

Morfološke, genetske i fitokemijske značajke populacije rogača (*Ceratonia siliqua* L.) u Hrvatskoj

Ivna, Dragojević Müller

Doctoral thesis / Disertacija

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:217:965963>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Ivna Dragojević Müller

**MORFOLOŠKE, GENETSKE I
FITOKEMIJSKE ZNAČAJKE
POPULACIJE ROGAČA (*Ceratonia
siliqua L.*) U HRVATSKOJ**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Ivna Dragojević Müller

**MORPHOLOGICAL, GENETIC AND
PHYTOCHEMICAL TRAITS OF CAROB
POPULATIONS (*Ceratonia siliqua* L.) IN
CROATIA**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017

Ovaj doktorski rad izrađen je u Zavodu za kemiju prehrane, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zavodu za oplemenjivanje bilja, genetiku, biometriku i eksperimentiranje Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, pod vodstvom dr.sc. Daria Kremera, znanstvenog savjetnika, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovnog-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Od srca se zahvaljujem mom mentoru dr. sc. Dariju Kremeru, znanstvenom savjetniku i izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo s Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, te prof. dr. sc. Snježani Bolarić s Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na savjetima, podršci i velikoj, velikoj pomoći pri izradi ovog rada.

Također dugujem zahvalnost dr. sc. Blanki Taribi Lovaković sa Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, izv. prof. dr.sc. Mirku Roščiću s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu, te dr. sc. Siniši Srećecu voditelju projekta „Taksonomija, ekologija i uporaba rogača (*Ceratonia siliqua* L.) i lovora (*Laurus nobilis* L.) u Hrvatskoj“ uz koji je vezana ova doktorska disertacija.

Na tehničkoj i stručnoj pomoći zahvaljujem svim suradnicima Zavoda za kemiju prehrane Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, a posebno gospođi Gordani Blažinić i doc.dr.sc. Lovorki Vujić.

Zahvaljujem se Upravi Vodoopskrbe i odvodnje d.o.o., Zagreb na suglasnosti za daljnju edukaciju na poslijediplomskom doktorskom studiju Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu.

Na kraju se želim zahvaliti mojoj obitelji na podršci i razumjevanju.

**MORFOLOŠKE, GENETSKE I FITOKEMIJSKE ZNAČAJKE
POPULACIJE ROGAČA (*Cerantonía siliqua* L.)
U HRVATSKOJ**

IVNA DRAGOJEVIĆ MÜLLER

Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu,
Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet,
Institut za Medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

Obzirom na oskudnost saznanja o hrvatskim populacijama rogača (*Cerantonía siliqua* L.), nutritivno i protektivno vrlo kvalitetne biljke, provedeno je istraživanje morfoloških, genetskih i fitokemijskih značajki populacija rogača u Hrvatskoj. Na sakupljenim uzorcima ploda i lista rogača napravljena su morfometrijska istraživanja, dok je genetska varijabilnost utvrđena primjenom AFLP analize genomske DNA izolirane iz lista. Udio ukupnih fenola, flavonoida i tanina te antioksidativni potencijal ploda i lista određen je spektrofotometrijskim metodama. Udio makro i mikroelemenata određen je primjenom ICP-AES tehnike. Utvrđena je statistički značajna varijabilnost morfoloških i fitokemijskih značajka ploda i lista istraživanih populacija rogača. Molekularna AFLP analiza pokazuje značajnu varijabilnost istraživanih populacija, obzirom da je varijanca između individua unutar populacija znatno veća (75,51%) od varijance između populacija. Usprkos statistički značajnoj varijabilnosti UPGMA klaster analizom, istraživane populacije se mogu grupirati u skupine s najmanjim stupnjem razdvojenosti. Mantelovim testom komparacije utvrđene su statistički značajne korelacije između pojedinih molekularnih, morfoloških i fitokemijskih svojstava ploda, lista te ploda i lista istraživanih populacija. Obzirom na dobre morfološke i fitokemijske značajke ističu se plodovi populacije Vis, Šolta, Brač i Šipan. Plodovi populacije Orašac visokog su antioksidativnog potencijala i dobri izvori minerala.

(stranica 155, slika 56, tablica 63, literaturnih navoda 211, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: rogač, populacija, morfologija, AFLP analiza, fitokemijske značajke

Mentor: Dr. sc. Dario Kremer, znanstveni savjetnik

Ocjenjivači: Izv. prof. dr. sc. Dubravka Vitali Čepo

Prof. dr. sc. Gordana Rusak

Prof. dr. sc. Snježana Bolarić

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

**MORPHOLOGICAL, GENETIC AND PHYTOCHEMICAL TRAITS OF CAROB
(*Ceratonia siliqua* L.) POPULATIONS IN CROATIA**

IVNA DRAGOJEVIĆ MÜLLER

University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb

University of Zagreb, Faculty of Agriculture

Institute for Medical Research and Occupational Health

Since there is a limited knowledge about croatian populations of a carob tree (*Ceratonia siliqua* L.), a nutritively and protectively high-quality plant, this research was conducted to determine the morphological, genetic and phytochemical traits of the carob populations in Croatia. The morphometric investigations of carob were made on the samples of pods and leaves, while the genetic variability was determined using AFLP analysis of genomic DNA isolated from the leaf. The content of total phenols, flavonoids and tannins, as well as antioxidant potential of the pods and the leaves, was determined spectrophotometrically. Content of macro and microelements was determined by using ICP-AES techniques. The research revealed a significant variability of the morphological and phytochemical traits of pods and leaves of the investigated carob populations. A molecular AFLP analysis showed considerable variability in the studied populations, because the variance between individuals within a population is much higher (75.51%) than the variance between populations. Despite a significant statistical variability, UPGMA cluster analysis of the studied populations, can be grouped in the lowest degree of separation. The Mantel test revealed significant correlations between molecular, morphological and phytochemical properties of the pods and leaves in the studied populations. Populations of Vis, Šolta, Brač and Šipan have good morphological and phytochemical features of the pods. The pods of the populations Vis and Orašac have the highest antioxidant potential and are a good source of the minerals.

(pages 155, figures 56, tables 63, references 211, original in croatian)

Key words: Carob tree, populations, morphology, AFLP analysis, phytochemical traits

Supervisor: Dario Kremer, PhD, Scientific Advisor

Reviewers: Dubravka Vitali Čepo, PhD, Associate Professor

Gordana Rusak, PhD, Professor

Snježana Bolarić, PhD, Professor

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Naziv vrste i taksonomski status rogača (sistematska pripadnost)	3
2.2. Podrijetlo rogača	4
2.3. Morfologija rogača	5
2.4. Genetika rogača	7
2.5. Rasprostranjenost rogača u svijetu i Hrvatskoj	10
2.6. Uzgoj i sorte rogača	11
2.7. Nutritivni sastav rogača	13
2.8. Uporaba i gospodarski značaj rogača	15
2.9. Polifenoli i antioksidativna aktivnost rogača	17
2.10. Makro i mikroelementi rogača	21
3. MATERIJALI I METODE	24
3.1. Biljni materijal	24
3.2. Instrumenti i uređaji	26
3.3. Reagensi	27
3.4. Puferi i otopine	27
3.5. Morfološka i genetska određivanja	28
3.5.1. Morfometrijska analiza	28
3.5.2. Genetska analiza	29
3.6. Fitokemijska određivanja	33
3.6.1. Ekstrakcija	34
3.6.2. Određivanje ukupnih fenola	34
3.6.3. Određivanje flavonoida	35
3.6.4. Određivanje tanina	36
3.6.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti	36
3.6.5.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom	37
3.6.5.2. Određivanje antioksidativnog potencijala TEAC metodom	38
3.6.5.3. Određivanje reduktivnog potencijala FRAP metodom	39
3.6.6. Određivanje makro i mikroelemenata	40
3.6.7. Statistička obrada podataka	41

4. REZULTATI	42
4.1. Rezultati morfoloških istraživanja rogača	42
4.1.1. Morfometrija ploda rogača	42
4.1.2. Morfometrija sjemenki rogača	56
4.1.3. Morfometrija lista rogača	66
4.2. Rezultati genetskih istraživanja	82
4.3. Rezultati fitokemijskih istraživanja rogača	87
4.3.1. Udio ukupnih fenola, flavonoida i tanina u plodu rogača	88
4.3.2. Antioksidativna aktivnost ploda rogača	90
4.3.3. Udio ukupnih fenola i flavonoida u listu rogača	93
4.3.4. Antioksidativna aktivnost lista rogača	95
4.3.5. Udio makro i mikroelemenata u plodu rogača	98
4.3.6. Udio makro i mikroelemenata u listu rogača	103
5. RASPRAVA	107
5.1. Morfološke značajke ploda, sjemenke i lista populacija rogača u Hrvatskoj	107
5.2. Genetske značajke populacija rogača u Hrvatskoj	112
5.3. Fitokemijske značajke ploda i lista populacija rogača u Hrvatskoj	116
5.3.1. Polifenoli i antioksidativna aktivnost ploda rogača	116
5.3.2. Polifenoli i antioksidativni potencijal lista rogača	120
5.3.3. Makro i mikroelementi u plodu rogača	123
5.3.4. Makro i mikroelementi u listu rogača	127
6. ZAKLJUČCI	130
7. LITERATURA	133
8. ŽIVOTOPIS	153

1. UVOD

Ljudsko društvo je ovisno o velikom broju različitih biljnih kultura, a najmanje 6000 vrsta se koristi u različite namjene. Međutim, u prehrani se uglavnom koristi relativno mali broj biljnih vrsta. Jedna od takvih, u Hrvatskoj nepravedno zapostavljena kultura, je rogač (*Ceratonía siliqua* L).

Ova, često samonikla, biljka nekada je jako puno značila u seoskim domaćinstvima. U nedostatku hrane, plodovi i sjemenke rogača su se koristili za jelo, drvo rogača se koristilo za ogrijev te kao stolarska sirovina, dok je lišće služilo kao stočna hrana.

Rogač je vazdazeleno stablo iz roda rogač (*Ceratonía* L.) koji pripada porodici mahunarki (*Fabaceae* Lindl. 1836). Plod je srpasta, tamnosmeđa ili crnkasta mahuna duga 10 – 20 cm, široka 1,5 – 4 cm koja sadrži oko desetak sjemenki dugih do 1 cm. Podrijetlom je iz Sirije i Palestine, a od antičkih vremena rasprostranjeno je na čitavom području Mediterana. Uzgaja se u zemljama oko Sredozemnog mora, a najviše u Siriji, Palestini, Portugalu, Cipru, Španjolskoj, Grčkoj i Italiji, zatim u sjevernoj Africi te u Meksiku i Kaliforniji. U nekim područjima kao što je mediteranski dio Turske, jug Španjolske ili Maroko sakupljali su se plodovi uglavnom s divljih, nekultiviranih (necijepljenih) stabala rogača. Kultiviranje rogača promiče se od davnina, pa se u prvo vrijeme uzgaja iz sjemenki prikupljenih s odabranih stabala, a zatim cijepljenjem. Prve sorte rogača nastale su odabiranjem jedinki iz lokalnih populacija. S vremenom su utemeljeni i prvi komercijalni voćnjaci (Varder i sur., 1980, Batlle i Tous, 1994).

Plodovi i sjemenke se koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji a mljevene sjemenke u proizvodnji papira i za štavljenje kože. Rogač je posebno važan u prehrambenoj industriji gdje se koristi pri proizvodnji specijalnih vrsta kruha, slastica, kao zamjena za čokoladu, u pripremi brojnih napitaka, te u proizvodnji krmiva za prehranu stoke. Osim dekorativnog izgleda u vrijeme cvatnje iznimno je medonosna biljka, a kao takva odlična ispaša pčelama. Prema nutritivnom sastavu plodovi imaju visoki udio ugljikohidrata i visoki udio prehrambenih vlakana zahvaljujući kojem rogač ima niski glikemijski indeks. Udio proteina i masti je relativno nizak. Novija istraživanja upućuju na značajan antioksidativni potencijal ekstrakta ploda rogača koji je posljedica visokog udjela polifenolnih komponenti među kojima prevladavaju flavonolni glikozidi i hidrolizabilni tanini (Papagiannofoulos i sur., 2004).

U Hrvatskoj uzgoj rogača je ograničen na razmjerno malo područje. Uzgaja se u uskom obalnom pojasu na nižim nadmorskim visinama i najčešće na udaljenosti od nekoliko stotina metara od mora. Najviše ga ima na području Dubrovačkog primorja na otocima Mljetu, Šipanu

i Lopudu, kao i na poluotoku Pelješcu (Orebić), zatim otocima Visu, Korčuli i Šolti a manje na Lastovu, Braču i Hvaru. Usprkos svome značaju rogač se kod nas slabo cijeni, domaći sortiment rogača je vrlo slabo poznat, a osim nešto relativno veći na Visu, ne postoji niti jedan veliki nasad rogača za komercijalni uzgoj.

Cilj istraživanja

Obzirom da sustavna istraživanja rogača u Hrvatskoj do sada nisu provedena, cilj ovog doktorskog rada je:

- odrediti morfološke, genetske i fitokemijske značajke populacija rogača u Hrvatskoj
- dobiti uvid u varijabilnost unutar i između populacija
- procijeniti raznolikost između ispitivanih lokalnih populacija rogača i grupirati populacije na bazi morfoloških i molekularnih (AFLP) markera.
- usporediti raznolikost populacija na morfološkoj i molekularnoj razini
- utvrditi antioksidativni potencijal istraživanih populacija rogača
- odrediti udio makro i mikroelemenata u istraživanim populacijama rogača

Hipoteza

Budući da nutritivni sastav rogača bitno varira ovisno o sorti i podrijetlu, a obzirom na izoliranost pojedinih lokaliteta (otoci) s kojih su prikupljeni uzorci, mogu se očekivati razlike u morfološkim, genetskim i fitokemijskim značajkama populacija rogača u Hrvatskoj. Rogač je bogat fitokemikalijama pa se može očekivati značajna biološka odnosno antioksidativna aktivnost, a obzirom da stanišni uvjeti utječu i na sintezu sekundarnih biljnih metabolita može se očekivati i različita biološka aktivnost između pojedinih populacija.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Naziv vrste i taksonomski status rogača (sistematska pripadnost)

Odjeljak: *Spermatophyta*

Pododjeljak: *Magnoliophytina (Angiospermae)*

Razred: *Magnoliopsida (Dicotyledonae, Magnoliatae)*

Red: *Fabales*

Porodica: *Fabaceae (Leguminosae)*

Potporodica: *Caesalpinioideae*

Rod: *Ceratonia*

Vrsta: *Ceratonia siliqua* L.

