

Populacijsko-genetička struktura kratkozupčaste kadulje (*Salvia brachyodon* Vandas) na poluotoku Pelješcu

Turković, Doroteja

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:217:449206>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

DOROTEJA TURKOVIĆ

**Populacijsko-genetička struktura kratkozupčaste kadulje
(*Salvia brachyodon* Vandas) na poluotoku Pelješcu**

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za sistematsku botaniku i floru na Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc.dr.sc. Ivana Radosavljevića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja Magistra struke znanosti o okolišu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Populacijsko-genetička struktura kratkozupčaste kadulje (*Salvia brachyodon* Vandas) na poluotoku Pelješcu

Doroteja Turković
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Kratkozupčasta kadulja (*Salvia brachyodon* Vandas) usko je endemična vrsta s tri poznate populacije. Prikupljeno je 119 uzoraka najveće populacije, one s poluotoka Pelješca. Nakon izolacije DNA, lančanom reakcijom polimerazom provedeno je umnožavanje osam mikrosatelitnih lokusa, a s ciljem utvrđivanja osnovnih populacijsko genetičkih parametara. Ovim istraživanjem je utvrđena visoka stopa klonalnog razmnožavanja kratkozupčaste kadulje, a koje značajno utječe na prostornu genetičku strukturu istraživane populacije. Također, dobivene vrijednosti osnovnih populacijsko genetičkih parametara ne upućuju na genetičku osiromašenost ove populacije, te se može zaključiti da ona neposredno nije ugrožena. Nadalje, može se pretpostaviti da ekološka sukcesija i nestanak odgovarajućeg staništa predstavljaju posrednu prijetnju za kratkozupčastu kadulju na ovom lokalitetu, te bi eventualne konzervacijske aktivnosti u budućnosti trebale biti usmjerene prema očuvanju staništa otvorenog tipa nužnog za opstanak ove vrste.

(47 stranica, 11 slika, 4 tablica, 53 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: *Salvia brachyodon*, klonalnost, mikrosateliti, populacijska genetika

Voditelj: Dr.sc. Ivan Radosavljević, doc.

Ocjenitelji: Dr. sc. Jasna Lajtner, izv. prof.

Dr. sc. Neven Bočić, doc.

Dr. sc. Dražen Balen, prof.

Rad prihvaćen: 3. 3. 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Population genetic structure of the short-toothed sage (*Salvia brachyodon* Vandas) from the Peljašac peninsula

Doroteja Turković
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Salvia brachyodon Vandas is a narrow endemic species with three known populations. 119 samples were collected from the largest population at Pelješac peninsula. The DNA was isolated from plant tissue and eight microsatellite loci were amplified by the use of Polymerase Chain Reaction method. An analysis was conducted to determine the basic population genetic parameters. This research revealed high rates of clonal reproduction in short-toothed sage which has major impact on spatial genetic structure of analysed population. Also, the obtained population genetics parameters do not indicate a genetic impoverishment of the population, and it can be concluded that the population is not directly threatened. Furthermore, it can be assumed that ecological succession and the disappearance of a suitable habitat represent a direct threat to short-toothed sage in this site. Future conservation measures should be aimed at preserving open type habitat which is necessary for the survival of this species.

(47 pages, 11 figures, 4 tables, 53 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Keywords: *Salvia brachyodon*, clonality, microsatellites, population genetics

Supervisor: Dr. Ivan Radosavljević, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Dr. Neven Bočić, Asst. Prof.

Dr. Dražen Balen, Prof.

Thesis accepted: 3. 3. 2017.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. O kratkozupčastoj kadulji – <i>Salvia brachyodon</i> Vandas.....	1
1.1.1. Taksonomski smještaj kratkozupčaste kadulje.....	1
1.1.2. Područje rasprostranjenosti kratkozupčaste kadulje i opis lokaliteta kratkozupčaste kadulje na poluotoku Pelješcu.....	1
1.1.3. Morfološki opis kratkozupčaste kadulje.....	4
1.1.4. Kemijski sastav eteričnih ulja kratkozupčaste kadulje	8
1.1.5. Oblici razmnožavanja kratkozupčaste kadulje	8
1.1.6. Razina ugroženosti kratkozupčaste kadulje.....	8
1.2. Konzervacijska genetika.....	9
1.2.1. Općenito o konzervacijskoj genetici i uzrocima ugroženosti pojedinih kategorija	9
1.2.2. Tipovi istraživanja u konzervacijskoj genetici	9
1.3. Mikrosateliti kao molekularni biljezi	10
1.4. Ciljevi istraživanja.....	10
2. Materijali i metode.....	11
2.1. Prikupljanje biljnog materijala kratkozupčaste kadulje.....	11
2.2. Izolacija DNA i određivanje koncentracije izolirane DNA.....	11
2.3. Lančana reakcija polimerazom.....	12
2.3.1. Općenito o lančanoj reakciji polimerazom.....	12
2.3.2. Umnožavanje osam mikrosatelitnih lokusa kratkozupčaste kadulje lančanom reakcijom polimerazom.....	13
2.4. Elektroforeza	14
2.4.1. Općenito o elektroforezi na gelu	14
2.4.2. Provjera uspješnosti lančane reakcije polimerazom putem elektroforeze	14
2.5. Utvrđivanje veličine alela analiziranih mikrosatelitnih lokusa	16
2.6. Statistička obrada podataka	17
2.6.1. Utvrđivanje standardnih populacijsko-genetičkih vrijednosti.....	17
2.6.2. Provjera vjerodostojnosti korištenih molekularnih biljega s obzirom na klonalnost istraživane vrste.....	17
2.6.3. Utvrđivanje populacijsko-genetičkih vrijednosti karakterističnih za djelomično klonalne vrste	18
3. Rezultati.....	20
3.1. Vjerodostojnost korištenih molekularnih biljega	20
3.2. Rezultati genotipizacije temeljem osam umnoženih mikrosatelitnih lokusa.....	21

3.3. Prostorno genetička struktura populacije kratkozupčaste kadulje.....	23
3.4. Utvrđivanje prolaska istraživane populacije kroz genetičko usko grlo	26
3.5. Utvrđivanje srodstvenih odnosa na unutar-populacijskoj razini	26
4. Rasprava	28
5. Zaključci	31
6. Literatura	32
7. Prilozi	38
8. Životopis	46

1.Uvod

1.1. O kratkozupčastoj kadulji – *Salvia brachyodon* Vandas

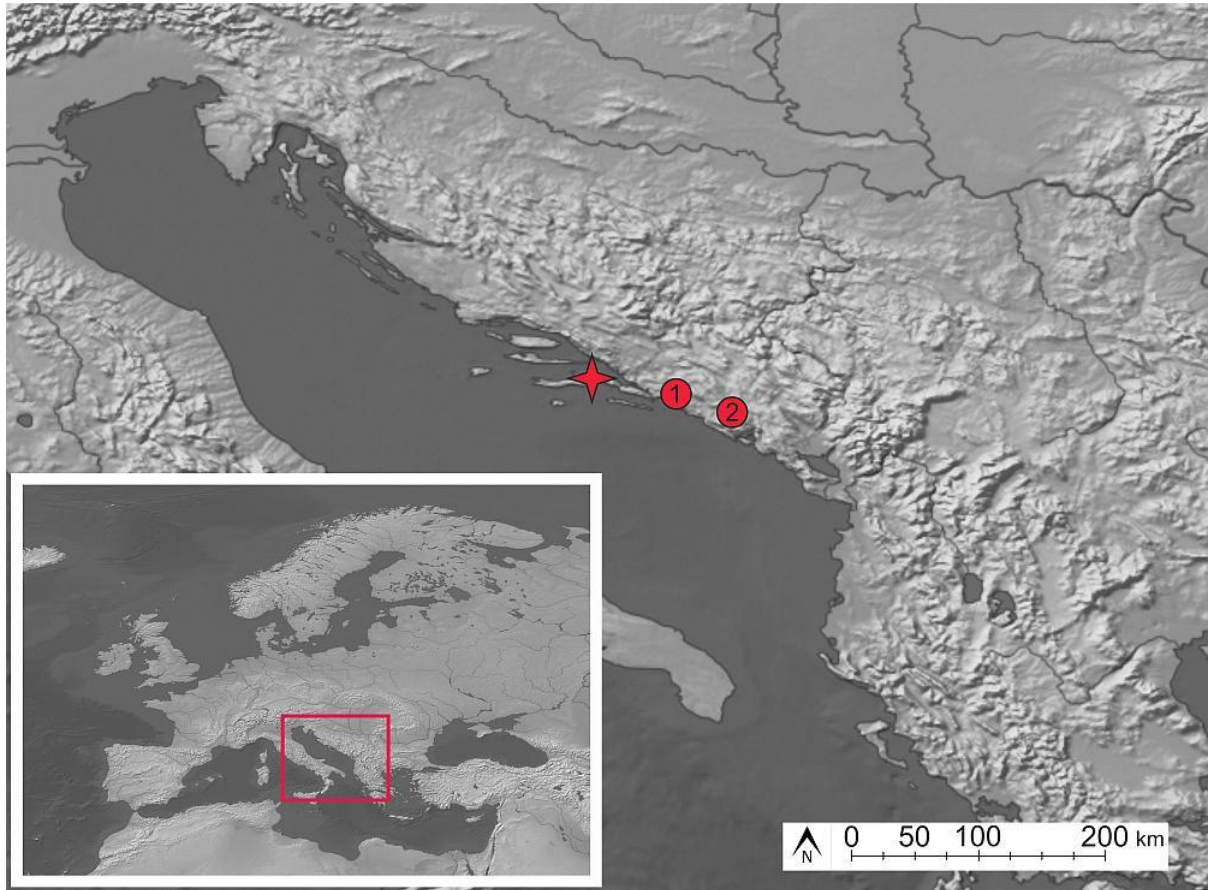
1.1.1. Taksonomski smještaj kratkozupčaste kadulje

Rod *Salvia* s više od tisuću opisanih vrsta jedan je od najvećih rodova, ne samo unutar porodice *Lamiaceae* kojoj pripada, već i općenito. Od ukupnog broja vrsta unutar roda, njih oko 250 pojavljuje se na području Mediterana pa zahvaljujući tome šire područje Mediterana predstavlja jedan od svjetskih centara rasprostranjenosti vrsta roda *Salvia* (Walker i sur. 2004, Radosavljević i sur. 2012). Morfološki i filogenetski, kratkozupčasta kadulja (*Salvia brachyodon* Vandas) pripada *Salvia officinalis* skupini te je morfološki najbližnja endemičnoj vrsti *S. ringens* Sibth. & Sm. koja raste na području središnjeg i južnog Balkana (Hedge 1972). Uz već spomenutu *S. ringens*, na području Europe nalazimo još i sljedeće vrste iz *Salvia officinalis* skupine: *S. officinalis* L., *S. fruticosa* Mill, *S. lavandulifolia* Vahl, *S. tomentosa* Mill., *S. candelabrum* Boiss, *S. blancoana* Webb & Heldr., *S. pinnata* L., *S. scabiosifolia* Lam. i *S. bracteata* Banks & Solander (Hedge 1972).

1.1.2. Područje rasprostranjenosti kratkozupčaste kadulje i opis lokaliteta kratkozupčaste kadulje na poluotoku Pelješcu

Kratkozupčasta kadulja je endemična biljna vrsta iznimno uske rasprostranjenosti. Poznate su samo tri populacije. Najveća populacija s obzirom na površinu koju zauzima i broj jedinki nalazi se na poluotoku Pelješcu, dok su dvije manje populacije smještene u zaleđu Cavtata i u podnožju planine Orjen, u graničnom području između Bosne i Hercegovine i Crne Gore (Abadžić i Šilić 1982) (Slika 1). Vrstu je otkrio i opisao Karl Vandas 1899. godine na planini Orjen, na području između sela Ulice i Vrbanje (Vandas 1889.) Populacija na poluotoku Pelješcu je smještena na zaravni jugozapadno od vrha Sv. Ilija, na približno 900 metara nadmorske visine (Slika 1.). Na ovom lokalitetu *Salvia brachyodon* raste na vapnenačkom kamenjaru te samo mjestimice u rijetkoj šumi crnog bora (*Pinus nigra* L.) (Trinajstić 1986). Specifičnost ovog lokaliteta je ta što je 1998. godine šumski požar većih razmjera gotovo u potpunosti opustošio ovo područje, te na taj način uklonio većinu visoke vegetacije (Slika 2.). Zahvaljujući tome, danas prisutna populacija kratkozupčaste kadulje na ovom lokalitetu nalazi se na opožarenom terenu gdje se ranije nalazila borova šuma. A kako

je populacija udaljena više sati hoda od najbližeg naselja, ne čudi što sama vrsta nije poznata lokalnom stanovništvu (Barbalić 1956.).



Slika 1. Geografski položaj populacija kratkozupčaste kadulje: zvjezdicom je označen položaj istraživane populacije s poluotoka Pelješca, dok su brojevima 1. i 2. označeni položaji populacija pokraj Cavtata odnosno u podnožju planine Orjen.



Slika 2. Stanište kratkozupčaste kadulje na poluotoku Pelješcu. Jasno su vidljivi opožareni ostaci šume crnog bora.

