Genetska i biokemijska raznolikost sredozemnog smilja (Helichrysum italicum /Roth/ G. Don)

Ninčević, Tonka

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:689279

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb





Sveučilište u Zagrebu

AGRONOMSKI FAKULTET

TONKA NINČEVIĆ

GENETSKA I BIOKEMIJSKA RAZNOLIKOST SREDOZEMNOG SMILJA (*Helichrysum italicum* /Roth/ G. Don)

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.

University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

TONKA NINČEVIĆ

GENETIC AND BIOCHEMICAL DIVERSITY OF IMMORTELLE (*Helichrysum italicum* /Roth/ G. Don)

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2020.

Sveučilište u Zagrebu

AGRONOMSKI FAKULTET

TONKA NINČEVIĆ

GENETSKA I BIOKEMIJSKA RAZNOLIKOST SREDOZEMNOG SMILJA (*Helichrysum italicum* /Roth/ G. Don)

DOKTORSKI RAD

Mentori:
Prof. dr. sc. Zlatko Šatović
Doc. dr. sc. Marija Jug-Dujaković

Zagreb, 2020.

University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

TONKA NINČEVIĆ

GENETIC AND BIOCHEMICAL DIVERSITY OF IMMORTELLE (*Helichrysum italicum* /Roth/ G. Don)

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
Prof. dr. sc. Zlatko Šatović
Dr. sc. Marija Jug-Dujaković

Zagreb, 2020.

Bibliografski podaci:

- **Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti
- **Znanstveno polje:** Poljoprivreda
- **Znanstvena grana:**
- **Institucija:** Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za sjemenarstvo
- **Voditelj doktorskog rada:** prof. dr. sc. Zlatko Šatović, doc. dr. sc. Marija Jug-Dujaković
- **Broj stranica:** 116
- **Broj slika:** 6, grafikona: 20
- **Broj tablica:** 14
- **Broj priloga:** 6
- **Broj literaturnih referenci:** 165
- **Datum obrane doktorskog rada:** 24.07.2020.
- **Sastav povjerenstva za obranu doktorskog rada:**
  1. Doc. dr. sc. Martina Grdiša, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet
  2. Prof. dr. sc. Zlatko Liber, Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet
  3. Dr. sc. Dejan Pljevljakušić, Institut za proučavanje ljekovitog bilja „Dr Josif Pančić"

Rad je pohranjen u:
Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4 p.p. 550, 10000 Zagreb,
Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog Fakulteta, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Agronomskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu održanoj 23. siječnja 2018. te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu održanoj 13. ožujka 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA O ODGOVORNOSTI

Ja, Tonka Ninčević, izjavljujem da sam samostalno izradila doktorski rad pod naslovom:

GENETSKA I BIOKEMIJSKA RAZNOLIKOST SREDOZEMNOG SMILJA (*Helichrysum italicum* /Roth/ G. Don)

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga doktorskog rada;
- da je doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u izradi istog nisam koristila drugim izvorima osim onih koji su u njemu navedeni;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (čl. 19).

Zagreb, 19. svibnja 2020. godine

_____

Potpis doktorandice

Ocjena doktorskog rada

Doktorska disertacija je obranjena na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, 24.07.2020. pred povjerenstvom u sastavu:

1. Doc. dr. sc. Martina Grdiša _____
Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet

2. Prof. dr.sc. Zlatko Liber _____
Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet

3. Dr. sc. Dejan Pljevljakušić _____
Institut za proučavanje ljekovitog bilja „Dr Josif Pančić”

Informacije o mentorima

Zlatko Šatović rođen je 1965. godine u Zagrebu. Na Fakultetu poljoprivrednih znanosti Sveučilišta u Zagrebu diplomirao je 1990. godine na ratarskom smjeru. Magistrirao je 1995. godine na International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies (CIHEAM), Mediterranean institute of Zaragoza (IAMZ), Zaragoza, Španjolska. Iste godine Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet u Zagrebu nostrificirao je stečenu diplomu. Doktorsku disertaciju obranio je 1999. na Sveučilištu u Zagrebu Agronomski fakultet. Znanstveno se usavršavao na više uglednih institucija u inozemstvu (Belgija, Bugarska, SAD, Španjolska, Švedska).

Od 1990. godine radi na Zavodu za oplemenjivanje bilja, genetiku i metodiku istraživanja Fakulteta poljoprivrednih znanosti na poslovima i zadacima stručnog suradnika. U nastavi sudjeluje od 1992. godine kada je izabran u znanstveno-nastavno zvanje asistenta na predmetu Sjemenarstvo. Od 1998. godine radi na novoosnovanom Zavodu za sjemenarstvo. U znanstveno-nastavno zvanje docent izabran je 2000., u zvanje izvanrednog profesora 2003., u zvanje redovitog profesora 2007 te u trajno zvanje 2012. godine.

Od 2006. nositelj je dva predmeta Diplomskog studija Biljnih znanosti (Očuvanje biljnih genetskih izvora; Molekularna raznolikost i evolucija) te dva predmeta na doktorskim studijima: Analiza molekularne raznolikosti i filogenetika na Poslijediplomskom doktorskom studiju Poljoprivrednih znanosti Sveučilišta u Zagrebu Agronomski fakultet i Analiza genetičke raznolikosti na Poslijediplomskom doktorskom studiju Biologije Sveučilišta u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet (sunositelj s prof. dr. sc. Zlatkom Liberom).

Znanstvena djelatnost pristupnika uključuje istraživanja u vezi očuvanja biljnih genetskih izvora, analize molekularne raznolikosti, statističke genomike (izrada genetskih karata i analiza lokusa za kvantitativna svojstva) te molekularne filogenetike. Prof. dr. sc. Zlatko Šatović autor je 222 znanstvena rada, od kojih 130 iz skupine a1, 52 iz skupine a2 i 40 iz skupine a3. Ukupna citiranost znanstvenih radova prof. dr. sc. Zlatka Šatovića iznosi 2,735 (WoS), a Hirshov indeks (*h-index*) 30. Najutjecajniji rad mu je citiran 249 puta.

Bio je voditelj 6 domaćih znanstvenih projekata i 4 međunarodna, a sudjelovao je na 10 domaćih i 13 međunarodnih znanstvenih projekata. Prof. dr. sc. Zlatko Šatović je voditelj Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv) uspostavljenog krajem 2015. godine kao i projekta "Bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja" (2018.-2023.).

Prof. dr. sc. Zlatko Šatović je glavni urednik časopisa *Agriculturae Conspectus Scientificus* (ACS) od 2005. godine.

Za svoj je znanstveni rad dobio Državnu nagradu za znanost (Godišnja nagrada za znanost u području biotehničkih znanosti; 2004.) kao i Medalju (2010.) i Povelju (2019.) Sveučilišta u Zagrebu Agronomski fakultet.

Marija Jug-Dujaković rođena je 16. rujna 1954. u Barnaulu, Rusija (SSSR). Pohađala je Gimnaziju Metković, gdje je maturirala 1973. godine. Diplomirala je na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu (PMF) Sveučilišta u Zagrebu 1979. godine i stekla zvanje diplomiranog inženjera biologije. Na istom je fakultetu 1985. obranila magistarski rad pod naslovom „Fiziološki i genetski faktori razvitka karanfila u uvjetima *in vitro*“ i time stekla titulu magistar prirodnih znanosti iz područja biologije (Biologija stanice). Doktorsku disertaciju „Genetska i biokemijska raznolikost ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.)“ obranila je 2010. na Sveučilištu u Zagrebu Agronomski fakultet.

Od 1979. do 1980. volontira u Laboratoriju za virologiju Botaničkog zavoda PMF-a Sveučilišta u Zagrebu. U Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu zapošljava se 11. lipnja 1980., gdje do 1995. radi na razvitku tehnologije proizvodnje sadnog materijala u kulturi biljnog tkiva. Od 1996. do 2004. godine boravi u SAD-u i radi kao biolog istraživač: u tvrtki *Integrated Food Technologies*, *Emmaus a*ktivirala je funkciju hidroponskog staklenika kao dijela sustava za pročišćavanje otpadnih voda iz ribogojilišta; u tvrtki *Merck & Co*., *West Point* sudjelovala je na istraživanju i razvoju cjepiva za HIV, rotavirus, HPV i vodene kozice. Od 2004. ponovo radi na Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša kao asistent. Od 2013. do 2019. radi u zvanju znanstvenog suradnika. Od početka 2020. je u mirovini.

Kao suradnik na modulu Osnove uzgoja ljekovitog i aromatičnog bilja na preddiplomskom studiju Mediteranska poljoprivreda (2008.-2013.) u Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša bila je mentor 13 završnih radova iz područja ljekovitog i aromatičnog bilja.

Znanstvena djelatnost dr. sc. Marije Jug-Dujaković od 2004. uključuje istraživanja vezana za ljekovito i aromatično bilje, s posebnim naglaskom na očuvanje biljnih genetskih izvora i populacijsku genetiku. Od 2015. do danas bavi se i etnobotanikom. Autorica je 18 znanstvenih radova, od kojih je 12 iz skupine a1, pet iz skupine a2 i dva iz skupine a3.

Vodila je četiri znanstvena projekta i bila suradnica na njih devet.

Za svoj znanstveni rad Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet dodijelilo joj je Zahvalnicu za osobitu uspješnost u rezultatima rada u ostvarenoj suradnji.

Najveće hvala mentoru prof. dr. sc. Zlatku Šatoviću koji me svojom profesionalnošću, znanjem i nadasve prijateljskim odnosom motivirao i uvelike mi pomogao pri izradi doktorskog rada. Hvala na ukazanom povjerenju i podršci prilikom odabira teme. Zahvaljujem na nesebično uloženom vremenu i pomoći pri statističkoj obradi podataka, savjetovanju te vođenju tijekom cijelog procesa izrade rada.

Hvala mentorici dr. sc. Mariji Jug-Dujaković na pruženoj prilici, savjetima i pomoći tijekom istraživanja i izrade doktorskog rada. Zahvaljujem na poticanju da boravim na znanstvenim skupovima gdje sam stekla nova znanja i poznanstva koja su mi pomogla u radu. Veliko hvala na riječima ohrabrenja u trenutcima kada je bilo potrebno.

Doc. dr. sc. Martini Grdiša neizmjerno hvala na nesebičnoj pomoći i prijateljskoj suradnji od samog početka istraživanja. Zahvaljujem na uloženom trudu i vremenu te svim savjetima koji su doprinijeli kvaliteti ovog rada.

Hvala prof. dr. sc. Zlatku Liberu na vodstvu, pomoći i ukazanom povjerenju tijekom analiza u molekularnom laboratoriju. Zahvaljujem na uloženom vremenu i svim prijedlozima koji su uvelike pomogli kvaliteti ovog rada.

Hvala dr. sc. Dejanu Pljevljakušiću na velikoj pomoći oko biokemijskih analiza. Zahvaljujem na uloženom trudu, entuzijazmu, savjetima i ukupno pomoći kako bi ovaj rad bio što bolji.

Hvala Tomislavu na brizi, potpori i svim savjetima zbog kojih je sve bilo lakše.

Zahvaljujem Blanki, Katji, Slavku, Maji, Branimiru, Silvii, Mirelli, Eldi, Maji, Katarini, Goranu, Gabrieli, Lukreciji, Goranu, Radojki, Mislavu, Diani, Andrei, Neni, Mrkiju i ostalim kolegicama i kolegama Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša koji su svatko na svoj način doprinijeli istraživanju i nastanku ovog rada.

Hvala mojoj sestri Ivani koja me uvijek poticala na izvrsnost i vjerovala u mene. Hvala Marku P. na podršci i strpljenju tijekom svih razgovora o znanosti.

Hvala mom Marku na velikoj potpori, razumijevanju i svakodnevnoj motivaciji za rad.

Hvala roditeljima na školovanju, podršci i strpljenju, hvala na svemu što su me naučili da postanem osoba kakva sam danas.

Sažetak

Sredozemno smilje (*Helichrysum italicum* /Roth/ G. Don) je višegodišnja biljna vrsta iz roda *Helichrysum* Mill. i porodice Asteraceae. Rasprostire se na području Mediterana nastanjujući obale mora kao i planine do 2200 metara nadmorske visine. Raznim istraživanjima utvrđeno je protuupalno, antioksidativno, antimikrobno i antivirusno djelovanje smilja. Smilje je u Hrvatskoj gospodarski značajna vrsta, čije se samonikle populacije sakupljaju u najvećim količinama od ukupnog broja sakupljenog ljekovitog i aromatičnog bilja. Zbog velikog pritiska na samonikle populacije smilja ograničeno je sakupljanje, što je potaknulo razvoj plantažnog uzgoja i potrebu za novim saznanjima o vrsti. S ciljem utvrđivanja genetske i biokemijske raznolikosti populacija rasprostranjenih na području Hrvatske uzorkovano je 18 prirodnih populacija sredozemnog smilja. Analiza genetske raznolikosti provedena je pomoću biljega AFLP, pri čemu je korištenjem četiriju kombinacija početnica utvrđeno 693 polimorfnih biljega. Analizom molekularne varijance (AMOVA) utvrđeno je da većina ukupne genetske raznolikosti pripada raznolikosti unutar populacija (93,08 %), dok manji dio (6,92 %) pripada raznolikosti između populacija. Wrightov indeks genetske diferencijacije (F_{ST}) bio je signifikantan, ali nizak (0,036), što upućuje na ekstenzivan protok gena između populacija. Bayesovskom analizom populacijske strukture utvrđeno je postojanje dvaju genskih skupova, a populacije su pridružene genskim skupovima ovisno o udjelu pripadnosti. Utvrđena su dva genska skupa koja je moguće objasniti na temelju zemljopisnog položaja mjesta prikupljanja. Otkrivanje lokusa za koje se pretpostavlja da su pod prirodnim odabirom je provedeno na dva temeljna načina: utvrđivanjem lokusa koji pokazuju atipične vrijednosti parametra genetske diferencijacije (F_{ST}) kao i analizom korelacija između genetske raznolikosti i okolišnih svojstava. Usporedbom rezultata navedenih metoda utvrđeno je pet biljega AFLP koji su značajno povezani s bioklimatskim svojstvima. Kemijski sastav eteričnog ulja istraživanih populacija određen je plinskom kromatografijom - masenom spektrometrijom. Analizom biokemijske raznolikosti utvrđene su značajne razlike između populacija u devet spojeva eteričnog ulja: limonen, linalool, nerol, neril acetat, trans kariofilen, neril propanoat, α-kurkumen, β-selinen i δ-selinen, na temelju kojih su utvrđeni kemotipovi. Multivarijatnim analizama kemijske raznolikosti identificirana su tri kemotipa. Utvrđena je značajna korelacija između biokemijske i genetske udaljenosti, pri čemu se 18,3 % biokemijske diferencijacije između populacija može objasniti genetskom udaljenošću.
Zbog povećane potražnje za eteričnim uljem smilja visoke kvalitete ključna su nova saznanja o ovoj biljnoj vrsti. Rezultati istraživanja će stoga pridonijeti razvoju budućih oplemenjivačkih programa i komercijalnih kultivara sredozemnog smilja, koji trenutno ne postoje. Dobiveni rezultati pridonijet će i razvoju programa očuvanja biljnih genetskih izvora ove biljne vrste.

Ključne riječi: sredozemno smilje, *Helichrysum italicum* /Roth/ G. Don, populacije, biljezi AFLP, eterično ulje, molekularna raznolikost, biokemijska raznolikost

GENETIC AND BIOCHEMICAL DIVERSITY OF IMMORTELLE (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don)

Immortelle *(Helichrysum italicum* /Roth/ G. Don) is a perennial plant species of the genus *Helichrysum* and the family Asteraceae. It is spread in the Mediterranean area inhabiting the sea coast as well as the mountains up to 2,200 meters above sea level. In Croatia, it grows along the Adriatic coast, on islands, and rocky pastures of the Dalmatian hinterland. *H. italicum* has been used in folk medicine for centuries due to many medicinal properties. Many studies have confirmed its anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial and antiviral activity. With the widespread use in the cosmetic pharmaceutical and food industries, the demand for *H. italicum* essential oil has increased in recent years. Immortelle makes 95% of the total wild harvested medicinal and aromatic plants in Croatia. Due to the overexploitation of immortelle wild populations, their collection was limited, which led to the development of plantation cultivation and new scientific research.

This doctoral thesis aims to determine the genetic diversity and population structure of immortelle, which has not been researched for this area and also to determine the biochemical diversity. Eighteen wild populations along the Adriatic coast and islands were sampled, representing the entire natural area of its distribution in Croatia. Accessions were planted in the experimental field to avoid the influence of different environmental factors. DNA was isolated from young leaves. Genetic diversity was assessed using the AFLP molecular marker technique used to detect a large number of polymorphic markers and to examine genetic diversity and structure in species for which there is no prior knowledge of the genome. Using four combinations of primers, 693 polymorphic AFLP markers were obtained. The total phenotypic diversity of all analyzed populations calculated by the Shannon information index was H_t = 0.414. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that most of the genetic diversity was attributed to differences among individuals within populations (93.08%), which is expected due to the outcrossing nature of the species. Wright's index of genetic differentiation was significant but low (F_{ST} = 0.036), indicating extensive gene flow between populations. The unrooted Fitch–Margoliash tree based on Nei's genetic distance matrix showed a separation of 18 *H. italicum* populations into two groups (supported by 96% *bootstrap* values) according to geographical origin. The first group included the northern Adriatic populations, and the second the populations of the central and southern Adriatic. The Bayesian model-based clustering using Structure showed the highest Δ*K* value for *K* = 2 and the second highest Δ*K* value for *K* = 3. At *K* = 2, the representative populations of ancestral gene pool A were mainly those from the northern Adriatic, while the populations from the central and southern Adriatic were representative of a separate gene pool B. At *K* = 3, a newly formed gene pool C was identified. Populations in which Q < 75% were observed as a hybrid because they were formed by mixing the two original populations. By using BAPS, two distinct ancestral clusters were obtained: A: with populations from the north and B: with the rest of the populations from the central and southern Adriatic which showed consistency with the results of the Structure at *K* = 2. These results are also in concordance with the Fitch–Margoliash tree that confirmed the existence of two different genetic groups. Adaptive genetic variation in *H. Italicum* natural populations was examined using landscape genetic methods Mcheza and BayeScan. Mcheza revealed 4.71% loci possibly under selection, among which 2.24% of loci exhibited higher F_{ST} values and 2.47% of loci exhibited lower F_{ST} values than the majority of loci. BayeScan detected the lower proportion of loci under divergent selection (2.02%) than Mcheza. The spatial analysis method Samβada detected 50 individual markers associated with bioclimatic variables, among them five were identified by both Mcheza and BayeScan as being under directional selection. A high correlation was found between 19 bioclimatic variables. Out of the 171 pairs examined, a strong positive correlation (r > 0.70) was found in 26 cases, while a strong negative correlation (r < -0.70) was found in five cases. The

principal components analysis (PCA), based on a correlation matrix, showed that the first four major components together explained 93.82% of the variance.

The chemical composition of essential oils for all populations was determined by gas chromatography and mass spectrometry. A total of 90 compounds were obtained of which 84 compounds were identified. Fifty compounds were isolated in 18 populations. Seventy-two compounds were present in a concentration of less than 5%. The maximum proportion of 18 essential oil compounds was higher than 5% in at least one sample from 18 populations. Populations differed significantly in nine essential oil compounds: limonene, linalool, nerol, neryl acetate, trans caryophyllene, neryl propanoate, α-curcumene, β-selinene, and δ-selinene that were taken for chemotype identification. Multivariate analyzes of chemical diversity enabled the identification of three chemotypes. Based on stepwise discriminant analysis, the most informative compounds for discriminating the three *H. italicum* chemotypes were: nerol, neryl propanoate, trans-caryophyllene, and β-selinene. With these compounds, after a cross-validation procedure, it was possible to correctly classify 100% of the populations into presumed chemotypes.

Correlations between geographical, genetic, and biochemical distances were calculated. A significant correlation between biochemical and genetic distance was found and it was shown that 18.3% of biochemical differentiation between populations can be explained by genetic distance.

Due to the increased demand for high-quality immortelle essential oil, new data about this plant species are crucial. The results of the research are a valuable contribution to the development of future breeding programs and commercial varieties of *H. italicum* that do not currently exist. The obtained results will also contribute to the development of conservation strategies of these valuable genetic resources.

Keywords: immortelle, *Helichrysum italicum* /Roth/ G. Don, populations, AFLP markers, essential oil, molecular diversity, biochemical diversity

SADRŽAJ

1. UVOD 1
   1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja 3
2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA 4
   2.1. Taksonomija i rasprostranjenost 4
   2.2. Morfološke osobine 7
   2.3. Tehnologija uzgoja 8
   2.4. Biokemijska svojstva 9
   2.5. Metode izolacije spojeva 13
   2.6. Biološka aktivnost i upotreba 14
      2.6.1. Antimikrobno djelovanje 15
      2.6.2. Antivirusno djelovanje 17
      2.6.3. Antioksidativno i protuupalno djelovanje 17
      2.6.4. Ostala djelovanja smilja 19
3. MATERIJAL I METODE RADA 20
   3.1. Ekozemljopisni pregled i prikupljanje 20
   3.2. Poljski pokus 23
   3.3. Metode molekularnih analiza 25
      3.3.1. Izolacija ukupne stanične DNA 25
      3.3.2. Određivanje koncentracije i čistoće izolirane DNA 26
      3.3.3. Polimorfizam dužine umnoženih ulomaka (AFLP) 27
      3.3.4. Detekcija PCR umnoženih ulomaka DNA 29
   3.4. Analiza eteričnog ulja 31
      3.4.1. Izolacija eteričnog ulja 31
      3.4.2. Plinska kromatografija s plameno-ionizacijskim detektorom 31
      3.4.3. Plinska kromatografija s masenom spektrometrijom 31
   3.5. Statistička obrada molekularnih podataka 33
      3.5.1. Deskriptivna statistika 33
      3.5.2. Analiza molekularne varijance i ϕ_{ST} udaljenosti 33
      3.5.3. Genetska struktura populacija 33
      3.5.4. Genetska udaljenost između populacija i izrada stabla 34
      3.5.5. Bayesovska analiza populacijske strukture 34
      3.5.6. Prostorna genetika 36
      3.5.7. Lokalna adaptacija 36
   3.6. Statistička obrada biokemijskih podataka 38
      3.6.1. Deskriptivna statistika 38

3.6.2. Analiza varijance 38
3.6.3. Analiza glavnih sastavnica 38
3.6.4. Analiza skupina 38
3.6.5. Analiza varijance između skupina populacija 39
3.6.6. Diskriminacijska analiza 39
3.6.7. Korelacije 39
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA 40
4.1. Genetska raznolikost 40
4.1.1. Deskriptivna statistika 40
4.1.2. Analiza molekularne varijance 41
4.1.3. Genetska struktura populacija 42
4.1.4. Genetska udaljenost između populacija 43
4.1.5. Bayesovska analiza populacijske strukture 46
4.1.6. Prostorna genetika 51
4.1.7. Lokalna adaptacija 53
4.2. Biokemijska raznolikost 61
4.2.1. Deskriptivna statistika i korelacije 61
4.2.2. Analiza varijance 69
4.2.3. Analiza glavnih sastavnica 71
4.2.4. Analiza skupina 74
4.2.5. Analiza varijance između skupina populacija 77
4.2.6. Diskriminacijska analiza 77
4.2.7. Korelacije - odnos između zemljopisne, genetske i biokemijske udaljenosti 80
5. RASPRAVA 85
5.1. Genetska raznolikost 85
5.2. Biokemijska raznolikost 89
6. ZAKLJUČCI 93
7. POPIS LITERATURE 95
8. ŽIVOTOPIS 109
9. PRILOZI 111

Popis tablica

Tablica 1. Rod *Helichrysum* Mill. – klasifikacija europskih svojti
Tablica 2. Lokacije uzorkovanja samoniklih populacija smilja
Tablica 3. Molekularna raznolikost 18 populacija smilja na temelju 693 biljega AFLP
Tablica 4. Raspodjela raznolikosti između i unutar 18 populacija smilja na temelju biljega AFLP pomoću analize molekularne varijance (AMOVA)
Tablica 5. Genska raznolikost (H_E) i genetska struktura 18 populacija smilja pod pretpostavkom ravnoteže po Hardyju i Weinbergu
Tablica 6. Korelacije između 19 bioklimatskih svojstava i prve četiri glavne sastavnice
Tablica 7. Broj biljega AFLP koji pokazuju signifikantnu povezanost s okolišnim svojstvima utvrđenu pomoću programa Samβada te broj biljega za koje je na temelju frekventističke (Mcheza) i Bayesovske metode (BayeScan) utvrđeno da pokazuju atipične vrijednosti parametra genetske diferencijacije (F_{ST})
Tablica 8. Deskriptivna statistika 18 najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja sredozemnog smilja izračunana na temelju (A) svih uzoraka (18 populacija x 2 pokusne lokacije x 2 ponavljanja) i (B) prosjeka 18 populacija
Tablica 9. Korelacije između 18 najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja
Tablica 10. Analiza varijance 18 najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja
Tablica 11. Rezultati analize glavnih sastavnica: korelacije između devet spojeva eteričnog ulja smilja i prve četiri glavne sastavnice
Tablica 12. Euklidska udaljenost između 18 populacija sredozemnog smilja izračunana na temelju devet spojeva eteričnog ulja
Tablica 13. Analiza varijance devet spojeva eteričnog ulja između skupina populacija
Tablica 14. Najinformativniji spojevi za diskriminaciju triju kemotipova smilja na temelju postupne diskriminacijske analize

Popis slika

Slika 1. Lokacije uzorkovanja samoniklih populacija smilja
Slika 2. Populacije smilja na prirodnom staništu: a) Krk; b) Cres; c) Pag (Miškovići); d) Hvar
Slika 3. Populacije u različitim fazama uzgoja: a) sijanci; b) presadnice; c) sadnja presadnica; d) presadnica posađena na stalno mjesto u pokušalište
Slika 4. Pokusno polje: a) u Vojniću Sinjskom i b) pokušalište Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu
Slika 5. Kromatogram s 18 spojeva eteričnog ulja koji imaju udio veći od 5 % u najmanje jednom uzorku iz 18 populacija
Slika 6. Kromatogrami triju kemotipova

Popis grafikona

Grafikon 1. Stablo Fitch-Margoliash na temelju matrice genetskih udaljenosti po Neiju između 18 populacija smilja. Vrijednosti bootstrap veće od 50 % dobivene na temelju 1000 pseudoponavljanja označene su na granama

Grafikon 2. Vjerodostojnost hipoteza [*ln* P(X|K)] i stopa promjene vjerodostojnosti između uzastopnih vrijednosti *K* (Δ*K*) za različit broj izvornih populacija (*K* = 1 do 11) u Bayesovskoj analizi skupina na temelju modela provedenog u računalnom programu STRUCTURE

Grafikon 3. Struktura izvornih populacija u Bayesovskoj analizi skupina na temelju modela provedenog u računalnom programu STRUCTURE: svaka je jedinka predstavljena stupcem, a boja odgovara postotku pripadnosti jedinke određenoj izvornoj populaciji pri *K* = 2 i *K* = 3

Grafikon 4. Struktura izvornih populacija u Bayesovskoj analizi skupina na temelju modela provedenog u računalnom programu BAPS: svaka je jedinka predstavljena stupcem, a boja odgovara postotku pripadnosti jedinke određenoj izvornoj populaciji prilikom (1) analize skupina (bez upotrebe zemljopisne pozicije mjesta prikupljanja kao informativnog priora) i (2) prostorne analize skupina

Grafikon 5. Analiza izolacije uslijed udaljenosti: regresija genetske udaljenosti [F_{ST}/(1-F_{ST})] na zemljopisnu udaljenost [*ln*(km)] između 18 populacija smilja

Grafikon 6. Biplot dobiven analizom glavnih sastavnica na temelju 19 bioklimatskih svojstava za 18 lokacija prikupljanja smilja

Grafikon 7. Utvrđivanje biljega AFLP koji pokazuju atipične vrijednosti parametra genetske diferencijacije (F_{ST}) na temelju frekventističke metode provedene pomoću programa Mcheza

Grafikon 8. Utvrđivanje biljega AFLP koji pokazuju atipične vrijednosti parametra genetske diferencijacije (F_{ST}) na temelju Bayesovske metode provedene pomoću programa BayeScan

Grafikon 9. Vennov dijagram prikazuje broj biljega AFLP koji pokazuju atipične vrijednosti parametara genetske diferencijacije (F_{ST}) na temelju frekventističke (Mcheza) i Bayesovske metode (BayeScan), te ujedno ukazuje na signifikantnu povezanost s okolišnim svojstvima utvrđenu pomoću programa Samβada

Grafikon 10. Broj spojeva eteričnog ulja u odnosu na broj populacija sredozemnog smilja u kojima je određeni spoj izoliran

Grafikon 11. Broj populacija smilja u odnosu na broj spojeva eteričnog ulja koji su izolirani

Grafikon 12. Broj spojeva eteričnog ulja u odnosu na maksimalan prosječan udio pojedinog spoja u 18 populacija smilja

Grafikon 13. Broj spojeva eteričnog ulja u odnosu na maksimalan udio pojedinog spoja u 18 populacija sredozemnog smilja uzorkovanih na dvije pokusne lokacije s dva ponavljanja

Grafikon 14. Kutijasti dijagram (*box plot*) 18 najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja sredozemnog smilja na temelju svih analiziranih uzoraka (18 populacija x 2 pokusne lokacije x 2 ponavljanja)

Grafikon 15. Biplot dobiven analizom glavnih sastavnica na temelju devet spojeva eteričnog ulja analiziranih u 18 populacija sredozemnog smilja. Skupine (A, B, C) su određene na temelju analize skupina

Grafikon 16. Wardov dendrogram na temelju kvadratnih euklidskih udaljenosti između 18 populacija sredozemnog smilja. Klasifikacija populacija u skupine (A, B, C) na temelju vrijednosti pseudo *F* statistike je prikazana iznad grana

Grafikon 17. Diskriminacijska analiza 18 populacija sredozemnog smilja na temelju četiri spoja eteričnog ulja radi razlikovanja pretpostavljenih kemotipova

Grafikon 18. Regresija postotka nerola (C35), neril acetata (C42), α-kurkumena (C57) i β-selinena (C58) na zemljopisnu širinu i zemljopisnu dužinu na temelju 18 populacija sredozemnog smilja

Grafikon 19. Regresija postotka nerola (C35), neril acetata (C42), α-kurkumena (C57) i β-selinena (C58) na Bio14 Količinu oborina u najsušem mjesecu i Bio15 Koeficijent varijacije oborina

Grafikon 20. Regresija bioklimatske, genetske [$F_{ST}/(1-F_{ST})$] i biokemijske udaljenosti na zemljopisnu udaljenost [ln(km)], genetske i biokemijske udaljenosti na bioklimatsku, te biokemijske na genetsku udaljenost između 18 populacija sredozemnog smilja

Popis priloga

Prilog 1. Matrica ϕ_{ST} vrijednosti između 18 populacija smilja na temelju analize molekularne varijance (AMOVA)

Prilog 2. Matrica F_{ST} vrijednosti između 18 populacija smilja pod pretpostavkom ravnoteže po Hardyju i Weinbergu

Prilog 3. Matrica genetske udaljenosti po Neiju između 18 populacija sredozemnog smilja pod pretpostavkom ravnoteže po Hardyju i Weinbergu

Prilog 4. Prosjek, minimum i maksimum 19 bioklimatskih svojstava za 18 lokacija prikupljanja sredozemnog smilja

Prilog 5. Vrijednosti 19 bioklimatskih svojstava za 18 lokacija prikupljanja sredozemnog smilja

Prilog 6. Matrica korelacija između 19 bioklimatskih svojstava na temelju 18 lokacija prikupljanja sredozemnog smilja

1. UVOD

Sredozemno smilje *(Helichrysum italicu*m /Roth/ G. Don) je višegodišnja termofilna biljna vrsta roda *Helichrysum* Mill. i porodice Asteraceae. Rod *Helichrysum* broji više od 600 vrsta rasprostranjenih u svijetu, dok je vrsta *H. italicum* rasprostranjena u mediteranskom bazenu. Raste na vapnenačkim i dobro dreniranim tlima: od razine mora do 2200 metara nadmorske visine (Galbany-Casals i sur., 2011).

Smilje ima brojna ljekovita svojstva te se već desetljećima koristi u narodnoj medicini kao koleretik, diuretik i ekspektorans (Chinou i sur., 1996). Znanstvenim istraživanjima potvrđeno je jako protuupalno (Sala i sur., 2002), antioksidativno (Sala i sur., 2003; Rosa i sur., 2007; Kladar i sur., 2015; Generalić Mekinić i sur., 2014), antimikrobno (Generalić Mekinić i sur., 2014; Stupar i sur., 2014; Djihane i sur., 2017; Malenica Staver i sur., 2018) i antivirusno djelovanje (Mucsi i sur., 1992; Appendino i sur., 2007). Osim u kozmetičkoj industriji upotrebljava se i u farmaceutskoj te prehrambenoj zbog čega je povećana potražnja za smiljem posljednjih nekoliko godina.

U Hrvatskoj je zabilježen znatan porast komercijalne eksploatacije prirodnih populacija smilja kao i ekspanzija plantažne proizvodnje, što je potaknulo nova znanstvena istraživanja o smilju. Uzgajivači smilja se suočavaju s mnogim izazovima jer je smilje nova kultura u uzgoju, a u prošlosti su samo sakupljane prirodne populacije. Sakupljanje smilja iz prirode zakonski je regulirano Zakonom o zaštiti prirode (NN 80/2013) i Pravilnikom o sakupljanju zavičajnih divljih vrsta (NN 114/2017). Smilje se nalazi na popisu zavičajnih divljih vrsta (Prilog I Pravilnika) za koje je potrebno ishoditi dopuštenje za sakupljanjem od Ministarstva zaštite okoliša i energetike. Godišnju kvotu i razdoblje sakupljanja određuje Ministarstvo na temelju Stručne podloge koja se izrađuje analizom stanja populacija u prirodi i analizom pritisaka na populacije uslijed korištenja. O ekonomskoj važnosti smilja svjedoči i podatak da se od ukupnog broja svih sakupljenih količina samoniklog ljekovitog i aromatičnog bilja u Hrvatskoj najviše sakupi smilja s udjelom od 95 % (Analiza stanja prirode u Republici Hrvatskoj za razdoblje 2008. - 2012).

Eterično ulje smilja predmet je mnogih istraživanja (Bianchini i sur., 2001; Angioni i sur., 2003; Paolini i sur., 2006; Mastelić i sur., 2008; Mancini i sur., 2011; Maksimovic i sur., 2013; Costa i sur., 2015; Zeljković i sur., 2015; Jerković i sur., 2016; Mouahid i sur., 2017; Tzanova i sur., 2018; Oliva i sur., 2019) u kojima je utvrđena velika varijabilnost u kemijskom sastavu, a pripisuje se utjecaju zemljopisnog podrijetla, okolišnih čimbenika, fazi rasta i genotipu.

Za razliku od podataka o biokemijskoj raznolikosti smilja, značajno je manji broj onih koji se odnose na genetsku raznolikost. Utvrđivanje genetske raznolikosti i strukture od

velikog je značaja za očuvanje prirodnih populacija i razvoj oplemenjivačkih programa, pogotovo od kada je *H. italicum* postao ekonomski važna biljka.

Na području Hrvatske do sada nije istražena genetska raznolikost prirodnih populacija smilja niti je procijenjena biokemijska raznolikost na velikom broju populacija. Ovim istraživanjem dat će se doprinos u procjeni genetske raznolikosti i strukture populacija te biokemijske raznolikosti što je od iznimnog značaja za očuvanje prirodnih populacija i razvoj kultivara poželjnih svojstava.

1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja

Hipoteze

Većina genetske raznolikosti populacija sredozemnog smilja uvjetovana je razlikama između jedinki unutar populacija, dok se manji dio odnosi na razlike između populacija.

Postoji veći broj genskih skupova sredozemnog smilja koje je moguće objasniti na temelju zemljopisnog položaja mjesta prikupljanja.

Postoji više kemotipova sredozemnog smilja koji su genetski različiti.

Ciljevi

Procijeniti unutarpopulacijsku genetsku raznolikost i genetsku udaljenost između populacija te utvrditi sastavnice molekularne varijance.

Procijeniti broj i strukturu genskih skupova.

Razvrstati populacije u kemotipove i procijeniti raspodjelu molekularne varijance između i unutar kemotipova.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Taksonomija i rasprostranjenost

Helichrysum italicum /Roth/ G. Don in Loudon, Hort. Brit. 342 (1830).

Sredozemno smilje (*H. italicum*) pripada porodici Asteraceae, potporodici Asteroideae, plemenu Gnaphalieae i rodu *Helichrysum*. Rod *Helichrysum* Mill. obuhvaća oko 600 vrsta rasprostranjenih u Africi, na Madagaskaru, u mediteranskom bazenu, Makroneziji, srednjoj Aziji i Indiji (Anderberg 1991). U mediteranskoj regiji raste 25 autohtonih vrsta roda *Helichrysum* (Morone-Fortunato i sur., 2010). Naziv roda potječe od dviju grčkih riječi: *helios* što znači sunce i *chryos* što znači zlato i odnosi se na boju cvjetova (Perrini i sur., 2009).

Clapham (1976) je klasificirao mediteranske, europske, zapadnoazijske i srednjoazijske vrste roda *Helichrysum* u dvije sekcije: *Helichrysum* i *Virginea* (DC.) Gren. & Godr., dok su u *Flori Europe* (Clapham, 1976) vrste *Helichrysum* svrstane u tri sekcije: *Helichrysum*, *Virgina* i *Xerochlaena* (DC) Bentham (Tablica 1).

Sredozemno smilje (*H. italicum*) je rasprostranjeno u središnjem mediteranskom području te u izoliranim lokalitetima u sjevernoj Africi i na Cipru (Galbany Casals i sur., 2006).

Klasifikacija podvrsta *H. italicum* razlikuje se ovisno o autoru. Zbog visokog polimorfizma ponekad je otežano morfološko razlikovanje podvrsta. Clapham (1976) je podijelio vrstu *H. italicum* na tri podvrste: 1) *H. italicum* ssp. *italicum*; 2) *H*. *italicum* ssp. *microphyllum* i 3) *H. italicum* ssp. *serotinum.*

Galbany Casals i sur. (2006) predložili su sljedeće tri podvrste za *H. italicum*: 1) *H. italicum* ssp. *italicum* (rasprostranjen u Italiji i Hrvatskoj, na istočnoj obali Korzike, u Bosni i Hercegovini, Srbiji, Crnoj Gori, Grčkoj na Egejskim otocima i Cipru te na pojedinim lokalitetima u Alžiru, Maroku i Tunisu); 2) *H. italicum* ssp. *siculum* (autohton na Siciliji) i 3) *H. italicum* ssp. *microphyllum* (na mediteranskim otocima Mallorci, Korzici, Sardiniji, Kreti i Cipru).

Novijim morfološkim i genetskim analizama Galbany-Casals i sur. (2011) utvrdili su da postoji prostorna raspodjela genetske raznolikosti te su predložili novu podjelu na zapadnu i istočnu mediteransku grupu koja se razlikuje od tradicionalne podjele na podvrste ssp. *italicum* i ssp. *microphyllum*.

Herrando-Moraira i sur. (2016) proveli su detaljnu multivarijatnu analizu morfoloških biljega i revidirali klasifikaciju cjelokupnog kompleksa *H. italicum.* Predložili su novu podjelu *H. italicum* na sljedeće podvrste:

1) H. italicum ssp. *italicum* (rasprostranjen u Italiji i Hrvatskoj, na istočnoj obali Sredozemlja Francuske i Korzike, u Bosni i Hercegovini, Grčkoj (Egejski otoci i Cipar), 2) *H. italicum* ssp. *microphyllum* (endem na Kreti), 3) *H. italicum* ssp. *siculum* (endem na Siciliji) i 4) *H. italicum* ssp. *tyrrhenicum* (Korzika, Sardinija, Mallorca i Dragonera).

Navedena taksonomska podjela smatra se relevantnom, a naziv sredozemno smilje u ovom radu odnosi se na *H. italicum* ssp. *italicum*.

Sinonimi za smilje *Helichrysum italicum* su: *Gnaphalium italicum* Roth in Bot. Mag. (Römer& Usteri) 4 (10): 19 (1790). *H. angustifolium* subsp. *italicum* (Roth) Briq. & Cavill. in Burnat, Fl. Alpes Marit. 6 (2): 265 (1917). Narodna imena za smilje u Hrvatskoj su: sredozemno smilje, bilobrada, cmilj, cmilje, smilj, margiž, uzkolistni smilj, bela brada (Nikolić, 2015).

U Hrvatskoj raste duž jadranske obale, na otocima te u Dalmatinskoj zagori, najčešće na kamenjarskim pašnjacima i uz rubove putova. Raste na osunčanim i toplim staništima. Odlično podnosi sušu. Uspijeva na ocjeditim tlima, lakšeg teksturnog sastava, najčešće na karbonatnim i skeletnim tlima. Raste od razine mora do 2200 m nadmorske visine (Galbany-Casals i sur., 2011).