Narodno ime: rogač

Engleski naziv: carob tree, locust bean, St John's-bread; njemački naziv: Johannisbrotbaum;

francuski naziv: caroube; talijanski naziv: carruba; poljski naziv: chleb świętojański; slovenski naziv: rožiči

Rogač je zimzeleno stablo ili katkada veliki grm koji pripada rodu *Ceratonia*. Stručno ime *Ceratonia siliqua* L. potječe od grčkog *keras* što znači rog i latinski *siliqua*, aludirajući na tvrdoću i oblik gondole. Narodni naziv potječe iz hebrejskog *kharuv*, iz koje su izvedeni arapski *harruba* i kasnije *algarrobo*, odnosno *garrofero* na španjolskom, talijanskom, *carrubo* u *caroubier* na francuskom, *Karubenbaum* na njemačkom, *alfarrobeira* na portugalskom, *charaoupi* na grčkom, *charnup* na turskom i *garrofer* ili *garrover* na katalonskom. Zanimljivo je spomenuti da se, primjerice različiti nazivi koriste u različitim dijelovima Italije: *ascenedda*, *soscella* (Basilikata); *carrua*, *carrubbi* (Sicilija); *carruba*; *carrubbio*, *carrubo*, *cornola*, *corue*, *pselocherato*, *pselocherea* (Apulija); *suscella* (Kampanija i Apulija); *garrubaro*, *garrubbo* (Kalabrija) (Hammer i sur., 1992). U Aziji se koriste sljedeći nazivi: *Chiao-tou-shu* (Kina), *gelenggang* (Malezija) i *chum het Tai* (Tajland) (Kruse 1986).

U Hrvatskoj se za rogač upotrebljavaju i sljedeći nazivi: *rogoc*, *rožičak*, *rožiček*, *rožić*, *rožki*, *kaluber*, *karuba*, *slatka korica*. Na otoku Mljetu ga nazivaju i „Mljetskom bananom“. Također je poznat kao kruh Sv. Ivana jer je prema legendi služio kao hrana Ivanu Krstitelju u pustinji, a od toga potječe i naziv *Johannisbrotbaum* na njemačkom jeziku. Vrlo važan je bio i u zlatarstvu, jer su se u antičko doba njegove prilično uniformne sjemenke koristile kao jedinica za mjeru vaganja zlata, te je naziv karat došao od naziva rogača, 1 sjemenka = 1 karat.

Suvremena, metrička definicija karata prihvaćena je 1907. godine i prema njoj je jedan karat jednak 200 miligrama (0,2 g).

U Tunisu rogač je uvršten u nacionalnu listu prioriteta genetskih resursa za očuvanje i upravljanje (Bouzouita i sur., 2007). U Hrvatskoj je nažalost uzgoj rogača zanemaren, iako je za njegov uzgoj potrebno minimalno truda, vremena i financijskih ulaganja. Plod mahuna se može upotrebljavati u svježem i prerađenom obliku, visoke je hranidbene i ljekovite vrijednosti, a u ljudskoj prehrani upotrebljava se već tisućljećima.

2.2. Podrijetlo rogača

Rod *Ceratonia* pripada porodici mahunarki *Leguminosae*, (sinonim *Fabaceae*), reda *Rosales*. Mahunarke su važni članovi vegetacije tropskih, suptropskih i umjerenih područja svijeta. To je jedna od najvećih porodica s oko 18000 vrsta (Polhill i sur., 1981). Članovi ove porodice vrlo su varijabilne morfologije i ekologije. Rogać je taksonomski smješten u potporodicu *Caesalpinioideae*. Međutim, neki autori ga svrstavaju u *Cassieae* (Irwin i Barneby, 1981; Tucker 1992a, 1992b) zbog toga što je diploidni broj kromosoma za *Ceratonia* $2n = 24$, dok mnoge *Cassieae* imaju $2n = 48$ (Goldblatt, 1981). Taksonomski je rod *Ceratonia* prilično izoliran od svih ostalih rodova ove porodice (Zohary, 1973).

Druga vrsta roda *Ceratonia*, *Ceratonia oreothauma* opisana je tek 1980 godine (Hillcoat i sur., 1980). Razlikuju se dvije podvrste, subsp. *oreothauma* koja potječe iz Omana i subsp. *somalensis*, koja je udomaćena na sjeveru Somalije. Vrsta *C. oreothauma* morfološki je dosta različita od vrste *C. siliqua*. Između ostalog *C. oreothauma* ima nešto manja polenova zrnca nego *C. siliqua* i ona su trikolporatna umjesto tetrakolporatna (Ferguson, 1980). Budući da su trikolporatna polenova zrnca biološki naprednija (razvijenija) od tetrakolporatnih, Hillcoat i sur. (1980) smatraju da je *C. oreothauma* divlji predak kultivirane vrste *C. siliqua*.

Zbog tisućljetnog kultiviranja središte podrijetla rogača nije sasvim jasno. De Candolle (1883) i Vavilov (1951) smatraju da je podrijetlom iz istočnog područja Mediterana (Turska i Sirija). Međutim, Schweinfurth (1894) smatra da je rogač udomaćen na visoravnima južne Arabije (Jemen). Zohary (1973) smatra da je podrijetlom iz ksero-tropske Indo-Malezijske flore, grupirajući ga sa rodovima *Olea*, *Laurus*, *Mirta*, *Chamaerops*, a veže ga i sa Arapskim poluotokom. Vrsta *C. oreothauma* je jedini poznati srodnik rogača i smatra se da mu je centar podrijetla u jugoistočnoj Arabiji (Oman) i oko roga Afrike (sjeverno od Somalije) (Hillcoat i sur., 1980).

Klimatski uvjeti na području podrijetla subfamilije *Caesalpinoideae* bili su topli i vlažni u početku, ali nakon razdoblja krede počelo je veliko sušenje i podizanje zemljišta tako da su se razvili hladniji, sušniji, skoro pustinjski uvjeti na koje se je rogač morao prilagoditi. Ostale mahunarke potporodice *Caesalpinoideae* su uglavnom biljke tropskih i suptropskih područja (Cowan, 1981).

2.3. Morfologija rogača

Rogač je, kao što je već rečeno, zimzeleno stablo ili znatno rijeđe grm, zelenih listova i plodova tamno smeđe – crvenkaste boje. Prosječne je visine od 5 do 10 m, iako može narasti i do 20 m u vis, s promjerom debla od 0.5 do 0.7 m. Kora je debela i smeđe boje koja kod starijih biljaka postane sivkasta i naborana. Krošnja rogača je gusta i razgranata, a starije grane s vremenom iznutra postaju šupljikave i spuštaju se prema tlu, dok mlađe grane rastu uspravno u unutrašnjost krošnje (Slika 1).



Slika 1. Drvo, list i plodovi rogača

Rogač dobro podnosi visoke temperature i osunčanost te je otporan na sušu, ali je osjetljiv na niske temperature. Vrijednosti temperature ispod $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ mogu oštetiti stablo i uništiti plodove. Najbolje mu odgovaraju terasasta, propusna i rahla tla, a ne podnosi teška i vlažna tla. Korijenov sustav, posebno glavni „sidreni“ vrh prodire duboko u tlo (Battle i Tous, 1997). Kao termofilna i kserofitna vrsta rogač najbolje uspijeva na staništima s blagom Mediteranskom klimom zahvaljujući anatomiji i prilagodbi listova (Catarino i sur., 1981). Čak

i pri slaboj dostupnosti vode u tlu rogač može održavati visoku razinu vode u listovima (Nunes i sur., 1989). To se postiže smanjenjem vodnog potencijala u listu kao odgovor na male gubitke vode (Lo Gullo i Salleo, 1988).

Listovi rogača su perasto sastavljeni, dugi 10 – 20 cm, izmjenično poredani, s 3 – 5 pari kožastih liski, sa ili bez vršne liske. Liske su otprilike 3 – 7 cm dugačke, jajaste do eliptične, gornja strana im je tamnozeleno i sjajna, a donja strana blijedo zelena (Battle i Tous, 1997). Sklerofilni su, a gornja epiderma, čije stanice sadrže fenolne spojeve u velikim vakuolama, im je jako debela i jednostruka, dok su puči u nakupinama prisutne samo u nižim slojevima epiderme (Mitrakos, 1988). Rogać ne odbacuje svoje lišće u jesen već svake druge godine u lipnju ili srpnju i to samo djelomično, jer obnavlja lišće u proljeće (Diamantoglou i Mitrakos, 1981).

Rogač je anemofilna i izrazito samooplodna voćka (Passos de Carvalho, 1988; Tous i Battle, 1990), ali ga oprašuju i kukci (posebno pčele, muhe i noćni leptiri) (Retana i sur., 1990, 1994; Ortiz i sur., 1996). Cvjetovi rogača su crveno zelene boje, 6 – 12 mm dugi i uski. Jednospolni su ili katkada dvospolni (biljke poligamne ili dvodomne), skupljeni u grozdaste spiralno poredane cvatove koji izbijaju postrance iz grana i tanjeg dijela debla (kauliflorija). Većinom je dvodomna (diecična) biljka te se muški i ženski cvjetovi nalaze uglavnom na različitim stablima, ali su prisutni i jednodomni (hermafroditski) oblici. Cvjetovi sva tri tipa spola izlučuju nektar, ali je njegova količina i koncentracija šećera najveća u ženskih cvjetova (Ortiz i sur., 1996). Zanimljivo je da su svi cvjetovi u početku dvospolni, ali jedan spol najčešće bude potisnut tijekom kasnijeg razvoja funkcionalno muških ili ženskih cvjetova (Tucker, 1992a). Mnoge druge mahunarke poput vrsta *Neptunia pubescent* i *Bauhinia malabarica* (Tucker, 1988b) potporodice *Caesalpinioideae* *Saraca* (Tucker, 2000 b), imaju u pravilu dvospolne cvjetove, dok povremeno bude tučak potisnut i nefunkcionalan i cvjetovi postanu funkcionalno muškog spola (Tucker, 2003). U evolucijskom smislu, jednospolnost se općenito smatra izvedenim iz dvospolnih predaka naprednijim oblikom (Battle i Tous, 1997).

Dvodomnost nije česta među leguminozama (Tucker, 1992a). Biljke ženskog spola se više preferiraju pri sadnji u odnosu na hermafroditne, jer im je prinos obilniji i daju kvalitetnije plodove. Samo nekoliko sorti hermafroditnih biljaka ima poželjne uzgojne značajke. Zato u voćnjacima hermafroditne biljke nisu nikada glavni prinosioci, ali mogu biti značajne kao oprašivači (Battle i Tous, 1997). Kao oprašivači često se koriste i izolirane mladice ili grane koje su preostale na podlozi nakon cijepljenja ženskih plemki (Battle i Tous, 1997). Osim sjemenjem, rogač se može razmnožavati reznicama i cijepljenjem.

Plod rogača je srpasta, tamnosmeđa ili crvenkasta mahuna duga 10 – 20 cm, široka 1,5 – 4 cm koja sadrži u prosjeku desetak sjemenki dugih do 1 cm (Šilić, 2005; Kovačić i sur., 2008). Pulpa se sastoji od vanjskog kožastog dijela (perikarpa) i mekše unutarnje regije (mezokarpa). Na pulpu otpada 90 % ukupne mase ploda, dok ostatak čine sjemenke. Sjemenke su smještene poprečno i omeđene su mezokarpom, ovalno – jajolikog su oblika i sjajne smeđe boje, dugačke oko 1 cm. Broj sjemenki je sortno svojstvo, a kreće se od 5 – 15 sjemenki u plodu. Plod je mesnat i jestiv (Batlle i Tous, 1997).

Rogač je dugoživuća biljka s produktivnim životnim vijekom od preko 100 godina (Karababa i Coskuner, 2013). Za neka stabla na otoku Visu narod smatra da su starija od 2000 godina, a još uvijek daju plod. Urod zna premašiti i 100 kg po stablu. Za rogač se kaže da je „najstariji stanovnik Mediterana“, a zbog njegove dugovječnosti u narodu se govorilo da je voćka koja se sadi za buduće generacije.

2.4. Genetika rogača

Genetska raznolikost je raznolikost alela i genotipova odnosno sveukupnost gena svih živih organizama te njihova genetska raznolikost između jedinki, populacija, vrsta i viših taksonomskih kategorija. Genetska raznolikost pruža sirovi materijal za prirodnu selekciju, te ima važnu ulogu u maksimaliziranju potencijala vrste da se prilagodi biotičkim i abiotičkim uvjetima okoliša (Jump i sur., 2009). Biološka raznolikost, kao jedna od ključnih komponenti brojnosti i raznolikosti organizama koji nastanjuju neko područje, i genetska raznolikost su povezani te interaktivno utječu na procese u ekosustavu (Butchart i sur., 2010).