1.1.3. Morfološki opis kratkozupčaste kadulje

Salvia brachyodon je višegodišnja biljka u formi niskog i gustog polugrma (Slika 3.). Listovi tvore rozetu, a tek iz pojedinih izdanaka se u ljetnim mjesecima razvija cvat. Listovi su veliki, dužine 6-14 cm i širine 1,5-4 cm, s dugom peteljkom i nerazdijeljenom ili perasto razdijeljenom plojkom (Šilić 1984). Mladi listovi nemaju istaknute žile i gusto su prekriveni dlakama, razvijeni listovi imaju slabo istaknute žile te su odozgo slabo dlakavi, a odozdo gusto prekriveni bijelim dlačicama. Stariji listovi su manje dlakavi i žutozeleni s jače istaknutim žilama, naboranim i režnjevitim rubom plojke (Šilić 1984). Stabljika cvata je zaobljeno četverobridna, uspravna i visoka 70 do 80 cm, u donjem dijelu odrvenjela. Listovi su veliki, dužine 6-14 cm i širine 1,5-4 cm, s dugom peteljkom i nerazdijeljenom ili perasto razdijeljenom plojkom (Slika 4.). Mladi listovi nemaju istaknute žile i gusto su prekriveni dlakama, razvijeni listovi imaju slabo istaknute žile te su odozgo slabo dlakavi, a odozdo gusto prekriveni bijelim dlačicama. Stariji listovi su manje dlakavi i žutozeleni s jače istaknutim žilama, naboranim i režnjevitim rubom plojke.

Cvat je rahlocvjetna metlica s malim brojem cvjetova. Brakteje se razlikuju u veličini i obliku, no sve otpadaju vrlo rano. Malene brakteje nalaze se uz sami cvijet te su nekad posute žljezdastim dlakama (Barbalić 1956.). Veće brakteje imaju različito razdijeljenu plojku i smještene su uz najniže, manje brakteje s nerazdijeljenom plojkom (Barbalić 1956.). Čaška je dvousnata, cjevasto zvonolika s izraženim žilama, dužine oko 9 mm. Zupci čaške međusobno su gotovo jednaki, široko trokutasti, na vrhu ušiljeni. Čaška se nalazi na četinjaskoj cvjetnoj stapci. Vjenčić je velik, svjetloljubičasto modri s žljezdastim dlakama, 3-4 puta duži od čaške. Gornja usna vjenčića je gotovo ravna, a donja, veća usna, izgrađena je od 3 krpasta dijela, srednjeg širokog, obrnuto-srcolikog i dvostruko većeg od oba postrana dijela (Barbalić 1956.) (Slika 5.). Cvijet sadrži dva fertilna prašnika s kratkim filamentima. Prašnici su međusobno povezani i tvore karakterističan mehanizam oprašivanja za rod *Salvia*. Tučak je građen od četverodjelne plodnice. Vrat tučka i prašnici proviruju iz cijevi vjenčića.

U usporedbi s drugim blisko srodnim vrstama, *S. brachyodon* cvjeta neuobičajeno kasno i dugo, od kraja srpnja do početka rujna (Šilić 1984). S obzirom da većina cvjetova nakon cvjetanja otpadne, a tek u manjem dijelu cvjetova se razviju 4 ploda - merikarpa, očito je da tek rijetki cvjetovi bivaju uspješno oprašeni.



Slika 3. Kratkozupčasta kadulja – *Salvia brachyodon* Vandas



Slika 4. Perasto razdijeljene lisne plojke kratkozupčaste kadulje



Slika 5. Cvijet kratkozupčaste kadulje

1.1.4. Kemijski sastav eteričnih ulja kratkozupčaste kadulje

Kao i mnoge druge biljke roda *Salvia* i *S. brachyodon* je bogata eteričnim uljima. Sadržaj eteričnih ulja u listovima je oko 1,6%, a kao najzastupljeniji kemijski spojevi u eteričnom ulju ističu seskviterpeni s udjelom od oko 68%. Zanimljivo je istaknuti da je u populaciji s planine Orjen pronađen visok postotak 1,8 - cineola (36,9%) (Soković i sur. 2005). Ovaj spoj ima alelopatijsko djelovanje na druge biljne vrste i štiti *S. brachyodon* od herbivora. Činjenica da je udio tog spoja u populaciji s poluotoka Pelješca znatno manji (1,6%) može se objasniti drugačijim uvjetima na tom lokalitetu. Eterična ulja populacije s poluotoka Pelješca se po kemijskom sastavu razlikuju od eteričnih ulja ljekovite kadulje *S. officinalis* (Maksimović i sur. 2007) .

1.1.5. Oblici razmnožavanja kratkozupčaste kadulje

Uz spolno razmnožavanje i oprašivanje kukcima koje je tipično za rod *Salvia*, ova vrsta je također karakterizirana i vegetativnim razmnožavanjem pomoću podzemnih stolona, što bitno utječe na efektivnu veličinu i strukturu populacija, njihovu genetsku raznolikost kao i ekologiju vrste (Radosavljević i sur. 2015a, Radosavljević i sur. 2015b).

1.1.6. Razina ugroženosti kratkozupčaste kadulje

Zahvaljujući saznanju da su svi lokaliteti na kojima je kratkozupčasta kadulja prisutna izloženi ekološkoj sukcesiji koja izravno ugrožava ovu heliofilnu vrstu, ona se s punim pravom može smatrati vrstom visokog rizika od izumiranja i jednom od najugroženijih biljnih vrsta dinarskog krša. Iako je vrlo rijetka, u Republici Hrvatskoj nije tretirana kao ugrožena, već ima status gotovo ugrožene vrste (NT) i Zakonom je strogo zaštićena (Radosavljević i sur. 2012).

1.2. Konzervacijska genetika

1.2.1. Općenito o konzervacijskoj genetici i uzrocima ugroženosti pojedinih kategorija

Konzervacijska genetika predstavlja interdisciplinarno znanstveno područje koje za cilj ima proučavanje genetičke strukture ugroženih populacija odnosno svojti, a s ciljem razumijevanja genetičkih čimbenika koji ugrožavaju promatranu populaciju odnosno svojtu (Hedrick 2004). U odnosu na velike populacije širom rasprostranjenih svojti, male i izolirane populacije koje najčešće pripadaju svojtima vrlo ograničenog areala, su često izložene različitim populacijsko-genetičkim fenomenima koji mogu izrazito negativno djelovati na samu populaciju odnosno vrstu. Najčešće takve pojave su križanje u bliskom srodstvu, izostanak razmjene genetičkog materijala na među-populacijskoj razini, gubitak genske raznolikosti, te posljedično gubitak evolucijskog potencijala tj. pojava nesposobnosti populacije da se prilagodi novim i izmijenjenim okolišnim utjecajima (Gitzendanner i Soltis 2000, Hoffmann i Sgro 2011, Hylander i Ehrlen 2013, Frankham i sur. 2014). Nadalje, smatra se da ugrožavanje pojedinih tipova staništa od strane čovjeka, kao i klimatske promjene, predstavljaju vodeće uzroke izumiranja biljnih i životinjskih vrsta što za posljedicu ima gubitak bioraznolikosti (Bellard i sur. 2012, Breed i sur. 2012).

1.2.2. Tipovi istraživanja u konzervacijskoj genetici

Pravovremeno prikupljanje informacija o genetičkoj strukturi populacije ili vrste od interesa, je od iznimne važnosti za osmišljavanje učinkovitih konzervacijskih aktivnosti, a s ciljem umanjivanja svih onih štetnih utjecaja i procesa koji ugrožavaju ciljanu populaciju ili vrstu (Zaya i sur 2017.). Definiranje intenziteta i smjera protoka gena na unutar- i među-populacijskoj razini, razlikovanje populacija s visokim od onih s niskim razinama genetske raznolikosti te utvrđivanje efektivne veličine populacija, samo su neke od pretpostavki koji omogućavaju pravovremeno reagiranje u smislu provedbe konzervacijskih aktivnosti, a s ciljem zaštite bioraznolikosti određenog područja (Demauro 1993, Tecic i sur. 1998, Gitzendanner i sur. 2012 i drugi).

1.3. Mikrosateliti kao molekularni biljezi

Molekularni biljezi (genetic markers) su dijelovi DNA koji pokazuju neki oblik raznolikosti između promatranih jedinki (Šatović 1999). Mikrosateliti, poznati i pod nazivom jednostavne ponavljajuće sekvence (SSR – *Simple Sequence Repeats*) su najčešće korišteni DNA biljezi u populacijsko-genetičkim istraživanjima. Mikrosateliti su regije DNA sastavljene od velikog broja kopija tzv. mikrosatelitnog motiva, a koji se sastoji od 1-6 nukleotida. Mikrosatelitne regije mogu biti velike i do nekoliko stotina nukleotida. Pozitivne osobine mikrosatelitnih biljega zbog kojih se često koriste u populacijsko-genetičkim istraživanjima su njihova pouzdanost, visoka informativnost zbog velikog broja alela po lokusu, ponovljivost, kodominantnost i jednostavnost primjene (Greguraš 2013). Njihov glavni nedostatak je taj što su uglavnom specifični za pojedinu vrstu, tj. određeni mikrosatelitni biljezi razvijeni za određenu vrstu nisu prikladni za istraživanja na drugim vrstama, uz izuzetak blisko srodnih svojti (Miah i sur. 2013).

Mikrosateliti su najčešće okruženi regijama DNA koje karakterizira niska stopa mutacija tj. visoka konzerviranost, pa se te regije koriste za izradu početnica za umnožavanje samih mikrosatelitnih lokusa lančanom reakcijom polimeraze (Greguraš 2013).

1.4. Ciljevi istraživanja

Cilj ovoga istraživanja je detaljna analiza populacijsko-genetičke strukture najveće populacije kratkozupčaste kadulje s posebnim naglaskom na utvrđivanje razine klonalnosti. S obzirom da je svaka prikupljena jedinka geokodirana, dobiveni rezultati će također omogućiti usporedbu genetske i prostorne organizacije populacije. Nadalje, imajući na umu da je lokalitet na kojem se ova populacija nalazi bio opožaren 1998. godine, ovo istraživanje će omogućiti bolje razumijevanje prilagodljivosti kratkozupčaste kadulje na požare kao iznimno važne pojave u evoluciji brojnih biljnih vrsta Mediteranskog područja.

S obzirom da je *S. brachyodon* djelomično klonalna vrsta iznimno ograničenog područja rasprostranjenosti, utvrđivanje razine genotipske raznolikosti ove populacije će biti od iznimne važnosti u eventualnom planiranju i provedbi budućih konzervacijskih aktivnosti.

2. Materijali i metode

2.1. Prikupljanje biljnog materijala kratkozupčaste kadulje

Lisno tkivo 120 jedinki kratkozupčaste kadulje prikupljenih na poluotoku Pelješcu isušeno je u silika gelu. Prilikom prikupljanja biljnog materijala, svaka jedinka je geokodirana, tj. za svaku jedinku je određen prostorni smještaj. U tu svrhu korišten je GPS uređaj (Garmin, GPSmap 60CSx) i mreža dimenzija 5 X 5 metara.

2.2. Izolacija DNA i određivanje koncentracije izolirane DNA

Po 25 mg liofiliziranog tkiva od svakog uzorka je usitnjeno uređajem TissueLyser (QIAGEN) te je iz njega izolirana DNA upotrebom izolacijskog kompleta GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). Nakon usitnjavanja tkiva, u epruvete se dodaju dvije otopine za razgradnju stanica, 350 µL otopine A (*Lysis Solution A*) i 50 µL otopine B (*Lysis Solution B*), te se sadržaj epruveta temeljito promućka pomoću miješalice tj. vorteksa. Zatim se uzorci inkubiraju na 65°C u trajanju od 10 minuta uz povremeno miješanje. U ovom koraku izolacije DNA vrši se razgradnja stanica i neutralizacija enzima koji bi eventualno mogli oštetiti genomsku DNA. Potom se dodaje 130 µL otopine za otklanjanje ostatka tkiva (*Precipitation Solution*), uzorci se promućkaju i ostave na ledu kroz 5 min uslijed čega dolazi do taloženja ostataka tkiva. Slijedi centrifugiranje na 15 000 okr./min. u trajanju od 5 minuta. Nakon centrifugiranja potrebno je pažljivo otpipetirati vodenu fazu i premjestiti je u posebnu filtracijsku kolonu, te ponovno centrifugirati na maksimalnoj brzini od 15 000 okr./min. kroz 1 minutu. U ovom koraku otklanjaju se zaostali dijelovi biljnog tkiva dok DNA ostaje u tekućoj fazi. U uzorke se potom dodaje 700 µL otopine za vezanje DNA (*Binding Solution*) koja će pospješiti vezanje DNA molekula na prihvatni filter u sljedećem koraku. Također s ciljem boljeg vezanja DNA, na prihvatni filter prvo se dodaje 500 µL otopine za pripremu filtera za prihvat DNA (*Column Preparation Solution*) te se isti centrifugira na 10 000 okr./min. kroz 1 minutu. Nakon što je prihvatni DNA filter pripremljen, na njega se dodaje otopina s DNA nakon čega slijedi ponovno centrifugiranje na brzini od 15 000 okr./min. u trajanju od 1 minute. U sljedećem koraku uzorci se ispiru s 500 µL otopine za ispiranje (*Wash Solution*) i ponovno centrifugiraju na brzini od 15 000 okr./min. u trajanju od jedne 1 minute.

Ovaj korak se ponavlja još jednom, uz tu razliku što se poslije drugog ispiranja uzorci centrifugiraju u trajanju od 3 minute. U posljednjem koraku izolacije DNA, uzorcima se dodaje po 100 μ L na 65°C ugrijanog TE pufera nakon čega se centrifugiraju na 15 000 okr./min. u trajanju od jedne 1 minute. Otopina ovako izolirane DNA je vrlo visoke čistoće, te se kroz dulji vremenski period može čuvati na temperaturi od – 20°C, odnosno na 2-8°C kroz kraći vremenski period.