Tablica 1. Rod *Helichrysum* Mill. – klasifikacija europskih svojti (Flora Europea; Clapham 1976)

Rod *Helichrysum* Mill.		
		Rasprostranjenost
Sect. *VIRGINEA* (DC) Fiori		
	H. amorginum Boiss. and Oprh.	Cikladi (Amorgos) Grčka
	H. sibthropii Rouy	sjeveroistok Grčke (Athos)
	H. doerfleri Rech. fil	istok Krete
	H. frigidum (Labill.) Wild.	planine Korzike i Sardinije
Sect. *HELICHRYSUM*		
	H. stoechas[a]	cijeli Mediteran
	H. rupestre (Rafin.) DC.[a]	jug Španjolske i Balearsko otočje, Sardinija, Sicilija
	H. heldreichii Boiss.[a]	jugozapad Krete
	H. ambiguum (Pers)[a]	Balearsko otočje
	H. saxatile[a]	Sardinija i Pantelleria (Sicilija)
	H. italicum (Roth)[a]	središnji Mediteran i izolirani lokaliteti u sjevernoj Africi i Cipar
	H. orientale (L.)	Grčka i Egejska regija
	H. plicatum DC. Prodr.	južni dio Balkanskog poluotoka
	H. arenarium (L.) Moench	od Nizozemske, juga Švedske i Estonije južnije do juga Njemačke, juga Bugarske i zapadnog Kazahstana
	H. Graveolens (Bieb.)	Krim i jugozapadna Azija
Sect. *XEROCHLAENA* (DC.) Bentham		
	H. foetidum (L.) Cass	zapadna Europa (naturaliziran) (s juga Afrike)
	H. bracteatum (Vent.) Andrews	uzgajan za ukras i naturaliziran u Španjolskoj (iz Australije)

[a] Vrste su svrstane u skupinu *H. stoechas* kao drvenaste trajnice

2.2. Morfološke osobine

Smilje je aromatična, višegodišnja biljna vrsta koja rastom formira polugrm. Samoniklo smilje visine je oko 40 cm, dok u uzgoju može doseći visinu i do 70 cm. Grm je pri bazi drvenast i razgranjen s uspravnim i lisnatim stabljikama prekrivenim dlakama cijelom dužinom. Stabljike su dužine od 20 do 50 cm. Donji i srednji listovi stabljika dimenzija su 2-37 × 0,4-1,8 mm, izduženi, linearni, tupog vrha i dlakavi. Na licu su zelenkaste boje, a na naličju srebrnaste. Na licu su listovi rijetko žljezdasti, dok su na naličju tomentozni (prekriveni vunastom dlakom) i žljezdasti. Listovi se smanjuju duž cvjetne stabljike do cvata. Donji listovi se skupljaju u rozeti, a ostali se naizmjenično raspoređuju po stabljici.
Cvat je štitac, promjera 4,5–62 × 3–80 mm, s 2 do 120 cvjetnih glavica intenzivno žute boje. Veličina glavice je 4–6,5 × 2–5 mm, cilindrična do usko zvonasta oblika, heterogamna ili rijetko homogamna s cvjetićima s tučkom (1–10) i hermafroditnim cvjetićima (8–31). Pricvjetni listovi se preklapaju, unutrašnji su duži od vanjskih i linearni, dok su vanjski ovalni, kožasti i prekriveni gustim dlakama (Clapham, 1976; Galbany-Casals i sur., 2006; Herrando-Moraira i sur., 2016).

Žljezdane dlake koje luče eterično ulje pripadaju jednom morfološkom tipu te su kod svih genotipova *H. italicum* građene od 12 stanica. Žljezdane dlake formirane su u tri zone: bazalna, srednja i vršna zona i smještene su na laticama, lapovima, braktejama i stabljičnim listovima. Kod *H. italicum* žljezdane dlake na cjevastim cvjetovima su guste, ali se gustoća smanjuje na braktejama, dok je kod podvrste *H. italicum* ssp. *microphyllum,* gustoća žljezdanih dlaka jednaka na svim biljnim organima (Perrini i sur., 2009).

Plod je roška tamnosmeđe boje (Domac, 1994), dimenzija 0,6-1,1 x 0,2-0,7 mm, cilindričnog oblika s raspršenim sjajnim bijelim žlijezdama ili bez njih (Clapham, 1976). Masa tisuću sjemenki teži oko 0,03 g (Stepanović i sur., 2009).

Smilje cvate od (svibnja) lipnja do kolovoza (rujna) (Galbani-Casals i sur., 2006).

2.3. Tehnologija uzgoja

Smilje se plantažno uzgaja u Francuskoj, Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini, Italiji te malim dijelom u Bugarskoj i Srbiji.

Heliofitna je biljna vrsta, odnosno za normalan rast i razvoj zahtijeva mnogo svjetlosti i topline, stoga dobro uspijeva na prostorima izloženim suncu veći dio dana. Osim što dobro podnosi visoke temperature i sušu, smilje dobro podnosi i niske temperature. Kod planiranja uzgoja smilja treba imati na umu da je višegodišnja biljna vrsta te se očekuje da će rasti na istoj površini do 10 godina (ovisno o uvjetima uzgoja, intenzitetu eksploatacije te mogućoj pojavi bolesti) (Stepanović i sur., 2009).

Uspijeva na karbonatnim i dobro propusnim tlima, često siromašnim hranivima, posebno fosforom i kalijem koje u intenzivnom uzgoju treba nadoknaditi. Ne podnosi teška tla koja zadržavaju vodu (Ninčević, 2017).

Smilje se razmnožava generativno sjemenom i vegetativno reznicama. Ako se sije u negrijanom zaštićenom prostoru, sije se početkom ožujka, s obzirom na to da za klijanje zahtijeva temperature više od 15 ºC. Ujedno, previsoke temperature (iznad 25 ºC) smanjuju klijavost. Sije se na pripremljene gredice s finim supstratom ili u kontejnere za sjetvu uz obaveznu zasjenu. U idealnim uvjetima sjeme niče u roku 10 dana. Nakon što razvije prave listove presađuje se u polistirenske kontejnere ili lončiće u kojima raste do sadnje.

Drugi način razmnožavanja smilja je vegetativno, najčešće reznicama. Postupak razmnožavanja reznicama podrazumijeva rezanje grančice od vrha stabljike na dužinu 10 cm, potom se odstrane donji listovi te se umoče u hormon i pikiraju u supstrat (perlit, sitni pijesak ili treset). Tijekom zakorjenjivanja treba održavati visoku vlažnost zraka. Zakorjenjivanje je najbolje provoditi u zaštićenom prostoru. U roku mjesec dana biljke razviju korijenje (Ninčević, 2017).

Smilje se na stalno mjesto sadi u jesen s prvim kišama ili u rano proljeće. Preporučeni razmak sadnje je 0,3 do 0,4 m unutar reda i 1 m između redova. Takav sklop osigurava potreban prostor za razvitak grma, a ujedno dolazi i do zatvaranja redova u trećoj godini što smanjuje pojavu korova. Za takav sklop potrebno je između 25.000 i 33.000 sadnica na jedan hektar. Razmak između redova potrebno je prilagoditi mehanizaciji kojom će se održavati nasad (Ninčević, 2017).

Održavanje nasada uključuje provođenje različitih agrotehničkih mjera kao što su redovito okopavanje, plijevljenje, frezanje, orezivanje biljaka, prihranjivanje te zaštita od bolesti. U prvoj godini biljku treba orezati na vrijeme zbog poticanja novog rasta, a kako bi se u kasnijim godinama uzgoja formirao gušći i intenzivno cvatući grm. Biljke se u prvoj

godini skraćuju prije cvatnje. U trećoj godini grmovi dostižu punu veličinu i formiraju se zatvoreni redovi, što znatno olakšava održavanje nasada. Prihranjuje se tijekom vegetacije po potrebi. (Stepanović i sur., 2009). Otkupljivači često traže ekološki uzgojeno smilje, stoga je poželjno koristiti organska gnojiva. Učestala pojava bolesti i štetnika nije zabilježena na smilju, međutim, može doći do pojave bolesti i napada štetnika. Na primjer, kalifornijski trips, štitasti moljac, lisne uši, lisni mineri i gusjenice moljaca mogu se pojaviti u različitim fazama uzgoja smilja. U kišnim godinama s visokom vlagom često obolijeva od gljivičnih bolesti. Otkrićem štetnika i bolesti u ranoj fazi mogu se spriječiti veće štete. S obzirom na to da se preporučuje uzgajati smilje po načelima ekološke proizvodnje, u skladu s time koriste se sredstva dozvoljena u ekološkoj zaštiti bilja (Pohajda i sur., 2015).

Smilje se žanje kada je najveći broj biljaka u punom cvatu. Ovisno o klimatskim uvjetima, to je tijekom lipnja ili srpnja. Na otocima smilje cvate ranije nego na kopnu. Bere se za vedrog vremena i nakon povlačenja jutarnje rose. U punom cvatu smilje ima jarko žute cvatove koji se beru zajedno sa zelenim dijelom jer se eterično ulje nalazi osim u cvatovima i u zelenoj stabljici s listovima.

U prvoj godini prinos s grmova smilja je malen zbog rezidbe koja se provodi radi formiranja grmova i jačanja biljke. U drugoj godini bilježi se značajan porast prinosa, dok se u trećoj godini može očekivati puna rodnost. Prinos biljne mase u punoj rodnosti prema grmu, ovisno o agroekološkim uvjetima, može varirati od 0,3 kg/grmu do 0,5 kg/grmu. Na 1 ha smilja može se postići urod od 7 do 12 tona svježe biljne mase (Ninčević, 2017).

2.4. Biokemijska svojstva

Smilje se sakuplja iz prirode ili uzgaja za proizvodnju eteričnog ulja i ekstrakata. Mnogi su znanstvenici istraživali kemijski sastav smilja (Bianchini i sur., 2001; Angioni i sur., 2003; Paolini i sur., 2006; Mastelić i sur., 2008; Mancini i sur., 2011; Maksimovic i sur., 2013; Costa i sur., 2015; Zeljković i sur., 2015; Jerković i sur., 2016; Mouahid i sur., 2017; Tzanova i sur., 2018; Oliva i sur., 2019) te su utvrdili veliku varijabilnost. Utvrđeno je da varijabilnost ovisi o čimbenicima kao što su: zemljopisno podrijetlo, fenofaza biljaka, ekološki uvjeti i dr.

Zabilježeno je postojanje više kemotipova smilja prema zemljopisnom podrijetlu:
1) ulja s Korzike karakteriziraju pretežito oksigenirani (neril acetat, neril propionat, alifatski ketoni i β-diketoni) i niski postotak neoksigeniranih mono- i seskviterpena (limonen, γ-kurkumen, α-kurkumen) (Bianchini i sur., 2001);

2) eterična ulja bivše Jugoslavije karakterizira visok sadržaj α-pinena (22 %), zatim γ-kurkumena (10 %), β-selinena (6 %), neril acetata (6 %) i β-kariofilena (5 %), dok su uz jadransku obalu glavni spojevi: α-kurkumen (15-29 %) ili γ-kurkumen ili α-pinen (25-30 %) i neril acetat (4-14 %) (Weyerstahl i sur., 1986);
3) u uljima iz Grčke glavne komponente su geraniol (36 %), geranil acetat (15 %) i nerolidol (12 %) (Chinou i sur., 1996); dok
4) u uljima iz Toskane, ovisno o mjestu uzorkovanja, glavni spoj je α-pinen (33 do 53 %) ili neril acetat (10-22 %) i visok sadržaj seskviterpenskih ugljikovodika (23-39 %) sa značajnim udjelom β-selinena, β-kariofilena i α-selinena (Bianchini i sur., 2003).
Morone-Fortunato i sur. (2010) analizirali su 20 samoniklih populacija smilja prikupljenih na različitim lokacijama u Italiji i na Korzici te su utvrdili tri profila eteričnog ulja: 1) genotipovi s visokim količinama nerola i njegovih estera; 2) genotipovi s glavnim spojevima β i α-selinena i 3) genotipovi s glavnim spojem γ-kurkumen. Međutim, autori naglašavaju da se podrijetlo biljke ne može odrediti isključivo prema sastavu ulja jer se pokazalo da podvrsta *H. italicum ssp. microphylum* ima jednak kemijski sastav kao i kemotip 1) podvrste *H. italicum* ssp. *italicum*.

Manji broj autora istraživao je kemijski sastav samoniklog smilja u Hrvatskoj (Blažević i sur., 1995; Mastelić i sur., 2005, 2008; Zeljković i sur., 2015). Blažević i sur. (1995) proučavali su sastav eteričnog ulja devet populacija iz Hrvatske u kojima su glavni spojevi bili α-pinen, neryl acetate, α-cedren, nerol, α-curcumen, γ-curcumen i geranyl acetat. Kvalitativni sastav ulja bio je sličan kod svih devet populacija, ali se razlikovao u koncentraciji određenih spojeva. Prinos ulja varirao je od 0,08 do 0,32 %.

U istraživanju samoniklog smilja uzorkovanog u okolici Splita (Mastelić i sur., 2008) utvrđeni su brojni monoterpenski, seskviterpenski i nonterpenski spojevi. Identificirana su 44 spoja, od kojih su u najvećem udjelu bili zastupljeni sljedeći: α-pinen (12,8 %), 2-metilciklo-heksil pentanoat (11,1 %), neril acetat (10,4 %), 1,7-di-epi-α-cedren (6,8 %) i timol (5,4 %). Identificirano je i sedam estera, koji su sačinjavali 29,0 % ukupnog ulja. Analizom ulja smilja uzorkovanog na području Konavala utvrđeno je da su najzastupljeniji spojevi: γ-kurkumen (12,4 %), β-selinen (9,9 %), trans-β-kariofilen (6,9 %), α-selinen (5,9 %), italicen (4,6 %) i α-kurkumen (4,0 %) (Ivanović i sur., 2011).

Osim zemljopisnog podrijetla, i različiti stadiji rasta biljaka utječu na sastav eteričnog ulja smilja. Varijacije u kemijskom sastavu smilja tijekom šest različitih faza rasta (rani izboji, formiranje štitca, prije cvatnje, u cvatnji, nakon cvatnje i kasni ljetni izboji) ispitali su Blažević i sur. (1995). Utvrđen je visok sadržaj α-pinena u fazama ranih izbojaka (24,58 %) i formiranja štitca (28,86 %) i relativno nizak sadržaj u fazama cvatnje i nakon cvatnje. Sadržaj α-kurkumena bio je nizak u fazi ranih izbojaka (0,44 %) i visok u fazi cvjetanja (28,06 %), dok je sadržaj γ-kurkumena bio najviši u stadiju ranih izbojaka (16,65 %), a u

fazi cvatnje smanjio se na 12,03 %. Sadržaj neril acetata bio je najviši u stadiju ranih izboja (9,02 %), a najniži nakon cvatnje (5,57 %), što ukazuje na to da je neril acetat najviši u najmlađim dijelovima biljke (mladice), a najniži u starim dijelovima (nakon cvatnje). Može se zaključiti da su u ranim fazama rasta biljaka dominantni monoterpeni, dok su seskviterpeni dominantni tijekom cvatnje i nakon cvatnje. Slično istraživanje proveli su Bianchini i sur. (2001) na *H. italicum* ssp. *italicum* u različitim fazama rasta uzorkovanih na obali Korzike. U svim fazama rasta neril acetat bio je glavni spoj s udjelom od 20,3 do 35,3 %, a maksimalna vrijednost dobivena je neposredno prije cvatnje. Spoj γ-kurkumen također je bio veći u razdoblju prije cvatnje i u razdoblju cvatnje s maksimalnom količinom od 6,6 %. Utvrđene su varijacije u sadržaju neterpenskih ketona: pentan-3-on, 2-metilpentan-3-on i 4-metilheksan-3-on tijekom različitih vegetacijskih stadija, a najviši sadržaj dobiven je u fazama ranih izbojaka.

Usai i sur. (2010) istraživali su, pak, ulje samoniklog smilja (*H. italicum* ssp. *microphilum)* sa Sardinije u četiri različita stadija rasta: u vegetaciji, pred cvatnju, u cvatnji i poslije cvatnje, u razdoblju od veljače do srpnja. U svim fazama rasta kao glavni spojevi utvrđeni su neryl acetat (17,6–35,6 %) i 5-eudesmen-11-ol (6,4–23,5 %). Sadržaj neril acetata povećavao se od vegetativne faze do faze cvatnje, a nakon toga se smanjivao. Pokazalo se da je povećanje i smanjenje sadržaja 5-eudesmen-11-ola i neril acetata povezano, odnosno dok se sadržaj jednog smanjuje, drugog se povećava. Autori su naveli da je najbolji sastav eteričnog ulja biljaka ubranih u srpnju. Isti autori su usporedili eterično ulje suhih i svježih uzoraka smilja kako bi utvrdili utjecaj procesa sušenja na sastav eteričnog ulja, no nije ustanovljena značajna razlika.

Angioni i sur. (2003) su odvojeno analizirali cvjetove i stabljike *H. italicum* ssp. *microphilum* kako bi utvrdili razlikuju li se u sastavu i prinosu. Najviši su prinosi bili na kraju cvatnje, pri čemu su cvjetovi imali prinos 0,18 % (v/w), a stabljika 0,04 % (v/w). Glavni spojevi (nerol, neril acetat, neril propionat, limonen i linalool) bili su najviši u fazi cvatnje u oba analizirana dijela biljke, ali viši u cvjetovima nego u stabljikama.

Mnogi autori ističu utjecaj nadmorske visine na sastav eteričnog ulja. Usai i sur. (2010) predlažu sakupljanje biljaka na nadmorskoj visini između 500-700 m za dobivanje visokog prinosa ulja i ulja bogatog aldehidima koji su odgovorni za poželjnu aromu biljke. Tundis i sur. (2005) su zaključili da nadmorska visina utječe na sadržaj trans-kariofilena u eteričnom ulju smilja. Kod uzoraka prikupljenih na 490 m nadmorske visine utvrđen je najviši sadržaj trans-kariofilena, dok je kod uzoraka prikupljenih na 800 m nadmorske visine sadržaj bio niži. Melito i sur. (2016) također su dokazali utjecaj nadmorske visine i klime na sastav eteričnog ulja. Istražili su 146 genotipova *H. italicum* ssp. *microphilum* uzorkovanih uz more (0-60 m nadmorske visine) i na planinama (600-1250 m nadmorske visine) na Sardiniji. Rezultati su pokazali da postoji povezanost između tipa staništa i

sastava eteričnog ulja na temelju značajno različitog sastava i sadržaja na oba staništa. Dokazana je korelacija sadržaja nerolidola s prosječnom zimskom temperaturom, kao i pozitivna korelacija italicena, bergamotena, nerola i kurkumena s proljetnim i ljetnim padalinama. Zeljković i sur., 2015 također navode da nadmorska visina i izloženost suncu imaju utjecaj na kemijski sastav eteričnog ulja što su prikazali u analizi četiriju populacija smilja iz Dalmacije. Kod tri uzorka utvrđen je visok sadržaj seskviterpenskih ugljikovodika, dok je jedan uzorak (sakupljen blizu mora) sadržavao visoke koncentracije oksigeniranih seskviterpena.

Utjecaj ekoloških čimbenika i različitih svojstava tla na sastav eteričnog ulja smilja istražili su Bianchini i sur. (2009). Analizirali su uzorke smilja u različitim fazama rasta prikupljenih sa 48 lokacija na Korzici. Rezultati su pokazali veliku varijabilnost u kemijskom sastavu, uglavnom s visokim udjelom oksigeniranih monoterpena (11,7–70,0 %) i neril acetatom kao glavnim spojem. Rezultati analize glavnih sastavnica (*Principal Component Analysis*; PCA) i analize parcijalne redundancije (*Redundancy analysis*; RDA) pokazali su korelaciju između sastava eteričnog ulja te teksture i kiselosti tla. S druge strane, anorganski sastav biljke i tla i faze rasta biljaka imali su manji utjecaj na kemijski sastav eteričnog ulja. Glavni sastojak neril acetat bio je u korelaciji sa slabom kiselošću tla i niskim postotkom gline, sitnog pijeska i grubog praha, a s druge strane u korelaciji s visokim postotkom grubog pijeska i finog praha.

Osim opisanih dominantnih spojeva u eteričnim uljima smilja, identificirane su još neke skupine bioaktivnih spojeva, kao npr. fenolni spojevi. Flavonoide kao što su apigenin, glikozil-apigenin, luteolin, gnafaliin, naringenin, glikozil-naringenin i glikozil-kalkon izolirali su Facino i sur. (1988) te je dokazano da djeluju kao zaštita od sunca. Sala i sur. (2003) proučavali su svojstva gnafaliina, pinocembrina i tilirozida. Mnogi drugi autori također su izolirali i analizirali flavonoide (Pietta i sur., 1991; Karasartov i sur. 1992; Wollenweber i sur. 2005; Schinella i sur., 2007; De la Garza i sur. 2013; Mari i sur., 2014). Kumarine eskuletin, skopoletin i izoskopoletin identificirali su Karasartov i sur. (1992) u kloroformnom ekstraktu cvjetova smilja, dok su fenolne kiseline izolirali i analizirali Zapesochnaya i sur. (1990, 1992), Mari i sur. (2014) te Kladar i sur. (2015). Generalić Mekinić i sur. (2016) proučavali su stilbene koje sintetizira samo nekoliko biljnih vrsta. U etanolnom ekstraktu smilja otkrili su veliku količinu resvetrola (3,5,4'-trihidroksi stilben) (6,63 mg/g) i njegove derivate piceid, astringin i izorhopotin (0,40 mg/g).

2.5. Metode izolacije spojeva

Osim navedenih parametara kao što su zemljopisno podrijetlo, fenofaza biljaka i ekološki uvjeti, za koje je dokazano da utječu na sastav i količinu eteričnog ulja, sve je veći broj istraživanja usmjeren na utvrđivanje utjecaja metoda izolacije i ekstrakcije na sadržaj i količinu eteričnog ulja. U radu autora Maksimović i sur. (2017) detaljno su opisane metode izolacije eteričnog ulja iz smilja i dobiveni spojevi. Eterična ulja i druge komponente se ekstrahiraju hidrodestilacijom, parnom destilacijom, organskim otapalima i superkritičnom CO_2 ekstrakcijom (S*upercritical carbon dioxide extraction*; SC-CO_2). Utvrđeno je da su destilacija i superkritična CO_2 ekstrakcija pogodne za ekstrakciju terpena, dok se fenolni spojevi najčešće izoliraju ekstrakcijom organskim otapalima. Najčešće korištena organska otapala su aceton, metanol ili etanol. Od svih metoda najčešće se koristi hidrodestilacija, ali ona ima određene nedostatke zbog primjene visokih temperatura koje mogu utjecati na kvalitetu ulja. Metode s organskim otapalima također imaju određene nedostatke, kao što su potreba za separacijom i rezidue organskih otapala u ekstraktima. Zbog nedostataka navedenih metoda, primjenjuju se i druge metode temeljene na upotrebi superkritičnih fluida. Te metode nisu toksične, proizvode ekstrakte bez otapala na niskim temperaturama i daju najveći prinos ekstrakcije te višu selektivnost ekstrahiranih spojeva.

Mnogi su autori analizirali smilje koristeći superkritičnu CO_2 ekstrakciju, bilo da se radi o optimizaciji ekstrakcije (Ivanović i sur., 2011; Costa i sur., 2015; Jerkovic i sur., 2016) ili o usporedbi sastava smilja dobivenog hidrodestilacijom i superkritičnom CO_2 ekstrakcijom (Ivanović i sur., 2011; Maksimović i sur., 2013; Costa i sur., 2015; Jerković i sur., 2016; Mouahid i sur., 2017). Otkriveno je da kemijskim profilom superkritičnog ekstrakta dominiraju seskviterpeni i voskovi, dok monoterpeni i seskviterpeni dominiraju u eteričnom ulju dobivenom hidrodestilacijom (Ivanović i sur., 2011). Usporedbom te dvije metode u istraživanju Costa i sur. (2015) pokazalo se da monoterpenski ugljikovodici dominiraju u eteričnom ulju, a seskviterpenski ugljikovodici u superkritičnim CO_2 ekstraktima. Prednost superkritičnih CO_2 ekstrakata je u tome što sačuvaju izvorni ugodan miris svježe biljke. Pomoću plinske kromatografije-olfaktometrije (analiza razrjeđenja ekstrakta arome) (GC-O AEDA) određuje se koji spojevi su odgovorni za miris neke biljke. Najviše aktivnih sastojaka smilja koje su opažali svi panelisti i koji pokazuju najviši srednji faktor razrjeđivanja arome bili su 4,6-dimetiloktan-3,5-dion, 1,8-cineol i nerol. Ostali spojevi također su utjecali na aromu eteričnog ulja smilja, ali u manjoj mjeri (Andreani i sur., 2019).

U novijim istraživanjima znanstvenici su nastojali dokazati da korištenje suvremenih metoda analize eteričnog ulja smilja može pomoći u diferencijaciji genotipova (Giuliani i sur., 2016 i Schipilliti i sur., 2016). Giuliani i sur. (2016) napravili su karakterizaciju hlapljivih spojeva populacija smilja (iz Toskane) i usporedili razlike između populacija. Hlapljive organske komponente su analizirane pomoću headspace mikroekstrakcije u krutoj fazi (*Headspace-solid phase microextraction*; HS-SPME) opremljenom s GC/MS. Rezultati su pokazali da se primijenjena metoda može koristiti kod određivanja vrsta i podvrsta. Također, Schipilliti i sur. (2016) su utvrdili da analize pomoću masene spektrometrije omjera ugljikovih izotopa (*Gas chromatography-Combustion-isotope ratio mass*; GC-C-IRMS), uz uporabu i-std, mogu djelovati kao preliminarna i brza metoda diferencijacije genotipova. Cilj istraživanja bio je pokušati razlikovati genotipove smilja različitog zemljopisnog podrijetla, istražujući odnos ugljikovih izotopa hlapljivih terpena iz cvjetova.

2.6. Biološka aktivnost i upotreba

Na području Mediterana smilje se stoljećima koristilo u narodnoj medicini. Etnofarmakološka istraživanja smilja u Europi (Viegas i sur. 2014) navode da se smilje koristilo kao lijek za mnoge bolesti i tegobe, kao što su zubobolja, probavni poremećaji, kašalj, prehlada, laringitis, kožne bolesti, alopecija, dermatomikoza, poremećaji jetre i žuči, bronhitis, nesanica, glavobolja i herpes. Znanstvenim istraživanjima potvrđena su brojna djelovanja smilja: snažno protuupalno (Sala i sur., 2002), antioksidativno (Facino i sur., 1990; Sala i sur., 2003; Rosa i sur., 2007; Kladar i sur., 2015; Generalić Mekinić i sur., 2014), antimikrobno (Nostro i sur., 2001, 2002; Mastelić i sur., 2005; Rossi i sur., 2007; Chao i sur., 2008; Generalić Mekinić i sur., 2014; Stupar i sur., 2014; Djihane i sur., 2017; Malenica Staver i sur., 2018), antivirusno (Wleklik i sur., 1988; Mucsi i sur., 1992; Appendino i sur., 2007) kao i antiproliferativno (Han i sur., 2017; Malenica Staver i sur., 2018).

Zahvaljujući brojnim blagotvornim učincima na ljudsko zdravlje smilje ima široku primjenu u raznim industrijama kao što su farmaceutska, kozmetička, mirisna i prehrambena. Mnoge vodeće svjetske kozmetičke tvrtke razvile su linije kozmetike sa smiljem zbog njegovog učinka protiv starenja (Guinoiseau, 2013). Još jedan primjer učinka smilja na kožu dali su Voinchet i Giraud-Robert (2007) kada su na ranu od kozmetičke i rekonstruktivne kirurgije dodali mješavinu eteričnog ulja smilja i maceriranog ulja mošusne ruže. Primjena smjese pomogla je smanjiti edeme, modrice i upale, što

pripisuju djelovanju italidiona, a ublažavanje boli neril acetatu. Smilje se također koristi u aromaterapiji zbog sposobnosti liječenja crvenih vena, tromboze, hematoma i modrica (Peace Rhind, 2012). Han i sur. (2017) testirali su učinak eteričnog ulja smilja na ljudski dermalni fibroblastni sustav. Eterično ulje je pokazalo značajnu antiproliferativnu aktivnost tj. njegovom primjenom inhibirano je remodeliranje tkiva, točnije proizvodnja kolagena I i III i dokazan je veliki potencijal kod zarastanja rana. Maksimović i sur. (2018) koristili su kserogelove kukuruznog škroba kao nositelje za oralni unos bioaktivnih spojeva iz smilja.

2.6.1. Antimikrobno djelovanje

Provedene su brojna istraživanja u kojima je ispitivan učinak eteričnog ulja i ekstrakata smilja na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije te razne gljivice. Chinou i sur. (1996) otkrili su bakteriostatske aktivnosti *H. italicum* ssp. *italicum* i *H. italicum* ssp. *amorginum* na Gram-pozitivne bakterije: *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*; i Gram-negativne bakterije: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*. Obje podvrste pokazale su snažno djelovanje na *S. aureus* i *S. epidermis*, a slabije na *E. cloacae, P. aeruginosa* i *K. pneumoniae*, dok je *E. coli* bila najotpornija. Autori su istaknuli da je bakteriostatska aktivnost ulja povezana s oksidiranim monoterpenima: geraniolom, geranilom i neril acetatom. Mastelić i sur. (2005) usporedili su antimikrobno djelovanje eteričnog ulja smilja iz Hrvatske i njegovih frakcija ugljikovodika i spojeva koji sadržavaju kisik. Utvrdili su minimalnu inhibicijsku koncentraciju protiv *S. aureus*, *E. coli, P. aeruginosa* i *Candida albicans*. Najučinkovitije djelovanje protiv *S. aureus* i *C. albicans* pokazalo je eterično ulje i njegova terpenoidna frakcija koja ima veću antimikrobnu aktivnost od terpenske frakcije, što potvrđuje otkriće Chinou i sur. (1996) da su oksidirani monoterpeni (geraniol, geranil i neril acetat) najvjerojatnije odgovorni za antimikrobno djelovanje smilja. Eterično ulje smilja također značajno smanjuje rezistentnost bakterija *Enterobacter aerogenes, E. coli, P. aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii* na mnoge antimikrobne lijekove (Lorenzi i sur., 2009). Utvrđeno je da geraniol iz eteričnog ulja smilja djeluje kao inhibitor efluksne pumpe te da obnavlja aktivnost kloromfenikola na *E. aerogenes* i također povećava osjetljivost na B-laktame i fluorokinolon norfloksacin koji su iznimno važni klinički antibiotici. Dobiveni rezultati su od velike važnosti jer pružaju mogućnost razvoja novih lijekova na koje bakterije još nisu otporne. Istraživanje Nostra i sur. (2001) dokazalo je da dietil-eter ekstrakt smilja inhibira rast nekih sojeva *S. aureus* i inhibira enzime koji se smatraju faktorima virulencije (koagulaza, DNA-za, termonukleaza i lipaza). Autori smatraju da su flavonoidi i terpeni

najodgovorniji spojevi za antimikrobno djelovanje, što je potvrđeno i u drugim istraživanjima (Cosar i Cubukcu, 1990; Tomas-Barberan i sur., 1990; Nostro i sur., 2000). Tundis i sur. (2005) su proučavali antibakterijsko djelovanje smilja s Kalabrije i Sardinije. Metanolski ekstrakti oba uzorka pokazali su najbolji učinak na Gram-pozitivne bakterije, osobito *Micrococcus luteus*. Tagliatela-Scafati i sur. (2013) su utvrdili antibakterijsku aktivnost arzanola, kumarata, benzofurana, pirona i heterodimernih floroglucinola izoliranih iz *H. italicum* subsp. *microphyllum*, pri čemu su jedino heterodimeri arzanola pokazali učinkovitost protiv višestruko izoliranih izolata *S. aureus*. U istraživanju Generalić Mekinić i sur. (2014) testirali su antibakterijsku aktivnost smilja na glavne patogene koji se prenose hranom: *Compylobacter coli, E. coli, Salmonella infantis, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes* i *S. aureus*. Ekstrakt smilja pokazao je jaku antibakterijsku aktivnost protiv Gram-pozitivnih bakterija. Slične rezultate postigli su i Djihane i sur. (2017) koji su eterično ulje smilja uzorkovanog u Alžiru, u kojem su glavni spojevi bili oksigenirani seskviterpeni (61,42 %), testirali na 12 bakterija (Gram-pozitivnih i Gram-negativnih), dva kvasca i četiri gljivice. Rezultati su pokazali snažno antimikrobno i značajno antifungalno djelovanje. Umjereno antifungalno djelovanje eteričnog ulja smilja na gljivice izolirane iz objekata kulturne baštine utvrdili su Stupar i sur. (2014). Najjači učinak zabilježen je na gljivice *Epicoccum niger* i *Penicillium* sp., dok je najveću otpornost pokazala *Trichoderma viride*. D'Abrosca i sur. (2016) iz smilja su izolirali tri nova derivata aminofloroglucinola: helicristalicine A-C koji su neuobičajeni diamino-floglucinoli. Spoj helicristalinin B pokazao je visoku baktericidnu aktivnost na *S. epidermidis* inhibirajući formiranje biofilma *S. epidermidis*. Werner i sur. (2019) izolirali su i okarakterizirali dva nova derivata arzanola: helitalon A, koji je rijedak dimer supstituiranih α i γ-pironskih jedinica, te helitalon B, koji je slične strukturne formule kao i arzanol, ali ne sadrži etilnu skupinu, nego izopropilnu skupinu. Djelovanje izoliranih spojeva testirano je na različite Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, međutim, nije postignuto značajno antibakterijsko djelovanje u početnoj dozi od 20 μg/ml. U istraživanju autora Malenica Staver i sur. (2018) najosjetljiviji sojevi bakterija na eterično ulje smilja bili su *S. aureus* i *S. epidermidis* na koje je ono imalo slab do umjeren antimikrobni učinak. Cui i sur. (2015) testirali su antimikrobni učinak eteričnog ulja smilja na sedam mikroorganizama. Antibakterijska aktivnost je procijenjena u *in vitro* uvjetima i na svježem sirovom povrću: špinatu, kupusu i zelenoj salati kako bi se utvrdilo postoji li mogućnost korištenja eteričnog ulja u zaštiti i konzerviranju povrća. Oba eksperimenata pokazala su da smilje inhibira rast *E. coli* i *S. aureus* te da učinkovitost raste duljim izlaganjem bakterija eteričnom ulju. U novijim istraživanjima Cui i sur. (2016) su istraživali sposobnost smilja da se bori protiv bakterijske kontaminacije bakterijama *S. aureus* te su postigli obećavajuće rezultate. Ističu da su formiranjem biofilma na čvrstim

površinama bakterije otpornije na primjenu antibiotika i da su biofilmovi u mnogim slučajevima uzrok upornih infekcija.

2.6.2. Antivirusno djelovanje

Rezultate djelovanja ekstrakta smilja na virus *Herpes simplex* tipa 1 (HSV-1) objavili su Nostro i sur. (2003). Testirali su različite koncentracije ekstrakata, a najučinkovitijima su se pokazale koncentracije od 100 do 400 µg/mL. Anti-HSV aktivnost može se pripisati flavonoidima apigeninu i luteolinu prisutnom u smilju, za koje je anti-HSV aktivnost dokazana u drugim istraživanjima (Wleklik i sur., 1988; Musci i sur., 1992). Antivirusnu aktivnost arzanola - polifenolnog spoja ekstrahiranog iz *H. italicum* ssp. *microphillum* - istraživali su Appendino i sur. (2007) te navode da inhibira replikaciju HIV-1 u T limfocitima. Navedeni rezultati upućuju na antivirusni potencijal smilja.

2.6.3. Antioksidativno i protuupalno djelovanje

Spoj arzanol se najčešće veže uz protuupalni učinak smilja. Arzanol je prenilirani heterodimerni floroglucinol α-pirona, prvotno identificiran u *H. italicum* ssp. *microphillum* i određen kao vodeći protuupalni spoj (Kothavade i sur., 2013). Appendino i sur. (2007) razvili su metodu ekstrakcije i izolacije arzanola iz acetonskog ekstrakta *H. italicum* ssp. *microphyllum*. Arzanol je pokazao jaku inhibiciju aktivnosti NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer* aktiviranih B stanica) (IC50=5 µg/mL) koji je jedan od ključnih regulatora gena uključenih u imunološki/upalni odgovor te sudjeluje u regulaciji nekoliko faktora (citokina, kemokina, adhezijskih molekula, proteina akutne faze, enzima inducibilnih efektora) uključenih u upalna stanja. Bauer i sur. (2011) proveli su istraživanje u kojem je dokazano da arzanol djeluje kao inhibitor biosinteze protuupalnih medijatora kao što su prostaglandin E2 (PGE2), tromboksan B2 (TXB2) i leukotrieni (LT). Ti su rezultati također dokazani u *in vivo* testu gdje je arzanol značajno smanjio upalnu reakciju. Arzanol djeluje i kao antioksidant, što je objavljeno u istraživanju Rosa i sur. (2011).

Sala i sur. (2003) izolirali su iz smilja tri flavonoida: gnaphaliin, pinocembrin i tilirozid s ciljem ispitivanja njihovog antioksidacijskog učinka u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Flavonoid tilirozid pokazao se najučinkovitijim u oba testa. Poli i sur. (2003) proučavali su antioksidacijsku aktivnost superkritičnih CO_2 ekstrakta smilja. Svi ekstrakti su pokazali, s više ili manje učinkovitosti, antioksidacijsku aktivnost. Autori su istaknuli da superkritični

ekstrakti smilja mogu biti vrijedan prirodni antioksidans za prehrambenu i kozmetičku industriju. Molnar i sur. (2017) također su istraživali antioksidativna svojstva smilja. Rezultati istraživanja su pokazali da je smilje imalo visok sadržaj ukupnih fenola u 96 % etanolnom ekstraktu koji je bio u visokoj korelaciji s aktivnošću vezanja DPPH (93,5 %). Rigano i sur. (2014) su iz cvjetova *H. italicum* subsp*. italicum*, po prvi put izolirali gnafaliol 9-O-propanoat među pet drugih već poznatih acetofenona. Ispitana su citotoksična, protuupalna i antioksidativna svojstva na novom i druga dva izolata (acetotrixmeton i 1-[2-[1-[(acetiloksi) metil] etenil]-2,3-dihidro-3-hidroksi-5-benzofuranil]-etanon). Test citotoksičnosti pokazao je siguran biološki profil, dok je samo izolat acetotrixmeton djelovao kao antioksidans. Goncalves i sur., (2017) su otkrili da metanolni ekstrakt smilja obiluje fenolnim spojevima - kafeoilkinskom i dikafeoilkinskom kiselinom i pinocembrinom. Zahvaljujući njima, smilje je pokazalo visok inhibitorni potencijal na acetilkolinesteraze (AChE) (78,29%), tirozinaze (74,13%) i α-glukozidaze (96,65%), enzimima koji su povezani s Alzheimerovom bolesti što je po prvi put zabilježeno u tom istraživanju. U radu autora Generalić Mekinić i sur. (2014) prikazan je profil fenolnih kiselina i ispitano je antioksidacijsko djelovanje ekstrakta smilja u usporedbi s kamilicom (*Matricaria recutita* L.) i ekstraktima stolisnika (*Achillea millefolium* L.). Kemijska analiza etanolnih ekstrakata triju vrsta pokazala je varijabilnost u sadržaju fenola. Ekstrakt smilja sadržavao je najveću količinu flavonoidne frakcije i kofeinske kiseline, ali je ujedno pokazao najnižu antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s drugim ekstraktima. Slabo antioksidativno djelovanje ekstrakta smilja uzorkovanog na području Crne Gore također su utvrdili i Kladar i sur. (2015).

U narodnoj medicini biljni čaj od smilja često se spominje kao tradicionalni lijek za gastrointestinalne bolesti. Kako bi provjerili tu tradicionalnu primjenu, Rigano i sur. (2013) su testirali utjecaj etanolnog ekstrakta smilja na pokretljivost crijeva *in vivo* i *in vitro* te potvrdili njegov pozitivan učinak kod bolesti crijeva. Novija istraživanja autora Ornano i sur. (2015) te Malenica Staver i sur. (2018) dokazala su i antiproliferativno djelovanje (djelovanje kojim se sprečava razmnožavanje tumorskih stanica) eteričnog ulja smilja.

2.6.4. Ostala djelovanja smilja

Epidemijske bolesti koje prenose komarci rastući su problem u svijetu, stoga se istražuju eterična ulja i ekstrakti koji su manje štetni za ljude i okoliš, a mogu zamijeniti sintetičke insekticide i repelente. Smilje također posjeduje spojeve insekticidnih i repelentnih svojstava. Conti i sur. (2010) istražili su učinak eteričnog ulja *H. italicum*a s otoka Elbe na tigrastog komarca *Aedes albopictus*. Rezultati su pokazali visoku toksičnost pri najvišoj dozi od 300 ppm, sa stopom smrtnosti do 100 %. Benelli i sur. (2014) dokazali su larvicidni učinak eteričnog ulja *H. italicum* na tigrastog komarca, a Drapeau i sur. (2009) su testirali repelentni potencijal protiv komarca *Aedes aegypti*. Dobiveni rezultati su pokazali da se eterično ulje smilja može smatrati sekundarnim čimbenikom za proširenje zaštite jačih repelentnih molekula. Ostala istraživanja pokazala su insekticidnu i repelentnu aktivnost eteričnog ulja smilja protiv *Sitophilus zeamais* (Bertoli i sur., 2012), kao i *Culex quinquefasciatus* i (*Musca domestica*). (Benelli i sur., 2018).

Smilje je poželjna vrsta i u pejzažnoj arhitekturi. Kao kserofit pokazao se koristan za uzgoj na urbanim sustavima zelenih krovova u polusuhim i suhim klimatskim uvjetima mediteranskog područja (Monteiro i sur., 2017a, 2017b; Papafotiou i sur., 2018).

Grifoni i sur. (2014) ispitali su učinak vodenog ekstrakta smilja kao sredstva za bojenje prirodnih tkanina pamuka i lana. Cilj je bio ispitati njegovu sposobnost zaštite od UV zračenja, koja se kod lana pokazala zadovoljavajućom.

Primjenjivost sekundarnih metabolita smilja u stvaranju jestivih filmova na bazi pektina i alginata istražili su Karača i sur. (2019). Prema riječima autora, smilje je obećavajući materijal s velikim potencijalom primjene jer je bogat polifenolima visoke antioksidativne aktivnosti i stoga ima sposobnost zaštititi pohranjenu hranu od oksidacije i mikrobne razgradnje.

Istražen je i fitoremedijacijski potencijal smilja tako što je istražena njegova sposobnost apsorpcije teških metala (Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb i Zn) iz kontaminiranog tla (Brunetti i sur., 2018). Korištene su dvije vrste biljnog materijala, ne-mikorizirane biljke i biljke mikorizirane s *Septoglomus viscosum*. Rezultati su pokazali da smilje smanjuje sadržaj teških metala u tlu i da biljke koje nisu mikorizirane apsorbiraju veće količine. Autori naglašavaju da je smilje uzgajano na kontaminiranom tlu sigurno za upotrebu u kozmetičke i medicinske svrhe, jer se teški metali akumuliraju u korijenovom sustavu, a ne u nadzemnim dijelovima biljaka iz kojih se izolira eterično ulje.

