se više ne može pronaći u istraživanim populacijama, ali su prisutni usko srodni haplotipovi nastali od njega uz samo jednu ili dvije mutacijske promjene. Dinamičke povijesno-demografske promjene se očituju i u cijeloj paleti mutacijskih promjena koje sežu čak do broja 13 (Slika 15 i 16).

Iz dobivenih haplotipova i njihovog geografskog smještaja moguće je zaključiti da je cijela jadranska obala i uski kontinentalni rub podijeljen na dva dijela, pri čemu se granica može povući negdje kod Šibenika i rijeke Krke (Slika 16). Južne populacije ljekovite kadulje posjeduju svih devet nađenih kloroplastnih haplotipova, dok ih je u deset sjevernih populacija zabilježeno svega pet.

Kada bi se iz sjevernih populacija izdvojile populacije Kamenjak i Vratnik, koje jako odudaraju svojim haplotipskim profilima, u preostalim osam sjevernih populacija, ostala bi samo dva haplotipa i to nikad zajedno u istoj populaciji. Od tako preostalih osam sjevernih populacija dvije sadrže samo haplotip 4, a šest ima samo najučestaliji haplotip u ovom istraživanju, haplotipom br. 1. U sjevernim populacijama populacije Kamenjak i Vratnik odudaraju kako sastavom haplotipova, tako i po velikoj haplotipskoj raznolikosti. Teško je ovaj rezultat objasniti nekakvim prirodnim fenomenom, osim da je na njihov haplotipski profil utjecao čovjek. Naime, haplotip br. 6 u populaciji Vratnik je prilično izoliran od geografski najbližeg zabilježenog takvog haplotipa u populaciji Unešić. Zanimljivo je

primijetiti da je taj haplotip br. 6 samo jedan korak udaljen od hipotetskog haplotipnog pretka i da je prilično čest u južnim populacijama. S druge strane populacija Kamenjak, kao druga neobična populacija među sjevernim populacijama, posjeduje uz najučestaliji haplotip haplotip br. 1, još dva haplotipa osobita za čak pet populacija središnje Dalmacije (Vis, Pelješac, Runovići, Mostar i Međugorje). Prilikom pokušaja objašnjenja dobivenih rezultata za populaciju Vratnik bitno je znati da se ova populacija nalazi na netipičnom staništu za ljekovitu kadulju i da se po tome razlikuje od svih ostalih istraživanih populacija (Greguraš 2013). Naime, ova je populacija smještena na planinskom prijevoju s netipično hladnom klimom za ljekovitu kadulju. Podrijetlo ove populacije bi se moglo povezati s nedavno izgrađenom cestom za čiju je konstrukciju dovožena zemlja iz priobalja. Moguće je da je ta zemlja sadržavala merikarpe ljekovite kadulje podrijetlom iz južnih populacija. Ukoliko su ove pretpostavke točne za vjerovati je da će prva oštrija zima uništiti ovu populaciju. Što se tiče neobičnih haplotipova utvrđenih za populaciju Kamenjak, ne postoji drugo objašnjenje nego da su rezultat migracije uzgojenih jedinki podrijetlom iz središnje Dalmacije.

Južne populacije su nevjerojatno bogate različitim haplotipovima pa čak i unutar iste populacije (Slika 16). Ovakva raznolikost bi se mogla povezati s centrom raznolikosti ove vrste kao i s poznatim centrima biološke raznolikosti kao što su Biokovo, južna Dalmacija i Crna gora, ali i postojanjem poznatih genetičkih barijera kao što su riječna korita i ušća Neretve i Krke (Podnar i sur. 2004, Krystufek i sur. 2007, Kučera i suradnici 2008, Lakušić i sur. 2013). Najjužniji i genetski najudaljeniji haplotip br. 9, zbog svojih brojnih mutacijskih promjena od hipotetskog haplotipnog pretka, upućuje na povezanost ovih populacija s nekim sasvim drugim genetskim skupom nepostojećim u ovom istraživanju, a koji bi se mogao pronaći među populacijama iz Crne gore i južne Srbije (Stojanović i sur. 2013).