Koncentracije DNA uzoraka izmjerene su spektrofotometrijski, nanofotometrom P330 (IMPLEN), dok je kvaliteta i razina degradiranosti DNA utvrđena elektroforezom na agaroznom gelu. Nakon utvrđivanja koncentracije DNA slijedi razrjeđivanje uzoraka na koncentraciju od 1 ng/ μ L. Tako razrijeđeni uzorci koriste se za lančanu reakciju polimeraze. Izmjerene koncentracije DNA i korišteni volumeni vode i izolirane DNA za dobivanje otopine DNA prikladne koncentracije za lančanu reakciju polimerazom prikazani su u Prilogu 1.

2.3. Lančana reakcija polimerazom

2.3.1. Općenito o lančanoj reakciji polimerazom

Lančana reakcija polimeraze (Polymerase Chain Reaction, PCR) je tehnika u molekularnoj biologiji koju koristimo kako bismo umnožili željeni dio DNA molekule (Schochetman i sur 1988). Za uspješno umnožavanje potrebno je raspolagati kratkim oligonukleotidnim fragmentima koji će biti komplementarni određenim regijama DNA objekta istraživanja i osigurati dovoljne količine slobodnih nukleotida. Ti kratki jednolančani fragmenti služe kao početnice za sintezu DNA te se na njih u svakom ciklusu lančane reakcije polimerazom pridodaju nukleotidi komplementarni ciljanom dijelu DNA molekule koji želimo umnožiti. Cijeli proces provodi DNA polimeraza, enzim zadužen za polimerizaciju DNA lanca. DNA polimeraza mora biti stabilna na visokim temperaturama i zato se najčešće koristi onaj oblik izoliran iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* (Chien i sur 1976).

Lančana reakcija polimeraze odvija se u više ciklusa. Za svaki od tih ciklusa značajno je da prvo dolazi do povišenja temperature koje za posljedicu ima pucanje vodikovih veza između komplementarnih baza i razdvajanje komplementarnih lanaca DNA. Nakon naglog povišenja temperature sustav se postupno hladi pri čemu dolazi do vezanja početnica na komplementarne regije DNA. U sljedećem koraku odvija se polimerizacija koju kontrolira

DNA polimeraza, a tijekom koje se slobodni nukleotidi dodaju od 5' kraja prema 3' kraju DNA molekule stvarajući komplementarni lanac. Ovi koraci se ponavljaju sve dok u reakcijskoj otopini nisu prisutni samo željeni fragmenti u iznimno velikom broju kopija (Schochetman i sur 1988).

2.3.2. Umnožavanje osam mikrosatelitnih lokusa kratkozupčaste kadulje lančanom reakcijom polimerazom

Nakon određivanja koncentracije DNA slijedi priprema reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom. Reakcijska smjesa ukupnog je volumena 20 μL te sadrži 10x PCR pufer, 1,5 Mm MgCl_2 , 0,2 mM svake baze (dNTP), 0,075 μL TAIL FOR primer, 0,2 μL TAIL REV, 0,2 μL M13 primer, 0,5 μL Taq HS polymerase (Takara, Bio Inc). Za lančanu reakciju polimerazom korišten je uređaj GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), uz tzv. *Touchdown* protokol po sljedećem temperaturnom režimu:

- 94°C kroz 5 min;
- 5 ciklusa od 45 s na 94 °C, 30 s na 60 °C, uz snižavanje temperature u svakom od preostala 4 ciklusa za 1 °C, i 90 s na 72 °C
- 25 ciklusa od 45 s na 94°C, 30 s na 55 °C, i 90 s na 72 °C
- 8 min korak produljivanja na 72 °C.

Reakcijom je umnoženo osam polimorfnih mikrosatelitnih lokusa (SoUZ001, SoUZ002, SoUZ004, SoUZ005, SoUZ006, SoUZ007, SoUZ011, SoUZ014).

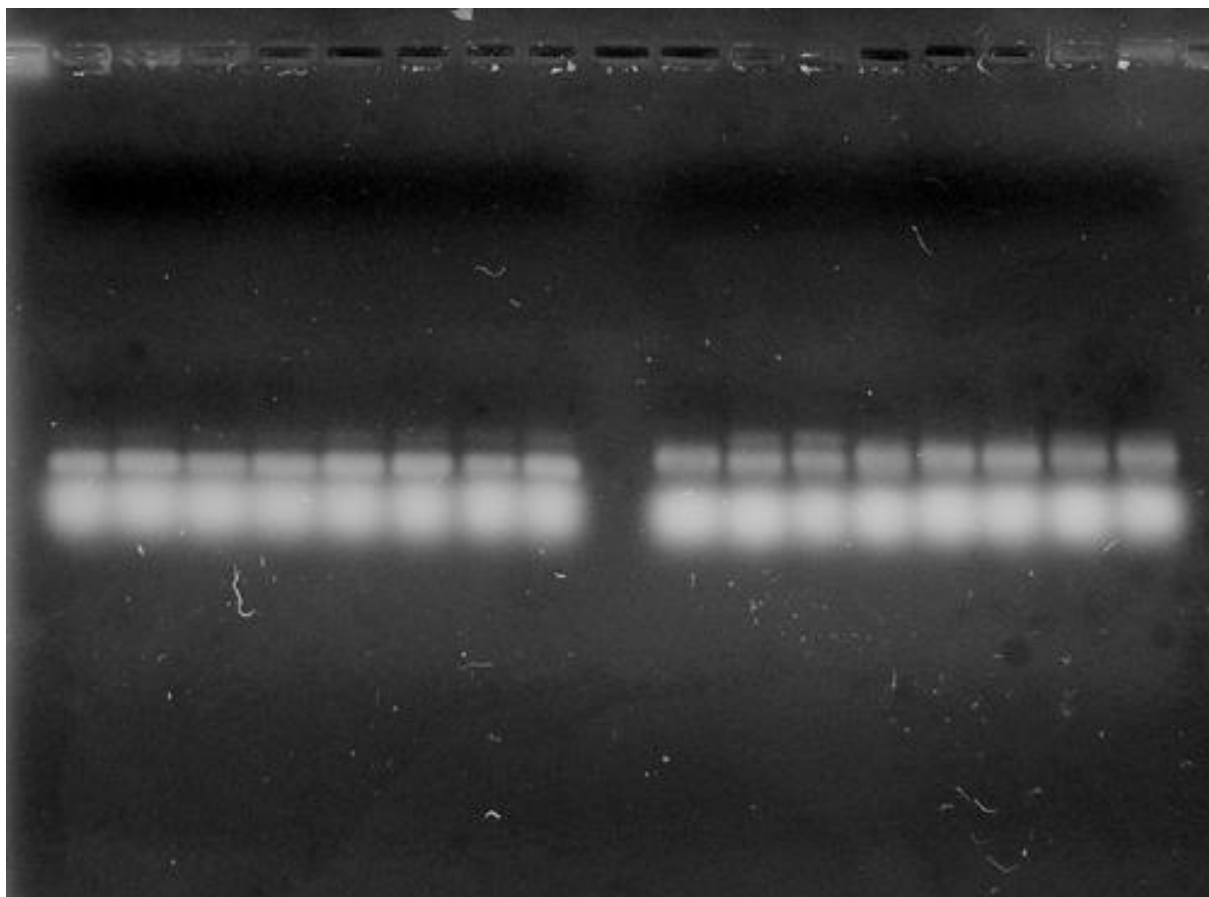
2.4. Elektroforeza

2.4.1. Općenito o elektroforezi na gelu

Elektroforeza je tehnika razdvajanja nabijenih čestica unutar električnog polja koje je uspostavljeno na gelu. DNA molekule su negativno nabijene te će se zato kretati u smjeru pozitivno nabijene elektrode. Manji fragmenti zbog manjeg otpora na koji nailaze u gelu se kreću brže od većih fragmenata, tako da naposljetku dolazi do razdvajanja DNA molekula u gelu s obzirom na njihovu veličinu (Southern 1980). Kako bi se mogla provesti vizualizacija DNA u gelu, potrebno je DNA na neki način označiti. Najčešće korištena metoda je bojanje etidijevim bromidom koji se specifično veže na molekulu DNA, te na ultraljubičastom svijetlu fluorescira narančasto i tako pokazuje gdje se u gelu nalazi DNA. Za odvajanje DNA fragmenata koriste se dvije vrste gela, poliakrilamidni gelovi i agarozni gelovi. Poliakrilamidni gelovi služe za finiju detekciju fragmenata koji se međusobno vrlo malo razlikuju u veličini, dok se za manje precizno razdvajanje DNA fragmenata koji se značajnije razlikuju svojom veličinom, koriste agarozni gelovi.

2.4.2. Provjera uspješnosti lančane reakcije polimerazom putem elektroforeze

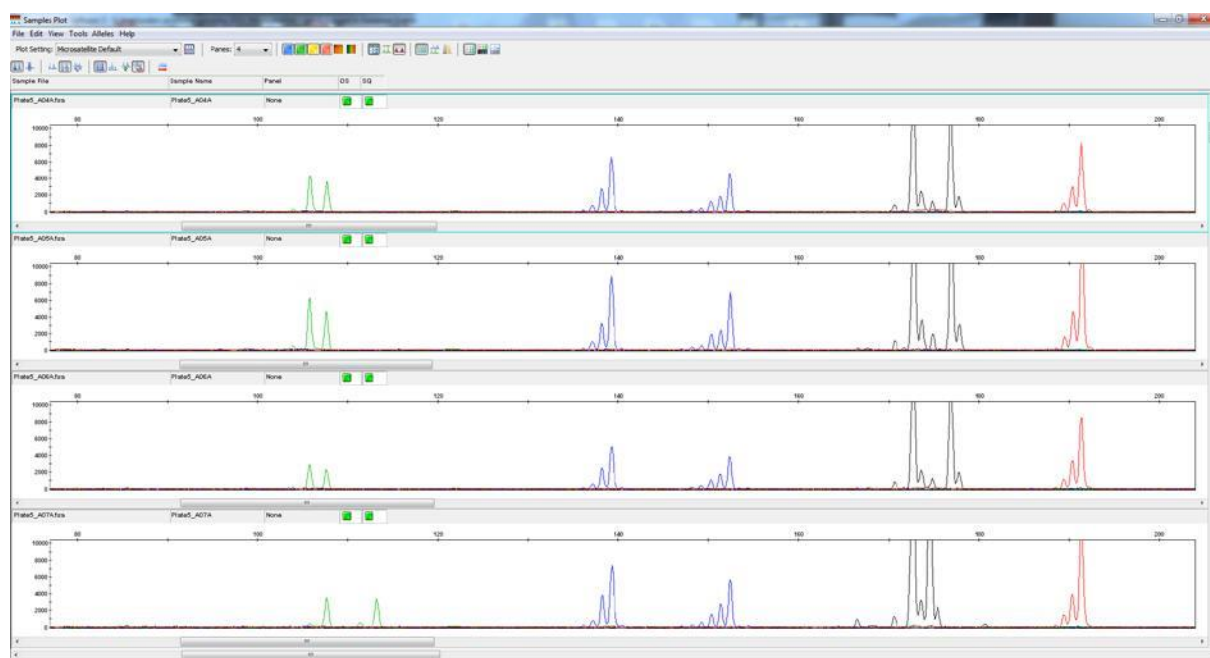
Uspješnost lančane reakcije polimerazom tj. prisutnost umnoženih mikrosatelitnih lokusa je provjerena elektroforezom na agaroznom gelu koncentracije 1.4%. Svaki pojedini uzorak za elektroforezu se pripremaju na načina da se prije nanošenja na gel, pomiješa 5 μ L produkta lančane reakcije polimerazom i 1 μ L boje. Sama elektroforeza se odvijala u trajanju od 20 min, uz napon od 120 V. Po završetku elektroforeze, bojanje DNA je provedeno uranjanjem cijeloga gela u otopinu etidijevog bromida u trajanju od 30 min, nakon čega je vizualizacija DNA ostvarena izlaganjem gela UV svijetlu (Slika 6.).



Slika 6. Prikaz elektroforegrama 16 uzoraka kratkozupčaste kadulje nakon umnožavanja lokusa SoUZ001 lančanom reakcijom polimerazom.

2.5. Utvrđivanje veličine alela analiziranih mikrosatelitnih lokusa

Nakon umnožavanja mikrosatelitnih lokusa uzorci su poslani u Macrogen Inc. (Seul, Južna Korea) gdje je kapilarnom elektroforezom na uređaju ABI 3730XL (Applied Biosystems) provedeno razdvajanje umnoženih mikrosatelitnih alela na temelju njihove veličine. Samo očitavanje veličine alela provedeno je pomoću računalnog programa GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems) (Slika 7.). Utvrđeno je da je lančana reakcija polimerazom nije bila uspješna kod jednog uzorka, te se stoga statističkoj obradi dobivenih podataka pristupilo sa 119 uzoraka. Za svih 119 uzoraka, veličine detektiranih alela na pripadajućim lokusima prikazane su u Prilogu 2.



Slika 7. Prikaz utvrđivanja veličine alela za četiri uzorka u računalnom programu GeneMapper 4.0, za lokuse SoUZ006, SoUZ007, SoUZ011 i SoUZ014. Sa X osi se očitava veličina pojedinog alela izražena kao broj parova baza. Vidljivo je da gornja tri uzorka imaju zajednički genotip, dok je naspram njim genotip donjeg, 4. uzorka, jedinstven.

2.6. Statistička obrada podataka

2.6.1. Utvrđivanje standardnih populacijsko-genetičkih vrijednosti

Za detekciju null-alela na svim umnoženim mikrosatelitnim lokusima korišten je računalni program MICRO-CHECKER v.2.2.3. Za izračunavanje populacijsko genetičkih parametara korišten je program GENEPOP 4.0 (Raymond and Rousset 1995). Izračunat je prosječan broj alela po lokusu (N_a), zapažena heterozigotnost (H_o), očekivana heterozigotnost (H_E) (Nei 1978) te koeficijent samooplodnje (F_{is}) (Wright 1931). Zapažena heterozigotnost predstavlja udio heterozigotnih jedinki u populaciji, očekivana heterozigotnost predstavlja vjerojatnost da nasumičnim odabirom odaberemo dva međusobno različita alela unutar jedne populacije, dok je koeficijent samooplodnje mjera za smanjenje heterozigotnosti u populaciji tj. on sugerira u kojoj mjeri je prisutno križanje između blisko srodnih jedinki.