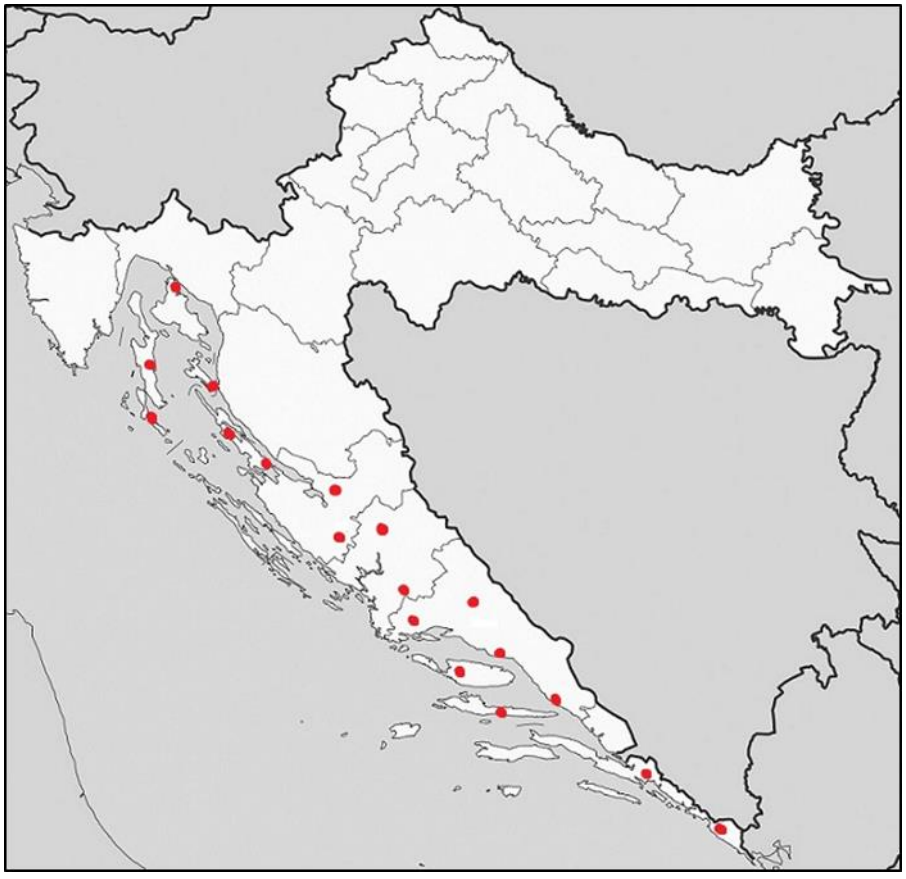
Zabilježena je i učinkovitost eteričnog ulja smilja kao inhibitora korozije čelika (Cristofari i sur., 2012).

3. MATERIJAL I METODE RADA

3.1. Ekozemljopisni pregled i prikupljanje

Sjeme prirodnih populacija sredozemnog smilja prikupljeno je tijekom srpnja 2014. i 2015. godine. Lokacije prikupljanja predstavljaju cjelokupni areal rasprostranjenja smilja na području Republike Hrvatske, a obuhvaća jadransku obalu i otoke te dio zaleđa (većinom kamenjarske pašnjake). Za istraživanje je ukupno prikupljeno sjeme 18 prirodnih populacija. Lokacije uzorkovanja prikazane su u Tablici 2. i Slici 1. Na Slici 2. prikazane su populacije na svom prirodnom staništu.

Sakupljene primke pohranjene su u Kolekciju ljekovitog i aromatičnog bilja Zavoda za sjemenarstvo Agronomskog fakulteta. Podaci o primkama dostupni su u Hrvatskoj bazi podataka o biljnim genetskim izvorima (http://cpgrd.hapih.hr/).



Slika 1. Lokacije uzorkovanja samoniklih populacija smilja

Tablica 2. Lokacije uzorkovanja samoniklih populacija smilja

Br	Broj primke	Populacija	Zemljopisna širina	Zemljopisna dužina	Nadmorska visina (m/nm)
P01	MAP02687	Krk	45 1358N	14 3459E	36
P02	MAP02686	Cres	44 4949N	14 2507E	248
P03	MAP02685	Lošinj	44 3540N	14 2442E	73
P04	MAP02684	Rab	44 4222N	14 5122E	44
P05	MAP02683	Pag (Zrće)	44 3208N	14 5502E	18
P06	MAP02682	Pag (Miškovići)	44 2003N	15 1441E	42
P07	MAP02688	Obrovac	44 1312N	15 4019E	137
P08	MAP02672	Benkovac	44 0257N	15 4819E	203
P09	MAP02673	Kistanje	44 0129N	15 5330E	302
P10	MAP02674	Unešić	43 4453N	16 0953E	390
P11	MAP02675	Seget	43 3628N	16 1012E	426
P12	MAP02677	Brač	43 2125N	16 2902E	290
P13	MAP02679	Hvar	43 0829N	16 4432E	361
P14	MAP02676	Sinj	43 4023N	16 3914E	343
P15	MAP02678	Omiš	43 2415N	16 5052E	116
P16	MAP02680	Živogošće	43 1031N	17 1154E	125
P17	MAP02681	Slano	42 4939N	17 4901E	338
P18	MAP02689	Cavtat	42 3516N	18 1534E	525



a)

b)

c)

d)

Slika 2. Populacije smilja u prirodnom staništu: a) Krk; b) Cres; c) Pag (Miškovići); d) Hvar

3.2. Poljski pokus

Od prikupljenog sjemena uzgojene su presadnice u zaštićenom prostoru (Slika 3) te su posađene na dvije lokacije: 1) pokušalište Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu i 2) pokusno polje u Vojniću Sinjskom (Slika 4). Pokušališta se nalaze na različitim tipovima tla (rendzina na flišu te smeđe tlo na vapnencu). Pokusi su postavljeni po slučajnom bloknom rasporedu. Svaka od 18 populacija bila je zastupljena s po 20 biljaka u 2 ponavljanja, ukupno 720 biljaka. Razmak između redova iznosio je 80 cm, a razmak unutar reda 30 cm. U pokusu nisu korištena sredstva za zaštitu bilja niti gnojiva, nego isključivo mehaničke metode obrade (košnja, frezanje i ručno plijevljenje korova).



a)



b)



c)



d)

Slika 3. Populacije u različitim fazama uzgoja: a) kotiledoni; b) presadnice; c) sadnja presadnica; d) presadnica posađena na stalno mjesto u pokušalište



a)



b)

Slika 4. Pokusno polje: a) u Vojniću Sinjskom i b) pokušalište Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu

3.3. Metode molekularnih analiza

Molekularne analize provedene su na Sveučilištu u Zagrebu Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, biološkom odsjeku botaničkog zavoda u Zagrebu.

3.3.1. Izolacija ukupne stanične DNA

Za potrebe molekularnih istraživanja izolirana je ukupna stanična DNA iz svježih listova 25 biljaka svih 18 populacija, ukupno 450 uzoraka. Ukupna stanična DNA izolirana je iz 25 mg silika gel osušenog lisnog tkiva pomoću *DNeasy Plant Mini* izolacijskog kompleta (Qiagen®). Sva centrifugiranja su provedena u centrifugi 5415 D (Eppendorf®).

Postupak:

1. Nasjeckano i izvagano tkivo stavljeno je u epruvetu safe-lock (Eppendorf®) od 2 ml u koju je dodana čelična kuglica za usitnjavanje. Epruveta je potom stavljena u uređaj za usitnjavanje; *Tissue Lyser* II (Qiagen®) na frekvenciju 30 Hz/s, 1 min.
2. Na usitnjeno biljno tkivo dodano je 400 µL otopine AP1 pufera (otopina deterdženta i proteinaze) i 4 µL RNaze A te je sadržaj promiješan na vrtložnoj miješalici (GVLab - Gilson®).
3. Dobiveni homogenat inkubiran je 10 min na 65 °C uz povremeno miješanje (liziranje stanica).
4. U svaki uzorak dodano je 130 µL otopine P3, uzorci su promiješani na vrtložnoj mješalici te inkubirani 7 min na -20 °C (taloženje denaturiranih bjelančevina), a potom centrifugirani 5 min na 16.000 x g.
5. Gornji vodeni sloj je prepipetiran na *QIAshredder* spin kolonu i centrifugiran 2 min na 16.000 x g.
6. Filtrat je prenesen u novu kolonu, dodano je 1,5 volumena otopine AW1 te je kratko promiješano na vrtložnoj miješalici (GVLab - Gilson®).
7. 650 µL otopine je preneseno na *DNeasy Mini Spin* kolonu i centrifugirano 1 min na 6.000 x g. Filtrat je potom odbačen te se proces ponovio dok nije profiltrirana cijela otopina iz koraka br. 6.
8. Kolona s DNA prebačena je na novu epruvetu od 2 ml. Dodano je 500 µL otopine AW2 i centrifugirano 1 min na 6.000 x g (ispiranje DNA molekula vezanih na koloni). Filtrat se odbacio te se postupak ponovio još jednom ali ovaj put je centrifugiran 2 min na maksimalno.

9. *DNeasy Mini Spin* kolona prebačena je u novu epruvetu od 1,5 ml i ostavljena otvorena 5 min da ishlapi etanol.
10. U središnji dio kolone je dodano 100 µL AE otopine za ispiranje. Nakon 5 min stajanja na sobnoj temperaturi (kako bi se membrana kolone dobro natopila) uzorak je centrifugiran 1 minutu na 6.000 x g.
11. Kolona se odbacila, a dobiveni filtrat (otopina DNA) je pohranjen je u epruveti na -20 °C do budućih analiza.

3.3.2. Određivanje koncentracije i čistoće izolirane DNA

Nakon izolacije DNA izmjerena je koncentracija DNA pomoću spektrofotometra P300 (Implen®). Uređaj je kalibriran pomoću AE otopine za ispiranje DNA molekula s *DNeasy Mini Spin* kolone korištene prilikom izolacije DNA. Kako bi se dodatno potvrdila vjerodostojnost mjerenja, osim koncentracije DNA izmjerena je koncentracija DNA poznate koncentracije (λ DNA c=100 ng/µl). Osim što je za sve uzorke izmjerena koncentracija, određen je i omjer apsorbancije 260/280 kao mjera čistoće izolata DNA. Približna koncentracija i kakvoća ekstrahirane DNA provjerena je elektroforezom na 1,0 % agaroznom gelu u 0,5 × TBE puferu (45 mM tris-borata i 1 mM EDTA, pH 8), kroz 1 sat pri 100 V (Sambrook i sur., 1989). Prije same elektroforeze svim uzorcima DNA dodan je pufer za nanošenje (30 % saharoze, 0,25 % brom-fenolnog bojila i 0,25 % ksilen-cijanola) te je nanesen u jažice agaroznog gela. Kao standard korištena je DNA bakteriofaga λ (Boehringer, Mannheim, Njemačka) u koncentraciji od 100 ng/µl. Kako bi se detektirali fragmenti DNA, agarozni gel je uronjen u otopinu GelRed (Biotium®) kroz 30 minuta. Nakon toga gel je prebačen na UV-transiluminator i snimljen upotrebom DigiGenius gel doc sustava (Syngene®). Kvaliteta i koncentracija DNA procijenjena je usporedbom debljine i sjaja traka izoliranih DNA s trakom DNA bakteriofaga λ te jačinom sjaja razmaza malih fragmenata DNA.

3.3.3. Polimorfizam dužine umnoženih ulomaka (AFLP)

Metoda AFLP sastoji se od nekoliko postupaka: restrikcije ukupne stanične DNA pomoću dva restrikcijska enzima i ligacije specifičnih adaptera na restrikcijske fragmente, preselektivnog i selektivnog PCR umnožavanja. U nastavku je opisan postupak za 572 uzorka.

1) Restrikcija i ligacija za 572 uzorka (postepeno je otopljeno 10 x T4 pufera, 0.5 M otopina NaCl, 1 mg/ml otopne BSA)

   a) *EcoR*I adapter otopina, c=2,5 µM (iz 100 mM Stock-otopine):
      - 26,0 µl *EcoR*I adapter F (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3')
      - 26,0 µl *EcoR*I adapter R (5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3')
      - 988,0 µl H_2O
      - 1040,0 µl ukupno

   b) *Tru1I* adapter, c=25 µM (iz 200 mM Stock-otopine):
      - 130,0 µl *Tru1*I F (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3')
      - 130,0 µl *Tru1*I R (5'-TACTCAGGACTCAT-3')
      - 780,0 µl H_2O
      - 1040,0 µl ukupno

   Otopine *EcoR*I i *Tru1*I adaptera odvojeno su promiješane pipetiranjem, a potom ugrijane na 95 °C 7 min te ohlađene na RT kroz 10 min.

   c) Restrikcijsko - enzimska otopina
      - 104,0 µl 10 x T4 pufer
      - 104,0 µl 0.5 M NaCl
      - 52,0 µl 1 mg/ml BSA
      - 104,0 µl *EcoR*I HC
      - 20,8 µl *Tru1* HC
      - 34,7 µl T4 DNA Ligase
      - 620,5 µl H_2O
      - 1040,0 µl ukupno

   d) Restricijsko - ligacijska otopina:
      - 1040,0 µl10 x T4 pufer

- 1040,0 µl 0.5 M NaCl
- 520,0 µl 1 mg/ml BSA
- 1040,0 µl *EcoR*I adapter otopine
- 1040,0 µl *Tru1*I adapter otopine
- 1040,0 µl restrikcijsko – enzimske otopine
- 5720 µl ukupno

Restricijsko - ligacijska otopina je promiješana vrtložnom mješalicom (GV-lab Gilson®) i potom pipetirana po 10 µl u svaku jažicu dvije 384 PCR pločice u koje je prethodno dodano 10 µl razrijeđenih DNA (c=10 ng/µl). Otopine su inkubirane 2 sata na 37 °C i 16 sati na 23 °C u Thermal cycler uređaju GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®).

2. Preselektivno PCR umnožavanje (za potrebe preseletivnog PCR umnožavanja razrijeđeno je 6 µl restricijsko- ligacijske otopine u 42 µl H_2O (8x). Napravljena je preselektivna PCR otopina za 600 uzoraka:
    - 5940,0 µl H_2O
    - 1200,0 µl 10 x pufer
    - 960,0 µl dNTP
    - 720,0 µl preselektivne početnice *EcoR*I (5'GACTGCGTACCAATTCA-3') 5 µM
    - 720,0 µl preselektivne početnice *Tru1*I (5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3') 5 µM
    - 60,0 µl Taq HS polimeraze (Takara®)
    - 9600,0 µl ukupno

    Po 16 µL preselektivne PCR otopine razdijeljeno je u 600 epruveta, a u svaku od njih je dodano po 4 µl 8 x razrijeđene restrikcijsko-ligacijske otopine.
    Uzorci su podvrgnuti lančanoj reakciji polimerazom u Thermal Cycler uređaju GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®), prema PCR programu:
    - 94 °C 2 min
    - 20 ciklusa: 94 °C 20 sec, 56 °C 30 sec, 72 °C 2 min
    - 60 °C 30 min
    - hold 4 °C

3. Selektivno PCR umnožavanje (za potrebe selektivnog PCR umnožavanja razrijeđena je 4 µl preselektivne otopine u 92 µl H_2O. Pripremljena je selektivna PCR otopina za 600 uzoraka:
    - 4080,0 µl H_2O
    - 1200,0 µl 10 x PCR pufer
    - 960,0 µl dNTP
    - 660,0 µl selektivni *EcoR*I početnice ACA^{FAM}
    - 660,0 µl selektivni *EcoR*I početnice AGA^{NED}
    - 660,0 µl selektivni *EcoR*I početnice ACG^{VIC}
    - 660,0 µl selektivni *EcoR*I početnice AGC^{PET}
    - 660,0 µl selektivni *Tru1*I
    - 60,0 µl Taq HS
    - 9600,0 µl ukupno

    Po 16 µL selektivne PCR otopine razdijeljeno je u 600 jažica dvije 384 PCR pločice, a u svaku od njih je dodano po 4 µl 24 x razrijeđene preselektivne PCR otopine.
    Uzorci su podvrgnuti lančanoj reakciji polimerazom u Thermal Cycler uređaju GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®), prema PCR programu:
    - 94 °C 2min
    - 10 ciklusa: 94 °C 20 sec, 66 °C 30 sec, 72 °C 2 min (u svakom od 10 ciklusa temperatura vezanja početnica je snižavana za 1 °C)
    - 20 ciklusa: 94 °C 20 sec, 56 °C 30sec, 72 °C 2 min
    - 60 °C 30 min
    - hold 4 °C

3.3.4. Detekcija PCR umnoženih ulomaka DNA

Kapilarnom elektroforezom u uređaju ABI3730 Genetic analyser (Applied Biosystems) izvršena je detekcija PCR umnoženih ulomaka. Prije samog postupka svaki od produkta selektivnog umnožavanja (1,5 µl) pomiješan je s 0,5 µl DNA veličinskog standarda GS-400 HD ili GS-500 LIZ (Aplied Biosystems) i 10 µl formamida. Uzorci su potom denaturirani na 95 °C 5 min te zatim smješteni na led. Nakon kapilarne elektroforeze fragmenti AFLP su bili vidljivi u obliku .fsa podataka.

Rezultati detekcije svake kombinacije selektivnih početnica (.fsa file format) za svaku istraživanu jedinku analizirani su pomoću programskog paketa GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems) te su uz pomoć istog računalnog programa pretočeni u tablicu veličina (bp=bazni parovi) i visina detektiranih pikova AFLP (.txt file format) koja je predstavljala ulazni skup podataka za statističku obradu i za određivanje stupnja pogreške (eng. *error rate*) u računalnom programu scanAFLP ver. 1.2 (Herrmann i sur. 2010). Postavke u „*Analisys Method Editor*-u“ programskog paketa GeneMapper 4.0 bile su: Analysis Range (bps) Start 100 End 500 (analizirani su fragmenti od 100 do 500 bp) i Edit Labels Tresholds 100 (nisu detektirani fragmenti s visinom pika manjom od 50 odnosno 100 ovisno o upotrebljenoj selektivnoj početnici).

3.4. Analiza eteričnog ulja

3.4.1. Izolacija eteričnog ulja

Berba nadzemnog dijela smilja provedena je u fazi cvatnje. Ubrani su cvatovi zajedno sa stabljikom i listovima (sa 20 biljaka) u svakoj populaciji u dva ponavljanja, na dvije lokacije pokusa. Uzorci su potom podvrgnuti sušenju na sobnoj temperaturi.
Sto grama suhe biljne mase po uzorku je hidrodestilirano u Clevenger aparatu dva sata i 30 minuta. Kao otapalo korišten je pentan. Uzorci ulja su osušeni pomoću bezvodnog natrijevog sulfata. Sastav i sadržaj eteričnog ulja je analiziran plinskim kromatografom s plameno-ionizacijskim detektorom (GG/FID) i plinskim kromatografom s masenim spektrometrom (GC/MS) u laboratoriju Instituta za proučavanje ljekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ u Beogradu.

3.4.2. Plinska kromatografija s plameno-ionizacijskim detektorom

Kvantitativna analiza eteričnog ulja provedena je plinskim kromatografom, model HP-5890 Series II (Hawlett-Packard, Waldbronn, Njemačka) opremljenim sa split-splitless injektorom, HP-5 kapilarnom kolonom (25 m x 0,32 mm, debljine filma 0,52 μm) i plameno - ionizacijskim detektorom (*Flame ionization detector* - FID). Kao plinski nositelj korišten je vodik (1 ml/min). Injektor je ugrijan na 250 °C, a detektor na 300 °C, dok je temperatura kolone bila linearno programirana od 40 – 260 °C (porast temperature 4°/min). Rezultati obrade kromatograma izrađeni kao postotak površine svakog identificiranog spoja su korišteni kao podloga za kvantifikaciju.

3.4.3. Plinska kromatografija s masenom spektrometrijom

GC/MS analiza provedena je pod gotovo jednakim analitičkim uvjetima, koristeći HP G 1800C Series II GCD analitički sistem Hawlett-Packard, (Palo Alto, CA, SAD) opremljen s HP-5MS kolonom (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Kao plin nositelj korišten je helij. Linija za transfer (MSD) je ugrijana na 260 °C. EI masenog spektra (70 eV) je podešen za skeniranje u modu m/z raspona 40-400. U svakom pojedinačnom slučaju analizirano je 1 μL uzorka otopljenog u etanolu (20 μl/2 ml) ubrizganog u split modu (1:30).

Identifikacija spojeva izvedena je usporedbom njihovih masenih spektara i retencijskih indeksa sa spektrima dobivenih iz autentičnih uzoraka i/ili s NIST/Wiley bazama podataka, koristeći različite pretraživače (PBM/NIST/AMDIS) i dostupne literaturne podatke (Hochmuth, 2006 i Adams, 2007). Postotak udjela spojeva se izračunavao iz elektronskih mjerenja pomoću plameno-ionizirajuće detekcije (FID; 250 ^{o}C).

3.5. Statistička obrada molekularnih podataka

3.5.1. Deskriptivna statistika

Radi analize unutarpopulacijske raznolikosti, za svaku populaciju izračunan je udio polimorfnih biljega, broj jedinstvenih biljega (*private bands*) i Shannonov informacijski indeks (Lewontin, 1972). Shannonovim informacijskim indeksom izračunana je i ukupna raznolikost (H_t) svih analiziranih populacija te prosječna unutarpopulacijska raznolikost (H_p) radi raščlanjenja ukupne fenotipske raznolikosti na udio raznolikosti unutar (H_p/H_t) kao i između populacija [$(H_t–H_p)/H_t$].

3.5.2. Analiza molekularne varijance i Φ_{ST} udaljenosti

Analizom molekularne varijance (AMOVA; Excoffier i sur., 1992) raščlanjena je ukupna varijanca u sastavnice varijance: sastavnicu uzrokovanu razlikama između populacija te sastavnicu uzrokovanu razlikama između jedinki unutar populacija. Analiza je provedena upotrebom programa Arlequin ver. 2.000 (Schneider i sur., 2000), a signifikantnost ϕ vrijednosti izračunana je na temelju 10.000 permutacija. Pojedinačnim analizama izračunane su ϕ_{ST} vrijednosti između svih parova populacija uz izračun njihovih signifikantnosti. Tako je dobivena matrica ϕ_{ST} vrijednosti na temelju koje je moguće procijeniti udaljenost između analiziranih populacija.

3.5.3. Genetska struktura populacija

Na temelju učestalosti umnoženih ulomaka pojedinog biljega AFLP u svakoj analiziranoj populaciji izračunane su alelne učestalosti koristeći Bayesovsku metodu s nejednakim priornim raspodjelama alelnih učestalosti (*Bayesian method with non-uniform prior distribution of allele frequencies*) po Zhivotovskom (Zhivotovsky, 1999). Na temelju alelnih učestalosti procijenjena je genska raznolikost analiziranih populacija te izračunana ukupna (H_T) i prosječna (H_W) genska raznolikost kao i genetska diferencijacija (H_B) te Wrightov indeks genetske diferencije (F_{ST}) po Lynchu i Milliganu (1994).

3.5.4. Genetska udaljenost između populacija i izrada stabla

Između svih parova populacija izračunana je standardna genetska udaljenost po Neiju (D_{NEI72}) te izrađeno stablo metodom po Fitchu i Margoliashu. Navedena analiza provedena je pomoću AFLP-Surv v. 1.0 (Vekemans i sur., 2002) pretpostavljajući da su populacije u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži (F_{IS} = 0). Matrica standardne genetske udaljenosti po Neiju korištena je za izradu stabla metodom po Fitchu i Margoliashu koristeći program FITCH programskog paketa PHYLIP ver. 3.6b (Felsenstein, 1993). Metodom *boostrap* napravljeno je 1000 matrica udaljenosti pomoću programa AFLP-Surv, a vrijednosti *boostrap* izračunane su upotrebom programa FITCH i CONSENSE (PHYLIP).

3.5.5. Bayesovska analiza populacijske strukture

Bayesovska analiza populacijske strukture provedena je pomoću programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard i sur., 2000; Falush i sur., 2003; Kaeuffer i sur., 2007; Hubisz i sur., 2009; Pritchard i sur., 2010; pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html) i pomoću programa BAPS v. 5.3 (Corander i sur., 2009).

Upotrebom programa STRUCTURE pretpostavljeno je postojanje od jedne do 11 skupina (K = 1 - 11) te je za svaku hipotezu provedeno 30 neovisnih prohoda (*run*). Budući da se radi o stohastičkoj optimizaciji, različiti prohodi na temelju istog pretpostavljenog broja skupina obično ne daju isti rezultat. Svaki se prohod sastojao od 200.000 ponavljanja tijekom razdoblja zagrijavanja lanca (*burn-in*), a podaci o posteriornoj vjerojatnosti podataka [$ln\ P(X|K)$] prikupljani su tijekom 1.000.000 ponavljanja algoritma Markovljev Lanac Monte Carlo (*Markov Chain Monte Carlo*; MCMC). Pretpostavljen je model koji dozvoljava mješovito podrijetlo jedinki (*admixture model*) i korelirane alelne učestalosti bez uključivanja prethodnih informacija o populacijskoj pripadnosti pojedinih jedinki radi definiranja skupina. Analiza je provedena na Računalnom klasteru Isabella Sveučilišnog računskog centra (SRCE) Sveučilišta u Zagrebu.

Izbor najvjerodostojnije hipoteze proveden je usporedbom posteriornih vjerojatnosti podataka [$ln\ P(X|K)$] za svaku vrijednost K (Pritchard i sur., 2000) kao i izračunom vrijednosti ΔK koja predstavlja stopu promjene posteriornih vjerojatnosti između uzastopnih vrijednosti K (Evanno i sur., 2005). Vrijednost ΔK je izračunana u programu STRUCTURE HARVESTER v0.6.92 (Earl i von Holdt, 2012) po formuli:

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

gdje je:

L_K - prosječna posteriorna vjerojatnost podataka [*ln* P(X|K)] broja skupina K izračunana na temelju više prohoda (runs),

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

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

sd_K - standardna devijacija posteriornih vjerojatnosti podataka za broj skupina K.

Nakon utvrđivanja najvjerodostojnijeg broja K, jedinke su pridružene pojedinim skupinama uz izračun udjela genoma (Q) koji potječe iz određene skupine. Na taj način neke jedinke mogu potpuno pripadati jednoj skupini ili pak imati mješovito ('hibridno') podrijetlo iz dvije ili više skupina. Utvrđene skupine tako predstavljaju izvorne populacije (*ancestral populations*) odnosno genske skupove (*gene pool*) na temelju kojih se može objasniti genetska raznolikost uzorkovanih populacija. Prohodi (runs) za određenu vrijednost K su razvrstani po sličnosti, a vrijednosti udjela genoma (Q) uprosijećeni koristeći program CLUMPAK (Kopelman i sur., 2015).

Bayesovska analiza populacijske strukture provedena je i pomoću programa BAPS v. 5.2 (Corander i sur., 2009) na temelju 693 polimorfnih AFLP biljega. Provedena je Analiza skupina (*Clustering of individuals*) kao i Prostorna analiza skupina (*Spatial clustering of individulas*) pri kojoj su zemljopisne pozicije mjesta prikupljanja korištene kao informativni prior. Koristeći algoritam Metropolis-Hastings ova metoda svrstava analizirane jedinke u genetski različite skupine pretpostavljajući Hardy-Weinbergovu ravnotežu kao i ravnotežu vezanosti gena (*linkage equilibrium*) unutar svake skupine (Corander i sur., 2003; Corander i Martinen, 2006). U prvoj se fazi (*mixture model*) utvrđuje optimalan broj skupina (K) radi razvrstavanja jedinki u genetski različite skupine na temelju marginalne vjerodostojnosti (*marginal likelihood*) modela. Nakon odabira modela (broj K), nepodudarnost alelnih raspodjela između parova skupina analizira se pomoću Kullback-Leiblerove divergencije (Kullback i Leibler, 1951) kao mjerila relativne genetske udaljenosti. U drugoj se fazi (*admixture model*) procjenjuje pripadnost jedinki na način da se izračunava udio genoma svake jedinke koji potječe iz određene skupine odnosno izvorne populacije (*ancestral population*).

U svrhu provedbe analize u prvoj fazi (*mixture model*) pretpostavljen je maksimalan broj skupina K = 20 (jednak ukupnom broju uzorkovanih populacija) te je provedeno

dvadeset neovisnih prolaza (*run*) radi pronalaženja optimalnog broja skupina. Budući da se radi o stohastičkoj optimizaciji, različiti prolazi na temelju istog pretpostavljenog broja skupina obično ne daju isti rezultat. U drugoj su fazi (*admixture model*) korišteni sljedeći parametri: (1) minimalna veličina populacije koja će se uzeti u obzir prilikom procjene pripadnosti: 5; (2) broj iteracija: 100; (3) broj referentnih jedinki svake populacije: 200; (4) broj iteracija referentnih jedinki: 20.

3.5.6. Prostorna genetika

Analiza izolacije uslijed udaljenosti (*isolation by distance*; IBD; Rousset, 1997) provedena je pomoću Mantelovog testa na temelju 10.000 permutacija pomoću programa NTSys-pc ver. 2.10s (Rohlf, 2000) između matrice $F_{ST}/(1-F_{ST})$ vrijednosti i matrice prirodnih logaritama zemljopisnih udaljenosti (u km) između analiziranih populacija. Vrijednosti indeksa populacijske diferencijacije procijenjene su na temelju Bayesovske metode po Zhivotovskom (Zhivotovsky, 1999), dok su zemljopisne udaljenosti (odnosno ortodromske udaljenosti; *orthodromic distance*) između populacija izračunane na temelju putovničkih podataka (*passport data*) koji su uključivali zemljopisnu širinu i dužinu lokacije prikupljanja.

3.5.7. Lokalna adaptacija

Lokusi pod odabirom otkriveni su korištenjem dva temeljna pristupa: utvrđivanjem lokusa koji pokazuju atipične vrijednosti parametra genetske diferencijacije (F_{ST}) i analizom korelacija između genske raznolikosti i okolišnih svojstava. Identifikacija F_{ST} *outlier* lokusa provedena je frekventističkom metodom pomoću programa Mcheza (Antao i Beaumont, 2011) te hijerarhijskom Bayesovskom metodom pomoću programa BayeScan ver. 2.01. (Foll i Gaggiotti, 2008).

Frekventistička metoda implementirana u program Mcheza detektira lokuse s neuobičajeno visokim ili niskim F_{ST} vrijednostima. Izračunava se odnos vrijednosti očekivane heterozigotnosti (H_E) i genetske diferencijacije (F_{ST}) pojedinačnih biljega AFLP uz interval povjerenja (99 %). Lokusi pod direktnim odabirom (usmjerenim odabirom; *directional selection*) pokazuju signifikantno više vrijednosti F_{ST} nego većina neutralnih lokusa u uzorku, dok se lokusi sa signifikantno nižim F_{ST} vrijednostima smatraju da su pod ravnotežnim odabirom (*balancing selection*; *purifying selection*).

Bayesovska metoda implementirana u program BayeScan izračunava odnos vrijednosti dekadskog logaritma aposteriornih omjera vjerojatnosti modela [$\log_{10}$(PO)] pretpostavljajući adaptivnost i neutralnost pojedinog lokusa te vrijednosti parametra genetske diferencijacije (F_{ST}). Kritična vrijednost $\log_{10}$(PO) korištena je za utvrđivanje signifikantnosti lokusa koji pokazuju atipične vrijednosti na razini stope vjerojatnosti lažno pozitivnih slučajeva od 0,01 [FDR < 0,01;].

$$PO = \frac{\Pr\left(M_1 \middle| D\right)}{\Pr\left(M_2 \middle| D\right)}$$

PO – posteriorni omjer vjerojatnosti modela (posterior odds; *PO*)
Pr – posteriorna vjerojatnost
M_1 – model koji uključuje odabir
M_2 – neutralni model
D - podaci

Korelacije između genetske raznolikosti i okolišnih varijabli procijenjene su metodom prostorne analize implementirane u program Samβada (Stucki i Joost, 2015). Metoda provodi višestruke univarijatne logističke regresije kako bi se procijenila povezanost između alelnih učestalosti na lokusima biljega AFLP i okolišnih varijabli mjesta uzorkovanja. Klimatski podaci za 18 lokacija uzorkovanja dobiveni su iz baze podataka WorldClim (www.worldclim.org). Okolišni uvjeti lokacije uzorkovanja opisani su pomoću 19 bioklimatskih varijabli (11 temperaturnih varijabli i osam oborinskih varijabli).
Analiza glavnih sastavnica (PCA) provedena je na 19 bioklimatskih varijabli dobivenih iz baze podataka WorldClim za mjesta uzorkovanja smilja. Konstruiran je biplot s dvije glavne komponente (PC) koje prikazuju uzorkovane populacije i bioklimatske varijable (kao vektore).

3.6. Statistička obrada biokemijskih podataka

3.6.1. Deskriptivna statistika

Korelacije između 18 najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja izračunane su na temelju Pearsonovog korelacijskog koeficijenta u programu SAS v. 9.3 (SAS Institute Inc., 2011).

3.6.2. Analiza varijance

Analiza varijance provedena je za 18 spojeva eteričnog ulja smilja, a izvori varijabilnosti su bili populacija, pokusna lokacija, interakcija između populacije i lokacije te ponavljanje unutar lokacije (*nested*). Ponavljanje unutar lokacije je tretirano kao slučajna (*random*) varijabla i korištena je kao pogreška (*error term*) prilikom testiranja signifikantnosti lokacije. Usporedbe prosječnih vrijednosti između populacija su provedene pomoću Tukeyjevog post hoc testa na razini $P < 0,05$. Analiza je provedena pomoću naredbe PROC GLM u programu SAS.

3.6.3. Analiza glavnih sastavnica

Analiza glavnih sastavnica (*Principal Component Analysis*; PCA) je provedena na temelju devet spojeva eteričnog ulja koje su pokazale signifikantne razlike između populacija. Izrađen je dijagram u kojem je u koordinatnom sustavu točkama prikazan položaj analiziranih populacija, a vektorima pojedini spojevi eteričnog ulja. Analiza je provedena pomoću naredbe PROC PRINCOMP u programu SAS.

3.6.4. Analiza skupina

Na temelju vrijednosti devet spojeva eteričnog ulja izračunana je euklidska udaljenost između populacija. Matrica kvadratnih euklidskih udaljenosti korištena je u analizi skupina (*Cluster Analysis*; CA) u svrhu izrade dendrograma Wardovom metodom (Ward, 1963). Optimalan broj skupina utvrđen je na temelju vrijednosti pseudo F statistike (*Pseudo F statistics*; PSF).

3.6.5. Analiza varijance između skupina populacija

Jednosmjerna analiza varijance između skupina populacija provedena je pomoću naredbe PROC GLM u programu SAS radi testiranja razlika između skupina na temelju devet spojeva eteričnog ulja. Usporedba prosječnih vrijednosti između skupina provedena je pomoću Tukeyjevog *post hoc* testa.

3.6.6. Diskriminacijska analiza

Diskriminacijska analiza (*discriminant analysis*; DA) je provedena uporabom procedura PROC STEPDISC, PROC DISCRIM i PROC CANDISC u programu SAS. Postupna diskriminacijska analiza (*stepwise discriminant analysis*; PROC STEPDISC) je omogućila odabir spojeva koji najviše pridonose klasifikaciji populacija u tri utvrđena kemotipa. Uspješnost klasifikacije je utvrđena pomoću unakrsne provjere valjanosti (*cross-validation*) upotrebom procedure PROC DISCRIM. Procedurom PROC CANDISC izvedena je diskriminacijska funkcija i izrađen dijagram u kojem je u koordinatnom sustavu točkama prikazan položaj analiziranih populacija, a vektorima pojedini spojevi.

3.6.7. Korelacije

Korelacije između zemljopisne širine, zemljopisne dužine te bioklimatskih svojstva i 18 najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja smilja izračunane su na temelju Pearsonovog korelacijskog koeficijenta u programu SAS. Korelacije između matrica zemljopisne, bioklimatske, genetske i biokemijske udaljenosti između populacija izračunane su na temelju Pearsonovog korelacijskog koeficijenta, a signifikantnost korelacija je procijenjena neparametrijskim Mantelovim testom nakon 10.000 permutacija u programu NTSys-pc v. 2.10s (Rohlf, 2000). Zemljopisna je udaljenost izražena kao *ln*(km) između populacija, a genetska udaljenost kao $F_{ST}/(1-F_{ST})$. Bioklimatska udaljenost je euklidska udaljenost između populacija na temelju 19 bioklimatskih svojstava, a biokemijska je euklidska udaljenost između populacija na temelju devet spojeva eteričnog ulja.

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1. Genetska raznolikost

4.1.1. Deskriptivna statistika

Na temelju AFLP biljega analizirana je raznolikost unutar i između 18 populacija smilja (*Helichrysum italicum*). Četiri kombinacije početnica rezultirale su sa 693 polimorfna AFLP biljega. Ukupni stupanj pogreške (*error rate*) za sve kombinacije selektivnih PCR početnica bio je 4.87 %. U Tablici 3. prikazan je udio polimorfnih AFLP biljega za pojedinu populaciju. Kod populacije P03 Lošinj utvrđen je najveći udio polimorfnih biljega (0,654), dok je kod populacije P17 Slano utvrđen najmanji broj polimorfnih biljega (0,548). Ukupna fenotipska raznolikost (H_t) svih analiziranih populacija izračunana Shannovim informacijskim indeksom iznosila je 0,414. Prosječna unutarpopulacijska raznolikost (H_p) iznosila je 0,355 (Tablica 3). Udio raznolikosti unutar populacija (H_p/H_t) iznosio je 0,858, odnosno 85,82 %, dok je udio raznolikosti između populacija [$(H_t–H_p)/H_t$] iznosio 0,142 odnosno 14,18 %.

Prosjek učestalosti rijetkih alela (*DW*) iznosio je 50,82. Najvišu učestalost rijetkih alela (*DW*) imala je populacija P06 Miškovići, Pag (76,10), a najmanju (33,53) populacija P17 Slano (Tablica 3).

Tablica 3. Molekularna raznolikost 18 populacija smilja na temelju 693 biljega AFLP

Br.	Populacija	*n*	*P %*	N_{pr}	*I*	*DW*
P01	Krk	24	0,636	0	0,373	51,13
P02	Cres	25	0,649	1	0,373	56,79
P03	Lošinj	25	0,654	1	0,375	64,59
P04	Rab	25	0,633	1	0,383	67,94
P05	Zrće, Pag	24	0,582	0	0,344	50,58
P06	Miškovići, Pag	25	0,631	0	0,370	76,10
P07	Obrovac	24	0,615	0	0,366	48,73
P08	Benkovac	25	0,593	1	0,353	59,22
P09	Kistanje	25	0,608	0	0,352	41,88
P10	Unešić	24	0,610	0	0,356	45,05
P11	Seget	25	0,610	0	0,356	43,44
P12	Brač	25	0,571	0	0,337	40,85
P13	Hvar	25	0,600	0	0,353	51,56
P14	Sinj	25	0,589	0	0,349	42,63
P15	Omiš	25	0,569	1	0,334	42,31
P16	Živogošće	25	0,551	0	0,330	36,00
P17	Slano	23	0,548	0	0,332	33,53
P18	Cavtat	25	0,592	0	0,357	62,46
	Prosjek (H_p)	0,602	0,602		0,355	50,82
	Minimum	0,548	0,548		0,330	33,53
	Maksimum	0,654	0,654		0,383	76,10

n – broj jedinki
%P – udio polimorfnih biljega
Npr – broj jedinstvenih alela
I – Shanonov informacijski indeks
DW - učestalost rijetkih alela (*frequency down-weighted marker value*)

4.1.2. Analiza molekularne varijance

Analizom molekularne varijance (AMOVA) ukupna molekularna varijanca utvrđena biljezima AFLP raspoređena je na sastavnice koje čine razlike unutar populacija i između populacija. Rezultati analize molekularne varijance pokazali su da 93,08 % raznolikosti pripada unutarpopulacijskoj raznolikosti, a 6,92 % pripada raznolikosti između populacija. Rezultati su dobiveni nakon 10.000 permutacija na razini signifikantnosti $P(\phi) < 0,001$ (Tablica 4).

Između svih parova populacija smilja pojedinačnim analizama izračunana je matrica ϕ_{ST} vrijednosti (Prilog 1). Na temelju dobivene matrice moguće je procijeniti udaljenost između analiziranih populacija. Prosječna vrijednost genetske diferencijacije između svih analiziranih populacija iznosila je 0,068. Najveća udaljenost utvrđena je između populacija

P05 Zrće, Pag i P13 Hvar (0,127), dok su najbliže bile populacije P09 Kistanje i P10 Unešić (0,010).

Tablica 4. Raspodjela raznolikosti između i unutar 18 populacija smilja na temelju biljega AFLP pomoću analize molekularne varijance (AMOVA)

Izvor	df	Sastavnice varijance	% Ukupne varijance	*f*-statistika	*P(ϕ)*
Između populacija	17	4,17	6,92	0,069	< 0,0001
Unutar populacija	426	56,09	93,08		

P(*ϕ*) - značajnost f-statistike nakon 10.000 slučajnih permutacija

4.1.3. Genetska struktura populacija

Genska raznolikost (očekivana heterozigotnost; H_E) izračunana je unutar svake od analiziranih populacija na temelju genskih frekvencija pod pretpostavkom ravnoteže po Hardyju i Weinbergu (Tablica 5). Najmanja genska raznolikost zabilježena je kod populacije P16 Živogošće (H_E = 0,134), a najveća kod populacije P04 Rab (H_E = 0,153). Ukupna genska raznolikost (H_t) svih analiziranih populacija iznosila je 0,147. Prosječna genska raznolikost unutar populacija (H_w) bila je 0,142, dok je prosječna genska raznolikost između populacija u suvišku od one uočene unutar populacija (H_b) iznosila 0,005.

Wrightov koeficijent genetske diferencijacije (F_{ST}) na razini svih populacija iznosio je 0,036. Dobivene F_{ST} vrijednosti između svih parova populacija prikazane su u Prilogu 2. Najveća vrijednost indeksa genetske diferencijacije, izračunana je kod populacija P04 Rab i P13 Hvar (F_{ST} = 0,069), a najmanja izračunana je kod populacija P09 Kistanje i P10 Unešić (F_{ST} = 0,002).