Očuvanje biološke raznolikosti je neophodan preduvjet u održanju i očuvanju raznolikosti nekog prostora, kao i pojedinačnih vrsta i podvrsta biljnog i životinjskog svijeta. Vrijednost svakog genoma u prirodi je neprocjenjiva, pa tako gubitak pojedine vrste, podvrste ili njena modifikacija mogu ujedno značiti i poremećaj ili čak trajan gubitak biološke ravnoteže unutar nekog staništa. Ekološke posljedice na gubitak bioraznolikosti su postale istaknuto javno i znanstveno pitanje (Loreau i sur., 2001; Hooper i sur., 2005). Mediteransko područje ima važne biljne genetske resurse. Međutim, genetička erozija, koja je sve češća, prvenstveno gubitak prvobitne biljke i genetske raznolikosti, povećala se je tijekom dvadesetog stoljeća (Maxted i Bennett, 2001).

Najveća prijetnja divljim svojstama u svijetu (pa tako i u Hrvatskoj) je uništavanje i gubitak staništa, dijelom i kao posljedica pretvaranja prirodnih staništa u građevinsko ili

poljoprivredno zemljište, izgradnja prometnica i ostalih prometnih putova što često dovodi do fragmentacije staništa.

Proveden je niz istraživanja vezan uz analizu genetske raznolikosti rogača (Russo i sur., 2002; Barracosa i sur., 2008, Caruso i sur., 2008; Tetik i sur., 2011). Saznanja o genetskoj raznolikosti, unutar svojiti može se koristiti kao nadopuna informacijama o fenotipu biljke i to je temeljni alat za očuvanje raznolikosti jer dopušta organizaciju germplazme i omogućuje učinkovitije uzorkovanje genotipova (Nienhuis i sur., 1993). Kultivari rogača mogu se okarakterizirati po različitim kombinacijama genotipova i fenotipova. Morfološke i fiziološke razlike su vrlo bitne i tradicionalno su se koristile za identifikaciju različitih sorti rogača. Međutim, tradicionalna identifikacija sorti rogača koja se temelji na morfološkim i fiziološkim karakteristikama zahtjeva veliku količinu fenotipskih podataka do kojih je teško doći i koji ponekad variraju ovisno o okolišnim uvjetima što može dovesti do nepouzdanosti ili pogrešne determinacije sorte. Pored toga varijacije u osobinama ploda i cvijeta, što je važno pri definiranju sorte, mogu se raspoznati samo kod odraslih stabala što isključuje njihovo korištenje kod određivanja mladih biljaka (Tous i Battle, 1990).

U programu oplemenjivanja rogača nužno je procijeniti varijabilnost raspoložive germplazme, jer samo dovoljna širina genetske osnove svojstva daje stvarnu mogućnost izbora za željeno svojstvo. Raspon varijabilnosti, tj. genetska osnova svojstva, može se proširiti putem korištenja lokalnih populacija, stranih kultivara, križanja, mutageneze (toplina, Sf gen), ionizirajućeg zračenja (X-zrake, γ -radijacija), kemijskih mutagena i somaklona. Raspon se mijenja prirodnom ili umjetnom selekcijom, a varijabilnost svojstva i primjena varijabilnosti svojstva/svojstava nastalih uslijed selekcije utvrđuje se na fenotipskoj i/ili molekularnoj razini (Grljušić 2003).

Postoji vrlo malo podataka o agronomskim svojstvima kultiviranog rogača u specifičnim područjima (Tous i sur., 2009). Španjolska je vodeći proizvođač, a slijede ju Italija, Portugal, Maroko, Grčka, Cipar i Turska (Vekiari i sur., 2011). Najviše podataka i istraživanja dostupno je upravo iz tih zemalja. Novija istraživanja rogača provedena su u Turskoj na 70 divljih i kultiviranih stabala (Tetik i sur., 2011). Preliminarni rezultati pokazali su da Turska ima vrlo bogate genetske resurse rogača koji sadrže značajne varijacije za većinu svojstava ploda (Tetik i sur., 2011). Istraživanja su pokazala da je u pravilu plod divljeg rogača manji. Također prosječni udio topljivog čvrstog sadržaja je bio manji kod divljih, u odnosu na kultivirane genotipove, dok je prosječna ukupna kiselost bila slična kod oba genotipa.

Battle i Tous (1997) su također izvjestili da kultivirani rogač ima veće plodove (mahune) s većim udjelom šećera i više pulpe, u odnosu na divlje genotipove. Prema tim

autorima ta svojstva ploda zajedno s produktivnošću i prilagodbom na okoliš čine glavne kriterije za selekciju kod uzgajivača rogača. Tous i sur. (2009) su zaključili da je na temelju prinosa mahuna i sjemenki sorta „Duratio“ najbolji kultivar u pokrajini Tarragoni u Španjolskoj. Provedena su istraživanja morfoloških svojstava i karakterizacija sorti rogača na području Algarve u Portugalu. Analize izoenzima u rogaču pokazale su niski polimorfizam između sorti bilo različitog ili istog podrijetla i nisu otkriveni specifični biokemijski markeri za sorte rogača iz ove regije (Tous i sur., 1992, Battle i sur., 1997; Barracosa i sur., 2007).

Određivanje razlika između individua u populaciji i između populacija i genetskih odnosa vrši se pomoću DNA markera koji pokazuju genetsku varijabilnost izravno na razini DNA molekule. Uporaba DNA markera temelji se na razvoju molekularne genetike i na značajnim otkrićima kao što su restrikcijski enzimi, lančana reakcija polimerazom, te mikrosateliti (Šatović, 1999). Metode kojima se ispituje varijabilnost na molekularnoj razini su različite (izoenzimi, RFLP, PCR), a sve se temelje na polimorfizmu molekula proteina ili fragmenata DNA. Najkorišteniji sustavi markera su metode AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* – razlika duljine amplificiranih fragmenata), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – slučajno amplificirana različita DNA), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – različitost duljine restrikcijskih fragmenata), kao i često korišteni markeri SSR (*Simple Sequence Repeats* – jednostavne ponavljajuće sekvence) ili mikrosateliti. DNA markeri predstavljaju vrlo učinkovito sredstvo za brzu analizu genetske raznolikosti unutar kultivara. Oni nisu ovisni o korištenom dijelu i razvoju biljke, okolišnim uvjetima, zahtjevaju samo mali dio biljnog tkiva. Uz to korištenje molekularnih markera uglavnom doprinosi razvijanju tehnika za brže razmnožavanje biljaka i klasifikaciju, potvrđujući ili čak mijenjajući sistematiku i taksonomiju biljaka (Talhinhas i sur., 2003; Güzeldağ i Çolak, 2007).

Isto tako napravljena je RAPD analiza genetske raznolikosti iz četiri bioklimatske zone prirodnih populacija Rogaz iz Tunisa. Rezultati su pokazali visoku raznolikost unutar populacija i visoku genetsku sličnost unutar populacija, što pokazuje da su populacije nedavno izolirane pod antropogenim utjecajem (Afif i sur., 2006). RAPD analiza je također korištena u istraživanjima divljih populacija rogača u Libanonu. Dobiveni rezultati su pokazali da se populacije nisu grupirale u klastere na temelju udaljenosti te da postoje značajne razlike između i unutar populacija što, ukazuje da populacije rogača koje su preostale predstavljaju vrijedne germplazme (Talhok i sur., 2005). U studiji Barracosa i sur. (2008) korištene su RAPD i AFLP metode za procjenu genetske varijabilnosti devet glavnih sorti rogača regije Algarve radi usporedbe s njihovim morfološkim karakteristikama.

Battle i Tous (1997) izvještavaju da su Turska i Maroko važni kao izvor divljih populacija rogača. U Turskoj se divlji rogač razmnožava iz sjemena, dok se kultivirani varijeteti lagano dobivaju vegetativnim presađivanjem. Prema Vadar i sur. (1980) u Turskoj se uzgajaju tri tipa rogača: divlji (mahune su tanke, duge i ravne, ponekad savijene, smeđe boje), mesnati (mahune su debele, kratke i ravne, smeđe boje) i "Sisam" rogač (mahune su debele, kratke i ravne, svjetlosmeđe boje). Pekmezci i sur. (2005) su odabrali pet superiornih kultivara i sedam divljih genotipova s istočnog dijela mediterana odnosno, 4 uzgojena i 10 divljih genotipova sa zapadnog dijela Mediterana i Aegian regije u Turskoj, radi usporedbe različitih značajki između divljih i kultiviranih genotipova.

2.5. Rasprostranjenost rogača u svijetu i Hrvatskoj

Rogač je tipična Mediteranska suptropska voćka sa specifičnim zahjevima za klimatskim uvjetima. Najviše mu odgovaraju staništa u niskoj zoni vegetacije Mediterana zajedno sa drugim vrstama kao što su *Pistacia lentiscus*, *Olea europaea* var. *sylvestris*, *Tetraclinis articulata*, *Juniperus phoenicea*, *Pinus halepensis* i *Quercus ilex*, formirajući asocijacije *Oleo-Ceratonion*, *Pistacio-Rhamnetalia* (Gharnit i sur., 2004; Aafi i sur., 1996; Ouchkif i sur., 1988; Zohary i sur., 1996). Plodovi rogača obzirom da su tvrdi i relativno otporni mogu se skladištiti i transportirati na velike udaljenosti.

Smatra se da je rogač prirodno rasprostranjen od Turske, Cipra, Sirije, Libanona, Izraela, Jordana, Arapskog poluotoka, južnog Egipta do Tunisa i Libije otkud je proširen na zapad. Grci su ga prenijeli u Grčku i Italiju, a potom su ga Arapi proširili obalom sjeverne Afrike, zatim na jug i istok Španjolske, odakle je prenešen na jug Portugala i jugoistok Francuske (Hillcoat i sur., 1980). Na mnogim mjestima diljem zapadnog Sredozemlja, rogač se spontano pojavljuje, ali se smatra da su to divlji primjerci nastali iz sjemena kultiviranih sorti. U najvećem djelu mediteranskog područja divlji rogač je rasprostranjen u, više ili manje, istom zemljopisnom i klimatskom pojasu kao i onaj kultivirani (Battle i Tous, 1997). Na primjer u Maroku rogač raste samoniklo ili je kultiviran u toplom i umjerenom Mediteranskom pojasu s polu-sušnom i sub-vlažnom klimom minimalnih temperatura do 3 °C i nadmorske visine do 500 m, a iznimno od 900 do 1600 m (Gharnit i sur., 2004; Foury i sur., 1954; Magini i Tulstrup, 1955; Rejeb i sur., 1991).

U Hrvatskoj rogač je proširen u zimzelenom pojasu zajednice *Oleo-Ceratonion*, od granice sa Crnom Gorom preko Dubrovačkog primorja (uski pojas od Dubrovnika do Slanog) i na poluotoku Pelješcu, gdje ga najviše ima, te na otocima: Šipan, Lopud i Mljet. Nadalje ima

ga na otocima Vis, Lastovo, Korčula, Hvar, Brač i Šolta te na Malom i Velikom Drveniku. Uglavnom raste na nižim nadmorskim visinama i u uskom obalnom pojasu na udaljenosti od 100 do 150 m od mora (Miljković, 1991).

2.6. Uzgoj i sorte rogača

U svijetu postoji velik broj sorti rogača, a među najkvalitetnije ubrajaju se i neke od hrvatskih sorti. Međutim, obzirom da je kultura rogača kod nas zapostavljena, niti jedna sorta rogača se ne nalazi na službenoj sortnoj listi Republike Hrvatske.

Na temelju arheobotaničkih nalaza (spaljenog drva i sjemenke) u Izraelu, utvrđeno je da je rogač postojao u istočnom Mediteranu dugo prije početka neolitičke poljoprivrede oko 4000 pr. n. e. (Liphschitz, 1987). U arheološkim iskopinama u blizini vulkana Vezuv u Italiji, pronađeni su ostaci karboniziranih mahuna rogača koji potječu iz razdoblja nakon njegove erupcije 79 g. n. e. (Meyer 1980). Smatra se da je rogač kultiviran relativno kasno, a kao razlog tome navode se poteškoće sa vegetativnim uzgojem rogača. Slično kao kod većine voćnih kultura Starog svijeta, kultiviranje rogača se temelji na prijelazu sa spolnog razmnožavanja u divljini na vegetativno razmnožavanje u uzgoju (Zohary, 1996).

Uzgoj rogača započeo je relativno kasno i zbog toga što u antičko doba nije bio potreban jer su divlja stabla bila uobičajena u istočnom dijelu Mediterana (Hillcoat i sur., 1980). Tri glavne osobine po kojima se razlikuju domaće sorte rogača od svojih divljih srodnika su: veća mahuna, više pulpe i veći udio šećera. Povećanje dimenzija sjemenki i njihovog broja je manje vidljivo (Batle i Tous, 1997).

Stoljeća kultiviranja dovela su do stvaranja brojnih lokalnih sorti koje se razlikuju s obzirom na veličinu i kvalitetu ploda, broj sjemenki u plodu, produktivnost, otpornost na bolesti i štetnike. Mnoge sorte su nepoznatog podrijetla i danas predstavljaju dio genofonda populacija rogača određenog područja. Batle i Tous (1997) opisuju 26 sorti rogača, dok je više od 80 klonova rogača pohranjeno u kolekciji Sveučilišta u Kaliforniji. Neke od poznatih svjetskih sorti su: Amele di Bari, Bonifacio, Gibiliana, Saccarata i Tantillo (Italija), Banya de cabra, Casuda, Matalafera, Negra, Ramillete i Rojal (Španjolska), Hemere i Tylliria (Grčka), Sisam, portugalske Galhosa i Mulata (Turska), Bolser, Clifford, Conejo, Horne, Imera i Santa Fe (Kalifornija), Koumbota i Tylliria (Cipar) Tylliria, Sandalawi, Habati (Izrael), te sorta Sfax (Tunis) (Batle i Tous, 1997).

