

# GENETIČKA RAZNOLIKOST I FILOGEOGRAFIJA LJEKOVITE KADULJE (*Salvia officinalis* L.)

---

Škrtić, Danijel

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:017964>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Danijel Škrtić

**Genetička raznolikost i filogeografija  
ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.)**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



UNIVERSITY OF ZAGREB  
FACULTY OF SCIENCE  
DIVISION OF BIOLOGY

Danijel Škrtić

**Genetic diversity and phylogeography  
of common sage (*Salvia officinalis* L.)**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za filogeniju i molekularnu sistematiku Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka PMF-a i na Zavodu za biljnu bioraznolikost Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Zlatka Libera i prof. dr. sc. Zlatka Šatovića, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

*Zahvaljujem se svojim mentorima, prof. dr. sc. Zlatku Liberu i prof. dr. sc. Zlatku Šatoviću, na strpljenju, ustrajnosti, „konjskim živicima“ i svojoj motivaciji koju su mi pružili tijekom ovih godina.*

*Isto tako zahvaljujem se svim suradnicima na istraživanju ljekovite kadulje, a pogotovo Ivanu Radosavljeviću, koji je uvijek bio spreman pomoći oko prepreka tijekom analiziranja podataka kao i pisanja disertacije. Zahvaljujem se prof. dr. sc. Toniju Nikoliću koji je imao povjerenja i omogućio mi da držim praktikum iz kolegija „Sistematska botanika“ bez kojeg ne bi niti bilo mojeg poslijediplomskog studija.*

*Veliko hvala prof. dr. sc. Mladenu Kučiniću i prof. dr. sc. Boženi Mitić koji od samog početka studija imaju povjerenje u mene da sudjelujem s njima na kolegiju „Terenska nastava iz botanike i zoologije“ za studente molekularne biologije, ali i svojoj podršci i motivaciji da ustrajem i ne odustajem. Od srca se zahvaljujem Boženi što je od samih početaka mog studija na PMF – u bila „druga mama“ u najtežim i najizazovnijim trenucima.*

*Zahvaljujem se kolegama i prijateljima iz X. gimnazije Ivan Supek, ravnateljici Željki Frković i profesoru Damiru Vresku koji su mi omogućili da mi obveze na redovnom poslu nisu u koliziji s obvezama na fakultetu, kao i brojnim izostancima zbog istih.*

*Na kraju se želim zahvaliti obitelji i prijateljima čija je moralna podrška bila sila i motivacija za nastavak i završetak studija.*

## **Informacije o mentoru**

Prof. dr. sc. Zlatko Liber je rođen 1964. godine u Županji. Diplomirao je 1990., obranio magistarski rad 1996., a doktorirao 2000. godine na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Znanstveno i stručno se usavršavao na Sveučilištima u Ljubljani, Beču, ETH institutu u Zürichu te Sveučilištu u Cambridgeu.

Od 1992. godine je zaposlen na Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka PMF-a Sveučilišta u Zagrebu. U znanstveno-nastavno zvanje docenta je izabran 2003., izvanrednog profesora 2009., redovitog profesora 2016. te redovitog profesora u trajnom zvanju 2021. godine.

Prof. dr. sc. Zlatko Liber je voditelj nekoliko kolegija na preddiplomskom, diplomskom i doktorskom studiju biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Pod njegovim vodstvom je obranjeno devet doktorskih disertacija, jedan magistarski rad te 30 diplomskih radova, a tri studentska rada pod njegovim mentorstvom su dobila nagradu rektora Sveučilišta u Zagrebu. Od 2004. do 2006. godine je bio pomoćnik pročelnice Biološkog odsjeka za nastavu i studentska pitanja, a od 2003. do 2013. godine je na istom odsjeku bio studentski voditelj integriranog preddiplomskog i diplomskog studijskog programa biologije i kemije.

Znanstveni interes prof. dr. sc. Zlatka Libera su filogenija, taksonomija, populacijska, krajobrazna i konzervacijska genetika vaskularnih biljaka s posebnim naglaskom na primjeni molekularne-bioloških i računalnih metoda te razvoju novih molekularnih biljega. Do sada je publicirao 94 znanstvena rada. Objavljeni znanstveni radovi ukupno su citirani 1280 puta u bazi Web of Science uz h-indeks 20, 1455 puta u bazi Scopus uz H-indeks 21 te 2205 puta u bazi Google Scholar uz h-indeks 26. Na znanstvenim skupovima sudjelovao je s više od stotinu izlaganja. Do sada je vodio dva i bio suradnik na devet znanstvenih projekata.

Prof. dr. sc. Zlatko Liber je član nekoliko domaćih i međunarodnih stručnih udruga, bio je suradnik na šest stručnih projekata, a od 2006. do 2014. godine urednik sekcije za sistematsku botaniku i floru znanstvenog časopisa *Acta Botanica Croatica*. Osnivač je Laboratorija za genetičku raznolikost, filogeniju i molekularnu sistematiku bilja na Biološkom odsjeku PMF-a Sveučilišta u Zagrebu.

## **Informacije o mentoru**

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. Doktorsku disertaciju obranio je 1999. na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu. 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. Od 1998. godine radi na novoosnovanom Zavodu za sjemenarstvo koji 2023. godine mijenja naziv u Zavod za biljnu bioraznolikost. 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 na Agronomskom fakultetu i Analiza genetičke raznolikosti na Poslijediplomskom doktorskom studiju Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu (sunositelj s prof. dr. sc. Zlatkom Liberom).

Znanstvena djelatnost pristupnika uključuje istraživanja u vezi očuvanja biljnih genetskih izvora, analize molekularne raznolikosti, statističke genomike te molekularne filogenetike. Prof. dr. sc. Zlatko Šatović autor je 186 znanstvenih radova u časopisima referiranim u bazi podataka WoS CC citiranih preko 4,000 puta uz Hirshov indeks (H-index) 39.

Bio je voditelj šest domaćih znanstvenih projekata i četiri međunarodna, a sudjelovao je na 10 domaćih i 13 međunarodnih znanstvenih projekata. Urednik je jedne znanstvene monografije, a autor jednog fakultetskog udžbenika i jedne znanstvene monografije. Voditelj je Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv) uspostavljenog krajem 2015. godine. Od 2005. do 2020. bio je glavni urednik znanstvenog časopisa *Agriculturae Conspectus Scientificus* (ACS).

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 Agronomskog fakulteta.

**GENETIČKA RAZNOLIKOST I FILOGEOGRAFIJA LJEKOVITE KADULJE**  
*(Salvia officinalis L.)*

DANIJEL ŠKRTIĆ

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek,  
Botanički zavod, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Za utvrđivanje genetičke raznolikosti jedinki i populacija ljekovite kadulje na cjelokupnom prirodnom arealu te za rekonstrukciju evolucijske povijesti i filogeografije vrste upotrijebljeni su mikrosatelitni biljezi DNA i analiza sekvencija dvije regije kloroplastne DNA. Genetičke analize je obuhvatila procjene unutarpopulacijske i međupopulacijske genetičke raznolikosti, određivanje strukture i broja izvornih populacija, utvrđivanje najvjerojatnijeg scenarija demografske povijesti te procjenu nukleotidne i haplotipske raznolikosti vrste. Najveća genetička raznolikost i najveći broj privatnih alela zabilježen je kod populacija iz središnjeg dijela Balkanskog poluotoka, što uz rezultate modeliranja rasprostranjenosti dovodi do zaključka da je ovo područje centar rasprostranjenja i vjerojatno utočište vrste tijekom glacijacijskog maksimuma. Nepostojanje drevnih kloroplastnih haplotipova u populacijama Apeninskog poluotoka ukazuje na dužu prisutnost ljekovite kadulje na Balkanskom poluotoku. Modeliranjem rasprostranjenosti vrste potvrđeno je postojanje ekološki povoljnog kopnenog mosta između Balkana i Apenina te introgresija s Balkanskog na Apeninski poluotok. Prvim kolonizacijskim događajem nastala je južna, genetički jedinstvena, skupina apeninskih populacija, dok se druga kolonizacija dogodila vjerojatno tijekom posljednjeg glacijacijskog perioda formiranjem sjeverne apeninske skupine populacija.

(99 stranica, 20 slika, 16 tablica, 116 literaturnih navoda, 3 priloga, hrvatski jezik)

**Ključne riječi:** ljekovita kadulja, biljezi SSR, kloroplastna DNA, genetička raznolikost, filogeografija

Mentori: prof. dr. sc. Zlatko Liber - Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek  
prof. dr. sc. Zlatko Šatović - Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Božena Mitić - Sveučilište u Zagrebu, PMF, Biološki odsjek  
prof. dr. sc. Jerko Gunjača - Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet  
prof. dr. sc. Sven Jelaska - Sveučilište u Zagrebu, PMF, Biološki odsjek

Rad prihvaćen:



**GENETIC DIVERSITY AND PHYLOGEOGRAPHY OF COMMON SAGE (*Salvia officinalis* L.)**

DANIJEL ŠKRTIĆ

University of Zagreb, Faculty of Science, Division of Biology,  
Department of Botany and Botanical Garden, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Microsatellite DNA markers and analysis of sequences of two chloroplast DNA regions were used to determine genetic diversity of individuals and populations of common sage within the entire geographic distribution. The genetic analyses included estimation of within and between population genetic diversity, determination of the structure and number of indigenous populations, determination of the most probable scenario of demographic history and estimation of nucleotide and haplotype diversity of the species. Populations of central Balkan Peninsula show highest recorded genetic diversity and the highest number of private alleles, which, together with the result of distribution modelling, leads to the conclusion that this area was the centre of distribution and most likely sanctuary during the glacial maximum. The absence of ancient chloroplast haplotypes in the populations of the Apennine Peninsula shows that common sage was present in the Balkan Peninsula longer than in the Apennine Peninsula. Using distribution modelling we confirmed that there was a favourable ecological land bridge between the Balkans and the Apennines, and that introgression occurred from the Balkan to the Apennine Peninsula. The first colonisation event led to the emergence of the southern, genetically unique Apennine group of populations, while the second colonisation event probably occurred during the last glacial period and formed the northern Apennine group of populations.

(99 pages, 20 figures, 16 tables, 116 references, 3 appendices, original in Croatian)

**Keywords:** common sage, SSR markers, chloroplast DNA, genetic diversity, phylogeography

Supervisors: Prof. Zlatko Liber, PhD - University of Zagreb, Faculty of Science,  
Department of Biology

Prof. Zlatko Šatović, PhD - University of Zagreb, Faculty of Agriculture

Reviewers: Prof. Božena Mitić, PhD - University of Zagreb, Faculty of Science, Department  
of Biology

Prof. Jerko Gunjača, PhD - University of Zagreb, Faculty of Agriculture

Prof. Sven Jelaska, PhD - University of Zagreb, Faculty of Science, Department  
of Biology

Thesis accepted:

Sadržaj:

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Hipoteze.....	4
1.2. Cilj istraživanja.....	4
<b>2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>5</b>
2.1. Rod <i>Salvia</i> .....	6
2.2. Ljekovita kadulja ( <i>Salvia officinalis</i> ) .....	7
2.2.1. Rasprostranjenost ljekovite kadulje .....	9
2.2.2. Pregled dosadašnjih istraživanja ljekovite kadulje s posebnim osvrtom na populacijsko-genetička i filogeografska istraživanja.....	11
2.3. Genetički biljezi.....	13
2.3.1. Mikrosateliti .....	14
2.3.2. Kloroplastna DNA .....	18
2.4. Aproksimativna Bayesovska Analiza .....	19
2.5. Modeliranje rasprostranjenosti vrsta .....	20
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>24</b>
3.1. Biljni materijal .....	25
3.2. Izolacija ukupne stanične DNA .....	28
3.3. Mikrosatelitni genetički biljezi .....	29
3.3.1. Umnažanje i detekcija mikrosatelitnih biljega.....	29
3.3.2. Statistička obrada mikrosatelitnih podataka .....	31
3.3.2.1. Unutarpopulacijska raznolikost.....	31
3.3.2.2. Genetička diferencijacija i struktura populacija.....	32
3.3.2.3. Analiza evolucijske povijesti .....	33
3.4. Kloroplastna DNA .....	35
3.4.1. Umnažanje i sekvenciranje kloroplastnih DNA regija .....	36
3.4.2. Statistička obrada kloroplastnih podataka .....	37
3.5. Modeliranje rasprostranjenosti vrste .....	38
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>40</b>
4.1. Rezultati analize mikrosatelitnih biljega .....	41
4.1.1 Unutar populacijska raznolikost .....	41
4.1.2 Diferencijacija i struktura populacija.....	46

4.2. Rezultati analize kloroplastnih DNA regija.....	57
4.3. Modeliranje rasprostranjenosti vrste .....	63
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>65</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>74</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>76</b>
<b>8. PRILOZI.....</b>	<b>86</b>
<b>9. ŽIVOTOPIS AUTORA .....</b>	<b>99</b>

## **1. UVOD**

Rod *Salvia* (kadulja) je pripadnik porodice Lamiaceae (podporodica Nepetoideae, tribus Mentheae, podtribus Salviinae) (Drew i Sytsma, 2012). Tipska vrsta unutar roda je ljekovita kadulja (*Salvia officinalis*) koja je prirodno rasprostranjena u jadranskom obalnom području Balkanskog poluotoka i Tirenskom obalnom području središnjeg i južnog dijela Apeninskog poluotoka. Osim u prirodi ljekovita kadulja se može pronaći u kulturi širom svijeta (Rešetnik i sur., 2016).

Ljekovita kadulja je zbog ljekovitih svojstava eteričnog ulja komercijalno vrijedna vrsta. Eterično ulje ljekovite kadulje opisano je u mnogim farmakopejama te postoje brojni radovi o sastavu eteričnih ulja ove vrste (Pitarević i sur., 1984; Tucker i Maciarello, 1990; Perry i sur., 1999; Jug-Dujaković i sur., 2012). Uzgoj u kulturi sve je učestaliji, ali u Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori i Albaniji se ova vrsta još uvijek prikuplja u komercijalne svrhe iz samoniklih populacija što može imati negativan utjecaj na očuvanje genetičke raznolikosti. Koliki je stvarni utjecaj ovakvog prikupljanja na genetičku raznolikost prirodnih populacija još uvijek je nepoznato jer su genetička istraživanja ljekovite kadulje još uvijek rijetka (Bruna i sur., 2006; Wise i sur., 1998; Skoula i sur., 1999; Bazina i sur., 2002; Böszörményi i sur., 2009; Mader i sur., 2010; Radosavljević i sur., 2015).

Do sada se samo jedno istraživanje bavilo evolucijom ljekovite kadulje (Stojanović i sur., 2015), dok je genetička raznolikost samoniklih populacija bila predmetom istraživanja dva znanstvena članka (Liber i sur., 2014; Jug-Dujaković i sur., 2020), a usporedba genetičke raznolikosti samoniklih, kultiviranih i naturaliziranih populacija jednog znanstvenog članka (Rešetnik i sur., 2016). Posljednja i najopsežnija istraživanja ljekovite kadulje s ciljem utvrđivanja genetičke raznolikosti i demografije prirodnih i naturaliziranih populacija na Balkanskom poluotoku provedena su uporabom kodominantnih mikrosatelitnih biljega (An i sur., 2010; Vinet i Zhedanov, 2011; Radosavljević i sur., 2011) na uzorku od 30 prirodnih i naturaliziranih populacija (Rešetnik i sur., 2016). Dobiveni rezultati su pokazali jasno odvajanje prirodnih i naturaliziranih populacija na Balkanskom poluotoku te podrijetlo svih naturaliziranih populacija iz prirodnih populacija samo jedne geografske regije. Premda je većina genetičke raznolikosti u obje grupe potjecala najvećim dijelom zbog raznolikosti među jedinkama unutar populacija, prostorno-genetička analiza prirodnih populacija ukazala je i na izolaciju zbog udaljenosti. Geografsko strukturiranje prirodnih populacija kao i podjela na tri podskupine potvrđena je klaster i Bayesovskom analizom genetičke strukture (Pritchard i sur., 2000). Najveća raznolikost i najveći broj privatnih alela je pronađen u centralnom dijelu istočne obale Jadrana dok je tendencija pada genetičke raznolikosti i privatnih alela primijećena u

smjeru sjeverozapada i jugoistoka. Rezultati modeliranja ekološke niše vrste (Phillips i sur., 2006) kao i analize demografske povijesti vrste pomoću Aproksimativne Bayesovske analize (Beaumont i sur., 2002) ukazali su na dva moguća demografska scenarija: (1) vrsta je preživjela posljednju glacijaciju u južnojadranskom utočištu te se zatopljenjem klime naknadno širila na sjeverozapad i jugoistok Balkanskog poluotoka ili (2) vrsta je preživjela ledeno doba u nekoliko utočišta koja se poklapaju s uočenim genetičkim skupinama današnjih populacija. Zajednički zaključak svih dosadašnjih istraživanja bez obzira na upotrijebljene metode svodi se na to da je za jasnu sliku o genetičkoj raznolikosti, strukturi, evoluciji i filogeografiji ljekovite kadulje nužno u budućnosti istraživati cjelokupni areal vrste.

## 1.1. Hipoteze

1. Uzorkovane populacije pripadaju većem broju genskih skupova, a pripadnost je moguće objasniti na temelju zemljopisnog položaja.
2. Genetička raznolikost populacija se znatno razlikuje ovisno o tome kojem genskom skupu pripadaju; bogatstvo alela balkanskih populacija je znatno veće od apeninskih.
3. Modeliranjem rasprostranjenosti vrste u vrijeme posljednjeg glacijalnog maksimuma (LGM) moguće je utvrditi postojanje glacijalnih refugija, a na temelju najvjerojatnijeg scenarija koji opisuje demografsku povijest moguće je rekonstruirati slijed i vrijeme razdvajanja pojedinih genskih skupova.

## 1.2. Cilj istraživanja

Cilj ovog doktorskog rada je provesti analizu raznolikosti alela osam mikrosatelitnih lokusa i dvije kloroplastne intergenske regije DNA (rpL32-trnL, rps16-trnS) 1350 jedinki iz ukupno 62 populacije ljekovite kadulje (*Salvia officinalis*) koje u potpunosti pokrivaju cijelu prirodnu rasprostranjenost vrste kako bi se mogla:

1. Procijeniti unutarpopulacijsku raznolikost i genetsku udaljenost između populacija, broj i strukturu genskih skupova te utvrditi postojanje prostorne autokorelacije na temelju mikrosatelita.
2. Utvrditi najvjerojatniji scenarij koji opisuje demografsku povijest vrste pomoću Aproksimativne Bayesovske analize (ABC) te usporediti dobivene rezultate s onima dobivenima modeliranjem ekološke niše (ENM) vrste u prošlosti, sadašnjosti i budućnosti.
3. Procijeniti nukleotidnu i haplotipsku raznolikost populacija te utvrditi filogeografske odnose između kloroplastnih haplotipova.

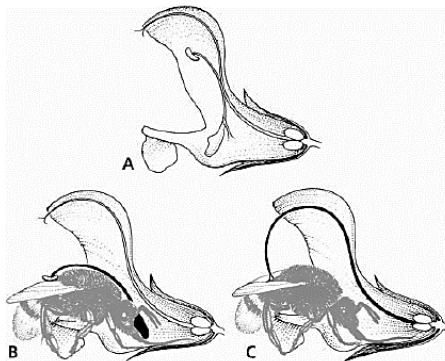
## **2. LITERATURNI PREGLED**



## 2.1. Rod *Salvia*

*Salvia* L. (kadulja) je rod odjeljka Spermatophyta (sjemenjače), pododjeljka Magnoliophyta (kritosjemenjače), razreda Magnoliopsida (dvosupnice), podrazreda Asteridae, reda Lamiales, porodice Lamiaceae (usnjače), podporodice Nepetoideae, tribusa Mentheae, podtribusa Salviinae, sekcije *Salvia* (Drew i Sytsma, 2012).

Naziv roda *Salvia* potječe od latinske riječi *salvare* što u prijevodu znači spasiti i odnosi se na ljekovita svojstva nekih vrsta roda koje su bile u upotrebi od davnina (Kintzios, 2000). Rod *Salvia* uključuje jednogodišnje, dvogodišnje, ili višegodišnje zeljaste biljke i drvenaste polugrmove. Rod *Salvia* predstavlja veliki i kozmopolitski skup od preko 1000 raznolikih svojiti što ga čini najbrojnijim rodom unutar porodice Lamiaceae. Ovaj rod ima tri centra raznolikosti u svijetu (Središnja i Južna Amerika (500 svojiti), Središnja Azija i Mediteran (250 svojiti) i istočna Azija (90 svojiti)). Značajna morfološka osobina ovog roda nastala tijekom evolucije je prijelaz sa četiri na samo dva prašnika u cvijetu, a to se tijekom evolucije neovisno dogodilo tri puta i povezano je s osobitim mehanizmom oprašivanja unutar ovoga roda koji se naziva mehanizam poluge ili mehanizam klackalice (Walker i Sytsma, 2007; Drew i Sytsma, 2012). Mehanizam poluge je prilagodba za efikasnije oprašivanje gdje je jedna prašnica (antera) funkcionalna i stvara pelud dok se druga nalazi na kraju izduženog filameta i služi kao prepreka oprašivaču (kukac) koji ulazi u vrat vjenčića prema nektarijima. Tijekom slijetanja kukca dolazi do pomicanja zakržljale prašnice prema naprijed dok se istovremeno funkcionalna prašnica kao poluga savija i prenosi pelud na prsa ili zadak kukca kako je vidljivo na slici 1 (Walker i sur., 2004).



**Slika 1.** Oprašivanje roda *Salvia* karakterističnim mehanizmom poluge. Shematski uzdužni presjek cvijeta (A), pokretanje mehanizma poluge slijetanjem i hranjenjem kukca (B), prijenos prethodno sakupljene peludi na njušku tučka drugog cvijeta (C). Prilagođeno prema (Walker i sur., 2004).

U Hrvatskoj je do sada zabilježeno 19 vrsta ovoga roda. Četiri vrste su na Crvenom popisu IUCN – a: *Salvia brachyodon* Vandas (Gotovo ugrožena – NT), *Salvia fruticosa* Mill. (Gotovo ugrožena – NT), *Salvia nemorosa* L. (Ugrožena – EN) i *Salvia peloponnesica* Boiss. et Heldr. (Gotovo ugrožena – NT; Nikolić, 2021).

## 2.2. Ljekovita kadulja (*Salvia officinalis*)

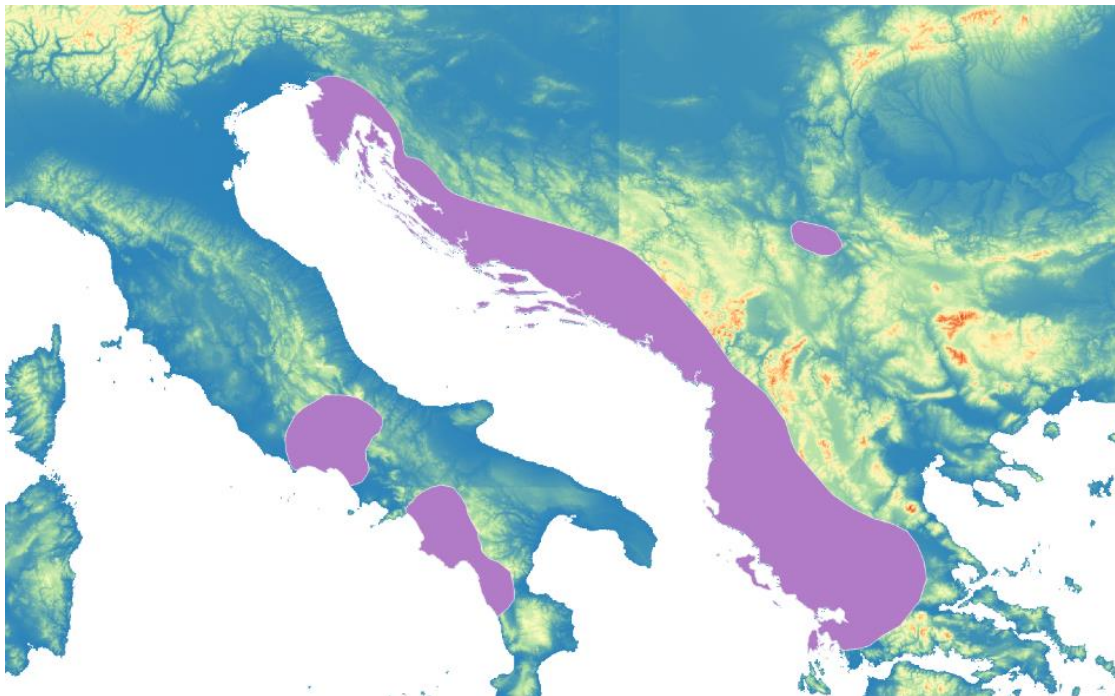
Habitus ljekovite kadulje je visok do 60 cm, i prekriven dlačicama od 0,2 – 1,5 mm od kojih je većina žljezdasta (slika 2). Brojne žljezdaste dlake na svim biljnim dijelovima izlučuju eterična ulja. Prilikom njihovog oštećenja oslobođena eterična ulja čine biljku mnogim životinjama i kukcima nejestivom (Castroviejo, 1995). Listovi su jajasti, sroliki ili streličasti, nepodijeljeni ili perasto razdijeljeni, cjelovitog, nazubljenog ili narovašenog ruba sa zelenom dorzalnom stranom i bjelkasto ili bjelkasto-zelenom ventralnom stranom. Donji listovi su često skupljeni u rozetu. Cvjetovi su združeni u jednostavne ili razgranjene, gušće ili pršljenasto razmaknute cvatove tipa grozda, rjeđe metlice veličine 10 – 41 cm. Cvjetovi su veliki, zigomorfni, plavi, ljubičasti do crveni, rjeđe bijeli ili žuti. Čaška je 10 – 14 mm duga, dvousnena, cjevasta ili zvonolika. Donja usna čaške je duboko rascijepljena u dva dijela, a gornja obično u tri dijela ili rijetko cjelovita. Dužina usni čaške je 3 – 4 mm. Dvousnena vjenčić ima različito oblikovanu cijev. Gornja usna je uspravna ili jako zasvođena, cjelovitog ruba ili nazubljena, donja usna široka i troreznjasta (srednji režanj obično najduži). Plod cjepavac se raspada na četiri jajasto četverobridna, glatka merikarpa. Ljekovita kadulja je višegodišnja grmolika biljka dobro poznata i važna zbog aromatskih i ljekovitih svojstava te je jedna od najvažnijih ekonomskih biljaka Mediteranskog područja. Široko se upotrebljava u kulinarstvu, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Ekstrakti ljekovite kadulje pokazuju antioksidativno, protupalno, fungicidno, baktericidno, viralno, protugrčevno, protudijabetično i protupretilno djelovanje te pomaže u zaštiti probavnog sustava. Listovi ljekovite kadulje široko se upotrebljavaju u aromatizaciji hrane, a cijela biljka je postala popularna u vrtnom uzgoju s nekoliko razvijenih kultivara (Rešetnik i sur., 2016). Ljekovita kadulja je diploidna vrsta ( $2n = 14$ ) s veličinom genoma od 0,97 pg/2C (Maksimović i sur., 2007).



**Slika 2.** Ljekovita kadulja na prirodnom staništu. Habitus biljke (a), sastavljeni cvat (b) (autori: Zlatko Liber i Igor Sheremetyev)

### 2.2.1. Rasprostranjenost ljekovite kadulje

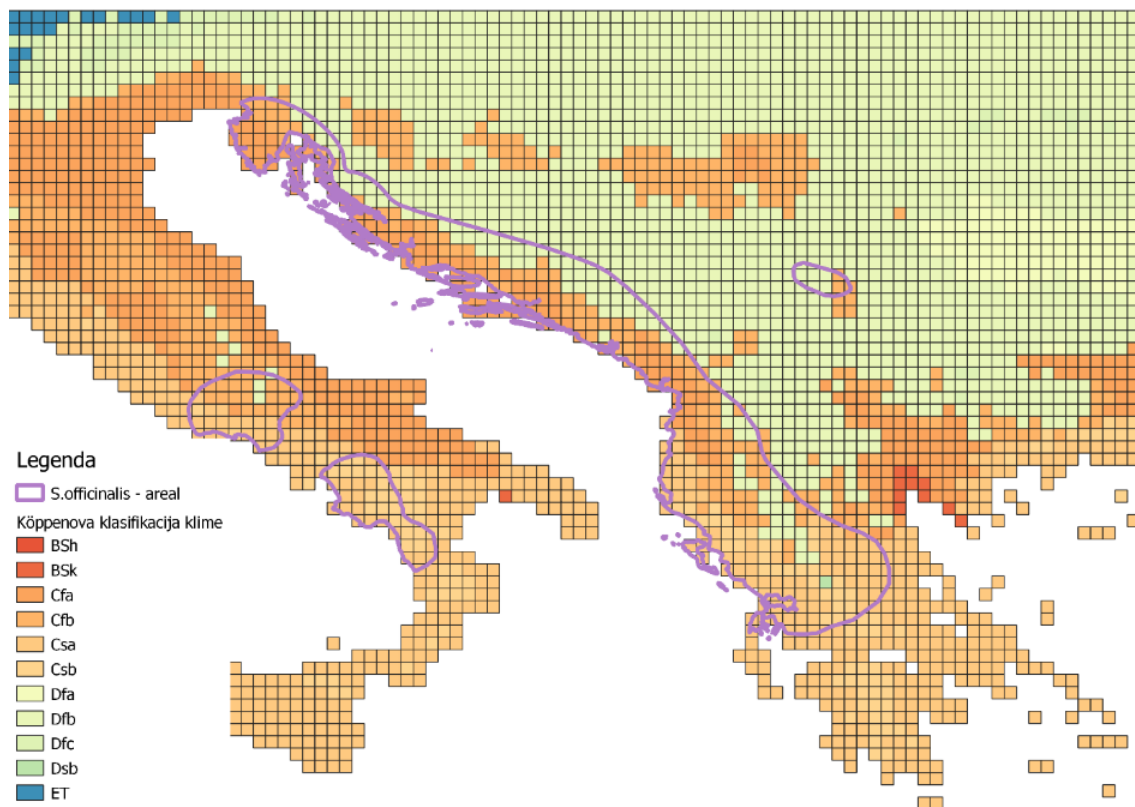
Najveći dio prirodnog areala ljekovite kadulje je istočna obala Jadranskog mora s najgušćim populacijama u središnjem dijelu istočne obale za koji se smatra da je centar rasprostranjenosti ove vrste. Areal se kontinuirano proteže duž cijele istočne obale Jadranskog mora od sjevera Italije (Tršćanski zaljev) preko obalnog područja Slovenije, Hrvatske, mediteranskog dijela Bosne i Hercegovine, Crne Gore, Albanije pa sve do sjeverne i sjeverozapadne Grčke gdje raste u kopnenom dijelu na nadmorskoj visini od 650 do 950 m. Osim ovog najvećeg dijela areala ljekovita kadulja ima nekoliko disjunktних populacija i to dvije u središnjim i južnim Apeninima (Apeninski poluotok, Italija) brojnih jedinki koje rastu u suhim vapnenačkim tlima te u Sićevačkoj klisuri (Srbija) kao što je prikazano na slici 3. Uz navedeni areal autohtonih populacija postoji niz naturaliziranih malih populacija na jugozapadu Kosova, sjeverozapadu Srbije, sjeveru Rumunjske i jugu Moldavije. Zbog visokocijenjenih ljekovitih svojstava Feničani, Grci i Rimljani introducirali su ljekovitu kadulju duž cijelog mediteranskog područja. Ovi drevni narodi su bili skloni uzgajati i prenositi ljekovite biljke duž svojih naseobina koje su bile raspršene duž Mediterana. Kao posljedica toga postoji veliki broj spontanih i na prvi pogled autohtonih populacija ove vrste upravo na tim mjestima drevnih kolonija (Rešetnik i sur., 2016).