Tablica 5. Genska raznolikost (H_E) i genetska struktura 18 populacija smilja pod pretpostavkom ravnoteže po Hardyju i Weinbergu

Br.	Populacija	H_E
P01	Krk	0,145
P02	Cres	0,148
P03	Lošinj	0,148
P04	Rab	0,153
P05	Pag (Zrće)	0,141
P06	Pag (Miškovići)	0,150
P07	Obrovac	0,148
P08	Benkovac	0,141
P09	Kistanje	0,138
P10	Unešić	0,140
P11	Seget	0,139
P12	Brač	0,137
P13	Hvar	0,141
P14	Sinj	0,140
P15	Omiš	0,136
P16	Živogošće	0,134
P17	Slano	0,136
P18	Cavtat	0,143
	H_t	0,147
	H_w	0,142
	Minimum H_w	0,134
	Maksimum H_w	0,153
	H_b	0,005
	F_{ST}	0,036***

H_E - genska raznolikost (očekivana heterozigotnost) unutar populacija
H_t - ukupna genska raznolikost
H_w - prosječna genska raznolikost unutar populacija
H_b - prosječna genska raznolikost između populacija u suvišku od one uočene unutar populacija
F_{ST} - Wrightov koeficijent genetske diferencijacije (*** - signifikantan na razini P < 0,001 nakon 1.000 nasumičnih permutacija jedinki između populacija)

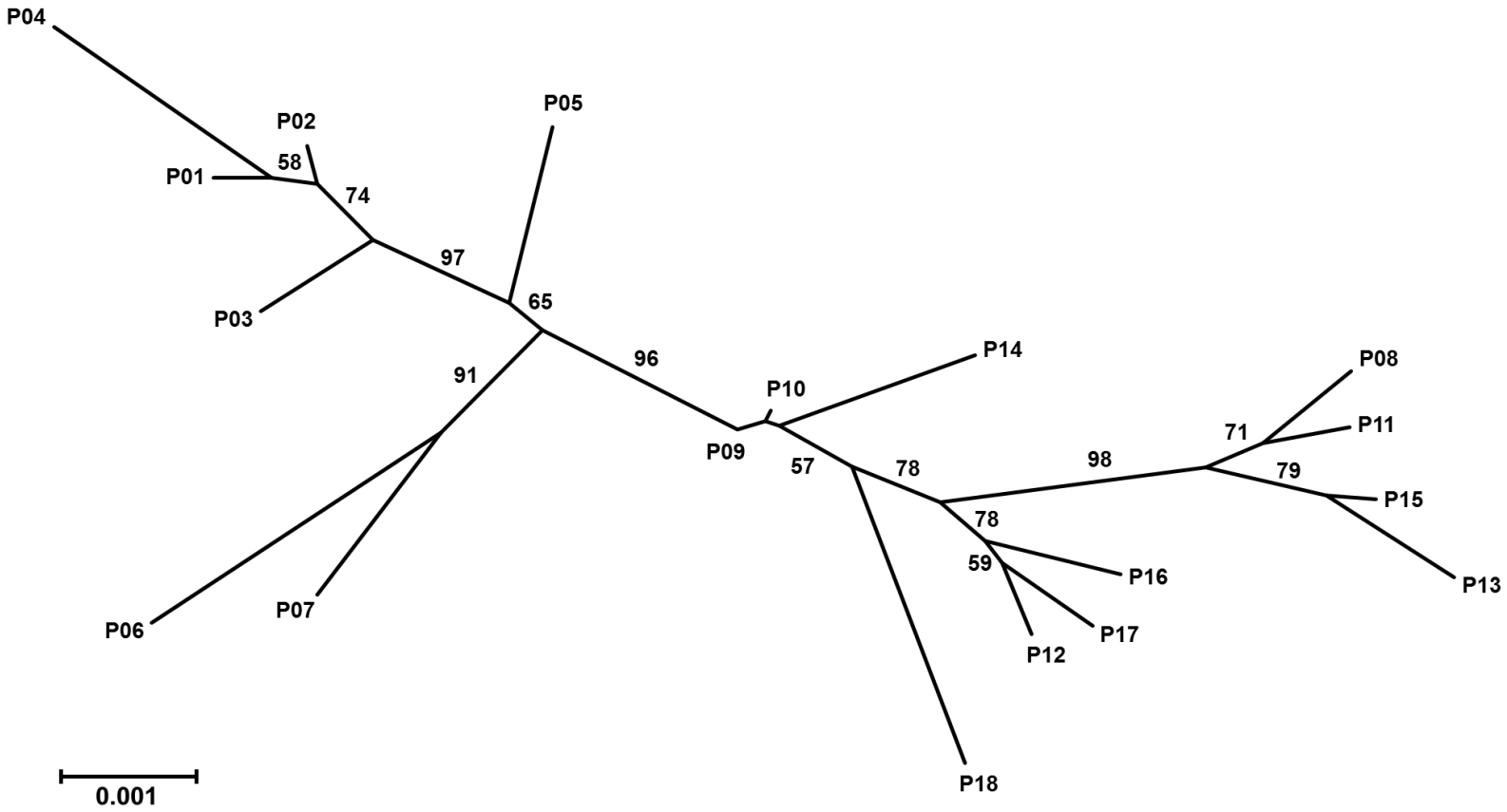
4.1.4. Genetska udaljenost između populacija

Pod pretpostavkom ravnoteže po Hardyju i Weinbergu izračunana je matrica genetske udaljenosti po Neiju između 18 populacija smilja (Prilog 3).

Prosječna genetska udaljenost svake pojedinačne populacije od svih ostalih populacija iznosila je D_{NEI} = 0,0062. Najmanja udaljenost između parova populacija izračunana je između populacija P09 Kistanje i P10 Unešić (D_{NEI} = 0,0003), dok je najveća udaljenost na matrici izračunana između populacija P04 Rab i P13 Hvar (D_{NEI} = 0,0128).

4.1.4.1. Izrada stabla

Srodstveno stablo je izrađeno metodom po Fitchu i Margoliashu (Fitch i Margoliash, 1967) (Grafikon 1) na temelju matrice genetskih udaljenosti po Neiju između 18 populacija sredozemnog smilja. Pouzdanost skupina na stablu procijenjena je metodom *bootstrap* uz upotrebu 1000 pseudoponavljanja. Vrijednosti *bootstrap* veće od 50 % označene su na granama. Na dobivenom stablu uočljivo je odvajanje 18 populacija smilja na dvije skupine, što je podržano s 96 % *bootstrap* vrijednošću. Prva skupina uključuje sjevernojadranske populacije P01 Krk, P02 Cres, P03 Lošinj, P04 Rab, P05 Pag (Zrće), P06 Pag (Miškovići) i P07 Obrovac. Unutar te skupine prisutno je još odvajanja na podskupine (s 91 % vrijednosti *bootstrap* odvojile su se populacije P06 Pag (Miškovići) i P07 Obrovac te sa 65 % vrijednosti *bootstrap* populacija P05 Pag (Zrće) među kojima je važno istaknuti izdvajanje s 97 % *bootstrap* vrijednosti populacije: P01 Krk, P02 Cres, P0 Lošinj i P04 Rab, koje predstavljaju sjevernojadranske otočne populacije i zemljopisno su međusobno najbliže. Drugu skupinu čine populacije srednjeg i južnog Jadrana: P08 Benkovac, P09 Kistanje, P10 Unešić, P11 Seget, P12 Brač, P13 Hvar, P14 Sinj, P15 Omiš, P16 Živogošće, P17 Slano i P18 Cavtat. Unutar navedene skupine populacije su se odvojile u više manjih podskupina. S najvećom *bootstrap* vrijednosti (98 %) izdvojile su se populacije P08 Benkovac, P11 Seget, P15 Omiš i P13 Hvar koje predstavljaju populacije srednjeg Jadrana.



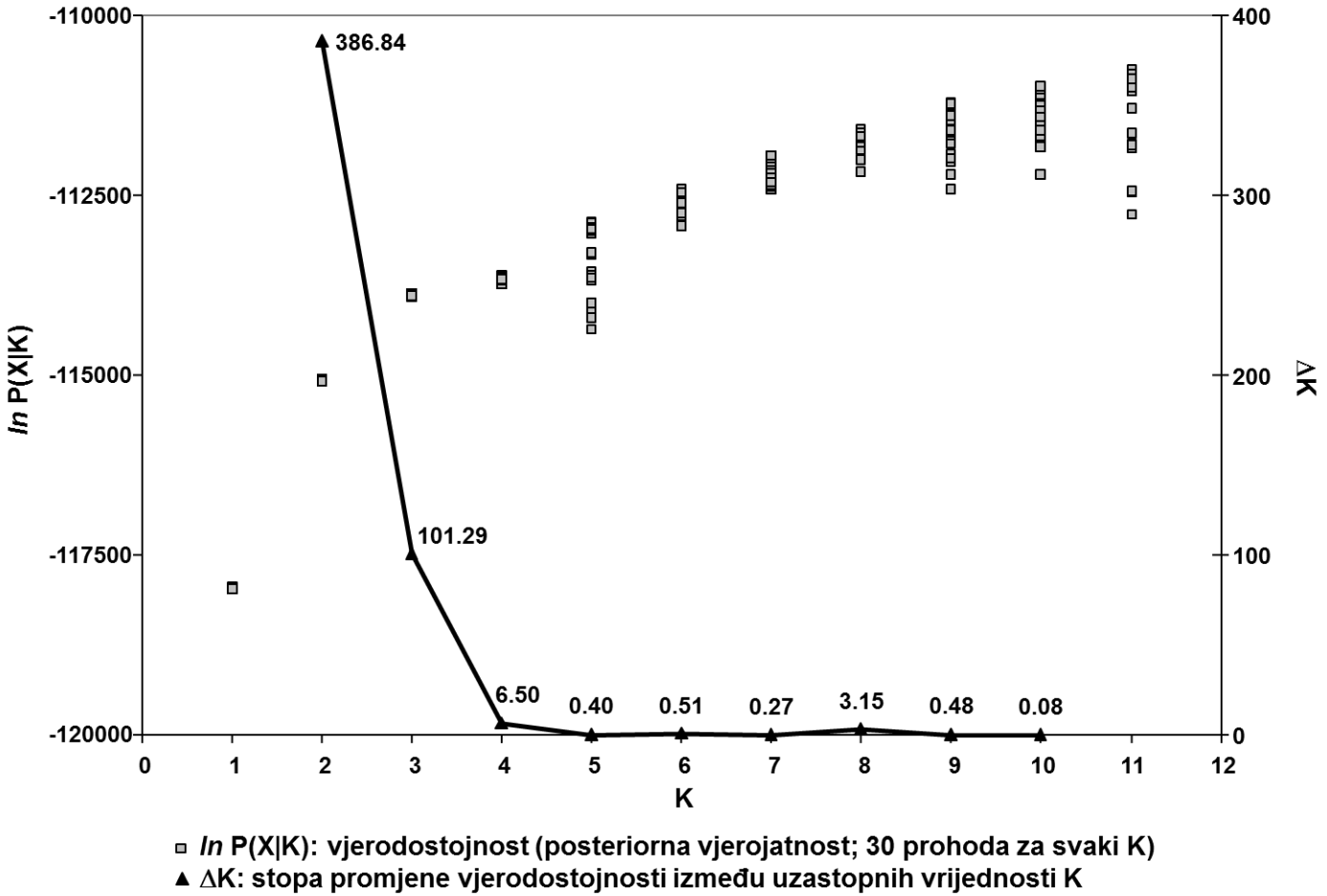
Grafikon 1. Stablo Fitch-Margoliash na temelju matrice genetskih udaljenosti po Neiju između 18 populacija smilja. Vrijednosti *bootstrap* veće od 50 % dobivene na temelju 1000 pseudoponavljanja označene su na granama

4.1.5. Bayesovska analiza populacijske strukture

Bayesovskom analizom populacijske strukture 18 populacija smilja, pomoću programa STRUCTURE i BAPS, utvrđen je optimalan broj skupina (*K*) radi razvrstavanja jedinki u genetski diferencirane skupine.

Računalnim programom STRUCTURE pretpostavljeno je postojanje od jedne do 11 skupina (*K* = 1-11) (hipoteza), gdje je za svaku od hipoteza provedeno 30 neovisnih prohoda, a svaki prohod se sastojao od 200.000 ponavljanja tijekom razdoblja zagrijavanja lanaca. U Grafikonu 2. prikazana je vjerodostojnost hipoteza [*ln* P(X|K)] i stopa promjene vjerodostojnosti između uzastopnih vrijednosti *K* (ΔK) za različit broj izvornih populacija (*K*=1 do 11). Najviša vrijednost za Δ*K* utvrđena je kod *K* = 2, a iznosila je 386,84, stoga se hipoteza o postojanju dvije skupine pokazala optimalnom. Sljedeća najviša vrijednost Δ*K* od 101,29 utvrđena je kod *K* = 3. Kod pretpostavke da postoje više od tri izvorne skupine, prosječne vrijednosti [*ln P*(X|K)] su se smanjivale, dok su se standardne devijacije povećavale, a ΔK vrijednosti su se značajno smanjivale (Grafikon 2).

Analiza pomoću programa BAPS pokazala je da je broj od dvije skupine optimalan. Kod analize skupina bez upotrebe zemljopisne pozicije mjesta prikupljanja kao informativne apriorne raspodjele (*informative prior*), logaritam marginalne vjerodostojnosti optimalne particije iznosio je -89.691,83, a Kullback-Leiblerova udaljenost između utvrđenih izvornih skupina iznosila je 0,052. Kod prostorne analize skupina uz upotrebu zemljopisne pozicije mjesta prikupljanja kao informativnog apriora, Kullback-Leiblerova udaljenost između utvrđenih izvornih skupina bila je jednaka, dok je logaritam marginalne vjerodostojnosti optimalne particije iznosio -90.102,87.



Grafikon 2. Vjerodostojnost hipoteza [*ln* P(X|K)] i stopa promjene vjerodostojnosti između uzastopnih vrijednosti *K* (Δ*K*) za različit broj izvornih populacija (*K* = 1 do 11) u Bayesovskoj analizi skupina na temelju modela provedenog u računalnom programu STRUCTURE

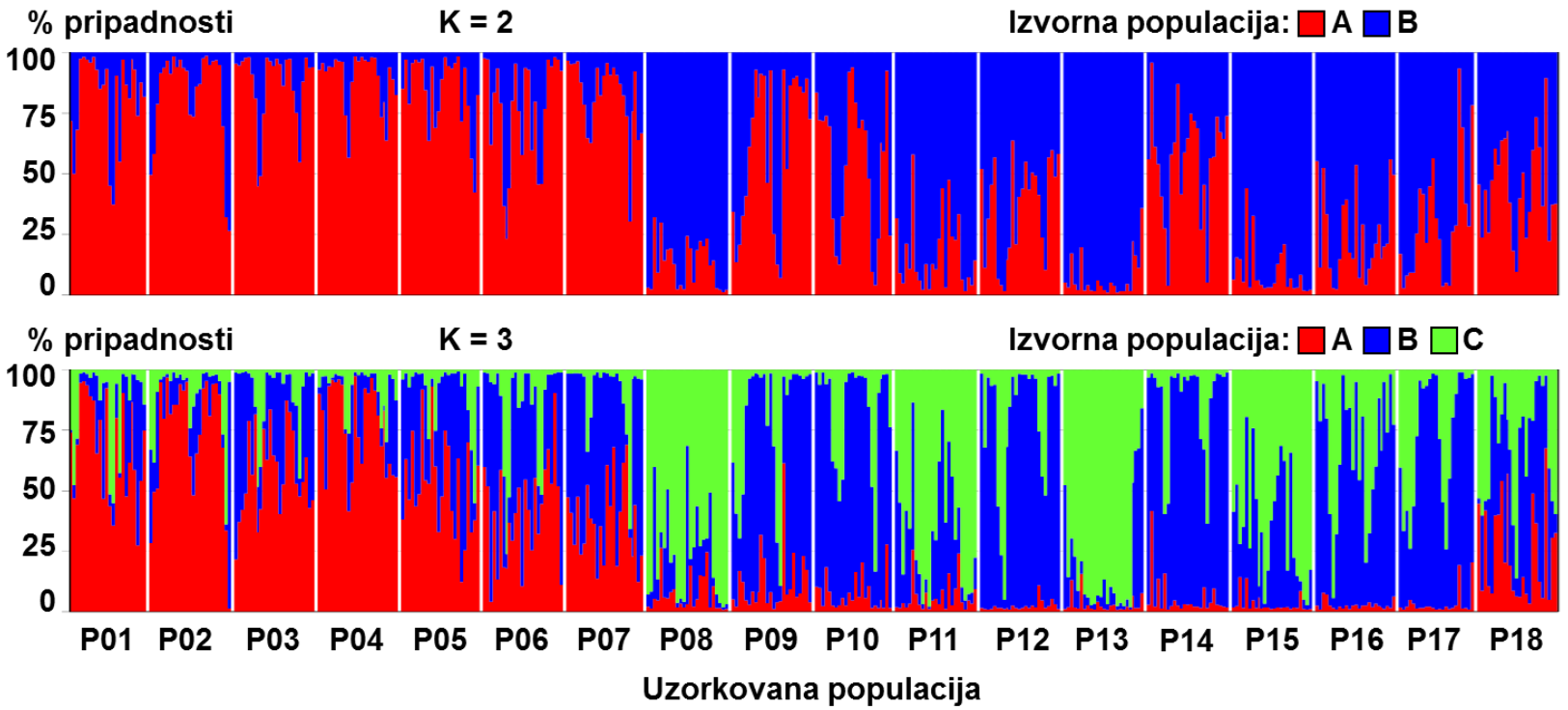
Na Grafikonu 3. prikazana je struktura izvornih populacija (*ancestral population*) na temelju Bayesovske analize pomoću programa STRUCTURE.

Nakon što je programom STRUCTURE određen optimalan broj izvornih skupina (*K* = 2 i *K* = 3) jedinke su pridružene pojedinim skupinama uz izračun udjela genoma (*Q*) koji potječe iz određene skupine. Populacije kod kojih je prosječan postotak pripadnosti određenoj genetskoj skupini skupu bio veći od 75 % pridružene su tom istom skupu. Rezultati su pokazali da kod *K* = 2, izvornoj populaciji A pripadaju populacije sjevernog Jadrana: P01 Krk, P02 Cres, P03 Lošinj, P04 Rab, P05 (Zrće) Pag, P06 (Miškovići) Pag i P07 Obrovac. Izvornoj populaciji B pridružene su populacije: P08 Benkovac, P11 Seget, P13 Hvar i P15 Omiš. Populacije koje su nastale miješanjem dvaju genetskih skupina te imaju prosječni postotak pripadnosti manji od 75 % genskom skupu A ili genskom skupu B, nazvane su „hibridne“. Hibridne populacije kod kojih prevladava genski skup A bile su: P09 Kistanje, P10 Unešić, i P14 Sinj, dok su hibridne populacije s većim udjelom genskog skupa B bile: P12 Brač, P16 Živogošće, P17 Slano i P18 Cavtat.

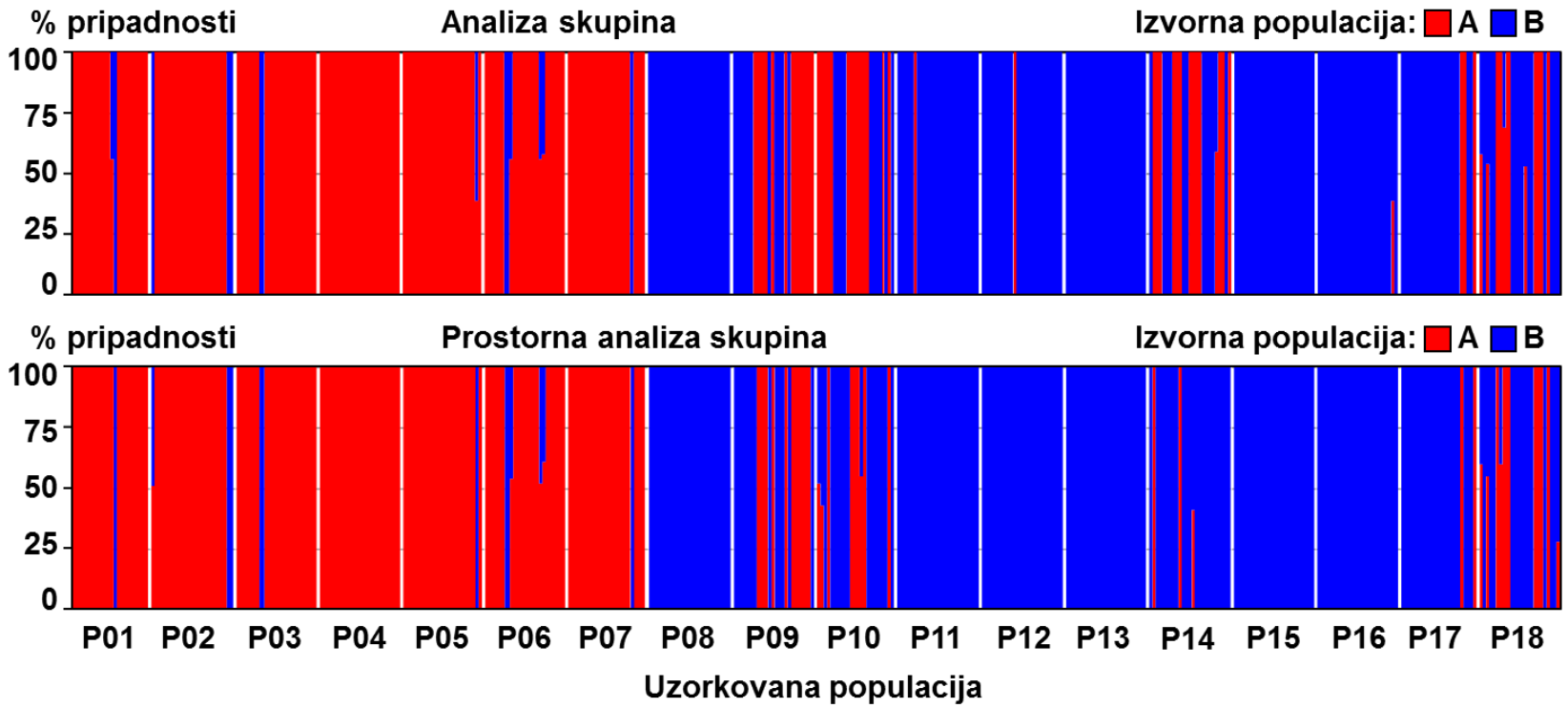
Kod *K* = 3 izvornoj populaciji A (*Q* > 75 %) pridružena je populacija P04 Rab, a izvornoj populaciji B populacije: P10 Unešić, P12 Brač i P14 Sinj, dok su izvornoj populaciji C pridružene populacije P08 Benkovac i P13 Hvar. Hibridne populacije, kod kojih prevladava genski skup A bile su: P01 Krk, P02 Cres, P03 Lošinj i P05 (Zrće) Pag. Hibridne populacije koje pripadaju genskom skupu B bile su: P07 Obrovac, P09 Kistanje, P16 Živogošće i P17 Slano, a one koje pripadaju genskom skupu C bile su: P11 Seget i P15 Omiš (Grafikon 3).

Rezultati dobiveni programom BAPS kod analize skupina (bez upotrebe zemljopisne pozicije mjesta prikupljanja kao informativnog priora) (Grafikon 4.) prikazuju sjevernojadranske populacije koje su pripale izvornoj populaciji A (> 75 %): P01 Krk, P02 Cres, P03 Lošinj, P04 Rab, P05 (Zrće) Pag, P06 (Miškovići) Pag i P07 Obrovac te srednjojadranske i južnojadranske populacije koje su pripale izvornoj populaciji B: P08 Benkovac, P11 Seget, P12 Brač, P13 Hvar, P15 Omiš, P16 Živogošće i P17 Slano. Ovakva podjela u skladu je s podjelom pomoću programa STRUCTURE za K = 2.

Hibridne populacije koje su pripale izvornoj populaciji A su: Kistanje, Unešić i Sinj, a izvornoj populaciji B pripala je hibridna populacija Cavtat. U analizi skupina uz upotrebu zemljopisne pozicije mjesta prikupljanja kao informativnog priora dobiveni su gotovo jednaki rezultati, uz nekoliko iznimki, odnosno populacije Kistanje i Unešić svrstane su kao hibridne u izvornu populaciju B, a populacija Sinj pripala je izvornoj populaciji B s *Q* > 75 %.



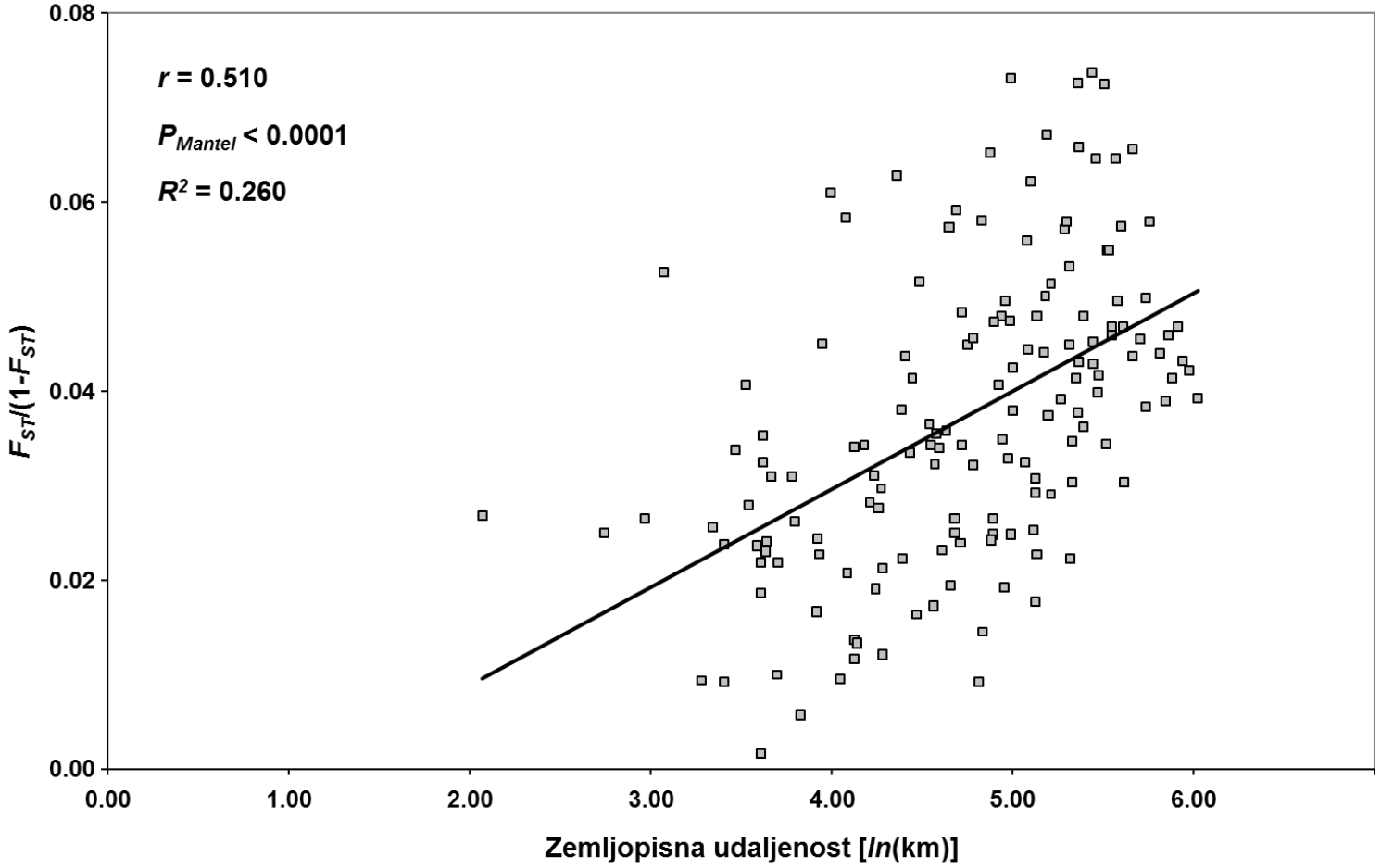
Grafikon 3. Struktura izvornih populacija u Bayesovskoj analizi skupina na temelju modela provedenog u računalnom programu STRUCTURE: svaka je jedinka predstavljena stupcem, a boja odgovara postotku pripadnosti jedinke određenoj izvornoj populaciji pri $K = 2$ i $K = 3$



Grafikon 4. Struktura izvornih populacija u Bayesovskoj analizi skupina na temelju modela provedenog u računalnom programu BAPS: svaka je jedinka predstavljena stupcem, a boja odgovara postotku pripadnosti jedinke određenoj izvornoj populaciji prilikom (1) analize skupina (bez upotrebe zemljopisne pozicije mjesta prikupljanja kao informativnog priora) i (2) prostorne analize skupina

4.1.6. Prostorna genetika

Rezultati analize izolacije zbog udaljenosti (*IBD*) prikazani su na Grafikonu 5. Korelacija između matrice $F_{ST}/(1-F_{ST})$ vrijednosti i matrice prirodnih logaritama zemljopisnih udaljenosti (u km) između analiziranih populacija iznosila je $r = 0,510$ i bila je visokosignifikantna ($P_{Mantel} < 0,0001$) nakon 10.000 permutacija Mantelovog testa. Koeficijent determinacije iznosio je $R^2 = 0,260$, stoga se 26 % genetske diferencijacije između analiziranih populacija može objasniti njihovom prostornom udaljenošću.



Grafikon 5. Analiza izolacije uslijed udaljenosti: regresija genetske udaljenosti [$F_{ST}/(1-F_{ST})$] na zemljopisnu udaljenost [*ln*(km)] između 18 populacija smilja

4.1.7. Lokalna adaptacija

Utvrđena je visoka korelacija između 19 bioklimatskih svojstava korištenih u istraživanju. Od 171 ispitivanog para, jaka pozitivna korelacija ($r > 0,70$) pronađena je u 26 slučajeva, dok je u pet slučajeva utvrđena snažna negativna korelacija ($r < -0,70$). Analiza glavnih sastavnica (PCA) na temelju matrice korelacija, pokazala je da su prve četiri glavne sastavnice imale svojstvene vrijednosti (*eigenvalues*) veće od 1 i zajedno su objasnile 93,82 % varijance (Tablica 6). Prva glavna sastavnica objasnila je 39,36 % ukupne varijance. Jaka pozitivna korelacija s prvom glavnom sastavnicom (PC1) utvrđena je kod pet bioklimatskih svojstava (Bio01 Prosječna godišnja temperatura, Bio06 Minimalna temperatura najhladnijeg mjeseca, Bio09 Prosječna temperatura najsušeg kvartala, Bio10 Prosječna temperatura najtoplijeg kvartala, Bio11 Prosječna temperatura najhladnijeg kvartala). Druga glavna sastavnica objasnila je 24,48 % ukupne varijance i bila je jako pozitivno korelirana s četiri bioklimatska svojstva (Bio12 Godišnja količina oborina, Bio13 Količina oborina u najvlažnijem mjesecu, Bio16 Količina oborina u najvlažnijem kvartalu i Bio19 Količina oborina u najhladnijem kvartalu).

Izrađen je biplot u kojem su u koordinatnom sustavu točkama prikazani položaji analiziranih populacija, a vektorima pojedina bioklimatska svojstva (Grafikon 6). Prva glavna sastavnica odvojila je južnojadranske populacije (P16 Živogošće, P15 Omiš, P13 Hvar i P12 Brač) kod kojih su zabilježene više temperature i manje količine oborina, od sjevernojadranskih populacija (P01 Krk, P02 Cres, P03 Lošinj, P04 Rab, P05 Zrće, Pag i P06 Miškovići, Pag) i srednjojadranskih populacija (P14 Sinj, P11 Seget, P10 Unešić, P09 Kistanje, P08 Benkovac i P07 Obrovac) kod kojih su zabilježene niže temperature i veće količine oborina.

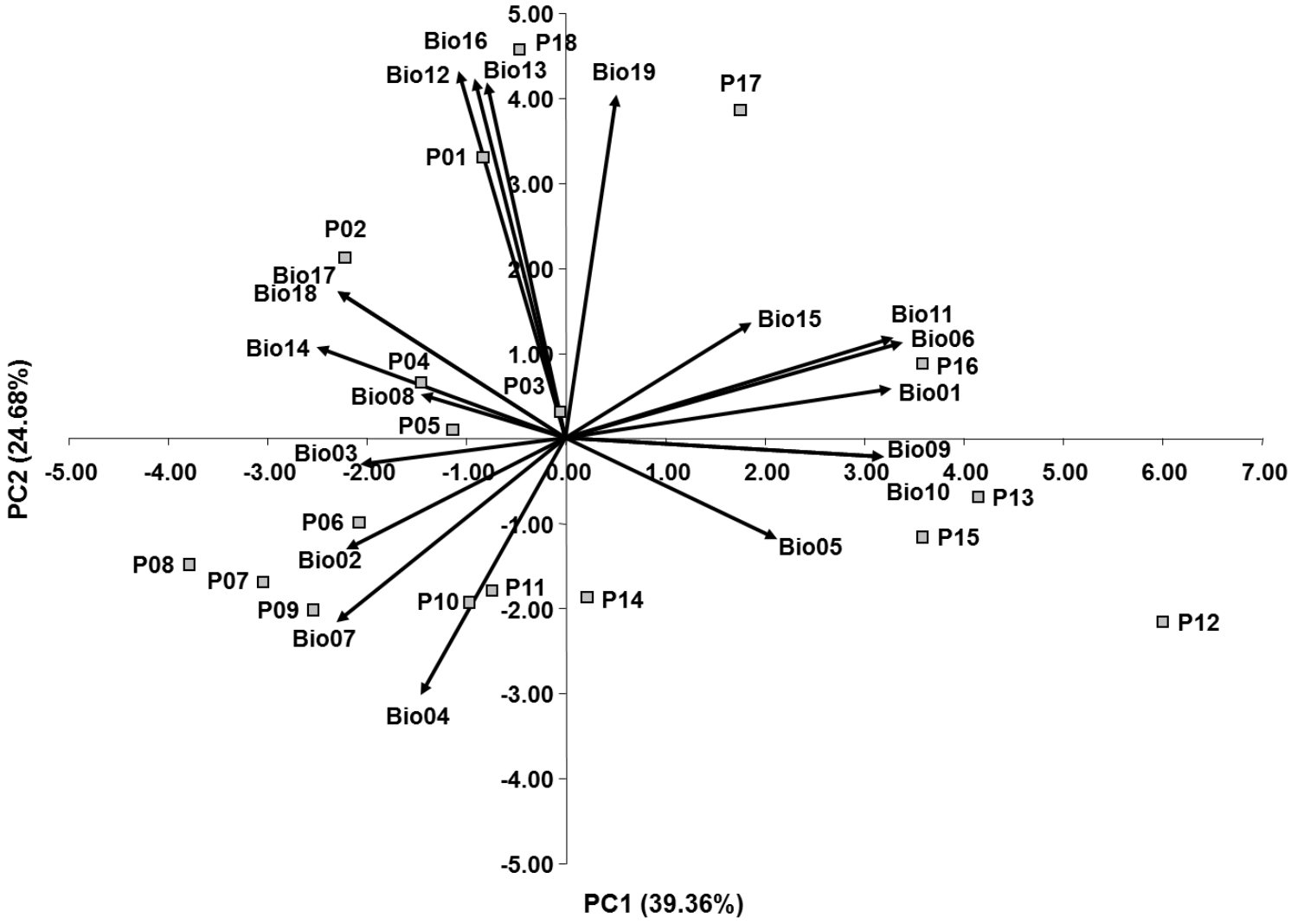
Druga glavna sastavnica razdvojila je populacije Hrvatskog primorja kod kojih je zabilježena veća količina oborina i niže temperature od populacija srednje Dalmacije gdje su zabilježene više temperature i manje količine oborina (iznimke su južne populacije P17 Slano i P18 Cavtat za koje je specifično da imaju veće količine oborina).

Tablica 6. Korelacije između 19 bioklimatskih svojstava i prve četiri glavne sastavnice

		PC1		PC2		PC3		PC4	
Br.	Bioklimatsko svojstvo	r	P	r	P	r	P	r	P
Bio01	Prosječna godišnja temperatura	0,897	***	0,127	ns	0,268	ns	0,322	ns
Bio02	Prosječni dnevni temperaturni opseg	-0,604	**	-0,283	ns	-0,361	ns	0,624	**
Bio03	Izotermnost	-0,566	*	-0,065	ns	-0,380	ns	0,599	**
Bio04	Sezonske promjene temperature	-0,400	ns	-0,654	**	-0,028	ns	0,180	ns
Bio05	Maksimalna temperatura najtoplijeg mjeseca	0,581	*	-0,258	ns	0,072	ns	0,764	***
Bio06	Minimalna temperatura najhladnijeg mjeseca	0,928	***	0,246	ns	0,273	ns	0,011	ns
Bio07	Godišnji temperaturni opseg	-0,629	**	-0,470	*	-0,258	ns	0,550	*
Bio08	Prosječna temperatura najvlažnijeg kvartala	-0,401	ns	0,113	ns	0,687	**	0,034	ns
Bio09	Prosječna temperatura najsušeg kvartala	0,875	***	-0,048	ns	0,292	ns	0,365	ns
Bio10	Prosječna temperatura najtoplijeg kvartala	0,875	***	-0,048	ns	0,292	ns	0,365	ns
Bio11	Prosječna temperatura najhladnijeg kvartala	0,900	***	0,255	ns	0,237	ns	0,211	ns
Bio12	Godišnja količina oborina	-0,295	ns	0,936	***	-0,017	ns	0,173	ns
Bio13	Količina oborina u najvlažnijem mjesecu	-0,217	ns	0,907	***	-0,306	ns	0,151	ns
Bio14	Količina oborina u najsušem mjesecu	-0,684	**	0,233	ns	0,657	**	0,142	ns
Bio15	Koeficijent varijacije oborina	0,511	*	0,295	ns	-0,789	***	0,036	ns
Bio16	Količina oborina u najvlažnijem kvartalu	-0,250	ns	0,918	***	-0,216	ns	0,200	ns
Bio17	Količina oborina u najsušem kvartalu	-0,627	**	0,376	ns	0,643	**	0,177	ns
Bio18	Količina oborina u najtoplijem kvartalu	-0,627	**	0,376	ns	0,643	**	0,177	ns
Bio19	Količina oborina u najhladnijem kvartalu	0,141	ns	0,876	***	-0,423	ns	0,074	ns
Svojstvena vrijednost		7,48		4,69		3,39		2,27	
% ukupne varijance		39,36		24,68		17,85		11,93	
Kumulativni % varijance		39,36		64,04		81,89		93,82	

Korelacijski koeficijent: $r > 0,70$ jaka pozitivna korelacija, $r < -0,70$ jaka negativna korelacija

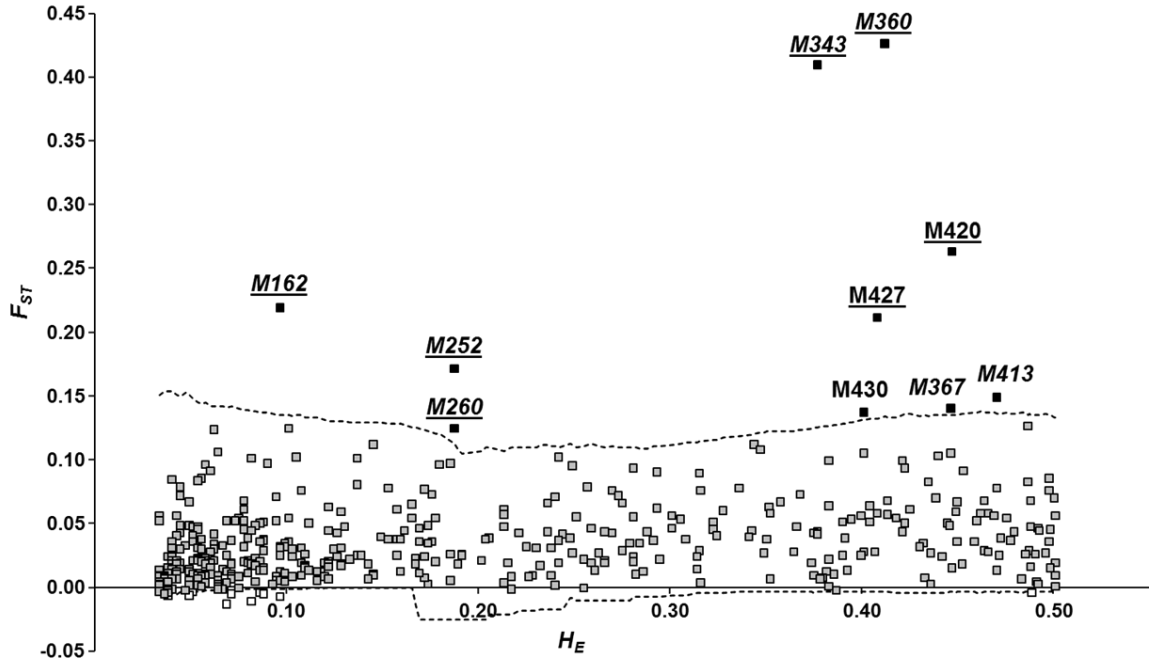
*** $P(r) < 0,001$, ** $0,001 < P(r) < 0,01$, * $0,01 < P(r) < 0,05$, ns $P(r) > 0,05$



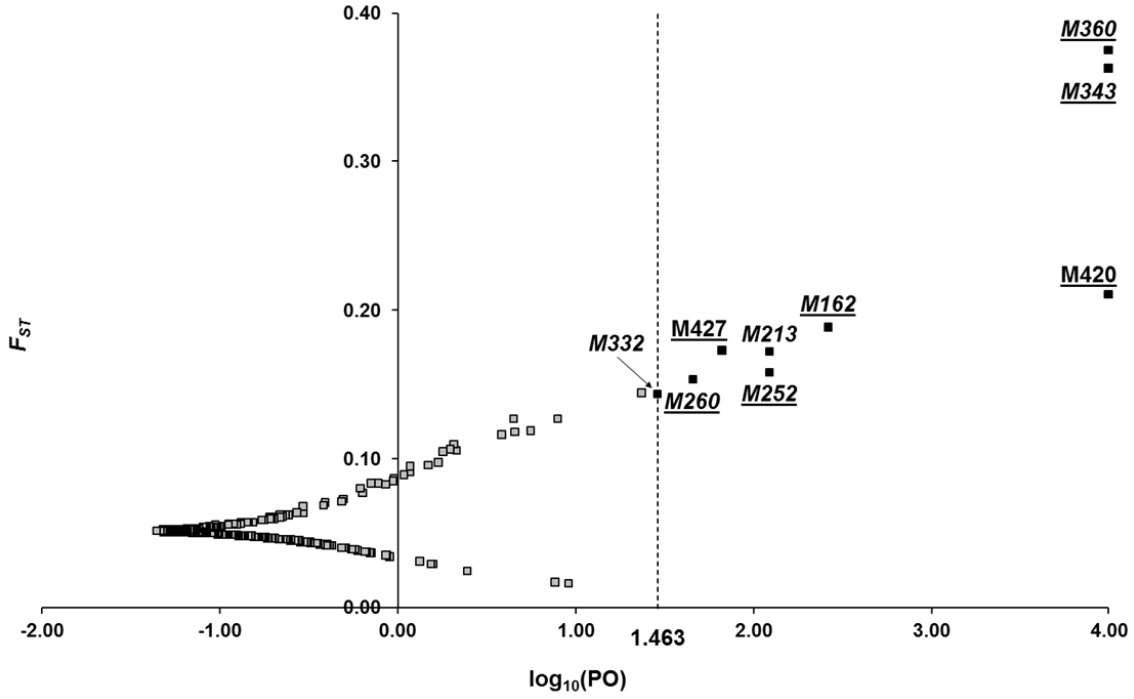
Grafikon 6. Biplot dobiven analizom glavnih sastavnica na temelju 19 bioklimatskih svojstava za 18 lokacija prikupljanja smilja

Ukupno 446 AFLP biljega korišteno je za identifikaciju atipičnih lokusa (nakon izdvajanja biljega s učestalošću ispod 3 % ili iznad 97 %). S razinom pouzdanosti od 99 % pomoću programa Mcheza otkriven je ukupno 21 atipičan lokus (4,71 %) pod mogućim odabirom, među kojima je njih deset (2,24 %) pod pozitivnim odabirom (usmjerenim odabirom), a 11 (2,47 %) pod ravnotežnim odabirom (Grafikon 7). Pomoću programa BayeScan identificirano je devet (2,02 %) lokusa pod pozitivnim odabirom koji su prelazili prag kritične vrijednosti $\log_{10}$(PO) korišten za utvrđivanje signifikantnosti lokusa koji pokazuju atipične vrijednosti na razini stope vjerojatnosti lažno pozitivnih slučajeva od 0,01 [FDR<0,01; PO=29,03; $\log_{10}$(PO)=1,463]. Pod ravnotežnim odabirom nije bio ni jedan lokus (Grafikon 8). Mcheza i BayeScan zajedno su detektirali skup od sedam (1,57 %) (pretpostavljenih) biljega pod pozitivnim odabirom.