U svom doktoratu Greguraš (2013) se tijekom rasprave rezultata mikrosatelitne analize gotovo istog uzorku populacija kao u ovom radu, dvoumi jesu li tijekom glacijacije populacije ljekovite kadulje preživjele u većem broju refugija diljem jadranske obale ili su kao izvor postglacijacijskog širenja poslužile samo južne populacije. Očigledno je da rezultati našeg istraživanja podržavaju hipotezu postglacijalnog širenja iz južnih utočišta. Prema tome glavni filogenetski zaključak dobiven ovim istraživanjem bi se mogao sažeti u sljedeće: južne populacije predstavljaju refugijalno utočište iz kojih su se nakon oledbe, uz efekt osnivača i brojna ponavljajuća genetička uska grla (eng. genetic bottleneck), populacije ljekovite kadulje širile jadranskom obalom na sjeverozapad. Glavni argumenti ovom zaključku su puno veća genetička raznovrsnost, specifičnost i zastupljenost haplotipova koji se razlikuju u samo

jednoj mutacijskoj promjeni od hipotetskog haploidnog pretka u južnim populacijama te vidno haplotipski siromašnije i uniformnije sjeverne populacije. U svim ovim zaključcima treba biti oprezan i uzeti u obzir tisućljetnu prisutnost i utjecaj čovjeka na ovom području. Naime, smatra se da je jadranska obala neposredno nakon razdoblja posljednje glacijacije bila prekrivena šumskom vegetacijom, pa su staništa ljekovite kadulje bila znatno manja nego danas. Vjerojatno je čovjek taj koji je procesom deforestacije omogućio njezinu današnju rasprostranjenost. Čini se ipak da se pri tome kadulja širila spontano, jer kod namjernog presađivanja ne bi bila prisutna ovakva pravilna geografska distribucija genetičke raznolikosti (Greguraš 2013). Isto tako za izvođenje sigurnijih zaključaka o podrijetlu i načinu širenja ljekovite kadulje nužno je proširiti ovo istraživanje na diskontinuirane populacije na Balkanskom poluotoku te podrijetlom nejasne populacije s juga Francuske, Iberijskog poluotoka i Sjeverne Afrike.

Ovom studijom utvrđeno je da prirodne populacije ljekovite kadulje posjeduju veliku genetsku raznolikost, pa su zbog toga izuzetno zanimljive u programima oplemenjivanja i uzgoja. Čini se da danas populacije ljekovite kadulje nisu direktno ugrožene, ali bi se daljnjim uništavanjem staništa i pojačanim prikupljanjem ova slika mogla brzo promijeniti na gore. Uzgojem ljekovite kadulje za potrebe farmaceutske i kozmetičke industrije smanjila bi se potreba za prikupljanjem u prirodi, a time bi se ekološki i ekonomski gledano, zaštitio ovaj u svjetskim razmjerima vrijedan genofond.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju filogeografske analize sekvenci DNA dvije kloroplastne regije (*rps16x2F2-trnK^{UUU}* i *rpl32F-trnL^{UAG}*) 86 jedinki ljekovite kadulje, podrijetlom iz 21 prirodne populacije, moguće je zaključiti sljedeće:

1. Utvrđeno je ukupno 9 kloroplastnih haplotipova koji su se razlikovali u ukupno 52 polimorfna mjesta od kojih su 22 predstavljali nukleotidne supstitucije, a 30 insercije/delecije.

2. Iz dobivenih haplotipova i njihovog geografskog smještaja moguće je zaključiti da je cijela jadranska obala i uski kontinentalni rub podijeljen na dva dijela; sjeverni i južni. Granica između ova dva područja može se povući negdje kod Šibenika i rijeke Krke.

3. Jedanaest južnih populacija ljekovite kadulje posjeduju svih devet kloroplastnih haplotipova, dok ih je u deset sjevernih populacija zabilježeno svega pet.

4. Populacije Kamenjak i Vratnik odudaraju kako sastavom haplotipova, tako i po velikoj haplotipskoj raznolikosti od ostalih sjevernih populacija. Ovaj rezultat moguće je objasniti jedino aktivnim utjecajem čovjeka na širenje ove vrste.