**Slika 3.** Rasprostranjenost autohtonih populacija ljekovite kadulje (*Salvia officinalis*) prikazana je ljubičastom bojom

Kao ukrasna i ljekovita vrsta široke ekološke valencije ljekovita kadulja se uzgaja i izvan Mediterana na područjima umjerene kontinentalne klime (ostatak Europe, Kanada, SAD, Indija, Japan, Indonezija, Tanzanija, Južna Afrika, Brazil, Kuba, Australija, Novi Zeland i dr.). Upravo na ovim područjima često „bježi“ iz kulture i formira naturalizirane populacije (Kintzios, 2000). Uzgojeno je i mnogo kultivara ljekovite kadulje: 'Albiflora', 'Aurea', 'Berggarten', 'Compacta', 'Crispa', 'Grete Stolze', 'Holt's Mammoth', 'Icterina', 'Milleri', 'Purpurascens', 'Salicifolia', 'Sturnina', 'Tricolor', 'Isla', 'Delband', 'Battle', 'Royal Fleur', 'Abundance', 'Extrakta', 'Regula', 'IPPO' (Tucker i Maciarelo, 1990).

Prema Köppenovoj klasifikaciji klime (Šegota i Filipčić, 2017), u Hrvatskoj je ova vrsta prirodno rasprostranjena na područjima sa sredozemnom klimom s vrućim ljetom (Csa) i na područjima s umjerenom toplom vlažnom klimom s vrućim ljetom (Cfa) (Sl. 4).



**Slika 4.** Usporedba areala ljekovite kadulje ovisno o Köppenovoj klasifikaciji klime.

Ljekovita kadulja je jedna od najznačajnijih predstavnika flore jadranske obale i otoka gdje, ako su uvjeti staništa povoljni, raste u velikoj brojnosti jedinki. Prema klasifikaciji staništa ljekovita kadulja prirodno raste na krškim kamenjarima gdje formira zajednicu jadranskih kamenjara kadulje i kovilja (*As. Stipo-Salvietum officinalis* H-ić. (1956) 1958) i zajednicu kamenjara kadulje i isprekidane šašike (*As. Salvia – Seslerietum interruptae* ("juncifoliae"))

Trinajstić 1977 nom. corr.), a kao dio florističkog sastava dolazi u kamenjarskim travnjacima biokovskog kozlinca i velike šašike (*As. Astragalo-Seslerietum robustae* Trinajstić (1981) 1987) i šumama dalmatinskog crnog bora i crnike (*As. Quercu ilicis-Pinetum dalmaticae* Trinajstić 1986). Navedena staništa pripadaju travnjacima (osim posljednje navedenog) koja zajedno sa ostalim travnjačkim zajednicama obalnog područja jadranske obale i otoka pripadaju krajnjim stadijima deforestacije koja traje već tisućama godina. Današnja krška područja prvobitno su bila prekrivena šumskom vegetacijom koja je klimazonalna vegetacija šireg područja Europe, a termofilne vrste koje su sačinjavale te šume bile su *Quercus ilex* L., *Pinus nigra* Arnold ssp. *dalmatica* (Vis) Franco, *Fraxinus ornus* L. i dr. Trend deforestacije doveo je do pojave erozije tla i zajedno s djelovanjem bure, ljetnih suša i čestih požara rezultirao sa suhim kamenjarskim krajolicima kakve imamo danas. Ovaj proces imao je i pozitivan učinak na pojavu različitih tipova travnjaka (pašnjaka i livada) na kojima danas dolazi ljekovita kadulja. Međutim, u posljednjem desetljeću dolazi do napuštanja tradicionalne poljoprivrede i smanjenja ispaše stoke čime dolazi do sekundarne sukcesije kojom ova staništa nestaju, a vrste poput ljekovite kadulje suočene su s polaganom redukcijom brojnosti populacija (Greguraš, 2013).

### **2.2.2. Pregled dosadašnjih istraživanja ljekovite kadulje s posebnim osvrtom na populacijsko-genetička i filogeografska istraživanja**

Istraživanja roda *Salvia* kao i na tipskoj vrsti *Salvia officinalis* su još uvijek sporadična i nedovršena. Sveobuhvatnim genetičkim istraživanjem tribusa Mentheae kojem pripada rod *Salvia* utvrđen je filogenetički odnos između svih pripadnika ovog tribusa kao i pripadnost roda *Salvia* podtribusu Salviinae kao i zajedničko mediteransko podrijetlo istraživanih svojti (Drew i Sytsma, 2012). Među prvim filogenetičkim istraživanjima roda *Salvia* ističe se istraživanje Walkera i sur., 2004. koji su analizom sekvencija kloroplastne DNA zaključili da rod nije monofiletski i da je oprašivanje mehanizmom poluge, kao najistaknutijom osobinom roda, evoluiralo neovisno najmanje dva puta. Naknadnim istraživanjem Walker i Sytsma (2007) potvrdili su da je prašnički mehanizam polugom evoluirao neovisno tri puta. Autori su također konstatirali da bi se rod *Salvia* mogao smatrati monofiletskim ako bi se u njega uključile svojte iz rodova *Perovskia* Kar., *Rosmarinus* L., *Meriandra* Benth., *Dorystaechas* Boiss. i Heldr. i *Zhumaria* Rech.f. & Wendelbo što je nedavno i učinjeno (Drew i sur., 2017).

Istraživanja kemijskog sastava eteričnih ulja i ostalih kemijskih spojeva koji su zaslužni za ljekovita svojstva vrste *Salvia officinalis* najčešći su tip istraživanja ove vrste (Pitarević i sur., 1984; Tucker i Maciarelo, 1990; Putievsky i sur., 1990; Wise i sur., 1998; Perry i sur., 1999; Böszörményi i sur., 2009; Grdiša i sur., 2015). Posljednje najopsežnije istraživanje eteričnih ulja iz 25 populacija kadulje je pokazalo da je postotak ulja prosječno 2,83 % i da na sastav eteričnih ulja utječe genetička struktura populacija (Jug-Dujaković i sur., 2012).

Samo je manji dio istraživanja na ovoj vrsti usmjeren na populacijsku genetiku i filogeografiju. Početna istraživanja temelje se na upotrebi RAPD (*eng. Random amplification of polymorphic DNA*) genetičkih biljega gdje je utvrđeno da postoje značajna fenotipska i genotipska raznolikost uzorkovanih populacija te da postoji prostorna autokorelacija i prostorna izolacija (Židovec i sur., 2005). Prema istraživanju koje su proveli Liber i sur. (2014) potvrđeni su prethodno navedeni zaključci te su dokazali da većina genetičke raznolikosti populacija dolazi zbog razlika između jedinki i da postoji velika unutarpopulacijska raznolikost. Istraživanje je pokazalo da se sve istraživane populacije genetički razvrstavaju u najmanje dva klastera što je bio zaključak i Jug-Dujaković i sur. (2012). Autori navode da populacije koje pripadaju srednjedalmatinskom dijelu areala pokazuju iznadprosječnu genetičku raznolikost te su zaključili da je kadulja preživjela zadnji glacijalni maksimum (LGM) u nekoliko refugija, a da južnodalmatinska populacija predstavlja glavnu kontaktnu zonu između potomaka glacijalnog refugija. Udaljavanjem od tog područja dolazi do smanjenja alelnog bogatstva i broja privatnih alela. Do istog rezultata su došli i Radosavljević i sur. (Radosavljević i sur., 2012) upotrebom mikrosatelita kao genetičkih biljega.

Izolacijom mikrosatelitnih biljega utvrđeno je 20 dinukleotidnih i 9 trinukleotidnih lokusa. Dobiveni mikrosatelitni biljezi uspješno su primijenjeni na druge srodne vrste kadulja (*Salvia fruticosa* i *Salvia bachyodon*) i omogućili su daljnja genetička istraživanja više vrsta sekcije *Salvia* (Radosavljević i sur., 2011). Uz pomoć izoliranih mikrosatelitnih biljega u kombinaciji sa AFLP (*eng. Amplified fragment length polymorphism*) i MSAP (*eng. Methylation-sensitive amplified polymorphism*) biljezima i morfologijom analizirana je hibridizacija između ljekovite i grčke kadulje (*Salvia fruticosa*) na otoku Visu koja je pokazala da u hibridnim jedinkama postoji udio miješanih svojstava roditelja, ali i svojstava kojih u roditelja nema (npr. brakteje i zubi čaške su duži nego kod roditelja). Zaključeno je da hibridi imaju veći udio polimorfnih alela nego roditelji i da su sličniji ljekovitoj kadulji koja ujedno ima značajno veću genetičku raznolikost i brojnost jedinki nego grčka kadulja na ovom otoku (Radosavljević i sur., 2019).

Do sada najopsežnije populacijsko-genetičko i filogeografsko istraživanje ljekovite kadulje proveli su Rešetnik i sur. (2016) na 709 jedinki unutar 23 autohtone, tri naturalizirane i četiri kultivirane populacije rasprostranjenim duž Balkanskog poluotoka. Glavni ciljevi istraživanja bili su: analiza demogeografske prošlosti, genetičke raznolikosti i populacijske strukture autohtonih, naturaliziranih i kultiviranih populacija ljekovite kadulje na Balkanskom poluotoku upotrebom osam mikrosatelitnih biljega. Autohtone populacije su pokazivale veći udio privatnih alela, višu očekivanu i opaženu heterozigotnost. Zaključeno je da sve naturalizirane i kultivirane populacije potječu sa istog područja prirodnih populacija (Istra, Kvarner). Kao i kod drugih istraživanja autori su pokazali da je središnji dio areala ljekovite kadulje genetički najraznolikiji, a da ta raznolikost opada kako se krećemo na sjever odnosno jug areala te da je moguća raspodjela areala u dva ili tri izvorna genetička klastera. Analiza demogeografske prošlosti pokazala je da se prirodne populacije genetički razlikuju zbog utjecaja klimatskih promjena u pleistocenu pa autori predlažu dva scenarija kojim je ljekovita kadulja preživjela posljednji glacijalni maksimum:

1. veliki broj privatnih alela sugerira prisutnost glacijalnog refugija koji je vjerojatno bio u južnom dijelu areala,
2. postojala su tri refugija koji odgovaraju trima genetičkim izvornim klasterima utvrđenim duž sjeverne obale Jadrana.

Sva dosadašnja istraživanja uključivala su nepotpuni areal ljekovite kadulje pa je više-manje zajednički zaključak svih autora bio da je za potpuni uvid u genetičku raznolikost, populacijsku strukturu i demogeografiju ove vrste nužno uzorcima pokriti cijeli areal koji uključuje i populacije s Apeninskog poluotoka.

### **2.3. Genetički biljezi**

Genetički biljeg je dio DNA koji pokazuje polimorfizam između jedinki, populacija ili različitih klasifikacijskih kategorija. Možemo ga definirati kao opaženu mutaciju nekog lokusa DNA. Njihova upotreba je danas sveprisutna, a njihov razvoj temelji se na značajnim otkrićima molekularne biologije kao što su restrikcijski enzimi, lančana reakcija polimerazom (PCR), sekvenciranje nove generacije (NGS) i sl. U istraživanjima se danas koriste različite tehnike



koje za cilj imaju otkrivanje velikog broja lako uočljivih, jeftinih i ponovljivih biljega. Najpoznatiji i danas najčešće upotrebljavani genetički biljezi su:

1. Polimorfizam dužine restrikcijskih ulomaka (*Restriction Fragment Length Polymorphism*; RFLP);
2. Polimorfizam dužine amplificiranih ulomaka (*Amplified Fragment Length Polymorphism*; AFLP);
3. Jednonukleotidni polimorfizam (*Single Nucleotide Polymorphism*; SNP) i
4. Mikrosateliti (*Simple Sequence Repeats*; SSR).

Svaki od ovih genetičkih biljega ima svoje prednosti i nedostatke te je odabir ovisan o cilju i objektu istraživanja. Prilikom odabira genetičkih biljega treba kad je god to moguće voditi računa da se upotrebljavaju oni koji raspoznaju heterozigotni lokus (kodominantni biljezi), no ako se analizira vrsta s dosad neistraživanim genomom onda se mogu upotrijebiti i dominantni biljezi koji to nisu u mogućnosti (Greguraš, 2013). Zbog intenzivnih ranijih istraživanja na otkrivanju i razvoju mikrosatelitnih biljega kod ljekovite kadulje (Vinet i Zhedanov, 2011; Radosavljević i sur., 2011, 2019) u ovom radu smo mogli primijeniti visokoinformativne kodominantne mikrosatelitne genetičke biljege.

### **2.3.1. Mikrosateliti**

Mikrosateliti (*Short Tandem Repeats*; STR ili *Simple Sequence Repeats*; SSR) su dijelovi DNA molekule s ponavljajućim motivima nukleotida koji variraju svojom veličinom. Najčešće se ponavljaju dva do četiri nukleotida nekoliko desetaka puta (Vinet i Zhedanov, 2011; Greguraš, 2013). Mikrosateliti su zabilježeni u svim do danas analiziranim genomima kako prokariota tako i eukariota. Prema tipu ponavljajuće sekvencije mikrosateliti se mogu podijeliti na četiri osnovna tipa (Vinet i Zhedanov, 2011):

- savršeni (*perfect*) – mikrosatelitna sekvencija nije prekinuta niti jednom bazom koja ne pripada mikrosatelitnom motivu (npr. TATATATATATATATA)
- nesavršeni (*imperfect*) – mikrosatelitna sekvencija je prekinuta samo jednim parom baza koje ne odgovaraju mikrosatelitnom motivu (npr. TATATATATACATATA)

- prekinuti (*interrupted*) – mikrosatelitna sekvencija je prekinuta manjom sekvencijom DNA (npr: TATATACGGTTATATA)
- sastavljeni (*composite*)– mikrosatelitna sekvencija se sastoji od niza različitih mikrosatelitnih motiva (npr. TATATATATAGAGAGAGA)

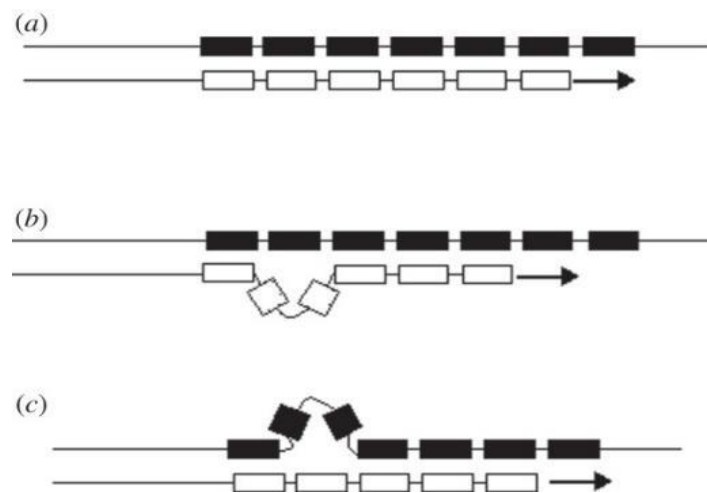
Zabilježeno je da su biljke bogate s Adenin – Timin (AT), a životinje Adenin – Citozin (AC) ponavljajućim dinukleotidima pa je to jedna od metoda razlikovanja biljnog od životinjskog genoma. Kod biljaka se ponavljanja (AG)<sub>n</sub>, (AAG)<sub>n</sub> i (CCG)<sub>n</sub> češće pojavljuju u kodirajućem, dok su (AT)<sub>n</sub> ponavljanja karakteristična za nekodirajući dio genoma. Također je ustanovljeno da je učestalost mikrosatelita kod biljaka negativno korelirana s veličinom genoma što se pripisuje činjenici da su mikrosateliti slabo zastupljeni u dijelovima uključenima u ekspanziju genoma, odnosno da su značajnije zastupljeni u dijelu genoma s malim brojem kopija. Prisutnost mikrosatelita opažena je i kod kloroplastne i mitohondrijske DNA, ali ih karakterizira manji stupanj ponavljanja po lokusu, raspršena rasprostranjenost unutar genoma i visoki stupanj polimorfizma (Kalia i sur., 2011).

Broj ponavljanja mikrosatelitnog motiva na nekom lokusu može jako varirati na interspecifičnoj, intraspecifičnoj i intrapopulacijskoj razini. Uzrok tome je visoka stopa mutacija ( $10^{-2}$  do  $10^{-6}$  po lokusu po generaciji) u odnosu na ostale dijelova DNA. Pretpostavlja se da mutacijski mehanizmi mogu biti vrlo dinamični i kompleksni te da još uvijek nisu dovoljno razjašnjeni. Po današnjim saznanjima mikrosateliti mogu nastati na sljedeće načine:

- replikacijskim klizanjem (*replication slippage*)
- dvolančanom rekombinacijom (nejednoliki *crossing over*)
- zbog neusklađenosti prilikom popravka lanaca DNA
- retrotranspozicijom

Od navedenih mehanizma replikacijsko klizanje se smatra najčešćim uzrokom nastanka polimorfizma (slika 5). Ono se događa tijekom replikacije DNA, zbog nesavršenosti rada enzima DNA polimeraze koja radi veću grešku kod replikacije sekvencija DNA s mikrosatelitnim motivom. Tijekom replikacije dolazi do prolaznog razdvajanja i proklizavanja lanca DNA što dovodi do krivog sparivanja lanaca, a to za posljedicu ima stvaranje omče s

viškom ponavljanja na jednom ili drugom lancu. U sljedećim replikacijskim ciklusima omča može poslužiti kao kalup; ukoliko se takva omča nalazi na novosintetiziranom lancu, rezultat će biti povećanje broja ponavljanja (*forward slippage*), a ukoliko se nalazi na lancu kalupu, rezultat će biti smanjenje broja ponavljanja (*backward slippage*). Zanimljivo je da većinu takvih primarnih mutacija korigira sustav za popravak krivo sparenih baza (*mismatch repair system*), ali očito je broj mutacija u mikrosatelitnom nizu tako velik da usprkos korekciji jedan dio tih pogrešaka polimeraze završava kao mutacijski događaj.



**Slika 5.** Shematski prikaz replikacijskog klizanja. Strelice pokazuju smjer stvaranja novog lanka, a pravokutnici predstavljaju ponavljajuće motive. Prikazana su tri slučaja: (a) nema pojave mutacije tijekom replikacije, (b) tijekom replikacije dolazi do stvaranja omče na novonastalom lancu (povećanje broja mikrosatelitnog motiva) i (c) tijekom replikacije dolazi do stvaranja omče na kalupu (smanjenje broja mikrosatelitnog motiva) (Forster i sur., 2015).

Radi potrebe ispravnog određivanja populacijsko–genetičkih parametara dobivenih iz mikrosatelitnih podataka vrlo je važno odabrati dobar teoretski model koji opisuje mutacije mikrosatelita. Do sada su predložena tri osnovna mutacijska modela:

- Model beskonačnog broja alela (*Infinite Allele Model*; IAM)
- Model postupnih mutacija (*Stepwise Mutation Model*; SMM)
- Dvofazni model (*Two Phase Model*; TPM)

Model beskonačnog broja alela (IAM) podrazumijeva da svakom mutacijom dolazi do nasumične pojave novog alela. Pritom nije važna promjena u broju dobivenih ili smanjenih mikrosatelitskih motiva. Model postupnih mutacija (SMM) pretpostavlja da je nastanak novih alela koji nastaje povećanjem ili smanjenjem postojećeg motiva za jedan najvjerojatniji događaj, a da vjerojatnost mutacijskog događaja pada što je povećanje ili smanjivanje broja mikrosatelitnih ponavljanja veće. Kod ovog modela važna je veličina alela pa su oni slične veličine srodniji. Dvofazni model (TPM) uvažava mogućnost IAM i SMM modela i kao takav predstavlja njihovu kombinaciju te se smatra najispravnijim modelom kod obrade podataka dobivenih upotrebom mikrosatelitnih biljega. No bez obzira na ovakav zaključak kod nekih statističkih obrada podataka uzima se isključivo ili IAM ili SMM mutacijski model. Tako se kod izračunavanja fiksacijskog indeksa ( $F_{ST}$ ) kao pokazatelja genetičke diferencijacije između populacija podrazumijeva model beskonačnog broja alela, dok se kod njegove inačice indeksa genetičke diferencijacije ( $R_{ST}$ ) podrazumijeva model postupnih mutacija (Vinet i Zhedanov, 2011).

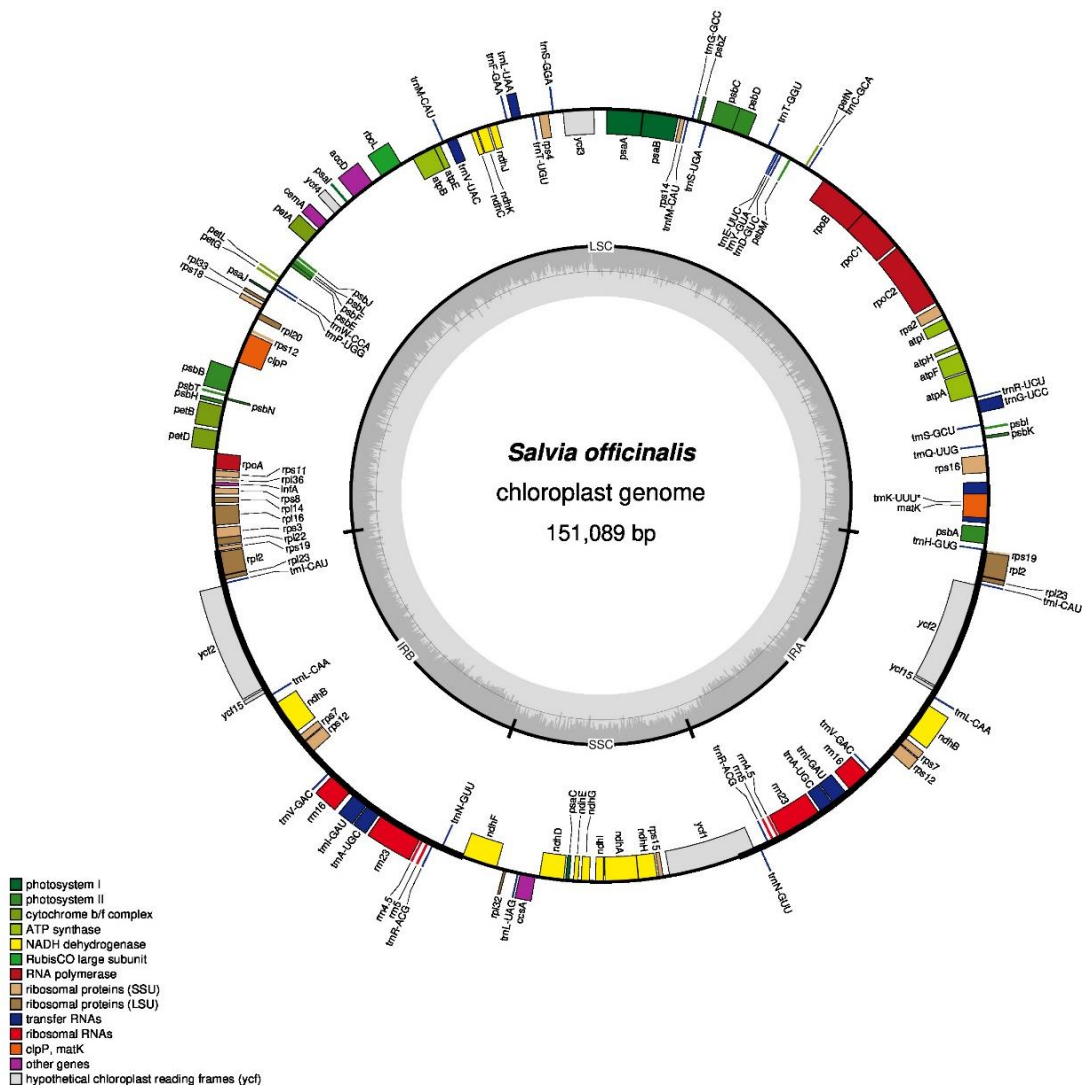
Kao i ostali genetički biljezi mikrosateliti imaju svojih nedostataka. Prvi nedostatak je taj što su pretežito „vršno specifični“ pa se mogu primijeniti jedino u istraživanju vrste kod koje su razvijeni ili kod nekoliko srodnih vrsta, a za njihov razvoj je potrebna laboratorijska i/ili bioinformatička stručnost kao i značajan utrošak vremena i resursa. U određenim situacijama to im može biti prednost jer im je onemogućena kontaminacija stranom DNA što je od velikog značaja u određenim analizama (npr. forenzika). Drugi nedostatak je pojava nul-alela. Oni predstavljaju mutacije koje se ne događaju u mikrosatelitnom motivu nego regiji DNA gdje se vežu PCR začetnice što onemogućuje detekciju jednog dijela mikrosatelitnih alela pa se obično lažno povećava udio homozigota na tom mikrosatelitnom lokusu. Ovaj nedostatak može se potencijalno riješiti izradom novih začetnica, podešavanjem PCR parametara ili potpunim isključivanjem sumnjivih lokusa iz analize. Postojanje nul-alela u analiziranoj populaciji moguće je statistički testirati i ujedno preinačiti alelne učestalosti isključivanjem učestalosti nul-alela iz izračuna. Treći nedostatak je pojava homoplazije, koja se javlja i kod svih drugih vrsta genetičkih biljega. Ona predstavlja pojavu alela iste dužine, ali različitog podrijetla. Njihova pojava umanjuje vidljivu raznolikost alela, procjenu genetičke divergencije i protoka gena (*gene flow*) između populacija i vrsta, no smatra se minimalnim izvorom pogreške kod istraživanja populacija iste vrste. Prisutnost homoplazije uključena je u mnoge statističke metode koje se temelje na modelu postupnih mutacija (SMM) (Greguraš, 2013).

Mikrosateliti imaju mnoge osobine idealnih genetičkih biljega: lako su dostupni, visoko polimorfni i stoga vrlo informativni, ponovljivi, pouzdani, lako mjerljivi, kodominantni, neutralni i dobro pokrivaju cijeli genom. Upravo su zbog toga i jedan od najčešće korištenih genetičkih biljega. Primjenjuju se u znanstvenim područjima koja se mogu svesti pod evoluciju, populacijsku genetiku te izradu genetičkih karata.

### 2.3.2. Kloroplastna DNA

Kloroplastna DNA (cpDNA) je dvolančana kružna DNA molekula (slika 6) veličine od 120 – 170 kilobaznih parova (kbp). Kloroplastni genom pokazuje veliku sličnost u strukturi, veličini, genskom sadržaju i linearnom poretku gena između različitih biljnih skupina. Sastoji se od četiri tipa sekvencija koje se razlikuju po funkciji: geni koji kodiraju proteine, geni za ribosomske RNA, introni i međugenske razmaknice. Posljednja dva tipa su poznata kao nekodirajuće regije jer ne sadrže gensku uputu za proteine ili ribosomske RNA. Većina kloroplastne DNA sadrži dvije obrnutoponavljajuće sekvencije (inverted repeats, IRa i IRb) prosječne dužine 25 kbp svaka (Bonatelli i sur., 2013).

Zahvaljujući tome što su unutar kloroplastnog genoma uglavnom geni odgovorni za reakcije fotosinteze njegova mutacijska stopa je vrlo niska u odnosu na jezgrin genom što ga čini korisnim za upotrebu kod filogenetičkih istraživanja viših klasifikacijskih razina. U počecima istraživanja analizirale su se sekvencije gena *rbcL* koji kodira veliku podjedinicu ribuloze–1,5–bis–fosfat karboksilaze/oksigenaze (RuBisCO), a kasnije u upotrebu dolaze i druge kloroplastne sekvencije poput *ndhF*, *atpB* i *matK* (Drew i Sytsma, 2012). Usprkos tome, upotreba cpDNA sekvencija nije ostala samo na kodirajućim regijama već se proširila na nekodirajuće sekvencije. Nekodirajući dijelovi brže mutiraju i time sadrže veću raznolikost nego kodirajući dijelovi kao i veći stupanj heterogenosti, a uz to su i evolucijski neutralni što omogućuje njihovu primjenu na nižim klasifikacijskim razinama kao što su različite vrste unutar roda ili pak na unutarvrstnoj razini, osobito pri filogeografskim istraživanjima (Boršić, 2013).



**Slika 6.** Genetska karta kloroplastnog genoma vrste *Salvia officinalis*. Geni s unutarnje strane većeg kruga su transkribirani u smjeru, a oni s vanjske strane suprotno smjeru kazaljke na satu. Boja označava funkcionalnu pripadnost gena. Unutarnji krug prikazuje četverodijelnu strukturu kloroplastnog genoma koja se sastoji od: male podjedinice s genima u jednoj kopiji (eng. *small single copy region*, SSC), velike podjedinice s genima u jednoj kopiji (*large single copy region*, LSC) i dvije potpuno iste podjedinice s istim sastavom i redoslijedom gena, ali suprotnog smjera transkripcije tzv. obrnuta ponavljanja (eng. *inverted repeats*, IRa i IRb) (nacrtno uz pomoć RefSeq: NCBI Reference Sequence Database i računalnog program OGDRAW ver. 1.3.1 (Greiner i sur., 2019)

## 2.4. Aproksimativna Bayesovska Analiza

Aproksimativna Bayesovska analiza (eng. *Approximate Bayesian Computation*, ABC; Beaumont i sur. 2022) obuhvaća niz tehnika koje su se u posljednjih dvadesetak godina počele primjenjivati i u populacijskoj genetici za rješavanje kompleksnih problema kao što je rekonstrukcija evolucijske povijesti biljnih vrsta (Cornuet i sur. 2008). U biološkim

istraživanjima često se koriste brojni modeli za simuliranje setova podataka na temelju određenih parametara modela. S druge strane, često je vrlo teško odrediti vrijednosti parametara koji bi mogli simulirati set podataka identičan onom koji je dobiven u „stvarnom“ istraživanju, jer je naše poznavanje kompleksnih bioloških sustava još uvijek vrlo ograničeno.

Za sve statističke analize temeljene na određenom modelu ključna je funkcija vjerodostojnosti jer se na temelju nje provodi izbor između različitih modela te procjenjuju parametri. Za jednostavne se modele obično može naći analitička formula za funkciju vjerodostojnosti. Kod kompleksnijih modela analitičku formulu nije moguće izvesti ili je za to potrebno isuviše računalnog vremena. Glavna prednost tehnika ABC je ta što se svojstva posteriornih raspodjela parametara kao što su prosječna vrijednost i gustoća raspodjele aproksimiraju bez izračuna funkcije vjerodostojnosti (Beaumont, 2010).

ABC se općenito sastoji od tri koraka. U prvom se koraku provodi simulacija podataka koja obuhvaća izbor priornih raspodjela parametara, simuliranje setova podataka na temelju priornih raspodjela kao i izračun mjerila deskriptivne statistike na temelju simuliranih podataka. Drugi je korak izračun mjerila deskriptivne statistike na temelju „stvarnih“ podataka, njihova usporedba s mjerilima dobivenima na temelju simuliranih podataka te zadržavanja simuliranih podataka koji su najbliži „stvarnima“. U trećem se koraku procjenjuju vrijednosti parametara iz posteriornih raspodjela utvrđenih na temelju zadržanih simuliranih podataka. Pritom je od ključne važnosti izbor priornih raspodjela parametara kao i mjerila deskriptivne statistike, te metode njihove usporedbe (Csilléry i sur., 2010).