Izračunom logističkih regresija između svih mogućih parova biljega i bioklimatskih svojstava (8.474 modela) programom Samβada otkrivena su 184 (2,17 %) signifikantna modela koji uključuju 50 (11,21) biljega povezanih s jednim do 13 bioklimatskih svojstava. Pomoću programa Mcheza i/ili BayeScan identificirano je 12 lokusa, a programom Samβada 41. Bioklimatska svojstva povezana s više od 20 biljega bila su: Bio8 prosječna temperatura najvlažnijeg kvartala, Bio14 količina oborina u najsušem mjesecu, Bio15 koeficijent varijacije oborina, Bio17 količina oborina u najsušem kvartalu i Bio18 količina oborina u najtoplijem kvartalu (Tablica 7). Od 50 biljega otkrivenih Samβadom, za njih pet je utvrđeno da su pod pozitivnim odabirom i pomoću programa Mcheza i BayeScan. Dakle, od ukupno 446 biljega, pet biljega (1,121 %) je identificirano pomoću sve tri metode, kao što je prikazano u Wennovom dijagramu (Grafikon 9). Svih 19 bioklimatskih varijabli bilo je povezano s najmanje jednim atipičnim biljegom.



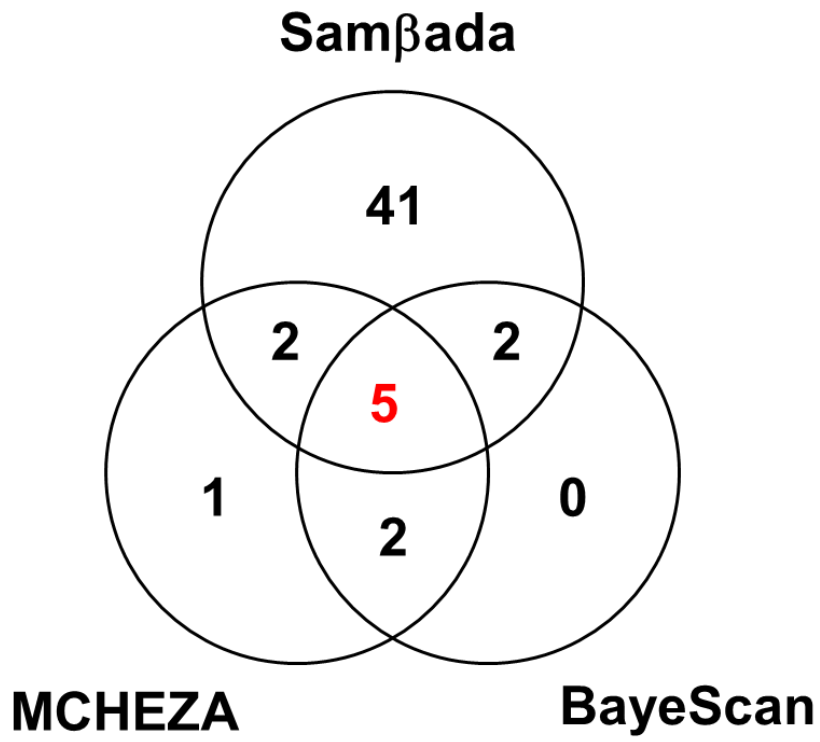
Grafikon 7. Utvrđivanje biljega AFLP koji pokazuju atipične vrijednosti parametra genetske diferencijacije (F_{ST}) na temelju frekventističke metode provedene pomoću programa Mcheza. Grafikon prikazuje odnos vrijednosti očekivane heterozigotnosti (H_E) i genetske diferencijacije (F_{ST}) pojedinačnih biljega AFLP, pri čemu isprekidana linija predstavlja interval povjerenja (99 %). Lokusi pod pozitivnim odabirom su prikazani kao crni kvadrati, oni pod ravnotežnim odabirom kao bijeli, dok su neutralni lokusi prikazani sivim kvadratima. Nazivi lokusa pod pozitivnim odabirom su podcrtani ako je njihova atipična vrijednost potvrđena i u Bayesovskoj analizi provedenoj pomoću programa BayeScan, a ako je njihova povezanost s okolišnim svojstvima utvrđena pomoću programa Samβada prikazani su u kurzivu.



Grafikon 8. Utvrđivanje biljega AFLP koji pokazuju atipične vrijednosti parametra genetske diferencijacije (F_{ST}) na temelju Bayesovske metode provedene pomoću programa BayeScan. Grafikon prikazuje odnos vrijednosti dekadskog logaritma aposteriornih omjera vjerojatnosti modela [$\log_{10}$(PO)] pretpostavljajući adaptivnost i neutralnost pojedinog lokusa, te vrijednosti parametra genetske diferencijacije (F_{ST}). Okomita isprekidana linija predstavlja kritičnu vrijednost $\log_{10}$(PO) korištenu za utvrđivanje signifikantnosti lokusa koji pokazuju atipične vrijednosti na razini stope vjerojatnosti lažno pozitivnih slučajeva od 0,01 [FDR < 0,01; PO = 29,03; $\log_{10}$(PO) = 1,463]. Lokusi pod pozitivnim odabirom su prikazani kao crni kvadrati, dok su neutralni lokusi prikazani sivim kvadratima. Nazivi lokusa pod pozitivnim odabirom su podcrtani ako je njihova atipična vrijednost potvrđena i u frekventističkoj analizi provedenoj pomoću programa Mcheza, a ako je njihova povezanost s okolišnim svojstvima utvrđena pomoću programa Samβada prikazani su u kurzivu.

Tablica 7. Broj biljega AFLP koji pokazuju signifikantnu povezanost s okolišnim svojstvima utvrđenu pomoću programa Samβada, te broj biljega za koje je na temelju frekventističke (Mcheza) i Bayesovske metode (BayeScan) utvrđeno da pokazuju atipične vrijednosti parametra genetske diferencijacije (F_{ST})

Br.	Bioklimatsko svojstvo	Samβada	MCHEZA/BayeScan
Bio01	Prosječna godišnja temperatura	3	2
Bio02	Prosječni dnevni temperaturni opseg	3	2
Bio03	Izotermnost	3	3
Bio04	Sezonske promjene temperature	5	2
Bio05	Maksimalna temperatura najtoplijeg mjeseca	1	1
Bio06	Minimalna temperatura najhladnijeg mjeseca	4	1
Bio07	Godišnji temperaturni opseg	1	0
Bio08	Prosječna temperatura najvlažnijeg kvartala	22	7
Bio09	Prosječna temperatura najsušeg kvartala	4	3
Bio10	Prosječna temperatura najtoplijeg kvartala	4	3
Bio11	Prosječna temperatura najhladnijeg kvartala	5	2
Bio12	Godišnja količina oborina	9	5
Bio13	Količina oborina u najvlažnijem mjesecu	8	3
Bio14	Količina oborina u najsušem mjesecu	25	7
Bio15	Koeficijent varijacije oborina	21	5
Bio16	Količina oborina u najvlažnijem kvartalu	8	4
Bio17	Količina oborina u najsušem kvartalu	27	7
Bio18	Količina oborina u najtoplijem kvartalu	27	7
Bio19	Količina oborina u najhladnijem kvartalu	4	0

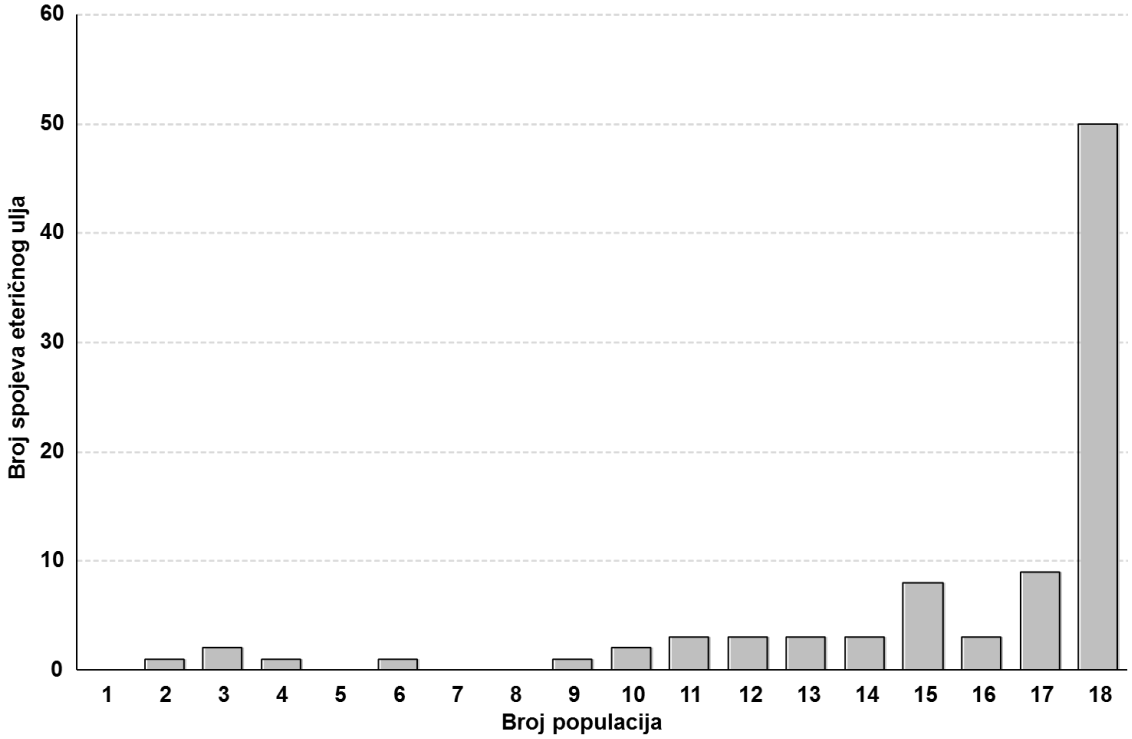


Grafikon 9. Vennov dijagram prikazuje broj biljega AFLP koji pokazuju atipične vrijednosti parametara genetske diferencijacije (F_{ST}) na temelju frekventističke (Mcheza) i Bayesovske metode (BayeScan), te ujedno ukazuje na signifikantnu povezanost s okolišnim svojstvima utvrđenu pomoću programa Samβada

4.2. Biokemijska raznolikost

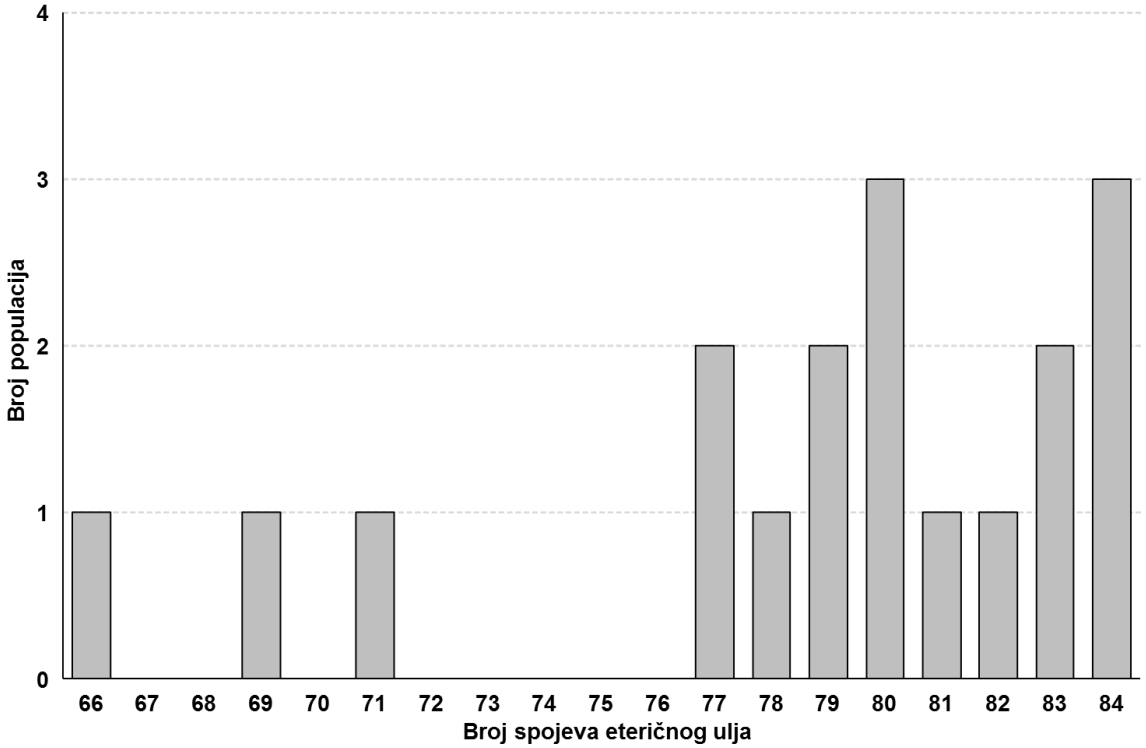
4.2.1. Deskriptivna statistika i korelacije

Analizom eteričnih ulja 18 populacija smilja utvrđeno je ukupno 90 spojeva od kojih je 84 identificirano. Od 90 utvrđenih spojeva, 50 je izolirano u svih 18 populacija smilja (Grafikon 10).



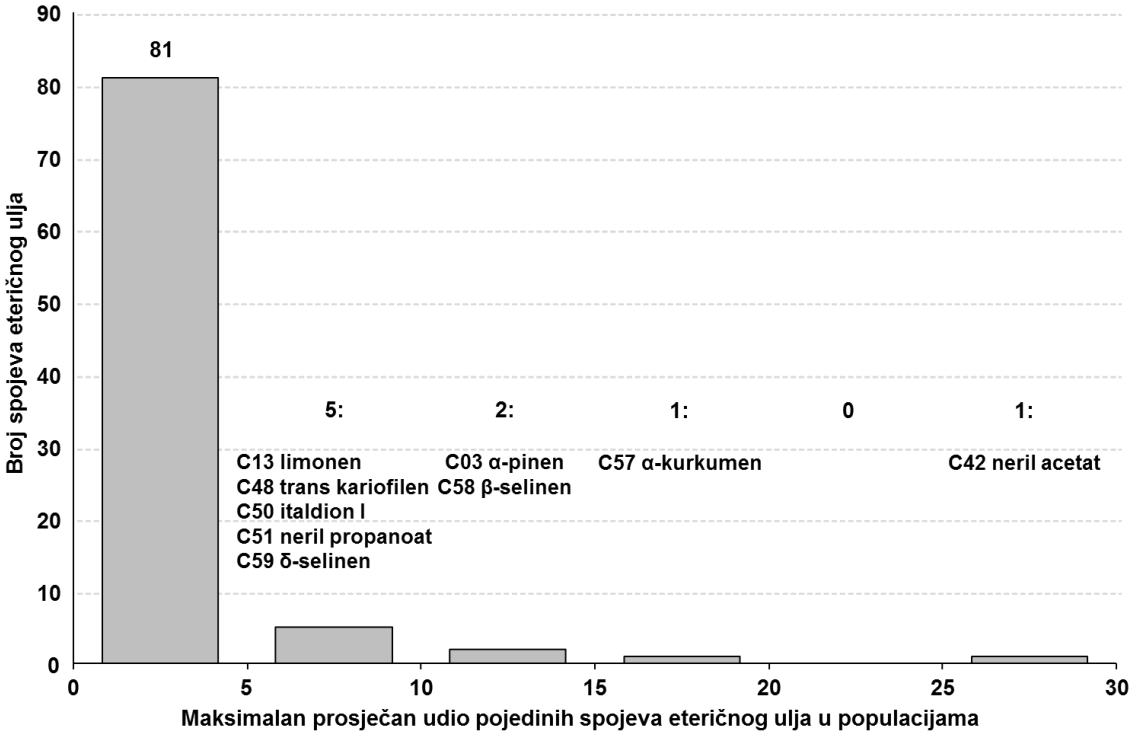
Grafikon 10. Broj spojeva eteričnog ulja u odnosu na broj populacija sredozemnog smilja u kojima je određeni spoj izoliran

Broj spojeva eteričnog ulja izoliranih iz pojedinih populacija smilja u prosjeku je iznosio 78,72, a kretao se od 66 (P12 Brač) do 84 (P10 Unešić). Po tri populacije imale su 80 izoliranih spojeva eteričnog ulja odnosno 84 spoja. Po dvije populacije imale su 77, 79 i 83 izolirana spoja, a po jedna populacija imale su 66, 69, 71, 78, 81 i 82 izoliranih spojeva eteričnog ulja (Grafikon 11).



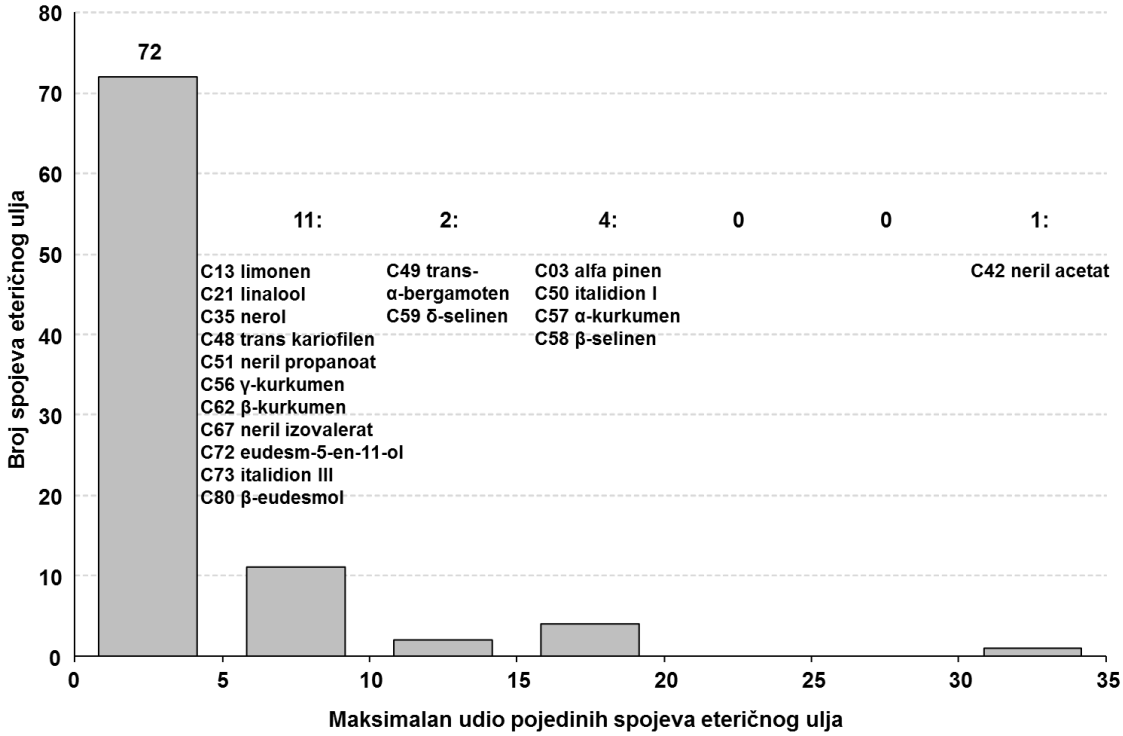
Grafikon 11. Broj populacija smilja u odnosu na broj spojeva eteričnog ulja koji su izolirani

Broj spojeva eteričnog ulja u odnosu na maksimalan prosječan udio pojedinog spoja u 18 populacija smilja prikazan je na Grafikonu 12. Izračunan je prosjek od četiri izmjera i to dvije lokacije x dva ponavljanja. U barem jednoj populaciji je maksimalan prosječan udio devet spojeva eteričnog ulja bio veći od 5 % (prosječno). Osamdeset jedan spoj bio je prisutan u koncentraciji manjoj od 5 %. Pet spojeva (limonen, trans kariofilen, italidion I, neril propanoat i δ-selinen) bilo je prisutno u koncentraciji između 5 i 10 %, dva spoja (α-pinen i β-selinen) između 10 i 15 %, a jedan (α-kurkumen) između 15 i 20 % i jedan (neril acetat) između 25 i 30 %.

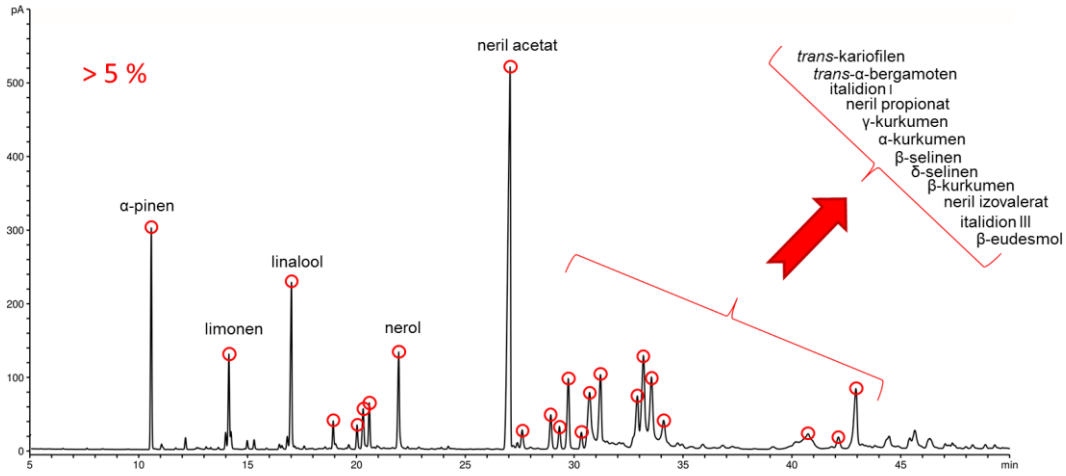


Grafikon 12. Broj spojeva eteričnog ulja u odnosu na maksimalan prosječan udio pojedinog spoja u 18 populacija smilja

Na Grafikonu 13. prikazan je broj spojeva eteričnog ulja u odnosu na maksimalan udio pojedinog spoja u 18 populacija sredozemnog smilja uzorkovanih na dvije pokusne lokacije s dva ponavljanja. Maksimalan udio 18 spojeva eteričnog ulja je bio veći od 5 % u najmanje jednom uzorku iz 18 populacija. Sedamdeset dva spoja su bila prisutna u koncentraciji manjoj od 5 %. Jedanaest spojeva (limonen, linalool, nerol, trans kariofilen, neril propanoat, γ-kurkumen, β-kurkumen, neril izovalerat, eudesm-5-en-11-ol, italidion III, β-eudesmol) bilo je prisutno u koncentraciji između 5 i 10 %, dva spoja (trans-α-bergamoten i δ-selinen) između 10 i 15 %, četiri spoja (α-pinen, italidion I, α-kurkumen i β-selinen) između 15 i 20 %, a jedan spoj (neril acetat) između 30 i 35 %. Na Slici 5. prikazan je primjer kromatograma s 18 spojeva eteričnog ulja koji imaju udio veći od 5 % u najmanje jednom uzorku iz 18 populacija.



Grafikon 13. Broj spojeva eteričnog ulja u odnosu na maksimalan udio pojedinog spoja u 18 populacija sredozemnog smilja uzorkovanih na dvije pokusne lokacije s dva ponavljanja



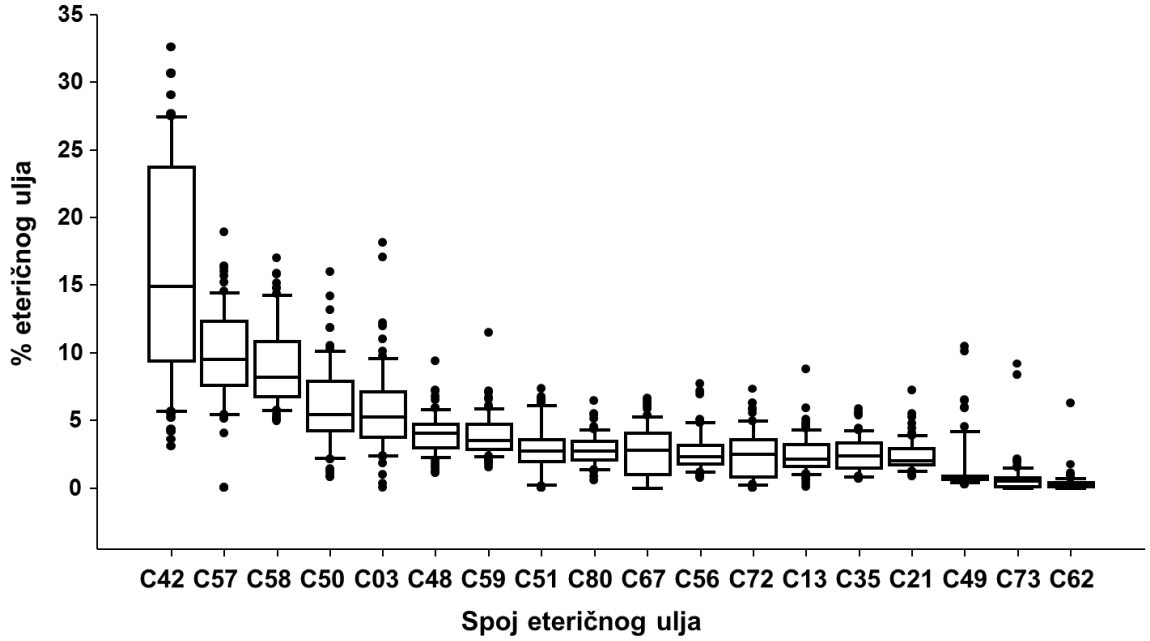
Slika 5. Kromatogram s 18 spojeva eteričnog ulja koji imaju udio veći od 5 % u najmanje jednom uzorku iz 18 populacija

Daljnje analize biokemijske raznolikosti eteričnog ulja smilja uključivale su navedenih 18 najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja (Tablica 8). Koeficijenti varijacije spojeva eteričnog ulja na temelju svih uzoraka su se kretali od 33,86 (C58 β-selinen) do 198,94 (C62 β-kurkumen) ukazujući na visoku biokemijsku raznolikost sredozemnog smilja. Najveći koeficijent varijacije zapažen je u slučaju C62 β-kurkumen (198,94; raspon 0,00 – 6,25), C73 italidion III (188,09; raspon 0,00 – 9,15) i C49 trans-α-bergamoten (147,99; raspon 0,22 – 10,43). Koeficijenti varijacije spojeva eteričnog ulja na temelju prosjeka 18 populacija su se kretali od 22,59 (C48 trans-kariofilen) do 113,45 (C62 β-kurkumen).

Na Grafikonu 14. prikazano je 18 najzastupljenijih spojeva smilja na temelju svih analiziranih uzoraka pomoću kutijastog dijagrama. Prikazan je odnos minimuma, maksimuma, donjeg i gornjeg kvartila te medijana podataka. Izgled kutijastog dijagrama ukazuje na stupanj raspršenosti i asimetričnosti, te ukazuje na stršeće vrijednosti analiziranih populacija smilja.

Tablica 8. Deskriptivna statistika 18 najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja sredozemnog smilja izračunana na temelju (A) svih uzoraka (18 populacija x 2 pokusne lokacije x 2 ponavljanja) i (B) prosjeka 18 populacija

Analiza	Parametar	C03	C13	C21	C35	C42	C48	C49	C50	C51	C56	C57	C58	C59	C62	C67	C72	C73	C80
		α-pinen	limonen	linalool	nerol	neril-acetat	trans-karioilen	trans- α-bergamoten	italidion I	neril propanoat	γ-kurkumen	α-kurkumen	β-selinen	δ- selinen	β-kurkumen	neril izovalerat	eudesm-5-en-11-ol	italidion III	β-eudesmol
A	Prosjek	5,766	2,490	2,402	2,484	16,222	3,979	1,381	6,040	2,963	2,620	9,734	9,083	3,891	0,386	2,676	2,536	0,773	2,802
	StDev	3,246	1,428	1,167	1,326	7,998	1,492	2,043	3,122	1,853	1,450	3,763	3,075	1,597	0,768	1,940	1,851	1,453	1,161
	CV	56,303	57,348	48,582	53,360	49,305	37,502	147,988	51,684	62,525	55,351	38,661	33,857	41,050	198,941	72,480	72,960	188,085	41,439
	Min	0,000	0,069	0,850	0,647	3,052	1,100	0,216	0,795	0,000	0,736	0,000	4,954	1,515	0,000	0,000	0,000	0,000	0,532
	Max	18,137	8,763	7,184	5,846	32,581	9,375	10,429	15,941	7,306	7,692	18,882	16,974	11,445	6,254	6,603	7,293	9,145	6,410
B	Prosjek	5,766	2,490	2,402	2,484	16,222	3,979	1,381	6,040	2,963	2,620	9,734	9,083	3,891	0,386	2,676	2,536	0,773	2,802
	StDev	2,066	1,044	0,878	1,132	6,930	0,899	0,884	1,882	1,508	0,745	3,204	2,788	1,108	0,438	1,253	0,939	0,764	0,682
	CV	35,827	41,906	36,556	45,566	42,718	22,590	64,018	31,166	50,883	28,425	32,914	30,695	28,483	113,445	46,840	37,025	98,886	24,348
	Min	1,880	1,288	1,369	0,787	5,376	2,188	0,535	2,769	1,206	1,672	4,847	6,053	2,488	0,000	0,485	0,967	0,203	1,609
	Max	10,553	5,498	4,221	4,188	29,213	5,436	3,106	8,985	6,216	4,222	15,764	14,747	5,644	1,961	4,758	4,431	2,918	3,967



Grafikon 14. Kutijasti dijagram (*box plot*) 18 najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja sredozemnog smilja na temelju svih analiziranih uzoraka (18 populacija x 2 pokusne lokacije x 2 ponavljanja)

U Tablici 9. prikazane su korelacije između 18 najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja. Sedam spojeva bilo je međusobno jako pozitivno korelirano ($r > 0,70$; $P < 0,001$). Jaka pozitivna korelacija zabilježena je između sljedećih spojeva: neril acetata i nerola; neril propanoata i linaloola te neril propanoata i nerola. Također jaka pozitivna korelacija zabilježena je i između spojeva: β-selinena i α-kurkumena te između δ-selinena i β-selinena. Između neril izovalerata i nerola te neril izovalerata i neril acetata također je bila jaka pozitivna korelacija. Jaka negativna korelacija ($r < -0,70$) zabilježena je između sedam spojeva eteričnog ulja. Spoj α-kurkumen bio je jako negativno koreliran s nerolom, neril acetatom i neril propanoatom. Nadalje, spoj β-selinen bio je negativno koreliran s nerolom i neril acetatom, a spoj δ-selinen s nerolom i neril acetatom.

Tablica 9. Korelacije između 18 najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja

Sastavnica	C03	C13	C21	C35	C42	C48	C49	C50	C51	C56	C57	C58	C59	C62	C67	C72	C73	C80
C03		ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C13	0,356		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C21	-0,187	-0,177		ns	ns	ns	**	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C35	-0,285	-0,157	0,444		***	ns	ns	*	***	ns	***	***	***	ns	***	ns	*	ns
C42	-0,231	-0,002	0,205	**0,866**		ns	ns	**	**	ns	***	***	***	ns	***	ns	*	ns
C48	0,502	0,080	0,381	-0,244	-0,324		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C49	0,295	0,142	-0,593	-0,377	-0,234	-0,302		ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
C50	-0,398	-0,279	-0,030	-0,469	-0,602	0,009	-0,243		ns	ns	*	**	*	ns	ns	ns	**	ns
C51	-0,303	-0,211	0,736	0,786	0,675	0,012	-0,576	-0,272		ns	***	*	ns	ns	**	ns	ns	ns
C56	0,318	-0,159	0,130	0,467	0,334	0,095	-0,321	-0,370	0,276		ns	*	**	ns	ns	ns	ns	ns
C57	0,207	-0,155	-0,429	-0,849	-0,874	0,141	0,412	0,543	-0,761	-0,357		***	ns	ns	**	ns	ns	ns
C58	0,060	0,024	-0,216	-0,845	-0,891	0,265	0,247	0,610	-0,565	-0,493	0,821		***	ns	**	ns	*	ns
C59	-0,144	0,208	-0,125	-0,767	-0,746	0,215	0,128	0,517	-0,466	-0,630	0,567	0,862		ns	*	ns	ns	ns
C62	-0,452	-0,251	-0,381	-0,355	-0,233	-0,354	0,137	0,431	-0,288	-0,423	0,252	0,219	0,434		ns	ns	ns	ns
C67	-0,416	-0,104	0,276	0,786	0,772	-0,149	-0,442	-0,266	0,669	0,137	-0,694	-0,600	-0,507	-0,241		ns	ns	ns
C72	-0,112	-0,028	-0,285	-0,147	-0,176	-0,395	0,474	-0,143	-0,394	-0,180	0,095	0,093	0,211	0,251	-0,266		ns	*
C73	0,010	0,170	-0,262	-0,540	-0,521	-0,072	-0,022	0,625	-0,438	-0,346	0,452	0,524	0,371	0,095	-0,339	0,073		ns
C80	0,188	0,398	-0,133	-0,112	-0,202	0,095	0,156	-0,117	-0,405	0,143	0,009	0,167	0,189	-0,322	-0,253	0,478	0,202	

Ispod dijagonale - Pearsonov korelacijski koeficijent (*r*)
Iznad dijagonale - oznaka signifikantnosti (P) korelacijskog koeficijenta

*** $P < 0,001$
** $0,001 < P < 0,01$
* $0,01 < P < 0,05$
ns $P > 0,05$

> 0,70 jaka pozitivna korelacija
< -0,70 jaka negativna korelacija

4.2.2. Analiza varijance

Analiza varijance 18 najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja prikazana je u Tablici 10. Populacije su se signifikantno ($P < 0,05$) razlikovale u devet spojeva eteričnog ulja: C13 limonen, C21 linalool, C35 nerol, C42 neril acetat, C48 trans-kariofilen, C51 neril propanoat, C57 α-kurkumen, C58 β-selinen i C59 δ-selinen.

Lokacije se nisu signifikantno razlikovale ni u jednom spoju, a interakcija populacija x lokacija bila je signifikantna samo u slučaju spoja C51 neril propanoat.

U daljnju analizu biokemijske raznolikosti uključeno je devet spojeva eteričnog ulja koji su pokazali signifikantne razlike između populacija.

Tablica 10. Analiza varijance 18 najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja

Izvor varijabiliteta		C03		C13		C21		C35		C42		C48		C49		C50		C51		C56		C57		C58		C59		C62		C67		C72		C73		C80	
Populacija	P(F)	ns		**		***		***		***		*		ns		ns		***		ns		***		***		*		ns		ns		ns		ns		ns	
Lokacija	P(F)	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns	
Populacija x Lokacija	P(F)	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		*		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns	
Ponavljanje(Lokacija)	P(F)	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		***		ns		ns		ns		ns		ns		*		*		ns	
Populacija	P01	4,401	ab	2,694	ab	3,706	abc	4,064	a	21,172	abc	4,023	a	0,831	a	4,118	a	5,285	abc	2,187	a	6,078	ef	6,951	f	3,663	a	0,072	ab	3,369	a	3,157	a	0,203	a	3,006	a
	P02	7,194	ab	2,640	ab	4,221	a	3,911	a	21,160	abc	4,488	a	0,893	a	4,566	a	5,697	ab	3,011	a	4,982	f	6,388	f	3,059	a	0,183	ab	3,527	a	2,208	a	0,226	a	2,161	a
	P03	3,561	ab	1,288	b	3,046	abc	4,188	a	29,213	a	3,925	a	0,535	a	5,717	a	6,216	a	3,362	a	4,847	f	6,364	f	2,489	a	0,178	ab	4,758	a	0,967	a	0,221	a	1,831	a
	P04	4,803	ab	3,181	ab	2,399	abc	3,302	ab	26,331	ab	2,188	a	1,905	a	4,199	a	4,284	abcd	2,315	a	6,452	def	6,053	f	3,024	a	0,270	ab	3,349	a	2,381	a	0,428	a	2,459	a
	P05	7,743	ab	2,089	b	1,369	c	2,761	abcd	22,223	abc	3,672	a	2,325	a	2,769	a	1,566	de	3,233	a	8,019	cdef	6,370	f	2,958	a	0,360	ab	2,455	a	4,431	a	0,395	a	3,742	a
	P06	3,754	ab	3,089	ab	2,136	abc	2,420	abcde	18,942	abcde	3,769	a	1,893	a	4,290	a	2,428	cde	1,882	a	9,112	bcdef	9,833	bcdef	4,645	a	0,340	ab	4,226	a	3,603	a	0,642	a	3,245	a
	P07	1,880	b	1,650	b	1,806	abc	1,821	bcde	15,872	abcde	3,268	a	0,727	a	8,490	a	2,730	bcde	1,672	a	9,692	abcdef	8,872	cdef	5,229	a	1,961	a	2,656	a	2,795	a	0,496	a	1,609	a
	P08	3,054	ab	1,895	b	2,048	abc	3,360	ab	16,089	abcde	2,758	a	2,111	a	7,430	a	2,182	de	2,339	a	11,700	abcde	8,601	cdef	3,409	a	0,454	ab	3,644	a	2,711	a	0,381	a	2,635	a
	P09	8,523	ab	3,229	ab	1,758	bc	2,725	abcd	18,675	abcde	3,863	a	0,764	a	4,024	a	2,810	bcde	4,222	a	10,253	abcdef	6,912	f	2,719	a	0,038	ab	2,540	a	1,715	a	0,266	a	2,330	a
	P10	5,800	ab	2,111	b	2,646	abc	2,764	abcd	15,429	abcde	4,500	a	0,582	a	6,417	a	2,910	bcde	3,571	a	9,616	abcdef	8,600	cdef	3,506	a	0,413	ab	2,230	a	1,398	a	0,900	a	3,422	a
	P11	6,104	ab	1,581	b	2,882	abc	3,107	abc	20,678	abcd	4,796	a	0,579	a	7,326	a	3,208	abcde	2,485	a	10,014	abcdef	7,178	ef	2,488	a	0,000	b	3,852	a	1,342	a	0,899	a	2,502	a
	P12	6,387	ab	2,360	b	1,588	c	1,018	de	7,091	cde	3,770	a	3,101	a	6,846	a	1,365	de	2,167	a	14,712	ab	14,747	a	5,644	a	0,669	ab	0,485	a	3,052	a	0,453	a	3,252	a
	P13	5,815	ab	1,802	b	4,072	ab	1,150	de	5,665	de	5,436	a	0,825	a	7,359	a	2,581	cde	2,751	a	12,744	abcd	11,961	abcd	5,259	a	0,194	ab	0,581	a	2,806	a	0,504	a	3,123	a
	P14	5,702	ab	2,539	ab	2,093	abc	3,419	ab	16,323	abcde	3,549	a	1,013	a	6,486	a	2,909	bcde	3,796	a	6,780	def	7,305	def	3,166	a	0,271	ab	2,991	a	3,751	a	0,850	a	3,967	a
	P15	5,846	ab	5,498	a	2,118	abc	1,317	cde	12,170	bcde	4,240	a	0,797	a	8,128	a	1,662	de	1,786	a	9,346	abcdef	11,872	abcde	5,610	a	0,244	ab	2,154	a	2,141	a	2,510	a	3,847	a
	P16	10,553	a	3,966	ab	1,370	c	1,210	cde	12,545	bcde	5,187	a	3,106	a	3,838	a	1,206	e	2,163	a	11,721	abcde	9,014	cdef	3,751	a	0,331	ab	1,300	a	1,986	a	0,363	a	2,521	a
	P17	6,951	ab	1,873	b	2,384	abc	1,390	cde	7,051	cde	5,370	a	0,644	a	7,728	a	3,059	bcde	2,233	a	13,382	abc	14,009	ab	5,294	a	0,228	ab	3,335	a	1,738	a	1,256	a	2,443	a
	P18	5,715	ab	1,336	b	1,589	c	0,787	e	5,376	e	2,812	a	2,224	a	8,985	a	1,238	de	1,988	a	15,764	a	12,462	abc	4,125	a	0,739	ab	0,717	a	3,474	a	2,918	a	2,346	a
Prosjek		5,766		2,490		2,402		2,484		16,222		3,979		1,381		6,040		2,963		2,620		9,734		9,083		3,891		0,386		2,676		2,536		0,773		2,802	

Razina signifikantnosti

*** $P < 0.001$

** $0.001 < P < 0.01$

* $0.01 < P < 0.05$

ns $P > 0.05$; Prosječne vrijednosti populacija označene istim slovom nisu signifikantno različite na razini P > 0,05

4.2.3. Analiza glavnih sastavnica

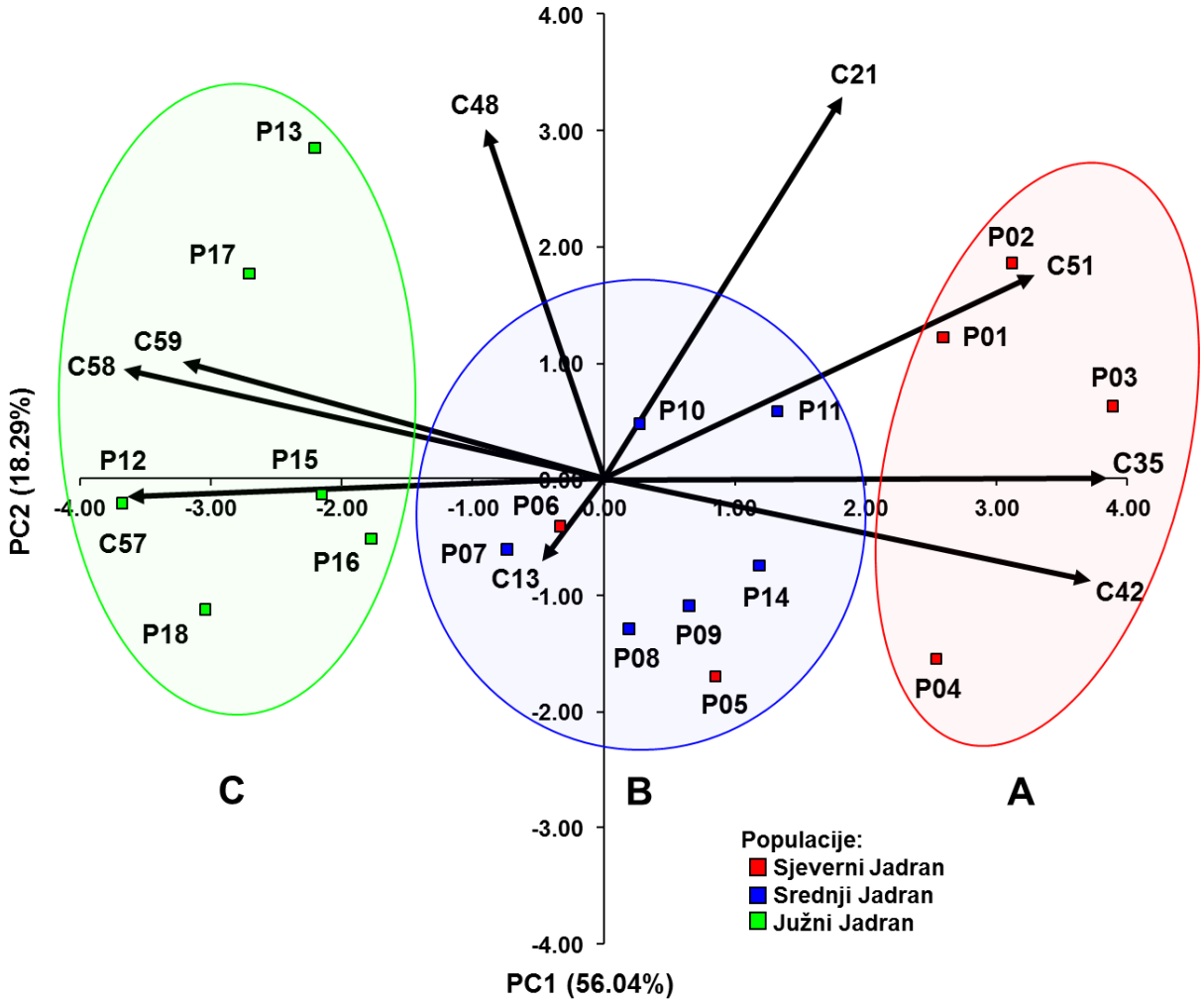
Analizom glavnih sastavnica utvrđeno je da su prve tri glavne sastavnice imale svojstvene vrijednosti (*eigenvalues*) veće od jedan, a zajedno su objasnile 86,93 % ukupne varijabilnosti. U Tablici 11. prikazane su korelacije između devet spojeva eteričnog ulja i prve četiri glavne sastavnice. Tri spoja: C35 nerol, C42 neril acetat i C51 neril propanoat, bila su jako pozitivno korelirana ($r > 0,70$; $P < 0,001$) s prvom glavnom sastavnicom koja je objasnila 56,04 % ukupne varijance, dok su spojevi C57 α-kurkumen, C58 β-selinen i C59 δ-selinen bili u jakoj negativnoj korelaciji ($r < -0,70$; $P < 0,001$) s prvom sastavnicom. Navedeni podaci upućuju na to da prva glavna sastavnica odvaja populacije na one bogate nerolom, neril acetatom i neril propanoatom od onih bogatih α-kurkumenom, β-selinenom i δ-selinenom. Spojevi C21 linalool i C48 trans-kariofilen bili su u jakoj pozitivnoj korelaciji ($r > 0,70$; $P < 0,001$) s drugom glavnom sastavnicom koja je objasnila 18,29 % ukupne varijance, a spoj C13 limonen bio je u jakoj pozitivnoj korelaciji s trećom glavnom sastavnicom.