Ishodišna matrica umnoženih mikrosatelitnih alela je upotrebljena za izradu matrice genske udaljenosti između genotipova na temelju udjela zajedničkih alela (Proportion of Shared Alleles Distance; D_{psa}), a pritom je korišten računalni program MICROSAT (Minch 1997). Nezakorijenjeno Neighbor-joining stablo (NJ) kao grafički prikaz stupnja genetske sličnosti između jedinki je generirano na temelju matrice D_{psa} .

2.6.2. Provjera vjerodostojnosti korištenih molekularnih biljega s obzirom na klonalnost istraživane vrste

Procijenjena je sposobnost seta molekularnih biljega da između klonova razluče jedinke jedinstvenih genotipova uz pretpostavku Hardy-Weinbergove ravnoteže (P_{gen}), odnosno odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže $P_{gen}(F_{is})$ (Arnaud-Haond i sur. 2007). S ciljem utvrđivanja vjerojatnosti da je pojava istog genotipa kod dviju uzorkovanih jedinki posljedica nezavisnih događaja spolnog razmnožavanja, a ne klonalnosti, izračunati su parametri P_{sex} (vjerojatnost klonalnog identiteta uz pretpostavku Hardy-Weinbergove ravnoteže), te $P_{sex}(F_{is})$ (vjerojatnost klonalnog identiteta uz pretpostavku odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže) (Arnaud-Haond i sur. 2007). Za izračunavanje ovih vrijednosti korišten je program GenClone 2.0. GenClone 2.0 je također korišten i za identifikaciju uzoraka istog multilokusnog genotipa te za izračunavanje klonalne raznolikosti.

2.6.3. Utvrđivanje populacijsko-genetičkih vrijednosti karakterističnih za djelomično klonalne vrste

Genotipsko bogatstvo (R) kao mjera klonalne raznolikosti računato je pomoću izraza:

$$R = \frac{(G - 1)}{(N - 1)}$$

gdje (G) predstavlja broj jedinstvenih multilokusnih genotipova, a (N) broj uzoraka (Dorken i Eckert 2001).

Preinačeni Simpsonov koeficijent raznolikosti (D^*) govori nam kolika je vjerojatnost da prilikom nasumičnog odabira dviju jedinki iz iste populacije one budu karakterizirane zasebnim genotipovima. Preinačeni Simpsonov koeficijent raznolikosti računa se prema

$$D^* = \frac{1}{\sum_{g=1}^G \frac{n_g(n_g-1)}{N(N-1)}}$$

gdje (n_g) predstavlja broj jedinki koje pripadaju klonu g , a (N) broj uzoraka.

Izračunat je i maksimalni klonalni raspon koji označava najveću zabilježenu udaljenost između dvije jedinke istog genotipa.

Računalnim programom BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet i Luikart 1996; Piry i sur. 1999) provjereno je ima li dokaza o nedavnoj pojavi genetičkog uskog grla u promatranoj populaciji tj. da li je populacija relativno nedavno doživjela značajnije smanjenje broja genotipova.

2.3.4. Laboratorijska oprema i pribor

Uređaji

- TissueLyser (QIAGEN)
- centrifuga MIKRO 200 (Hettich)
- vortex MSI minishaker
- analitička vaga (ACCULAB sartorius)
- nanofotometar P330 (IMPLEN)
- uređaj za *in vitro* amplifikaciju GeneAmp® PCR System 9700 (Applied biosystems)
- uređaj za kapilarnu elektroforezu ABI3730XL
- hladnjak
- UV lampa
- aparat za fotografiranje

Pribor

- pipete
- multikanalne pipete
- autoklavirani nastavci za pipetiranje različitih
- pločice za uzorke s 96 mjesta
- epruvete
- stalak za hlađenje
- stalak za gel
- kada za bojanje i ispiranje gela
- aluminijska folija
- zaštitne rukavice

3. Rezultati

Od 120 prikupljenih uzoraka, uspješna genotipizacija je provedena na njih 119, dok je lančana reakcija polimerazom bila neuspješna kod jednog uzorka.

3.1. Vjerodostojnost korištenih molekularnih biljega

Sve izračunate vrijednosti koje se odnose na 1) diskriminatornu snagu seta korištenih molekularnih biljega u razlučivanju jedinstvenih genotipova (P_{gen} i $P_{gen}(F_{is})$), odnosno 2) na vjerojatnost da identični genotipovi potječu iz različitih zigota (P_{sex} i $P_{sex}(F_{is})$), su manje od 0,01. Time je potvrđeno da bilo koji par jedinki sa utvrđenim identičnim genotipom najvjerojatnije pripada istom klonalnom organizmu (P_{gen} i $P_{gen}(F_{is})$), odnosno da bilo koja dva različita genotipa uistinu i potječu od različitih zigota (P_{sex} i $P_{sex}(F_{is})$) (Tablica 1.).

Tablica 1. Parametri koji prikazuju adekvatnost seta molekularnih biljega za istraživanje klonalne vrste

	Min	Max
P_{gen}	1.17×10^{-11}	1.34×10^{-6}
$P_{gen}(F_{is})$	-4.05×10^{-9}	2.49×10^{-6}
P_{sex}	1.39×10^{-9}	1.60×10^{-4}
$P_{sex}(F_{is})$	3.89×10^{-9}	2.96×10^{-4}

P_{gen} - sposobnost seta molekularnih biljega da između klonova razluče jedinke jedinstvenih genotipova uz pretpostavku Hardy-Weinbergove ravnoteže, $P_{gen}(F_{is})$ - sposobnost seta molekularnih biljega da između klonova razluče jedinke jedinstvenih genotipova uz pretpostavku Hardy-Weinbergove ravnoteže, P_{sex} - vjerovatnost klonalnog identiteta uz pretpostavku Hardy-Weinbergove ravnoteže, $P_{sex}(F_{is})$ - vjerojatnost klonalnog identiteta uz pretpostavku odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže

3.2. Rezultati genotipizacije temeljem osam umnoženih mikrosatelitnih lokusa

Između 119 prikupljenih uzoraka, utvrđena je prisutnost 36 genotipova. 14 genotipova je predstavljeno s po jednim uzorkom, dok je najzastupljeniji genotip bio predstavljen s ukupno 22 uzorka (Tablica 2.) .

Tablica 2. Odnos broja zabilježenih genotipova i uzorkovanih jedinki

Broj biljaka istog genotipa	Broj genotipova	Broj biljaka istog genotipa x broj genotipova
1	14	14
2	7	14
3	3	9
4	4	16
5	3	15
6	2	12
8	1	8
9	1	9
22	1	22
Ukupno	36	119

Vrijednost genotipskog bogatstva iznosila je relativno skromnih 0,297 i to zahvaljujući malom broju genotipova u odnosu na ukupan broj prikupljenih uzoraka (Tablica 3.). U slučaju kada unutar populacije ne bi bilo klonova, genotipsko bogatstvo iznosilo bi 1, odnosno 0 kada bi svi uzorci pripadali istom genotipu, tj. jednom klonalnom organizmu. Preinačeni Simpsonov koeficijent raznolikosti iznosio je 0,944 (Tablica 3.).

Tablica 3. Utvrđena razina klonalnosti istraživane populacije

max ng (%)	22 (18.48%)
R	0,297
D*	0,944

max ng (%) – maksimalna klonalna veličina (% uzoraka koji pripada najčešćem klonu), R – genotipsko bogatstvo D*- preinačeni Simpsonov koeficijent raznolikosti

Analizom osam polimorfnih mikrosatelitnih lokusa utvrđena je prisutnost 52 alela. Najveći broj alela zabilježen je na lokusu SoUZ006 (10 alela), najmanji broj na lokusu SoUZ002 (4 alela), dok je prosječan broj alela po lokusu bio 6,5 (Tablica 4.).

Uz izuzetak lokusa SoUZ004, zabilježene su visoke razine očekivane i opažene heterozigotnosti. Vrijednosti očekivane heterozigotnosti su u rasponu od 0,631 (SoUZ001) do 0,870 (SoUZ007), dok su vrijednosti opažene heterozigotnosti od 0,583 (SoUZ014) do 0,917 (SoUZ007). Najniže vrijednosti očekivane i opažene heterozigotnosti su zabilježene na lokusu SoUZ004, te iznose 0,403, odnosno 0,333 (Tablica 4.).

Koeficijent samooplodnje iznosi -0,014 te je statistički nesignifikantan, time sugerirajući da se populacija nalazi u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži, te da izraženije križanje u bliskom srodstvu nije prisutno (Tablica 4.).

Tablica 4. Osnovni populacijsko-genetički pokazatelji

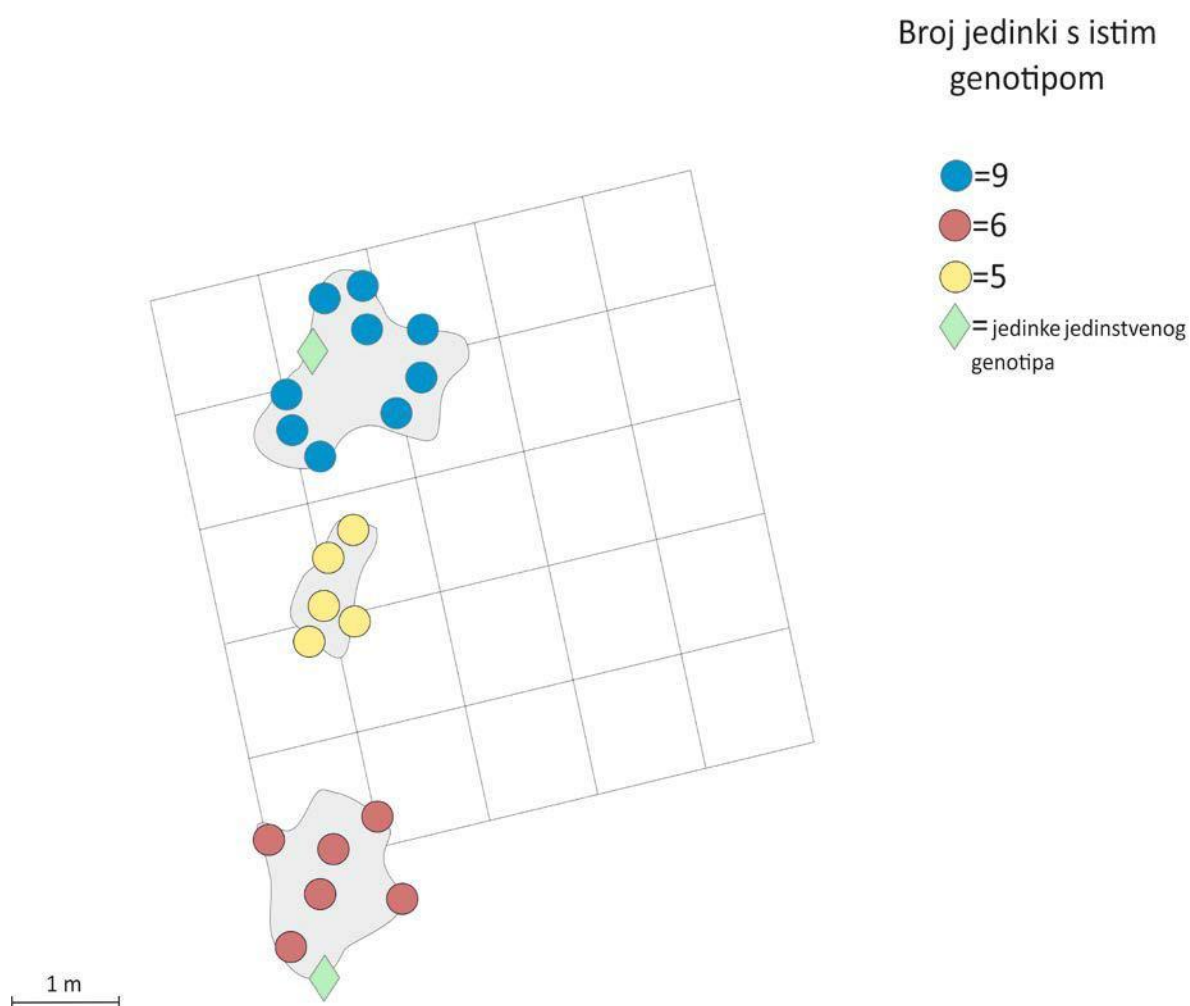
Lokus	N_a	H_o	H_E	F_{IS}
SoUZ001	6	0,639	0,631	-0,012
SoUZ002	4	0,750	0,652	-0,151
SoUZ004	5	0,333	0,403	0,172
SoUZ005	5	0,833	0,734	-0,135
SoUZ006	10	0,861	0,809	-0,065
SoUZ007	9	0,917	0,870	-0,053
SoUZ011	6	0,750	0,743	-0,010
SoUZ014	7	0,583	0,750	0,222
Ukupno	52	0,708	0,699	-0,014

N_a – broj alela, H_o – opažena heterozigotnost, H_E – očekivana heterozigotnost, F_{IS} – koeficijent samooplodnje

3.3. Prostorno genetička struktura populacije kratkozupčaste kadulje

Relativni položaji u prostoru svih uzorkovanih jedinki prikazani su Slikama 8., 9. i 10.. Prostorna genetička struktura opisuje prostornu raspodjelu genetičke raznolikosti, povezujući parametre populacijske-genetike s položajem jedinki u prostoru. S obzirom na visoke razine klonalnosti kod istraživane vrste, raspodjela genotipova pa tako i genetičke raznolikosti u prostoru nije homogena. Prosječna udaljenost između dva klonova iznosi 0,93 m, najmanja zabilježena udaljenost je 0,19 m. Zanimljivo je da najveći zabilježeni klonalni domet iznosi 11,62 m i proteže se kroz dvije plohe uzorkovanja (plohe 4 i 5), te da tom genotipu pripada ujedno i najveći zabilježeni broj klonova, njih 22. GPS prostorne koordinate za pojedine uzorke prikazane su u Prilogu 3.