## **2.5. Modeliranje rasprostranjenosti vrsta**

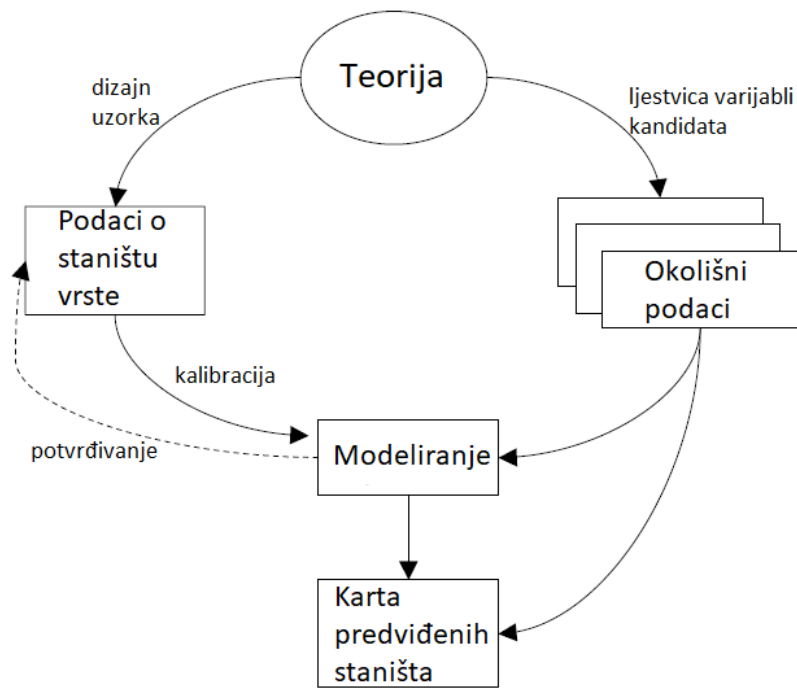
U novije vrijeme došlo je do razvoja i primjene brojnih geografskih metoda u razumijevanju biološke rasprostranjenosti. Geografski informacijski sustavi (*Geographic Information Systems*; GIS) omogućili su analizu prostorne razdiobe bogatstva vrsta i endemizma kako bi se prepoznala prioritetna staništa za očuvanje na temelju principa komplementarnosti. Tehnike modeliranja rasprostranjenosti vrsta (*Species Distribution Modelling*; SDM ili *Ecological Niche Modelling*; ENM) posljednjih su godina sve prisutnije. Ovi se modeli koriste da bismo predvidjeli fundamentalne (potencijalne) niše, realizirane (stvarne) niše te multivarijantne niše

vrsta ili klimatske niše, ukoliko se koriste klimatski čimbenici. Pojam modeliranja ekoloških niša (ENM) sinonim je koji se u literaturi koristi značajno češće od SDM-a, ali će se u ovom radu koristiti izraz SDM zato što puno preciznije opisuje proces i rezultate modeliranja. Izrada modela pretpostavlja analizu odnosa između poznate rasprostranjenosti vrste po određenim nalazištima i okolišnih uvjeta tih nalazišta na temelju koje je moguće procijeniti pogodnost pojedinih staništa za vrstu. Proces modeliranja rasprostranjenosti vrsta sastoji se od tri faze koje uključuju uspostavu triju modela: ekološkog, podatkovnog i statističkog. Ekološki model uključuje teorijsku osnovu ekologije u primjeni ili testiranje hipoteza u istraživanju. Podatkovni model se sastoji od odluka usmjerenih na to kako su podaci prikupljeni i kako će se oni mjeriti i procjenjivati. Statistički model uključuje odabir metoda i odluka o implementaciji (kalibracija i potvrđivanje). Elementi potrebni za modeliranje i prostorna predviđanja rasprostranjenosti vrsta su (slika 7):

- Teorijski ili konceptualni model abiotičkih i biotičkih čimbenika koji utječu na rasprostranjenost vrsta u prostoru i vremenu
- Podaci o staništu vrsta (lokalitet) u geografskom prostoru (prisutnost vrste, upotreba staništa, brojnost ili neki drugi podatak)
- Digitalne karte koje predstavljaju odabrane okolišne čimbenike koji određuju kvalitetu staništa ili koreliraju s njome. Ove karte dobivaju se pomoću daljinskog mjerenja ili drugih izvora i pohranjuju se unutar GIS-a.
- Model koji povezuje okolišne potrebe (*habitat requirements*) ili upotrebu staništa (*habitat use*, prisutnost vrste) s okolišnim čimbenicima. Model može biti statistički, deskriptivan ili logistički.
- Metode za primjenu modela (zakovitosti, pragove, značajnosti, koeficijenti) na vrijednosti kartiranih okolišnih čimbenika kako bi se dobila nova metrička karta o pojavnosti vrste
- Podaci i kriteriji o potvrđivanju predviđanja i način interpretacije pogreške nesigurnosti analize



Kako je već navedeno, SDM analize zasnivaju se na različitim statističkim pristupima i modelima od kojih se neki koriste češće. Jedan takav statistički model predstavlja model maksimalne entropije (Maxent) koji je razvijen unutar statističke mehanike i primjenjuje se u poljima poput financija i astronomije. Maksimalna entropija je princip u statističkoj mehanici i informacijskoj teoriji koji kaže da je vjerojatnost rasprostranjenosti s najvećom maksimalnom entropijom (najrašireniji skup podataka, onaj najbliži uniformnosti) najbolja procjena (aproksimacija) poznate rasprostranjenosti jer se potkrepljuje sa svim do sada poznatim znanjem o rasprostranjenosti, ali izbjegava ono što je nepoznato (Franklin i Miller, 2010). Primjena maksimalne entropije omogućuje primjenu principa Occamove oštrice; najjednostavnije objašnjenje je i najtočnije. Prilikom primjene na modeliranje rasprostranjenosti vrsta rasprostranjenost koja se procjenjuje je multivarijantna rasprostranjenost pogodnih stanišnih uvjeta (povezanih s pojavnošću vrste) u prostoru određenom okolišnim čimbenicima (Peterson, 2001; Peterson i sur., 2008). Zahvaljujući svemu navedenome SDM predstavlja moćno oruđe u čitavom nizu istraživanja i analiza prisutnih u svim granama znanosti, a u ovom radu koristi se u određivanju pogodnih staništa za ljekovitu kadulju danas i u vrijeme posljednjeg glacijalnog maksimuma (*Last Glacial Maximum*, LGM). Ova dva modela rasprostranjenosti vrste dati će bolji uvid u pogodnost staništa za vrstu na temelju sadašnjih bioklimatskih uvjeta, kao i vrlo vjerojatnu rasprostranjenost na temelju pogodnosti staništa za vrijeme posljednjeg glacijalnog maksimuma. Prethodna modeliranja rasprostranjenosti vrsta nisu uključivali podatke o pojavnosti ljekovite kadulje duž cijelog raspona areala, već samo Balkanskog poluotoka što je u manjoj mjeri utjecalo na preciznost korištenih modela (Rešetnik i sur., 2016).

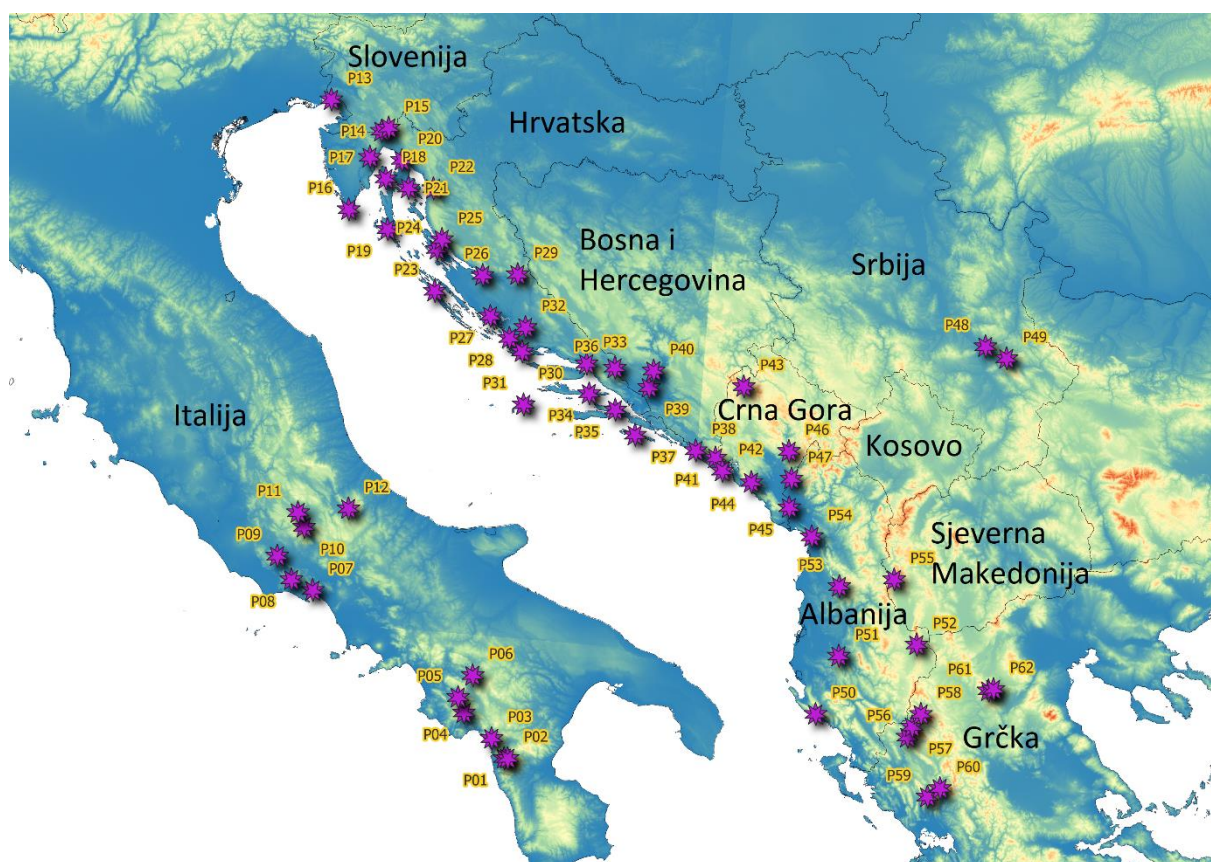


**Slika 7.** Dijagram prikaza elemenata modeliranja rasprostranjenosti vrsta. Prilagođeno prema (Franklin i Miller, 2010).

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Biljni materijal

Biljni materijal sakupljen je iz 62 populacije: 23 iz Hrvatske, 13 iz Italije, 7 iz Crne Gore, 7 iz Grčke, 5 iz Albanije, 2 iz Srbije, 2 iz Slovenije i 1 iz Sjeverne Makedonije (Tablica 1). Sakupljanje materijala ravnomjerno je raspoređeno tako da se obuhvati cijeli areal autohtonih populacija (slika 8).



**Slika 8.** Karta područja istraživanja i uzorkovanja ljekovite kadulje (*Salvia officinalis*) duž areala autohtonih populacija.

**Tablica 1.** Istraživane populacije ljekovite kadulje (*Salvia officinalis*) s osnovnim podacima: populacija (redni broj populacije u istraživanju), lokalitet, država (ITA-Italija, SVN-Slovenija, CRO-Hrvatska, BIH-Bosna i Hercegovina, MNE-Crna Gora, SRB-Srbija, ALB-Albanija, MKD-Sjeverna Makedonija, GRC-Grčka), Y-stupnjevi geografska širina, X-stupnjevi geografska dužina i sakupljeni broj jedinki unutar populacije.

Populacija	Lokalitet	Država	Y (°)	X (°)	Broj jedinki
P01	Pollino 2	ITA	39,82	15,93	20
P02	Pollino 1	ITA	39,82	15,97	23
P03	Maratea	ITA	40,00	15,78	23
P04	Cilento	ITA	40,23	15,45	24
P05	Sacco	ITA	40,37	15,38	21
P06	Savoia	ITA	40,57	15,55	22
P07	Aurunci	ITA	41,31	13,62	24
P08	Ausoni	ITA	41,40	13,36	20
P09	Supino	ITA	41,61	13,18	23
P10	d'Antino	ITA	41,88	13,49	20
P11	M. Salviano	ITA	42,01	13,41	23
P12	Maiella/Pacentro	ITA	42,06	14,02	20
P13	Trieste	ITA	45,76	13,64	24
P14	Novokračine	SVN	45,49	14,30	24
P15	Ilirska Bistrica	SVN	45,52	14,39	21
P16	Kamenjak	CRO	44,77	13,91	23
P17	Šušnjeвица	CRO	45,25	14,16	19
P18	Cres	CRO	45,06	14,37	21
P19	Lošinj	CRO	44,60	14,41	22
P20	Krk	CRO	45,23	14,57	23
P21	Stara Baška	CRO	44,98	14,66	22
P22	Vratnik	CRO	44,98	14,98	21
P23	Dugi Otok	CRO	44,05	15,02	23
P24	Pag	CRO	44,43	15,04	24
P25	Karlobag	CRO	44,52	15,10	24
P26	Otišina	CRO	44,20	15,62	24
P27	Pirovac	CRO	43,83	15,72	23
P28	Šparadići	CRO	43,63	15,96	16
P29	Zrmanja	CRO	44,21	16,06	21
P30	Vinišće	CRO	43,51	16,12	25
P31	Vis	CRO	43,03	16,14	20
P32	Unešić	CRO	43,73	16,16	22
P33	Biokovo	CRO	43,40	16,92	18
P34	Hvar	CRO	43,13	16,95	21
P35	Pelješac	CRO	42,98	17,27	24

**Tablica 1. Nastavak**

P36	Runovici	CRO	43,36	17,27	24
P37	Mljet	CRO	42,75	17,51	22
P38	Konavle	CRO	42,60	18,25	25
P39	Međugorje	BIH	43,18	17,69	23
P40	Mostar	BIH	43,33	17,75	19
P41	Vrbanj	MNE	42,53	18,49	19
P42	Luštica	MNE	42,41	18,57	19
P43	Piva	MNE	43,17	18,86	20
P44	Brajići	MNE	42,30	18,92	23
P45	Rumija	MNE	42,06	19,37	20
P46	Bratonožići	MNE	42,57	19,39	20
P47	Božaj	MNE	42,32	19,41	22
P48	Miljkovac	SRB	43,43	21,87	17
P49	Sićevo	SRB	43,31	22,12	20
P50	Llogora	ALB	40,18	19,60	20
P51	Tommor	ALB	40,70	19,90	24
P52	Prespa	ALB	40,77	20,83	24
P53	Dajti	ALB	41,33	19,94	24
P54	Shengjin	ALB	41,79	19,63	22
P55	Jablanica	MKD	41,37	20,60	19
P56	Zagori	GRC	39,94	20,67	20
P57	Timfi	GRC	40,03	20,73	24
P58	Smolikas	GRC	40,14	20,84	24
P59	Arta	GRC	39,39	20,87	24
P60	Plaka	GRC	39,46	21,02	21
P61	Skiti, Kozani	GRC	40,32	21,65	20
P62	Lygeri, Kozani	GRC	40,33	21,71	23
				$\Sigma =$	1350

Svaka populacija predstavljena je sa 17 – 25 jedinki od kojih su prikupljeni mladi listovi i još na terenu smješteni u plastične vrećice sa zip zatvaračem u kojima se nalazi silika-gel. Tijekom 24 sata uzorci listova su potpuno isušeni i na taj način skladišteni kroz više mjeseci za kvalitetnu izolaciju DNA. Ovim istraživanjem obuhvaćeno je 1350 jedinki.

Dio uzoraka s Balkanskog poluotoka uključen je iz prethodnih istraživanja (Radosavljević i sur., 2012, 2019; Jug-Dujaković i sur., 2012; Liber i sur., 2014; Grdiša i sur., 2015; Rešetnik i sur., 2016) dok su u ovom istraživanju dodane gotovo isključivo populacije iz Italije čime je u potpunosti obuhvaćen cijeli prirodni areal vrste.

## 3.2. Izolacija ukupne stanične DNA

Ukupna stanična DNA izolirana je iz 25 – 30 mg suhog lisnog tkiva pomoću izolacijskog kompleta *GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep* (Sigma-Aldrich®):

1. izvagano suho lisno tkivo smješteno je u epruvetu od 2 mL u koju je dodana sterilizirana čelična kuglica za usitnjavanje,
2. pripremljeno tkivo usitnjeno je u uređaju *Tissue Lyser* (Qiagen®), 1 min na frekvenciji od 30 Hz,
3. u epruvetu je dodano 350 µL otopine A za lizu tkiva (L7910®) i 50µL otopine B (L8035®) te nakon toga inkubirano na 65 °C kroz 10 minuta s povremenim miješanjem na vrtložnoj miješalici,
4. dodano je 130 µL otopine za precipitaciju (P9727®), promiješano i stavljeno u zamrzivač na 5 minuta nakon čega je mješavina centrifugirana 5 minuta na brzini od 20 000 g,
5. kolona za filtraciju (CP9346®) stavljena je u 2 mL epruvetu za sakupljanje (T5449®) i supernatant iz prethodnog koraka pažljivo je pipetiran na kolonu za filtraciju te je centrifugiran na 20 000 g 1 minutu. Kolona je bačena, a filtrat sačuvan,
6. u filtrat je dodano 700 µL otopine za vezivanje (B2177®) i dobro promiješano,
7. kolona za vezivanje (CP9471®) je stavljena na epruvetu od 2 mL epruvetu za sakupljanje (T5449®) te je dodano 500 µL otopine za pripremu kolone (C2112®) i centrifugirano 1 minutu na brzini od 20 000 g,
8. 700 µl filtrata iz koraka 7 pipetirano je na kolonu za vezivanje i centrifugirano na 20 000 g 1 minutu. Kolona je sačuvana i stavljena u novu epruvetu od 2 mL, a filtrat bačen,
9. Na kolonu je dodano 500 µL otopine za ispiranje (W3011®) i centrifugirano 1 minutu na 20 000g. Postupak je ponovljen, ali centrifugiranjem na 20 000g 3 minute,
10. 100 µL otopina za eluiranje (T7688®) prethodno zagrijane na 65 °C je dodano u središte kolone koja se zajedno s epruvetom za sakupljanje DNA materijala centrifugirala 1 minutu na najvećoj brzini,
11. dobiveni filtrat je pročišćena otopina DNA koja se za uporabu kroz duži period pohranjuje na – 20 °C.

Koncentracija i čistoća izolirane DNA izmjerena je spektrofotometrom NanoPhotometer P300 (Implen®). Svi uzorci izolirane DNA razrjeđeni su ultračistom vodom na radnu koncentraciju od 2,5 ng/μL i takvi korišteni u daljnjim PCR amplifikacijama.

### 3.3. Mikrosatelitni genetički biljezi

#### 3.3.1. Umnažanje i detekcija mikrosatelitnih biljega

Umnažanje osam mikrosatelitnih lokusa lančanom reakcijom polimerazom provedeno je uporabom fluorescencijski označenih začetnica (FAM, NED, VIC, PET; *Applied Biosystems*®) prikazanih u tablici 2 (An i sur., 2010, Radosavljević i sur., 2011, 2012).

**Tablica 2.** Naziv, sekvencija začetnice, fluorescencijska oznaka, mikrosatelitni motiv i očekivane duljene mikrosatelitnih biljega korištenih u istraživanju

Br.	Naziv	Sekvencija začetnice (5' - 3')	Oznaka fluor. boje	Motiv	Očekivana duljina (pb)
1	SoUZ001	F: CGAACCGGACCAGAGTCTAA R: CTTGCGCCATCTCTCTTCTC	NED	(AG) <sub>15</sub>	159-195
2	SoUZ002	F: CGTGTCTGCTACAAGACAACC R: CGCACTCACTCTCTCCCTCT	FAM	(TG) <sub>11</sub>	199-222
3	SoUZ003	F: CAGCTTCTGCACGTTATCCA R: TGTACGTGGACCCAGCAATA	PET	(GT) <sub>13</sub>	193-210
4	SoUZ007	F: GCAATCAATGCAAGTCAGGA R: TTGGCTCTAATTATGGGGTCA	NED	(GT) <sub>11</sub>	214-227
5	SoUZ011	F: GGCAGTGGCATTATCACCA R: TGCTGTGATTTGCCTAGGTG	FAM	(GA) <sub>25</sub>	175-227
6	SoUZ013	F: ACCATGCCCAAAGACCATAA R: GGCTTCTCCCCTCGAATAAC	PET	(AAC) <sub>8</sub>	202-229
7	SoUZ014	F: GGCAATGATAAGGATGCTG R: GAAGCTTCTCCCTTCTCTCTAACA	VIC	(AGA) <sub>10</sub>	201-237
8	SoUZ019	F: CAAAGCTCCTCGAAGACGAA R: CACGAGCAAGCGTAATAGCA	VIC	(AGA) <sub>16</sub>	153-183

Otopine za PCR pripremljene su na način naveden u tablici 3. Umnažanje mikrosatelitnih regija provedeno je u uređaju GeneAmp® PCR System 9700 (*Applied Biosystems*®) korištenjem *touchdown* PCR metode (TD-PCR). Ova PCR metoda omogućuje nakupljanje amplikona čija je komplementarnost začetnice i kalupa najveća. Umnažanje



mikrosatelitnih lokusa lančanom reakcijom polimerazom provedeno je prema sljedećem PCR programu: denaturacija 5 minuta na 94 °C; 5 ciklusa ponavljanja tri temperature: 45 sekundi na 94 °C, 30 sekundi na 60 °C (uz snižavanje temperature u svakom od preostala 4 ciklusa za 1 °C), 90 sekundi na 72 °C; 25 ciklusa ponavljanja tri temperature: 45 sekundi na 95 °C, 30 sekundi na 55 °C, 90 sekundi na 72 °C; završni korak elongacije od 8 minuta na 72 °C (Korbie i Mattick, 2008).

**Tablica 3.** Sastav PCR otopine za umnažanje mikrosatelitnih biljega s fluorescencijski obilježenim začetnicama

<b>Materijal</b>	<b>Volumen</b>
H <sub>2</sub> O (sterilizirana, deionizirana; Qiagen®)	12,30 µl
10 x PCR pufer ( <i>TaKaRa</i> ®; (100 mM Tris HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,00 µl
dNTP ( <i>TaKaRa</i> ®) (2,5 mM dATP, dCTP, dGTP i dTTP)	1,60 µl
Začetnica F ( <i>Forward</i> ) 5 µM (FAM, NED, VIC ili PET)	1,00 µl
Začetnica R ( <i>Reverse</i> ) 5 µM	1,00 µl
<i>Taq HS</i> polimeraza ( <i>TaKaRa</i> ®; 5 U/µL)	0,10 µl
Otopina DNA uzorka (c = 2,5 ng/µL)	2,00 µl
Ukupni volumen: 20,00 µl	

Amplikoni dobiveni lančanom reakcijom polimeraze (PCR) provjereni su elektroforezom na agaroznom gelu. Uzorci su pripremljeni tako da je 5 µl svakog DNA uzorka pomiješano s 1 µl boje za nanošenje na gel (30 % saharoza, 0,25 % brom-fenol modri i 0,25 % ksilen-cijanoli) i stavljeno u jažice gela. Elektroforeza se odvijala 15 minuta na 100 V nakon čega je gel uronjen u otopinu etidijevog bromida na 30 minuta i postavljen pod UV svjetlom transiluminatora i fotografiran. Ukoliko je umnožavanje mikrosatelitnih lokusa bilo uspješno, u rasponu od 100 – 300 bp morao se uočiti fragment DNA. Finalna detekcija mikrosatelitnih alela određena je kapilarnom elektroforezom na uređaju ABI3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) u DNA-servisu Macrogen Europe® (Amsterdam, Nizozemska). Nakon kapilarne elektroforeze rezultati svih analiziranih uzoraka bili su vidljivi u obliku .fsa podataka u programu GeneMapper (Applied Biosystems™).

### 3.3.2. Statistička obrada mikrosatelitnih podataka

#### 3.3.2.1. Unutarpopulacijska raznolikost

Za svaki mikrosatelitni biljeg izračunat je ukupan broj alela ( $N_a$ ) i informacijski sadržaj polimorfizma (Polymorphism Information Content; PIC; Botstein i sur., 1980) pomoću programa Cervus v.2.2.3 (Kalinowski et al., 2007). Prisutnost nul-alela je provjerena pomoću programa Micro-Checker v. 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004), a učestalosti nul-alela su procijenjene algoritmom maksimizacije očekivanja (Expectation-Maximization algorithm; EM) u programu FreeNA (Chapuis i Estoup, 2007)

Populacijski parametri poput zapažene ( $H_o$ ) i očekivane heterozigotnosti ( $H_E$ ) kao i fiksacijskog indeksa ( $F_{IS}$ ) izračunati su pomoću programa Genepop v.4.7 (Rousset, 2008). Nepristrani procjenitelj fiksacijskog indeksa ( $f$ ) izračunat je po metodi Weira i Cockerhama (1984). Program Genepop je također korišten za testiranje značajnosti odstupanja od ravnoteže po Hardyju i Weinbergu (HW) pomoću metode Markovljevih lanaca (Guo i Thompson, 1992). Korekcija vrijednosti značajnosti provedena je pomoću postupnog Bonferronijevog testa (Holm, 1979; Rice, 1989) u programskom paketu SAS v.9.4 (SAS Institute, 2011) u svrhu kontrole utjecaja višestrukog testiranja. Alelna bogatstvo ( $N_{ar}$ ), broj privatnih alela ( $N_{pr}$ ) kao i alelna bogatstvo privatnih alela ( $N_{par}$ ) svake populacije procijenjeno je pomoću programa HP-Rare v. 1.0 (Kalinowski, 2005).

U svrhu analize postojanja genetičkog uskog grla (*genetic bottleneck*) korišten je program BOTTLENECK v1.2.02 (Cornuet i Luikart, 1996). Očekivana heterozigotnost ( $H_E$ ) uspoređena je s ravnotežnom očekivanom heterozigotnošću ( $H_{EQ}$ ) odnosno očekivanom heterozigotnošću populacije koja je u ravnoteži mutacija i pomaka (*mutation-drift equilibrium*) na temelju zapaženog broja alela. Ukoliko je  $H_E > H_{EQ}$ , postoji suvišak heterozigota u odnosu na ravnotežu mutacija i genetičkog otklona što je znak da je populacija prošla kroz genetičko usko grlo. Prilikom analize korišten je dvofazni model (*two-phase model*; TPM; (Di Rienzo i sur., 1994) evolucije mikrosatelitnih regija koji je pretpostavljao da u 22% slučajeva do mutacija dolazi po modelu beskonačnog broja mutacija (*infinite alleles model*; IAM), a u 78% slučajeva po modelu postupnih mutacija (stepwise mutaton model; SMM) uz varijancu od 11.92 kao što su to predložili Peery i sur. (2012). Značajnost je utvrđena na temelju Wilcoxonovog testa uz 10000 ponavljanja.

### 3.3.2.2. Genetička diferencijacija i struktura populacija

Indeks genetičke diferencijacije ili fiksacijski indeks ( $F_{ST}$ ) izračunat je između parova populacija pomoću nepristranog procjenitelja  $\theta$  po metodi Weira i Cockerhama (1984) u programu FSTAT v2.9.4 (Goudet, 1995), a značajnost je utvrđena na temelju 10000 permutacija.

Genetička udaljenost između populacija procijenjena je na temelju preinačene tetivne udaljenosti prema Cavalli-Sforzi i Edwardsu (*Cavalli-Sforza chord distance*, (Cavalli-Sforza i Edwards, 1967), stablo je izrađeno pomoću algoritma po Fitchu i Margoliashu (1967) uz 1000 pseudoponavljanja *bootstrap* (Felsenstein, 1985) koristeći programe SEQBOOT, GENDIST, FITCH i CONSENSE programskog paketa PHYLIP v3.6b (Felsenstein, 2004).

Analiza genetičke strukture populacija provedena je pomoću programa STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard i sur., 2000). Provedeno je 30 neovisnih prohoda po svakoj skupini ( $K$ ) u rasponu od 1 do 11 pomoću Isabella računalnog klastera Sveučilišnog računskog centra (SRCE), Sveučilišta u Zagrebu. Svaki prohod sastojao se od 200000 ponavljanja tijekom razdoblja zagrijavanja lanca (burn-in), nakon čega je slijedilo ponavljanje od 1000000 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 u svrhu definiranja skupina. Odabir najvjerojatnijeg broja skupina ( $K$ ) proveden je računajući  $\Delta K$  vrijednosti (Evanno i sur., 2005) za svaki  $K$  pomoću programa STRUCTURE HARVESTER v0.6.94 (Earl i vonHoldt, 2012). Prohodi su grupirani i uprosječeni pomoću programa CLUMPAK.

Pomoću analize molekularne varijance (AMOVA; (Excoffier i sur., 1992) raščlanjena je ukupna genetička varijanica na njezine sastavnice. Provedeno je pet analiza: (A) analiza između i unutar populacija uključujući sve analizirane populacije, (B) analiza između pet genetičkih skupina utvrđenih programom STRUCTURE (A, B, C, D, E), između populacija unutar skupina te unutar populacija, (C) analiza između dvije genetičke skupine s Apeninskog poluotoka (A, B), između populacija unutar skupina te unutar populacija, (D) analiza između tri genetičke skupine s Balkanskog poluotoka (C, D, E), između populacija unutar skupina te unutar populacija te (E) analiza između apeninskih (A, B) i balkanskih (C, D, E) skupina,

između populacija unutar skupina te unutar populacija. Analiza je provedena u programu Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier i sur., 2010), a značajnost  $\phi_{ST}$  vrijednosti izračunata je na temelju 10000 permutacija. Pojedinačnim analizama izračunate su  $\phi_{ST}$  vrijednosti između svih parova populacija te je testirana njihova značajnost.

Analiza izolacije uslijed udaljenosti (*isolation by distance*; IBD) provedena je računajući korelaciju između matrice genetičke diferencijacije (vrijednosti  $F_{ST}/(1-F_{ST})$ ) i zemljopisne udaljenosti ( $\ln(\text{km})$ ) između populacija kako je predložio Rousset (1997). Razina značajnosti testirana je upotrebom testa po Mantelu nakon 10000 permutacija pomoću programa NTSYS-pc v2.10s (Rohlf, 1998).

### 3.3.2.3. Analiza evolucijske povijesti

Evolucijska povijest ljekovite kadulje na Balkanskom poluotoku istražena je pomoću aproksimativne Bayesovske analize (*Aproximative Bayesian Computation*; ABC; Beaumont i sur., 2002). Provedene su koalescentne simulacije u svrhu testiranja alternativnih povijesnih scenarija miješanja i divergencije koristeći program DIYABC v2.1 (Cornuet i sur., 2014). Na temelju rezultata dobivenih programom STRUCTURE definirano je pet izvornih populacija koje su obuhvaćale 41 uzorkovanu populaciju. Izabrane su one uzorkovane populacije koje su pokazivale prosječni udio pripadnosti veći od  $Q > 0,7$  određenoj izvornoj populaciji odnosno genetičkoj skupini utvrđenoj programom STRUCTURE.

Na temelju dobivenih rezultata konstruirano je pet mogućih scenarija: (1) populacija južnih Apenina odvojila se neovisno (u vrijeme  $t_2$ ), dok su se ostale današnje populacije odvojile istovremeno kasnije (u vrijeme  $t_1$ ); (2) populacija središnjih Apenina odvojila se neovisno (u vrijeme  $t_2$ ) nakon odvajanja populacije južnih Apenina (u  $t_3$ ), a kasnije se od ancestralne Balkanske populacije odvajaju sve ostale populacije (u  $t_1$ ); (3) ancestralna populacija Apenina odvaja se od balkanske ancestralne populacije (u  $t_3$ ) nakon odvajanja današnje apeninske populacije u  $t_2$  i sve tri današnje balkanske u  $t_1$ ; (4) svaka populacija odvaja se neovisno, prvo se odvaja populacija južnih Apenina u  $t_4$ , nakon toga središnji Apenini u  $t_3$ , sjeverni Balkan u  $t_2$  te središnji i južni Balkan istovremeno u  $t_1$ ; (5) nakon početnog odvajanja središnjih Apenina u  $t_3$  dolazi do odvajanja sjevernog Balkana u  $t_2$ , a kasnije odvajanje preostalih populacija (središnji Apenini i Balkan te južni Balkan) u  $t_1$ .