5. Južne populacije su izrazito bogate različitim haplotipovima pa čak i unutar iste populacije. Ovakva raznolikost bi se mogla povezati s centrom raznolikosti ove vrste kao i s poznatim centrima biološke raznolikosti kao što su Biokovo, južna Dalmacija i Crna gora, ali i postojanjem ranije prepoznatim genetičkih barijera kao što su korita i ušća rijeka Neretve i Krke.

6. Najjužniji i genetski najudaljeniji haplotip br. 9, zbog svojih brojnih mutacijskih promjena od hipotetskog haplotipnog pretka, upućuje na povezanost ovih populacija s nekim sasvim drugim genetskim skupom nepostojećim u ovom istraživanju, a koji bi se mogao pronaći među populacijama iz Crne gore i južne Srbije.

7. Za izvođenje konačnih zaključaka o podrijetlu i načinu širenja ljekovite kadulje nužno je proširiti ovo istraživanje na diskontinuirane populacije u unutrašnjosti Balkanskog poluotoka te podrijetlom nejasne populacije s juga Francuske, Iberijskog poluotoka i Sjeverne Afrike.

8. Glavni filogenetski zaključak dobiven ovim istraživanjem je da južne populacije predstavljaju refugijalno utočište iz kojih su se nakon oledbe, uz efekt osnivača i brojna ponavljajuća genetička uska grla, populacije ljekovite kadulje širile jadranskom obalom na sjeverozapad.

9. Ovom istraživanjem je potvrđeno da prirodne populacije ljekovite kadulje, a osobito one iz južnog dijela, posjeduju veliku genetsku raznolikost, pa su zbog toga izuzetno zanimljive u programima oplemenjivanja i uzgoja.

10. Danas populacije ljekovite kadulje nisu direktno ugrožene, ali bi se daljnjim uništavanjem staništa i pojačanim prikupljanjem ova slika mogla brzo promijeniti na gore.

7. ZAHVALA

Srdačno se zahvaljujemo našem mentoru, profesoru doktoru znanosti Zlatku Liberu, koji nas je svojom neizmjernom podrškom, pažnjom i savjetima vodio kroz sve faze stvaranja ovog znanstvenog rada. Za nas je na najbolji mogući način otvorio vrata molekularne filogeografije, a svojim osmijehom i pristupnošću učinio ovo iskustvo uistinu ugodnim.

Zahvaljujemo se i profesoru doktoru Zlatku Šatoviću sa Agronomskog fakulteta te ostalim zaposlenicima Botaničkog zavoda, Zagrebačkog PMF-a, koji su svojim savjetima pomogli u izradi ovog rada.

8. SAŽETAK

Analiza raznolikosti kloroplastne DNA i filogeografija ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.)

Salvia officinalis L. je višegodišnji, vazdazeleni grm porodice *Lamiaceae*, karakterističan po mirisavim eteričnim uljima, sivozelenim listovima i plavo-ljubičastim cvjetovima. U narodu je ova autohtona vrsta istočne jadranske obale poznata kao mirisava kadulja, žalfija, kuš ili slavulja. Zbog svoje ljekovitosti cijenjena je još od antičkih vremena, a i danas ima veliki ekonomski značaj. Poznavanje genetičke raznolikost i filogeografije ljekovite kadulje preduvjet su pouzdanog utvrđivanje podrijetla ove vrste, rekonstrukcije njezina areala kroz prošlost, uvođenja efikasnih mjera zaštite, povezivanja genetičke komponente s ekonomski vrijednim osobinama te uzgoja najvrjednijih genotipova. Imajući u vidu navedene prednosti poznavanja genetičke raznolikosti i filogeografije ljekovite kadulje, u ovom radu smo analizirali raznolikost sekvenci dvije kloroplastne DNA regije (*rps16x2F2-trnK^{UUU}* i *rpl32F-trnL^{UAG}*) 86 jedinki iz ukupno 21 populacije uzduž jadranske obale i otoka. Nakon što su sekvence sravnjene, upotrebom TCS računalnog programa, načinjena je parsimonijska haplotipska mreža. Ukupno smo utvrdili 9 kloroplastnih haplotipova. Četiri haplotipa su se pokazala specifična isključivo za južne populacije. Imajući u vidu da južne populacije osim specifičnosti imaju i sve haplotipove zastupljene u Sjevernom Jadranu, zaključeno je da one predstavljaju genetički izvor širenju ove vrste. Naime, ljekovita se kadulja vjerojatno nakon oledbe (prije oko 12 000 godina) postepeno širila prema sjeveru pri čemu su zbog efekta osnivača (eng. founder effect) sjeverne populacije danas genetički siromašnije. Za genetički sastav nekolicine populacija (npr. Kamenjak i Vratnik) utvrdili smo širenje pod utjecajem čovjeka. Populacije iz Južnog Jadrana, zbog svog genetičkog bogatstva i specifičnosti, predstavljaju osobito vrijedan materijal za buduće programe oplemenjivanja i uzgoja.