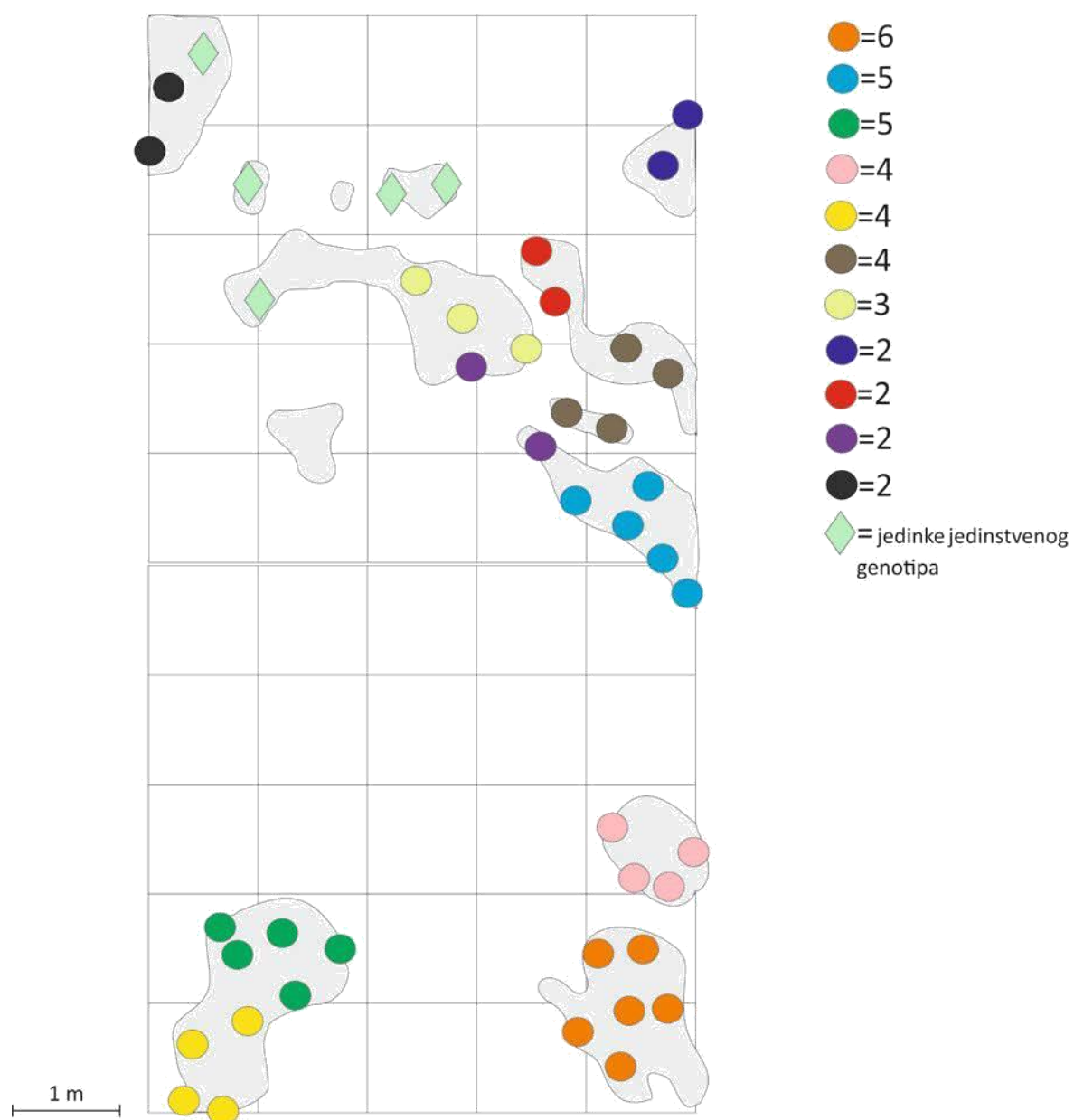
Ploha 1.



Slika 8. Prostorni raspored uzorkovanih jedinki s obzirom na genotipsku pripadnost na plohi 1.

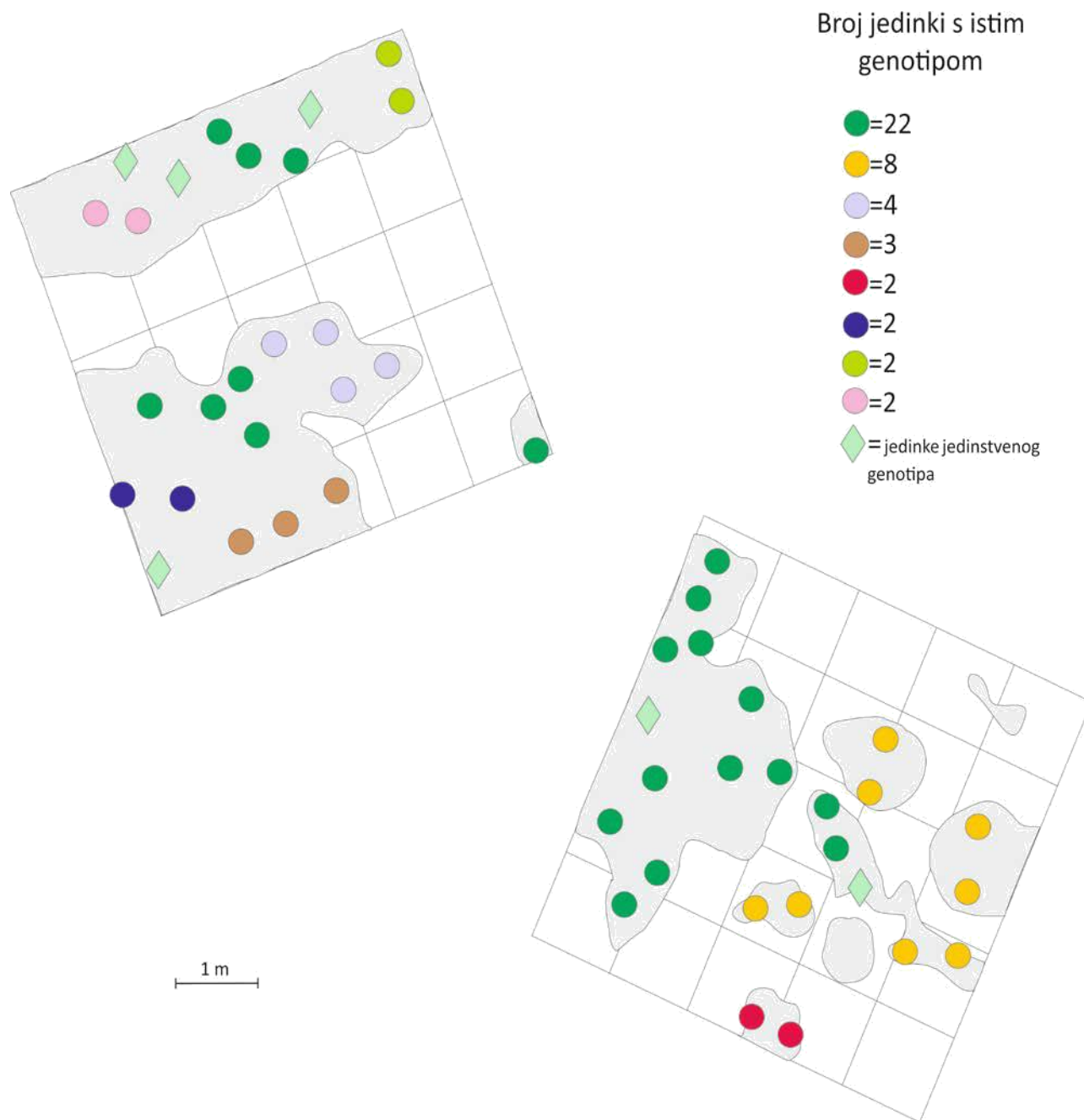
Plohe 2. i 3.

Broj jedinki s istim
genotipom



Slika 9. Prostorni raspored uzrokovanih jedinki s obzirom na genotipsku pripadnost na plohama 2 i 3.

Plohe 4. i 5.



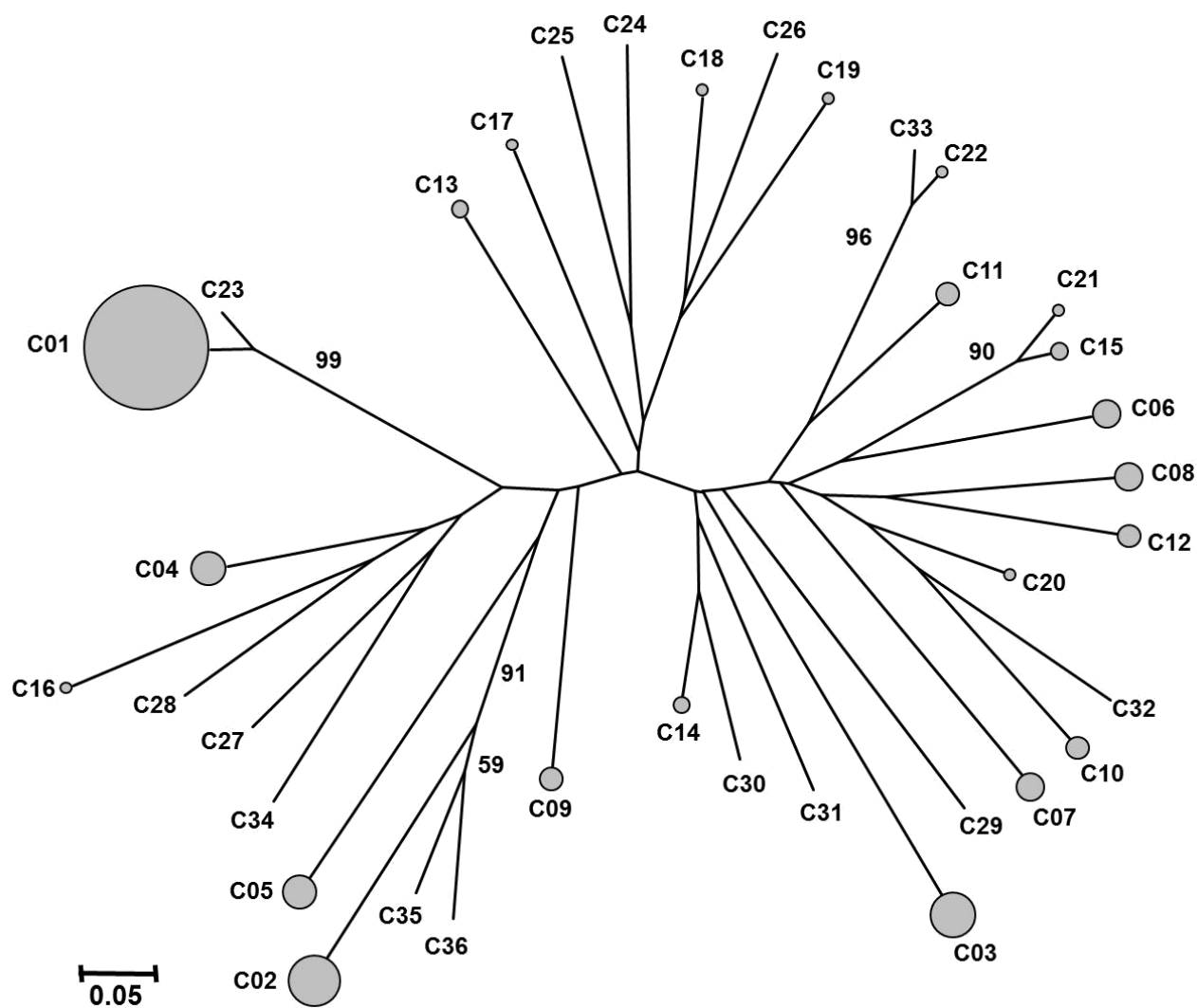
Slika 10. Prostorni raspored uzrokovanih jedinki s obzirom na genotipsku pripadnost na plohama 4 i 5.

3.4. Utvrđivanje prolaska istraživane populacije kroz genetičko usko grlo

Nedavno značajno i naglo smanjenje veličine populacije koje bi se prepoznalo kao genetičko usko grlo, nije zabilježeno. Genetička struktura populacije nakon prolaska kroz genetičko usko grlo istovjetna je genetičkoj strukturi preživjelih jedinki, u populaciji su prisutni aleli koji su prije bili zastupljeni u visokim frekvencija, to jest dolazi do nestanka rijetkih alela. U populacijskoj genetici efekt genetičkog uskog grla u analizi mikrosatelitnih biljega može se utvrditi pomoću tri teorijska modela kojima se opisuju mutacije mikrosatelitnih lokusa. To su model beskonačnog broja alela (*Infinite Allele Model, IAM*) (Kimura i Crow, 1964), model postupnih mutacija (*Stepwise Mutation Model, SMM*) (Ohta i Kimura 1973) i dvofazni model (*Two-Phase Model, TPM*) (Di Rienzo i sur. 1994). Od navedenih modela, samo se dvofazni model smatra prikladnim kada se provodi analiza mikrosatelitnim biljezima (Di Rienzo i sur. 1994). Za istraživanu populaciju kratkozupčaste kadulje, vrijednost dobivena primjenom dvofaznog modela je statistički nesignifikantna, te iznosi 0,230.