Sorte rogača pokazuju značajnu genetsku raznolikost, ali i raznolikost u morfološkim, agronomskim i tehnološkim značajkama (Barracosa i sur., 2007; Sidina i sur., 2009; Oziyci i

sur., 2014). Međutim, kao što je već rečeno, analize DNA s izoenzima pokazale su niski polimorfizam između kultivara različitog (Tous i sur., 1992; Battle i sur. 1996) i istog podrijetla (Barracasa i sur., 1996). Također, istraživanja su pokazala da su divlji i kultivirani rogači izoenzimski slični (Battle i sur., 1996). U Hrvatskoj rogač se u većim količinama uzgajao u Komiži na Visu, gdje se je i tradicionalno sadio prilikom svetkovina. Nekad je prekrivao velike površine na području toga grada te je uz maslinu, smokvu i badem bio važna gospodarska kultura (www.slobodnadalmacija.hr). Nažalost danas je uzgoj rogača zanemaren tako da su i sorte u nas slabo poznate. Kako kultura uzgoja rogača u Hrvatskoj nije imala veliku važnost, tako u proizvodnji nisu niti uvedene nove strane sorte, pa nema podataka o ponašanju stranih sorti u našim ekološkim uvjetima. Prema popisu sorti voćnih vrsta Zavoda za sjemenarstvo i rasadničarstvo u Osijeku (Popis voćnih vrsta, 2010), u Hrvatskoj raste 5 sorti rogača (Komiški, Korčulanski, Medunac, Puljiški i Šipanski). One do danas nisu ni farmakobotanički ni nutritivno okarakterizirane a njihov uzgoj i prerada su, osim na otoku Visu, potpuno zapostavljeni. Inače, u literaturi se spominje još nekoliko domaćih sorti: Šipanski dugi, Komiški krupni, Moliški, Koštunac (Bubić, 1977); Komiški veliki, Šipanski i Mekiš, a od stranih sorti uzgajan je Puljiški rogač iz Puglie u Italiji (Miljković, 1991).

Komiški veliki (tusti) rogač je autohtona domaća sorta iz grada Komiže na otoku Visu, ali je proširena uzduž čitavog uzgojnog područja rogača. Ovu sortu odlikuju velika stabla sa širokom, bujnom krošnjom. Prinosi su obilni i redoviti a mahune su duge, krupne, široke i mesnate, vrlo dobre kakvoće, te kada sazriju sadrže 70 % šećera. Mahune se lako lome i melju. To je u Hrvatskoj najranija sorta, koja dozrijeva u kolovozu (Anonymus., 2014)

Šipanski rogač je također autohtona sorta koja se najviše uzgaja na otoku Šipanu, te u Dubrovačkom primorju. Ubraja se u stolne sorte, jer se njegove mahune prilično dugo mogu čuvati u skladištu. Plodovi su srednje veličine, mesnati i često malo zavinuti, dobre kakvoće ali se teško lome i melju. Mahune dozrijevaju početkom rujna.

Mekiš rogač ima manje plodove, dobre kakvoće, koji nakon sušenja ostaju prilično mekani. Uzgoj ove sorte je proširen na područje Dubrovnika.

Puljiški rogač je sorta podrijetlom iz Italije i jedina je strana sorta rogača u Hrvatskoj. Visoke je rodnosti, mekanog i slatkog ploda, te je najrodnija sorta rogača u nas. Ubraja se u stolne sorte, a plodovi se teško lome i melju. Plod je mesnata, slatka mahuna, nešto manja od Komiškog i Šipanskog rogača. Dozrijeva krajem kolovoza (Miljković, 1991).

2.7. Nutritivni sastav rogača

Proveden je niz istraživanja vezan uz nutritivni sastav ploda rogača, a osobito u zemljama u kojima se rogač uzgaja na plantažama u komercijalne svrhe kao što su Grčka, Turska, Egipat, Maroko, Jordan (Ayaz i sur., 2007; Youssef i sur., 2013; Makris i Kefalas, 2004; El-shatnawi i Ereifej, 2001; El-Hajaji i sur., 2010; Khilfa i sur., 2013; Dakia i sur., 2007; Benchikh i sur., 2014; Khair, 2001). Komercijalno najznačajniji dio ploda, odnosno mahune rogača je pulpa koja, kao što je već rečeno, čini 90 % mase ploda i sjeme koje čini ostalih 10 % mase ploda (Battle i Tous, 1997).

Kemijski sastav ploda varira ovisno o uzgoju i ekološkim uvjetima, sorti, genetskom utjecaju (genetski make-up), podrijetlu i vremenu berbe (Zografakis i Dasenakis, 2000; Orphanos i Papaconstantinou, 1969). Glavne sastavnice ploda rogača (Tablica 1) su ugljikohidrati (monosaharidi, polisaharidi), prehrambena vlakna (topiva i netopiva), proteini i lipidi, koji zajedno čine više od 50 % sastava rogača (Albanell i sur., 1991), zatim aminokiseline i masne kiseline, minerali, vitamini, polifenoli, vlaga (voda) i pepeo (Iipumbu, 2008). Poznato je da je pulpa rogača bogata šećerima (48 – 56 %) (Markis i Kefalas, 2004; Würsh i sur., 1984; Bravo, 1994) a siromašna mastima (Khilfa i sur., 2013). Sjemenka i klica sadrže više masti a manje ugljikohidrata nego pulpa rogača (Hajaji i sur., 2010).

Tablica 1. Sastav ploda rogača (Battle i Tous, 1997; Avallone i sur., 1997; Yousif i sur., 2000;)

Sastavnice	Udio (g/100 g)
Voda	3,6 – 18,0
Proteini	1,0 – 7,6
Masti	0,2 – 2,3
Ugljikohidrati	48,0 – 88,9
Ukupni šećeri	32,0 – 60,0
Prehrambena vlakna	2,6 – 39,8
Polifenoli	0,5 – 20,0
Pepeo	1,0 – 6,0

Obzirom da je plod rogača bogat šećerima koristi se kao zaslađivač u mnogim prehrambenim proizvodima. Od šećera je najviše zastupljena saharoza (32 – 38 %), zatim glukoza (5 – 6 %), fruktoza (5 %) i maltoza (Orhan i Sener, 2002). Nadalje, pulpa sadrži i oko 18 % celuloze i hemiceluloze (Orhan i Sener, 2002). Vlakna ploda rogača bogata su polifenolima te sadrže 24 različita polifenola (Oven i sur., 2003).

Brašno rogača zbog svoje boje i okusa često se koristi kao zamjena za kakao u čokoladi. Prednost rogača u odnosu na kakao može se pripisati činjenici da brašno rogača ne sadrži kofein, teobromin i oksalnu kiselinu (Biner i sur., 2007). Oksalna kiselina u većim količinama može biti toksična za ljude zbog stvaranja bubrežnih kamenaca koji mogu dovesti do ozbiljnih oštećenja bubrega. Istraživanja Khilfa i sur. (2013) vezana su za uporabu brašna ploda rogača kao zamjene za kakao u čokoladnoj industriji i prednosti rogača u odnosu na čokoladu.

Gubbuk i sur. (2010) u svojoj studiji određuju udio masti i masnih kiselina u rogaču i utvrđuju da su najzastupljenije masne kiseline metil esteri oleinske kiseline i linolenske kiseline. Zaključili su da lipidna komponenta rogača sadrži približno jednaku količinu zasićenih i nezasićenih masnih kiselina. U pulpi udio masti, koja je bitan izvor energije i vitamina topljivih u mastima, se kreće od 0.2 do 2.3 g/100 g uzorka. Ulje sjemenki rogača sadrži veliku količinu esencijalnih masnih kiselina (Orhan i Sener, 2012).

Prema Battle i Tous (1997) u plodu rogača je nađeno sedam aminokiselina: alanin, glicin, leucin, prolin, valin, tirozin i fenilalanin. Od njih su tri esencijalne aminokiseline leucin, glicin i valin (Cooper i sur., 2000). Mahuna rogača također sadrži i vitamine A, B₆, C, E, folati, tiamin, riboflavin, niacin i pantotensku kiselinu (Nielsen, 2003).

Sjemenka rogača, kao što je već rečeno, se sastoji od ovojnice (30 – 33 %) i endosperma (42 – 46 %), te klice (23 – 25 %). Visoku viskoznost, kao fizikalno svojstvo mljevenog rogača sa sjemenkama, daju galaktomanani koji se nalaze u endospermu sjemenki rogača. Galaktomanani su polisaharidi sastavljeni od manoze i galaktoze u omjeru 4:1, a u vodi stvaraju otopine visoke viskoznosti. Klica je izrazito bogata proteinima, dok ovojnica sjemenka sadrži antioksidanse (Battle i Tous, 1997).

Sastav rogača ovisi i o ekološkim čimbenicima i uvjetima tla, pa su tako primjećene značajne razlike u udjelu šećera, proteina, masnih kiselina i polifenola između lokaliteta (Vekiari i sur., 2011). Udio proteina kreće se između 1,0 – 7,6 g/100 uzorka ploda, ovisno o sorti, podrijetlu i poljoprivrednoj praksi (Calixto i Cañellas, 1982.; Owen i sur., 2003). Mahuna rogača, koja služi i kao bogati izvor ugljikohidrata, može imati i do 89 g/100 g uzorka, ovisno o sorti, klimi i drugim ekološkim čimbenicima (Biner i sur., 2007).

Plod je također dobar izvor antioksidansa (Makris i Kefalas, 2004). Nositelji antioksidativnih svojstava rogača su polifenoli koji zbog modulacije određenih proteina povoljno djeluju na ljudsko zdravlje (Sakakibara i sur., 2003; Papagiannopoulos i sur., 2004; Owen i sur., 2005), stoga je rogač kao izvor polifenola iznimno vrijedna namirnica. Povoljan učinak uključuje prevenciju koronarnih srčanih bolesti, antialergijski učinak, prevenciju raka i

vazo-relaksaciju (Sakakibara i sur., 2003). Ipak, korištenje sirovog ploda u ljudskoj prehrani je ograničeno zbog veće količine tanina koji mu daju trpkost i gorčinu (Avallone i sur., 1997).

Nova saznanja o kemijskom sastavu rogača otvaraju i razne mogućnosti uklapanja rogača u obrasce zdrave prehrane. Osobito je naglašen značajan antioksidativni potencijal ploda i lista rogača, kao i ovojnice sjemenke. Obzirom da sintetski antioksidansi mogu imati toksično djelovanje, prirodni ekstrakti koji imaju značajniji antioksidativni učinak, kao što je to ekstrakt rogača mogu imati široku primjenu kao nutritivni suplementi (Kumazawa i sur., 2002; Goulas i sur., 2016) te je u tom smislu zanimljivo istražiti mogućnosti rogača kao suhog ekstrakta određenih fizikalno kemijskih karakteristika.

2.8. Uporaba i gospodarski značaj rogača

Plod rogača se koristi u različite svrhe, ali najvažnija uporaba je u prehrambenoj industriji te se od njega dobivaju proizvodi kao karuba guma, šećer, alkohol (Carlson, 1986; Tous i sur., 1992). Svjetska proizvodnja rogača procjenjuje se na oko 310.000 tona godišnje, a glavni proizvođači su Španjolska, Italija, Portugal, Turska, Maroko, Grčka, Cipar (Konate i sur., 2007; Battlle i Tous, 1997; Gubbuk i sur., 2013). Procjenjuje se da je ukupna svjetska proizvodnja rogača oko 188 000 tona godišnje, na površini od 84 000 hektara (FAO, 2011). Za zemlje Evropske unije trenutna proizvodnja iznosi oko 75 % svjetske proizvodnje (Tablica 2).

Rogač se stoljećima upotrebljavao u različite svrhe, a gotovo svi dijelovi biljke su korisni čovjeku. Može se koristiti kora, plod, sjemenka i list rogača. Vrijednost rogača poznavali su i stari Egipćani koji su ga koristili za prehranu, kao zaslađivač, ali i u terapijske svrhe. Korišten je i u mumificiranju, a u grobnicama su nađene mahune i sjemenke rogača. Kora rogača se koristila za proizvodnju ogrijeva, ugljena i oruđa. U bilješkama Grčkog filozofa Teofrasta, rogač se spominje kao „egipatska smokva“, dok su Rimljani jeli zelene i svježe mahune zbog njihove prirodne slatkoće. Brašno rogača mješalo se sa pšeničnim pri pravljenju kruha, a koristilo se i kao krmivo za stoku. Suhe mahune, koje obiluju ugljikohidratima i bjelančevinama, nisu kvarljive, pa ih se cijeno kao osobito prikladnu hranu za pomorce na dugim putovanjima.

Danas se plodovi i sjemenke rogača koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Stabla rogača su također zanimljiva kao ukrasno bilje, za uređenje parkova, okućnica, vrta, za zaštitu od vjetra te za pošumljavanje (Iipumbu, 2008). Vrijedno je i lišće koje se upotrebljava u Turskoj narodnoj medicini kao sredstvo protiv dijareje i kao diuretik. Naime listovi ove biljke imaju visoki udio polifenola sa jakim antidijaroičnim i

antioksidativnim svojstvima i važan su izvor prirodnih antioksidansa (Agullo, 1997; Hajaji i sur., 2010; Hsouna i sur., 2011). Istraživanja pokazuju i mogućnost upotrebe lišća u farmaceutici i medicini, jer spojevi kao što su mitricin, galična kiselina, epigalokatehin-3-galat koji su pronađeni u listu rogača mogu spriječiti rast bakterije *Listeria monocytogenes* koja izaziva bolest listeriozu (Aissani, 2012).