Ključne riječi: ljekovita kadulja, filogeografija, kloroplastna DNA

9. SUMMARY

Analysis of chloroplast DNA diversity and phylogeography of common sage (*Salvia officinalis* L.)

Salvia officinalis L. is a perennial, evergreen shrub from the family *Lamiaceae* remarkable for its fragrant essential oils, greyish-green leaves and bluish-purple flowers. This indigenous east Adriatic coast species is also known by its traditional names such as mirisava kadulja, žalfija, kuš or slavulja. Because of its therapeutic abilities it is treasured since the ancient times and even today has a great economic importance. Understanding the genetic diversity and the phylogeography of common sage is the prerequisite for reliable identification of the origin of this species, as well as for reconstructing its areal through the past. It is also important for introduction of efficient protection measures, relating the genetic component with the economically valuable traits and for cultivation of the most valuable genotypes. Because of the mentioned advantages of knowing the genetic diversity and phylogeography of common sage, in this work we analysed the sequence diversity of two chloroplast DNA regions (rps16x2F2-trnKUUU and rp132F-trnLUAG) of 86 individuals from 21 populations along the Adriatic coast and islands. After aligning the sequences, a parsimony haplotype network was made using the TCS computer program. Overall we found 9 chloroplast haplotypes. Four haplotypes were identified as specific exclusively for southern populations. Since the southern populations in addition to specific also have all the other haplotypes present in North Adriatic, we concluded that they represent the genetic source for the propagation of this species. Namely, common sage has probably spread gradually after the deglaciation (12 000 years ago) in the northwestern direction, which left the north populations today genetically poorer because of the founder effect. For the genetic structure of a few populations (e.g. Kamenjak and Vratnik) we concluded that the expansion was caused by humans. Populations from the South Adriatic, because of their genetic richness and uniqueness, represent particularly valuable material for future breeding programs and cultivation.

Key words: common sage, phylogeography, chloroplast DNA

10. LITERATURA

- Akhondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Jamshidi A.H i Khani M (2003) *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 28 : 53-59.
- Arora R (2011) *Medicinal plant biotechnology*. CABI, Oxfordshire.
- Avise J.C, Arnold J, Ball R.M, Bermingham E, Lamb T, Neigel J.E, Reeb C.A i Saunders N.C (1987) Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics, *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Baričević D, Sosa S, Della Loggia R, Tubaro A, Simonovska B, Krasna A i Župančić A (2001) Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 75(2-3):125-132.
- Belščak A, Komes D i Piljac Žegarac J (2008) Antioxidant potential of Mediterranean herbs and herb-based honeys .Book of abstracts / 15th Young Investigators' Seminar on Analytical Chemistry , Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana , 46-49.
- Bubalo D, Matijaš J, Dvornik Gosaić J, Svečnjak L i Hegić G (2010) Praćenje oprašivača na kadulji (*Salvia officinalis* L.). U: Marić S, Lončarić Z, Florijančić T, Lužaić R (UR.) Zbornik radova 45. hrvatskog i 5. međunarodnog simpozija agronoma, 177-178. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
- Claßen-Bockhoff R (2007) Floral construction and pollination biology in the Lamiaceae. *Annals of Botany* 100(2): 359-360.
- Clement M, Posada D i Crandall K (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660.
- Dabsgaard W, Johnsen S.J, Clausen H.B, Dahl-Jensen D, Gundestrup N.S, Hammer C.U, Hvidberg C.S, Steffensen J.P, Sveinbjornsdottir A.E, Jouzel J i Bond G (1993) Evidence for general instability of past climate from a 250-kyr ice-core record, *Nature* 364: 218-220.
- Debbab A, Aly A.H, Edrada-Ebel R, Müller W.E, Mosaddak M, Hakikj A i Proksch P (2009) Bioactive secondary metabolites from the endophytic fungus *Chaetomium* sp. isolated from *Salvia officinalis* growing in Morocco. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 13(2): 229-234.