3.5. Utvrđivanje srodstvenih odnosa na unutar-populacijskoj razini

Iz nezakorijenjenog NJ stabla (Slika 11.) je vidljivo da značajnije diferencijacije pojedinog genotipa ili skupine genotipova unutar populacije nema, što je i razumljivo uzevši u obzir da se radi o relativno maloj populaciji smještenoj na jako ograničenom prostoru. Stoga lako možemo pretpostaviti da je gotovo ista vjerojatnost oprašivanja bilo koje jedinke polenom s bilo koje druge jedinke unutar populacije.



Slika 11. Prikaz nezakorijenjenog Neighbor-joining stabla gdje su oznakama C1 do C36 označeni jedinstveni genotipovi.

4. Rasprava

Rod *Salvia* je poznat po specifičnim mehanizmima oprašivanja koji su se tijekom evolucije razvili ciljano za pojedine oprašivače, najčešće kukce (Claßen-Bockhoff i sur. 2004). Upravo zbog toga je slučaj kratkozupčaste kadulje, za koju na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da se odmiče od entomofilije prema klonalnom razmnožavanju, tim zanimljiviji. Na temelju provedenog istraživanja je nemoguće utvrditi uzroke ove pojave, ali utvrđivanje prostorno genetičke strukture najveće populacije kratkozupčaste kadulje svakako predstavlja dobru osnovu za buduća istraživanja koja bi se bavila ovim fenomenom. Genotipiziranje provedeno na uzorku od 119 jedinki populacije kratkozupčaste kadulje sa poluotoka Pelješaca je potvrdilo djelomičnu klonalnost ove vrste. Dobiveni rezultati nedvosmisleno potvrđuju da je kod istraživane vrste klonalno razmnožavanje ne samo prisutno, već i dominantno u odnosu na seksualno razmnožavanje, čime su potvrđene pretpostavke iz ranijih istraživanja (Radosavljević i sur. 2015a). Do ovakvog zaključka dolazimo na temelju detekcije tek manjeg broja jedinki koje su bile jedinstvenog genotipa, a i ovakav nalaz je gotovo sigurno posljedica strategije uzorkovanja, te ne odražava pravo stanje stvari. Da je uzorkovanje bilo opsežnije, tj. da je sa jedinice površine prikupljen veći broj uzoraka, vrlo vjerojatno bi se konstatalo da su i ove jedinice jedinstvenih genotipova zapravo sastavni dio većih klonalnih kolonija.

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da ovu populaciju karakterizira prilično visoka razina genetičke raznolikosti, što je donekle iznenađujuće uzme li u obzir endemičnost i iznimno malo područje rasprostranjenosti ove vrste. Za usko endemične vrste je uvriježeno mišljenje da osim što su geografski izolirane, ujedno su i karakterizirane niskim razinama genetičke raznolikosti, a zahvaljujući čemu su izložene povećanom riziku od izumiranja (Lavergne i sur. 2004). Međutim, kratkozupčasta kadulja je klonalna vrsta, a to pozitivno utječe na njenu genetičku raznolikost. Kod tipičnih stranooplodnih vrsta, dva suprotstavljena mehanizma utječu na razinu genetičke raznolikosti u promatranoj populaciji: genski pomak i mutacije. I dok novi aleli/geni nastaju mutacijama u spolnim stanicama te se tako prenose na sljedeću generaciju, zahvaljujući genskom pomaku, istovremeno se iz generacije u generaciju i gube. Paralelno s mutacijama u spolnim stanicama, dešavaju se i mutacije u somatskim stanicama, no one ostaju specifične za jedinku u kojoj su se dogodile i ne prenose se na sljedeću generaciju te su u populacijsko genetičkom smislu, nevažne (Klekowski 1997, de Witte i Stocklin 2010).

Međutim, kod klonalnog razmnožavanja, situacija se bitno razlikuje. Izostanak spolnog razmnožavanja ujedno znači i izostanak generacija kao i spolnih stanica koje bi novonastale mutacije prenijele na potomstvo, ali i izostanak genskog pomaka. Istovremeno, klonalno razmnožavanje osigurava da će dio somatskih mutacija ostati trajno sačuvan kod novonastalih jedinki klonalne kolonije, a s vremenom će se takve mutacije i dodatno akumulirati (Balloux i sur. 2003, Gross i sur. 2012).

Zbog požara koji je 1998. godine opustošio lokalitet na kojem se istraživana populacija kratkozupčaste kadulje nalazi, pretpostavljalo se da je populacija doživjela značajno smanjenje svoje veličine u odnosu na period prije požara, tj. da je prošla kroz genetičko usko grlo. Ipak, dobiveni rezultati ne sugeriraju takvo što, te se čini da je ova populacija preživjela požar bez ozbiljnijih posljedica. Dva su moguća objašnjenja ovakve situacije. 1) Imajući na umu da je *S. brachyodon* klonalna vrsta koja se dominantno razmnožava vegetativno pomoću podzemnih stolona, može se pretpostaviti da su u požaru nastradali samo nadzemni dijelovi biljke, dok su oni pod zemljom ostali zaštićeni. Poslije požara, iz podzemnih stolona su se jednostavno razvili novi izdanci te je time populacija preživjela požar bez i najmanjeg narušavanja stanja prije požara, kao što je slučaj i kod mnogih drugih biljnih vrsta Mediteranskog područja (Naveh 1975). 2) Mnoge biljne vrste Mediterana tvore u tlu tzv. banku sjemena (Naveh 1975). S obzirom da su za klijanje sjemena i preživljavanje klijanaca potrebni specifični okolišni uvjeti koji u već formiranim biljnim zajednicama često nisu niti prisutni (kao npr. golo tlo bez zasjene), iz generacije u generaciju u tlu oko razvijenih biljaka se nakupljaju sjemenke koje ne kliju dok uvjeti ne postanu povoljni. I upravo nekontrolirani požari, koji uklanjaju svu nadzemnu vegetaciju, omogućavaju stvaranje povoljnih uvjeta za klijanje sjemena te općenito imaju vrlo važnu ulogu u preživljavanju brojnih vrsta u ekosustavima Mediteranskog tipa (Naveh 1975, Keeley 1977, Ne'eman 1999, Pausas i sur. 2008). Uzevši u obzir dobivene rezultate koji u istraživanoj populaciji otkrivaju prisutnost većeg broja velikih klonalnih kolonija kojima je vrlo vjerojatno trebao bitno dulji vremenski period za rast do današnjih dimenzija od perioda proteklog od požara, možemo pretpostaviti da je prvo ponuđeno objašnjenje izglednije.

Provedena populacijsko-genetička analiza sugerira da populacija kratkozupčaste kadulje na poluotoku Pelješcu nije genetski osiromašena, pa stoga i nije u neposrednoj opasnosti od izumiranja. Ipak, kada govorimo o eventualnim konzervacijskim aktivnostima kojima bi se zaštitila ova, ali i druge vrste na sličnom tipu staništa otvorenog tipa, posebnu pažnju bi trebalo usmjeriti upravo na zaštitu samih staništa, a koja su nerijetko izložena izraženim rizicima. U prošlosti, staništa otvorenog tipa na području Mediterana su bila održavana

zahvaljujući agro-pastoralnom sustavu baziranom na stočarstvu, poljoprivredi i krčenju šuma, a kojeg su njegovale zajednice lokalnog stanovništva (Blondel 2006). U moderno vrijeme, s razvojem turizma dolazi do napuštanja agro-pastoralnog sustava, što za posljedicu ima postupno zaraštavanje ovog tipa staništa (Medail i Quezel 1999). Sa nestankom staništa otvorenoga tipa, nestaju i vegetacijske zajednice i vrste koje su za njega vezane, a kratkozupčasta kadulja je zasigurno jedna od njih.

Provedenim istraživanjem došlo se do vrijednih spoznaja ne samo o populacijsko- i prostorno-genetičkoj strukturi istraživane populacije, već i do boljeg općenitog razumijevanja ove vrste. Male i izolirane populacije izložene su izraženim rizicima kao što su križanje u bliskom srodstvu i izostanak protoka gena na među-populacijskoj razini, a što za posljedicu ima smanjenje genske raznolikosti, a time i smanjenje mogućnosti prilagodbe populacije na izmijenjene okolišne čimbenike (Gitzendanner i Soltis 2000, Honnay i sur. 2007, Hoffmann i Sgro 2011, Hylander i Ehrlén 2013 i drugi). No bitno je uočiti da su svi navedeni, za populaciju potencijalno pogubni procesi, bazirani na spolnom razmnožavanju. Imajući to na umu, dolazimo do zaključka da time što sprječava gubitak genske raznolikosti, izraženo klonalno razmnožavanje koje je ovim istraživanjem potvrđeno kod kratkozupčaste kadulje, značajno pridonosi otpornosti ove vrste prema rizicima koji proizlaze iz činjenice da se radi o usko endemičnoj vrsti sa samo tri male i geografski izolirane populacije. Iako se čini da Pelješka populacija *S. brachyodon* nije neposredno ugrožena, posebnu pažnju bi trebalo usmjeriti na očuvanje specifičnog staništa na kojemu ona raste. Također, radi stjecanja uvida u genetičku strukturu vrste u cjelini, nužno bi bilo provesti uzorkovanje i populacijsko-genetičku analizu i preostale dvije manje populacije.

5. Zaključci

- upotrebom osam mikrosatelitnih molekularnih biljega provedena je populacijsko-genetička analiza na 119 prikupljenih uzoraka vrste *Salvia brachyodon* sa Pelješkog poluotoka, pri čemu je potvrđena prisutnost klonalnog razmnožavanja kod ove vrste
- izražena klonalnost značajno utječe na prostorno-genetičku strukturu istraživane populacije, pa je tako za najveća klonalnu koloniju zabilježen raspon od čak 11,62 metara, dok je svega 14 uzoraka bilo jedinstvenog genotipa
- zahvaljujući izraženom klonalnom razmnožavanju, a usprkos geografskoj izoliranosti, ova populacija je uspjela zadržati visoke razine heterozigornosti i genske raznolikosti
- požar koji je prije 18 godina opustošio lokalitet na kojem se populacija nalazi nije značajnije utjecao na populaciju tj. nije uzrokovao osiromašenje njezine genske raznolikosti kroz fenomen populacijskog uskog grla
- iako se čini da istraživana populacija nije neposredno ugrožena, pažnju je potrebno usmjeriti na zaštitu staništa ove vrste kojem prijeti zaraštavanje od strane drvenastih vrsta tj. ekološka sukcesija

6. Literatura

Abadžić S., Šilić Č. (1982): Horologija, ekologija i fitosociološka pripadnost vrste *Salvia brachyodon* Vandas u flori Jugoslavije. Glasnik Republičkog Zavoda za Zaštitu prirode i Prirodnjačkog muzja u Titogradu 15: 125-131.

Arnaud-Haond S., Duarte C. M., Alberto F., Serrao E. A. (2007): Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology* 16: 5115-39.

Balloux F., Lehmann L., de Meeus T. (2003): The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics* 164: 1635-1644.

Barbalić L. (1956): Prilog poznavanju vrste *Salvia brachyodon* Vandas. *Biološki glasnik* 9: 5-10.

Bellard C., Bertelsmeier C., Leadley P., Thuiller W., Courchamp F. (2012): Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology Letters* 15: 365-377.

Blondel J. (2006): The 'design' of Mediterranean landscapes: a millennial story of humans and ecological systems during the historic period. *Human Ecology* 34: 713-729.

Breed M. F., Stead M. G., Ottewell K. M., Gardner M. G., Lowe A. J. (2012) : Which provenance and where? Seed sourcing strategies for revegetation in a changing environment. *Conservation Genetics* 14: 1-10.

Claßen-Bockhoff R., Speck T., Tweraser E., Wester P., Thimm S., Reith M. (2004): The staminal lever mechanism in *Salvia* L. (Lamiaceae): a key innovation for adaptive radiation? *Organisms, Diversity & Evolution* 4: 189-205.

Chien A., Edgar D. B., Trela J. M. (1976): Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, 127: 1550-1557.

Cornuet J. M., Luikart G. (1996): Description and Power Analysis of Two Tests for Detecting Recent Population Bottlenecks From Allele Frequency Data. *Genetics*, 144: 2001-2014.

Demauro M. M. (1993): Relationship of breeding system to rarity in the lakeside daisy (*Hymenoxys acaulis* var. *glabra*). *Conservation Biology* 7: 542-550.

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 of the USA*, 91: 3166-3170.

Dorken M. E., Eckert C. G. (2001): Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (*Lythraceae*). *Journal of Ecology* 89: 339-350.

Frankham R., Bradshaw C. J. A., Brook B. W. (2014) : Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation* 170: 56-63.

Gitzendanner M. A., Soltis P. S. (2000) : Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany* 87: 783-792.

Gitzendanner M. A., Weekley C. W., Germain-Aubrey C. C., Soltis D. E., Soltis P. S. (2012): Microsatellite evidence for high clonality and limited genetic diversity in *Ziziphus celata* (*Rhamnaceae*), an endangered, self-incompatible shrub endemic to the Lake Wales Ridge, Florida, USA. *Conservation Genetics* 13: 223-234.

Greguraš D. (2013): Genetička raznolikost i struktura populacija ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.), doktorska disertacija.

Gross C. L., Nelson P. A., Haddadchi A., Fatemi M. (2012): Somatic mutations contribute to genotypic diversity in sterile and fertile populations of the threatened shrub, *Grevillea rhizomatosa* (*Proteaceae*). *Annals of Botany* 109: 331-342.