Tablica 2. Glavni proizvođači, područje i količine proizvodnje rogača (Gubbuk i sur., 2013)

Zemlja	Područje (ha)	Proizvodnja (tone)	Postotak ukupne proizvodnje (%)
Italija	9.183	44.749	23,8
Španjolska	43.883	38.380	20,4
Portugal	8.274	31.067	16,6
Grčka	5.284	20.901	11,2
Maroko	9.717	20.489	10,9
Turska	2.910	13.972	7,4
Cipar	1.353	10.560	5,6
Ostale*	3.564	7.802	4,1
Ukupno	84.168	187.920	100

*Alžir, Izrael, Jordan, Libanon, Meksiko

Ipak, rogač je najvažniji u prehrambenoj industriji gdje se njegov plod koristi pri proizvodnji posebnih kruhova i slastica. Plodovi rogača usitnjavaju se, te se odvaja sjeme i slatki viskozni dio, pulpa. Od pulpe ploda dobiva se brašno koje se koristi u prehrambene svrhe. Često se brašno rogača, kao što je već rečeno, koristi kao zamjena za čokoladu, jer ne sadrži kafein i teobromin (Rakib i sur., 2010), a zbog visoke koncentracije šećera smanjuje potrebu za zaslađivačima u nekim prehrambenim proizvodima (Yousif i Alghzawi, 2000; Kumazawa i sur., 2002). Plod rogača koristi se i pri pripremi brojnih napitaka, likera i rakija. Sirup od rogača koji je dobiven ekstrakcijom plodova rogača s vodom je jedno od popularnih napitaka u zemljama kao što je Egipat (Zografakis i Dasenakis, 2000). Pulpa se koristi i kao stočna hrana u proizvodnji krmiva za prehranu stoke, jer joj je hranidbena vrijednost iznad, primjerice, ozimog ječma. Zbog visokog udjela tanina, također se može koristiti za izradu farmaceutskih proizvoda (Kumazawa i sur., 2002).

U Hrvatskoj prerada rogača je uglavnom zanemarena. Jedna od iznimki je otok Vis gdje se uzgaja i prerađuje. U Komiži su višestoljetni nasadi rogača, a komiški rogač autohtona je sorta, poznata po kvaliteti i nazivu tvz. "komiški Veliki ili Tusti rogač". U Komiži se prerađuje rogač već gotovo 50 godina, a i danas postoji mlin za mljevenje rogača kapaciteta 1000 kg na dan. Također, od rogača se radi poznata komiška rakija "Rogačica".

U prehrambenoj industriji najznačajnije su sjemenke rogača koje se melju u brašno od kojeg se dobiva karuba guma, prehrambeni aditiv (E 410), koji se koristi u recepturama raznih prehrambenih proizvoda (Kawamura, 2008) zbog sposobnosti stvaranja viskoznih otopina i stabiliziranja emulzija i disperezija (Macleod i Forcen, 1992). Karuba guma je prirodni, neopasni aditiv, a u prehrambenoj industriji koristi se kao zgušnjivač, emulgator i stabilizator. Upotrebljava se u pekarskim proizvodima, konditorskoj industriji, desertima na osnovi voća i povrća, umacima, u bezalkoholnim osvježavajućim napitcima, koncentratima za juhe i umake, grickalicama od žitarica i kao zamjena za mliječne proizvode. Zbog svoje antioksidativne aktivnosti kao i s obzirom na visok udio prehrambenih vlakana, nisku zastupljenost masti, malu energetsku gustoću, karakterističnu aromu i odsutnost glutena, uporaba brašna rogača u prehrambenoj industriji mogla bi imati širu primjenu, osobito u proizvodnji funkcionalne hrane (Kumazawa i sur., 2002).

Plod rogača je u nekim zemljama u razvoju, kao što je Južna Afrika, lako dostupan, te se u kućanstvima s niskim primanjima, može sakupljati sirov i konzumirati bez prerade kao jeftina ali visoko nutritivna namirnica. Alternativno u takvim prilikama bi se plodovi mogli sakupljati i prodavati pogonima za obradu i proizvodnju hrane, na taj način imati važnu ulogu u poboljšanju prehrambene situacije u zemljama u razvoju (Iipumbu, 2008). U Južnoj Africi, naročito u provinciji Western cape rogač raste obilno (kultivirani i divlji), ali nažalost veliki dio tog vrijednog izvora kvalitetnih nutrijenata uglavnom propada svake godine (Muller, 2005).

2.9. Polifenoli i antioksidativna aktivnost rogača

Istraživanja provedena tijekom protekla dva desetljeća (Avallone i sur., 1997; Owen i sur., 2003; Makris i Kefalas, 2004; 2004a; Gruendel i sur., 2006; Ayaz i sur., 2007; Custodio i sur., 2009 i 2011; Ortega i sur., 2009; Crone i sur., 2009; Hajaji i sur., 2010; Rakib i sur., 2010; Roseiro i sur., 2013; Durazzo i sur., 2014) ukazuju da je rogač, osim prehrambenim vlaknima koja imaju niz fizioloških svojstava, bogat i nekim drugim promotorima zdravlja, odnosno komponentama kao što su fitokemikalije s naglaskom na polifenole.

Polifenoli su vrlo heterogena grupa kemijskih spojeva koja sadrži dvije ili više fenolnih (hidroksibenzenskih) skupina, sveprisutna u biljnim organizmima koji ih sintetiziraju kao sekundarne metabolite tijekom normalnog razvoja kao odgovor na stresne uvjete (ozljede, infekcije, UV zračenje). Ova skupina biljnih metabolita uključuje više tisuća (8000) poznatih spojeva u rasponu od jednostavnih fenolnih kiselina i njihovih derivata, flavonoida, stilbena i kalkona do složenih spojeva promjenjivog sastava kao što su tanini ili trjeslovine. Tanini u

mahunama rogača su visoko polimerizirani (molekularna masa može biti i do 32000), netopivi i pojavljuju se u neporoznoj granularnoj formi (Wursch 1984).

Osim što su esencijalne molekule u fiziologiji biljke, obzirom da su uključeni u funkciju rasta, pigmentacije, rezistencije na patogene kao i u procesu fitoaleksacije (privlače oprašivače), polifenoli zbog svoje specifične biološke aktivnosti imaju antioksidativna (Rice - Evans i sur., 1995), antimutagena (Yomagishi i sur., 2000) antikancerogena (Mukthar i sur., 1992) antiproliferativna (Manthey i sur., 2002) i antiestrogena (Messina i sur., 1991) svojstva.

Dobro je poznato da oksidativni stres može uzrokovati oštećenja stanica i posljedično tome može biti uzrokom različitih bolesti. U tim slučajevima aktivnost endogenih enzimatskih antioksidansa superoksid dismutaze (SOD), glutation peroksidaze (GPx), glutation reduktaze (GR) i katalaze (CAT), nije dovoljna za prevenciju nastanka oksidativnog stresa koji predhodi takvoj bolesti, te je potrebno povećati unos egzogenih antioksidansa. Upotreba sintetičkih antioksidansa koja je uobičajena u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji u novije vrijeme je upitna zbog sve veće ekološke osvješćenosti i moguće toksičnosti nekih suplemenata, ukoliko se unose kumulativno u većim količinama (Valentao i sur., 2002).

Pravilan i kvalitetan unos polifenola prehranom, ima pozitivan učinak na prevenciju kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, nekih vrsta karcinoma, autoimunih bolesti, neurodegenerativnih bolesti (Alzheimer, Parkins), ateroskleroze kao i u procesu starenja (Heinecke, 1997; Moreira i sur., 2005; Naito i sur., 2006; Paz-Elizur i sur., 2008). Zbog toga se preporuča hrana bogata prirodnim antioksidansima, odnosno biljnim namirnicama bogatim polifenolima, a osobito flavonoidima. Kao jedna od takvih protektivnih namirnica mogao bi se koristiti rogač, koji predstavlja jednu ne previše skupu sirovinu bogatu nutritivno iskoristivim komponentama, prehrambenim vlaknima i polifenolima. Nekoliko studija pokazuju da kumulativni unos rogača u prehrani može utjecati na sniženje ukupnog i LDL kolesterola kod pacijenata sa hiperkolesterolemijom (Kumazawa i sur.; 2002, Makris i Kefalas, 2004), ima pozitivivan učinak na metabolizam inzulina i iskoristivost glukoze, te povoljan utjecaj na unos energije i regulaciju tjelesne mase (Gruendel i sur. 2006, 2007a, 2007b). Ekstrakt lista rogača često se koristi u tuniškoj narodnoj medicini kao laksativ, diuretik i u terapiji gastroenteritisa u dojenčadi (Kivcak i sur., 2002).

Galna kiselina kao glavna fenolna komponenta ekstrakta rogača modulira ekspresiju gena (katalaza i superoksid dismutaza) i štiti adenoma stanice od genotoksičnosti vodikovog peroksida (Klenow i sur., 2009). Također je dokazano da galna kiselina, epigalokatehin-3-O-galat (EGCG) i epikatehin - 3 - O - galat (ECG) iz ekstrakta ploda i lista rogača smanjuje, ovisno o dozi, proliferaciju T1 stanične linije mišjeg hepatocelularnog karcinoma. Maksimalni

učinak je pri dozi od 1mg/mL, a dokazana je i indukcija apoptoze nakon 24 h putem direktne aktivacije kaspaze 3 (Corsi, 2002). Koncentracije galne kiseline najveće su u zrelim mahunama rogača (Makris i Kefalas, 2004). Galna kiselina, miricitrin, izokvercetin i EGCG, koji su sastavnice lista rogača, inhibiraju rast *Listeria monocytogenes* pa djeluju bakteriostatski i to tako da inhibiraju bakterijski citoplazmatski enzim, prolin dehidrogenazu (Aissani i sur., 2012). Ekstrakt lista rogača mogući je zaštitni faktor u smanjenju oksidativnog stresa (Hsouna i sur., 2011).

Jednostavni fenoli i polifenoli nađeni u vlaknima rogača potentni su čistači reaktivnih kisikovih spojeva a flavonoidi uz to i inhibitori enzima ksantin oksidaze i ciklosigenaze te inhibitori produkcije citokina, koji su također uključeni u etiologiju karcinoma (Owen i sur., 2003, Soriani i sur., 1998; Wadsworth i Koop, 1999). Na važnost unosa polifenola, uz prehrambena vlakna, ukazuje i inhibicija rasta humane stanične linije adenokarcinoma ekstraktom ploda rogača (Klenow, 2008).

Tijekom dvogodišnjeg istraživanja mahuna, zrna i klica rogača s nekoliko lokaliteta na Siciliji uz makronutrijente određen je i udio ukupnih polifenola i tanina (Avallone i sur., 1997). Koncentracije polifenola i tanina bile su veće u klicama rogača (40.8 mg/g odnosno 16.2 mg/g kondenziranih i 2.98 mg/g hidrolizabilnih tanina) u odnosu na mahune rogača (19.0 mg/g odnosno 2.75 mg/g kondenziranih i 0.95 mg/g hidrolizabilnih tanina). U sjemenkama su ove komponente nađene samo u tragovima što je potvrđeno i u nekim drugim studijama (Lambraki i Karagouni, 1998; Kumazawa i sur., 2002). Novija istraživanja ukazuju na brašno zrna rogača kao vrlo kvalitetnu sirovinu, bogatu prehrambenim vlaknima i polifenolima uz pozitivnu korelaciju između ukupnih polifenola, lignana i antioksidativnog svojstva (Durazzo i sur., 2014). Kemijskom degradacijom tanina nastaju flavanoli, uključujući katehine, epikatehine, epigalokatehine, epigalokatehin galate i epikatehin galate uz još neke jednostavne fenole kao što su fluoroglucinol, pirogalol, katehol i galna kiselina (Lambraki i Karagouni, 1998). Međutim, iako su mahune bogate taninima većina istraživanja svedena je na određivanje udjela tanina u mahuni rogača s vrlo malo definiranja njihove strukture (Silanikove i sur., 2006).

Owen i sur. (2003) smatraju da su vlakna rogača, u odnosu na ostale mediteranske plodove, kao što su npr. masline, bogata fenolnim antioksidansima te sadrže velike količine različitih fenolnih komponenti: jednostavnih fenola (0,079 g/kg), polifenola (1,688 g/kg), slobodnih flavonola i flavanola (0,132 g/kg), glikoziliranih flavonola (0,879 g/kg), izoflavonoida (0,001 g/kg), flavonona (0,019 g/kg) i galotonina (1,150 g/kg). Identificirano i kvantificirano je 24 individualnih struktura čije količine su se kretale od vrlo niskih (izoflavan, genistein, 0.50 mg/kg) do vrlo visokih količina (galna kiselina 1.65 g/kg). Istraživanjem fenolne

frakcije mahune rogača (Corsi, 2002) dobiveno je ukupno 1.36 g/kg fenola s dominacijom galne kiseline od 88 % i sa relevantnim doprinosom katehina, epigalokatehina i epikatehin galata. Sakakibara i sur. (2003) dobivaju vrlo slične rezultate ali sa znatno nižim prinosom fenolnih spojeva (0.23 g/kg). Također je istaknuta dominacija galne kiseline (91%) sa manjim prinosom kvercetin glukozida, katehina i elagične kiseline. Glavne razlike u rezultatima dobivenim iz studija Owena i sur. (2003), Corsi i sur. (2002) i Sakahibara (2003) su u varijabilnosti i količini ekstrahiranih fenolnih spojeva. To se može tumačiti različitošću ekstrakcije odnosno ovisno o tome da li su ekstrahirane mahune rogača ili u vodi netopiva vlakna (Corsi i sur., 2002) kao i razlikama u otapalima, vremenu i temperaturama prilikom ekstrakcije (Makris i Kefalas, 2004). Obzirom da varijabilnost literaturnih podataka o strukturi i ukupnom udjelu polifenola u rogaču, bilo u plodu ili listu, ovisi osim o geografskom podrijetlu, klimatskim faktorima, spolu drva rogača i o ekstrakciji, relativno dosta je istraživanja vezano i uz metode ekstrakcije (Vekiari i sur., 2011; Custodio i sur., 2011; Ouzounidou i sur., 2012; Bernardo-Gill i sur., 2011).