Analiza je provedena uz vrlo široke priorne raspodjele evolucijskih parametara. Efektivne veličine populacija (N1-N5) kao i ancestralnih populacija (NA1-NA3) modelirana je uniformnom raspodjelom u rasponu od 10 do 10000. Divergencijska vremena (broj generacija;  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$  i  $t_4$ ) su imala uniformnu raspodjelu u rasponu od 1 do 1000000. Stopa miješanja (*admixture rate*;  $r$ ) je imala uniformnu raspodjelu u rasponu od 0,001 do 0,999. Dodatni uvjeti su uključivali poredak povijesnih događaja kao i poredak efektivnih veličina populacija. Upotrijebljen je Opći model postupnih mutacija (*Generalized Stepwise Mutation model*; GSM) uz široku raspodjelu parametara kao što su prosječna stopa mutacija ( $\mu$ ; uniformna raspodjela; raspon:  $10^{-4}$  -  $10^{-3}$ ), prosječna vrijednost parametra geometrijske distribucije ( $P$ ; uniformna raspodjela; raspon: 0,10 – 0,30) i prosječna stopa jednonukleotidnih indela ( $\mu_{SNI}$ , log-uniformna raspodjela, raspon:  $10^{-8}$  -  $10^{-5}$ ).

Za svaki scenarij je generirano milijun simulacija, a 10000 simulacija najbližih analiziranom skupu podataka je korišteno za procjenu posteriornih vjerojatnosti i raspodjela parametara. Usporedba alternativnih scenarija provedena je na temelju posteriornih vjerojatnosti korištenjem logističke regresije. Pouzdanost najvjerojatnijeg scenarija je procijenjena provjerom modela na temelju 10000 simuliranih setova podataka preuzetih iz posteriornih raspodjela sljedećih parametara: prosječan broj alela ( $N_a$ ) i prosječna očekivana heterozigotnost ( $H_E$ ) svake populacije te indeks genetičke diferencijacije ( $F_{ST}$ ), klasifikacijski indeks jedinki (Rannala i Mountain, 1997) te udaljenost na temelju udjela zajedničkih alela ( $D_{AS}$ ; (Chakraborty i Jin, 1993)) za svaki par populacija. Nepodudarnost između simuliranih i zapaženih podataka analizirana je pomoću kumulativne raspodjele učestalosti svih analiziranih parametara pri čemu je parametar  $t$  definiran kao vjerojatnost da je parametar  $t_{sim}$  (simulirana vrijednost) manji od  $t_{obs}$  (zapažena vrijednost). Analiza glavnih sastavnica (PCA) je provedena na temelju 10000 simuliranih setova podataka preuzetih iz priornih raspodjela parametara, zapaženog seta podataka te 10000 simuliranih setova podataka preuzetih iz posteriornih raspodjela parametara.

### 3.4. Kloroplastna DNA

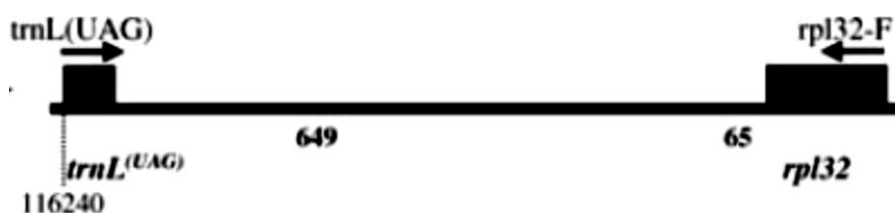
Molekularno genetička analiza kloroplastne DNA provedena je analizom intergenskih sekvencija *rps16-trnK* i *rpL32-trnL* (Shaw i sur., 2007) (Tablica 5, Slike 9 i 10). Za svaku odabranu regiju analizirano je ukupno 299 jedinki vrste *Salvia officinalis*. Odabrano je četiri do pet jedinki iz svake od ukupno 61 populacije.

**Tablica 4.** Sekvencirane regije kloroplastne DNA s imenom i sekvencijom začetnice.

Br.	Regija kloroplastne DNA	Ime začetnice	Sekvencija začetnice (5' - 3')
1.	<i>3'rps16-5'trnK</i>	rpS16x2F2 trnK(UUU)x1	AAAGTGGGTTTTTATGATCC TTAAAAGCCGAGTACTCTACC
2.	<i>rpL32-trnL</i>	trnL(UAG) rpL32-F	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT CAGTTCCAAAAAACGTA CTTC



**Slika 9.** Položaj i smjer regije kloroplastne DNA *3'rps16-5'trnK* (prilagođeno prema Shaw i surr. (Shaw i sur., 2007))



**Slika 10.** Položaj i smjer regije kloroplastne DNA *rpL32-trnL* (prilagođeno prema Shaw i surr. (Shaw i sur., 2007))

### 3.4.1. Umnažanje i sekvenciranje kloroplastnih DNA regija

PCR umnažanje je provedeno u 25 µl reakcijskog volumena pripremljeno prema sastavu prikazanom u tablici 5 te pomoću uređaja GeneAmp® PCR 9700 (Applied Biosystems®).

**Tablica 5.** Sastav PCR otopine za umnažanje kloroplastnih biljega s fluorescencijski obilježenim začetnicama

Materijal	Volumen
H <sub>2</sub> O (sterilizirana, deionizirana; Qiagen®)	15,85 µl
10 x PCR pufer ( <i>TaKaRa</i> ®; (100 mM Tris HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,50 µl
dNTP ( <i>TaKaRa</i> ®) (2,5 mM dATP, dCTP, dGTP i dTTP)	2,00 µl
Začetnica rpS16x2F2 ili trnL(UAG) 5 µM	1,00 µl
Začetnica rnk(UUU)x1 ili rpL32-F 5 µM	1,00 µl
<i>Taq HS</i> polimeraza ( <i>TaKaRa</i> ®; 5 U/µL)	0,15 µl
Otopina DNA uzorka (c = 2,5 ng/µL)	2,00 µl
Ukupni volumen: 25,00 µl	

Termički ciklusi lančane reakcije polimerazom preuzet je od Shaw i sur. (2005), a sastoji se od niza koraka. Prvo se otopina grije na 94 °C 4 minute nakon čega slijedi 30 ciklusa umnažanja pod sljedećim uvjetima: zadržavanje temperature od 95 °C 1 minutu (denaturacija DNA molekule), zatim pad temperature na 50 °C 1 minutu (vezanje začetnica), nakon toga podizanje temperature za 0,3 °C/s do 65 °C i na kraju zadržavanje temperature od 65 °C 4 minute (sinteza novog lanca DNA). Završni korak sinteze sastoji se zadržavanja temperature od 5 minuta na 65 °C. Otopina se zatim zadržava na 12 °C neodređeno vrijeme.

Veličina i kvaliteta produkata lančane reakcije polimerazom provjerena je na gore opisan način pomoću elektroforeze na agaroznom gelu i bojanjem otopinom etidijevog bromida.

Pročišćavanje intergenskih regija kloroplastne DNA upotrebom GenElute™ PCR Clean-Up kompleta (Sigma-Aldrich®; NA1020) provedeno je na sljedeći način:

1. 25 µl PCR umnožene DNA dodano je u 125 µl otopine za vezivanje i promiješano,
2. 500 µl otopine za pripremu kolone dodano je u GenElute plasmid mini spin kolonu za vezivanje te centrifugirano na 20000 g 1 minutu nakon čega je filtrat bačen
3. 150 µl otopine iz koraka 1 pipetirano je na pripremljenu kolonu za vezivanje i centrifugirano 1 minutu na brzini od 20000 g nakon čega je filtrat bačen

4. 500  $\mu$ l otopine za ispiranje (razrijeđene etanolom prema uputama proizvođača) pipetirano je na kolonu za vezivanje koja je zatim centrifugirana 1 minutu na brzini od 20000 g nakon čega je filtrat bačen
5. kolona za vezivanje je centrifugirana 2 minute na brzini od 20000 g bez dodavanja otopine za ispiranje
6. kolona za vezivanje prebačena je u novu epruvetu od 2 mL, na kolonu je dodano 35  $\mu$ l ultračiste vode i inkubirano 1 minutu na sobnoj temperaturi. Nakon toga ponovljeno je centrifugiranje od 1 minute na brzini od 20000 g.
7. pročišćeni PCR produkt (filtrat) pohranjen je na temperaturi od  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do upotrebe.

Pročišćeni PCR produkt sekvenciran je u dva smjera u Macrogen Europe<sup>®</sup> servisnom centru (Amsterdam, Nizozemska) upotrebom istih začetnica korištenih tijekom procesa umnažanja odgovarajućih regija kloroplastne DNA lančanom reakcijom polimerazom. Sekvenciranje je provedeno upotrebom ABI PRISM BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing kompleta i sekvencera ABI 3730xl (Applied Biosystems<sup>®</sup>).

Rezultati sekvenciranja kloroplastnih DNA regija dobiveni su u obliku .ab1 datoteka. Sekvencije svih uzoraka poravnate su pomoću programa CLUSTAL X v2.1 (Larkin i sur., 2007), a zbog nužnosti ručne izmjene korišten je program BioEdit v7.2 (Hall, 1999). Insercije i delecije (indeli) u kloroplastnoj DNA tretirani su kao supstitucije tj. pojedinačni događaj (Caicedo i Schaal, 2004). Na temelju pretpostavke da kloroplastna DNA tvori jedinstvenu skupinu povezivanja (*linkage group*), sekvencije obje regije cpDNA su povezane, a matrice podataka spremljene u FASTA formatu za kasnije analize.

### 3.4.2. Statistička obrada kloroplastnih podataka

Razine unutar populacijske haplotipske raznolikosti kvantificirane su preko izračunatih vrijednosti broja haplotipova ( $h$ ), broja haplotipova po broju jedinki ( $h/n$ ), broju privatnih haplotipova ( $h_{pr}$ ), nepristrana haplotipska raznolikost ( $H_d$ , (Saitou i Nei, 1987)) i nukleotidna raznolikost ( $\pi$ , (Nei i Li, 1979)) koristeći program Arlequin v3.5.2.2 (Excoffier i sur., 2010). Sve insercije i delecije svedenu su na jedno nukleotidno mjesto. Program Arlequin je korišten i kod izračuna interhaplotipskih matrica udaljenosti. Upotrebom programa PopART v1.7



(Leigh i Bryant, 2015) izrađena je haplotipska mreža metodom sparivanja na temelju medijana (*Median-Joining*; MJ).

Prosječna genetička raznolikost unutar populacija ( $h_s$ ), ukupna genetička raznolikost ( $h_T$ ) i genetička diferencijacija ( $G_{ST}$ ; Pons i Petit, 1995) izračunata je uzimajući u obzir isključivo učestalost haplotipova (neuređeni haplotipovi; *unordered haplotypes*), a odgovarajuća mjerila ( $v_S$ ,  $v_T$  i  $N_{ST}$ ; Pons i Petit, 1996) su također izračunata uzimajući u obzir i genetičku sličnost između haplotipova (uređeni haplotipovi; *ordered haplotypes*). Usporedba diferencijacije za uređene ( $N_{ST}$ ) i neuređene ( $G_{ST}$ ) haplotipove provedena je prema Pons i Petit (1996) u programu Permut CpSSR v. 2.0 (Pons i Petit, 1995, 1996). Značajnost je izračunata na temelju 1000 nasumičnih permutacija. Ukoliko je vrijednost  $N_{ST}$  veća od  $G_{ST}$  srodni haplotipovi se mogu pronaći u istoj populaciji češće nego što bi se to slučajno očekivalo te ukazuje na postojanje filogeografske strukture.

U svrhu raščlambe ukupne genetičke varijance na njezine sastavnice na temelju kloroplastnih DNA regija korištena je analiza molekularne varijance. Analize su provedene na isti način kao u slučaju mikrosatelitnih biljega.

### **3.5. Modeliranje rasprostranjenosti vrste**

U svrhu određivanja dinamike pogodnosti staništa i rasprostranjenosti vrste korišteni su podaci o prisutnosti (geografske koordinate) za 62 populacije ljekovite kadulje duž geografskog raspona vrste na Balkanu i Apeninskom poluotoku. Svi podaci geokodirani su u WGS84 koordinatni sustav i prikazani su u tablici 1. Izrađeni su modeli rasprostranjenosti vrste za sadašnjost, srednji holocen (6000 YBP), za vrijeme posljednjeg glacijalnog maksimuma (*Last Glacial Maximum*; LGM, 21 000 YBP) i za vrijeme posljednjeg interglacijala (*Last Interglacial*; LIG, 120 000 YBP) uz pomoć programa MAXENT v3.4.4 (S. J. Phillips i sur., 2017).

Modeli su temeljeni na 19 bioklimatskih varijabli prostornih rezolucija preuzetih iz WorldClim baze prostornih podataka prikazane u tablici 6 (Fick i Hijmans, 2017).

**Tablica 6.** Popis bioklimatskih varijabli korištenih u modeliranju rasprostranjenosti vrste

<b>Naziv varijable</b>	<b>Opis varijable</b>
BIO1	Srednja godišnja temperatura
BIO2	Srednji dnevni raspon temperatura
BIO3	Izotermalnost
BIO4	Sezonska temperatura
BIO5	Maksimalna temperatura najtoplijeg mjeseca
BIO6	Minimalna temperatura najhladnijeg mjeseca
BIO7	Srednja godišnja temperatura
BIO8	Srednja temperatura kvartala s najviše padalina
BIO9	Srednja temperatura najsušeg kvartala
BIO10	Srednja temperatura najtoplijeg kvartala
BIO11	Srednja temperatura najhladnijeg kvartala
BIO12	Godišnja količina oborina
BIO13	Oborine mjeseca s najviše padalina
BIO14	Oborine mjeseca s najmanje padalina
BIO15	Koeficijent varijacije sezonskih oborina
BIO16	Kvartal s najvišom količinom padalina
BIO17	Kvartal s najmanjom količinom padalina
BIO18	Količina oborina u najtoplijem kvartalu
BIO19	Količina oborina u najhladnijem kvartalu

Visoka korelacija između bioklimatskih varijabli uzrokuje nestabilnost u parametrima prilikom modeliranja. Radi utvrđivanja kolinearnosti (snažna korelacija između dvije ili više varijabli) izračunat je inflacijski faktor varijance (*Variance inflation factor; VIF*) pomoću programa ENMTools v1.4.4 (Warren i sur., 2010). Sve VIF vrijednosti veće od 10 za bioklimatske varijable su isključene iz daljnjeg istraživanja zbog problema kolinearnosti. Od ukupno 19 varijabli njih 13 su pokazale problem kolinearnosti te su isključene iz daljnje analize, dok je zadržano njih šest (BIO1, BIO3, BIO4, BIO8, BIO9 i BIO14). Kao najbolji model odabran je onaj s najmanjim AIC (*Akaike information criteria*) vrijednostima kako su predložili Warren i Seifert (2011). Model rasprostranjenosti vrste za vrijeme posljednjeg glacijalnog maksimuma (LGM) temeljen je na MIROC, MPI-ESM-P i CCSM modelima Nacionalnog centra za atmosferska istraživanja, Boulder, Colorado, SAD. Svi modeli su naknadno obrađeni i vizualizirani u programu QGIS v2.18.12 (QGIS Development Team (2020). QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>).

## **4. REZULTATI**

## 4.1. Rezultati analize mikrosatelitnih biljega

### 4.1.1 Unutarpopulacijska raznolikost

Analizom osam mikrosatelitnih lokusa detektiran je ukupno 191 alel (Tablica 7). Svi lokusi su visoko polimorfni: najveći broj alela (41) utvrđen je na lokusu SoUZ001, a najmanji (13) na lokusu SoUZ007, s prosječnom vrijednosti 23,88 alela po lokusu. Svi lokusi imaju visoke PIC vrijednosti (raspon od 0,654 do 0,954), što potvrđuje njihovu efikasnost u procjeni genetičke raznolikosti i strukture populacija.

**Tablica 7.** Svojstva osam mikrosatelitnih lokusa analiziranih u 62 populacije ljekovite kadulje (*Salvia officinalis*). PIC-informacijski sadržaj polimorfizma.

Br.	Lokus	Ponavljajući motiv	Raspon duljina ulomaka (pb)	Ukupan broj alela	PIC
1	SoUZ001	(AG)15	141-221	41	0,954
2	SoUZ002	(TG)11	133-217	23	0,818
3	SoUZ003	(GT)13	160-212	22	0,766
4	SoUZ007	(GT)11	138-210	13	0,654
5	SoUZ011	(GA)25	150-214	30	0,945
6	SoUZ013	(AAC)8	173-218	15	0,836
7	SoUZ014	(AGA)10	175-241	22	0,891
8	SoUZ019	(AGA)16	132-204	25	0,827
Prosjek				23,88	0,836
$\Sigma$				191	

Pomoću programa Micro-Checker u ukupnom broju analiza (496) utvrđena je prisutnost nul-alela u 20 slučajeva što čini 4,03 % uzoraka (Prilog 1). Nul-aleli se pojavljuju nasumično, bez nekog obrasca te razlike u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži nisu uzrokovane nul-alelima. Dva nul-alela utvrđena su u četiri populacije (P22 Vratnik, P37 Mljet, P51 Tommor i P54 Shengjin) dok po jedan nul-alel ima 12 populacija. Na lokusu SoUZ011 utvrđen je najveći broj nul-alela i to šest, zatim na lokusu SoUZ019 pet, dok kod SoUZ007 i SoUZ013 nisu zabilježeni nul-aleli. Prema procjeni uz pomoć algoritma Očekivanja i maksimizacija u programu FreeNa najveći udio nul-alela nalazimo u populaciji P22 Vratnik za lokus SoUZ019 i iznosi 0,210, a najmanji 0,065 za populaciju P54 Shengjin i lokus SoUZ001.

Osnovni populacijski parametri koji opisuju unutarpopulacijsku raznolikost svih 62 populacije prikazani su u tablici 8.

Prosječni broj alela po lokusu po populaciji iznosio je 7,24, maksimalni 11,38 (P38 Konavle), a minimalni 1,38 (P12 Maiella/Pacentro). Broj alela neovisan o broju uzoraka u analiziranoj populaciji (alelno bogatstvo;  $N_{ar}$ ) kretao se od 1,35 (P12 Maiella/Pacentro) do 10,11 (P38 Konavle) sa srednjom vrijednošću od 6,67 (Tablica 7 i Slika 11.). Ukupno je utvrđeno 24 privatna alela ( $N_{pr}$ ). Broj privatnih alela po populaciji većinom je iznosio jedan dok je u populaciji P50 Llogora bilo čak pet privatna alela. Najveće alelno bogatstvo zapaženo je u središnjim balkanskim populacijama (Južna Dalmacija, Crna Gora i sjeverna Albanija, a njegova vrijednost se smanjuje udaljavanjem od tog dijela areala (Slika 11.). Prosječno alelno bogatstvo privatnih alela iznosi 0,14, minimalne vrijednosti od 0 većinom imaju apeninske populacije, dok populacija P60 Plaka (0,74) i P50 Llogora (0,85) imaju najveće vrijednosti. Zapažena heterozigotnost kretala se između 0,081 (P12 Maiella/Pacentro) do 0,832 (P44 Brajići) i prosječnom vrijednosti od 0,665. Vrijednosti očekivane heterozigotnosti su u većini slučajeva bile nešto više i kretale su se od 0,087 (P12 Maiella/Pacentro) do 0,846 (P38 Konavle) i prosječnom vrijednosti od 0,683. Očekivana heterozigotnost nakon procjene učestalosti za nul-alele rezultirala je vrijednostima sličnima izračunu očekivane heterozigotnosti pa se može zaključiti da nul-aleli nisu imali značajan utjecaj na vrijednosti očekivane heterozigotnosti. Multilokusnim testom utvrđeno je značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže u dvije populacije: P51 (Tommor;  $F_{IS} = 0,140$ ;  $P < 0,001$ ) i P54 (Shengjin;  $F_{IS} = 0,113$ ;  $P < 0,001$ ). Na temelju vrijednosti značajnosti Wilcoxonovog testa ( $P < 0,05$ ) za suvišak heterozigotnosti u odnosu na heterozigotnost populacije koja je u ravnoteži mutacija i pomaka ( $H_E > H_{EQ}$ ) prema dvofaznom modelu (TPM) može se zaključiti da su kroz genetičko usko grlo prošle dvije populacije: P14 Novokračine ( $P = 0,027$ ) i P44 Brajići ( $P = 0,010$ ).

**Tablica 8.** Mikrosatelitna raznolikost za 62 populacije ljekovite kadulje (*Salvia officinalis*)

Populacija	Lokalitet	<i>n</i>	<i>N<sub>a</sub></i>	<i>N<sub>ar</sub></i>	<i>N<sub>pr</sub></i>	<i>N<sub>par</sub></i>	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>H<sub>E</sub></i>	<i>H<sub>E</sub>(null)</i>	<i>F<sub>IS</sub></i>	Značajnost	<i>P<sub>bottleneck</sub></i>
P01	Pollino 2	20	4,63	4,43	0	0,00	0,606	0,574	0,579	-0,056	ns	0,531
P02	Pollino 1	23	4,88	4,42	0	0,00	0,522	0,519	0,538	-0,005	ns	0,875
P03	Maratea	23	4,88	4,60	1	0,21	0,576	0,536	0,537	-0,075	ns	0,852
P04	Cilento	24	4,75	4,52	1	0,08	0,516	0,521	0,528	0,010	ns	0,594
P05	Sacco	21	5,38	5,10	0	0,00	0,560	0,608	0,617	0,080	ns	0,234
P06	Savoia	22	4,63	4,29	1	0,12	0,591	0,591	0,606	-0,001	ns	0,422
P07	Aurunci	24	5,75	5,22	0	0,00	0,651	0,623	0,625	-0,045	ns	0,371
P08	Ausoni	20	5,88	5,46	0	0,01	0,606	0,628	0,645	0,034	ns	0,727
P09	Supino	23	5,88	5,32	0	0,00	0,533	0,580	0,598	0,081	ns	0,980
P10	d'Antino	20	3,50	3,41	0	0,05	0,531	0,500	0,512	-0,063	ns	0,230
P11	M, Salviano	23	3,38	3,22	0	0,00	0,576	0,520	0,528	-0,108	ns	0,191
P12	Maiella/Pacentro	20	1,38	1,35	0	0,00	0,081	0,087	0,091	0,064	ns	0,813
P13	Trieste	24	6,00	5,53	0	0,00	0,630	0,650	0,655	0,031	ns	0,629
P14	Novokračine	24	3,38	3,27	0	0,00	0,474	0,527	0,576	0,100	ns	<b>0,027</b>
P15	Ilirska Bistrica	21	5,88	5,65	0	0,00	0,750	0,717	0,723	-0,046	ns	0,371
P16	Kamenjak	23	7,25	6,66	0	0,01	0,701	0,695	0,699	-0,009	ns	0,809
P17	Šušnjeвица	19	6,38	6,16	0	0,07	0,697	0,718	0,723	0,028	ns	0,680
P18	Cres	21	7,50	6,99	0	0,02	0,762	0,733	0,735	-0,039	ns	0,422
P19	Lošinj	22	7,88	7,14	1	0,11	0,682	0,700	0,702	0,026	ns	0,973
P20	Krk	23	8,38	7,56	0	0,09	0,717	0,739	0,751	0,029	ns	0,973
P21	Stara Baška	22	8,00	7,29	0	0,04	0,790	0,760	0,761	-0,040	ns	0,422
P22	Vratnik	21	7,88	7,28	0	0,12	0,667	0,772	0,783	0,137	*	0,422
P23	Dugi Otok	23	8,50	7,44	0	0,04	0,669	0,678	0,692	0,014	ns	0,990
P24	Pag	24	8,75	7,86	0	0,19	0,755	0,761	0,768	0,007	ns	0,902
P25	Karlobag	24	7,63	6,85	0	0,13	0,724	0,773	0,782	0,063	ns	0,527
P26	Otišina	24	8,38	7,45	0	0,05	0,714	0,736	0,749	0,031	ns	0,809
P27	Pirovac	23	8,00	7,04	0	0,09	0,712	0,708	0,710	-0,006	ns	0,875
P28	Šparadići	16	9,13	9,13	1	0,25	0,719	0,759	0,767	0,053	ns	0,980

**Tablica 8.** Nastavak

P29	Zrmanja	21	8,13	7,49	0	0,23	0,691	0,749	0,756	0,078	ns	0,844
P30	Vinišće	25	9,63	8,49	0	0,01	0,735	0,785	0,795	0,063	ns	0,578
P31	Vis	20	6,75	6,42	0	0,27	0,713	0,711	0,729	-0,002	ns	0,902
P32	Unešić	22	9,63	8,80	1	0,15	0,733	0,779	0,793	0,059	ns	0,629
P33	Biokovo	18	8,13	7,87	0	0,04	0,750	0,763	0,771	0,016	ns	0,371
P34	Hvar	21	10,13	9,18	1	0,26	0,774	0,775	0,783	0,002	ns	0,902
P35	Pelješac	24	11,13	9,70	0	0,34	0,745	0,768	0,769	0,030	ns	0,629
P36	Runovici	24	10,00	8,83	1	0,18	0,734	0,781	0,783	0,059	ns	0,980
P37	Mljet	22	9,13	8,47	1	0,19	0,665	0,767	0,790	0,133	*	0,875
P38	Konavle	25	11,38	10,10	0	0,17	0,825	0,846	0,849	0,025	ns	0,473
P39	Međugorje	23	10,38	9,33	0	0,25	0,832	0,817	0,822	-0,017	ns	0,422
P40	Mostar	19	10,00	9,54	0	0,18	0,757	0,805	0,815	0,060	ns	0,770
P41	Vrbanj	19	10,63	9,89	1	0,48	0,809	0,807	0,811	-0,003	ns	0,994
P42	Luštica	19	9,00	8,45	0	0,13	0,750	0,775	0,782	0,032	ns	0,973
P43	Piva	20	6,50	6,01	1	0,45	0,625	0,606	0,608	-0,032	ns	0,875
P44	Brajići	23	8,25	7,61	0	0,10	0,832	0,806	0,811	-0,032	ns	<b>0,010</b>
P45	Rumija	20	9,88	9,16	0	0,22	0,819	0,814	0,817	-0,006	ns	0,844
P46	Bratonožići	20	9,38	8,74	1	0,34	0,775	0,823	0,829	0,058	ns	0,473
P47	Božaj	22	9,38	8,42	1	0,20	0,676	0,767	0,780	0,118	*	0,973
P48	Miljkovac	17	4,50	4,43	0	0,00	0,463	0,508	0,556	0,088	ns	0,875
P49	Sićevo	20	5,38	5,03	0	0,02	0,644	0,614	0,634	-0,049	ns	0,902
P50	Llogora	20	9,00	8,48	5	0,85	0,744	0,777	0,778	0,043	ns	0,996
P51	Tommor	24	5,50	5,20	0	0,02	0,557	0,648	0,677	<b>0,140</b>	***	0,422
P52	Prespa	24	5,00	4,50	0	0,01	0,578	0,537	0,550	-0,076	ns	0,809
P53	Dajti	24	7,25	6,70	0	0,05	0,651	0,734	0,749	0,113	**	0,320
P54	Shengjin	22	9,50	8,59	0	0,08	0,705	0,794	0,807	<b>0,113</b>	***	0,727
P55	Jablanica	19	6,00	5,69	1	0,39	0,612	0,644	0,658	0,051	ns	0,963
P56	Zagori	20	8,00	7,34	0	0,07	0,631	0,701	0,711	0,100	ns	1,000
P57	Timfi	24	6,63	5,97	0	0,03	0,557	0,636	0,664	0,123	ns	0,902

**Tablica 8.** Nastavak

P58	Smolikas	24	6,13	5,56	0	0,09	0,708	0,683	0,686	-0,038	ns	0,578
P59	Arta	24	5,75	4,99	0	0,09	0,578	0,595	0,602	0,028	ns	0,844
P60	Plaka	21	6,25	5,90	4	0,74	0,708	0,655	0,660	-0,082	ns	0,680
P61	Skiti, Kozani	20	7,00	6,54	1	0,25	0,663	0,703	0,709	0,058	ns	0,230
P62	Lygeri, Kozani	23	6,00	5,43	0	0,13	0,674	0,667	0,675	-0,011	ns	0,527
$\Sigma$		1350			24							
Prosjek		21,77	7,24	6,67	0,39	0,14	0,665	0,683	0,693			
Minimum		16,00	1,38	1,35	0,00	0,00	0,081	0,087	0,091			
Maksimum		25,00	11,38	10,10	5,00	0,85	0,832	0,846	0,849			

$n$  - veličina uzorka

$N_a$  - prosječan broj alela po lokusu

$N_{ar}$  - alatno bogatstvo

$N_{pr}$  - broj privatnih alela

$N_{par}$  - alelna bogatstvo privatnih alela

$H_O$  - zapažena heterozigotnost

$H_E$  - očekivana heterozigotnost

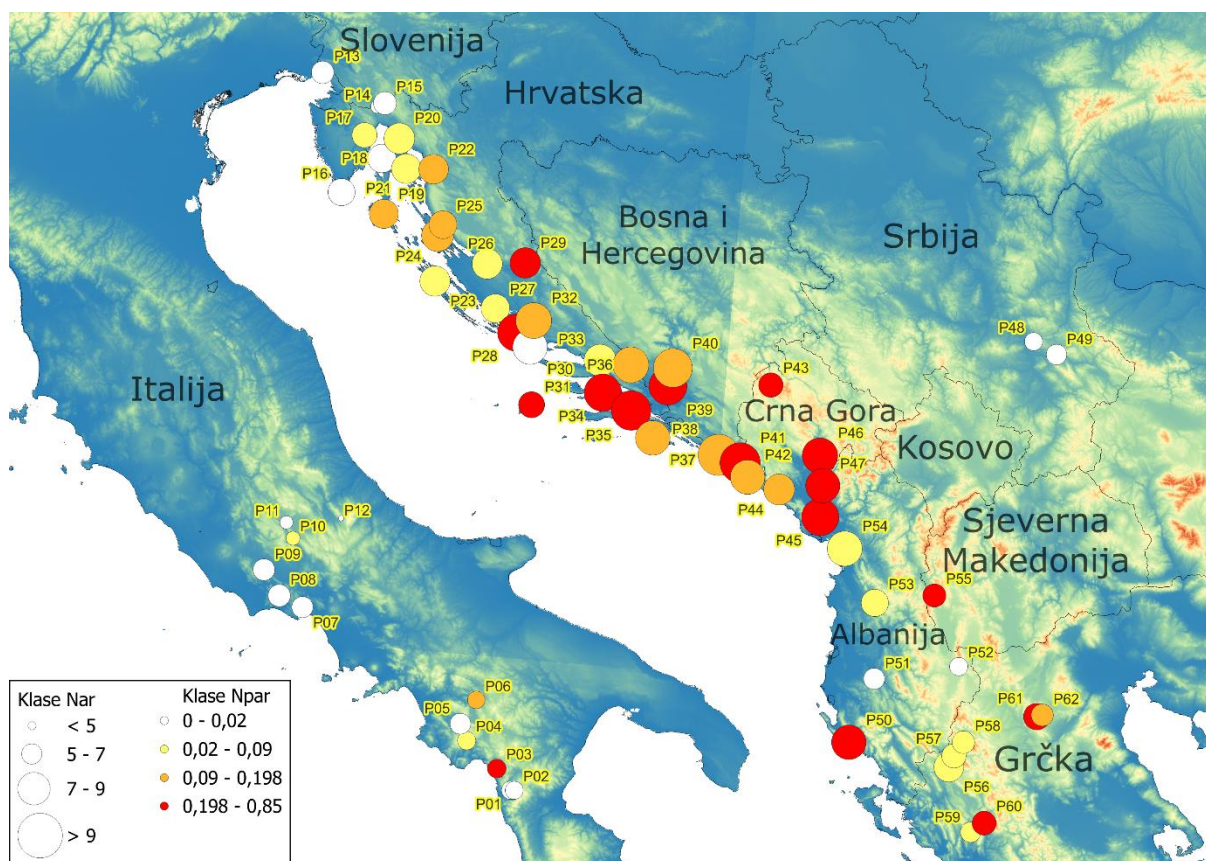
$H_{E(null)}$  - očekivana heterozigotnost nakon procjene učestalosti nul-alela

$F_{IS}$  - koeficijent samooplodnje

$P_{bottleneck}$  - Značajnost Wilcoxonovog testa za suvišak heterozigotnosti u odnosu heterozigotnost populacije koja je u ravnoteži mutacija i pomaka ( $H_E > H_{EQ}$ ): genetičko usko grlo, prema dvofaznom modelu (TPM). Vrijednost  $P < 0,05$  su podebljane.