Na Grafikonu 15. prikazan je biplot dobiven analizom glavnih sastavnica na temelju devet spojeva eteričnog ulja analiziranih u 18 populacija sredozemnog smilja. Točkama je prikazan položaj analiziranih populacija u koordinatnom sustavu, a vektorima pojedini spojevi eteričnog ulja. Uz prvu glavnu sastavnicu (PC1) sjeverozapadne populacije (P01 Krk, P02 Cres, P03 Lošinj i P04 Rab) su se jasno odvojile od jugoistočnih populacija (P12 Brač, P13 Hvar, P15 Omiš, P16 Živogošće, P17 Slano i P18 Cavtat), dok su se srednjojadranske populacije (P05 Zrće, Pag, P06 Miškovići, Pag, P07 Obrovac, P08 Benkovac, P09 Kistanje, P10 Unešić, P11 Seget i P14 Sinj) smjestile oko centra plota. Sjeverozapadne otočne populacije karakterizira veći postotak spojeva neril propanoata, nerola i nerila acetata u odnosu na jugoistočne populacije koje karakterizira viši postotak spojeva α-kurkumen, β-selinen i δ-selinen, dok su srednjojadranske (kopnene) populacije pokazale srednje vrijednosti navedenih spojeva.

Tablica 11. Rezultati analize glavnih sastavnica: korelacije između devet spojeva eteričnog ulja smilja i prve četiri glavne sastavnice

Sastavnica	PC1		PC2		PC3		PC4	
C13	-0,117	ns	-0,177	ns	0,961	***	0,045	ns
C21	0,456	ns	0,824	***	-0,016	ns	0,172	ns
C35	0,961	***	0,002	ns	-0,058	ns	0,036	ns
C42	0,930	***	-0,221	ns	0,097	ns	0,004	ns
C48	-0,224	ns	0,756	***	0,244	ns	-0,539	*
C51	0,822	***	0,439	ns	-0,058	ns	0,248	ns
C57	-0,908	***	-0,039	ns	-0,312	ns	-0,123	ns
C58	-0,916	***	0,236	ns	-0,060	ns	0,216	ns
C59	-0,803	***	0,253	ns	0,187	ns	0,436	ns
Svojstvena vrijednost	5,044		1,646		1,134		0,637	
% ukupne varijance	56,04		18,29		12,60		7,08	

*** $P < 0,001$; ** $0,001 < P < 0,01$; * $0,01 < P < 0,05$; ^{ns} $P > 0,05$



Grafikon 15. Biplot dobiven analizom glavnih sastavnica na temelju devet spojeva eteričnog ulja analiziranih u 18 populacija sredozemnog smilja. Skupine (A, B, C) su određene na temelju analize skupina.

4.2.4. Analiza skupina

Euklidska udaljenost između 18 populacija sredozemnog smilja izračunana je na temelju devet spojeva eteričnog ulja (Tablica 12). Prosječna euklidska udaljenost između populacija iznosila je 10,635, a kretala se od 1,600 (između populacija P01 Krk i P02 Cres) do 27,694 (između P03 Lošinj i P18 Cavtat).

Navedena euklidska udaljenost će se nadalje smatrati biokemijskom udaljenošću između populacija.

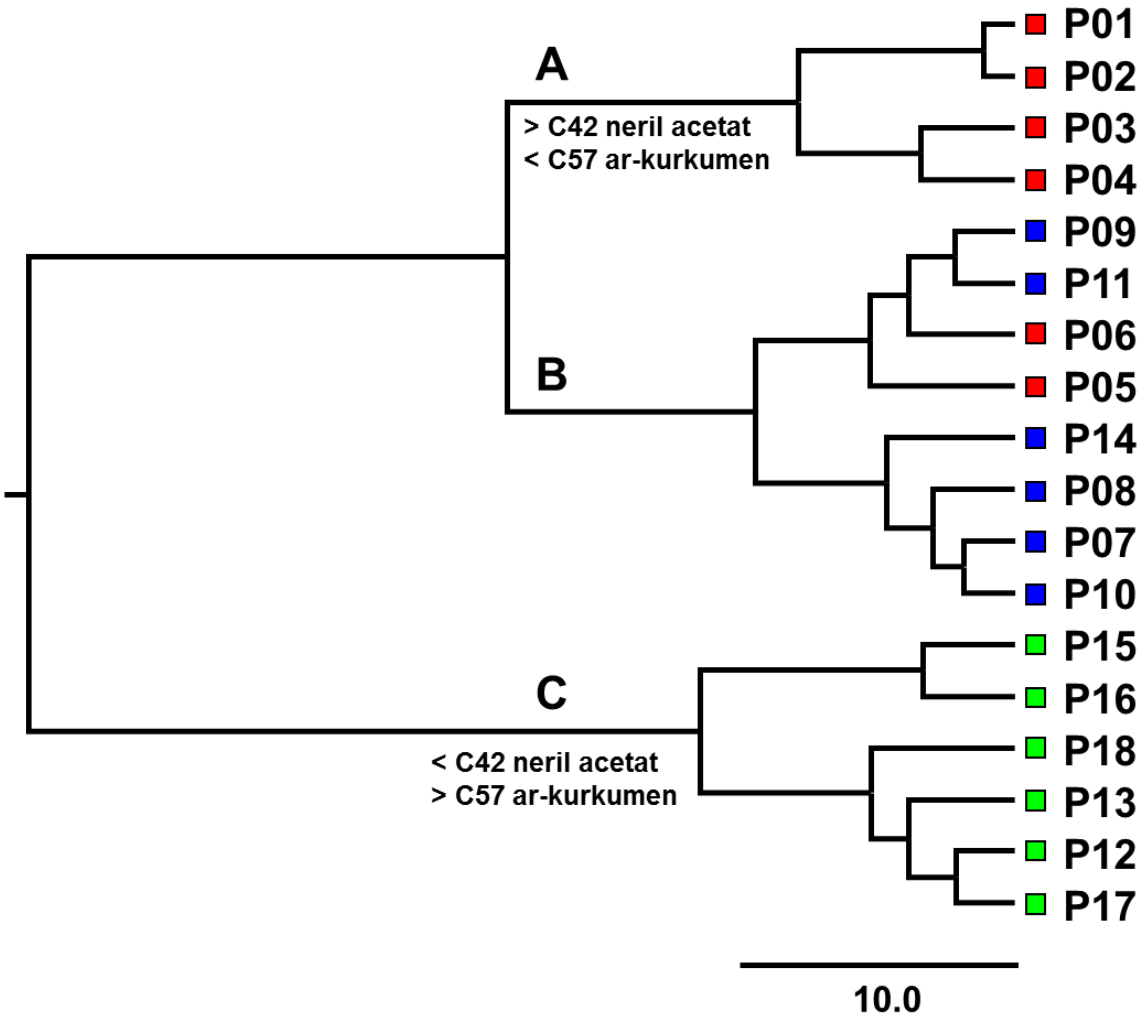
Na Grafikonu 16. prikazan je Wardov dendrogram na temelju kvadratnih euklidskih udaljenosti između 18 populacija sredozemnog smilja. Na temelju vrijednosti pseudo F statistike utvrđeno je da je klasifikacija populacija u tri skupine (A, B, C) optimalna.

U skupinu (A) su se smjestile populacije: P01 Krk, P02 Cres, P03 Lošinj i P04 Rab za koje je karakteristično da sadrže više neril acetata; u skupinu (B) populacije: P05 Pag 1, P06 Pag 2, P07 Obrovac, P08 Benkovac, P09 Kistanje, P10 Unešić, P11 Seget i P14 Sinj, a u skupinu (C) populacije: P12 Brač, P13 Hvar, P15 Omiš, P16 Živogošće, P17 Slano i P18 Cavtat koje karakterizira veći sadržaj α-kurkumena.

Navedene skupine će se nadalje smatrati različitim kemotipovima sredozemnog smilja.

Tablica 12. Euklidska udaljenost između 18 populacija sredozemnog smilja izračunana na temelju devet spojeva eteričnog ulja

Br.	Populacija	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17
P01	Krk																	
P02	Cres	**1,600**																
P03	Lošinj	8,438	8,311															
P04	Rab	5,905	6,347	4,776														
P05	Pag 1	5,214	6,153	9,291	5,619													
P06	Pag 2	6,082	7,371	12,725	9,240	5,409												
P07	Obrovac	8,008	9,083	15,333	11,881	7,572	3,730											
P08	Benkovac	8,680	9,839	15,644	12,067	7,644	4,614	3,242										
P09	Kistanje	6,048	7,133	12,641	8,922	4,579	3,745	4,689	4,000									
P10	Unešić	7,567	8,441	15,261	12,013	7,622	4,185	2,570	3,019	4,107								
P11	Seget	4,991	6,029	10,550	7,549	3,724	4,527	6,242	5,731	3,057	5,603							
P12	Brač	19,153	20,095	26,529	23,204	18,825	14,174	11,845	11,849	15,160	12,041	16,883						
P13	Hvar	18,201	18,847	26,114	23,007	18,632	14,290	11,549	11,865	14,826	11,190	16,416	4,957					
P14	Sinj	5,770	6,397	13,615	10,301	6,343	4,739	4,351	5,251	4,373	3,530	5,760	14,770	13,729				
P15	Omiš	12,281	13,119	19,961	16,429	12,439	7,670	6,342	7,488	9,210	6,426	11,245	8,567	8,589	8,115			
P16	Živogošće	11,989	12,839	19,473	15,862	11,105	7,451	5,415	5,391	7,247	4,882	9,473	8,936	8,561	7,413	4,629		
P17	Slano	17,932	18,728	25,514	22,476	18,188	13,530	11,087	11,353	14,431	10,937	15,975	2,979	3,110	13,675	7,976	8,318	
P18	Cavtat	20,219	21,083	**27,694**	24,252	19,688	15,616	12,837	12,439	15,842	12,862	17,684	3,690	5,093	15,493	10,489	9,621	4,836



Grafikon 16. Wardov dendrogram na temelju kvadratnih euklidskih udaljenosti između 18 populacija sredozemnog smilja. Klasifikacija populacija u skupine (A, B, C) na temelju vrijednosti pseudo *F* statistike je prikazana iznad grana. Crveni kvadrati predstavljaju sjevernojadranske populacije, plavi predstavljaju srednjojadranske, a zeleni južnojadranske populacije

4.2.5. Analiza varijance između skupina populacija

Provedena je analiza varijance između skupina populacija te je ustanovljeno da se sedam spojeva eteričnog ulja signifikantno ($P < 0,05$) razlikuje između skupina populacija. Skupine se najviše razlikuju u vrijednostima C35 nerol, C42 neril acetat, C51 neril propanoat, C57 α-kurkumen i C58 β-selinen (Tablica 13).

Tablica 13. Analiza varijance devet spojeva eteričnog ulja između skupina populacija

Sastavnica	P(ϕ)	Skupina					
		A		B		C	
C13 limonen	ns	2,451	a	2,273	a	2,806	a
C21 linalool	*	3,343	a	2,092	b	2,187	ab
C35 nerol	***	3,866	a	2,797	b	1,145	c
C42 neril acetat	***	24,469	a	18,029	b	8,316	c
C48 trans kariofilen	ns	3,656	a	3,772	a	4,469	a
C51 neril propanoat	***	5,370	a	2,593	b	1,852	b
C57 α-kurkumen	***	5,590	c	9,398	b	12,945	a
C58 β-selinen	***	6,439	b	7,959	b	12,344	a
C59 δ-selinen	**	3,059	b	3,515	b	4,947	a

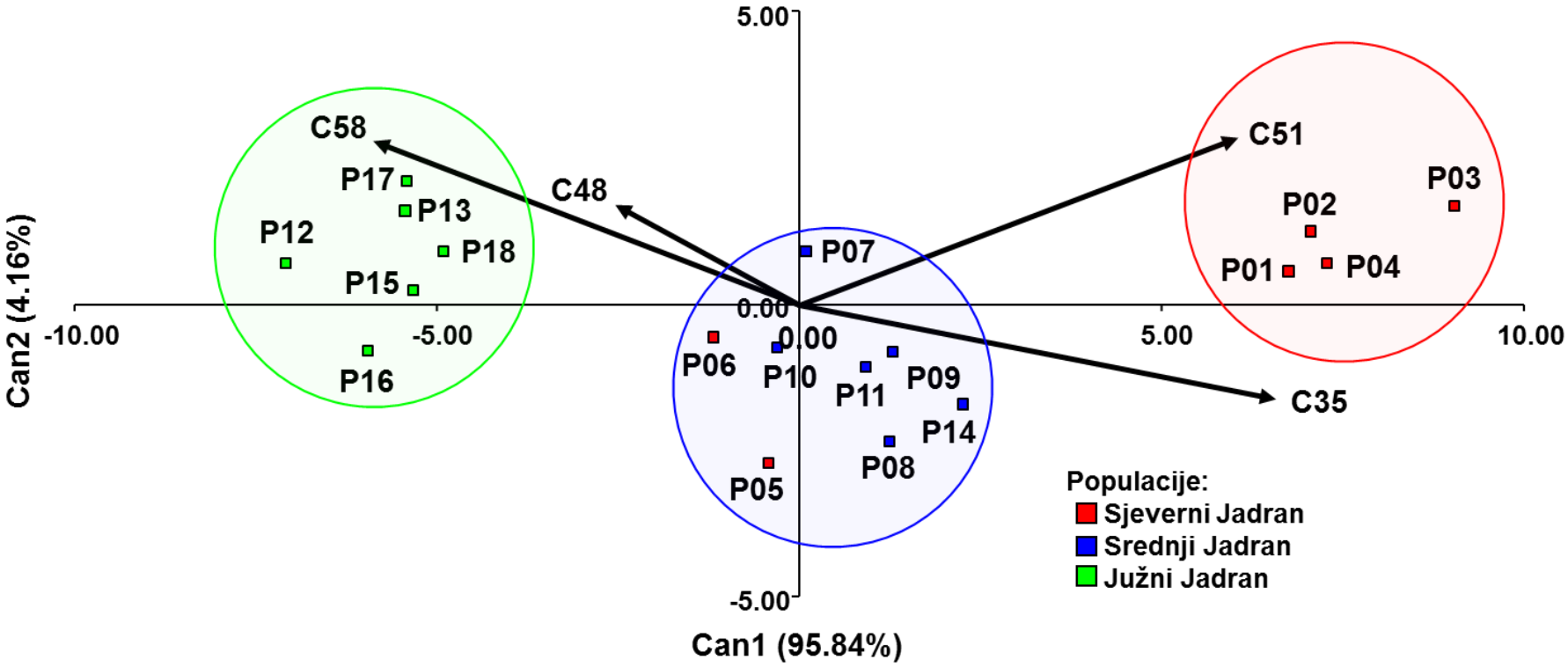
$P(\phi)$ - signifikantnost F-testa (*** $P < 0,001$; ** $0,001 < P < 0,01$; * $0,01 < P < 0,05$; ^{ns} $P > 0,05$)
Prosječne vrijednosti skupina populacija označene istim slovom nisu signifikantno različite na razini $P > 0,05$

4.2.6. Diskriminacijska analiza

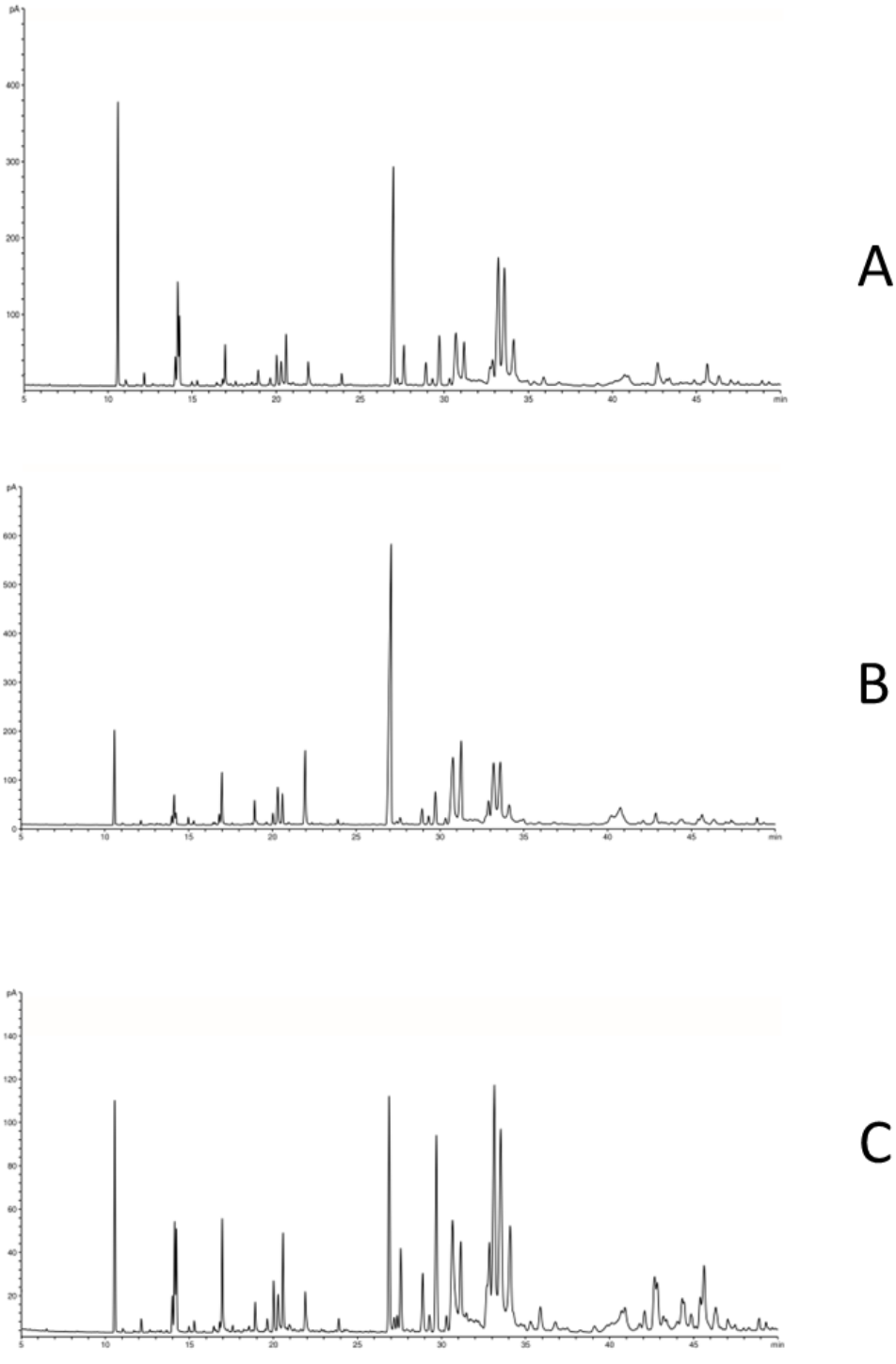
Na temelju postupne diskriminacijske analize, kao najinformativniji spojevi za diskriminaciju triju kemotipova smilja pokazali su se: C35 nerol, C51 neril propanoat, C48 trans-kariofilen i C58 β-selinen (Tablica 14). Pomoću njih bilo je moguće ispravno klasificirati 100 % populacija u pretpostavljene kemotipove nakon provedenog postupka unakrsne validacije (Grafikon 17).

Tablica 14. Najinformativniji spojevi za diskriminaciju triju kemotipova smilja na temelju postupne diskriminacijske analize

Oznaka	Spoj	Parcijalni R^2	F	P(F)
C35	nerol	0,881	55,26	< 0,0001
C51	neril propanoat	0,587	9,94	0,002
C48	trans kariofilen	0,471	5,78	0,016
C58	β-selinen	0,412	4,20	0,041



Grafikon 17. Diskriminacijska analiza 18 populacija sredozemnog smilja na temelju četiri spoja eteričnog ulja radi razlikovanja pretpostavljenih kemotipova



Slika 6. Kromatogrami triju kemotipova

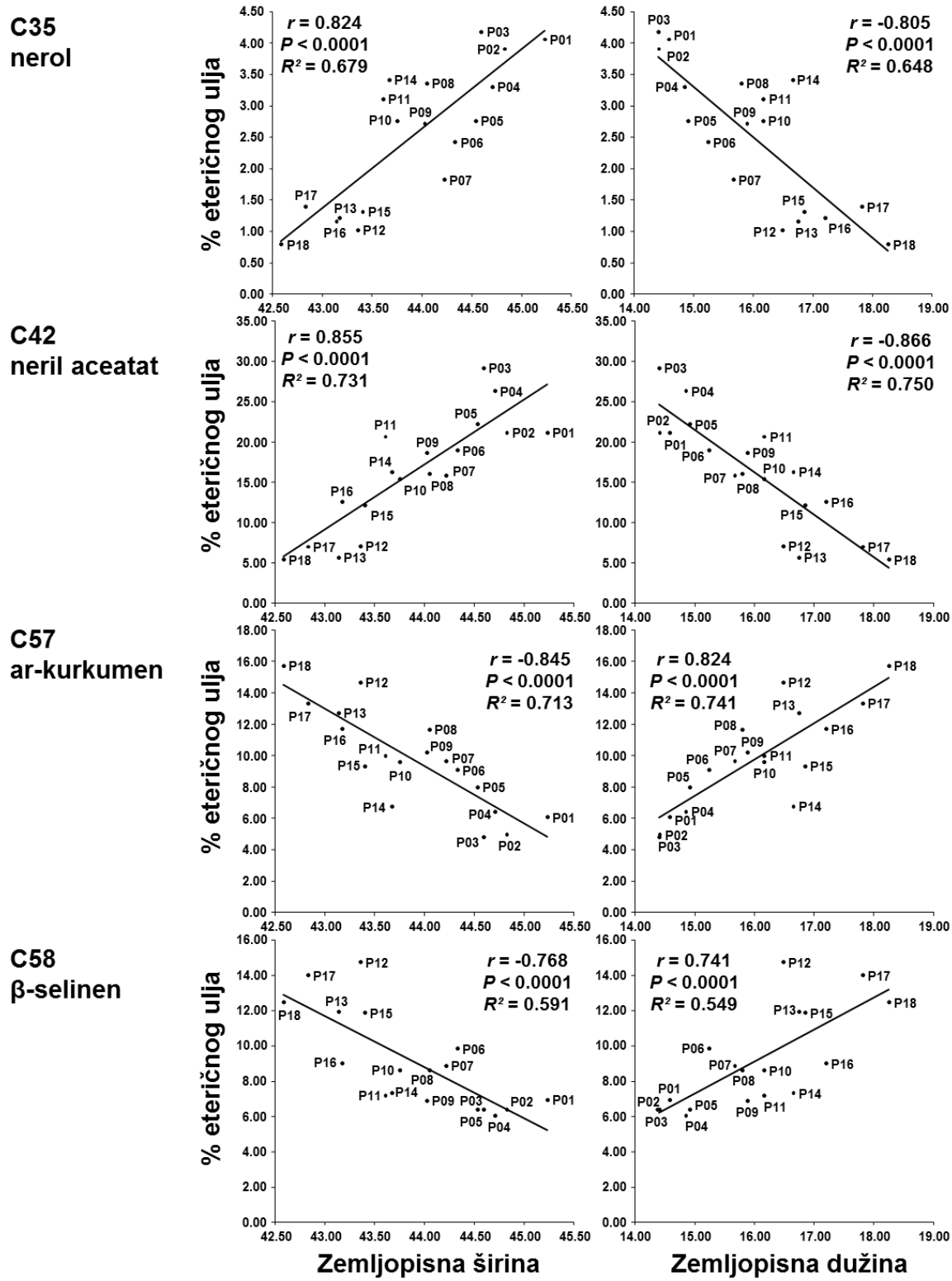
4.2.7. Korelacije - odnos između zemljopisne, genetske i biokemijske udaljenosti

Izračunane su korelacije između zemljopisne širine, zemljopisne dužine te bioklimatskih svojstava mjesta prikupljanja i 18 najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja. Zemljopisna udaljenost izražena je kao *ln*(km) između populacija, a genetska udaljenost kao $F_{ST}/(1-F_{ST})$. Bioklimatska udaljenost je euklidska udaljenost između populacija na temelju 19 bioklimatskih svojstava, a biokemijska je euklidska udaljenost između populacija na temelju devet spojeva eteričnog ulja. Četiri spoja bila su visokosignifinantno korelirana ($r > 0,70$ ili $r < -0,70$) sa zemljopisnom širinom i zemljopisnom dužinom. Spojevi C35 nerol i C42 neril acetat pozitivno su korelirani sa zemljopisnom širinom, a negativno sa zemljopisnom dužinom. Spojevi C57 α-kurkumen i C58 β-selinen negativno su korelirani sa zemljopisnom širinom, a pozitivno sa zemljopisnom dužinom. Dobiveni rezultati ukazuju na to da najsjevernije populacije (istodobno i najzapadnije) imaju najviše C35 nerola i C42 neril acetata, a najjužnije (i najistočnije) imaju najviše C57 α-kurkumena i C58 β-selinena, što je vidljivo u Grafikonu 18.

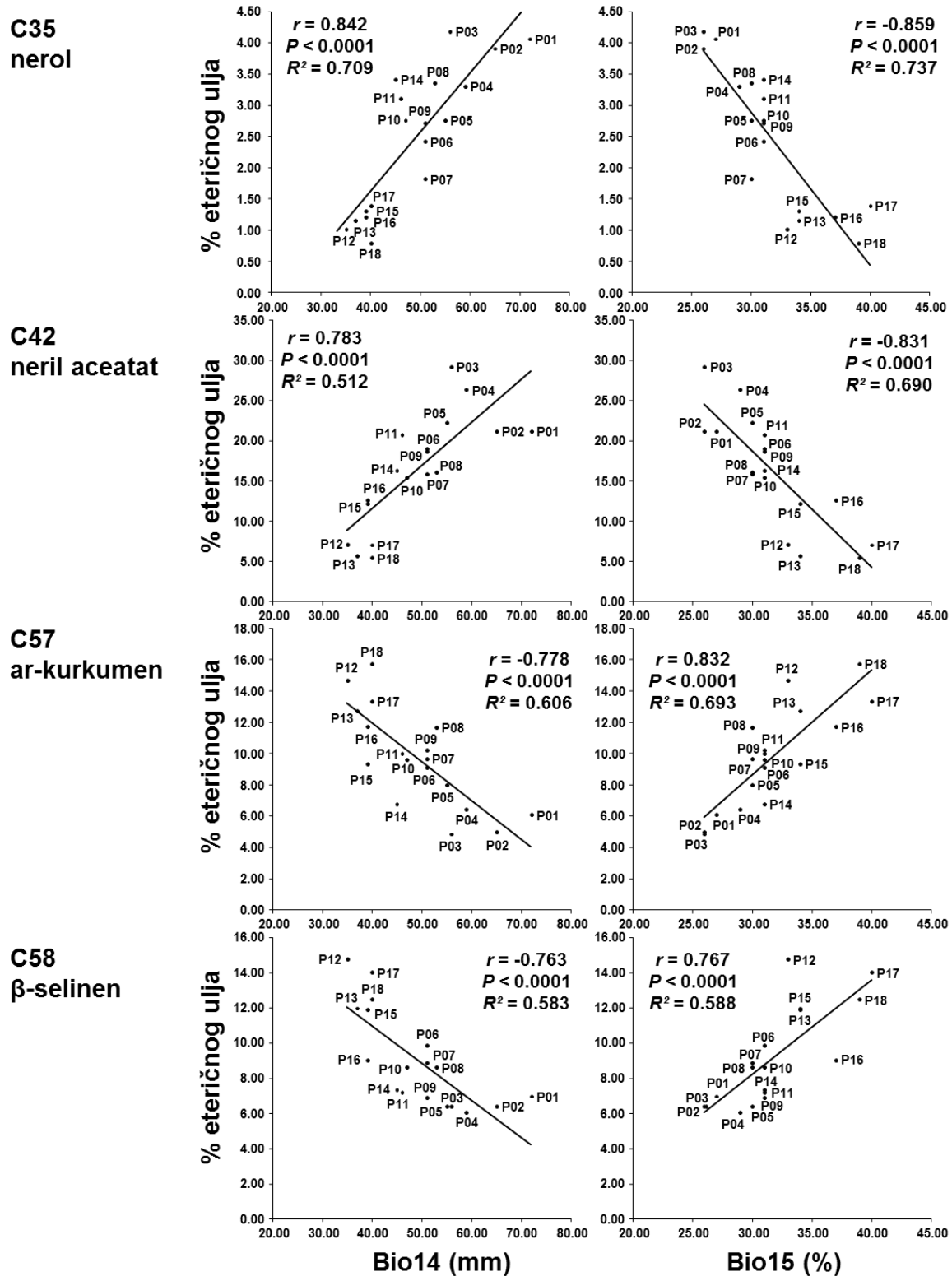
Četiri bioklimatska svojstva (Bio14 Količina oborina u najsušem mjesecu, Bio15 Koeficijent varijacije oborina, Bio17 Količina oborina u najsušem kvartalu i Bio18 Količina oborina u najtoplijem kvartalu) bila su visokosignifikantno korelirana s pet spojeva eteričnog ulja (C35 nerol, C42 neril acetat, C51 neril propanoat (s Bio15 je $r = 0,699$), C57 α-kurkumen i C58 β-selinen). Rezultati su vrlo slični jer su bioklimatska svojstva korelirana sa zemljopisnom širinom i dužinom. Spojevi C35 nerol, C42 neril acetat, C51 neril propanoat bili su pozitivno korelirani s bioklimatskim svojstvima: Bio14 Količina oborina u najsušem mjesecu, Bio17 Količina oborina u najsušem kvartalu i Bio18 Količina oborina u najtoplijem kvartalu, a negativno korelirani sa svojstvom Bio15 Koeficijentom varijacije oborina. Spojevi C57 α-kurkumen i C58 β-selinen bili su obrnuto korelirani od prethodno navedenih (negativno korelirani s bioklimatskim svojstvima Bio14, Bio17 i Bio18, a pozitivno s Bio15). Svojstva Bio14, Bio17 i Bio18 su međusobno vrlo visoko korelirana tako da se na Grafikonu 19. prikazuju samo Bio14 i Bio15. Može se zaključiti da su najvažnija svojstva o kojima ovisi kemijski sastav eteričnog ulja: Bio14 Količina oborina u najsušem mjesecu, Bio15 Koeficijent varijacije oborina, Bio17 Količina oborina u najsušem kvartalu i Bio18 Količina oborina u najtoplijem kvartalu, jer je upravo za ta svojstva otkriveno najviše lokusa pod pozitivnim odabirom.

Na Grafikonu 20. prikazana je regresija bioklimatske, genetske [$F_{ST}/(1-F_{ST})$] i biokemijske udaljenosti na zemljopisnu udaljenost [*ln*(km)], genetske i biokemijske udaljenosti na bioklimatsku te biokemijske na genetsku udaljenost između 18 populacija sredozemnog smilja. Analizom odnosa između bioklimatske udaljenosti i zemljopisne

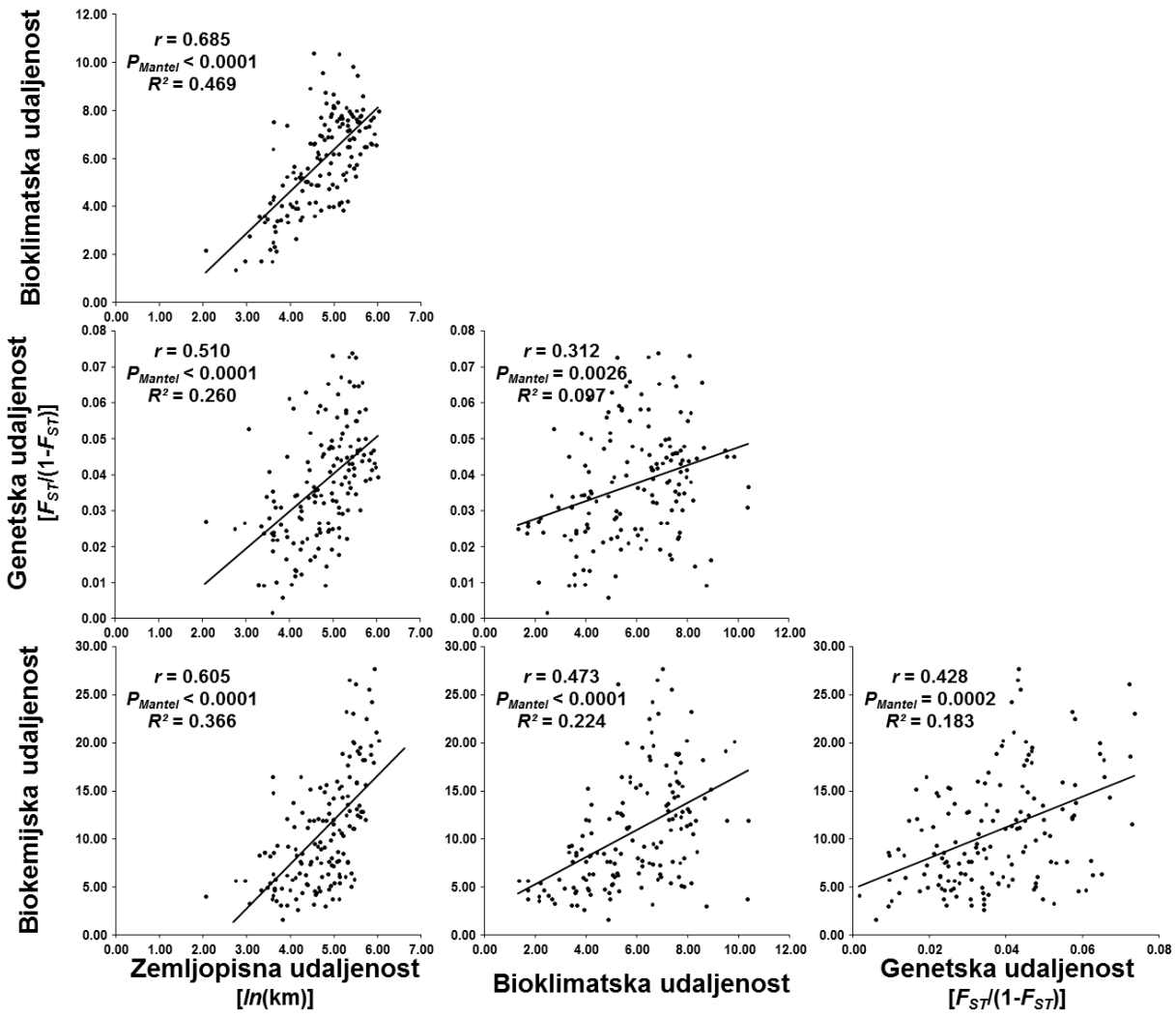
udaljenosti utvrđeno je da postoji značajna korelacija (r = 0,685, P_{Mantel}<0,0001). Linearnom regresijom bioklimatske udaljenosti na zemljopisnu dobiven je koeficijent determinacije R^2 = 0,469 što pokazuje da se 46,9 % bioklimatske udaljenosti može objasniti zemljopisnom udaljenošću. Regresijom genetske raznolikosti na zemljopisnu udaljenost dobiven je koeficijent determinacije R^2 = 0,260 kojim se 26 % genetske raznolikosti može objasniti zemljopisnom udaljenošću. Analizom odnosa između biokemijske i zemljopisne udaljenosti može se objasniti 36,6 % (R^2 = 0,366) biokemijske udaljenosti sa zemljopisnom udaljenosti. Kod regresije genetske na bioklimatsku udaljenost koeficijent determinacije je iznosio R^2 = 0,097, stoga se može objasniti 9,7 % genetske udaljenosti bioklimatskom udaljenosti. Regresijom pomoću koeficijenta determinacije (R^2 = 0,224) utvrđeno je da se 22,4 % biokemijske udaljenosti može objasniti bioklimatskom, dok se regresijom biokemijske na genetsku udaljenost može objasniti 18,3 % (R^2 = 0,18) biokemijske udaljenosti genetskom udaljenosti.



Grafikon 18. Regresija postotka nerola (C35), neril acetata (C42), α-kurkumena (C57) i β-selinena (C58) na zemljopisnu širinu i zemljopisnu dužinu na temelju 18 populacija sredozemnog smilja



Grafikon 19. Regresija postotka nerola (C35), neril acetata (C42), α-kurkumena (C57) i β-selinena (C58) na Bio14 Količinu oborina u najsušem mjesecu i Bio15 Koeficijent varijacije oborina



Grafikon 20. Regresija bioklimatske, genetske [F_{ST}/(1-F_{ST})] i biokemijske udaljenosti na zemljopisnu udaljenost [ln(km)], genetske i biokemijske udaljenosti na bioklimatsku te biokemijske na genetsku udaljenost između 18 populacija sredozemnog smilja.

5. RASPRAVA

5.1. Genetska raznolikost

Smilje je posljednjih godina postalo gospodarski važna ljekovita i aromatična biljna vrsta u Hrvatskoj. Intenzivno sakupljanje započelo je zbog povećane potrebe za eteričnim uljem smilja, što je dovelo do toga da se u Hrvatskoj od svih količina samoniklog bilja najviše sakuplja upravo smilja (95 %). Zbog prekomjerne eksploatacije samoniklih populacija donesene su preporuke za ograničenim sakupljanjem pa je započeo razvoj plantažnog uzgoja. To je samo potaknulo potrebu za novim spoznajama o genetskoj raznolikosti smilja. Naime, podaci dostupni u znanstvenoj literaturi su oskudni, postoji samo nekoliko istraživanja koja se bave genetskom raznolikošću samoniklih populacija *H. italicum.* Jedno od takvih istraživanja je utvrđivanje genetske raznolikosti *H. italicum* spp*. microphylum* na području mediteranskog bazena s najvećim uzorkovanjem na Korzici i Sardiniji (Galbany-Casals i sur., 2011). U analizi su korišteni molekularni AFLP biljezi pomoću kojih je istraženo ima li podvrsta *H. italicum* spp*. microphylum* neovisno podrijetlo (*gene pool*) od podvrste *H. italicum* spp. *italicum*. Istu molekularnu metodu AFLP biljega koristili su Morone Fortunato i sur. (2010) za istraživanje genetske raznolikosti 20 samoniklih populacija smilja na raznim lokacijama u Italiji i na Korzici. Melito i sur. (2013) su pomoću AFLP biljega istražili genetsku raznolikost samoniklih populacija smilja na Sardiniji, gdje je utvrđeno postojanje dviju genetski različitih skupina. Istraživanje Scialabba i sur. (2008) pomoću AFLP biljega bilo je usmjereno na utvrđivanje odnosa između svojti te razine genetske raznolikosti svih populacija *Helichrysuma* na Siciliji. Autori Angioni i sur. (2003) koristili su (RAPD) molekularne biljege za otkrivanje genetske raznolikosti *H. italicum* ssp. *microphyllum* na Sardiniji.