Plodovi rogača iz Anatolije su dobri izvori polifenola (13.51 mg ekvivalent galične kiseline (GAE)/g suhe tvari), proantocijanidi (0.36 mg GAE/g suhe tvari), galatonina (0.41 katehin ekvivalent (CE)/g suhe tvari) i flavanola (3.21 mg CE/g suhe tvari proteina) (Ayaz i sur., 2007). Nutritivnim sastavom vrlo su slični plodovima grčkih rogača (Makris i Kefalas, 2004; Vekiari i sur., 2011). Također je istražen utjecaj spola i kultivara na antioksidativnu i citotoksičnu aktivnost portugalskih rogača (Custodio i sur., 2011b). Ekstrakti dobiveni iz plodova rogača (6 ženskih i 2 hermafrodita) bogati su ukupnim polifenolima (osobito katehinom i galnom kiselinom), pokazuju jaku antioksidativnu aktivnost i utječu na smanjenje vijeka trajanja života različitih humanih kancerogenih stanica. Spol i kultivar značajno utječu na kemijski sastav i biološku aktivnost ekstrakata. Ekstrakti iz hermafroditnih mahuna imaju veći udio fenolnih komponenti i pokazuju jaču antioksidativnu i citotoksičnu aktivnost. I brašno sjemenki ovih istraživanih kultivara rogača, smatraju autori, također je značajan izvor polifenola (19,8 – 32,9 mg GAE/g), flavonoida (10,8 – 22,3 mg CE/g) i tanina (1,9 – 6,8 mg RE/g) i ima visoku antioksidativnu aktivnost koja, zaključuju autori značajno ovisi o kultivaru (Custodio i sur., 2011 a).

Iako su istraživanja vezana uz plod rogača brojnija, radovi, osobito noviji, ukazuju na list rogača kao važan izvor prirodnih antioksidansa zbog visokog udjela polifenola s jakim antiradikalnim i antioksidacijskim kapacitetom i reducirajućim svojstvima (Vaya i Mahmood, 2006; Custodio i sur., 2009; Hajaji i sur., 2010; Eldahshan, 2010). Dokazana je antioksidativna i citotoksična aktivnost etanolnog ekstrakta lista rogača na staničnim linijama sisavaca koja je bila izraženija na humanim staničnim linijama (Nagib i sur., 2010).

2.10. Makro i mikroelementi rogača

Relativno malo istraživanja je provedeno vezano uz mineralni sastav ploda i lista rogača. Rezultati dosadašnjih studija (Correia i Martins-Loucao, 1997; El-Shatnawi i Ereifej, 2001; Custodio i sur., 2007; Ayaz i sur., 2007; Gubbuk i sur., 2010; Khelifa i sur., 2013; Kamal i sur., 2013; Oziyci i sur., 2014; Fidan i Sapundzhieva, 2015) ukazuju na značajan udio ovih izuzetno važnih mikronutrijenata, za biljne organizme. Makroelementi (K, Ca, Mg, P, N, S) i mikroelementi (Fe, Na, Mn, Zn, Cu, B, Mo, Cl, Ni, Na, Si, Co, Se) iako prisutni u malim količinama u biljkama (oko 5 %) i bez obzira da li se radi o esencijalnim ili samo korisnim elementima, sudjeluju u nizu metaboličkih procesa odnosno u regulaciji brojnih fizioloških funkcija u biljci (kofaktori pri mnogim enzimskim reakcijama, procesu staničnog disanja, fotosintezi, esencijalni za rast biljke, sintezi proteina).

Originalne studije na humanim i životinjskim organizmima pokazuju da optimalni unos elemenata kao što su natrij, kalij, magnezij, bakar, cink i jod mogu reducirati neke od rizičnih faktora raznih bolesti uključujući i kardiovaskularne bolesti (Mertz, 1982; Sanchez-Castillo i sur., 1998). U svjetskim razmjerima veliki je interes za prehrambene minerale i njihovu ulogu u prevenciji raznih bolesti a u današnje vrijeme je i u potpunosti poznata i relativno dobro usvojena važnost unosa biljnih namirnica bogatih ovim mikronutrijetima svakodnevnom prehranom. Brašno rogača može se svrstati u namirnice koje svojim dobrim nutritivnim (ugljikohidrati, proteini, masti) i protektivnim sastavom (prehrambena vlakna, polifenoli...) sadrži i značajne količine minerala (Ayaz i sur., 2007; Custodio sur., 2007; Khelifa i sur., 2013; Youssef i sur., 2013; Ozyci i sur., 2014; Fidan i Sapundzhieva, 2015).

Kratkim pregledom nekih istraživanja (Calixto i Canellas, 1982; Petit i Pinilla, 1995; Batlle i Tous, 1997) mineralnog sastava plodova i listova rogača može se zaključiti da je udio pojedinih makro i mikroelemenata vrlo varijabilan za što može biti odgovoran cijeli niz endogenih i egzogenih odnosno ekoloških čimbenika kao što su:

temperatura – utječe na sve fiziološko-biokemijske procese kod biljaka pa tako i na usvajanje iona (iako varira ovisno o vrsti iona uočeno je da apsorpcija dostiže svoj maksimum između 15 – 25 °C. Kod optimalnih temperatura brža je apsorpcija iona i brža sinteza spojeva u koju su uključeni usvojeni ioni (Vardar i Ozturk, 1972; Cornic, 2003; Pietro i sur., 2009, Ouzounidou i sur., 2012, Nunes i sur., 1992; Fidan i Sapundzhieva, 2015).

svjetlost – optimalni intenzitet osvjetljenja za usvajanje iona ovisi o svojstvima iona i biološkim karakteristikama (osobinama) biljke (Bates, 1971; Ouzounidou i sur., 2012).

vrsta tla, pH, salinitet, navodnjavanje i fertilizacija tla – mineralni profil tla odnosno dostupnost i raspoloživost pojedinih iona u tlu kao i kiselost ili lužnatost tla na kojem biljka raste iako pojedine vrste biljaka imaju specifične nutritivne zahtjeve i različitu toleranciju na višak minerala u tlu (Pugnaire i Chapin, 1992 i 1993; Correia i Martinis-Loucao, 1997; Ouzounidou i sur., 2012, El-Dengawy i sur., 2011; Oziyci i sur., 2014).

Varijabilnost može biti posljedica i genetske različitosti odnosno specifičnosti. Poznato je da biljke ne apsorbiraju i kumuliraju ione u istom odnosu i količini koja je dostupna iz okruženja u kojem se razvijaju, nego u određenim odnosima koji su specifični za pojedinu biljnu populaciju. Također na varijabilnost može utjecati raznolikost spola (muški, ženski ili hemafrodit) a isto tako su primjećene razlike između divljih i kultiviranih (cijepljenih) populacija (Custodio i sur., 2007; Oziyci i sur., 2014)

Saznanja o utjecaju ovih parametara na promjene mineralnog sastava ploda ili lista rogača vrlo su oskudna, iako se u novije vrijeme može primjetiti određeni porast interesa za istraživanje ovog područja.

Utjecaj navodnjavanja i prihrane dušikom na koncentracije dušika, fosfora i kalija u listu jedne sorte portugalskog rogača praćen je tijekom četverogodišnjeg vegetativnog razdoblja s obzirom na nekoliko pretpostavki: koncentracija N, P i K se povećava dugotrajnom upotrebom prihrane dušikom i navodnjavanja; povezanost koncentracije nutrijenata u listu vegetativnog i reproduktivnog rasta; obogaćivanje dušikom i navodnjavanje utječe na ravnotežu N i drugih nutrijenata; dugotrajno navodnjavanje i obogaćivanje tla dušikom utječe na retranslokaciju nutrijenata i potiče opadanje lišća tijekom jakih suša koje su izvan uobičajenih ljetnih sušnih razdoblja. Rezultati studije pokazuju da porast koncentracije N u listu ne ovisi o količini prihrane rogača dušikom. Translokacija K neovisna je o primjenjenom postupku. Navodnjavanje nema bitan utjecaj na mineralni sastav lista ali utječe na količinu otpalog lišća (Correia i Martins-Loucao, 1997). Istraživanja nutritivnog sastava rogača iz Anatolije u Turskoj (Ayaz i sur 2007) obuhvaćaju četiri makroelementa (Ca, P, K i Mg) i četiri mikroelementa (Fe, Cu, Mn i Zn). Najveća je zastupljenost K uz velike količine Ca. Razine P i Mg su značajno niže ali unutar raspona količina tih elemenata u nekom drugom voću (jabuka, dunja, smokva, datulja, mušmula, kivi) kod kojih je K također najzastupljeniji. Ukupni udio makroelemenata u rogaču vrlo je sličan količinama u drugim voćkama, ali su primjećene znatne razlike u razinama pojedinih elemenata. Obzirom na mikroelemente najzastupljeniji su Fe i Mn uz značajne količine Cu i Zn. Željezo je također najzastupljeniji mikroelement u ostalim istraživanim voćkama.

Mineralni sastav cvjetova i sezonska kolebanja makroelemenata (N, P, K, Ca i Mg) i mikroelemenata (Fe, Mn, Zn i Cu) u listovima muških, ženskih i hermafroditnih stabala rogača pratili su Custodio i sur. (2007) obzirom da dinamika nutrijenata nije vezana samo za fenološki utjecaj već i za spol biljke. Rezultati su pokazali da listovi sa stabala ženskog spola sadrže više makroelemenata a manje mikroelemenata nego listovi sa stabala muškog spola. Hermafroditi imaju niže koncentracije makro i mikroelemenata u odnosu na oba spola. Cvjetovi ženskog spola imaju u pravilu niže koncentracije istraživanih elemenata u odnosu na muške cvjetove i hermafrodite. U odnosu na listove cvjetovi imaju veću koncentraciju N, P i K i nižu koncentraciju Mn. Khelifa i sur. (2013) u svojoj studiji o kemijskom sastavu i karakteristikama rogača sa sjevera Maroka ističu da mahune rogača sadrže relativno velike količine makronutrijenata (proteina, ugljikohidrata, prehrambenih vlakana) i polifenola, a osim značajnih količine K i Ca (1003,5 odnosno 268,57 mg/100g) u zadovoljavajućim količinama i Mg, P, Na, Fe, Zn, Mn i Cu. Rađena je usporedba udjela makro (N, P, K, Ca i Mg) i mikroelemenata (Cu, Fe, Mn i Zn) u mahunama i sjemenkama divljih i kultiviranih genotipova rogača na području Antalije u Turskoj (Gubbuk i sur., 2010; Oziyci i sur., 2014). Koncentracije N i K u mahuni divljih genotipova bile su značajno više nego u kultiviranih. Značajne su razlike između dijelova ploda (mahuna i sjemenka) i genotipa rogača (divlji i kultivirani). Veći udio analiziranih makro i mikroelemenata nađen je u sjemenkama kultiviranih rogača. Najveće količine K nađene su u mahunama divljih rogača. U odnosu na mahune udio Fe, Mg i Zn kao i ukupnog N je viši u sjemenkama uzgojenih i divljih rogača.

U svojoj studiji, koja obuhvaća određivanje kemijskog sastava i nutritivnog statusa rogača s područja Asuana (Egipat), Kamal i sur. (2013) ističu brašno rogača kao bogati izvor Na, K, P, Ca, Fe i S. Količine Mn, Zn, Fe, Cu i Se kreću se u granicama očekivanog za mikroelemente. Fidan i Sapundzhieva (2015) prate udio minerala u mahunama, zrnu i brašnu cijepljenih (kultiviranih) rogača skupljenih na području Mersina u Turskoj. Rezultati pokazuju da postoje značajne razlike u koncentracijama istraživanih minerala (Mg, Fe, Mn, Cu, Zn i Se) kako između pojedinih dijelova rogača (mahuna - zrno) tako i u odnosu na sirovo brašno rogača. Sjemenke rogača imaju značajno veće koncentracije svih istraživanih makro i mikroelemenata (osobito Mg i Mn), osim Se čiji je udio jednak u sva tri analizirana uzorka. Autori zaključuju da se plod i brašno rogača obzirom na svoj vrlo povoljan mineralni sastav mogu preporučiti kao dobar suplement u zdravoj humanoj prehrani.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

Morfološka, genetska, i fitokemijska istraživanja provedena su na plodovima i listovima iz 12 populacija ženskih stabala rogača na otocima i priobalju južnog dijela Hrvatske: Šolta, Brač (Mirca), Podgora, Hvar (Sućuraj), Vis (Komiža), Pelješac (Orebić), Lastovo, Mljet, Korčula (Prižba), Šipan, Orašac i Molunat (Slika 2). Najviše nadmorske visine je lokalitet Molunat (120 m) dok je najmanje otok Šolta (6 m) (Tablica 3.).