Značajnost  $F_{IS}$  vrijednosti: \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $0,001 < P < 0,01$ ; \*  $0,01 < P < 0,05$ ; <sup>ns</sup>  $P > 0,05$



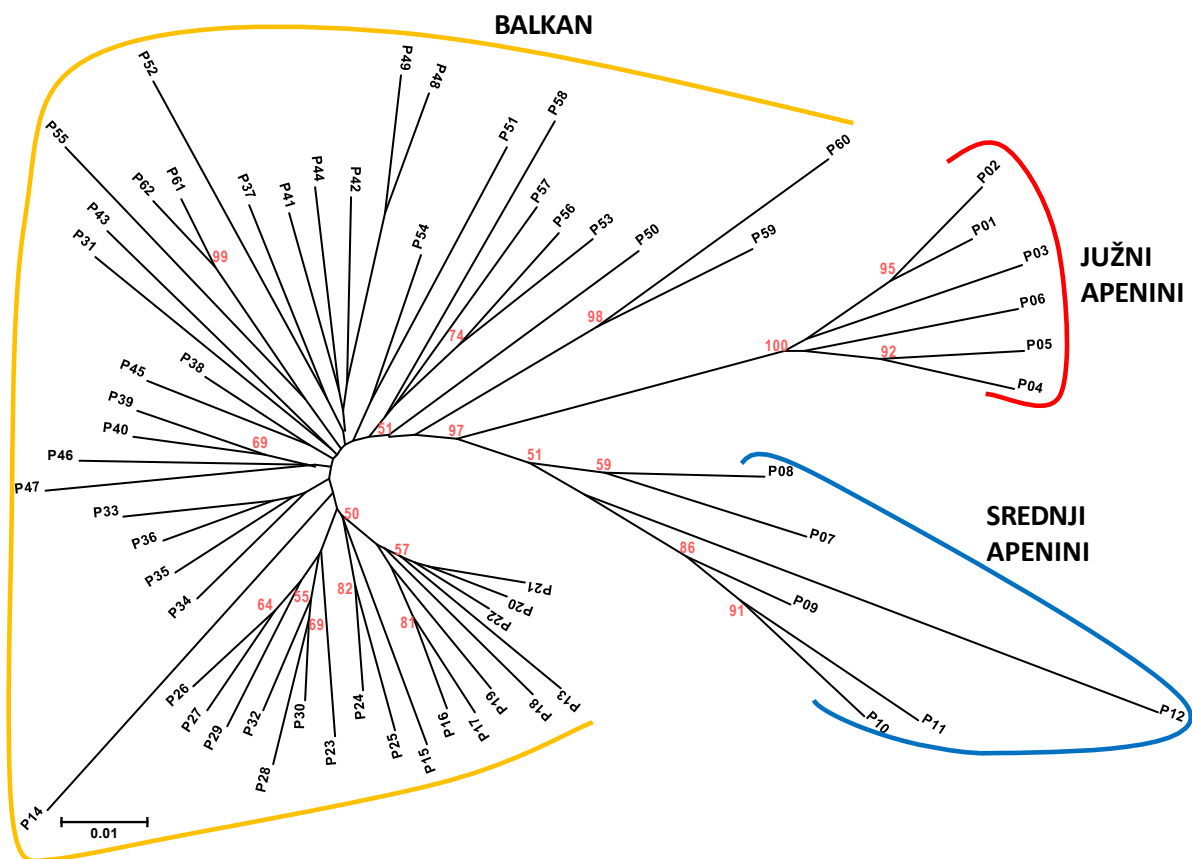


**Slika 11.** Alelno bogatstvo ( $N_{ar}$ ) i alelno bogatstvo privatnih alela ( $N_{par}$ ) 62 populacije ljekovite kadulje (*Salvia officinalis*)

#### 4.1.2 Diferencijacija i struktura populacija

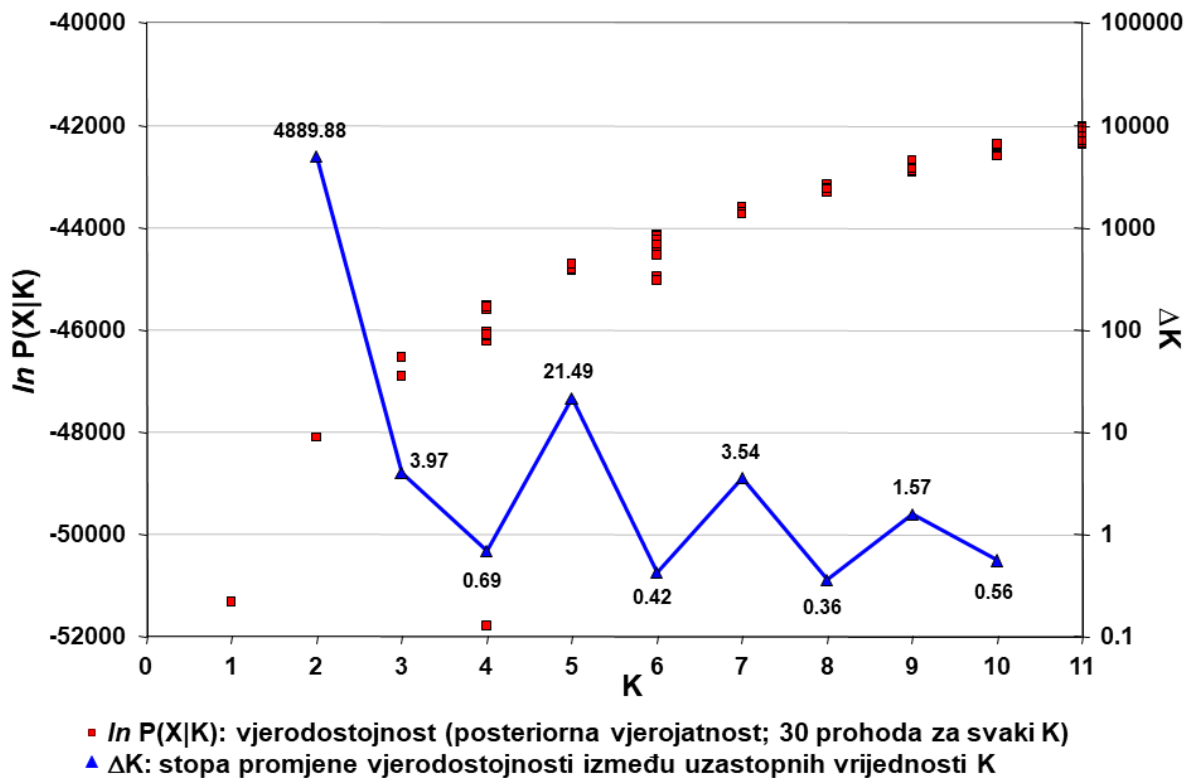
Matrica vrijednosti indeksa genetičke diferencijacije ( $F_{ST}$ ) između svih parova populacija nalazi se u prilogu 3. Vrijednosti  $F_{ST}$  u većine parova populacija su bile visokoznačajne za  $P < 0,05$  gdje je najmanja vrijednost između populacija P39 (Međugorje) i P40 (Mostar) s vrijednosti od 0,009 dok je najveća vrijednost bila između P12 (Maiella/Pacentro) i P48 (Miljkovac) s vrijednosti od 0,708. Prosječna vrijednost  $F_{ST}$  na razini svih populacija iznosi 0,196. Između šest parova zabilježeno je da vrijednosti  $F_{ST}$  nisu značajne, a radi se o geografski bliskim populacijama između kojih nije uočena genetička diferencijacija.

Na srodstvenom stablu (slika 12) je vidljivo da su se populacije grupirale u skladu s njihovim geografskim položajem pri čemu su se apeninske populacije značajno odvojile od balkanskih, a balkanske populacije su se smjestile u skladu s njihovom geografskom pozicijom, prateći jadransku obalu od sjevera prema jugu.



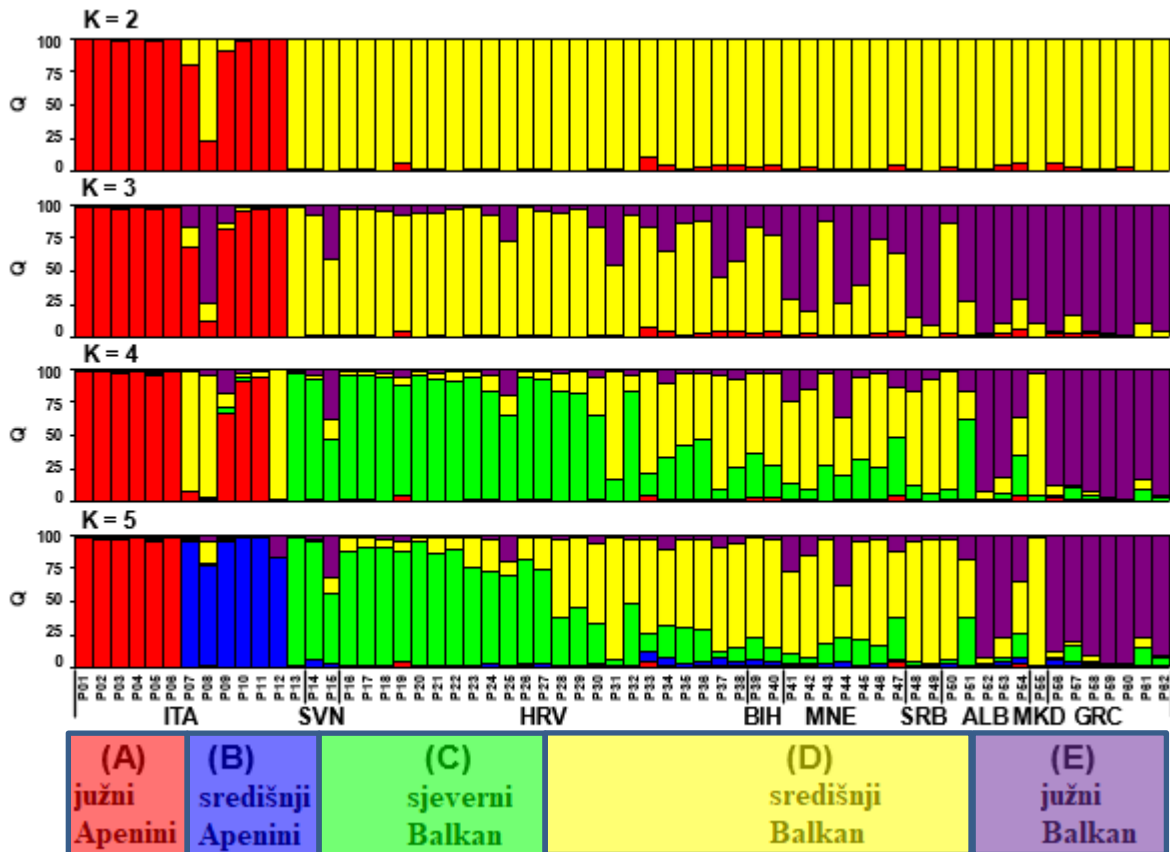
**Slika 12.** Nezakorijenjeno stablo po Fitchu i Margoliashu izrađeno na temelju matrice preinačene tetivne udaljenosti između 62 populacije ljekovite kadulje (*Salvia officinalis*). Vrijednosti bootstrap dobivene su na temelju 1000 pseudoponavljjanja i označene su na granama crvenom bojom.

Nakon provedbe Bayesovske analize populacijske strukture pomoću programa STRUCTURE najviša je vrijednost parametra  $\Delta K$  utvrđena pri  $K = 2$  (4889,88), a sljedeća najveća pri  $K = 5$  (21,49) kako je prikazano na slici 13. Struktura uzorkovanih populacija s udjelima genoma jedinki koji pripadaju određenoj genetičkoj skupini izračunatih pri  $K = 2$  do  $K = 5$  prikazana je na slici 14. Jedinke su pridružene pojedinim skupinama na temelju izračuna udjela genoma ( $Q$ ) koji potječe iz određene izvorne populacije. Ukoliko je udio određene izvorne populacije jednak ili veći od 0,75 pretpostavljeno je da jedinke pripadaju jednoj izvornoj populaciji, a ukoliko je manji od 0,75 tada je pretpostavljeno da jedinke imaju mješovito (hibridno) podrijetlo iz dvije ili više izvornih populacija.



**Slika 13.** Odabir optimalnog broja genetičkih skupina (K) na temelju rezultata analize genetičke strukture pomoću programa STRUCTURE

Pri  $K = 2$  populacije apeninskog poluotoka genetički pripadaju istoj skupini, dok populacije Balkana pripadaju drugoj skupini. Izuzetak je populacija P08 (Ausoni) koja je genetički sličnija balkanskim nego apeninskim populacijama. Pri  $K = 3$  i  $K = 4$  balkanske se populacije počinju razvrstavati u dvije odnosno tri genetičke skupine prateći zemljopisno podrijetlo navedenih populacija uz znatan udio populacija miješanog podrijetla. Pri  $K = 5$  dolazi do jasnog odvajanja populacija srednjih i južnih Apenina u dvije genetičke skupine te stoga možemo razlikovati sljedećih pet genetičkih skupina: (A) južni Apenini (P01-P06), (B) središnji Apenini (P07-P12), (C) sjeverni Balkan (P13-P27), (D) središnji Balkan (P28-P51; P54-P55) te (E) južni Balkan (P52-P53; P56-P62).



**Slika 14.** Bayesovska analiza genetičke strukture pomoću programa STRUCTURE pri  $K = 2$  do 5. Sve jedinice populacije predstavljene su stupcem, a boja odgovara udjelu gena ( $Q$ ) koji potječe iz određene genetičke skupine (izvorne populacije). Slovim od A do E imenovane su genetičke skupine dobivene na temelju  $K = 5$ .

Svih šest populacija skupine A i četiri od šest populacija skupine B ima udjele gena ( $Q$ ) veće od 0,9 što ukazuje na dominantnu pripadnost ovih populacija navedenim genetičkim skupinama (slika 15). U sjevernom Balkanu 12 od ukupno 15 populacija pripada genetičkoj skupini C, dok ostale tri populacije imaju mješovito podrijetlo, s pretežitim udjelom genetičke skupine D (P24 Pag) i E (P15 Ilirska Bistrica i P25 Karlobag). U srednjem Balkanu 14 od ukupno 26 populacije pripada svojoj genetičkoj skupini D, a ostalih 12 je mješovitog podrijetla, s dominantnim udjelom genetičke skupine C, ali i značajnim udjelom genetičke skupine E. Zanimljivo je da populacije P48 (Miljkovac) i P49 (Sićevo) imaju veću genetičku sličnost populacijama skupine D, nego populacijama skupine E kojoj su geografski znatno bliže. Južnom Balkanu (skupina E) pripada sedam populacija bez znatnijeg miješanja. Slično kao i kod skupina A i B, u skupini E pet od sedam populacija ima vrijednosti  $Q$  veće od 0,9 što ukazuje na dominantnu pripadnost ovih populacija genetičkoj skupini E. Rezultati analize

raznolikosti genetičkih skupina ( $K = 5$ ) ljekovite kadulje prikazani su u tablici 9. Genetička skupina D (središnji Balkan) pokazuje najveće vrijednosti alelnog bogatstva ( $N_{ar}$ ), alelnog bogatstva privatnih alela ( $N_{par}$ ), kao i očekivane heterozigotnosti ( $H_E$ ) dok genetičke skupine A (južni Apenini) i B (središnji Apenini) imaju najmanje vrijednosti navedenih parametara.

Rezultati analize molekularne varijance (AMOVA) na temelju mikrosatelitnih biljega prikazani su u tablici 10. Bez obzira na pretpostavljene razine strukture većina je ukupne genetičke varijance bila uvjetovana razlikama unutar populacija što je i razumljivo imajući u vidu da je ljekovita kadulja stranooplodna biljna vrsta. Razlike između populacija činile su 19,91% ukupne genetičke varijance (Tablica 10, Analiza I), dok je razlikama između genetičkih skupina (A, B, C, D, E) bilo objašnjeno 7,71% ukupne genetičke varijance (Tablica 10, analiza II). Razlike između genetičkih skupina s Apeninskog poluotoka (A, B) su objašnjavale znatno veći postotak ukupne genetičke varijance (19,08%; tablica 10, analiza III) od onih između balkanskih genetičkih skupina (C, D, E; 1,97%; tablica 10, analiza IV) kao i razlike između apeninskih populacija unutar skupina (21,02%) od onih između balkanskih populacija (12,55%).

Navedeni rezultati ukazuju na to da su apeninske genetičke skupine kao i populacije međusobno znatno izoliranije od balkanskih. U usporedbi s apeninskima, balkanske genetičke skupine su daleko manje zemljopisno definirane dok između populacija postoji nesmetan prijenos gena. Razlike između apeninskih i balkanskih genetičkih skupina objašnjavaju 8.30% ukupne genetičke varijance (Tablica 10, analiza V). Budući da razlike između apeninskih genetičkih skupina objašnjavaju veći postotak ukupne genetičke varijance (19,08%) od razlika između svih skupina (7,71%) moguće je pretpostaviti da se apeninske genetičke skupine nisu odvojile od balkanskih u isto vrijeme tijekom evolucije ljekovite kadulje.

**Tablica 9.** Analiza raznolikosti genetičkih skupina (A-E) ljekovite kadulje (*Salvia officinalis*) dobivenih na temelju analize genetičke strukture pomoću programa Structure

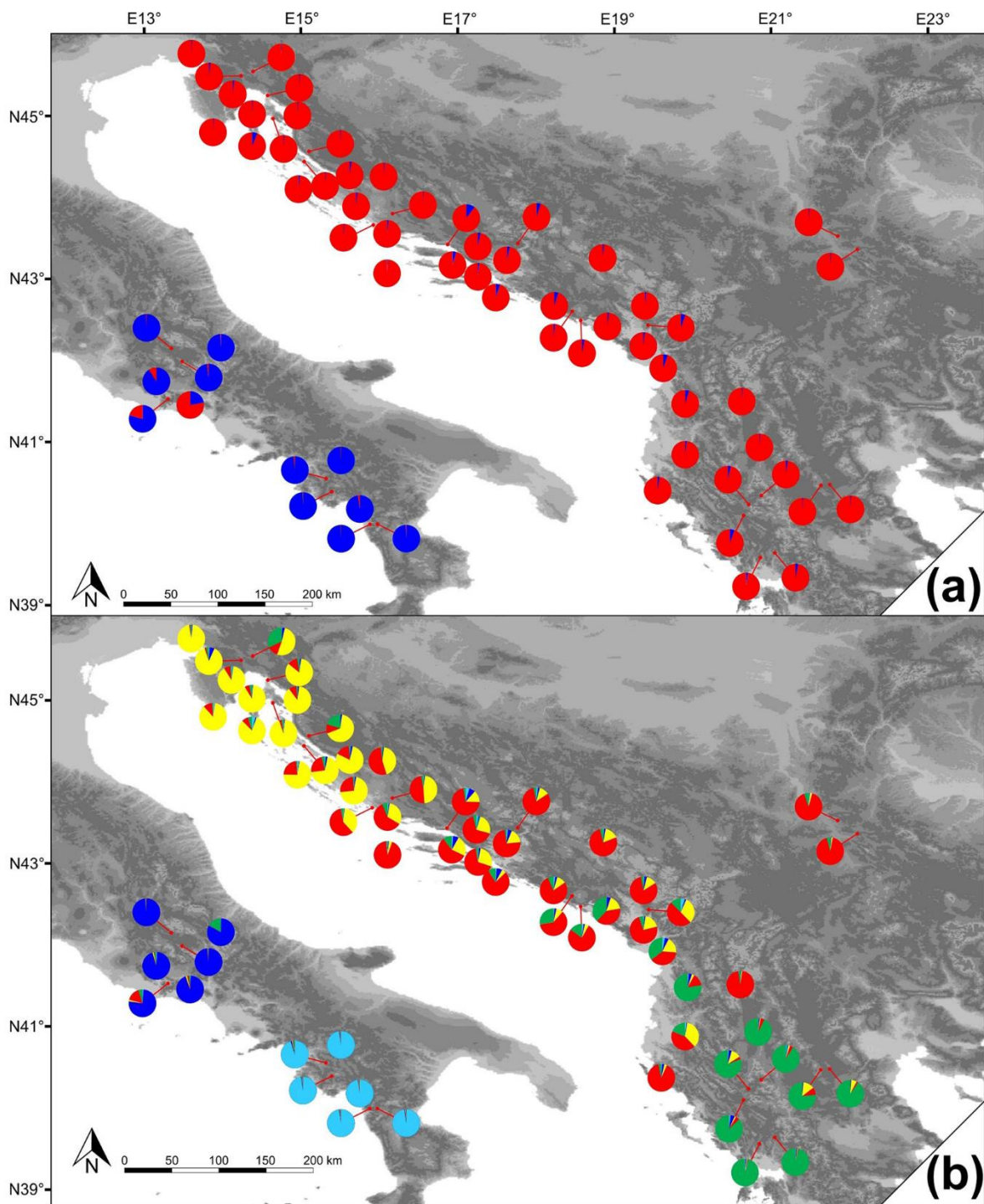
Skupina	Regija	Broj populacija	Broj jedinki	$N_{ar}$	$N_{par}$	$H_o$	$H_E$
A	južni Apenini	6	133	4,562	0,88	0,562	0,558
B	središnji Apenini	6	130	3,997	0,15	0,496	0,490
C	sjeverni Balkan	15	338	6,678	0,48	0,696	0,711
<b>D</b>	<b>središnji Balkan</b>	<b>26</b>	<b>545</b>	<b>8,039</b>	<b>1,92</b>	<b>0,718</b>	<b>0,749</b>
E	Južni Balkan	9	204	5,881	1,39	0,639	0,657

$N_{ar}$  - alatno bogatstvo

$N_{par}$  - alelni bogatstvo privatnih alela

$H_o$  - zapažena heterozigotnost

$H_E$  - očekivana heterozigotnost

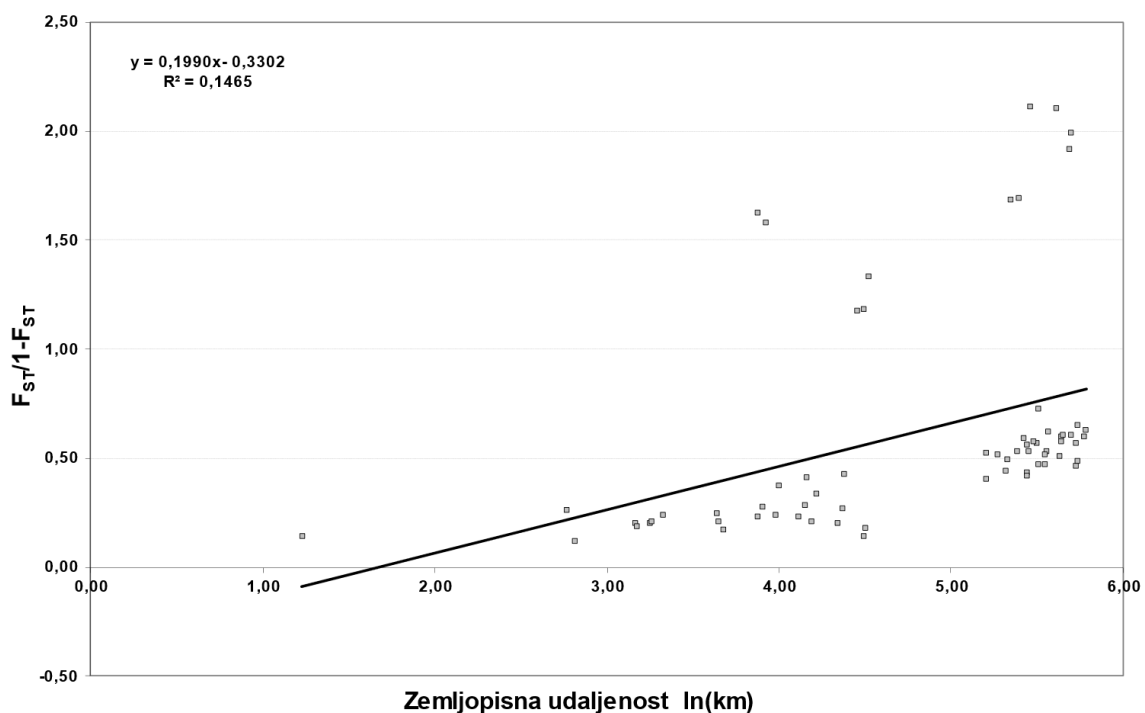


**Slika 15.** Geografski prikaz genetičke strukture populacija ljekovite kadulje dobivene analizom pomoću programa STRUCTURE pri (a)  $K = 2$  i (b)  $K = 5$ . Svaka je populacija predstavljena prosječnim udjelom genoma ( $Q$ ) pomoću tortnog grafikona, a boja predstavlja genetičku skupinu: svjetlo plava-južni Apenini, tamno plava-središnji Apenini, žuta-sjeverni Balkan, crvena-središnji Balkan, zelena-južni Balkan.

**Tablica 10.** Analiza molekularne varijance (AMOVA) na temelju mikrosatelitnih biljega: (I) između 62 populacije ljekovite kadulje (*Salvia officinalis*), (II) između pet genetičkih skupina (A – E), (III) između apeninskih skupina (A i B), (IV) između balkanskih skupina (C, D i E) te (V) između apeninskih (A i B) i balkanskih (C, D i E) skupina.

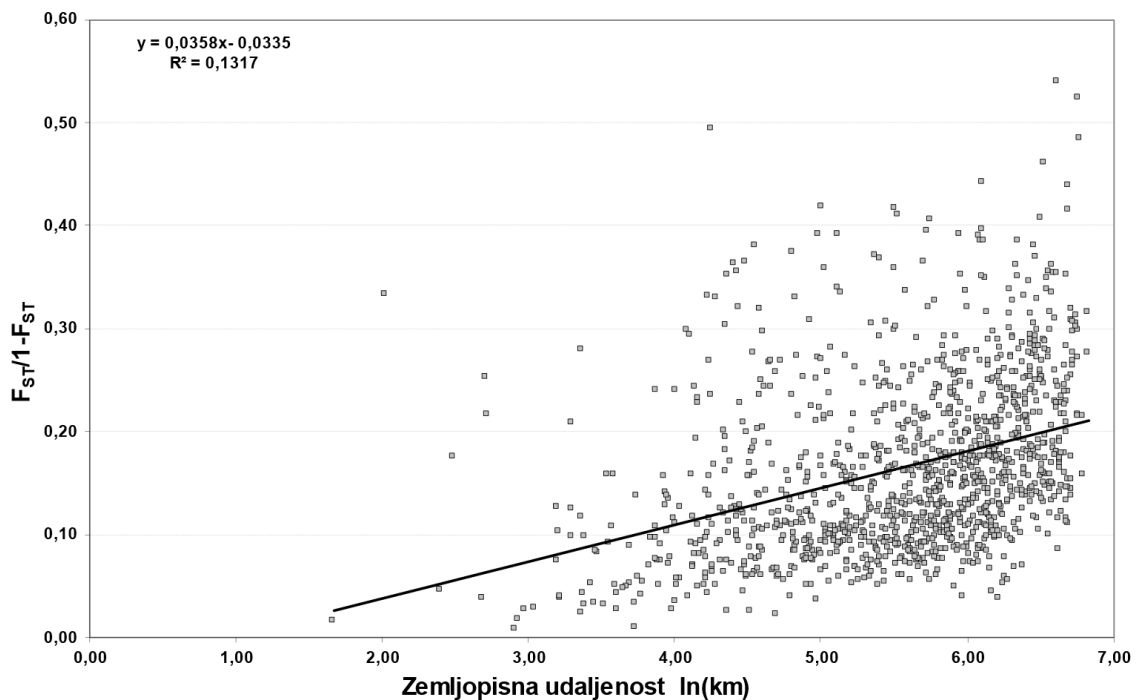
Analiza	Izvor	df	Sastavnice varijance	% ukupne varijacije	$\varphi$ -statistika	vrijednost	P( $\varphi$ )
I	Između populacija	61	0,679	19,91	$\varphi_{ST}$	0,199	< 0,0001
	Unutar populacija	2638	2,731	80,09			
II	Između genetičkih skupina	4	0,268	7,71	$\varphi_{CT}$	0,077	< 0,0001
	Između populacija unutar skupina	57	0,479	13,78	$\varphi_{SC}$	0,149	< 0,0001
	Unutar populacija	2638	2,731	78,51	$\varphi_{ST}$	0,215	< 0,0001
III	Između apeninskih skupina (A i B)	1	0,671	19,08	$\varphi_{CT}$	0,191	< 0,0001
	Između populacija unutar skupina	10	0,740	21,02	$\varphi_{SC}$	0,260	< 0,0001
	Unutar populacija	514	2,108	59,90	$\varphi_{ST}$	0,401	< 0,0001
IV	Između balkanskih skupina (C, D i E)	2	0,066	1,97	$\varphi_{CT}$	0,020	< 0,0001
	Između populacija unutar skupina	47	0,423	12,55	$\varphi_{SC}$	0,128	< 0,0001
	Unutar populacija	2124	2,882	85,48	$\varphi_{ST}$	0,145	< 0,0001
V	Između apeninskih i balkanskih skupina	1	0,300	8,30	$\varphi_{CT}$	0,083	< 0,0001
	Između populacija unutar skupina	60	0,583	16,14	$\varphi_{SC}$	0,176	< 0,0001
	Unutar populacija	2638	2,731	75,56	$\varphi_{ST}$	0,244	< 0,0001

Analiza izolacije uslijed udaljenosti (IBD) napravljena je zasebno za populacije Apenina i Balkana, a rezultati su prikazani na slikama 16 i 17. Korelacija između matrice  $F_{ST}/(1-F_{ST})$  vrijednosti i matrice prirodnih logaritama geografskih udaljenosti apeninskih populacija iznosila je  $r = 0,383$ , a balkanskih  $r = 0,363$  i obje vrijednosti su visokoznačajne ( $p_{Mantel} < 0,0001$ ) nakon 10000 permutacija Mantelovog testa. Linearnom regresijom genetičkih udaljenosti [ $y; F_{ST}/(1-F_{ST})$ ] na geografske [ $x; \ln(\text{km})$ ] izračunat je pravac regresije, za Apenine  $y = 0,1990x - 0,3302$ , a za Balkan  $y = 0,0358x - 0,0335$ . Koeficijent determinacije za Apenine iznosi  $R^2 = 0,1465$  (slika 16), a za Balkan  $R^2 = 0,1317$  (slika 17) stoga se 14,7 % za Apenine, odnosno 13,2 % genetičke diferencijacije za Balkan između analiziranih populacija može objasniti njihovom prostornom udaljenošću što znači da na oba poluotoka postoji izolacija uslijed udaljenosti.