Ovaj rad predstavlja prvu analizu genetske raznolikosti i strukture prirodnih populacija smilja na području Hrvatske te je stoga istraživanje provedeno na cijelom arealu rasprostranjena. Uzorkovano je 18 populacija smilja rasprostranjenih duž obale i otoka od sjeverozapada do jugoistoka Hrvatske. Genetska raznolikost procijenjena je pomoću molekularne metode biljega AFLP koja je prikladna za procjenu bioraznolikosti vrsta (Matthes i sur.,1998), a koristi se za otkrivanje velikog broja polimorfnih biljega i ispitivanje genetske raznolikosti i strukture kod vrsta za koje ne postoji prethodno znanje o genomu (Nybom, 2004). Molekularnom analizom 18 populacija smilja koristeći četiri kombinacije početnica dobivena su 693 polimorfna biljega AFLP, što upućuje na visoku raznolikost.
Temeljna životna svojstva (*life history traits*) poput zemljopisne rasprostranjenosti vrste, životnog ciklusa, načina razmnožavanja i oplodnje znatno se razlikuju među vrstama i

utječu na dinamiku genskog skupa (Loveless i Hamrics, 1984; Hamrick and Godt, 1996). Smilje je višegodišnja, stranooplodna entomofilna biljna vrsta. Roške su lagane te se raspršuju pomoću vjetra što također značajno pridonosi širenju vrste. Kod stranooplodnih biljnih vrsta ukupna genetska raznolikost većim dijelom je posljedica veće unutarpopulacijske raznolikosti (Nybom and Bartish, 2000). Izračunom Shanonnovog informacijskog indeksa fenotipske raznolikosti i analize molekularne varijance kod populacija smilja potvrđena je takva raspodjela ukupne raznolikosti. Naime, ukupna fenotipska raznolikost iznosila je H_t = 0,414, udio raznolikosti unutar populacija iznosio je 85,82 %, dok je udio raznolikosti između populacija iznosio 14,18 %. Rezultati AMOVA-e također su pokazali da većina ukupne genetske raznolikosti pripada raznolikosti unutar populacija (93,08 %), dok manji dio (6,92 %) pripada raznolikosti između populacija. Jednaku raspodjelu genetske raznolikosti potvrđuju rezultati AMOVA-e analiziranih populacija raznih vrsta iz roda *Helichrysum* na Siciliji (Scialabba i sur., 2008). Navedeni rezultati su u skladu i s istraživanjima provedenim na dalmatinskom buhaču (Grdiša i sur., 2014) i ljekovitoj kadulji (Jug-Dujaković i sur., 2020), također stranooplodnim, mediteranskim višegodišnjim vrstama koje imaju isti areal rasprostranjenosti na području Hrvatske kao i smilje.

Učestalost rijetkih alela kod sjeverozapadnih populacija smilja bila je veća, što ukazuje na dugo preživljavanje populacija na tom području (Schonswetter i Tribsch, 2005). Najvišu učestalost rijetkih alela na sjeverozapadu (*DW*) imala je populacija P06 Miškovići, Pag (76,10), a na jugu najjužnija populacija P18 Cavtat (62,4). Ukupna genska raznolikost smilja iznosila je (H_t) = 0,147, a Wrightov indeks genetske diferencijacije (F_{ST}) bio je signifikantan, ali nizak (0,036), što upućuje na ekstenzivan protok gena između populacija (Wright, 1951). Rezultati su uspoređeni s rezultatima istraživanja buhača (Grdiša i sur., 2014) i ljekovite kadulje (Jug-Dujaković i sur., 2020), smilju sličnih biljnih vrsta na proučavanom prostoru, kod kojih su također sjeverne populacije bile bogatije, a F_{ST} je bio nizak. Moguće objašnjenje za nisku raznolikost južnijih populacija leži u tome što su se sve tri vrste na tom području intenzivno eksploatirale. Buhač se najduže vrijeme sakupljao, pa kadulja kod koje se nisu brali cvjetovi nego listovi. Smilje se sakuplja u relativno novijem razdoblju i to u manjim količinama nego buhač. Također, plodovi smilja su lagani što je pridonijelo širokoj rasprostranjenosti vjetrom.

Izračunom genetske udaljenosti između parova populacija po Neiju, najveća i najmanja udaljenost bile su između istih parova kao i kod izračuna F_{ST} vrijednosti. Najveća udaljenost izračunana je između populacija Rab i Hvar (D_{NEI} = 0,0128), a najmanja između para P09 Kistanje i P10 Unešić (D_{NEI} = 0,0003). Prikazom genetskih udaljenosti između populacija na srodstvenom stablu po Fitchu i Margoliashu vidljivo je odvajanje 18 populacija smilja na dvije skupine (podržano s 96 % *bootstrap* vrijednosti) prema

zemljopisnom podrijetlu. Prva skupina uključuje sjevernojadranske populacije: P01 Krk, P02 Cres, P03 Lošinj, P04 Rab, P05 Zrće, Pag, P06 Miškovići, Pag i P07 Obrovac, a druga skupina uključuje populacije srednjeg i južnog Jadrana: P08 Benkovac, P09 Kistanje, P10 Unešić, P11 Seget, P12 Brač, P13 Hvar, P14 Sinj, P15 Omiš, P16 Živogošće, P17 Slano i P18 Cavtat.

Bayesovskom analizom populacijske strukture populacija smilja pomoću programa STRUCTURE i BAPS utvrđen je optimalan broj izvornih skupina K = 2, a populacije su pridružene genskim skupovima ovisno o udjelu pripadnosti. Dobiveni rezultati pomoću oba programa utvrdili su da izvornoj populaciji A pripadaju sjevernojadranske populacije: P01 Krk, P02 Cres, P03 Lošinj, P04 Rab, P05 (Zrće) Pag, P06 (Miškovići) Pag i P07 Obrovac, a izvornoj populaciji B srednjojadranske i južnojadranske populacije. Populacije kod kojih je Q < 75 % promatrane su kao hibridne jer su nastale miješanjem dviju izvornih populacija. Rezultati za K = 3 (STRUCTURE) pokazali su najveće neslaganje u rezultatima između navedena dva programa. Populacije su se dodatno odvojile kod $K = 3$ uz mnogo hibridnih populacija. Rezultati analize populacijske strukture smilja bili su u skladu sa srodstvenim stablom na temelju genetskih udaljenosti po Neiju koje je također potvrdilo postojanje dviju različitih genetskih skupina. Ovakvo odvajanje populacija na sjeverne i južne prisutno je i kod dalmatinskog buhača (Grdiša i sur., 2014). Mogući razlog za takvo odvajanje leži u postojanju ledenjaka koji su zajedno s klimatskim uvjetima predstavljali barijere te na duži period odvojili populacije (Marjanac i Marjanac, 2004). Zadnje ledeno doba, promjene razine mora i temperature imale su najveći utjecaj na današnju strukturu populacija (Sikora i sur., 2014).

Biljne vrste se rasprostiru u heterogenom okolišu (kontinuirani gradijent, kontrastni uvjeti, fragmentirana staništa) koji izlaže populacije različitim pritiscima okolišnih faktora. Ovisno o međusobnoj selekciji i protoku gena, neke populacije mogu se prilagoditi lokalnim uvjetima okoliša (Lenormand 2002, Savolainen i sur. 2007). Kod 18 populacija smilja, ukupno 446 AFLP biljega je korišteno za identifikaciju lokusa za koje se pretpostavlja da su pod prirodnim odabirom. Pomoću programa Mcheza otkriven je ukupno 21 lokus koji pokazuje atipične vrijednosti (F_{ST}) (4,71 %), među kojima je 10 (2,24 %) bilo pod pozitivnim odabirom, a 11 (2,47 %) pod ravnotežnim odabirom, dok je pomoću programa BayeScan identificirano devet (2,02 %) lokusa pod pozitivnim odabirom. U istraživanju populacija planinske biljne vrste *Sideritis scardica* (Grdiša i sur., 2019) također je otkriven manji broj lokusa pod odabirom programom Bayescan, (3,10 %) u odnosu na program Mcheza (5,31 %). Takve rezultate potvrđuju i drugi autori koji ističu konzervativniju prirodu bajezijanske metode te tvrde da djeluje efikasnije jer detektira visoki postotak atipičnih lokusa s niskim udjelom lažno pozitivnih lokusa (Pérez-Figueroa i sur., 2010; Narum i Hess, 2011; Vilas i sur., 2012). Zbog toga se preporučuje korištenje

više metoda koje podrazumijevaju različite pristupe i koriste različite algoritme pa je veća vjerojatnost da su detektirani lokusi doista adaptivni. Na temelju rezultata oba programa, Mcheza i BayeScan, za sedam lokusa AFLP je otkriveno da su pod pozitivnim odabirom. Korištenjem sve tri metode (Mcheza, BayeScan i Samβada) identificirano je pet (1,121 %) lokusa pod odabirom koji su povezani s bioklimatskim svojstvima. Usporedba s istraživanjima na drugim vrstama potvrđuje da je samo mali broj lokusa pod utjecajem prirodnog odabira. Autori Hoffmann i Willi (2008) su detektirali manje od 5 % atipičnih lokusa, dok su Nosil i sur. (2009) otkrili 5-10 %. U istraživanju invazivne vrste *Mikania micrantha* Kunth (Wang i sur, 2012) identificirano je 14 atipičnih lokusa (2,9 %) pomoću programa Dfdist i BayeScan, dok je analizom vrste *Eruca sativa* Mill. (Westberg i sur., 2013) identificirano devet lokusa, ali samo su tri od njih potvrđena još jednom metodom (1,6 %). Muller i sur. (2017) detektirali su kod vrste *Geropogon hybridus* (L.) Sch. Bip. čak 11 (8.9 %) atipičnih lokusa programom Mcheza i BayeScan te metodom prostorne analize (SAM). Lokuse pod prirodnim odabirom dobivene pomoću sve tri metode smatramo odgovornima za prilagodbu organizama na različite okolišne čimbenike. Oborine i temperatura pokazale su se najznačajnijim okolišnim čimbenicima koji su utjecali na aktiviranje mehanizama prilagodbe vrsta na okoliš kod 18 prirodnih populacija smilja. Mnoga istraživanja alpskih vrsta (Körner, 2003; Manel i sur., 2010; Poncet i sur., 2010; Di Pierro i sur., 2016) također naglašavaju veliki utjecaj upravo tih okolišnih čimbenika. Prirodne populacije smilja protežu se obalom Jadranskog mora duž gradijenta sjeverozapad-jugoistok. Devetnaest bioklimatskih svojstava bilo je međusobno korelirano i korelirano s koordinatama. Sjeverozapadnu obalu Jadranskog mora karakteriziraju niže temperature i više oborina, dok se prema jugoistoku obale temperature povećavaju, a smanjuje se količina oborina. Procjep u gradijentu (crta razdvajanja) populacija je u blizini kanjona Zrmanje koji razdvaja sjevernojadranske populacije od srednjojadranskih i južnojadranskih populacija. Različit prirodan odabir populacija može biti i rezultat izloženosti kontrastnim uvjetima okoliša, što je uočeno kod vrste *Sideritis scardica* rasprostranjene u središnjem dijelu Balkanskog poluotoka (Grdiša i sur., 2019). Otkrivanje mehanizama adaptibilnosti biljnih vrsta važno je kako bi se mogao predvidjeti njihov opstanak uslijed klimatskih promjena odnosno u kojoj će mjeri određene biljne vrste razviti ili aktivirati mehanizme prilagodbe na novonastale uvjete (Nielsen, 2005; Hoffmann i Willi, 2008).

5.2. Biokemijska raznolikost

Mnogi su autori analizirali eterično ulje smilja te su ustanovili visoku varijabilnost njegovog kemijskog sastava (Bianchini i sur., 2001; Angioni i sur., 2003; Mastelić i sur., 2008; Maksimovic i sur., 2013; Costa i sur., 2015; Jerković i sur., 2016; Mouahid i sur., 2017; Tzanova i sur., 2018; Oliva i sur., 2019). U Hrvatskoj je provedeno nekoliko istraživanja eteričnog ulja smilja, ali na malom broju uzoraka. Ovaj rad predstavlja prvo opsežno istraživanje na velikom broju populacija. Naime, za istraživanje biokemijske raznolikosti smilja u Hrvatskoj analizirano je eterično ulje 18 prirodnih populacija koje obuhvaćaju cijeli areal rasprostranjena od sjeverozapada do jugoistoka hrvatskog dijela jadranske obale. Za razliku od istraživanja drugih autora (Blažević i sur., 1995; Mastelić i sur. 2008; Željković i sur., 2015; Jerkovic i sur., 2016), čiji su uzorci ubrani u prirodi i analizirani, u ovom istraživanju svi uzorci uzeti od prirodnih populacija uzgojeni su u stakleniku te su dobivene presadnice posađene u pokušališta na dva lokaliteta kako bi se uklonio utjecaj različitih okolišnih čimbenika (klima, tlo i nadmorska visina).

Provedenom analizom eteričnih ulja dobiveno je ukupno 90 spojeva od čega su 84 spoja identificirana. Među 90 dobivenih spojeva, 50 spojeva je izolirano u svih 18 populacija smilja. Željković i sur. (2015) u svojem istraživanju identificirali su 97 spojeva u šest uzoraka smilja, dok su Mastelić i sur. (2008) identificirali ukupno 44 spoja. Kladar i sur. (2015) naglašavaju da iako je u mnogim znanstvenim istraživanjima identificirano više od 80 spojeva u eteričnom ulju smilja, mnogi od njih su prisutni samo u tragovima i nemaju veći utjecaj na kemotip.

U istraživanju eteričnih ulja 18 populacija smilja 72 spoja bila su prisutna u koncentraciji manjoj od 5 %. Maksimalan udio 18 spojeva eteričnog ulja je bio veći od 5 % u najmanje jednom uzorku iz 18 populacija. Od toga 11 spojeva (limonen, linalool, nerol, trans kariofilen, neril propanoat, γ-kurkumen, β-kurkumen, neril izovalerat, eudesm-5-en-11-ol, italidion III, β-eudesmol) je imalo koncentraciju između 5 i 10 %; dva spoja (trans-α-bergamoten i δ-selinen) su imala udjel između 10 i 15 %; četiri spoja (alfa pinen, italidion I, α-kurkumen i β-selinen) između 15 i 20 %, a jedan spoj (neril acetat) udjel između 30 i 35 %.

U farmakopeji ne postoje propisani standardi vezani za glavne spojeve eteričnog ulja smilja, stoga je rezultate moguće uspoređivati samo s istraživanjima drugih autora. Blažević i sur. (1995) istražili su sastav eteričnog ulja devet populacija u Hrvatskoj. Glavni spojevi su α-pinen, neril acetat, α-cedren, nerol, α-kurkumen, γ-kurkumen i geranil acetat. Devet populacija najviše se razlikovalo u sadržaju određenih komponenti eteričnog ulja. U istraživanju Mastelića i sur. (2008) na populacijama uzorkovanim u blizini Splita utvrđen je

najveći udio sljedećih spojeva: α-pinen (12,8 %), 2-metilciklo-heksil pentanoat (11,1 %), neril acetat (10,4 %), 1,7-di-epi-α-cedren (6,8 %) i timol (5,4 %). Identificirali su i sedam estera, koji su sačinjavali 29,0 % ukupnog ulja. Kod eteričnog ulja smilja iz Konavala (Ivanović i sur., 2011) najzastupljeniji spojevi bili su γ-kurkumen (12,4 %), β-selinen (9,9 %), trans-β-kariofilen (6,9 %), α-selinen (5,9 %), italicen (4,6 %) i α-kurkumen (4,0 %).

Navedene varijabilnosti sastava i sadržaja pojedinih spojeva mogu se pripisati utjecaju različitih čimbenika kao što su: zemljopisno podrijetlo, fenofaza biljaka i ekološki uvjeti (klima, tlo, nadmorska visina). U predmetnom istraživanju uzorci (cvjetovi sa stabljikom i listovima) ubrani su u fazi pune cvatnje. Istraživanjem Blažević i sur. (1995) utvrđeno je da su u ranim fazama rasta smilja dominantni monoterpeni, dok su seskviterpeni dominantni tijekom cvatnje i nakon cvatnje. Različiti biljni dijelovi također pridonose razlici u sastavu i prinosu eteričnog ulja *H. italicum* ssp. *Microphilum*, navode Angioni i sur. (2003), koji su odvojeno analizirali cvijet i stabljiku. Utvrdili su da je najviši prinos na kraju faze cvjetanja, pri čemu su cvjetovi imali prinos 0,18 % (v/w), a stabljika 0,04 % (v/w). Metode izolacije i ekstrakcije također utječu na sastav eteričnog ulja.

Izračunom korelacija između 18 najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja smilja utvrđeno je da je sedam spojeva bilo međusobno jako pozitivno korelirano. Navedeni spojevi su: neril acetat i nerol; neril propanoat i linalool te neril propanoat i nerol; β-selinen i α-kurkumen te δ-selinen i β-selinen; neril izovalerat i nerol te neril izovalerat i neril acetat. Jaka negativna korelacija zabilježena je između sedam spojeva. Spoj α-kurkumen bio je jako negativno koreliran s nerolom, neril acetatom i neril propanoatom. Spoj β-selinen bio je negativno koreliran s nerolom i neril acetatom, a spoj δ-selinen s nerolom i neril acetatom.

Analiza varijance 18 najzastupljenijih spojeva pokazala je da su se populacije signifikantno razlikovale u devet spojeva eteričnog ulja: C13 limonen, C21 linalool, C35 nerol, C42 neril acetat, C48 trans kariofilen, C51 neril propanoat, C57 α-kurkumen, C58 β-selinen i C59 δ-selinen koji su uzeti za identifikaciju kemotipova. Lokacije se nisu signifikantno razlikovale ni u jednom spoju eteričnog ulja, a interakcija populacija x lokacija je bila signifikantna samo u slučaju spoja C51 neril propanoat.

Analizom glavnih sastavnica utvrđeno je da su prve tri glavne sastavnice zajedno objasnile 86,93 % ukupne varijabilnosti. Na izrađenom biplotu vidljivo je da su se uz prvu glavnu sastavnicu (PC1) sjevernojadranske populacije (P01 Krk, P02 Cres, P03 Lošinj i P04 Rab) jasno odvojile od južnojadranskih populacija (P12 Brač, P13 Hvar, P15 Omiš, P16 Živogošće, P17 Slano i P18 Cavtat), dok su se srednjojadranske populacije (P05 (Zrće) Pag, P06 Pag (Miškovići), P07 Obrovac, P08 Benkovac, P09 Kistanje, P10 Unešić, P11 Seget i P14 Sinj) smjestile oko centra plota. Sjevernojadranske otočne populacije karakterizira veći postotak monoterpene: neril propanoata, nerola i nerila acetata, u

odnosu na južnojadranske populacije koje karakterizira viši postotak seskviterpena: α-kurkumen, β-selinen i δ-selinen. Ovakvi rezultati se dijelom poklapaju s istraživanjima autora Weyerstahl i sur. (1986) koji navode da eterična ulja bivše Jugoslavije karakterizira visok sadržaj α-pinena (22 %), zatim y-kurkumena (10 %), β-selinena (6 %), neril acetata (6 %) i β-kariofilena (5 %), dok su uz jadransku obalu glavni spojevi α-kurkumen (15-29 %) ili γ-kurkumen ili α-pinen (25-30 %) i neril acetat (4-14 %). Nizak postotak α-pinena u predmetnom istraživanju mogao bi se pripisati destilacijom suhih, a ne svježih uzoraka smilja. Sličnost s predmetnim uzorcima ulja pokazuje istraživanje Bianchini i sur., (2003) na uljima iz Toskane gdje je, ovisno o mjestu uzorkovanja, glavni spoj α-pinen (33 do 53 %) ili neril acetat (10-22 %) te je visoki sadržaj seskviterpenskih ugljikovodika (23-39 %) sa značajnim udjelom β-selinena, β-kariofilena i α-selinena. Glavni spojevi izolirani iz smilja u Crnoj Gori (Kladar i sur. 2015) bili su neril acetat, y-kurkumen, neril propionat i α-kurkumen, što se djelomično poklapa sa sastavom ulja u predmetnom istraživanju.

Multivarijatnim analizama kemijske raznolikosti identificirana su tri kemotipa. U skupinu (A) smjestile su se populacije: P01 Krk, P02 Cres, P03 Lošinj, P04 Rab za koje je karakteristično da sadrže više neril acetata; u skupinu (B) populacije: P05 Pag 1, P06 Pag 2, P07 Obrovac, P08 Benkovac, P09 Kistanje, P10 Unešić, P11 Seget, P14 Sinj; u skupinu (C) populacije: P12 Brač, P13 Hvar, P15 Omiš, P16 Živogošće, P17 Slano i P18 Cavtat koje karakterizira veći sadržaj α-kurkumena. Može se reći da su sjevernojadranske populacije zbog višeg sadržaja neril acetata sličnije populacijama s Korzike koje karakteriziraju pretežito oksigenirani spojevi (neril acetat, neril propionat, alifatski ketoni i β-diketoni) i niski postotak ugljikovodika (limonen, γ-kurkumen, α-kurkumen) (Bianchini i sur., 2001), dok južnojadranske populacije više nalikuju onima iz Italije (Bianchini, 2003).

Pomoću analize varijance između skupina populacija ustanovljeno je da se sedam spojeva eteričnog ulja signifikantno ($P<0.05$) razlikovalo između skupina populacija. Skupine su se najviše razlikovale u vrijednostima: C35 nerol, C42 neril acetat, C51 neril propanoat, C57 α-kurkumen i C58 β-selinen. Diskriminacijskom analizom na temelju četiri prethodno odabrana spoja (C35 nerol, C51 neril propanoat, C48 trans-kariofilen i C58 β-selinen) bilo je moguće ispravno klasificirati sve populacije u pretpostavljene kemotipove nakon provedenog postupka unakrsne validacije.

Izračunane su korelacije između zemljopisne širine, zemljopisne dužine te bioklimatskih svojstva i 18 najzastupljenijih sastavnica eteričnog ulja. Sastavnice C35 nerol i C42 neril acetat bile su pozitivno korelirane sa zemljopisnom širinom, a negativno sa zemljopisnom dužinom. Spojevi C57 α-kurkumen i C58 β-selinen bili su negativno korelirani sa zemljopisnom širinom, a pozitivno sa zemljopisnom dužinom. Dobiveni rezultati ukazuju na to da najsjevernije populacije (istodobno i najzapadnije) imaju najviše C35 nerola i C42 neril acetata, a najjužnije (i najistočnije) imaju najviše C57 α-kurkumena

i C58 β-selinena. Četiri bioklimatska svojstva (Bio14 Količina oborina u najsušem mjesecu, Bio15 Koeficijent varijacije oborina, Bio17 Količina oborina u najsušem kvartalu, Bio18 Količina oborina u najtoplijem kvartalu) bila su visokosignifikantno korelirana s pet sastavnica eteričnog ulja (C35 nerol, C42 neril acetat, C51 neril propanoat, C57 α-kurkumen i C58 β-selinen). Rezultati su vrlo slični jer su bioklimatska svojstva korelirana sa zemljopisnom širinom i dužinom. Može se zaključiti da su navedena četiri bioklimatska svojstva najvažnija svojstva o kojima ovisi kemijski sastav eteričnog ulja jer je za njih otkriveno najviše lokusa za koje se smatra da su pod pozitivnim odabirom.

Analizom odnosa između bioklimatske udaljenosti i zemljopisne udaljenosti utvrđeno je da se 46,9 % bioklimatske udaljenosti može objasniti zemljopisnom udaljenošću, dok se 36,6 % (R^2=0,366) biokemijske udaljenosti može objasniti zemljopisnom udaljenošću. Kod regresije genetske na bioklimatsku udaljenost koeficijent determinacije je iznosio R^2=0,097, stoga se može objasniti 9,7 % genetske udaljenosti bioklimatskom udaljenošću. Regresijom pomoću koeficijenta determinacije (R^2=0,224) utvrđeno je da se 22,4 % biokemijske udaljenosti može objasniti bioklimatskom. Utvrđena je značajna korelacija između biokemijske i genetske udaljenosti, pri čemu se 18,3 % biokemijske diferencijacije između populacija može objasniti genetskom udaljenošću. Povezanost između genetske i biokemijske raznolikosti utvrdili su i Melito i sur. (2013) na populacijama *H. italicum* na Sardiniji. U istraživanju Morone-Fortunato i sur. (2010) također je zabilježena povezanost između genetske i kemijske raznolikosti na analiziranim populacijama iz Italije i Korzike. Angioni i sur. (2003) su utvrdili postojanje dvaju kemotipova koji se međusobno i genetski razlikuju kod populacija *H. italicum* ssp. *microphyllum* na Sardiniji. Nepostojanje korelacije između genetske i biokemijske udaljenosti utvrđeno je, pak, u istraživanju 25 populacija ljekovite kadulje (Jug-Dujaković i sur., 2012) i 25 populacija dalmatinskog buhača (Grdiša i sur., 2013) na području rasprostranjenosti duž jadranske obale.

Ovaj rad daje nove spoznaje o genetskoj i biokemijskoj raznolikosti populacija smilja na području Hrvatske. Na velikom broju populacija provedene su brojne analize koje daju odgovore o raspodjeli raznolikosti unutar i između populacija te pobliže objašnjavaju odnose genetske i biokemijske raznolikosti. Dva najistaknutija spoja koja su razdvojila populacije u tri kemotipa neril acetat i α-kurkumen imaju značajnu primjenu u industriji. Nerol i njegovi derivati koriste se u parfemskoj i kozmetičkoj industriji jer sadrže poželjan slatkasti miris, dok se kurkumeni više koriste u prehrambenoj industriji (Ansari i Curtis, 1974). Rezultati istraživanja mogu pridonijeti razvoju budućih oplemenjivačkih programa i komercijalnih sorti *H. italicum* koje trenutno nisu dostupne. Dobiveni rezultati također mogu biti osnova za izradu programa gospodarenja uz očuvanje bioraznolikosti smilja.

6. ZAKLJUČCI

1. Analizirane populacije smilja pokazale su visoku raznolikost pomoću četiri kombinacije početnica koje su rezultirale sa 693 polimorfna AFLP biljega.

2. Analiza molekularne varijance (AMOVA) pokazala je da se većina genetske raznolikosti odnosi na razlike između jedinki unutar populacija (93,08 %), dok je ostatak genetske raznolikosti uzrokovan razlikama između populacija (6,92 %).

3. Ukupna genska raznolikost (H_t) svih populacija iznosila je 0,147. Prosječna genska raznolikost unutar populacija (H_w) bila je 0,142, dok je prosječna genska raznolikost između populacija u suvišku od one uočene unutar populacija (H_b) bila 0,005. Wrightov koeficijent genetske diferencijacije (F_{ST}) na razini svih populacija iznosio je 0,036.

4. Srodstveno stablo izrađeno metodom po Fitchu i Margoliashu na temelju genetskih udaljenosti po Neiju pokazalo je odvajanje 18 populacija smilja na dvije skupine s obzirom na zemljopisno podrijetlo (sjevernojadranske populacije i srednjojadranske i južnojadranske) što je podržano s 96 % *bootstrap* vrijednosti.

5. Utvrđene su dvije izvorne populacije: A i B (BAPS) te tri izvorne populacije: A, B i C (STRUCTURE). Kod K = 2 (BAPS i STRUCTURE) izvornoj populaciji A pripale su sjevernojadranske populacije, a izvornoj populaciji B pripadaju srednjojadranske i južnojadranske populacije.

6. Korelacijom između genetskih i zemljopisnih udaljenosti utvrđeno je da se 26 % genetske diferencijacije između analiziranih populacija može objasniti njihovom prostornom udaljenošću.

7. Analiza lokalne adaptacije populacija smilja pokazala je da od sedam lokusa AFLP koji su pod pozitivnim odabirom utvrđeni u obje metode (BayeScan i Mcheza) pet ih je korelirano s bioklimatskim svojstvima. Najvažnija svojstva su: prosječna temperatura najvlažnijeg kvartala te količina oborina u najsušem kvartalu.

8. Analizom eteričnog ulja dobiveno je ukupno 90 spojeva od čega su 84 spoja identificirana. U svih 18 populacija smilja izolirano je 50 spojeva; 18

najzastupljenijih spojeva nađeno je u koncentraciji većoj od 5 % u najmanje jednoj populaciji.

9. Sedam spojeva bilo je međusobno jako pozitivno korelirano: neril acetat i nerol; neril propanoat i linalool te neril propanoat i nerol; β-selinen i α-kurkumen te δ-selinen i β-selinen; neril izovalerat i nerol te neril izovalerat i neril acetat. Jaka negativna korelacija zabilježena je između sedam spojeva: α-kurkumen bio je jako negativno koreliran s nerolom, neril acetatom i neril propanoatom; β-selinen bio je negativno koreliran s nerolom i neril acetatom, a spoj δ-selinen s nerolom i neril acetatom.

10. Analiza glavnih sastavnica, analiza skupina i diskriminacijska analiza pokazale su se prikladnim multivarijantnim statističkim metodama za određivanje kemotipova unutar analiziranih populacija. Na temelju devet najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja populacije su podijeljene u tri skupine: (A) sjevernojadranske populacije koje karakterizira veći postotak neril acetata, (B) srednjojadranske populacije te (C) južnojadranske populacije koje karakterizira veći postotak α-kurkumena. Može se reći da je ovo svojstvo najviše genetički kontrolirano, s obzirom na to da su biljke bile posađene u istim uvjetima.

11. Utvrđena je korelacija između genetske i biokemijske udaljenosti između populacija, 18,3 % biokemijske udaljenosti može se objasniti genetskom udaljenošću.

7. POPIS LITERATURE

1. Adams R. P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry, 4th Ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.
2. Analiza stanja prirode u Republici Hrvatskoj za razdoblje 2008. - 2012. (preuzeto s: http://www.dzzp.hr/analiza-stanja-prirode-u-republici-hrvatskoj/razdoblje-2008-2012/analiza-stanja-prirode-u-republici-hrvatskoj-za-razdoblje-2008-2012-1379.html; 28.10.2017.).
3. Anderberg A.A. (1991). Taxonomy and phylogeny of the tribe Gnaphalieae (Asteraceae). Opera Bot 104, 1-195.
4. Andreani S., Uehara A., Blagojević P., Radulović N., Muselli A., Baldovini N. (2019). Key odorants of industrially-produced *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* essential oil. Ind Crop Prod 132, 275-280.
5. Angioni A., Barra A., Arlorio M., Coisson J.D., Russo M.T., Pirisi F.M., Satta M., Cabras P. (2003). Chemical composition, plant genetic differences, and antifungal activity of the essential oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp *microphyllum* (Willd) Nym. J Agr Food Chem 51, 1030-1034.
6. Ansari, H.R., Curtis, A.J. (1974). Sesquiterpenes in the perfumery industry. J. Soc. Cosmet. Chem. 25, 203–231.
7. Antao, T. & Beaumont, M. A. (2011). Mcheza: a workbench to detect selection using dominant markers. Bioinformatics 27, 1717–1718.
8. Appendino G., Ottino, M., Marquez N., Bianchi F., Giana A., Ballero M., Sterner O., Fiebich B.L., Munoz E. (2007). Arzanol an anti-inflammatory and anti-HIV-1 phloroglucinol alpha-pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*. J Nat Prod 70, 608-612.
9. Bauer J., Koeberle A., Dehm F., Pollastro F., Appendino G., Northoff H., Rossi A., Sautebin L., Werz O. (2011). Arzanol, a prenylated heterodimeric phloroglucinyl pyrone, inhibits eicosanoid biosynthesis and exhibits anti-inflammatory efficacy in vivo. Biochem Pharmacol 81, 259-268.
10. Benelli G., Canale A., Conti B. (2014). Eco-friendly control strategies against the asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): Repellency and toxic activity of plant essential oils and extracts. Pharmacologyonline 1, 44-50.
11. Benelli G., Pavela R., Giordani C., Casettari L., Curzi G., Cappellacci L., Petrelli R., Maggi F. (2018). Acute and sub-lethal toxicity of eight essential oils of

commercial interest against the filariasis mosquito *Culex quinquefasciatus* and the housefly *Musca domestica*. Ind Crop Prod 112, 668-680.

12. Bertoli A., Conti B., Mazzoni V., Meini L., Pistelli L. (2012). Volatile chemical composition and bioactivity of six essential oils against the stored food insect *Sitophilus zeamais* Motsch (Coleoptera Dryophthoridae). Nat Prod Res 26, 2063-2071.
13. Bianchini A., Tomi P., Costa J., Bernardini A.F. (2001). Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. subsp. *italicum* essential oils from Corsica (France). Flavour Frag J 16, 30-34.
14. Bianchini A., Tomi P., Bernardini A.F., Morelli L., Flamini G., Cioni P.L., Usai M., Marchetti M. (2003). A comparative study of volatile constituents of two *Helichrysum italicum* (Roth) Guss. Don Fil subspecies growing in Corsica (France), Tuscany and Sardinia (Italy). Flavour Frag J 18, 487-491.
15. Bianchini A., Santoni F., Paolini J., Bernardini A.F., Mouillot D., Costa J. (2009). Partitioning the relative contributions of inorganic plant composition and soil characteristics to the quality of *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (Roth) G. Don Fil. Essential Oil. Chem Biodivers 6, 1014-1033.
16. Blažević N., Petričić J, Stanić G., Maleš Ž. (1995). Variations in yields and composition of immortelle (*Helichrysum italicum*, Roth Guss.) essential oil from different locations and vegetation periods along Adriatic coast. Acta Pharm 45, 517-522.
17. Brunetti G., Ruta C., Traversa A., D'Ambruoso G., Tarraf W., De Mastro F., De Mastro G., Cocozza C. (2018). Remediation of a heavy metals contaminated soil using mycorrhized and non-mycorrhized *Helichrysum italicum* (Roth) Don. Land Degrad Dev 29, 91-104.
18. Chao S., Young G., Oberg C., Nakaoka K. (2008). Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. Flavour Frag J 23, 444-449.
19. Chinou I.B., Roussis V., Perdetzoglou D., Loukis A. (1996). Chemical and biological studies on two *Helichrysum* species of Greek origin. Planta Med 62, 377-379.
20. Clapham A. R. (1976). *Helichrysum* Mill., in: Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M., Webb, D. A. (Eds.) Flora Europaea. Vol. 4. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 128-131.
21. Conti B., Canale A., Bertoli A., Gozzini F., Pistelli L. (2010). Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res 107, 1455-1461.

22. Corander J., Waldmann P., Sillanpää. M.J. (2003). Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. Genetics 163: 367-374.
23. Corander J., Marttinen P. (2006). Bayesian identification of admixture events using multi-locus molecular markers. Mol Ecol 15: 2833-2843.
24. Corander J., Marttinen P., Siren J., Tang J. (2009). BAPS: Bayesian Analysis of Population Structure. Manual v. 5.3. Department of Mathematics, Åbo Akademi University, Finland.
25. Cosar G., Cubukcu B. (1990). Antibacterial activity of *Helichrysum* species growing in Turkey. Fitoterapia LXI, 161-164.
26. Costa P., Loureiro J.M., Teixeira M.A., Rodrigues A.E. (2015). Extraction of aromatic volatiles by hydrodistillation and supercritical fluid extraction with CO2 from *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* growing in Portugal. Ind Crop Prod 77, 680-683.
27. Cristofari G., Znini M., Majidi L., Costa, J., Hammouti B., Paolini, J. (2012). *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* essential oil as environmentally friendly inhibitor on the corrosion of mil steel in hydrochloric acid. Int J Electrochem Sc 7, 9024-9041.
28. Cui H.Y., Zhao C.T., Lin L. (2015). Antibacterial activity of *Helichrysum italicum* oil on vegetables and its mechanism of action. J Food Process Pres 39, 2663-2672.
29. Cui H.Y., Li W., Li C.Z., Lin L. (2016). Synergistic effect between *Helichrysum italicum* essential oil and cold nitrogen plasma against *Staphylococcus aureus* biofilms on different food-contact surfaces. Int J Food Sci Tech 51, 2493-2501.
30. D'Amato G. (1971). Numeri cromosomici per la Flora Italiana. Inf Bot Ital 3, 124-157.
31. D'Abrosca B., Buommino E., Caputo P., Scognamiglio M., Chambery A., Donnarumm G., Fiorentino A. (2016). Phytochemical study of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Spectroscopic elucidation of unusual amino-phloroglucinols and antimicrobial assessment of secondary metabolites from medium-polar extract. Phytochemistry 132, 86-94.
32. De la Garza A.L., Etxeberria U., Lostao M.P., San Roman B., Barrenetxe J., Martinez J.A., Milagro F.I. (2013). *Helichrysum* and grapefruit extracts inhibit carbohydrate digestion and absorption, improving postprandial glucose levels and hyperinsulinemia in rats. J Agr Food Chem 61, 12012-12019.
33. Di Pierro, E. A., Mosca E., Rocchini D., Binelli G., Neale D. B., La Porta N. (2016). Climate-related adaptive genetic variation and population structure in natural stands of Norway spruce in the South-Eastern Alps. Tree Genetics & Genomes, 12(2). doi:10.1007/s11295-016-0972-4

34. Djihane B., Wafa N., Elkhamssa S., Pedro D.H.J., Maria A.E., Mihoub Z.M. (2017). Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. Saudi Pharm J 25, 780-787.
35. Domac R. (1994). Flora Hrvatske - Priručnik za određivanje bilja. Školska knjiga, Zagreb.
36. Drapeau J., Frohler, C., Touraud D., Krockel U., Geier M., Rose A., Kunz W. (2009). Repellent studies with *Aedes aegypti* mosquitoes and human olfactory tests on 19 essential oils from Corsica, France. Flavour Frag J 24, 160-169.
37. Earl D.A., Vonholdt B.M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conserv Genet Resour 4 (2):359-361. doi:10.1007/s12686-011-9548-7
38. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol Ecol 14: 2611-2620.
39. Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitocondrial DNA restriction sites. Genetics 131: 479-491.
40. Facino R.M., Carini M., Mariani M., Cipriani C. (1988). Anti-erythematous and photoprotective activities in guinea-pigs and in man of topically applied flavonoids from *Helichrysum italicum* G. Don. Acta Therap 14, 323-345.
41. Facino R.M., Carini M., Franzoi L., Pirola O., Bosisio E. (1990). Phytochemical characterization and radical scavenger activity of flavonoids from *Helichrysum italicum* G. Don. (Compositae). Pharmacol Res 22, 709-721.
42. Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. Genetics 164: 1567-1587.
43. Fitch W. M., Margoliash E. (1967). Construction of phylogenetic trees: A method based on mutation distances as estimated from cytochrome c sequences is of general applicability. Science 155: 279-284.
44. Foll, M. & Gaggiotti, O. A. (2008). Genome-Scan Method to Identify Selected Loci Appropriate for Both Dominant and Codominant Markers: A Bayesian Perspective. Genetics 180, 977–993.
45. Galbany-Casals M., Saez L., Benedi C. (2006). A taxonomic revision of *Helichrysum* sect. Stoechadina (Asteraceae, Gnaphalieae). Can J Bot 84, 1203-1232.

46. Galbany-Casals M., Blanco-Moreno J.M., Garcia-Jacas N., Breitwieser I., Smissen R.D. (2011). Genetic variation in Mediterranean *Helichrysum italicum* (Asteraceae; Gnaphalieae): do disjunct populations of subsp. *microphyllum* have a common origin? Plant Biology 13, 678-687.
47. Generalić Mekinić I., Skroza D., Ljubenkov I., Krstulović L., Možina S.S., Katalinić V. (2014). Phenolic acids profile, antioxidant and antibacterial activity of chamomile, common yarrow and immortelle (Asteraceae). Nat Prod Commun 9, 1745-1748.
48. Generalić Mekinić I., Skroza D., Ljubenkov I., Katalinić V. (2016). Insight into the presence of stilbenes in medicinal plants traditionally used in Croatian folk medicine. Nat Prod Commun 11, 833-835.
49. Giuliani C., Lazzaro L., Calamassi R., Calamai L., Romoli R., Fico G., Foggi B., Lippi M.M. (2016). A volatolomic approach for studying plant variability: the case of selected *Helichrysum* species (Asteraceae). Phytochemistry 130, 128-143.
50. Goncalves S., Moreira, E., Grosso C., Andrade P.B., Valentao P., Romano A., (2017). Phenolic profile, antioxidant activity and enzyme inhibitory activities of extracts from aromatic plants used in Mediterranean diet. J Food Sci Tech Mys 54, 219-227.
51. Grdiša M., Babić S., Periša M., Carović-Stanko Kl., Kolak I., Liber Z., Jug-Dujaković M., Šatović Z. (2013). Chemical diversity of the natural populations of Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir. /Sch. Bip.) in Croatia. Chemistry & biodiversity, 10, 3; 460-472, doi:10.1002/cbdv.201200015
52. Grdiša M., Liber Z., Radosavljević I., Carović-Stanko K., Kolak I., Šatović Z. (2014). Genetic Diversity and Structure of Dalmatian Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* Trevir. /Sch./ Bip., Asteraceae) within the Balkan Refugium. PLoS ONE 9(8): e105265. doi:10.1371/journal.pone.0105265
53. Grdiša M., Radosavljević I., Liber L., Stefkov G., Ralli P., Chatzopoulou, P.S. Carović-Stanko K., Šatović Z. (2019). Divergent selection and genetic structure of *Sideritis scardica* populations from southern Balkan Peninsula as revealed by AFLP fingerprinting. Scientific Reports 9:12767, https://doi.org/10.1038/s41598-019-49097-x
54. Grifoni D., Bacci L., Di Lonardo S., Pinelli P., Scardigli A., Camilli F., Sabatini F., Zipoli G., Romani A. (2014). UV protective properties of cotton and flax fabrics dyed with multifunctional plant extracts. Dyes Pigments 105, 89-96.
55. Guinoiseau E., Lorenzi V., Luciani A., Muselli A., Costa J., Casanova J., Berti J. (2013). Biological properties and resistance reversal effect of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don., in: Méndez Vilas, A. (Ed.), Microbial pathogens and strategies for

combating them: science, technology and education. Formatex Research Center, Badajoz, pp. 1073-1080.