- Demesure B, Sodzi N i Petit RJ (1995) A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4: 129–131.
- Drew B.T i Sytsma K.J (2012) Phylogenetics, biogeography, and staminal evolution in the tribe Mentheae (Lamiaceae). *American Journal of Botany* 9(5): 933-953.
- Dumolin-Lapègue S, Demesure B, Fineschi S, Le Corre V i Petit R.J (1997) Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* 146(4):1475-87
- Dweck A.C (2000) The folklore and cosmetic use of various *Salvia* species. U: Kintzios SE (ur.) Sage: The Genus *Salvia*, 1-25. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Excoffier L, Laval G i Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- FCD Nikolić T. (ur.) (2004) Flora Croatica baza podataka. On-Line (<http://hirc.botanic.hr/fcd>). Botanički zavod, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
- Felsenstein J (1992) Estimating effective population-size from samples of sequences - inefficiency of pairwise and segregating sites as compared to phylogenetic estimates. *Genetical Research* 59: 139–147.
- Greguraš D (2013) Genetic diversity and population structure of Dalmatian sage (*Salvia officinalis*), Doktorska disertacija. PMF, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Hedge I.C (1972) *Salvia* L. U: Tutin T.G, Heywood V.H, Burges N.A, Valentine D.H, Walters S.M, Webb D.A (ur.) *Flora Europaea* 3, 188-192. Cambridge University Press. London.
- Jug-Dujaković M (2010) Genetska i biokemijska raznolikost ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.). Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Krystufek B, Buzan E.V, Hutchinson W.F i Hänfling B (2007) Phylogeography of the rare Balkan endemic Martino's vole, *Dinaromys bogdanovi*, reveals strong differentiation within the western Balkan Peninsula. *Molecular Ecology* 16(6): 1221-1232.
- Kučera J, Tremetsberger K, Vojta J i Marhold K (2008) Molecular study of the *Cardamine maritima* group (Brassicaceae) from the Balkan and Apennine Peninsulas based on amplified fragment length polymorphism. *Plant Systematics and Evolution* 275(3): 193-207.