**Slika 16.** Regresija genetičke diferencijacije [ $F_{ST}/(1-F_{ST})$ ] na geografsku udaljenost [ $\ln(\text{km})$ ] za apeninske populacije





**Slika 17.** Regresija genetičke diferencijacije [ $F_{ST}/(1-F_{ST})$ ] na geografsku udaljenost [ $\ln(km)$ ] za balkanske populacije

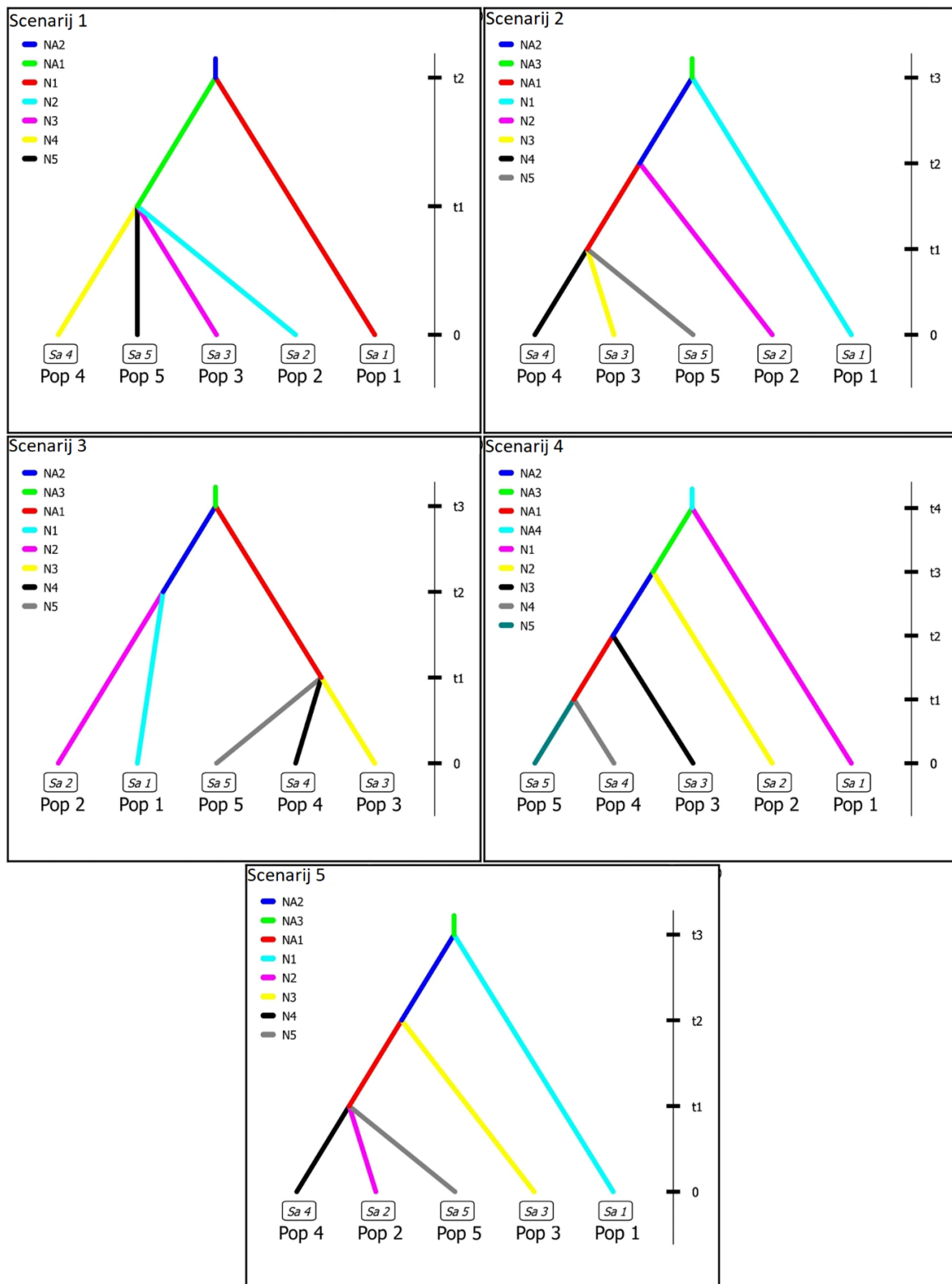
Rezultati koalescentne simulacije scenarija ljekovite kadulje temeljem ABC analize pokazali su da je prvi scenarij imao najveću vrijednosti posteriorne vjerojatnosti (Tablica 11). Prvi scenarij pretpostavlja da se skupina južnih Apenina prva odvojila od ancestralne populacije koja kasnije daje četiri ostale skupine (Slika 18). Vrijeme za prvo i drugo odvajanje procijenjeno je na 7020 ( $t_2$ ) i 582 ( $t_1$ ) generacija što ukazuje na prolongiranu izolaciju skupine južnih Apenina. Treba naglasiti da je 95% interval pouzdanosti za oba rezultata vrlo širok (1330 do 64 500 za  $t_1$  i 131 do 2060 za  $t_2$ ). Procijenjena efektivna veličina populacija skupina kretala se od 945 (središnji Apenini) do 9140 (središnji Balkan) kao što je prikazano u tablici 12. Iako je prvi scenarij najvjerojatniji ipak se ne može u potpunosti odbaciti hipoteze scenarija dva i tri zbog visokih vrijednosti posteriorne vjerojatnosti.

**Tablica 11.** Analiza scenarija razdvajanja izvornih populacija ljekovite kadulje (*Salvia officinalis*) s naznačenim posteriornim vrijednostima i 95-postotnim intervalom pouzdanosti (*confidence interval*; CI)

Scenarij	Posteriorne vjerojatnosti	95 % CI
1	0,4927	0,4768-0,5085
2	0,3152	0,3018-0,3287
3	0,1802	0,1700-0,1903
4	0,0057	0,0000-0,0140
5	0,0062	0,0000-0,0147

**Tablica 12.** Efektivne veličine izvornih populacija ljekovite kadulje (*Salvia officinalis*) i vremena njihovog razdvajanja prema scenariju 1 utvrđene pomoću programa DIYABC

Parametar	Opis	Medijan	q025	q975
N1	Efektivna veličina izvorne populacije Pop1 (A = južni Apenini)	3700	1170	9090
N2	Efektivna veličina izvorne populacije Pop2 (B = središnji Apenini)	945	208	5580
N3	Efektivna veličina izvorne populacije Pop3 (C = sjeverni Balkan)	6270	2340	9560
N4	Efektivna veličina izvorne populacije Pop4 (D = središnji Balkan)	9140	6590	9930
N5	Efektivna veličina izvorne populacije Pop5 (E = južni Balkan)	7430	3510	9760
t1	Vrijeme razdvajanja (broj generacija)	582	131	2060
NA1	Efektivna veličina ancestralne populacije 1	27100	9260	70700
t2	Vrijeme razdvajanja (broj generacija)	7020	1330	64500
NA2	Efektivna veličina ancestralne populacije 2	36100	8670	94200



**Slika 18.** Prikaz testiranih povijesnih scenarija razdvajanja ancestralnih populacija ljekovite kadulje (*Salvia officinalis*) na Apeninima i Balkanskom poluotoku koristeći DIYABC program. t1-t4 = vrijeme razdvajanja, N1-N5 i NA1-NA4 = efektivne veličine izvornih i ancestralnih populacija u datom vremenskom periodu. Pop1-Pop5 predstavljaju genetičke skupine (A) južni Apenini, (B) središnji Apenini, (C) sjeverni Balkan, (D) središnji Balkan, (E) južni Balkan.

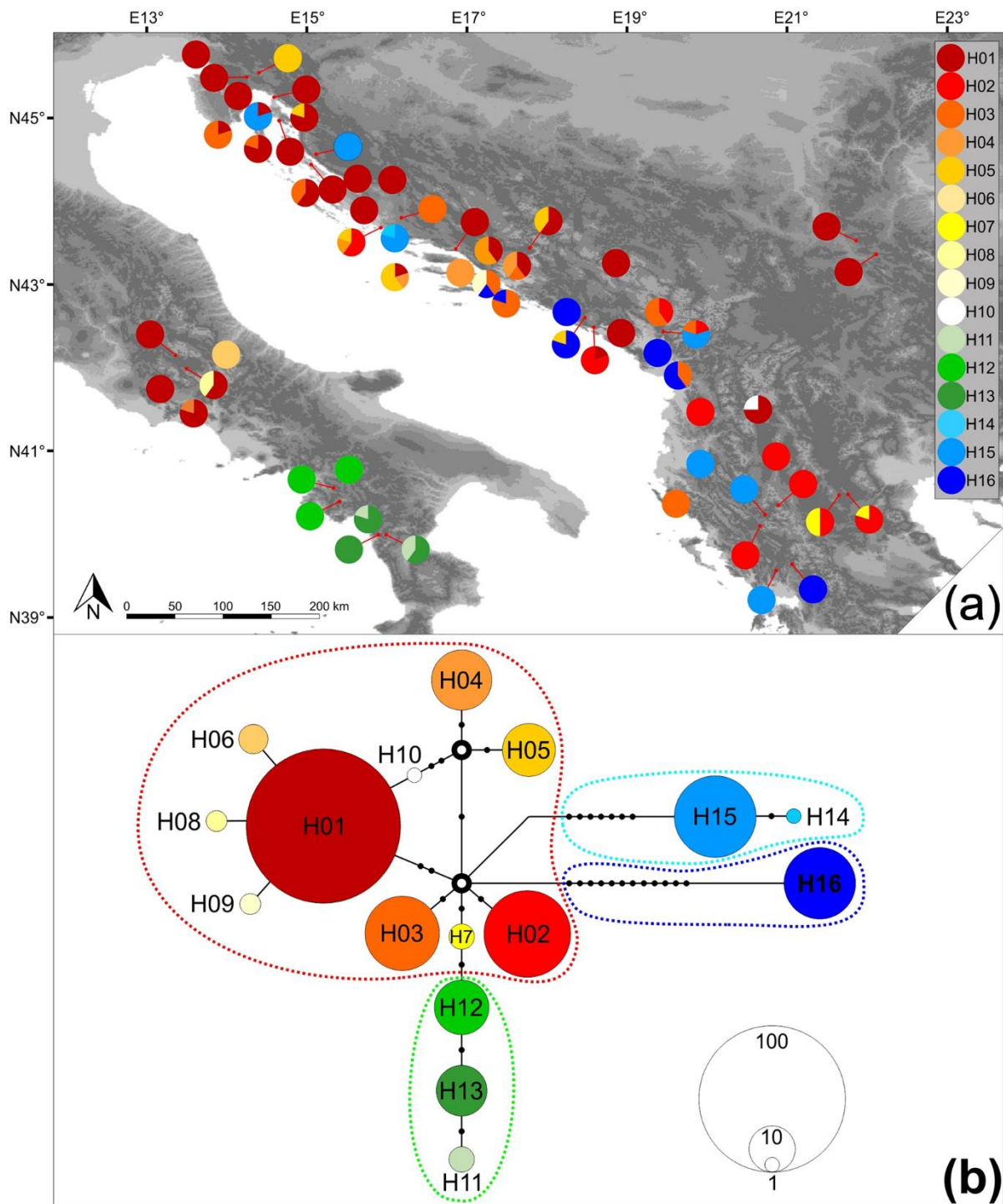
## 4.2. Rezultati analize kloroplastnih DNA regija

Sekvenciranje odabranih cpDNA regija uspješno je provedeno na 299 jedinki. U šest populacija korišteni su DNA uzorci od četiri jedinke dok su kod 55 populacija umnoženi i sekvencirani uzorci DNA svih pet jedinki. Uzorci iz populacije P08 (Ausoni) nisu umnoženi niti nakon opetovanih pokušaja. Intergenska regija *rps16-trnK* je imala duljinu od 692 parova baza, a *rpL32-trnL* 869 parova baza što sveukupno čini duljinu od 1561 parova baza. Nakon poravnavanja umnoženih sekvencija njihova duljina je svedena na 684 parova baza za *rps16-trnK* regiju i 800 parova baza za *rpL32-trnL* regiju, a sveukupna duljina je iznosila 1484 parova baza. Na temelju analize raznolikosti haplotipova utvrđeno je 16 haplotipova. Za istraživane izvorne populacije ljekovite kadulje nepristrana raznolikost haplotipova iznosi 0,817, a nukleotidna raznolikost 0,004 (Tablica 13).

**Tablica 13.** Analiza haplotipske raznolikosti 61 populacije ljekovite kadulje na temelju kloroplastnih regija

Br.	Parametar	Vrijednosti
1	broj sekvencija	300
2	broj nukleotidnih mjesta bez skraćivanja insercija i delecija	1484
3	ukupni broj nukleotidnih mjesta bez višenukleotidnih insercija i/ili delecija/)	1471
4	Uklonjene višenukleotidne insercije i/ili delecije	13
5	nevarijabilna (monomorfna) nukleotidna mjesta	1406
6	varijabilna (polimorfna) nukleotidna mjesta	65
7	"singleton" varijabilna nukleotidna mjesta	39
8	parsimonično informativna nukleotidna mjesta	26
<hr/>		
1	$n$ – ukupan broj sekvenci	300
2	$h$ – ukupan broj haplotipova	16
3	$h/n$ – prosječan broj haplotipova po jedinci	0,057
4	$H_d$ – prosječna nepristrana raznolikost haplotipova (Nei, 1987)	0,817
5	$\pi$ – prosječna nukleotidna raznolikost (Nei i Li, 1979)	0,00382

Rezultati raznolikosti haplotipova po istraživanim populacijama prikazani su u prilogu 2 i na slici 19 (a). U većini populacija pronađen je jedan haplotip, 20 populacija ima dva haplotipa i pet populacija ima tri haplotipa (P28 Šparadići, P31 Vis, P35 Pelješac, P39 Međugorje i P47 Božaj).



**Slika 19.** (a) geografska rasprostranjenost 16 cpDNA haplotipova duž areala ljekovite kadulje. Udio svake boje u tortnom grafikonu predstavlja učestalost pripadnosti određenom haplotipu. (b) median-joining mreža haplotipova (H01-H16). Krugovi označavaju pripadnost haplotipu, a crne točke mutacijske korake. Veličina krugova razmjerna je frekvenciji haplotipa, a iscrtane linije označavaju pripadnost jedinki određenom haplotipu (zelena južni Apenini, crvena rasprostranjen duž Balkana i središnjih Apenina, svijetlo- i tamnoplava dva diferencirana podrijetla s Balkana)

Najčešći haplotip bio je H01 koji je pronađen u 111 jedinki iz 29 populacija, zatim H02 i H04 u 35 i 26 jedinki iz 10 populacija te H03, H05 i H06 u 31, 24 i 17 jedinki iz 7 populacija.

Dobivena haplotipska mreža pokazala je četiri skupine haplotipova. Najveća skupina sastoji se od deset haplotipova (H01-H10) i karakterizira je niska razina diferencija s tipično jednim ili dva mutacijska koraka između susjednih haplotipova (Slika 19 (b) označeno crvenom iscrtanom linijom). Većina ovih haplotipova nije pripadala zasebnoj regiji nego su rasprostranjeni duž Balkana i središnjih Apenina. Sljedeću skupinu čine tri haplotipa južnih Apenina (H11, H12 i H13) i ovo je bila jedina skupina s jasnom geografskom pripadnosti. Na Balkanu su uz najveću skupinu zabilježene dvije manje skupine koje se od svih ostalih skupina izrazito odvojene većim brojem mutacijskih koraka. Prva skupina s haplotipovima H14 i H15 te druga skupina sa samo jednim haplotipom H16. Populacije s haplotipovima H14 i H15 su raširene duž zapadnog Balkana dok je haplotip H16 pronađen u središnjim i južnim dijelovima Balkanskog poluotoka.

Prosječna genetička raznolikost unutar populacija ( $h_S$ ), ukupna genetička raznolikost ( $h_T$ ) i genetička diferencija ( $G_{ST}$ ) s obzirom na samo učestalosti haplotipova (neuređeni aleli) i odgovarajući parametri ( $v_S$ ,  $v_T$  i  $N_{ST}$ ) za koje su u obzir uzete genetičke sličnosti između haplotipova (uređeni aleli) izračunate su pomoću programa PermutCpSSR i prikazane u tablici 14. Test filogeografske strukture raznolikosti haplotipova je pokazao da je vrijednost  $N_{ST} = 0.814$  značajno veća od  $G_{ST} = 0.733$  ( $P < 0.01$ ) što ukazuje da postoji filogenetička struktura, odnosno da su različiti haplotipovi unutar iste populacije u prosjeku srodniji nego različiti haplotipovi iz različitih populacija.

**Tablica 14.** Podaci o genetičkoj diferencijaciji s obzirom na frekvencije haplotipova (neuređeni aleli) i kombinaciju haplotipske raznolikosti i genetičkih sličnosti između njih (uređeni aleli)

Parametar	(A) neuređeni aleli	(B) uređeni aleli <sup>a</sup>
prosječna unutar populacijska raznolikost	$h_S = 0,221$	$v_S = 0,154^{ns}$
ukupna genetička raznolikost	$h_T = 0,826$	$v_T = 0,827^{ns}$
genetička diferencijacija	$G_{ST} = 0,733$	$N_{ST} = 0,814^{**}$

<sup>a</sup> – test hipoteze da je  $v_S$ ,  $v_T$  i  $N_{ST}$  različito od  $h_S$ ,  $h_T$  i  $G_{ST}$

<sup>ns</sup> nije značajno ( $P > 0,05$ ), \* značajno za  $0,01 < P < 0,05$ , \*\* značajno za  $P < 0,01$ , \*\*\* značajno za  $P < 0,001$ .

Kako bi se utvrdila haplotipska raznolikost na temelju regija korišteno je pet skupina dobivenih analizom mikrosatelita u programu STRUCTURE ( $K = 5$ ), a rezultati su prikazani u tablici 15. Rezultati ove analize pokazuju da najveću nepristranu haplotipsku raznolikost  $H_d$  ima skupina D (središnji Balkan) i ona iznosi 0,81, nakon nje skupina E (južni Balkan) s 0,76. Ostale skupine A (južni Apenini), B (središnji Apenini) i C (sjeverni Balkan) imaju srednje  $H_d$  vrijednosti redom 0,61, 0,48 i 0,49. Ukoliko uspoređujemo haplotipove na temelju poluotoka onda haplotipska raznolikost iznosi 0,78 za Apenine i 0,79 za Balkan čime je raznolikost haplotipova populacija Balkana nešto veća nego Apenina. Najveća vrijednost za nukleotidnu raznolikost  $\pi$  bila je za južnu balkansku skupinu E (0,00434), zatim za južnu balkansku skupinu D (0,00405) te sjevernu balkansku skupinu C (0,002) dok su najmanje vrijednost zabilježene za apeninske skupine A (0,00048) i B (0,00058).

Rezultati analize molekularne varijance (AMOVA) na temelju kloroplastnih DNA regija prikazani su u tablici 16. Kao što je bilo i za očekivati imajući u vidu citoplazmatsko nasljeđivanje i izostanak rekombinacija kloroplastnog genoma, analiza molekularne varijance na temelju kloroplastnih DNA regija pokazala je da su razlike unutar populacija činile znatno manji postotak ukupne genetičke varijance u usporedbi s rezultatima na temelju mikrosatelitnih biljega. Razlike između populacija činile su 81,47% ukupne genetičke varijance (Tablica 16, analiza I), dok je razlikama između genetičkih skupina (A, B, C, D, E) bilo objašnjeno 18,89% ukupne genetičke varijance (Tablica 16, analiza II). Razlike između genetičkih skupina s Apeninskog poluotoka (A, B) su objašnjavale znatno veći postotak ukupne genetičke varijance (83,04%; Tablica 16, analiza III) od onih između balkanskih genetičkih skupina (C, D, E; 8,21%; tablica 16, analiza IV). S druge strane, razlike između apeninskih populacija unutar skupina (11,09%) bile su znatno manje od onih između balkanskih populacija (71,86%). Razlike između apeninskih i balkanskih genetičkih skupina objašnjavaju 12,00% ukupne genetičke varijance (Tablica 16, analiza V). Znatno veći postotak ukupne genetičke varijance (83,04%) objašnjen razlikama između apeninskih genetičkih skupina od onog objašnjenog razlikama između svih skupina (18,89%) potvrđuje rezultate dobivene na temelju mikrosatelitnih biljega ukazujući na to da se apeninske genetičke skupine nisu odvojile od balkanskih u isto vrijeme tijekom evolucije ljekovite kadulje.

**Tablica 15.** Analiza haplotipske raznolikosti po skupinama dobivenih programom STRUCTURE.

Skupina	Br.	Regija	Br. Pop.	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	<i>n</i>	<i>h</i>	<i>h/n</i>	<i>h<sub>pr</sub></i>	<i>H<sub>d</sub></i>	$\pi$
A	R1	južni Apenini	6							14		12		3						29	3	0,103	3	0,6059	4,81E-04
B	R2	središnji Apenini	5	17			1						4			2				24	4	0,167	2	0,4819	5,82E-04
C	R3	sjeverni Balkan	15	52		9	2		5		6									74	5	0,068	0	0,4861	2,00E-03
D	R4	Središnji Balkan	22	39	10	7	16	16	12		7						2	1		110	9	0,082	2	0,8107	4,05E-03
E	R5	južni Balkan	13	3	25	15	7	8							3				1	62	7	0,113	2	0,7567	4,34E-03
	$\Sigma$		61	111	35	31	26	24	17	14	13	12	4	3	3	2	2	1	1	299	16	0,054			
		<b>Poluotok</b>		<b>H01</b>	<b>H02</b>	<b>H03</b>	<b>H04</b>	<b>H05</b>	<b>H06</b>	<b>H07</b>	<b>H08</b>	<b>H09</b>	<b>H10</b>	<b>H11</b>	<b>H12</b>	<b>H13</b>	<b>H14</b>	<b>H15</b>	<b>H16</b>	<b><i>n</i></b>	<b><i>h</i></b>	<b><i>h/n</i></b>	<b><i>h<sub>pr</sub></i></b>	<b><i>H<sub>d</sub></i></b>	<b><math>\pi</math></b>
AB	P1	Apenini	11	17			1			14		12	4	3		2				53	7	0,132	5	0,7801	1,94E-03
CDE	P2	Balkan	50	<b>94</b>	<b>35</b>	<b>31</b>	<b>25</b>	<b>24</b>	<b>17</b>		<b>13</b>				<b>3</b>		<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	246	11	0,045	5	0,7934	3,79E-03
	$\Sigma$		61	111	35	31	26	24	17	14	13	12	4	3	3	2	2	1	1	299					

*n* – broj jedinki

*h* – broj haplotipova

*h/n* – broj haplotipova po broju jedinki

*h<sub>pr</sub>* – broj privatnih haplotipova

*H<sub>d</sub>* – nepristrana haplotipska raznolikost (Nei, 1987)

$\pi$  – nukleotidna raznolikost (Nei i Li, 1979)



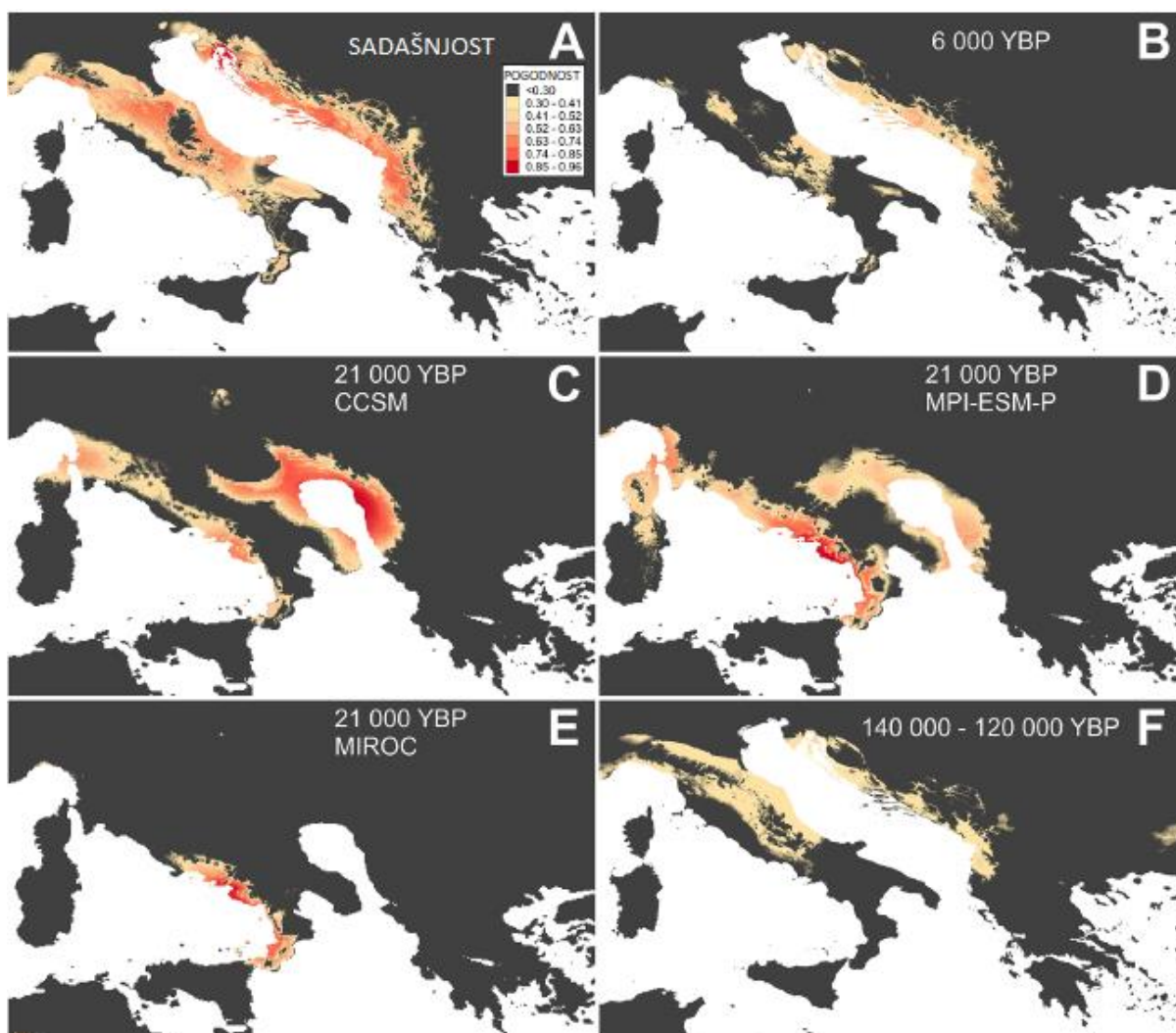
**Tablica 16.** Analiza molekularne varijance (AMOVA) na temelju kloroplastnih DNA regija: (I) između 61 populacije ljekovite kadulje (*Salvia officinalis*), (II) između pet genetičkih skupina (A-E), (III) između apeninskih skupina (A i B), (IV) između balkanskih skupina (C, D i E) te (V) između apeninskih (A i B) i balkanskih (C, D i E) skupina.

Analiza	Izvor varijabilnosti	df	Sastavnice varijance	% ukupne varijacije	$\phi$ -statistika	vrijednost	P ( $\phi$ )
I	Između populacija	60	2,171	81,47	$\phi_{ST}$	0,815	<0,0001
	Unutar populacija	238	0,494	18,53			
II	Između genetičkih skupina	4	0,528	18,89	$\phi_{CT}$	0,189	<0,0001
	Između populacija unutar skupina	56	1,772	63,43	$\phi_{SC}$	0,782	<0,0001
	Unutar populacija	238	0,494	17,68	$\phi_{ST}$	0,823	<0,0001
III	Između apeninskih skupina	1	2,021	83,04	$\phi_{CT}$	0,830	<0,0001
	Između populacija unutar skupina	9	0,270	11,09	$\phi_{SC}$	0,654	<0,0001
	Unutar populacija	42	0,143	5,87	$\phi_{ST}$	0,941	<0,0001
IV	Između balkanskih skupina	2	0,234	8,21	$\phi_{CT}$	0,80063	0,011
	Između populacija unutar skupina	47	2,051	71,86	$\phi_{SC}$	0,783	<0,0001
	Unutar populacija	186	0,569	19,94	$\phi_{ST}$	0,801	<0,0001
V	Između apeninskih i balkanskih skupina	1	0,349	12,00	$\phi_{CT}$	0,120	0,008
	Između populacija unutar skupina	59	2,068	71,03	$\phi_{SC}$	0,807	<0,0001
	Unutar populacija	238	0,494	16,97	$\phi_{ST}$	0,830	<0,0001

### 4.3. Modeliranje rasprostranjenosti vrste

Provedeno modeliranje rasprostranjenosti vrste (SDM) u svrhu određivanja dinamike pogodnosti staništa i rasprostranjenosti ljekovite kadulje (*Salvia officinalis*) pomoću programa MAXENT prikazano je na slici 20. Izrađeni su modeli rasprostranjenosti vrste za sadašnjost, srednji holocen (6000 YBP), za vrijeme posljednjeg glacijalnog maksimuma (*Last Glacial Maximum; LGM*, 21 000 YBP) i za vrijeme posljednjeg interglacijala (*Last Interglacial; LIG*, 120 000 YBP). Radi utvrđivanja kolinearnosti izračunat je inflacijski faktor varijance (*VIF*) pomoću programa ENMTools i sve *VIF* vrijednosti veće od 10 za bioklimatske varijable su isključene iz daljnjeg istraživanja zbog problema kolinearnosti; od 19 varijabli njih 13 su pokazale problem kolinearnosti (BIO2, BIO5, BIO6, BIO7, BIO10, BIO11, BIO12, BIO13, BIO15, BIO16, BIO17, BIO18 i BIO19). Nakon isključenja preostale bioklimatske varijable (BIO1, BIO3, BIO4, BIO8, BIO9 i BIO14) imale su raspon linearnog koeficijenta korelacije od -0,00206 do 0,58927, a raspon *VIF* vrijednosti od 1,5865 do 4,1643. Udio doprinosa klimatskih/okolišnih varijabli u prediktivnom modelu iznosio je 7 (BIO1), 0,1 (BIO3), 19,4 (BIO4), 20,1 (BIO8), 23,4 (BIO9) i 30,1 % (BIO14). Nakon provedenog modeliranja odabran je model s najmanjom AIC vrijednosti.

Dobiveni model za sadašnjost (Slika 20 A) većinom se poklapa s arealom rasprostranjenosti prirodnih populacija ljekovite kadulje na Balkanu gdje je većina obale prikazana s visokom pogodnošću staništa, a najpogodnije stanište se nalazi u području Kvarnera dok je u slučaju Apenina pogodnost staništa prema modelu značajno veća. Za vrijeme posljednjeg glacijalnog maksimuma (LGM, 21 000 YBP) modeli CCSM (Slika 20 C) i MPI-ESM-P (Slika 20 D) su imali slične rezultate: pogodna staništa su ograničena na obalu paleo-Jadranskog mora, prostor koji odgovara današnjem središnjem i južnom Jadranu. Kopneni most između poluotoka i dijelova središnjih i južnih Apenina je bio pogodan za postojanje vrste. Rezultat MIROC modela za LGM (Slika 20 E) čini se jako malo vjerojatan jer model opisuje cijelu obalu balkanskog poluotoka visoko nepogodnom za rast ljekovite kadulje za vrijeme posljednjeg glacijalnog maksimuma dok istovremeno karakterizira južne i središnje Apenine visoko pogodnima. Na kraju rezultati modeliranja za središnji holocen (6000 YBP, Slika 20 B) i posljednje interglacijalno doba (140 000 – 120 000 YBP, Slika 20 F) vrlo su slični. Istočna obala Jadranskog mora i središnji dijelovi Apenina su prepoznati kao srednje pogodni, dok su južni Apenini nepogodni za postojanje ljekovite kadulje.