56. Hamrick J.L., Godt M.J.W. (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. Philosophical Transactions: Biological Sciences 351: 1291–1298
57. Han X., Beaumont C., Stevens N., Parker T. L. (2017). Chemical composition analysis and in vitro biological activities of ten essential oils in human skin cells. Biochimie Open 5, 1-7.
58. Herrando-Moraira S., Blanco-Moreno J. M., Sáez L. & Galbany-Casals M. (2016). Re-evaluation of the *Helichrysum italicum* complex (Compositae: Gnaphalieae): A new species from Majorca (Balearic Islands). Collect Bot 35, e009.
59. Herrmann D., Poncet B.N., Manel S., Rioux D., Gielly L., Taberlet P., Gugerli F. (2010). Selection criteria for scoring amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) positively affect the reliability of population genetic parameter estimates. Genome 53: 302–10. doi: 10.1139/g10-006.
60. Hochmuth D.H. (2006). MassFinder 3 Software (incorporating W.A. König, D. Joulain, D.H. Hochmuth, GC–MS Library: Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils), Dr. Hochmuth Scientific Consulting, Hamburg, Germany
61. Hoffmann A. A. i Willi Y. (2008). Detecting genetic responses to environmental change. Nat Rev Genet 9, 421–432.
62. Hrvatska baza podataka o biljnim genetskim izvorima (http://cpgrd.hapih.hr/).
63. Hubisz M. J., Falush D. Stephens M., Pritchard J. K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. Mol Ecol Resources 9: 1322-1332.
64. Ivanovic J., Ristic M., Skala D. (2011). Supercritical CO2 extraction of *Helichrysum italicum*: Influence of CO2 density and moisture content of plant material. J Supercrit Fluid 57, 129-136.
65. Jerkovic I., Rajic M., Marijanovic Z., Bilic M., Jokic S. (2016). Optimization of supercritical CO2 extraction of dried *Helichrysum italicum* flowers by response surface methodology: GC-MS profiles of the extracts and essential oil. Sep Sci Technol 51, 2925-2931.
66. Jug-Dujaković M., Ristić M., Pljevljakušić D., Dajić-Stevanović Z., Liber Z., Hančević K., Radić T., Šatović Z. (2012). High Diversity of Indigenous Populations of Dalmatian Sage *(Salvia officinalis* L.) in Essential-Oil Composition Chemistry & biodiversity Vol. 9.
67. Jug-Dujaković M., Liber, Z., Grdiša, M., Bogdanović S., Šatović Z. (2015). The Sixth Balkan Botanical Congres, Sept. 14-18, 2015, Rijeka, Croatia

68. Jug‐Dujaković M., Ninčević T., Liber Z., Grdiša M., Šatović Z. (2020). *Salvia officinalis* survived in situ Pleistocene glaciation in 'refugia within refugia' as inferred from AFLP markers. Plant Systematics and Evolution 306:38, https://doi.org/10.1007/s00606-020-01665-9
69. Kaeuffer R., Reale D., Coltman D.W., Pontier D. (2007). Detecting population structure using STRUCTURE software: effect of background linkage disequilibrium. Heredity 99: 374-380
70. Karača S., Trifković K., Bušić, A., Đorđević V., Belščak-Cvitanović A., Cebin A.V., Bugarski B., Komes D. (2019). The functional potential of immortelle (*Helichrysum italicum*) based edible films reinforced with proteins and hydrogel particles. Lwt-Food Sci Technol 99, 387-395.
71. Karasartov B.S, Kurkin V.A, Zapesochnaya G.G. (1992). Coumarins and flavonoids of the flowers of *Helichrysum italicum*. Chem Natl Compds. 28:504–505.
72. Kladar N.V., Anackov G.T., Rat M.M., Srdenovic B.U., Grujic N.N., Sefer E.I., Bozin B.N. (2015). Biochemical characterization of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* (Asteraceae) from Montenegro: Phytochemical screening, chemotaxonomy, and antioxidant properties. Chem Biodivers 12, 419-431.
73. Kopelman N.M., Mayzel J., Jakobsson M., Rosenberg N.A. & Mayrose I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. Mol Ecol Resour. 15, 1179–1191, doi: 10.1111/1755-0998.12387.
74. Körner C. (2003). Alpine Plant Life. Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems 2nd edn, Springer Science & Business Media.
75. Kothavade P.S., Nagmoti D.M., Bulani V.D., Juvekar A.R. (2013). Arzanol, a potent mPGES-1 inhibitor: Novel anti-inflammatory agent. Sci World J.
76. Kullback S., Leibler R.A. (1951). On information and sufficiency. Ann Math Stat 22:79-86.
77. Lenormand T. 2002. Gene flow and the limits to natural selection. Trends Ecol. Evol. 17:183–89.
78. Lewontin R.C. (1972). The apportionment of human diversity. Evol Biol 6: 381–398
79. Lorenzi V., Muselli A., Bernardini A.F., Berti L., Pages J.M., Amaral L., Bolla J.M. (2009). Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from Gram-negative species. Antimicrob Agents Ch 53, 2209-2211.
80. Loveless M.D, Hamrick J.L. (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. Annu Rev Ecol Syst 15: 65-95.

81. Lynch M., Milligan B.G. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Mol Ecol 3: 91 – 99.
82. Maksimovic S., Kesic Z., Lukic I., Milovanovic S., Ristic M., Skala D. (2013). Supercritical fluid extraction of curry flowers, sage leaves, and their mixture. J Supercrit Fluid 84, 1-12.
83. Maksimovic S., Tadic V., Skala D., Zizovic I. (2017). Separation of phytochemicals from *Helichrysum italicum*: An analysis of different isolation techniques and biological activity of prepared extracts. Phytochemistry 138, 9-28.
84. Maksimovi S., Tadic V., Ivanovic J., Radmanovic T., Milovanovic S., Stankovic M., Zizovic I. (2018). Utilization of the integrated process of supercritical extraction and impregnation for incorporation of *Helichrysum Italicum* extract into corn starch xerogel. Chem Ind Chem Eng Q 24, 191-200.
85. Malenica Staver M., Gobin I., Ratkaj I., Petrovic M., Vulinovic A., Dinarina-Sablic M., Broznic D. (2018). In vitro antiproliferative and antimicrobial activity of the essential oil from the flowers and leaves of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don growing in central Dalmatia (Croatia). J Essent Oil Bear Pl 21, 77-91.
86. Mancini E., De Martino L., Marandino A., Scognamiglio M.R., De Feo V. (2011). Chemical composition and possible in vitro phytotoxic activity of *Helichrsyum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum*. Molecules 16, 7725-7735.
87. Manel, S., Poncet, B. N., Legendre, P., Gugerli, F. & Holderegger, R. (2010). Common factors drive adaptive genetic variation at different spatial scales in *Arabis alpina*. Mol Ecol 19, 3824–3835.
88. Mari A., Napolitano A., Masullo M., Pizza C., Piacente S. (2014). Identification and quantitative determination of the polar constituents in *Helichrysum italicum* flowers and derived food supplements. J Pharmaceut Biomed 96, 249-255.
89. Marjanac L., Marjanac T. (2004). Glacial history of the Croatian Adriatic and Coastal Dinarides. U: Quartenary glaciations—extent and chronology, part I: Europe: developments in quaternary science. Ehlers J., Gibbard P.L. (ur), Elsevier, Amsterdam, 2: 19–26.
90. Mastelic J., Politeo O., Jerkovic I., Radosevic N., (2005). Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions. Chem Nat Compd+ 41, 35-40.
91. Mastelic J., Politeo O., Jerkovic I. (2008). Contribution to the analysis of the essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. - Determination of ester bonded acids and phenols. Molecules 13, 795-803.

92. Matthes MC, Daly A, Edwards KJ. (1998). Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). In: Karp A, Isaac PG, Ingram DS, editors. Molecular tools for screening biodiversity 10.1. London: Chapman and Hall. pp 183–190.
93. Melito S., Sias A., Petretto G.L., Chessa M., Pintore G., Porceddu A. (2013). Genetic and metabolite diversity of Sardinian populations of *Helichrysum italicum*. Plos One 8.
94. Melito S., Petretto G.L., Podani J., Foddai M., Maldini, M., Chessa M., Pintore G. (2016). Altitude and climate influence *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* essential oils composition. Ind Crop Prod 80, 242-250.
95. Molnar M., Jerkovic I., Suknovic D., Rajs B.B., Aladic K., Subaric D., Jokic S. (2017). Screening of six medicinal plant extracts obtained by two conventional methods and supercritical CO_2 extraction targeted on coumarin content, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity and total phenols content. Molecules 22.
96. Monteiro C.M., Calheiros, C.S.C., Martins J.P., Costa F.M., Palha P., de Freitas S., Ramos N.M.M., Castro P.M.L. (2017a). Substrate influence on aromatic plant growth in extensive green roofs in a Mediterranean climate. Urban Ecosyst 20, 1347-1357.
97. Monteiro C.M., Calheiros C.S.C., Palha P., Castro P.M.L. (2017b). Growing substrates for aromatic plant species in green roofs and water runoff quality: pilot experiments in a Mediterranean climate. Water Sci Technol 76, 1081-1089.
98. Morone-Fortunato I., Montemurro C., Ruta C., Perrini R., Sabetta W., Blanco A., Lorusso E., Avato P. (2010). Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm. Ind Crop Prod 32, 639-649.
99. Mouahid A., Dufour C., Badens E. (2017). Supercritical CO2 extraction from endemic Corsican plants; comparison of oil composition and extraction yield with hydrodistillation method. J Co2 Util 20, 263-273.
100. Mucsi I., Gyulai Z., Beladi I. (1992). Combined effects of flavonoids and acyclovir against herpesviruses in cell-cultures. Acta Microbiol Hung 39, 137-147.
101. Müller C. M., Schulz B., Lauterbach D., Ristow M., Wissemann V., Gemeinholzer B. (2016). *Geropogon hybridus* (L.) Sch.Bip. (Asteraceae) exhibits micro-geographic genetic divergence at ecological range limits along a steep precipitation gradient. Plant Systematics and Evolution, 303 (1), 91–104. doi:10.1007/s00606-016-1354-y
102. Narum S. R. i Hess J. E. (2011).Comparison of F-ST outlier tests for SNP loci under selection. *Mol Ecol Resour* **11**, 184–194

103. Nielsen R. (2005). Molecular signatures of natural selection. Annu Rev Genet 39, 197–218.
104. Nikolić T. ur. (2015): Flora Croatica baza podataka (http://hirc.botanic.hr/fcd). Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (datum pristupa: 7.01.2020).
105. Ninčević T. (2017). Uzgoj smilja - od sjemena do berbe. Gospodarski list br. 5 (od 15.03.2017).
106. Nosil P., Funk D. J. i Ortiz-Barrientos D. (2009). Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Mol Ecol* **18**, 375–402
107. Nostro A., Germano M.P., D'Angelo V., Marino A., Cannatelli M.A. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lett Appl Microbiol 30, 379-384.
108. Nostro A., Bisignano G., Cannatelli M.A., Crisafi G., Germano M.P., Alonzo V., (2001). Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Ag 17, 517-520.
109. Nostro A., Cannatelli M.A., Musolino A.D., Procopio F., Alonzo V. (2002). *Helichrysum italicum* extract interferes with the production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus*. Lett Appl Microbiol 35, 181-184.
110. Nostro A., Cannatelli M.A., Marino A., Picerno I., Pizzimenti F.C., Scoglio M.E., Spataro P. (2003). Evaluation of antiherpesvirus-1 and genotoxic activities of *Helichrysum italicum* extract. Microbiologica 26, 125-128.
111. Nybom H., Bartish V. (2000). Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 3(2): 93-114.
112. Oliva A., Garzoli S., Sabatino M., Tadić V., Costantini S, Ragno, R., Božović M. (2019). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. (Asteraceae) from Montenegro. Nat Prod Res 3, 1-4.
113. Ornano L., Venditti A., Sanna C., Ballero M., Maggi F., Lupidi G., Bramucci M., Quassinti L., Bianco A. (2015). Chemical composition and biological activity of the essential oil from *Helichrysum microphyllum* Cambess. ssp. *tyrrhenicum* Bacch., Brullo e Giusso growing in La Maddalena Archipelago, Sardinia. J Oleo Sci 64, 19-26.
114. Paolini J., Desjobert J.M., Costa J., Bernardini A.F., Castellini C.B., Cioni P.L., Flamini G., Morelli I. (2006). Composition of essential oils of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil subsp. *italicum* from Tuscan Archipelago islands. Flavour Frag J 21, 805-808.

115. Papafotiou M., Tassoula L., Mellos K. (2018). Construction and maintenance factors affecting most the growth of shrubby Mediterranean native plants on urban extensive green roofs. Acta Hortic. 1215, 101-108.
116. Peace Rhind J. (2012). Essential oils: A handbook for aromatherapy practice, second ed. Singing Dragon, Philadelphia, pp. 148-149.
117. Pérez-Figueroa A., Garcia-Pereira M. J., Saura M., Rolan-Alvarez E., Caballero A. (2010). Comparing three different methods to detect selective loci using dominant markers. *J Evolution Biol* 23, 2267–2276
118. Perrini R., Morone-Fortunato I., Lorusso E., Avato P. (2009). Glands, essential oils and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *microphyllum* (willd.) Nyman. Ind Crop Prod 29, 395-403.
119. Pietta P., Mauri P., Gardana C., Facino R.M., Carini M., (1991). High-performance liquid-chromatographic determination of flavonoid glucosides from *Helichrysum italicum*. J Chromatogr 537, 449-452.
120. Pohajda I., Dragun G. Puharić Visković L. Savjetodavna služba. (2015).
121. Poli F., Muzzoli M., Sacchetti G., Tassinato G., Lazzarin R., Bruni A. (2003). Antioxidant activity of supercritical CO2 extracts of *Helichrysum italicum*. Pharm Biol 41, 379-383.
122. Poncet B.N., Herrmann D., Gugerli F., Taberlet P., Holderegger R., Gielly L., Rioux D., Thuiller W., Aubert S., Manel S. (2010). Tracking genes of ecological relevance using a genome scan in two independent regional population samples of *Arabis alpina*. Mol. Ecol. 19:2896–907.
123. Pravilnik o sakupljanju zavičajnih divljih vrsta (NN 114/2017), (preuzeto s: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2017_11_114_2663.html; 16.03.2020.).
124. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945-959.
125. Pritchard J.K., Pickrell J.K., Coop G. (2010). The genetics of human adaptation: hard sweeps, soft sweeps, and polygenic adaptation. Current Biology 20(4): R208 - R215.
126. Rigano D., Formisano C., Senatore F., Piacente S., Pagano E., Capasso R., Borrelli F., Izzo A.A. (2013). Intestinal antispasmodic effects of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum* and chemical identification of the active ingredients. J Ethnopharmacol 150, 901-906.
127. Rigano D., Formisano C., Pagano E., Senatore F., Piacente S., Masullo M., Capasso R., Izzo A.A., Borrelli F. (2014). A new acetophenone derivative from flowers of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum*. Fitoterapia 99, 198-203.

128. Rohlf F.J. (2000). NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1. Exeter Publications, New York, USA.
129. Rosa A., Deiana M., Atzeri A., Corona G., Incani A., Melis M.P., Appendino G., Dessi M.A. (2007). Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated alpha-pyrone-phloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum.* Chem-Biol Interact 165, 117-126.
130. Rosa A., Pollastro F., Atzeri A., Appendino G., Melis M.P., Deiana M., Incani A., Loru D., Dessi A. (2011). Protective role of arzanol against lipid peroxidation in biological systems. Chem Phys Lipids 164, 24-32.
131. Rossi P.G., Berti L., Panighi J., Luciani A., Maury J., Muselli A., Serra D.D., Gonny M., Bolla J.M. (2007). Antibacterial action of essential oils from Corsica. J Essent Oil Res 19, 176-182.
132. Rousset F. (1997). Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. Genetics 145: 1219-1228.
133. Sala A., Recio M., Giner R.M., Manez S., Tournier H., Schinella G., Rios J.L. (2002). Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*. The Journal of pharmacy and pharmacology 54, 365-371.
134. Sala A., Recio M.C., Schinella G.R., Manez S., Giner R.M., Cerda-Nicolas M., Rios J.L., (2003). Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. Eur J Pharmacol 461, 53-61.
135. Sambrook J., Fritch E.F., Maniatis T. (1989). Molekular cloning: A laboratorial manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
136. SAS Institute Inc. (2011). Base SAS® 9.3 Procedures Guide; NC, USA
137. Savolainen O, Pyhajarvi T, Knurr T. 2007. Gene flow and local adaptation in trees. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 38:595–619.
138. Schinella G.R., Tournier H.A., Manez S., de Buschiazzo P.M., Recio M.D., Rios J.L. (2007). Tiliroside and gnaphaliin inhibit human low density lipoprotein oxidation. Fitoterapia 78, 1-6.
139. Schipilliti L., Bonaccorsi I.L., Ragusa S., Cotroneo A., Dugo P. (2016). *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. subsp. *italicum* oil analysis by gas chromatography - carbon isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS): a rapid method of genotype differentiation? J Essent Oil Res 28, 193-201.
140. Schneider S., Roessli D., Excoffier L. (2000). ARLEQUIN Version 2.000: A Software for Population Genetic Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva.
141. Schönswetter P, Tribsch A. (2005). Vicariance and dispersal in the alpine perennial Bupleurum stellatum L. (Apiaceae). Taxon 54:725–732.

142. Stepanović B., Radanović D., Turšić I., Nemčević N., Ivanec J., (2009). Uzgoj ljekovitog i aromatičnog bilja. Jan-Spider, Pitomača, pp. 243-245.
143. Stucki, S. & Joost, S. (2015). Samβada: User manual, Version v0.5.1. URL, http://lasig.epfl.ch/sambada.
144. Stupar M., Grbic M.L., Dzamic A., Unkovic N., Ristic M., Vukojevic J. (2014). Antifungal activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don (Asteraceae) essential oil against fungi isolated from cultural heritage objects. Arch Biol Sci 66, 1539-1545.
145. Tagliatela-Scafati O., Pollastro F., Chianese G., Minassi A., Gibbons S., Arunotayanun W., Mabebie B., Ballero M., Appendino G. (2013). Antimicrobial phenolics and unusual glycerides from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*. J Nat Prod 76, 346-353.
146. Tomas-Barberan F., Iniesta-Sanmartin E., Tomas-Lorente F., Rumbero A. (1990). Antimicrobial phenolic compounds from three Spanish *Helichrysum* species. Phytochemistry 29, 1093-1095.
147. Tundis R., Statti G.A., Conforti F., Bianchi A., Agrimonti C., Sacchetti G., Muzzoli M., Ballero M., Menichini F., Poli F. (2005). Influence of environmental factors on composition of volatile constituents and biological activity of *Helichrysum italicum* (Roth) Don (Asteraceae). Nat Prod Res 19, 379-387.
148. Tzanova M., Grozeva N., Gerdzhikova M., Atanasov V., Terzieva S., Prodanova R. (2018). Biochemical composition of essential oil of Corsican *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don, introduced and cultivated in South Bulgaria. Bulg J Agric Sci 24, 1071-1077.
149. Usai M., Foddai M., Bernardini A.F., Muselli A., Costa J., Marchetti M. (2010). Chemical composition and variation of the essential oil of wild Sardinian *Helichrysum italicum* G. Don subsp. *microphyllum* (Willd.) Nym from vegetative period to post-blooming. J Essent Oil Res 22, 373-380.
150. Viegas D.A., Palmeira-De-Oliveira A., Salgueiro L., Martinez-De-Oliveira J., Palmeira-De-Oliveira R. (2014). *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data. J Ethnopharmacol 151, 54-65.
151. Vilas A., Perez-Figueroa A., Caballero A. (2012). A simulation study on the performance of differentiation-based methods to detect selected loci using linked neutral markers. J Evolution Biol 25, 1364–1376.
152. Voinchet V., Giraud-Robert A.M. (2007). Utilisation de l'huile essentielle d'hélichryse italienne et de l'huile végétale de rose musquée après intervention de chirurgie plastique réparatrice et esthétique. Phytothérapie 5, 67-72.
153. Wang T., Chen G.P., Zan Q.J., Wang C.B., Su Y.J. (2012). AFLP Genome Scan to Detect Genetic Structure and Candidate Loci under Selection for Local

Adaptation of the Invasive Weed Mikania micrantha. Plos One 7, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041310.

154. Ward J.H. (1963). Hierarchical groupings to optimize an objective function. Journal of the American Statistical Association, 58: 236-244.
155. Werner J., Ebrahim W., Ozkaya F.C., Mandi A., Kurtan T., El-Neketi M., Liu Z., Proksch P. (2019). Pyrone derivatives from *Helichrysum italicum*. Fitoterapia 133, 80-84.
156. Westberg E., Ohali S., Shevelevich A., Fine P., Barazani O. (2013). Environmental effects on molecular and phenotypic variation in populations of *Eruca sativa* across a steep climatic gradient. Ecology and evolution 3, 2471–2484
157. Weyerstahl P., Marschall-Weyerstahl H., Weirauch M., Meier N., Manteuffel E., Leimner J., Sholtz S. (1986). Isolation and synthesis of compounds from the essential oil of *Helichrysum italicum*, in: Brunke, E. S. (ed.), Progress in Essential Oil Research. Walter de Gruyter, Berlin, pp. 178-195.
158. Wleklik M., Luczak M., Panasiak W., Kobus M., Lammerzarawska E. (1988). Structural basis for antiviral activity of flavonoids - naturally-occurring compounds. Acta Virol 32, 522-525.
159. Wollenweber E., Christ M., Dunstan R.H., Roitman J.N., Stevens J.F. (2005). Exudate flavonoids in some Gnaphalieae and Inuleae (Asteraceae). Z Naturforsch C 60, 671-678.
160. Wright S. (1951). The genetical structure of populations. Annals of Eugenics 15: 323-354.
161. Zakon o zaštiti prirode NN 80/13, 15/18, 14/19, 127/19, (Preuzeto s: https://www.zakon.hr/z/403/Zakon-o-za%C5%A1titi-prirode; 16.03.2020.).
162. Zapesochnaya G.G., Dzyadevich T.V., Karasartov B.S. (1990). Phenol compounds of *Helichrysum italicum*. Khim Prir Soedin+, 409-410.
163. Zapesochnaya G.G., Kurkin V.A., Kudryavtseva T.V., Karasartov B.S., Cholponbaev K.S., Tyukavkina N.A., Ruchkin V.E. (1992). Dicoffeeoylquinic acids of *Helichrysum italicum* and *Achillea cartilaginea*. Khim Prir Soedin+, 50-55.
164. Zeljkovic S.C., Solic M.E., Maksimovic M. (2015). Volatiles of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don from Croatia. Nat Prod Res 29, 1874-1877.
165. Zhivotovsky L.A. (1999). Estimating population structure in diploids with multilocus DNA markers. Mol Ecol 8: 907 – 913.

8. ŽIVOTOPIS

Tonka Ninčević rođena je 24. lipnja 1987. godine u Splitu. Srednjoškolsko obrazovanje stekla je u V. gimnaziji „Vladimir Nazor“ u Splitu (2002.-2006.). Međusveučilišni preddiplomski studij u čijem su izvođenju sudjelovali Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Sveučilište u Splitu i Institut za jadranske kulture i melioraciju krša završila je 2009. godine završnim radom „Razmnožavanje smilja *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. reznicama“. Agronomski fakultet u Zagrebu upisala je 2009. godine, usmjerenje agroekologija. Diplomirala je 2011. godine s diplomskim radom: „Ispiranje nitrata pri gnojidbi kukuruza različitim dozama dušika“ te stekla akademsku titulu magistre inženjerke agroekologije. Tijekom studiranja bila je stipendistica Sveučilišta u Splitu (2009.) i stipendistica Grada Splita (2010. i 2011.) za nadarene studente.
Od 2012. do 2016. godine radila je pri Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša kao: pripravnica na stručnom osposobljavanju za rad pri zavodu za biljne znanosti (2012.-2013.); suradnica na EU projektu IPA CBC CRO-BIH "Mediteransko ljekovito bilje" (2013.-2014.); suradnica na projektu „Razvoj tehnologije proizvodnje presadnica smilja (*Helichrysum italicum*)“ (2014.-2015.); suradnica na projektu "IPA Adriatic model forest“ (2014.) te suradnica na EU projektu "HvaR&D – Uvođenje GIS i ICT tehnologija u kurikulume fakultativne nastave i njihova primjena u održivom razvoju otoka Hvara" (2015.-2016.). Poslijediplomski doktorski studij Poljoprivredne znanosti na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu upisala je akademske godine 2013./2014. Od rujna 2016. godine zaposlena je kao znanstveni novak na Zavodu za biljne znanosti, pri Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša. Uključena je u Nacionalni program očuvanja i održive uporabe biljnih genetskih izvora za hranu i poljoprivredu u RH, u Radnu skupinu ljekovito i aromatično bilje.
Obavila je znanstvena usavršavanja: molekularne analize na Botaničkom zavodu, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te „Flowers and Pollinators field and lab techniques to assess functionality for biodiversity conservation” na Department of Agricultural Sciences University of Naples Federico II, Portici (Napulj), Italija.
Znanstveni interesi pristupnice obuhvaćaju očuvanje biljnih genetskih izvora, primjenu molekularnih metoda u analizi bioraznolikosti te tehnologiju uzgoja ljekovitog i aromatičnog bilja.

Koautorica je dva rada iz skupine a1, dva rada iz skupine a2, jednog rada iz skupine a3 te je sudjelovala na 12 znanstvenih i stručnih skupova u Hrvatskoj i inozemstvu usmenim priopćenjima ili poster prezentacijama.

Popis objavljenih znanstvenih radova:

<u>Znanstveni radovi iz skupine a1:</u>

Jug-Dujaković M., Ninčević T., Liber Z., Grdiša M., Šatović Z. (2020). *Salvia officinalis* survived in situ Pleistocene glaciation in ‘refugia within refugia’ as inferred from AFLP markers. Plant Systematics and Evolution 306, 38, https://doi.org/10.1007/s00606-020-01665-9

Ninčević T., Grdiša M., Šatović Z., Jug-Dujaković M. (2019). *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Taxonomy, biological activity, biochemical and genetic diversity. Industrial crops and products, 138, 111487, 10 doi:10.1016/j.indcrop.2019.111487

Znanstveni radovi iz skupine a2:

Delač D., Gršić K., Ninčević T., Carović-Stanko K., Varga F., Grdiša M. (2018). The Influence of Hydropriming and Osmopriming with KNO3 on Seed Germination of Dalmatian Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Sch. Bip.), Agriculturae Conspectus Scientificus 83 (3): 205-211.

Grdiša, Martina; Jug-Dujaković, Marija; Lončarić, Matija; Carović-Stanko, Klaudija; Ninčević, Tonka; Liber, Zlatko; Radosavljević Ivan; Šatović Zlatko. Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): A review of biochemical contents, medical properties and genetic diversity, *Agriculturae Conspectus Scientificus,* 80 (2015), 2; 69-78.

Znanstveni radovi iz skupine a3:

Bensa A., Sever Štrukil Z., Rubinić V., Ninčević T. (2012). Ispiranje nitrata pri gnojidbi kukuruza različitim dozama dušika. Zbornik radova 47. hrvatskog i 7. međunarodnog simpozija agronoma, (Pospišil M. ur.). Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb, Hrvatska, str. 35-39.

9. PRILOZI

Prilog 1. Matrica ϕ_{ST} vrijednosti između 18 populacija smilja na temelju analize molekularne varijance (AMOVA)

Br.	Populacija	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18
1	Krk		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
2	Cres	0,018		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
3	Lošinj	0,041	0,026		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
4	Rab	0,036	0,041	0,047		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
5	Zrće, Pag	0,046	0,053	0,050	0,051		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
6	Miškovići, Pag	0,079	0,074	0,060	0,073	0,060		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
7	Obrovac	0,060	0,061	0,049	0,057	0,060	0,049		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
8	Benkovac	0,078	0,092	0,103	0,101	0,100	0,104	0,085		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
9	Kistanje	0,044	0,052	0,049	0,065	0,044	0,062	0,038	0,054		*	***	***	***	***	***	***	***	***
10	Unešić	0,052	0,061	0,051	0,073	0,053	0,063	0,054	0,061	0,010		***	***	***	***	***	***	***	***
11	Seget	0,077	0,074	0,086	0,092	0,091	0,094	0,092	0,023	0,041	0,044		***	***	***	***	***	***	***
12	Brač	0,086	0,093	0,085	0,100	0,080	0,084	0,073	0,073	0,036	0,042	0,068		***	***	***	***	***	***
13	Hvar	0,107	0,114	0,121	0,123	0,127	0,112	0,108	0,038	0,077	0,077	0,042	0,067		***	***	***	***	***
14	Sinj	0,072	0,071	0,067	0,086	0,063	0,082	0,054	0,069	0,026	0,024	0,055	0,048	0,099		***	***	***	***
15	Omiš	0,095	0,103	0,112	0,107	0,107	0,105	0,099	0,049	0,065	0,056	0,040	0,052	0,029	0,071		***	***	***
16	Živogošće	0,083	0,089	0,091	0,096	0,083	0,090	0,076	0,070	0,039	0,043	0,057	0,035	0,057	0,053	0,044		***	***
17	Slano	0,081	0,093	0,085	0,101	0,093	0,090	0,071	0,075	0,042	0,041	0,060	0,025	0,059	0,053	0,047	0,030		***
18	Cavtat	0,070	0,083	0,084	0,075	0,078	0,073	0,056	0,085	0,062	0,073	0,080	0,066	0,076	0,081	0,063	0,056	0,054	

Ispod dijagonale ϕ_{ST} vrijednosti između populacija

Iznad dijagonale Signifikantnost ϕ_{ST} vrijednosti nakon 10.000 nasumičnih permutacija

*** $P(\phi_{ST}) < 0.001$

** $0.001 < P(\phi_{ST}) < 0.01$

* $0.01 < P(\phi_{ST}) < 0.05$

ns $P(\phi_{ST}) > 0.05$

Prilog 2. Matrica F_{ST} vrijednosti između 18 populacija smilja pod pretpostavkom ravnoteže po Hardyju i Weinbergu

Br.	Populacija	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18
1	Krk																		
2	Cres	0,006																	
3	Lošinj	0,021	0,009																
4	Rab	0,013	0,018	0,023															
5	Zrće, Pag	0,022	0,022	0,021	0,026														
6	Miškovići, Pag	0,046	0,040	0,029	0,043	0,027													
7	Obrovac	0,034	0,031	0,024	0,032	0,030	0,023												
8	Benkovac	0,043	0,046	0,055	0,054	0,049	0,058	0,050											
9	Kistanje	0,022	0,024	0,024	0,033	0,017	0,033	0,025	0,026										
10	Unešić	0,029	0,028	0,025	0,041	0,024	0,034	0,033	0,030	0,002									
11	Seget	0,046	0,038	0,048	0,053	0,047	0,056	0,059	0,009	0,024	0,024								
12	Brač	0,045	0,043	0,041	0,054	0,036	0,045	0,043	0,035	0,016	0,016	0,034							
13	Hvar	0,062	0,061	0,068	0,069	0,068	0,063	0,068	0,014	0,044	0,042	0,019	0,033						
14	Sinj	0,040	0,035	0,034	0,049	0,028	0,045	0,033	0,037	0,012	0,010	0,030	0,021	0,055					
15	Omiš	0,054	0,052	0,061	0,062	0,055	0,059	0,061	0,023	0,035	0,027	0,020	0,023	0,009	0,039				
16	Živogošće	0,048	0,042	0,045	0,052	0,038	0,051	0,046	0,037	0,019	0,019	0,031	0,012	0,032	0,027	0,024			
17	Slano	0,045	0,044	0,042	0,055	0,044	0,047	0,041	0,040	0,022	0,018	0,032	0,009	0,033	0,026	0,023	0,013		
18	Cavtat	0,038	0,040	0,041	0,040	0,038	0,037	0,029	0,044	0,033	0,036	0,043	0,030	0,039	0,042	0,032	0,026	0,026	

Prilog 3. Matrica genetske udaljenosti po Neiju između 18 populacija smilja pod pretpostavkom ravnoteže po Hardyju i Weinbergu

Br.	Populacija	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18
1	Krk																		
2	Cres	0,0010																	
3	Lošinj	0,0036	0,0016																
4	Rab	0,0024	0,0033	0,0041															
5	Zrce, Pag	0,0037	0,0039	0,0037	0,0045														
6	Miškovići, Pag	0,0084	0,0073	0,0052	0,0081	0,0047													
7	Obrovac	0,0060	0,0056	0,0043	0,0059	0,0052	0,0041												
8	Benkovac	0,0075	0,0081	0,0099	0,0099	0,0085	0,0104	0,0089											
9	Kistanje	0,0038	0,0042	0,0041	0,0058	0,0028	0,0057	0,0043	0,0044										
10	Unešić	0,0050	0,0049	0,0043	0,0073	0,0040	0,0060	0,0058	0,0051	0,0003									
11	Seget	0,0079	0,0066	0,0084	0,0096	0,0081	0,0100	0,0106	0,0015	0,0040	0,0041								
12	Brač	0,0077	0,0075	0,0072	0,0097	0,0061	0,0080	0,0075	0,0059	0,0026	0,0027	0,0057							
13	Hvar	0,0110	0,0110	0,0123	0,0128	0,0120	0,0115	0,0124	0,0024	0,0074	0,0072	0,0031	0,0055						
14	Sinj	0,0070	0,0061	0,0059	0,0088	0,0048	0,0080	0,0057	0,0062	0,0020	0,0016	0,0050	0,0035	0,0096					
15	Omiš	0,0094	0,0091	0,0107	0,0111	0,0093	0,0104	0,0108	0,0039	0,0057	0,0045	0,0033	0,0038	0,0015	0,0065				
16	Živogošće	0,0081	0,0072	0,0077	0,0092	0,0064	0,0088	0,0078	0,0060	0,0030	0,0031	0,0051	0,0018	0,0052	0,0044	0,0038			
17	Slano	0,0076	0,0076	0,0073	0,0098	0,0073	0,0083	0,0071	0,0067	0,0035	0,0028	0,0052	0,0014	0,0055	0,0042	0,0036	0,0021		
18	Cavtat	0,0066	0,0072	0,0074	0,0072	0,0065	0,0066	0,0052	0,0076	0,0057	0,0062	0,0074	0,0050	0,0068	0,0073	0,0053	0,0043	0,0043	

Prilog 4. Prosjek, minimum i maksimum 19 bioklimatskih svojstava za 18 lokacija prikupljanja sredozemnog smilja

Br.	Bioklimatsko svojstvo	Mjerna jedinica/formula	Prosjek	Raspon
BIO01	Prosječna godišnja temperatura		137,72	122 - 157
BIO02	Prosječni dnevni temperaturni opseg		85,00	75 - 100
BIO03	Izotermnost		31,72	30 - 35
BIO04	Sezonske promjene temperature		6311,11	6011 - 6603
BIO05	Maksimalna temperatura najtoplijeg mjeseca		283,17	268 - 296
BIO06	Minimalna temperatura najhladnijeg mjeseca		19,39	-2 - 45
BIO07	Godišnji temperaturni opseg		263,78	245 - 283
BIO08	Prosječna temperatura najvlažnijeg kvartala		96,44	78 - 112
BIO09	Prosječna temperatura najsušeg kvartala		219,72	206 - 238
BIO10	Prosječna temperatura najtoplijeg kvartala		219,72	206 - 238
BIO11	Prosječna temperatura najhladnijeg kvartala		59,06	40 - 81
BIO12	Godišnja količina oborina		1057,50	835 - 1301
BIO13	Količina oborina u najvlažnijem mjesecu		140,22	111 - 182
BIO14	Količina oborina u najsušem mjesecu		48,94	35 - 72
BIO15	Koeficijent varijacije oborina		31,67	26 - 40
BIO16	Količina oborina u najvlažnijem kvartalu		387,94	304 - 493
BIO17	Količina oborina u najsušem kvartalu		170,56	128 - 241
BIO18	Količina oborina u najtoplijem kvartalu		170,56	128 - 241
BIO19	Količina oborina u najhladnijem kvartalu		313,28	263 - 433

Prilog 5. Vrijednosti 19 bioklimatskih svojstava za 18 lokacija prikupljanja sredozemnog smilja

Br.	Populacija	Bio01	Bio02	Bio03	Bio04	Bio05	Bio06	Bio07	Bio08	Bio09	Bio10	Bio11	Bio12	Bio13	Bio14	Bio15	Bio16	Bio17	Bio18	Bio19
P01	Krk	145	81	31	6284	287	28	259	112	227	227	67	1289	158	72	27	456	241	241	342
P02	Cres	131	75	30	6194	268	18	250	100	211	211	54	1179	147	65	26	410	218	218	314
P03	Lošinj	140	79	31	6164	279	25	254	109	220	220	63	1050	133	56	26	367	190	190	283
P04	Rab	138	89	32	6355	286	16	270	105	220	220	58	1138	147	59	29	413	200	200	310
P05	Zrce, Pag	139	92	34	6265	287	17	270	106	220	220	60	1089	141	55	30	397	187	187	300
P06	Miškovići, Pag	134	100	35	6291	289	8	281	101	216	216	55	1047	139	51	31	388	175	175	291
P07	Obrovac	129	100	35	6415	285	2	283	94	212	212	48	1020	137	51	30	379	173	173	286
P08	Benkovac	122	92	33	6494	274	-2	276	87	206	206	40	1021	137	53	30	379	175	175	289
P09	Kistanje	129	94	33	6522	282	2	280	95	213	213	47	987	133	51	31	367	169	169	281
P10	Unešić	131	84	31	6476	278	11	267	98	215	215	50	941	127	47	31	348	160	160	276
P11	Seget	129	79	30	6421	273	12	261	97	213	213	49	927	124	46	31	341	156	156	275
P12	Brač	157	77	30	6193	296	45	251	96	238	238	81	835	111	35	33	304	128	128	263
P13	Hvar	146	75	30	6068	283	38	245	87	226	226	72	909	121	37	34	336	134	134	296
P14	Sinj	136	83	30	6603	286	17	269	101	223	223	54	967	129	45	31	350	163	163	294
P15	Omiš	149	82	31	6370	295	33	262	84	232	232	70	964	130	39	34	355	145	145	310
P16	Živogošće	150	83	31	6320	296	34	262	84	232	232	71	1092	150	39	37	413	148	148	367
P17	Slano	142	83	32	6154	284	27	257	78	221	221	66	1279	178	40	40	487	154	154	433
P18	Cavtat	132	82	32	6011	269	18	251	102	210	210	58	1301	182	40	39	493	154	154	429

Prilog 6. Matrica korelacija između 19 bioklimatskih svojstava na temelju 18 lokacija prikupljanja sredozemnog smilja

Br.	Bioklimatsko svojstvo	Bio01	Bio02	Bio03	Bio04	Bio05	Bio06	Bio07	Bio08	Bio09	Bio10	Bio11	Bio12	Bio13	Bio14	Bio15	Bio16	Bio17	Bio18	Bio19
Bio01	Prosječna godišnja temperatura		*	ns	ns	***	***	*	ns	***	***	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Bio02	Prosječni dnevni temperaturni opseg	-0,469		***	ns	ns	***	***	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Bio03	Izotermnost	-0,410	0,940		ns	ns	**	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Bio04	Sezonske promjene temperature	-0,414	0,441	0,141		ns	*	***	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*
Bio05	Maksimalna temperatura najtoplijeg mjeseca	0,750	0,160	0,087	0,116		*	ns	ns	***	***	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Bio06	Minimalna temperatura najhladnijeg mjeseca	0,942	-0,715	-0,618	-0,566	0,501		***	ns	***	***	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Bio07	Godišnji temperaturni opseg	-0,521	0,933	0,768	0,731	0,166	-0,770		ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Bio08	Prosječna temperatura najvlažnijeg kvartala	-0,149	0,038	0,046	-0,029	-0,209	-0,168	0,037		ns	ns	ns	ns	ns	**	**	ns	**	**	ns
Bio09	Prosječna temperatura najsušeg kvartala	0,971	-0,412	-0,430	-0,191	0,828	0,878	-0,390	-0,155		***	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Bio10	Prosječna temperatura najtoplijeg kvartala	0,971	-0,412	-0,430	-0,191	0,828	0,878	-0,390	-0,155	1,000		***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Bio11	Prosječna temperatura najhladnijeg kvartala	0,978	-0,543	-0,429	-0,589	0,624	0,972	-0,647	-0,137	0,905	0,905		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Bio12	Godišnja količina oborina	-0,098	0,012	0,183	-0,411	-0,276	-0,050	-0,146	0,197	-0,236	-0,236	-0,007		***	ns	ns	***	*	*	***
Bio13	Količina oborina u najvlažnijem mjesecu	-0,116	0,063	0,229	-0,407	-0,260	-0,067	-0,115	-0,009	-0,255	-0,255	-0,020	0,953		ns	ns	***	ns	ns	***
Bio14	Količina oborina u najsušem mjesecu	-0,361	0,187	0,194	0,149	-0,297	-0,394	0,230	0,667	-0,363	-0,363	-0,374	0,435	0,176		***	ns	***	***	ns
Bio15	Koeficijent varijacije oborina	0,292	-0,095	-0,024	-0,316	0,194	0,323	-0,225	-0,666	0,227	0,227	0,343	0,149	0,412	-0,801		ns	***	***	**
Bio16	Količina oborina u najvlažnijem kvartalu	-0,104	0,079	0,247	-0,404	-0,239	-0,068	-0,098	0,053	-0,243	-0,243	-0,013	0,977	0,992	0,273	0,331		ns	ns	***
Bio17	Količina oborina u najsušem kvartalu	-0,288	0,133	0,163	0,064	-0,272	-0,311	0,154	0,659	-0,307	-0,307	-0,290	0,563	0,309	0,984	-0,716	0,403		***	ns
Bio18	Količina oborina u najtoplijem kvartalu	-0,288	0,133	0,163	0,064	-0,272	-0,311	0,154	0,659	-0,307	-0,307	-0,290	0,563	0,309	0,984	-0,716	0,403	1,000		ns
Bio19	Količina oborina u najhladnijem kvartalu	0,141	-0,161	0,004	-0,505	-0,107	0,223	-0,333	-0,257	0,003	0,003	0,240	0,812	0,922	-0,160	0,680	0,889	-0,009	-0,009	

Ispod dijagonale - korelacijski koeficijent (*r*)

Iznad dijaglonale - signifikantnost korelacijskog koeficijenta (*P*)

*** $P < 0.001$, ** $0.001 < P < 0.01$, * $0.01 < P < 0.05$, ns $P > 0.05$

$r > 0.7$ jaka pozitivna korelacija

$r < -0.7$ jaka negativna korelacija