Hedge I. C. (1972): *Salvia*. U: Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A. (ur.) *Flora Europaea*, Vol. 3. Cambridge, Cambridge University Press, str. 188-192.

Hedrick P. W. (2004): Recent developments in conservation genetics. *Forest Ecology and Management* 197: 3-19.

Hoffmann A. A., Sgro C. M. (2011): Climate change and evolutionary adaptation. *Nature* 470: 479-485.

Honnay O., Adriaens D., Coart E., Jacquemyn H., Roldan-Ruiz I. (2007): Genetic diversity within and between remnant populations of the endangered calcareous grassland plant *Globularia bisnagarica* L. *Conservation Genetics* 8: 293-303.

Hylander K., Ehrlen J. (2013): The mechanisms causing extinction debts. *Trends in Ecology & Evolution* 28: 341-346.

Keeley J. E. (1977): Seed production, seed populations in soil, and seedling production after fire for two congeneric pairs of sprouting and nonsprouting chaparral shrubs. *Ecology* 58: 820-829.

Kimura M., Crow J.F. (1964): The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.

Klekowski E. J. (1997): Somatic mutation theory of clonality. U: De Kroon H, Van Groenendael J. (ur.) *The ecology and evolution of clonal plants*. Leiden, Backhuys Publishers, str. 227-241.

Lavergne S., Thompson J. D., Garnier M., Debussche M. (2004): The biology and ecology of narrow endemic and wide spread plants: a comparative study of trait variation in 20 congeneric pairs. *OIKOS* 107: 505-518.

Maksimović M., Vidic D., Miloš M., Šolić M. E., 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: 473-478.

Médail F., Quézel P. (1999): Biodiversity hotspots in the Mediterranean basin: Setting global conservation priorities. *Conservation Biology* 3: 1510-1513.

Miah G., Rafii M. Y., Ismail M. R., Puteh A. B., Rahim H. A., Islam Kh. N., Latif M. A. (2013): A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 22499-22528.

Minch E., Ruiz-Linares A., Goldstein D., Feldman M., Cavalli-Sforza L. L. (1997): MICROSAT: a computer program for calculating various statistics on microsatellite allele data, ver. 1.5d. Stanford University, Stanford, CA (hpgl.stanford.edu/projects/microsat)

Naveh Z. (1975): The evolutionary significance of fire in the Mediterranean region. *Vegetatio* 29: 199-208.

Ne'eman G., Dafni A. (1999): Fire bees and seed production in a Mediterranean key species *Salvia fruticosa* (Lamiaceae). *Israel Journal of Plant Sciences* 47: 157-163.

Nei M. (1978): Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.

Ohta T., Kimura M. (1973): A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetics Research* 22: 201-204.

Pausas J. G., Llovet J., Rodrigo A., Vallejo R. (2008): Are wildfires a disaster in the Mediterranean basin? – A review. *International Journal of Wildland Fire* 17: 713-723.

Piry S., Cornuet J. M., Luikart G. (1999): Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *Journal of Heredity* 90: 502-503.

Radosavljević I., Šatović 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 Science 13: 12082-12093.

Radosavljević I., Šatović Z., Liber Z. (2015a): Causes and consequences of contrasting genetic structure in sympatrically growing and closely related species. AoB PLANTS 7: plv106.

Radosavljević I., Šatović Z., Liber Z. (2015b): Microsatellite evidence for high clonality in narrow endemic and endangered *Salvia brachyodon* (Lamiaceae). U: Klobučar G., Kopjar N., Gligora Udovič M., Lukša Ž., Jelić D. (ur.) Book of abstracts of the 12th Croatian Biological Congress. Hrvatsko biološko društvo, str. 55-54.

Raymond M., Rousset F. (1995): GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. Journal of Heredity 86: 248-249.

Schochetman G., Ou C. Y., Jones W. K. (1988): Polymerase Chain Reaction. The Journal of Infectious Diseases 158: 1154-1157.

Soković M., Grubišić D., Ristić M. (2005) : Chemical composition and antifungal activities of essential oils from leaves, calyx and corolla of *Salvia brachyodon* Vandas. Journal of Essential Oil Research 17: 227-229.

Southern E. M. (1980): Measurement of DNA length by gel electrophoresis. Analytical Biochemistry 100: 319-323.

Šatović Z. (1999): Genetički biljezi i njihova uporaba u biljnoj genetici, oplemenjivanju i sjemenarstvu. Sjemenarstvo 16: 73-95.

Šilić Č. (1984): Endemične biljke, Svjetlost, OOUR Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Sarajevo – Zavod za udžbenike.

Tecic D. L., McBride J. L., Bowles M. L., Nickrent D. L. (1998): Genetic variability in the federal threatened Mead's milkweed, *Asclepias meadii* Torrey (*Asclepiadaceae*), as determined by allozyme electrophoresis. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85: 97-109.

Trinajstić I. (1986): Šume dalmatinskog crnog bora - *Pinus nigra* Arnold ssp. *dalmatica* (Vis) Franco – sredozemnog područja Hrvatske. *Poljoprivreda i šumarstvo* 32: 37-48.

Vandas K. (1899): Beitrage zur Kenntnis der Flora von Sud-Hercegovina. *Osterreich Botanische Zeitschrift* 39: 178-181.

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. *American Journal of Botany* 91: 1115-1125.

de Witte L. C., Stocklin J. (2010): Longevity of clonal plants: why it matters and how to measure it. *Annals of Botany* 106: 859-870.

Wright S. (1931): Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.

Zaya D. N., Molano-Flores B., Feist M. A., Koontz J. A., Coons J. (2017): Assessing genetic diversity for the USA endemic carnivorous plant *Pinguicula ionantha* R.K. Godfrey (Lentibulariaceae). *Conservation Genetics* 18:171-180.

7. Prilozi

Prilog 1. Izmjerene koncentracije DNA i korišteni volumeni vode i izolirane DNA za dobivanje otopine DNA prikladne koncentracije za lančanu reakciju polimerazom.

Prilog 2. Prikaz veličina alela mikrosatelitnih lokusa 119 uzoraka kratkozupčaste kadulje za poluotoka Pelješac

Prilog 3. Popis uzoraka s pripadajućim geografskim koordinatama i oznakama ploha uzrokovanja, te oznakom genotipske pripadnosti

Prilog 1. Izmjerene koncentracije DNA i korišteni volumeni vode i izolirane DNA za dobivanje otopine DNA prikladne koncentracije za lančanu reakciju polimerazom.

uzorka	Konc. (ng/ μ L)	DNA	voda	uzorka	Konc. (ng/ μ L)	DNA	voda	uzorka	Konc. (ng/ μ L)	DNA	voda
1	11,8	8,5	91,5	39	12,3	8,1	91,9	84	14,0	7,1	92,9
2	10,0	10,0	90,0	40	10,2	9,8	90,2	85	12,3	8,1	91,9
3	9,0	11,1	88,9	41	13,5	7,4	92,6	86	19,2	5,2	94,8
4	14,2	7,0	93,0	42	16,0	6,3	93,8	87	14,0	7,1	92,9
5	10,0	10,0	90,0	43	11,8	8,5	91,5	88	12,5	8,0	92,0
6	9,5	10,5	89,5	44	10,3	9,7	90,3	89	16,3	6,1	93,9
7	7,8	12,8	87,2	45	10,5	9,5	90,5	90	17,0	5,9	94,1
8	6,5	15,4	84,6	46	13,3	7,5	92,5	91	16,8	6,0	94,0
9	10,3	9,7	90,3	47	15,5	6,5	93,5	92	11,8	8,5	91,5
10	7,8	12,8	87,2	48	15,2	6,6	93,4	93	10,8	9,3	90,7
11	21,5	4,7	95,3	49	11,0	9,1	90,9	94	21,5	4,7	95,3
12	11,0	9,1	90,9	50	14,5	6,9	93,1	95	14,0	7,1	92,9
13	11,5	8,7	91,3	51	14,3	7,0	93,0	96	12,5	8,0	92,0
14	13,5	7,4	92,6	52	11,5	8,7	91,3	97	17,3	5,8	94,2
15	15,8	6,3	93,7	53	12,0	8,3	91,7	98	13,3	7,5	92,5
16	12,5	8,0	92,0	54	13,8	7,2	92,8	99	10,8	9,3	90,7
17	7,5	13,3	86,7	55	15,0	6,7	93,3	100	18,2	5,5	94,5
18	13,3	7,5	92,5	56	11,5	8,7	91,3	101	15,5	6,5	93,5
19	14,3	7,0	93,0	57	12,3	8,1	91,9	102	15,3	6,5	93,5
20	11,0	9,1	90,9	58	9,5	10,5	89,5	103	10,5	9,5	90,5
21	12,5	8,0	92,0	59	8,5	11,8	88,2	104	11,2	8,9	91,1
22	11,2	8,9	91,1	60	10,3	9,7	90,3	105	19,0	5,3	94,7
23	12,3	8,1	91,9	61	12,8	7,8	92,2	106	12,3	8,1	91,9
24	9,2	10,9	89,1	62	8,2	12,2	87,8	107	13,5	7,4	92,6
25	8,7	11,5	88,5	63	13,0	7,7	92,3	108	12,5	8,0	92,0
26	12,0	8,3	91,7	64	14,0	7,1	92,9	109	14,5	6,9	93,1
27	7,7	13,0	87,0	65	10,0	10,0	90,0	110	8,2	12,2	87,8
28	7,7	13,0	87,0	66	15,0	6,7	93,3	111	13,0	7,7	92,3
29	6,5	15,4	84,6	67	8,7	11,5	88,5	112	8,5	11,8	88,2
30	8,2	12,2	87,8	68	13,5	7,4	92,6	113	11,0	9,1	90,9
31	6,7	14,9	85,1	69	18,0	5,6	94,4	114	15,3	6,5	93,5
32	10,8	9,3	90,7	70	13,5	7,4	92,6	115	11,8	8,5	91,5
33	11,2	8,9	91,1	71	14,0	7,1	92,9	116	13,5	7,4	92,6
34	12,5	8,0	92,0	72	9,7	10,3	89,7	117	14,3	7,0	93,0
35	14,3	7,0	93,0	73	17,3	5,8	94,2	118	17,8	5,6	94,4
36	12,8	7,8	92,2	73a	17,0	5,9	94,1	119	14,0	7,1	92,9
37	10,5	9,5	90,5	74	11,2	8,9	91,1	120	8,2	12,2	87,8
38	10,3	9,7	90,3	75	11,5	8,7	91,3				
39	12,3	8,1	91,9	76	9,5	10,5	89,5				
40	10,2	9,8	90,2	77	10,0	10,0	90,0				
41	13,5	7,4	92,6	78	13,5	7,4	92,6				
42	16,0	6,3	93,8	79	11,8	8,5	91,5				
43	11,8	8,5	91,5	80	14,0	7,1	92,9				
44	10,3	9,7	90,3	81	19,2	5,2	94,8				
45	10,5	9,5	90,5	82	28,0	3,6	96,4				
46	13,3	7,5	92,5	83	23,0	4,3	95,7				

Prilog 2. Prikaz veličina alela mikrosatelitnih lokusa 119 uzoraka kratkozupčaste kadulje za poluotoka Pelješac

	SoUZ001		SoUZ002		SoUZ005		SoUZ004		SoUZ011		SoUZ006		SoUZ014		SoUZ007	
1	139	153	173	195	108	110	184	184	220	220	215	215	180	198	203	205
2	139	153	173	195	108	110	184	184	220	220	215	215	180	198	203	205
3	139	153	173	195	108	110	184	184	220	220	215	215	180	198	203	205
4	139	157	175	195	108	110	184	192	220	220	187	215	180	198	201	205
5	139	153	173	195	108	110	184	184	220	220	215	215	180	198	203	205
6	139	153	173	195	108	110	184	184	220	220	215	215	180	198	203	205
7	139	153	173	195	108	110	184	184	220	220	215	215	180	198	203	205
8	139	153	173	195	108	110	184	184	220	220	215	215	180	198	203	205
9	139	153	173	195	108	110	184	184	220	220	215	215	180	198	203	205
10	139	153	173	195	108	110	184	184	220	220	215	215	180	198	203	205
11	139	139	173	173	108	108	192	192	210	220	199	203	174	180	205	213
12	139	139	173	173	108	108	192	192	210	220	199	203	174	180	205	213
13	139	139	173	173	108	108	192	192	210	220	199	203	174	180	205	213
14	139	139	173	173	108	108	192	192	210	220	199	203	174	180	205	213
15	139	139	173	173	108	108	192	192	210	220	199	203	174	180	205	213
16	153	157	175	177	106	110	192	192	220	228	187	201	180	180	195	201
17	153	157	175	177	106	110	192	192	220	228	187	201	180	180	195	201
18	153	157	175	177	106	110	192	192	220	228	187	201	180	180	195	201
19	153	157	175	177	106	110	192	192	220	228	187	201	180	180	195	201
20	153	157	175	177	106	110	192	192	220	228	187	201	180	180	195	201
21	139	153	175	195	106	108	184	192	220	220	187	215	180	198	195	205
22	153	157	175	177	106	110	192	192	220	228	187	201	180	180	195	201
23	153	153	173	173	106	110	192	192	214	220	195	203	174	174	203	213
24	153	153	173	173	106	110	192	192	214	220	195	203	174	174	203	213
25	153	153	173	173	106	110	192	192	214	220	195	203	174	174	203	213
26	153	153	173	173	106	110	192	192	214	220	195	203	174	174	203	213
27	153	153	173	173	106	110	192	192	214	220	195	203	174	174	203	213
28	139	153	173	173	108	108	192	196	210	220	195	199	174	195	203	213
29	139	153	173	173	108	108	192	196	210	220	195	199	174	195	203	213
30	139	153	173	173	108	108	192	196	210	220	195	199	174	195	203	213
31	139	153	173	173	108	108	192	196	210	220	195	199	174	195	203	213
32	139	139	175	177	106	108	192	194	210	220	187	203	198	198	195	201
33	139	139	175	177	106	108	192	194	210	220	187	203	198	198	195	201