**Slika 20.** Modeliranje rasprostranjenosti vrste (SDM) za ljekovitu kadulju za sadašnjost (A), srednji Holocen (B), posljednji glacijalni maksimum CCSM (C), posljednji glacijalni maksimum MPI-ESM-P (D), posljednji glacijalni maksimum MIROC (E) i posljednje razdoblje interglacijala (F). Boje označavaju pogodnost staništa od svjetlo žute (najmanje pogodno) do crvene (najviše pogodno).

## **5. RASPRAVA**

Za genetičku analizu jedinki i populacija ljekovite kadulje na cjelokupnom arealu vrste upotrijebljeni su mikrosatelitni biljezi i sekvenciranje dvije regije kloroplastne DNA. Pretpostavka je bila da se ovakvim odabirom molekularnih metoda može dobiti potpuna slika demografske prošlosti vrste. Zbog izuzetno velike mutacijske stope mikrosateliti su prikladni za analize demografskih događaja koji su oblikovali genetičku strukturu vrste u zadnjih dvadesetak tisuća godina (Hodel i sur., 2016), odnosno od vremena zadnjeg glacijacijskog maksimuma (*Last Glacial Maximum*; LGM) prije oko 23000 godina pa sve do danas. Za razliku od mikrosatelitnih biljega sekvencije kloroplastne DNA su poznate po niskim stopama mutacija pa su standardni alat za identifikaciju davnijih evolucijskih događaja (Shaw i sur., 2005, 2007) koji sežu i više milijuna godina u prošlost u geološke epohe pliocena i miocena (prije 2,6 – 23 milijuna godina).

### **Mikrosatelitni biljezi**

Analizom osam mikrosatelitnih lokusa utvrđen je veliki broj alela i sukladno tome velika genetička raznolikost unutar i između 62 istraživane populacije ljekovite kadulje (*Salvia officinalis*) koje ravnomjerno pokrivaju prirodnu rasprostranjenost ove vrste. U svom istraživanju genetičke raznolikosti i strukture populacija ljekovite kadulje u Republici Hrvatskoj upotrebom istih mikrosatelitnih biljega Greguraš (2013) dobiva nešto veće vrijednosti nego što su dobivene u ovom istraživanju npr. prosječan broj alela je bio 8,97 naspram 7,24, alelna bogatstva 8,53 naspram 6,67, opažena heterozigotnost 0,727 naspram 0,665 i očekivana heterozigotnost 0,753 naspram 0,683. Ovakva odstupanja moguće je objasniti time da je u prijašnjem istraživanju obuhvaćeno 25 populacija koje obitavaju samo u Republici Hrvatskoj, a koje su i u ovoj doktorskoj disertaciji (23 populacije) imale većinom više vrijednosti genetičke raznolikosti od ostalih 39 populacija. Prema rezultatima ovog istraživanja najveće vrijednosti alelnog bogatstva nađene su upravo u tim populacijama (7-9), a osobito kod populacija južne hrvatske obale i otoka te Crne Gore. Dalje na sjever i jug Balkanskog poluotoka zabilježen je pad alelnog bogatstva (5-7). Zanimljivo je da je najmanja unutarpopulacijska raznolikost zabilježena kod apeninskih populacija (alelna bogatstva < 5). Upravo ove niske vrijednosti genetičke raznolikosti apeninskih populacija su najzaslužnije za ukupno niže vrijednosti genetičke raznolikosti u ovoj disertaciji u odnosu na spomenuto istraživanje (Greguraš, 2013). Wilcoxonovim testom zabilježene su naznake efekta uskog grla

kod dvije populacije (P14 Novokračine i P45 Brajići) no dobiveni rezultati nisu bili značajni za  $P < 0.001$  pa možemo zaključiti da te populacije nisu prošle kroz genetičko usko grlo. Do sličnog zaključka su došli autori prethodnih populacijsko-genetičkih istraživanja ljekovite kadulje (Greguraš, 2013; Liber i sur., 2014; Rešetnik i sur., 2016).

Dobivene vrijednosti indeksa genetičke diferencijacije  $F_{ST}$  među parovima populacija u većini slučajeva su statistički značajne te pokazuju malu do umjerenu genetičku diferencijaciju. Manjak genetičke diferencijacije zabilježen je kod šest parova populacija, ali objašnjenje za to je vjerojatno njihova geografska bliskost (npr. populacije P39 Međugorje i P40 Mostar). Ovaj zaključak potvrđuje analiza izolacije uslijed udaljenosti (*isolation by distance*; IBD) po kojoj se samo 15 % genetičke diferencijacije zabilježene u ovoj doktorskoj disertaciji moglo objasniti njihovom prostornom udaljenošću.

Multilokusni test pokazuje da je većina istraživanih populacija u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži (H-W ravnoteža), a odstupanje od ravnoteže zabilježeno je u tri albanske populacije (P51 Tommor, P53 Dajti i P54 Shengjin) s visokoznačajnim vrijednostima ( $P < 0.001$ ), ali nije zabilježeno kod šest hrvatskih populacija koje navodi Greguraš (2013). Za Hrvatske populacije odstupanje od H-W ravnoteže zabilježeno je kod dvije populacije (P22 Vratnik i P37 Mljet) uz nešto nižu značajnost ( $P = 0.01 - 0.05$ ). Greguraš (2013) navodi da je vjerojatnost odstupanja od ravnoteže prisutnost nul-alela, no oni su u ovoj doktorskoj disertaciji zabilježeni samo za populaciju Mljet, ali ne i za populaciju Vratnik. U svom istraživanju Greguraš (2013) navodi da je vjerojatnost odstupanja od H-W ravnoteže populacije Vratnik vjerojatno zbog toga što je populacija Vratnik vrlo mlada populacija na neobičnom mjestu (planinski prijevoj s izuzetno hladnom klimom) i da je vjerojatno nastala nanosom zemljanog materijala iz priobalnog područja. Populacija Mljet je s druge strane geografski prilično izolirana od drugih populacija što djelomično može objasniti odstupanje od H-W ravnoteže. Prisutnost nul-alela nije zabilježena niti kod albanskih populacija Tommor, Dajti i Shengjin. Prema tome može se zaključiti da razlog odstupanja od H-W ravnoteže nije prisutnost nul-alela, nego bi mogao biti geografska izoliranost.

Genetička analiza populacija ljekovite kadulje upotrebom mikrosatelitnih biljega otkrila je jake kontraste u razinama genetičke raznolikosti među populacijama različitih geografskih regija. Slično kao kod vrste *Edraianthus graminifolius* (Surina i sur., 2014), većina balkanskih populacija kadulje karakterizirana je znatno višim vrijednostima alelnog bogatstva, nego

apeninske populacije. Osim toga, populacije iz središnjeg dijela balkanskog područja pokazale su značajno veću genetičku raznolikost i najveći broj privatnih alela. U povoljnim geološkim epohama, kada se populacije neke vrste šire, novonastale populacije imaju progresivno smanjenje razine genetičke varijabilnosti što su više udaljavaju od središta areala vrste (Hewitt, 1996). Iz ovog podatka se može zaključiti kako je središnji dio balkanskog poluotoka vjerojatno područje gdje je ljekovita kadulja najduže obitavala, a u izuzetno povoljnim geološkim epohama i periodima vrsta se iz ovog područja širila uglavnom sjeverno i južno. Ovaj rezultat snažno podupire mogućnost da je središnji dio Balkanskog poluotoka utočište (refugij) ljekovite kadulje tijekom zadnjeg glacijacijskog maksimuma. Budući da ovim istraživanjem višestruka refugijska područja nisu prepoznata, koncept "refugija unutar refugija" (Gómez i Lunt, 2007) čini se neprikladnim za ljekovitu kadulju i mikrosatelitnu vremensku skalu.

Rezultati analize genetičke strukture upotrebom mikrosatelitnih podataka i računalnog programa STRUCTURE (Pritchard i sur., 2000) pružili su dokaz jasnog zemljopisnog strukturiranja na različitim razinama klasteriranja. Kako je Jadransko more najistaknutija biogeografska barijera u regiji, bilo je za očekivati detektiranje dvije genetičke skupine ( $K = 2$ ) koje se poklapaju s geografskom podjelom na Balkanski i Apeninski poluotok. Na višoj razini klasteriranja ( $K = 5$ ), jedinke i populacije se grupiraju prema njihovom zemljopisnom položaju unutar tri balkanske i dvije apeninske genetičke skupine. Za razliku od drugih istraživanih vrsta (*Cardamine maritima* skupina, *Edraianthus serpyllifolius*, *E. tenuifolius*, *Campanula pyramidalis* skupina) koje se pojavljuju diljem zapadnog Balkana (Kučera i sur., 2008; Surina i sur., 2011; Lakušić i sur., 2013), u slučaju ljekovite kadulje nisu prepoznate jasne geografske barijere između utvrđenih genetičkih skupina. Naime, u kontaktnim zonama zabilježen je nesmetani protok gena među populacijama tj. zabilježene su genetički miješane jedinke što je bilo dovoljno da se zamagli diferencijacija između utvrđenih genetičkih skupina. Na području središnjih Apenina populacije ljekovite kadulje su okarakterizirane kao mješovite, s različitim udjelima genetičkog materijala većeg broja balkanskih populacija. Dakle, utvrđen je recentni tok gena (introgresija) s Balkanskog poluotoka. Nasuprot tome, populacije iz južnih Apenina zadržale su genetičku jedinstvenost, što ukazuje na njihovu dugotrajnu izolaciju (slika 15).

Rezultate STRUCTURE analize podupire i analiza evolucijske povijesti (*Approximative Bayesian Computation*; ABC). Generacijsko vrijeme ljekovite kadulje nije poznato, ali se iz dobivenih rezultata može pretpostaviti da se središnja apeninska genetička skupina odvojila od Balkanskih klastera nakon završetka posljednjeg glacijacijskog maksimuma kad je podizanje

razine mora za oko 120 m odvojilo Balkanski od Apeninskog poluotoka. Budući da se ovaj događaj dogodio prije 17 000 – 12 000 godina (Lambeck i Purcell, 2005) na temelju rezultata ABC analize može se zaključiti da je od tada prošlo oko 580 generacija tj. možemo pretpostaviti da je generacijsko vrijeme ljekovite kadulje od 17 do 26 godina. Na temelju ove vrijednosti možemo dodatno procijeniti utvrđeno ranije vrijeme odvajanja ( $t_2$ ) na oko 182 000 – 121 000 godina, što odgovara vremenu pretposljednog glacijalnog maksimuma (prije 196 000 do 137 000 godina) i posljednjeg interglacijala, koji je dosegao vrhunac prije oko 122 000 godina (Tzedakis i sur., 2013; Colleoni i sur., 2016). Takvi su zaključci u skladu s rezultatima dobivenim nakon analize mikrosatelitnih biljega i sekvencija kloroplastnih DNA, a koji upućuju na to da se razdvajanje populacija južnih Apenina dogodilo prije nego što se klaster središnjih Apenina odvojio od balkanskih populacija. Iako rezultati nedvojbeno podupiru kolonizaciju Apenina u dva neovisna događaja, trebali bismo biti oprezni pri procjeni vremenske skale ovih događaja budući da su ovdje uzeti u obzir samo medijalni generacijski brojevi. Intervali pouzdanosti procijenjenih vrijednosti bili su široki, čineći zaključke na temelju ovih rezultata vrlo spekulativnima.

Dobiveni rezultati modeliranja rasprostranjenosti vrsta (*Species Distribution Modelling*; SDM) potvrdili su postojanje, za život ljekovite kadulje klimatski pogodnog, kopnenog mosta u sjevernom i srednjem dijelu današnjeg Jadranskog mora (Correggiai i sur., 1996; Lambeck i Chappell, 2001). Čini se da su tijekom posljednjeg ledenog doba (eng. *Last Glacial Maximum*; LGM) blizina mora i rezultirajući učinak sporijeg hlađenja obalnog područja mogli biti od velike važnosti za održanje ljekovite kadulje duž Jadranske obale (Lakušić i sur., 2013; Krebs i sur., 2019). Modeliranje rasprostranjenosti vrsta sugerira da su tijekom posljednjeg ledenog doba područja sjevernog Jadrana i južnog Balkana, za razliku od središnjih dijelova Balkana, bila neprikladna za preživljavanje ljekovite kadulje. Posljedično, čini se vjerojatnim da je ova vrsta doživjela ozbiljno smanjenje areala tijekom posljednjeg ledenog doba, nakon čega je slijedilo širenje u interglacijalu, osobito u geološkoj epohi holocena u posljednjih 11 700 godina. Ovdje je vrijedno napomenuti da je modeliranje rasprostranjenosti vrsta za sadašnje vrijeme dalo vrlo precizne rezultate za Balkan, ali ne i za Apenine, vjerojatno zato što je manja prisutnost vapnenačkog tla na Apeninima (Bernoulli, 2001) ograničavajući faktor za širenje ljekovite kadulje. Dobiveni rezultat služi kao podsjetnik da na stvarnu rasprostranjenost vrsta utječu i drugi brojni biotički i abiotički faktori, dok su bioklimatski faktori upotrijebljeni u ovom istraživanju predstavljaju samo jedan dio.



Brojne studije već su istraživale razne balkanske i amfijadranske svojte u potrazi za genetičkim otiscima prošlih demografskih oscilacija. Većina tih studija bila je ili usmjerena na vrste (*Cerastium dinaricum*, *Edraianthus graminifolius*, *Saxifraga* skupina) koje nastanjuju planinska i kopnena područja (Kutnjak i sur., 2014; Surina i sur., 2014; Đurović i sur., 2017) ili su bile usmjerene isključivo na filogeografiju proučavanih vrsta (Kučera i sur., 2010; Rešetnik i sur., 2014, 2016; Frajman i Schönswetter, 2017; Stevanoski i sur., 2020). Usprkos tome, postoji nekoliko dostupnih studija usporedivih s ovom doktorskom disertacijom u kojima su analizirane svojte sa sličnom rasprostranjenosti i ekološkim preferencijama. Kučera i sur. (2008) su istraživali populacijsko-genetičku strukturu vrste *Cardamine maritima* (Brassicaceae), a dobiveni rezultati sugeriraju da su starije populacije otkrivene u specifičnim staništima kao što su planinske padine i klanci orijentirani prema moru, a ne u nekoj posebnoj geografskoj regiji kao u ovoj doktorskoj disertaciji. Grdiša i sur. (2014) su istraživali populacijsko-genetičke osobine dalmatinskog buhača (*Tanacetum cinerariifolium*, Asteraceae). Utvrđena je najveća genetička raznolikost u sjeverozapadnim dijelovima Balkanskog poluotoka čime su rezultati te studije bili u suprotnosti s rezultatima ove doktorske disertacije. Područje sjevernog Jadrana je predloženo kao vjerojatno utočište (refugij) dalmatinskog buhača tijekom posljednjeg glacijacijskog maksimuma. Od svih prijašnjih istraživanja rezultati Surine i sur. (2011) bili su najbliži rezultatima ove doktorske disertacije. Naime, najveće vrijednosti genetičke raznolikosti i indeksa rijetkosti (eng. *rarity index*) vrste *Edraianthus tenuifolius* (Campanulaceae) otkrivene su u središnjem dijelu Balkanskog poluotoka, baš kako je u ovom istraživanju utvrđeno kod ljekovite kadulje.

### **Kloroplastne DNA regije**

Rezultati analize mikrosatelita su bili bitno različiti od rezultata sekvenciranja kloroplastne DNA. Izradom mreže kloroplastnih haplotipova utvrđene su dvije visoko diferencirane genetičke skupine na Balkanskom poluotoku (Slika 19). Populacije koje se nalaze u ove dvije skupine haplotipova predstavljaju drevne populacije. Za razliku od sličnih studija (Keppel i sur., 2012; Surina i sur., 2014; Reich i sur., 2022), ove dvije skupine nisu geografski strukturirane što zamagljuje sliku posljednje rekolonizacije. Bez obzira na to, rezultati analize kloroplastne DNA vjerojatno ukazuju na refugije koji su omogućili opstanak ljekovite kadulje

tijekom više ciklusa glacijacije. Nepostojanje drevnih haplotipova na Apeninskom poluotoku ukazuje na raniju prisutnost ljekovite kadulje na Balkanskom nego na Apeninskom poluotoku.

Budući da su drevni haplotipovi bili raspoređeni po velikim geografskim područjima i pronađeni u mnogim populacijama, očito je da nisu evoluirali mnogo puta *in situ*. Negdje tijekom evolucijske povijesti vrste, bili su znatno brojniji nego danas, zauzimajući veće dijelove paleorasprostranjenosti ljekovite kadulje. S vremenom su ih nepovoljni uvjeti i možda drugi haplotipovi potisnuli, pa su postali karantena u raštrkanim mikrorefugijama. Općenito, pretpostavlja se da su mikrorefugiji igrali važnu ulogu tijekom postglacijalnih ekspanzija (Stewart i Lister, 2001; Ashcroft, 2010; Hampe, 2011) i da se obrasci pleistocenske rekolonizacije teško mogu objasniti bez njih. Međutim, takve pretpostavke nisu potkrijepljene našim rezultatima. Da su te populacije imale takvu ulogu tijekom postglacijalne kolonizacije, njihovi bi haplotipovi bili brojniji i geografski strukturiraniji. Iz dobivenih rezultata nije moguće odgovoriti ni na jedno od ovih pitanja. U nekim su se prilikama slični filogeografski rezultati objašnjavali kao dokaz postojanja kriptičnih vrsta (Liao i sur., 2011; Valtueña i sur., 2016). Međutim, očekuje se barem neka potpora za takav zaključak i iz rezultata istraživanja jezgrenog genoma tj. rezultata analize mikrosatelitnih lokusa (Govindarajulu i sur., 2011; Yang i sur., 2019; Kramina i sur., 2020; Li i sur., 2020). Za razliku od kloroplastnih genoma drevnih populacija, njihovi jezgreni genomi ni po čemu se ne ističu u odnosu na one okolnih populacija. Budući da se kloroplasti nasljeđuju majčinskom linijom (McCauley i sur., 2007), a mikrosateliti biparentalno, nije iznenađenje vidjeti takvu divergenciju između kloroplastnog i jezgrenog genoma. Genetički „potpis“ na jezgrenoj razini koji bi omogućio razlikovanje drevnih populacija vjerojatno je „ispran“ intenzivnim i postojećim protokom gena zbog uspješnog entomofilnog oprašivanja na velike udaljenosti. U isto vrijeme, nerekombinantni kloroplastni genom naslijeđen putem barohorne sjemenke (Corsi i Bottega, 1999) zadržan je na brojnim mikrolokacijama današnjeg areala.

Tijekom duljeg razdoblja koje se vjerojatno proteglo kroz više ciklusa glacijacije, većina populacija koje nose haplotipove blisko povezane s onima predaka (H01-H10) opetovano su nestajale i ponovno se pojavljivale kroz ponovnu kolonizaciju. Ova skupina haplotipova, s H01 kao prevladavajućim haplotipom, dominira cijelom evolucijskom poviješću vrste, ali nažalost ne možemo sa sigurnošću objasniti kako ni zašto. Budući da je usko povezana s hipotetskim haplotipovima predaka, čini se vjerojatnim da je ova skupina zadržala niske razine diferencijacije zbog jakih oscilacija u rasponu distribucije i brojnosti kroz evolucijsku povijest.

Ako populacija povremeno doživi događaje kao što su genetičko usko grlo (*genetic bottleneck*) i genetički pomak (*genetic drift*), očekuje se da će se novonastale mutacije niske frekvencije stalno uklanjati (Luikart i sur., 1998). Posljedično, nemogućnost populacija da akumuliraju nove mutacije rezultirat će stalnom prisutnošću slabo diferenciranih haplotipova koji su blisko povezani s pretpostavljenim haplotipovima predaka. Nepostojanje značajne diferencijacije ovih haplotipova na velikim područjima može se dodatno objasniti brzim migracijama i kolonizacijom koja se vjerojatno dogodila na velikim udaljenostima, što je rezultiralo nepostojanjem bilo kakve značajne divergencije među udaljenim mjestima (Migliore i sur., 2018).

Usporedba haplotipova iz središnjih i južnih Apenina otkrila je da nisu tako blisko povezani kao što se možda očekivalo. Većim dijelom, sjevernija apeninska skupina sadrži haplotipove koji se nalaze diljem Balkana, s H01 kao dominantnim haplotipom. U isto vrijeme, skupina s južnih Apenina sastoji se od jedinstvenih, više diferenciranih haplotipova koji nisu pronađeni nigdje drugdje. Čini se da su dvije apeninske skupine haplotipova nastale iz dva različita kolonizacijska događaja s Balkanskog poluotoka. Iz prve, starije kolonizacije, nastala je južna skupina, dok je drugi kolonizacijski događaj rezultirao formiranjem sjevernije apeninske skupine haplotipova. Budući da se haplotipovi južne skupine nalaze isključivo u toj regiji, može se pretpostaviti da se kolonizacija dogodila samo jednom i da je nakon nje uslijedila trajna izolacija. Budući da se većina haplotipova iz središnjih Apenina (sjevernija skupina) nalazi i na Balkanu druga se kolonizacije vjerojatno dogodila tijekom posljednjeg ledenog doba pa nije bilo dovoljno vremena za jaču izolaciju. Kao što je već spomenuto, tijekom posljednjeg ledenog doba postojao je kopneni i ekološki povoljan most između Balkana i Apenina koji je omogućio širenje ljekovite kadulje na Apeninski poluotok.

Mikrosatelitni DNA-markeri i sekvencije kloroplastne DNA omogućili su razjašnjenje evolucijske povijest obične kadulje i to ne samo tijekom i nakon posljednjeg ledenog doba, nego i mnogo dalje u geološke epohe pleistocena, a u slučaju kloroplastne DNA u geološke epohe pliocena i miocena. Rezultati ove doktorske disertacije potvrđuju čest slučaj kolonizacije s Balkanskog na Apeninski poluotok, a u slučaju ljekovite kadulje postoje dokazi da se to dogodilo kroz dvije odvojene kolonizacije. Iako su rezultati dali odgovore na brojna pitanja, otvorili su i nova. Rull (2009) je izjavio da “mikrorefugiji nisu ništa više od teorijske potrebe

za objašnjenje pleistocenskih obrazaca rekolonizacije”. Međutim, čini se isto tako da postoji mogućnost da mikrorefugije djeluju kao karantene, a ne kao najbolja pozicija za rekolonizaciju. Iako se u više istraživanja pokazalo da je koncept "refugija unutar refugija" primjenjiv za objašnjenje današnje genetičke strukture biljnih i životinjskih vrsta, to nije bio slučaj s ljekovitom kaduljom.

## **6. ZAKLJUČCI**

Na temelju rezultata populacijsko-genetičke analize 62 prirodne populacije ljekovite kadulje (*Salvia officinalis*) upotrebom mikrosatelitnih i kloroplastnih biljega te modeliranja rasprostranjenosti vrste moguće je zaključiti sljedeće:

1. Mikrosatelitni DNA-biljezi i sekvencije kloroplastne DNA omogućili su razjašnjenje evolucijske povijest obične kadulje i to ne samo tijekom i nakon posljednjeg ledenog doba, nego i mnogo dalje u geološke epohe pleistocena, a u slučaju kloroplastne DNA u geološke epohe pliocena i miocena;
2. Genetička raznolikost populacija s Balkanskog poluotoka je daleko veća od genetičke raznolikosti populacija s Apeninskog poluotoka;
3. Najveću genetičku raznolikost i najveći broj privatnih alela zabilježen je kod populacija iz središnjeg dijela Balkanskog poluotoka, što uz rezultate modeliranja rasprostranjenosti vrste dovodi do zaključka da je ovo području centar rasprostranjenja ljekovite kadulje te vjerojatno predstavlja i glavno utočište (refugij) vrste tijekom zadnjeg glacijacijskog maksimuma;
4. Višestruka refugijska područja poznata pod terminom "refugiji unutar refugija" nisu potvrđena ovim istraživanjem, ali je predložena funkcija refugija više kao karantene nego kao mjesta buduće rekolonizacije;
5. Analiza genetičke strukture populacija je klasterirala istraživane populacije u pet jedinstvenih genetičkih skupina: A – srednji Apenini, B – južni Apenini, C – sjeverni Balkan, D – središnji Balkan i E – južni Balkan;
6. Nepostojanje drevnih kloroplastnih haplotipova na Apeninskom poluotoku ukazuje na raniju prisutnost ljekovite kadulje na Balkanskom nego na Apeninskom poluotoku;
7. Modeliranjem rasprostranjenosti vrste potvrđeno je postojanje ekološki povoljnog kopnenog mosta između Balkana i Apenina tijekom barem dva posljednja ledena doba te introgresija s Balkanskog na Apeninski poluotok;
8. Kolonizacija ljekovite kadulje s Balkanskog na Apeninski poluotok dogodila se neovisno u dva navrata. Iz prve, starije kolonizacije, najvjerojatnije tijekom pretposljednje glacijacije, nastala je južna genetički jedinstvena apeninska skupina populacija, dok se drugi kolonizacijski događaj dogodio tijekom posljednjeg glacijacijskog perioda te je rezultirao formiranjem sjeverne apeninske skupine.

## **7. LITERATURA**

- An, J., Bechet, A., Berggren, Å., Brown, S. K., Bruford, M. W., Cai, Q., Cassel-Lundhagen, A., Cezilly, F., Chen, S. L., Cheng, W., Choi, S. K., Ding, X. Y., Fan, Y., Feldheim, K. A., Feng, Z. Y., Friesen, V. L., Gaillard, M., Galaraza, J. A., Gallo, L., ... Zhong, J. (2010). Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 October 2009-30 November 2009. *Molecular Ecology Resources*, *10*(2), 404-408.
- Ashcroft, M. B. (2010). Identifying refugia from climate change. *Journal of Biogeography*, *37*(8), 1407–1413.
- Bazina, E., Makris, A., Vender, C., & Skoula, M. (2002). Genetic and chemical relations among selected clones of *Salvia officinalis*. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, *9*(4), 269–273.
- Beaumont, M. A., Zhang, W., & Balding, D. J. (2002). Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics*, *162*(4), 2025–2035.
- Bernoulli, D. (2001). Mesozoic-Tertiary carbonate platforms, slopes and basins of the external Apennines and Sicily. *Anatomy of an Orogen: the Apennines and Adjacent Mediterranean Basins*, 307–325.
- Bonatelli, I., Zappi, D., Taylor, N., & Moraes, E. (2013). Usefulness of cpDNA markers for phylogenetic and phylogeographic analyses of closely related cactus species. *Genetics and Molecular Research*, *12*(4), 4579–4585.
- Boršić, I. (2013). *Phylogeography of Centaurea (Compositae) in the circum-Adriatic region*. Doktorski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.
- Böszörményi, A., Héthelyi, É., Farkas, Á., Horváth, G., Papp, N., Lemberkovics, É., & Szoke, É. (2009). Chemical and genetic relationships among sage (*Salvia officinalis* L.) cultivars and judean sage (*Salvia judaica* Boiss.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(11), 4663–4667.
- Bruna, S., Giovannini, A., De Benedetti, L., Principato, M. C., & Ruffoni, B. (2006). Molecular analysis of *Salvia* spp. through RAPD markers. *Acta Horticulturae*, *723*, 157–160.
- Caicedo, A. L., & Schaal, B. A. (2004). Population structure and phylogeography of *Solanum pimpinellifolium* inferred from a nuclear gene. *Molecular Ecology*, *13*(7), 1871–1882.
- Castroviejo, S. (1995). Flora iberica. *Política científica*, *13*(44), 39–43.
- Cavalli-Sforza, L. L., & Edwards, A. W. (1967). Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*, *19*(3), 550-570.
- Chakraborty, R., & Jin, L. (1993). Determination of relatedness between individuals using DNA fingerprinting. *Human biology; an international record of research*, *65*(6), 875-95 .
- Colleoni, F., Wekerle, C., Näslund, J. O., Brandefelt, J., & Masina, S. (2016). Constraint on the penultimate glacial maximum Northern Hemisphere ice topography ( $\approx 140$  kyrs BP). *Quaternary Science Reviews*, *137*, 97–112.
- Cornuet, J. M., & Luikart, G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, *144*(4), 2001–2014.



- Correggiai, A., Roveri, M., & Trincardi, F. (1996). Late pleistocene and hoiocene evolution of the North Adriatic Sea. *Alpine and Mediterranean Quaternary*, 9(2), 697–704.
- Corsi, G., & Bottega, S. (1999). Glandular hairs of *Salvia officinalis*: New data on morphology, localization and histochemistry in relation to function. *Annals of Botany*, 84(5), 657–664.
- Di Rienzo, A., Peterson, A. C., Garza, J. C., Valdes, A. M., Slatkin, M., & Freimer, N. B. (1994). Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(8), 3166–3170.
- Drew, B. T., González-Gallegos, J. G., Xiang, C. L., Kriebel, R., Drummond, C. P., Walker, J. B., & Sytsma, K. J. (2017). *Salvia* united: The greatest good for the greatest number. *Taxon*, 66(1), 133–145.
- Drew, B. T., & Sytsma, K. J. (2012). Phylogenetics, biogeography, and staminal evolution in the tribe Mentheae (Lamiaceae). *American Journal of Botany*, 99(5), 933–953.
- Đurović, S., Schönswetter, P., Niketić, M., Tomović, G., & Frajman, B. (2017). Disentangling relationships among the members of the *Silene saxifraga* alliance (Caryophyllaceae): Phylogenetic structure is geographically rather than taxonomically segregated. *Taxon*, 66(2), 343–364.
- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620.
- Excoffier, L., Schneider, S., & Laval, G. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564–567.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the BOOTSTRAP. *Evolution*, 39(4), 783–791.
- Felsenstein, J. (2004). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle. <https://phylipweb.github.io/phylip/> [20. siječnja 2023.]
- Fick, S. E., & Hijmans, R. J. (2017). WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 37(12), 4302–4315.
- Fitch, W. M., & Margoliash, E. (1967). Construction of phylogenetic trees. *Science (New York, N.Y.)*, 155(3760), 279–284.
- Forster, P., Hohoff, C., Dunkelmann, B., Schürenkamp, M., Pfeiffer, H., Neuhuber, F., & Brinkmann, B. (2015). Elevated germline mutation rate in teenage fathers. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1803), 1–7.
- Frajman, B., & Schönswetter, P. (2017). Amphi-Adriatic distributions in plants revisited: Pleistocene trans-Adriatic dispersal in the *Euphorbia barrelieri* group (Euphorbiaceae).

*Botanical Journal of the Linnean Society*, 185(2), 240–252.