Tablica 3. Geografske karakteristike istraživanih hrvatskih populacija rogača

Populacija	Kratica	Zemljopisna dužina	Zemljopisna širina	Nadmorska visina (m)
Šolta	So	43 23'45.7"	16 18'15.8"	6
Brač	Br	43 22'47.8"	16 31'00.9"	34
Podgora	Po	43 14'41.2"	17 04'36.5"	17
Hvar	Hv	43 07'30.1"	17 11'45.8"	11
Vis	Vi	43 02'34.0"	16 06'22.4"	96
Pelješac	Pe	42 58'30.1"	17 09'55.9"	18
Lastovo	La	42 46'06.9"	16 53'54.4"	101
Mljet	Mlj	42 46'04.6"	17 23'26.9"	13
Korčula	Ko	42 45'32.2"	16 31'10.9"	17
Šipan	Si	42 42'42.6"	17 54'56.9"	48
Orašac	Or	42 41'48.6"	18 01'10.9"	16
Molunat	Mo	42 27'11.1"	18 25'55.3"	120

Prikupljanje je provedeno tijekom razdoblja cvatnje u rujnu 2012 godine kada su plodovi običnog rogača postigli fiziološku zrelost. U svakoj populaciji odabrano je nasumičnim izborom po deset odraslih stabala rogača, te su sa svakog stabla prikupljeni listovi i plodovi



Slika 2. Lokaliteti istraživanih populacija rogača

(mahune) rogača. Uzorci su prikupljeni sa soliternih stabala, izraslih na osami, koja mogu razvijati krošnju u skladu sa svojim genotipom i koja nisu jako izložena utjecaju kompeticije kao što je to kod stabala u sastojinama koja se moraju prilagoditi okolišu i oblikovati svoj fenotip u skladu s raspoloživim uvjetima. Stabla izrasla na osami primaju i najveću (najpovoljniju) količinu svjetlosti, što je vrlo važno za razvitak te heliofilne vrste. Uzorci su prikupljeni za sunčanih dana te pomiješani da se dobiju slučajno odabrani uzorci iz svake populacije.

Za analizu genetičkog materijala uzeti su listovi koji su *in situ* sakupljeni od istih biljaka s kojih su sakupljeni uzorci za morfometrijska i fitokemijska istraživanja. Uzorci listova uzeti za DNA analizu stavljeni su u PVC vrećice zajedno sa silikagelom (koji ima veliki apsorpcijski kapacitet pa je vrlo djelotvorno sredstvo za vezanje vode), kako bi se što brže osušili te se na taj način smanjila degradacija genomske DNA. Na vrećice je zapisana lokacija, datum uzimanja uzoraka te redni broj. Označeni uzorci su dobro zatvoreni i stavljeni u ručni prenosni hladnjak te su u kratkom roku prevezeni do laboratorija. Uzorci su potom spremljeni u ultra duboki zamrzivač na -80°C do početka analize.

Za morfometrijska i fitokemijska određivanja uzorci listova su uzimani s istog dijela krošnje (vanjskog) i s približno iste visine u sredini krošnje obzirom da je predviđena statistička obrada morfometrijskih svojstava lista, odnosno primjena komparativne statističko-varijacijske

analize. Prikupljeni lisni materijal je in situ herbariziran. Voucher primjerci su pohranjeni u Herbariju "Fran Kuša" (HFK-HR) Zavoda za farmaceutsku botaniku, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci mahuna rogača su pohranjeni u označene papirnate vrećice i u zatvorenim tamnim spremnicima dopremljeni u laboratorij Zavoda za kemiju prehrane Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na daljnju obradu.

Za fitokemijska istraživanja uzorci listova su sušeni 24 h na 60 °C, zatim mljeveni u laboratorijskom mlinu i homogenizirani. Plodovi rogača su sušeni u tamnoj prostoriji pri sobnoj temperaturi od 22 °C i pri 60 % relativne vlažnosti zraka te je nakon ručnog usitnjavanja i uklanjanja sjemenki pulpa rogača mljevena u mlinu. Do trenutka analize svi uzorci su pohranjeni u polietilenske spremnike zaštićeni od svjetla na 4 °C.

3.2. Instrumenti i uređaji

- Analitička vaga (AB265-S, Mettler Toledo, Indija)
- Destilacijski sustav (Milestone SubPUR/DuoPUR Sorisole, Italija)
- Digitalno pomično mjerilo s preciznošću od 1/10mm (J. Enterprises, Japan)
- Fluorometar VersaFluor™ (Bio-Rad, Njemačka)
- Genetički analizator (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems®)
- Jedinica za mikrovalno spaljivanje (MLS – 1200 Mega Microwave Processor, Milestone, Sorisole, Italija)
- Laboratorijski mlin (Foss-CT 193 Cyclotes, Švedska)
- Laboratorijska peć (Over industrijska elektronika, Sv. Nedjelja, Hrvatska)
- Oscilatorni mlin (Mixer Mill MM200, RETSCH)
- pH metar s kombiniranom staklenom elektrodom (Metrohm, Herisau, Švicarska)
- Rotavapor R 200 (Švicarska)
- Soxhlet aparatura (Behr Labortechnik, Düsseldorf, Njemačka)
- Spektroskop masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS), AgilentTechnologies 7500cx (AgilentTechnologies, Waldbronn, Njemačka)
- UV- spektrometar UV 4- 100 ATI Unicam (Cambridge, Velika Britanija)
- Vortex mješalica, VTY-3000L (Mixer Usuzio, Takyo, Japan)
- TKAGenPureUltrapuresustav (TKA Niederelbert, Njemačka)
- Termo-ciklički uređaj (Thermalcycler Veriti Applied Biosystems, SAD)
- Termostatirana kupelj s mućkalicom 1086 (Burgwedel, Njemačka)

3.3. Reagensi

- Aluminijev klorid heksahidrat, p.a. (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Etanol, p.a. (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Folin Ciocalteu reagens (Fluka, Buchs, Švicarska)
- Kalijev persulfat, p.a. (Sigma, St. Luis, SAD)
- Kloridna kiselina, p.a. (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Metanol, p.a. (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat, p.a. (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid, p.a. (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev nitrit, p.a. (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Nitratna kiselina 65 % , suprapur (pročišćena pomoću destilacijskog sustava)
- Petroleter, p.a. (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- TPTZ / 2,4,6-tri-(2-piridil)-s-triazin/ (Fluka, Buchs, Švicarska)
- Željezo (III) klorid heksahidrat, p.a. (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

3.4. Pufferi i otopine

- Acetatni puffer 0.3 mol/L za pripremu FRAP reagensa: 50 mL 0.3 mol/L octene kiseline i cca 4 mL 0.3 M NaOH (pH podesiti na 3.6)
- Agarozni gel 0.8 % u 0.5 x TBE pufferu (45 mM tris-borata i 1 mM EDTA, pH 8)
- FRAP reagens: 25 mL acetatnog pufera, 2.5 mL otopine FeCl₃ i 2.5 mL 20 mM TPTZ-a
- Komercijalni komplet (kit) za izolaciju DNA iz biljnog tkiva (Qiagene gel extraction kit Miniprep kit DNeasy plant Mini kit – Qiagen)
- Otopina ABTS radikala /2,2' – azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) radikal kation/: 7 mmol/L vodena otopina ABTS -a i 2.45 mmol/L vodene otopine K₂S₂O₈ pomiješati u jednakim omjerima. Trenutačno započinje reakcija stvaranja ABTS radikala što se očituje pojavom zeleno plavog obojenja. Reakcija završava, odnosno konačni intenzitet obojenja se postiže nakon 12 sati stajanjem na hladnom i tamnom mjestu. Otopina se razrjeđuje destiliranom vodom tako da je apsorbancija mjerena na 723 nm 0.700 ± 0.02 (1mL + cca 40mL vode)
- Otopina DPPH (2,2-difenil 1-pikrilhidrazil): 1,8 mg DPPH otopiti u 25 mL metanola. Svaki dan svježe pripremiti
- Pročišćena voda (pročišćena pomoću destilacijskog sustava TKAGenPure Ultrapure sustava (TKA Niederelbert, Njemačka) sa specifičnom otpornošću od 18,2 MΩ*cm

- Za izradu internih standarda korištene su standardne otopine pojedinačnih istraživanih elemenata (1000 ± 7 mg/L u 4-10 % HNO_3 ili 20 % HCl ; SPCscience, Quebec, Kanada).
- TPTZ reagens: otopiti 124.9 mg TPTZ-a u 20 mL 40 mmol/L HCl . Priprema se svježe svaki dan. Ukoliko se dnevno radi veliki broj uzoraka priprema se više puta.

3.5. Morfološka i genetska određivanja

Varijabilnost rogača može se prikazati pomoću morfoloških i molekularnih karakteristika biljke. Unutar populacija napravljena je evaluacija morfoloških značajki, a zatim se na temelju tih rezultata uspoređuju pojedine populacije da bi se u konačnici morfološke značajke koristile u procjeni i utvrđivanju različitosti između populacija. Pojedina svojstva razvijaju se pod kontrolom većeg ili manjeg broja nasljednih faktora (gena) unutar određenih uvjeta okoline. Danas se zna da su pojedina svojstva pod kontrolom malog broja gena (kvalitativna svojstva) te je njihovo nasljeđivanje predvidivo, dok su druga pod kontrolom velikog broja gena i značajnom utjecaju okoline (kvantitativna svojstva), te prilikom nasljeđivanja takvih svojstava nije jednostavno predvidjeti intenzitet i smjer tog svojstva u potomstvu (Pejić i sur., 1992).

3.5.1. Morfometrijska analiza

Mjerenje morfoloških značajki provedeno je na 10 plodova i 10 listova sa svakog od 10 stabala rogača s 12 lokaliteta (ukupno 1200 plodova i 1200 listova). Svakom plodu je izmjerena njegova dužina, širina, debljina i masa a vrijednosti su izražene u milimetrima odnosno gramima. Također je izmjerena i dužina peteljke ploda te utvrđen broj sjemenki u svakoj mahuni. Sjemenkama (3000 sjemenki) je također određena masa, dužina, širina i debljina. Svakom listu nakon što su izbrojane liske, izmjerena je dužina i širina, dužina glavne peteljke lista, te dužina, širina i dužina peteljčice svake liske. Mjerenja navedenih svojstava ploda provedena su na svježim uzorcima a lista na herbariziranom materijalu upotrebom digitalnog pomičnog mjerača s preciznošću od jedne stotinke milimetra i milimetarskog papira.

3.5.2. Genetska analiza

Izolacija molekule DNA

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, Polimorfizam dužine umnoženih fragmenata) analiza provedena je na uzorcima listova rogača prikupljenih na 12 lokacija. Neposredno prije izolacije DNA, uzorci listova rogača su izmrvljeni u fini prah oscilatornim mlinom. (Mixer Mill MM200, RETSCH)

Izolacija DNA izvedena je pomoću komercijalnog kompleta (kita) za izolaciju DNA iz biljnog tkiva (Qiagene gel extraction kit Miniprep kit DNeasy plant Mini kit - Qiagen). Postupak izolacije DNA proveden je prema protokolu priloženom u kompletu, s razlikom da se u izolaciji nije koristilo svježe već liofilizirano, izmrvljeno biljno tkivo (30 mg/uzorku). Kvaliteta izolirane DNA utvrđena je elektroforezom u 0.8 % agaroznom gelu u 0.5 X TBE puferu (45 mM tris-borata i 1mM EDTA, pH 8) (Bolarić i sur., 2005a), dok je količina izolirane DNA određena fluorometrijski (VersaFluor, BioRad). Nakon određivanja količine izolirane DNA, uzorci su za daljnje analize razrijeđeni u ultra čistoj (*milliQ*) vodi na radnu koncentraciju od 50 ng/μL.

AFLP analiza

AFLP tehnika bazira se na amplifikaciji podskupova genomskih restrikcijskih fragmenata pomoću metode lančane reakcije polimerazom (PCR, Polymeraze Chain Reaction). AFLP analiza rogača izvedena je prema metodi Vos i sur. (1995).

Za digestiju DNA molekule korištena su dva restrikcijska enzima, pomoću kojih je DNA isječena na fragmente različitih duljina. *EcoRI* koji reže veće fragmente molekule (rijetki rezač) i *MseI* koji reže manje fragmente DNA (česti rezač). Zatim su postupkom ligacije na krajeve endonukleazama isječene DNA, pomoću enzima ligaze vezani oligonukleotidni adapteri [*EcoRI*-adapter (*EcoA*) i *MseI*-adapter (*MseA*)] (Tablica 4).

Tablica 4. Kombinacije početnica adaptera korištenih u AFLP analizi

Naziv adaptera		Sekvenca adaptera
EcoA:	EcoA1	5' CTC GTA GAC TGC GTA CC 3'
	EcoA2	5' AAT TGG TAC GCA GTC 3'
MseA:	MseA1	5' GAC GAT GAG TCC TGA G 3'
	MseA2	5' TAC TCA GGA CTC AT 3'

Predselektivna amplifikacija provedena je s kombinacijama početnica koje su komplementarne sa oligonukleotidnim slijedom (sekvencom) adaptera s po jednim dodatnim

selektivnim nukleotidom (E01/M01 i E01/M02) (Tablica 5). Predselektivna amplifikacija provedena je na ukupno 240 uzoraka (120 biljaka × 2 kombinacije početnica). Predselektivna amplifikacija je izvedena u ukupnom volumenu od 20 µL, a PCR reakcija sadrži 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0,25 µM svake kombinacije početnica, (E01/M01 odnosno E01/M02), 0,2 mM dNTP, 0,5 Taq DNA polimeraze i 2 µL DNA molekule nakon restrikcije i ligacije. PCR reakcija je provedena u thermal cycler-u Veriti (Applied Biosystems) uređaju.

Uvjeti PCR-a bili su sljedeći: jedan korak na 72°C 2 min., jedan korak na 94 °C 5 min., 20 ciklusa [94 °C 20 sec. (denaturacija), zatim 56 °C 30 sec. (nalijeganje kombinacije početnica), te 72 °C 2 min. (polimerizacija)] i na kraju 30 min. na 60 °C. Smjesa umnoženih DNA fragmenata je nakon predselektivne amplifikacije razrijeđena u T₁₀E_{0,1} puferu u omjeru 1:25 i tako razrijeđena korištena u selektivnoj amplifikaciji.