34	139	139	175	177	108	108	194	194	220	220	187	215	174	198	201	201
35	139	139	175	177	106	108	192	194	210	220	187	203	198	198	195	201
36	139	139	175	177	106	108	192	194	210	220	187	203	198	198	195	201
37	139	139	175	177	106	108	192	194	210	220	187	203	198	198	195	201
38	139	139	175	177	106	108	192	194	210	220	187	203	198	198	195	201
39	139	153	173	177	108	110	192	194	210	220	187	215	174	174	197	213
40	139	153	173	177	108	110	192	194	210	220	187	215	174	174	197	213
41	139	153	173	177	108	110	192	194	210	220	187	215	174	174	197	213
42	139	153	173	177	108	110	192	194	210	220	187	215	174	174	197	213
43	139	153	177	195	108	108	192	192	218	220	187	199	174	174	201	213
44	139	153	177	195	108	108	192	192	218	220	187	199	174	174	201	213
45	153	153	173	177	108	110	192	192	210	218	189	215	174	174	197	203
46	153	157	173	177	108	110	192	192	210	218	189	215	174	174	197	203
47	153	157	173	177	108	110	192	192	210	218	189	215	174	174	197	203
48	139	139	173	173	108	110	192	192	218	218	189	199	174	174	197	213
49	157	157	173	177	106	108	192	192	210	220	187	215	174	180	195	203
50	139	139	173	177	106	108	192	192	210	220	187	187	180	198	201	201
51	139	139	173	175	108	110	192	192	210	210	203	215	174	201	201	207
52	139	153	173	177	108	108	192	192	210	214	195	197	174	174	201	213
53	139	153	173	177	108	108	192	192	210	214	195	197	174	174	201	213
54	139	153	173	177	108	108	192	192	210	214	195	197	174	174	213	213
55	139	153	173	177	108	108	192	192	210	214	195	197	174	174	201	213
56	139	153	173	177	108	108	192	192	210	214	195	197	174	174	213	213
57	139	153	177	195	108	108	192	192	218	220	187	199	174	174	201	213
58	139	153	177	195	108	108	192	192	218	220	187	199	174	174	201	213
59	139	153	177	195	108	108	192	192	218	220	187	199	174	174	201	213
60	139	155	173	173	106	108	192	192	210	218	197	199	174	177	197	213
61	139	155	173	173	106	108	192	192	210	218	197	199	174	177	197	213
62	139	153	173	173	106	108	192	192	210	220	187	197	174	198	197	213
63	139	153	173	173	106	108	192	192	210	220	187	197	174	198	197	213
64	139	155	173	173	106	108	192	192	210	218	197	199	174	177	197	213
65	139	155	173	173	106	108	192	192	210	218	197	199	174	177	197	213
66	139	153	173	177	106	108	192	192	210	220	187	187	174	180	201	213
67	139	153	173	177	106	108	192	192	210	220	187	187	174	180	201	213
68	139	153	173	177	106	108	192	192	210	220	187	187	174	180	201	213
69	139	153	173	175	108	114	192	192	210	210	195	195	195	198	195	203
70	139	153	173	175	108	114	192	192	210	210	195	195	195	198	195	203
71	139	139	175	177	106	114	192	194	220	220	187	211	198	198	199	203
72	139	139	177	177	108	112	192	194	220	220	187	215	198	198	213	223
73	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
74	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
75	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
76	153	155	173	175	106	114	192	192	210	214	187	195	195	204	199	203

77	139	159	173	175	110	114	192	192	210	214	187	195	195	198	203	223
78	139	159	173	175	110	114	192	192	210	214	187	195	195	198	203	223
79	139	139	173	177	106	114	192	192	214	220	187	215	180	195	199	203
80	139	139	173	177	106	114	192	192	214	220	187	215	180	195	199	203
81	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
82	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
83	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
84	139	139	173	177	106	114	192	192	214	220	187	215	180	195	199	203
85	139	139	173	177	106	114	192	192	214	220	187	215	180	195	199	203
86	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
87	139	157	173	177	110	114	192	192	214	218	187	189	174	198	197	223
88	139	157	173	177	110	114	192	192	214	218	187	189	174	198	197	223
89	139	155	173	173	108	112	192	192	214	226	187	203	195	195	213	223
90	139	153	173	177	108	112	192	192	210	214	187	215	198	198	207	223
91	139	153	173	177	108	112	192	192	210	214	187	215	198	198	207	223
92	139	153	173	177	108	112	192	192	210	214	187	215	198	198	207	223
93	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
94	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
95	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
96	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
97	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
98	139	153	173	173	110	114	190	192	214	226	187	203	174	195	203	223
99	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
100	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
101	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
102	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
103	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
104	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
105	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
106	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
107	139	139	173	177	106	108	190	196	210	226	195	203	180	195	203	213
108	139	139	173	177	106	108	190	196	210	226	195	203	180	195	203	213
109	147	155	175	177	110	114	192	194	218	220	187	199	198	198	199	201
110	147	155	175	177	110	114	192	194	218	220	187	199	198	198	199	201
111	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
112	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	187	195	198	199	223
113	139	155	173	177	112	114	192	194	214	220	187	191	195	198	199	223
114	139	139	173	177	106	108	190	196	210	226	195	203	180	195	203	213
115	139	139	173	177	106	108	190	196	210	226	195	203	180	195	203	213
116	139	139	173	177	106	108	190	196	210	226	195	203	180	195	203	213
117	139	139	173	177	106	108	190	196	210	226	195	203	180	195	203	213
118	139	139	173	177	106	108	190	196	210	226	195	203	180	195	203	213
119	139	139	173	177	106	108	190	196	210	226	195	203	180	195	203	213

Prilog 3. Popis uzoraka s pripadajućim geografskim koordinatama i oznakama ploha uzrokovanja, te oznakom genotipske pripadnosti

Ploha	Oznaka uzorka	Klon	x (m)	y (m)
4	P073	C01	5675979,52	4763563,68
4	P074	C01	5675979,34	4763563,90
4	P075	C01	5675980,17	4763563,55
4	P081	C01	5675979,83	4763561,24
4	P082	C01	5675979,53	4763560,98
4	P083	C01	5675978,88	4763560,72
4	P086	C01	5675980,24	4763560,68
4	P093	C01	5675983,50	4763560,73
5	P094	C01	5675987,17	4763559,31
5	P095	C01	5675986,87	4763559,01
5	P096	C01	5675986,88	4763558,64
5	P097	C01	5675986,27	4763558,37
5	P099	C01	5675986,03	4763557,21
5	P100	C01	5675985,39	4763556,72
5	P101	C01	5675985,45	4763555,98
5	P102	C01	5675985,81	4763555,98
5	P103	C01	5675986,47	4763556,68
5	P104	C01	5675986,89	4763557,09
5	P105	C01	5675987,37	4763557,78
5	P106	C01	5675987,38	4763556,74
5	P111	C01	5675988,01	4763556,61
5	P112	C01	5675987,94	4763556,08
1	P001	C02	5675932,75	4763560,11
1	P002	C02	5675932,43	4763560,00
1	P003	C02	5675932,92	4763559,69
1	P005	C02	5675932,12	4763559,20
1	P006	C02	5675932,20	4763558,81
1	P007	C02	5675932,42	4763558,51
1	P008	C02	5675933,20	4763559,01
1	P009	C02	5675933,42	4763559,20
1	P010	C02	5675933,38	4763559,60
5	P107	C03	5675986,83	4763555,78
5	P108	C03	5675987,42	4763555,40
5	P114	C03	5675988,58	4763554,91
5	P115	C03	5675989,05	4763554,79
5	P116	C03	5675989,41	4763555,39
5	P117	C03	5675989,90	4763556,05
5	P118	C03	5675988,84	4763557,28
5	P119	C03	5675988,36	4763556,78
2	P032	C04	5675935,84	4763568,82
2	P033	C04	5675936,26	4763568,44

2	P035	C04	5675936,86	4763568,90
2	P036	C04	5675936,50	4763568,88
2	P037	C04	5675936,76	4763569,42
2	P038	C04	5675936,12	4763569,46
1	P016	C05	5675932,91	4763555,53
1	P017	C05	5675932,52	4763555,27
1	P018	C05	5675932,02	4763555,31
1	P019	C05	5675932,48	4763554,95
1	P020	C05	5675932,16	4763554,52
1	P022	C05	5675933,13	4763554,94
2	P043	C06	5675936,94	4763572,56
2	P044	C06	5675936,86	4763572,96
3	P057	C06	5675935,90	4763573,62
3	P058	C06	5675936,46	4763573,20
3	P059	C06	5675936,44	4763573,74
2	P023	C07	5675932,58	4763569,62
2	P024	C07	5675932,72	4763569,48
2	P025	C07	5675933,26	4763569,08
2	P026	C07	5675933,74	4763569,36
2	P027	C07	5675933,10	4763569,56
1	P011	C08	5675932,56	4763557,93
1	P012	C08	5675932,42	4763557,51
1	P013	C08	5675932,42	4763557,29
1	P014	C08	5675932,48	4763556,89
1	P015	C08	5675932,72	4763557,20
4	P079	C09	5675980,77	4763561,86
4	P080	C09	5675980,10	4763561,44
4	P084	C09	5675981,09	4763561,18
4	P085	C09	5675981,73	4763561,50
3	P060	C10	5675936,16	4763574,30
3	P061	C10	5675935,80	4763574,42
3	P064	C10	5675936,40	4763574,98
3	P065	C10	5675936,84	4763574,78
2	P039	C11	5675937,00	4763570,28
2	P040	C11	5675936,82	4763570,06
2	P041	C11	5675936,50	4763570,08
2	P042	C11	5675936,28	4763570,60
2	P028	C12	5675932,80	4763568,76
2	P029	C12	5675932,42	4763568,46
2	P030	C12	5675932,52	4763568,02
2	P031	C12	5675932,28	4763568,10
4	P090	C13	5675979,97	4763559,48
4	P091	C13	5675980,60	4763559,83
4	P092	C13	5675981,24	4763560,07
3	P066	C14	5675936,94	4763576,80
3	P067	C14	5675936,72	4763576,64
3	P068	C14	5675936,94	4763577,08
3	P052	C15	5675934,40	4763575,50
3	P053	C15	5675934,80	4763575,14

3	P055	C15	5675935,34	4763574,94
5	P109	C16	5675986,17	4763554,79
5	P110	C16	5675985,88	4763555,22
4	P087	C17	5675979,34	4763559,83
4	P088	C17	5675978,60	4763559,93
4	P077	C18	5675981,46	4763565,08
4	P078	C18	5675981,68	4763564,47
4	P069	C19	5675977,97	4763562,93
4	P070	C19	5675978,69	4763562,84
3	P062	C20	5675935,68	4763575,66
3	P063	C20	5675935,74	4763575,32
3	P054	C21	5675934,94	4763574,84
3	P056	C21	5675935,54	4763574,16
3	P046	C22	5675932,06	4763576,78
3	P047	C22	5675932,08	4763577,28
5	P113	C23	5675988,21	4763555,73
5	P098	C24	5675985,92	4763557,91
4	P089	C25	5675979,13	4763558,97
4	P076	C26	5675980,41	4763564,14
4	P072	C27	5675978,92	4763563,45
4	P071	C28	5675978,36	4763563,50
3	P051	C29	5675934,74	4763576,48
3	P050	C30	5675934,20	4763576,36
3	P049	C31	5675933,08	4763575,40
3	P048	C32	5675932,86	4763576,34
3	P045	C33	5675932,46	4763577,56
2	P034	C34	5675936,94	4763568,26
1	P021	C35	5675932,55	4763554,29
1	P004	C36	5675932,33	4763559,49

8. Životopis

OSOBNJE INFORMACIJE Doroteja Turković

 Aleja pomoraca 19, 10020 Zagreb,
 Hrvatska 016525819  0915969772
 adajne@gmail.com

Spol žensko | Datum rođenja 17.09.1992. | Državljanstvo hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

- 10/2016-10/2016 Volontiranje na Central european genome stability and dynamics meeting
Institut Ruđer Bošković, Zagreb
Pomoć u organizaciji kongresa (rad na info pultu, rad u garderobi, koordinacija sudionika kongresa pri dolasku i odlasku)
- 09/2015–07/2016 Anketiranje u sklopu projekta EkoRama
Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, Hrvatska
Provođenje anketiranja i ispunjavanje anketa o standardu zanimanja
Ugovaranje sastanaka i komunikacija sa strankama
Vođenje evidencije o provedenim sastancima.
- 05/2016 – 07/2016 Rad u trgovini kao ispomoć
Parfois, Sportina grupa, Zagreb, Hrvatska
Komunikacija s kupcima, održavanje urednosti i čistoće u prodavaonici, rad na blagajni, rad na prijemu robe (deklariranje robe i slaganje u skladištu)
- 2011- Rad u rasadniku ukrasnog bilja
OPG Turković
Rad u obiteljskom rasadniku za uzgoj ukrasnog bilja i božićnih drvaca.

OBRAZOVANJE I OSPOBLJAVANJE

- 2011-2014 Sveučilišna prvostupnica struke Znanosti o okolišu
Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, Hrvatska
- 2007-2011 Srednje obrazovanje
I. Gimnazija, Zagreb

OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

Ostali jezici	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski	B2	B2	B2	B2	B2
Francuski	A2	A2	A2	A2	A2
Španjolski	A2	A2	A2	A2	A2

Digitalna kompetencija

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Temljni korisnik	Temeljni korisnik

▪