- Franklin, J., & Miller, J. A. (2010). Mapping species distributions: Spatial inference and prediction. Cambridge University Press.
- Gómez, A., & Lunt, D. H. (2007). Refugia within Refugia: Patterns of Phylogeographic Concordance in the Iberian Peninsula. *Phylogeography of Southern European Refugia: Evolutionary Perspectives on the Origins and Conservation of European Biodiversity*, 155–188.
- Goudet, J. (1995). FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86(6), 485–486.
- Govindarajulu, R., Hughes, C. E., & Donovan Bailey, C. (2011). Phylogenetic and population genetic analyses of diploid *Leucaena* (Leguminosae; mimosoideae) reveal cryptic species diversity and patterns of divergent allopatric speciation. *American Journal of Botany*, 98(12), 2049–2063.
- Grdiša, M., Jug-Dujaković, M., Lončarić, M., Carović-Stanko, K., Ninčević, T., Liber, Z., Radosavljević, I., & Šatović, Z. (2015). Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): A review of biochemical contents, medical properties and genetic diversity. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 80(2), 69–78.
- 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), 1-13.
- Greguraš, D. (2013). Genetička raznolikost i struktura populacija ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.). Doktorski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.
- Greiner, S., Lehwark, P., & Bock, R. (2019). OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3.1: Expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. *Nucleic Acids Research*, 47(1), 59-64.
- Guo, S. W., & Thompson, E. A. (1992). Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. *Biometrics*, 48(2), 361-372.
- Hall, T. A. (1999). BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hampe, A. (2011). Climatic relicts: Past, present, future. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 42(1), 313-333.
- Hewitt, G. M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58(3), 247-276 .
- Hodel, R. G. J., Segovia-Salcedo, M. C., Landis, J. B., Crowl, A. A., Sun, M., Liu, X., Gitzendanner, M. A., Douglas, N. A., Germain-Aubrey, C. C., Chen, S., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2016). The Report of My Death was an Exaggeration: A Review for Researchers Using Microsatellites in the 21st Century. *Applications in Plant Sciences*, 4(6), 1-13.

- Holm, S. (1979). A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 6(2), 65–70.
- 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(2), 1–12.
- 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 and Biodiversity*, 9(10), 2309–2323.
- Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R., & Dhawan, A. K. (2011). Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177(3), 309–334.
- Kalinowski, S. T. (2005). hp-rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes*, 5(1), 187–189.
- Keppel, G., Van Niel, K. P., Wardell-Johnson, G. W., Yates, C. J., Byrne, M., Mucina, L., Schut, A. G. T., Hopper, S. D., & Franklin, S. E. (2012). Refugia: Identifying and understanding safe havens for biodiversity under climate change. *Global Ecology and Biogeography*, 21(4), 393–404.
- Kintzios, S. E. (2000). Sage - The Genus *Salvia*. *Harwood Academic Publishers*.
- Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3(9), 1452–1456.
- Kramina, T. E., Samigullin, T. H., & Meschersky, I. G. (2020). Two cryptic species of *Lotus* (Fabaceae) from the Iberian Peninsula. *Wulfenia*, 27(1), 21–45.
- Krebs, P., Pezzatti, G. B., Beffa, G., Tinner, W., & Conedera, M. (2019). Revising the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) refugia history of the last glacial period with extended pollen and macrofossil evidence. *Quaternary Science Reviews*, 206, 111–128.
- Kučera, J., Marhold, K., & Lihová, J. (2010). *Cardamine maritima* group (Brassicaceae) in the amphi-Adriatic area: A hotspot of species diversity revealed by DNA sequences and morphological variation. *Taxon*, 59(1), 148–164.
- Kučera, J., Tremetsberger, K., Vojta, J., & Marhold, K. (2008). Molecular study of the *Cardamine maritima* group (Brassicaceae) from the Balkan and Apennine Peninsulas based on amplified fragment length polymorphism. *Plant Systematics and Evolution*, 275(3–4), 193–207.
- Kutnjak, D., Kuttner, M., Niketić, M., Dullinger, S., Schönswetter, P., & Frajman, B. (2014). Escaping to the summits: Phylogeography and predicted range dynamics of *Cerastium dinaricum*, an endangered high mountain plant endemic to the western Balkan Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 78(1), 365–374.
- Lakušić, D., Liber, Z., Nikolić, T., Surina, B., Kovačić, S., Bogdanović, S., & Stefanović, S. (2013). Molecular phylogeny of the *Campanula pyramidalis* species complex (Campanulaceae) inferred from chloroplast and nuclear non-coding sequences and its taxonomic implications. *Taxon*, 62(3), 505–524.

- Lambeck, K., & Chappell, J. (2001). Sea level change through the last glacial cycle. *Science* 292(5517), 679-686.
- Lambeck, K., & Purcell, A. (2005). Sea-level change in the Mediterranean Sea since the LGM: Model predictions for tectonically stable areas. *Quaternary Science Reviews*, 24(18–19), 1969–1988.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948.
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–1116.
- Li, Z. Z., Ngarega, B. K., Lehtonen, S., Gichira, A. W., Karichu, M. J., Wang, Q. F., & Chen, J. M. (2020). Cryptic diversity within the African aquatic plant *Ottelia ulvifolia* (Hydrocharitaceae) revealed by population genetic and phylogenetic analyses. *Journal of Plant Research*, 133(3), 373–381.
- Liao, Y. Y., Yang, X. Y., Motley, T. J., Chen, J. M., & Wang, Q. F. (2011). Phylogeographic analysis reveals two cryptic species of the endangered fern *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn. (Parkeriaceae) in China. *Conservation Genetics*, 12(5), 1357–1365.
- Liber, Z., Židovec, V., Bogdanović, S., Radosavljević, I., Pruša, M., Filipović, M., Dovedan, I. H., Jug-Dujaković, M., & Šatović, Z. (2014). Genetic Diversity of Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.) as Assessed by RAPD Markers. *Agriculturae Conspectus Scientifi cus*, 79(2), 77-84.
- Luikart, G., Allendorf, F. W., Cornuet, J. M., & Sherwin, W. B. (1998). Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity*, 89(3), 238–247.
- Mader, E., Lohwasser, U., Börner, A., & Novak, J. (2010). Population structures of genebank accessions of *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) revealed by high resolution melting analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(2), 178–186.
- Maksimović, M., Vidic, D., Miloš, M., Edita Šolić, M., Abadžić, S., & Siljak-Yakovlev, S. (2007). Effect of the environmental conditions on essential oil profile in two Dinaric *Salvia* species: *S. brachyodon* Vandas and *S. officinalis* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(8), 473–478.
- McCauley, D. E., Sundby, A. K., Bailey, M. F., & Welch, M. E. (2007). Inheritance of chloroplast DNA is not strictly maternal in *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae): Evidence from experimental crosses and natural populations. *American Journal of Botany*, 94(8), 1333–1337.
- Migliore, J., Baumel, A., Leriche, A., Juin, M., & Médail, F. (2018). Surviving glaciations in the Mediterranean region: An alternative to the long-term refugia hypothesis. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 187(4), 537–549.
- Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of

- restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5269–5273.
- Nikolić T. (2021). Flora Croatica Database. URL (<http://hirc.botanic.hr/fcd>). Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, pristupljeno 12.1.2021.
- Peery, M. Z., Kirby, R., Reid, B. N., Stoelting, R., Doucet-Bëer, E., Robinson, S., Vásquez-Carrillo, C., Pauli, J. N., & Palsboll, P. J. (2012). Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent population declines. *Molecular Ecology*, 21(14), 3403–3418.
- Perry, N. B., Anderson, R. E., Brennan, N. J., Douglas, M. H., Heaney, A. J., McGimpsey, J. A., & Smallfield, B. M. (1999). Essential oils from dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): variations among individuals, plant parts, seasons, and sites. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(5), 2048–2054.
- Peterson, A. T. (2001). Predicting species' geographic distributions based on ecological niche modeling. *Condor*, 103(3), 599–605.
- Peterson, A. T., Papeş, M., & Soberón, J. (2008). Rethinking receiver operating characteristic analysis applications in ecological niche modeling. *Ecological Modelling*, 213(1), 63–72.
- Phillips, S. B., Aneja, V. P., Kang, D., & Arya, S. P. (2006). Modelling and analysis of the atmospheric nitrogen deposition in North Carolina. *International Journal of Global Environmental Issues*, 6(2–3), 231–252.
- Phillips, S. J., Anderson, R. P., Dudík, M., Schapire, R. E., & Blair, M. E. (2017). Opening the black box: an open-source release of Maxent. *Ecography*, 40(7), 887–893.
- Pitarević, I., Kuftinec, J., Blažević, N., & Kuštrak, D. (1984). Seasonal Variation of Essential Oil Yield and Composition of Dalmatian Sage, *Salvia officinalis*. *Journal of Natural Products*, 47(3), 409–412.
- Pons, O., & Petit, R. J. (1995). Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity - I. Haploid locus. *Theoretical and Applied Genetics*, 90(3–4), 462–470.
- Pons, O., & Petit, R. J. (1996). Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics*, 144(3), 1237–1245.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2).
- Putievsky, E., Ravid, U., Diwan-Rinzler, N., & Zohary, D. (1990). Genetic affinities and essential oil composition of *Salvia officinalis* L., *S. fruticosa* Mill., *S. tomentosa* Mill. and their hybrids. *Flavour and Fragrance Journal*, 5(2), 121–123.
- Radosavljević, I., Bogdanović, S., Celep, F., Filipović, M., Satovic, Z., Surina, B., & Liber, Z. (2019). Morphological, genetic and epigenetic aspects of homoploid hybridization between *Salvia officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Mill. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13.
- Radosavljević, I., Jakse, J., Javornik, B., Satovic, Z., & Liber, Z. (2011). New microsatellite markers for *Salvia officinalis* (Lamiaceae) and cross-amplification in closely related species. *American Journal of Botany*, 98(11), 316–318.

- Radosavljević, I., Satovic, Z., Jakse, J., Javornik, B., Greguraš, D., Jug-Dujaković, M., & Liber, Z. (2012). Development of new microsatellite markers for *Salvia officinalis* L. and its potential use in conservation-genetic studies of narrow endemic *Salvia brachyodon* Vandas. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(9), 12082–12093.
- Radosavljević, I., Satovic, Z., & Liber, Z. (2015). Causes and consequences of contrasting genetic structure in sympatrically growing and closely related species. *AoB Plants*, *7*(106), 1-13.
- Rannala, B., & Mountain, J. L. (1997). Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(17), 9197–9201.
- Reich, D., Flatscher, R., Pellegrino, G., Hülber, K., Wessely, J., Gatringer, A., & Greimler, J. (2022). Biogeography of amphi-adriatic *Gentianella crispata* (Gentianaceae): a northern refugium and recent trans-adriatic migration. *Plant Biosystems*, *156*(3), 754–768.
- Rešetnik, I., Baričević, D., Rusu, D. B., Carović-Stanko, K., Chatzopoulou, P., Dajić-Stevanovic, Z., Goncariuc, M., Grdiša, M., Greguraš, D., Ibraliu, A., Jug-Dujaković, M., Krasniqi, E., Liber, Z., Murtić, S., Pećanac, D., Radosavljević, I., Stefkov, G., Stešević, D., Šoštarić, I., & Šatović, Z. (2016). Genetic diversity and demographic history of wild and cultivated/naturalised plant populations: Evidence from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L., Lamiaceae). *PLoS ONE*, *11*(7), 1–23.
- Rešetnik, I., Frajman, B., Bogdanović, S., Ehrendorfer, F., & Schönswetter, P. (2014). Disentangling relationships among the diploid members of the intricate genus *Knautia* (Caprifoliaceae, Dipsacoideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *74*(1), 97–110.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing Tables of Statistical Tests. *Evolution*, *43*(1), 223-225.
- Rohlf, J. F. (1998). NTSYSpc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0 User Guide. Department of Ecology and Evolution State University of New York Stony Brook.
- Rousset, F. (1997). Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, *145*(4), 1219–1228.
- Rousset, F. (2008). GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, *8*(1), 103–106.
- Rull, V. (2009). Microrefugia. *Journal of Biogeography*, *36*(3), 481–484.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, *4*(4), 406–425.
- Šegota, T., & Filipčić, A. (2017). Köppenova podjela klima i hrvatsko nazivlje. *Geoadria*, *8*(1), 17–37.
- Shaw, J., Lickey, E. B., Beck, J. T., Farmer, S. B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K. C., Winder, C. T., Schilling, E. E., & Small, R. L. (2005). The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, *92*(1), 142–166.

- Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E., & Small, R. L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The Tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, *94*(3), 275–288.
- Skoula, M., El Hilali, I., & Makris, A. M. (1999). Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. Clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles. *Biochemical Systematics and Ecology*, *27*(6), 559–568.
- Stevanoski, I., Kuzmanović, N., Koce, J. D., Schönswetter, P., & Frajman, B. (2020). Disentangling relationships between the amphi-adriatic *Euphorbia spinosa* and Balkan endemic *E. glabriflora* (Euphorbiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, *194*(3), 358–374.
- Stewart, J. R., & Lister, A. M. (2001). Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends in Ecology and Evolution*, *16*(11), 608–613.
- Stojanović, D., Aleksić, J. M., Jančić, I., & Jančić, R. (2015). A Mediterranean medicinal plant in the continental Balkans: A plastid DNA-based phylogeographic survey of *Salvia officinalis* (Lamiaceae) and its conservation implications. *Willdenowia*, *45*(1), 103–118.
- Surina, B., Schneeweiss, G. M., Glasnovič, P., & Schönswetter, P. (2014). Testing the efficiency of nested barriers to dispersal in the Mediterranean high mountain plant *Edraianthus graminifolius* (Campanulaceae). *Molecular Ecology*, *23*(11), 2861–2875.
- Surina, B., Schönswetter, P., & Schneeweiss, G. M. (2011). Quaternary range dynamics of ecologically divergent species (*Edraianthus serpyllifolius* and *E. tenuifolius*, Campanulaceae) within the Balkan refugium. *Journal of Biogeography*, *38*(7), 1381–1393.
- Tucker, A. O., & Maciarello, M. J. (1990). Essential oils of cultivars of Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Essential Oil Research*, *2*(3), 139–144.
- Tzedakis, P. C., Emerson, B. C., & Hewitt, G. M. (2013). Cryptic or mystic? Glacial tree refugia in northern Europe. *Trends in Ecology and Evolution* *28*(12), 696–704.
- Valtueña, F. J., López, J., Álvarez, J., Rodríguez-Riaño, T., & Ortega-Olivencia, A. (2016). *Scrophularia arguta*, a widespread annual plant in the Canary Islands: a single recent colonization event or a more complex phylogeographic pattern? *Ecology and Evolution*, *6*(13), 4258–4273.
- Vinet, L., & Zhedanov, A. (2011). A „missing“ family of classical orthogonal polynomials. *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical*, *44*(8), 1–16.
- Walker, J. B., & Sytsma, K. J. (2007). Staminal Evolution in the Genus *Salvia* (Lamiaceae): Molecular Phylogenetic Evidence for Multiple Origins of the Staminal Lever. *Annals of Botany*, *100*(2), 375–391.
- Walker, J. B., Sytsma, K. J., Treutlein, J., & Wink, M. (2004). *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae; *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and tribe Mentheae. *American Journal of Botany* *91*(7), 1115–1125.
- Warren, D. L., Glor, R. E., & Turelli, M. (2010). ENMTools: A toolbox for comparative studies

- of environmental niche models. *Ecography*, 33(3), 607–611.
- Warren, D. L., & Seifert, S. N. (2011). Ecological niche modeling in Maxent: The importance of model complexity and the performance of model selection criteria. *Ecological Applications*, 21(2), 335-342.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, 38(6), 1358-1370.
- Wise, M. L., Savage, T. J., Katahira, E., & Croteau, R. (1998). Monoterpene synthases from common sage (*Salvia officinalis*). cDna isolation, characterization, and functional expression of (+)-sabinene synthase, 1,8-cineole synthase, and (+)-bornyl diphosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(24), 14891–14899.
- Yang, L., Kong, H., Huang, J. P., & Kang, M. (2019). Different species or genetically divergent populations? Integrative species delimitation of the *Primulina hochiensis* complex from isolated karst habitats. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 132, 219–231.
- Židovec, V., Vršek, I., Kolak, I., Liber, Z., & Šatović, Z. (2005). Mirisava kadulja-Potencijalna vrsta za uređenje krajobraza. *Sjemenarstvo*, 23(1), 45–56.



## 8. PRILOZI

Popis priloga:

- Prilog 1. Procjena učestalosti nul – alela ( $f_{null}$ ) po lokusu i populaciji
- Prilog 2. Rasprostranjenost identificiranih haplotipova unutar istraživanih populacija ljekovite kadulje
- Prilog 3. Matrica vrijednosti indeksa genetičke diferencijacije ( $F_{ST}$ ) između svih parova populacija

**Prilog 1.** Procjena učestalosti nul – alela ( $f_{null}$ ) po lokusu i populaciji

Br.	Lokus								Ukupno
	So001	So002	So003	So007	So011	So013	So014	So019	
P01	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P02	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P03	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P04	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P05	0,166	-	-	-	-	-	-	-	1
P06	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P07	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P08	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P09	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P10	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P11	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P12	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P13	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P14	-	-	-	-	-	-	-	0,161	1
P15	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P16	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P17	0,196	-	-	-	-	-	-	-	1
P18	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P19	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P20	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P21	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P22	-	-	-	-	-	-	0,107	<b>0,210</b>	2
P23	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P24	-	-	-	-	-	-	-	0,080	1
P25	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P26	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P27	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P28	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P29	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P30	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P31	-	-	-	-	-	-	-	0,174	1
P32	-	0,175	-	-	-	-	-	-	1
P33	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P34	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P35	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P36	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P37	-	-	0,132	-	0,154	-	-	-	2
P38	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P39	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P40	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P41	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P42	-	-	-	-	0,088	-	-	-	1
P43	-	-	-	-	-	-	-	-	0

**Prilog 1.** Nastavak

P44	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P45	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P46	-	-	-	-	-	-	-	0,131	1
P47	-	-	-	-	-	-	0,100	-	1
P48	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P49	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P50	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P51	-	-	-	-	0,081	-	0,096	-	2
P52	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P53	-	-	-	-	0,170	-	-	-	1
P54	0,065	-	0,096	-	-	-	-	-	2
P55	-	-	-	-	0,120	-	-	-	1
P56	-	-	-	-	0,149	-	-	-	1
P57	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P58	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P59	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P60	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P61	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P62	-	-	-	-	-	-	-	-	0
$\Sigma$	3	1	2	0	6	0	3	5	20

**Prilog 2.** Rasprostranjenost kloroplastnih haplotipova unutar istraživanih populacija ljekovite kadulje. H01 – H16 predstavljaju identificirane haplotipove,  $n$  – broj analiziranih jedinki po populaciji,  $h$  – broj identificiranih haplotipova po populaciji,  $h/n$  – broj haplotipova po jedinci

Pop	n	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	h	h/n
P01	5													5				1	20
P02	5											2		3				2	40
P03	5											1		4				2	40
P04	5												5					1	20
P05	5												5					1	20
P06	4												4					1	25
P07	5	4		1														2	40
P08	0																	0	0
P09	5	5																1	20
P10	5	3							2									2	40
P11	5	5																1	20
P12	4						4											1	25
P13	4	4																1	25
P14	5	5																1	20
P15	5					5												1	20
P16	5	1			4													2	40
P17	5	5																1	20
P18	5	1														4		2	40
P19	5	4			1													2	40
P20	5	5																1	20
P21	5	5																1	20
P22	5	4				1												2	40
P23	5	3		2														2	40
P24	5	5																1	20
P25	5															5		1	20

**Prilog 2. Nastavak**

P26	5	5								1	20	
P27	5	5								1	20	
P28	5		3		1	1				3	60	
P29	5	5								1	20	
P30	5							1	4	2	40	
P31	5	1			1	3				3	60	
P32	5			5						1	20	
P33	5	5								1	20	
P34	5				5					1	20	
P35	5			2			2			1	3	60
P36	5	2			3					2	40	
P37	5			4						1	2	40
P38	5									5	1	20
P39	5	2		1	2					3	60	
P40	5	3				2				2	40	
P41	5					1				4	2	40
P42	5	1	4							2	40	
P43	5	5								1	20	
P44	5	5								1	20	
P45	5									5	1	20
P46	5		2	3						2	40	
P47	5		1	1					3	3	60	
P48	5	5								1	20	
P49	5	5								1	20	
P50	5			5						1	20	
P51	5								5	1	20	
P52	4		4							1	25	

## Prilog 2. Nastavak

P53	5	5																		1	20		
P54	5		2																	3	2	40	
P55	4	3							1												2	50	
P56	5	5																			1	20	
P57	5																			5	1	20	
P58	5	5																			1	20	
P59	5																			5	1	20	
P60	5																				5	1	20
P61	4	2						2													2	50	
P62	5	4						1													2	40	

## Prilog 3. Matrica vrijednosti indeksa genetičke diferencijacije ( $F_{ST}$ ) između svih parova populacija, prvi dio (P01-P20)

Pop	Lokalitet	Država	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20
P01	Pollino 2	ITA																				
P02	Pollino 1	ITA	0,124																			
P03	Maratea	ITA	0,165	0,168																		
P04	Cilento	ITA	0,188	0,219	0,196																	
P05	Sacco	ITA	0,165	0,213	0,191	0,108																
P06	Savoia	ITA	0,124	0,150	0,169	0,170	0,173															
P07	Aurunci	ITA	0,319	0,345	0,347	0,341	0,285	0,342														
P08	Ausoni	ITA	0,335	0,372	0,338	0,347	0,307	0,329	0,157													
P09	Supino	ITA	0,316	0,327	0,365	0,361	0,302	0,296	0,214	0,189												
P10	d'Antino	ITA	0,361	0,394	0,376	0,421	0,358	0,371	0,290	0,271	0,147											
P11	M. Salviano Maiella/Pacentr	ITA	0,374	0,385	0,377	0,381	0,320	0,364	0,299	0,252	0,186	0,207										
P12	o	ITA	0,657	0,666	0,678	0,679	0,628	0,628	0,541	0,571	0,541	0,618	0,612									
P13	Trieste	ITA	0,268	0,337	0,318	0,333	0,253	0,250	0,292	0,271	0,274	0,338	0,357	0,554								



### Prilog 3. Nastavak

P44	Brajići	MNE	0,266	0,302	0,290	0,295	0,246	0,264	0,195	0,183	0,226	0,281	0,279	0,495	0,163	0,191	0,109	0,105	0,091	0,102	0,111	0,097
P45	Rumija	MNE	0,229	0,272	0,233	0,260	0,210	0,230	0,200	0,164	0,200	0,242	0,249	0,517	0,136	0,190	0,087	0,090	0,088	0,096	0,090	0,057
P46	Bratonožići	MNE	0,239	0,279	0,257	0,257	0,215	0,240	0,191	0,153	0,233	0,273	0,239	0,505	0,165	0,183	0,130	0,116	0,113	0,091	0,112	0,095
P47	Božaj	MNE	0,276	0,331	0,304	0,306	0,244	0,254	0,252	0,231	0,260	0,324	0,312	0,526	0,137	0,231	0,153	0,137	0,117	0,091	0,151	0,114
P48	Miljkovac	SRB	0,368	0,409	0,380	0,386	0,346	0,347	0,345	0,287	0,331	0,423	0,421	0,708	0,253	0,276	0,234	0,187	0,201	0,223	0,202	0,178
P49	Sićevo	SRB	0,348	0,389	0,369	0,376	0,321	0,341	0,294	0,281	0,337	0,398	0,390	0,626	0,267	0,290	0,222	0,213	0,180	0,221	0,217	0,180
P50	Llogora	ALB	0,227	0,281	0,261	0,265	0,211	0,214	0,231	0,189	0,210	0,268	0,243	0,518	0,153	0,262	0,160	0,137	0,131	0,159	0,130	0,129
P51	Tommor	ALB	0,309	0,350	0,315	0,329	0,275	0,295	0,302	0,261	0,300	0,363	0,368	0,586	0,197	0,259	0,190	0,123	0,149	0,162	0,127	0,095
P52	Prespa	ALB	0,412	0,444	0,431	0,433	0,385	0,404	0,337	0,277	0,310	0,415	0,421	0,630	0,294	0,351	0,183	0,252	0,237	0,219	0,201	0,231
P53	Dajti	ALB	0,296	0,333	0,310	0,311	0,243	0,290	0,228	0,202	0,246	0,313	0,276	0,506	0,214	0,271	0,151	0,169	0,155	0,173	0,169	0,153
P54	Shengjin	ALB	0,223	0,274	0,255	0,263	0,214	0,224	0,202	0,146	0,151	0,222	0,239	0,499	0,124	0,212	0,066	0,096	0,093	0,101	0,074	0,065
P55	Jablanica	MKD	0,363	0,400	0,394	0,377	0,341	0,351	0,322	0,282	0,333	0,395	0,359	0,616	0,262	0,317	0,199	0,221	0,202	0,224	0,258	0,227
P56	Zagori	GRC	0,313	0,352	0,334	0,323	0,260	0,307	0,206	0,142	0,212	0,302	0,282	0,519	0,231	0,305	0,134	0,191	0,174	0,186	0,156	0,179
P57	Timfi	GRC	0,315	0,354	0,321	0,342	0,299	0,317	0,264	0,196	0,230	0,310	0,311	0,554	0,215	0,221	0,167	0,153	0,179	0,162	0,145	0,145
P58	Smolikas	GRC	0,312	0,340	0,329	0,335	0,291	0,310	0,281	0,275	0,301	0,362	0,362	0,551	0,234	0,261	0,188	0,161	0,138	0,142	0,171	0,148
P59	Arta	GRC	0,324	0,375	0,371	0,365	0,297	0,321	0,302	0,238	0,217	0,310	0,330	0,593	0,218	0,344	0,178	0,242	0,233	0,236	0,197	0,217
P60	Plaka	GRC	0,348	0,370	0,372	0,379	0,327	0,339	0,300	0,260	0,266	0,343	0,355	0,605	0,241	0,327	0,178	0,236	0,239	0,204	0,210	0,213
P61	Skiti, Kozani	GRC	0,283	0,325	0,303	0,313	0,260	0,277	0,261	0,209	0,215	0,300	0,300	0,563	0,138	0,209	0,122	0,101	0,127	0,104	0,125	0,103
P62	Lygeri, Kozani	GRC	0,309	0,350	0,337	0,340	0,290	0,305	0,277	0,242	0,237	0,323	0,323	0,573	0,178	0,230	0,134	0,128	0,150	0,128	0,149	0,118



**Prilog 3.** Matrica vrijednosti indeksa genetičke diferencijacije ( $F_{ST}$ ) između svih parova populacija, drugi dio (P21-P41)

P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27	P28	P29	P30	P31	P32	P33	P34	P35	P36	P37	P38	P39	P40	P41
0,038																				
0,144	0,099																			
0,074	0,067	0,121																		
0,085	0,067	0,119	0,045																	
0,086	0,079	0,136	0,095	0,105																
0,100	0,070	0,138	0,114	0,137	0,033															
0,106	0,095	0,066	0,126	0,118	0,104	0,091														



### Prilog 3. Nastavak

0,193	0,185	0,263	0,187	0,187	0,224	0,248	0,240	0,200	0,185	0,267	0,217	0,206	0,187	0,213	0,196	0,225	0,142	0,150	0,159	0,136
0,202	0,193	0,241	0,206	0,199	0,220	0,231	0,208	0,207	0,178	0,260	0,194	0,226	0,189	0,225	0,194	0,212	0,156	0,170	0,175	0,165
0,110	0,080	0,159	0,092	0,109	0,149	0,151	0,141	0,122	0,104	0,128	0,112	0,107	0,095	0,127	0,098	0,100	0,078	0,100	0,099	0,109
0,130	0,105	0,164	0,127	0,138	0,156	0,157	0,162	0,128	0,130	0,165	0,125	0,139	0,122	0,150	0,124	0,140	0,107	0,132	0,124	0,130

### Prilog 3. Matrica vrijednosti indeksa genetičke diferencijacije ( $F_{ST}$ ) između svih parova populacija, treći dio (P42-P62)

---

P42	P43	P44	P45	P46	P47	P48	P49	P50	P51	P52	P53	P54	P55	P56	P57	P58	P59	P60	P61	P62
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

---

### Prilog 3. Nastavak

0,173								
0,051	0,170							
0,060	0,143	0,067						
0,093	0,147	0,072	0,055					
0,122	0,211	0,082	0,106	0,090				
0,163	0,265	0,175	0,171	0,197	0,207			
0,136	0,253	0,152	0,140	0,142	0,182	0,113		
0,121	0,154	0,122	0,112	0,115	0,139	0,244	0,218	
0,147	0,226	0,150	0,092	0,131	0,168	0,221	0,212	0,196

### Prilog 3. Nastavak

0,169	0,289	0,200	0,209	0,235	0,234	0,283	0,268	0,273	0,262										
0,095	0,227	0,080	0,102	0,116	0,139	0,209	0,180	0,149	0,192	0,243									
0,064	0,146	0,067	0,042	0,069	0,106	0,163	0,160	0,110	0,088	0,175	0,113								
0,150	0,295	0,136	0,178	0,152	0,202	0,291	0,232	0,206	0,276	0,331	0,194	0,153							
0,102	0,199	0,095	0,116	0,139	0,172	0,253	0,217	0,161	0,213	0,218	0,077	0,115	0,220						
0,155	0,205	0,118	0,096	0,179	0,203	0,261	0,282	0,192	0,197	0,267	0,179	0,130	0,296	0,150					
0,122	0,205	0,118	0,111	0,120	0,154	0,216	0,161	0,196	0,170	0,213	0,136	0,128	0,236	0,174	0,202				
0,161	0,279	0,195	0,192	0,227	0,227	0,259	0,261	0,184	0,282	0,264	0,198	0,144	0,270	0,162	0,249	0,263			
0,187	0,307	0,179	0,189	0,203	0,216	0,284	0,281	0,215	0,254	0,282	0,211	0,157	0,271	0,228	0,250	0,234	0,179		
0,117	0,160	0,106	0,078	0,124	0,143	0,179	0,196	0,142	0,178	0,244	0,155	0,089	0,183	0,156	0,111	0,144	0,192	0,205	
0,144	0,206	0,136	0,117	0,142	0,168	0,208	0,213	0,157	0,192	0,268	0,178	0,114	0,214	0,200	0,167	0,168	0,216	0,213	0,018
<b>Prosjek</b>				0,196															
<b>Min.</b>				0,009															
<b>Maks.</b>				0,708															
				<b>Između</b>		P39 P40													
				<b>Između</b>		P12 P48													

## 9. ŽIVOTOPIS AUTORA

Danijel Škrtić, mag.biol.exp., rođen je 1986. godine u Karlovcu, a odrastao i Osnovnu školu pohađao u Generalskom Stolu. Završio je Preddiplomski studij biologije 2008., a diplomirao 2011. godine na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 2012. godine do danas radi kao nastavnik biologije u redovnoj i izornoj nastavi X. gimnazije Ivan Supek u Zagrebu. Uz redovnu nastavu biologije na hrvatskom jeziku, Danijel Škrtić predaje biologiju na hrvatskom i engleskom jeziku za učenike dvojezičnog programa te ih priprema za polaganje međunarodnih Cambridge ispita iz biologije. U X. gimnaziji Ivan Supek pokrenuo je tri izborna i fakultativna predmeta: Eksperimentalna biologija, Hortikultura i Bioinformatika.

Rad u nastavi Danijel Škrtić nastavlja i na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta gdje je od 2015.-2023. godine vodio vježbe iz kolegija Sistematska botanika i sudjelovao u terenskoj nastavi botanike unutar kolegija Terenska nastave iz botanike i zoologije.

Danijel Škrtić koautor je udžbenika za drugi razred gimnazije iz biologije i skripte „Maxtura“ za pripreme iz biologije te niza internih skripti za učenike kao dodatni materijal za učenje ili pomoć pri učenju koncepata i razvijanju praktičnih vještina iz biologije.

Kao vanjski suradnik u instituciji Oikon d.o.o. sudjeluje u terenskim istraživanjima iz botanike na projektima "Kartiranje stranih i invazivnih stranih vrsta biljaka te izrada, dorada i testiranje programa praćenja" i Usluge definiranja SMART ciljeva očuvanja i osnovnih mjera očuvanja ciljnih vrsta i stanišnih tipova".