- Kušan F (1941) Kadulja, *Salvia officinalis* L. Vjesnik ljekarnika 15: 374-376, 16: 407-416, 17: 448-450, 18: 483-487, Zagreb
- Lakušić D, Liber Z, Nikolić T, Surina B, Kovačić S, Bogdanović S (2013) Molecular phylogeny of *Campanula pyramidalis* species complex (Campanulaceae) inferred from chloroplast and nuclear non-coding sequences and its taxonomic implications; u tisku
- Lange D (1998) Europe's medicinal and aromatic plants: their use, trade and conservation. TRAFFIC International, UK, Cambridge
- Lušić D, Koprivnjak O, Ćurić D, Sabatini A.G i Conte L.S (2007) Volatile Profile of Croatian Lime Tree (*Tilia* sp.), Fir Honeydew (*Abies alba*) and Sage (*Salvia officinalis*) Honey. Food Technology and Biotechnology 45 (2): 156–165.
- Medail F i Diadema K (2009) Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. Journal of Biogeography 36(7): 1333-1345.
- Nei M (1987) Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Nei M, i Li W.H (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 76:5269-5273.
- Nielsen R i Beaumont M.A (2009) Statistical inferences in phylogeography. Molecular Ecology 18 : 1034–1047.
- Nikolić V i Diklić N (1966) Zajednica žalfije i rudinskog pelina *Artemisio-Salvietum officinalis* (*Salvia officinalis* – *Artemisia lobelii* Grebešenikov 1950) u Sićevačkoj klisuri. Glasnik Prirodnjačkog Muzeja, Beograd, Serija B, knjiga 21:5-21 (sažetak na njemačkom).
- Petit R.J, Aguinagalde I, de Beaulieu J-L, Bittkau C, Brewer S, Cheddadi R, Ennos R, Fineschi S, Grivet D, Lascoux M, Mohanty A, Muller-Starck G, Demesure-Musch B, Palme A, Martin J.P, Rendell S i Vendramin G.G (2003) Glacial Refugia: Hotspots But Not Melting Pots of Genetic Diversity. Science 300: 1563-1565.
- Pisanty G. (2012) Own work, Wikimedia commons (<http://commons.wikimedia.org/wiki>).
- Podnar M, Mayer W i Tvrtković N (2004) Mitochondrial phylogeography of the Dalmatian wall lizard, *Podarcis melisellensis* (Lacertidae). Organisms Diversity & Evolution 4(4): 307-317.

- Radosavljević I, Jakse J, Javornik B, Šatović Z i Liber Z (2011) New Microsatellite markers for *Salvia officinalis* (Lamiaceae) and cross-amplification in closely related species. *American Journal of Botany* 98(11):e316-e318.
- Ramawat K.G i Merillon J.M (2008) *Bioactive molecules and medicinal plants*. Springer. ISBN: 978-3-540-74603-4.
- Ristić M.S, Brkić D.D i Nastovski T.Lj. (1999) Hemijski sastav etarskog ulja žalfije. U: Brkić D. (ur.) *Žalfija (Salvia officinalis L.)*, 29-42. Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr. Josif Pančić" Beograd i Art Grafik, Beograd.
- Sambrook, J., Fritsch E. F i Maniatis T, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Santos-Gomes P.C i Fernandes-Ferreira M (2001) Organ and season-dependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated at two different sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2908-2916.
- Shaw J, Lickey E.B, Schilling E.E i Small R.L (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94(3): 275–288.
- Singh K.K (2004) Mitochondrial dysfunction is a common phenotype in aging and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1019: 260-264.
- Stojanović D, Aleksić M, Jančić I i Jančić R (2013) The indigeneity of a Mediterranean herb in the continental Balkans : A plastid-based phylogeographic survey of *Salvia officinalis* L. and its conservation implications (u tisku).
- Sutton J (2004) *The Gardener's Guide to Growing Salvias*. Workman Publishing Company,17. ISBN 978-0-88192-671-2
- Šilić Č (1973) *Atlas drveća i grmlja*. Zavod za izdavanje udžbenika, Sarajevo.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy A.G i Cosson J.F (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7(4): 453-464.
- Taberlet P, Gielly L, Patou G i Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17:1105-1109.
- Templeton A. R, Crandall K. A i Sing C. F (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619-633.

- Templeton A.R, Routman E i Phillips CA (1995) Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographic distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140: 767–782.
- Volz S.M i Renner S.S (2009) Phylogeography of the ancient Eurasian medicinal plant genus *Bryonia* (Cucurbitaceae) inferred from nuclear and chloroplast sequences. *Taxon* 58:550-560.
- Walker J.B, Sytsma K.J, Treutlein J i Wink M (2004) *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae. *American Journal of Botany* 91(7): 1115-1125.
- Yuan Q-J, Zhang Z-Y, Hu J, Guo L-P, Shao A-J i Huang L-Q (2010) Impacts of recent cultivation on genetic diversity pattern of a medicinal plant, *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae). *BMC Genetics* 11:29
- Židovec V (2004) Varijabilnost prirodnih populacija mirisave kadulje (*Salvia officinalis* L.). Doktorska disertacija. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

11. PRILOG