Selektivna amplifikacija izvedena je s četiri kombinacije primera [(E36/M46, E36/M36, E45/M46, E45/M36; Applied Biosystems) (Tablica 5.)] koji su odabrani od ukupno 10 ispitanih kombinacija početnica na temelju njihove polimorfnosti i stabilnosti. Selektivna amplifikacija provedena je na ukupno 512 uzoraka {[120 biljaka + 8 kontrola (2 pozitivne i 2 negativne kontrole unutar platea-a, 2 pozitivne i 2 negativne kontrole između platea)] × 4 kombinacije početnica}. Selektivna amplifikacija je izvedena u ukupnom volumenu od 20 µL PCR. Reakcija selektivne amplifikacije sadrži 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,25 mM svake od kombinacije početnica od kojih je jedna početnica označena fluorescentnom bojom (6 FAM ili VIC), 0,5 U Taq DNA polimeraze i 5 µL razrijeđene predamplificirane DNA.

Tablica 5. Kombinacije i sekvence početnica korištenih u predselektivnoj i selektivnoj amplifikaciji i njihove sekvence

Kombinacije početnica u predselektivnoj amplifikaciji		
E01/M01	E*+A/M**+A	
E01/M02	E+A/M+C	
Kombinacije početnica u selektivnoj amplifikaciji		
	Boja	
E36/M46	E*+ACC/M**+ATT	VIC
E36/M36	E+ACC/M+ACC	VIC
E45/M46	E+ATG/M+ATT	6 Fam
E45/M36	E+ATG/M+ACC	6 Fam

*E = 5' GAC TGC GTA CCA ATT C 3'; **M = 5' GAT GAG TCC TGA GTA A 3'

PCR reakcija je također provedena u thermal cycleru Veriti, prema *touchdown* protokolu sljedećim redosljedom: 10 ciklusa (20 sec. na 94 °C, zatim 30 sec. na 66 °C, 2 min.

na 72 °C, gdje je svakim ciklusom temperatura 11 ciklusa gdje je temperatura nalijeganja početnica bila smanjena za 1 °C. Nakon toga je izvršeno 20 ciklusa amplifikacije (20 sec. na 94 °C, zatim 30 sec. na 56 °C i 2 min na 72 °C), i na kraju 30 min. na 60 °C.

Razdvajanje i vizualizacija umnoženih AFLP fragmenata provedena je četverokapilarnom elektroforezom (Genetic Analyzer, 3130, *Applied Biosystems*). Očitavanje fragmenata AFLP u obliku pikova provedena je pomoću programskog paketa GeneMapper (Ver. 4.0) (*Applied Biosystems*®). Postavke u „*Analysis Method Editor*“-u programskog paketa GeneMapper 4.0 su: *Analysis Range* (bps) Start 80 End 600. Na bazi podataka o veličini i visini dobivenih pomoću softwera Gene Mapper 4.0, AFLP fragmenti dodatno su pročišćeni pomoću softvera scan AFLP (Herrmann i sur., 2010). Scan AFLP-om provjerava se pouzdanost fragmenata AFLP očitanih *Gene Mapper*-om. Pouzdanost očitanih fragmenata provjerava se na slijedeći način:

- (1) odbacuju se AFLP fragmenti koji nisu ponovljivi u pozitivnim kontrolama i oni koji su prisutni u negativnim kontrolama,
- (2) odbacivanje peak-ova čija je visina niža od zadanog praga [u ovoj statističkoj analizi prag iznosi 50 RFU (eng. Relative Fluorescence Units)],
- (3) odbacuju se AFLP fragmenti čija je visina pika niža od visine najnižeg pika, a također su niži od najviših detektiranih pikova za 10 %,
- (4) pomoću tog softwera automatski se izračunava koeficijent variranja (CV) visine pik-ova, te se AFLP fragmenti čiji je koeficijent variranja pikova veći od zadanog također brišu.

Nakon primjene softvera scan AFLP kreirana je binarna matrica (prisutnost AFLP fragmenata označena je sa 1 a njegova odsutnost s 0). Dobivena binarna matrica korištena je u statističkim analizama.

Informacijski sadržaj polimorfizma (PIC)

Informacijski sadržaj polimorfizma (PIC, *polymorphism information content*) za svaku kombinaciju početnica računa se prema formuli opisanoj prema Roldan-Ruiz i suradnici (2000).

$$PIC_i = 2f_i(1 - f_i)$$

PIC_i = informacijski sadržaj polimorfizma kombinacije početnica

f_i = frekvencija prisutnih AFLP fragmenata

$1-f_i$ = frekvencija odsutnih AFLP fragmenata

Vrijednost PIC za dominantne markere iznosi maksimalno 0,50 za $f_i = 0,50$ (De Riek i sur., 2001).

Koeficijent različitosti između parova individua

Na bazi binarne matrice izračunata je kvadratna Euklidska udaljenost (Excoffier i sur., 1929) za sve parove individua rogača, te je na taj način dobivena matrica različitosti. Matrica različitosti korištena je u analizi molekularne varijance (AMOVA, *Analysis of Molecular Variance*).

Molekularna analiza varijance

Molekularna analiza varijance se koristi za procjenu i razdiobu ukupne fenotipske varijance na varijancu unutar i između populacija. Komponente varijance procijenjene su prema modelu prikazanom u Tablici 6. (Excoffier i sur., 2005). Razina značajnosti procijenjene komponente varijance izvedena je postupkom neparametrijske permutacije (1000 permutacija). U analizi molekularne varijance korišten je program AMOVA unutar softverskog paketa Arlequin ver. 3.5.2.2. (Excoffier i Lischer, 2010).

Tablica 6. Model hijerarhijske analize molekularne varijance na razini populacija

Izvori variranja	n-1	Komponente varijance	% ukupne varijance	Φ
Između populacija	P-1	$b=(n\sigma_b^2 + \sigma_c^2)$	$\sigma_b^2=(b/d)\times 100$	$\phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma_T^2}$
Između individua unutar populacija	N- Σ P	$c=(\sigma_c^2)$	$\sigma_c^2=(c/d)\times 100$	
Ukupno	(N-1)	$d=(b+c)$	$\sigma_T^2 = \sigma_b^2 + \sigma_c^2$	

U analizi međupopulacijske udaljenosti izračunate su Φ_{ST} -vrijednosti koje predstavljaju udio varijance između populacija u ukupnoj varijanci, a mogu poslužiti kao mjerilo udaljenosti populacija (Huff i sur., 1993). Također, Φ_{ST} -vrijednosti su izračunate pomoću računalnog programa Arlequin ver. 3.5.2.2. (Tablica 7.).

Na temelju Φ_{ST} -vrijednosti izvedena je klaster analiza bazirana na UPGMA (eng. *Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Averages*).

U analizi molekularne varijance i međupopulacijske udaljenosti (Φ_{ST} -vrijednosti) korišten je program AMOVA unutar softverskog paketa Arlequin ver. 3.5.2.2. U provedbi klaster analize korišten je softver statističkog programa NTSYSpC 2.21L (Rohlf, 2008).

Tablica 7. Model hijerarhijske analize molekularne varijance na razini grupa populacija

Izvori variranja	n-1	Komponente varijance	% Ukupne varijance	Φ
Između grupa	P-1	$a=(n''\sigma_a^2+n'\sigma_b^2+\sigma_c^2)$	$\sigma_a^2=(a/d)\times 100$	$\phi_{CT} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}$
Između populacija unutar grupa	$\Sigma S-P$	$b=(n\sigma_b^2+\sigma_c^2)$	$\sigma_b^2=(b/d)\times 100$	$\phi_{SC} = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_b^2 + \sigma_c^2}$
Između individua unutar populacija	$N-\Sigma P$	$c=(\sigma_c^2)$	$\sigma_c^2=(c/d)\times 100$	$\phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma_T^2}$
Ukupno	(N-1)	$d=(a+b+c)$	$\sigma_T^2=\sigma_a^2+\sigma_b^2+\sigma_c^2$	

Korelacije između matrica distanci za fitokemijske karakteristike, morfološke i molekularne markere dobivene su primjenom Mantelovog testa (Mantel, 1967), te je određena značajnost korelacije (Z). Značajnost Z određena je putem usporedbe dobivene Z vrijednosti s očekivanom Z vrijednošću dobivenom iz distribucije permutacija. Distribucija je dobivena tako da su izračunate Z vrijednosti za matricu 1000 permutacija s drugom matricom (Luebberstedt i sur., 2000). Korelacije između matrica distanci izvedene su pomoću NTSYS 2.21L računalnog programa (Rohlf, 2008).

3.6. Fitokemijska određivanja

Određivanje udjela ukupnih fenola, flavonoida i tanina u plodu rogača provedeno je spektrofotometrijskim metodama u uzorcima samljevene pulpe ploda rogača dok je u uzorcima listova rogača određen udio ukupnih fenola i flavonoida. Antioksidativna aktivnost određena je u ekstrahiranim uzorcima ploda i lista rogača. Sva fitokemijska istraživanja provedena su u triplikatu i iskazana na originalni uzorak.

Zbog mogućnosti interferencije s mastima svi uzorci su prethodno odmašćeni petroleterom uz korištenje aparature po Soxhletu. Nakon odmašćivanja, provedena je ekstrakcija svih istraživanih uzoraka ploda i lista rogača postupkom prema Hsouna i sur. (2011).

3.6.1. Ekstrakcija

Učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva u biljnom materijalu ovisi o njihovoj kemijskoj prirodi, primjenjenoj metodologiji, veličini čestica uzorka kao i o prisutnosti interferirajućih čestica (Bernardo-Gil i sur., 2011a). Obzirom da fenoli mogu biti visokomolekularni spojevi vezani za proteine, ugljikohidrate ili neke druge komponente kao takvi su relativno netopivi te ne postoji standardni postupak za ekstrakciju svih polifenola. Primjenom organskih ili vodeno - organskih otapala može se izolirati samo dio fenolnih komponenti, uglavnom male i srednje molekulske mase, odnosno ekstraktibilne fenole, dok za vezane polifenole kao i polifenole velike molekularne mase treba primijeniti ekstremnije ekstrakcijske uvjete obzirom na temperaturu, pH i vrijeme trajanja ekstrakcije (Aspe i Fernandez, 2011). Klasična tehnika za ekstrakciju polifenola je tekućinsko-tekućinska ekstrakcija koja se temelji na odabiru otapala. Najčešće se koriste metanol, etanol, aceton, voda i etil-acetat (Roseiro i sur., 2013). U okviru ovog istraživanja za ekstrakciju su korišteni metanol i etil-acetat (Hsouna i sur. 2011).

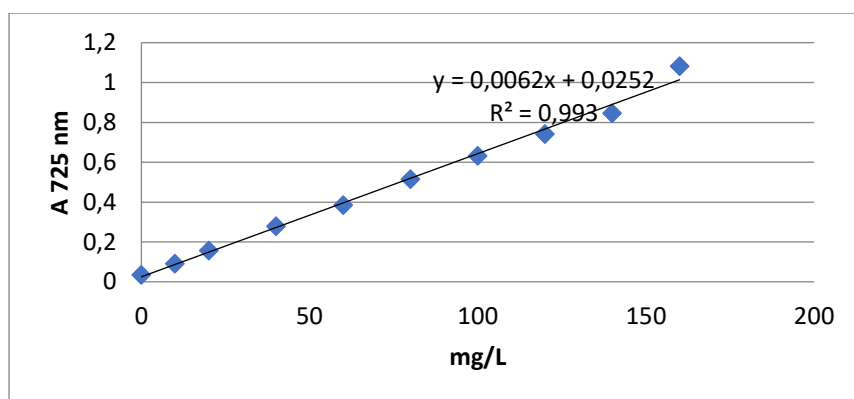
Pri ekstrakciji $1\text{g} \pm 0.0050$ odmašćene pulpe rogača ili samljevenog odmašćenog lista, macerira se s 100 mL 80 % (v/v) metanola u zatvorenoj tikvici za ekstrakciju 16 h (preko noći) na sobnoj temperaturi uz lagano potresivanje (80/min). Nakon završene ekstrakcije uzorak se kvantitativno profiltrira, uz ispiranje tikvice s 80 % metanolom, kroz gusti filter papir i upari na rotavaporu do vodenog ostatka (uparavanje: 45 °C, tlak se spušta od 250 do minimalno 100 mbar). Vodenom ostatku doda se točno 15 mL etil-acetata, izmučka se na vortex-u tijekom 2 min uz maksimalnu jakost i nakon toga centrifugira 5 min na 4000 okretaja (rpm). Dobiveni ekstrakt (etil-acetatni sloj) uzorka ploda odnosno uzorka lista koristi se za sva daljnja fitokemijska određivanja.

3.6.2. Određivanje ukupnih fenola

Za određivanje ukupnih fenola korištena je Folin – Ciocalteu metoda (Singleton i Rossi, 1965) modificirana prema Gao i sur. (2002). Metoda se temelji na redukcijskoj moći hidroksilnih skupina fenolnih spojeva uzorka da u lužnatom mediju reduciraju fosfomolibdat i fosfovolframat iz Folin – Ciocalteu (FC) reagensa pri čemu nastaju plavoobojeni kompleksi M(VI) i W(VI) nepoznate strukture koji se spektrofotometrijski detektiraju na 725 nm. Koncentracija tih kompleksa, odnosno intenzitet obojenja, proporcionalan je udjelu fenola u uzorku. Međutim, FC reagens nije specifičan za fenolne spojeve pa je moguća redukcija i nefenolnih spojeva kao što su aromatski amini, askorbinska kiselina, bakar i željezo. Stoga pri

određivanju ukupnih fenola treba uzeti u obzir i moguće interferencije. Analiza je relativno jednostavna, reproducibilna te pristupačna zbog komercijalno dostupnog reagensa. Mogućnost interferencije matriksa smanjena je činjenicom da kompleksi koji nastaju reakcijom apsorbiraju na visokim valnim duljinama.

Tekući ekstrakt rogača (plod, list) razrijedi se etanolom (100 µL/10 mL). U Falcon kivetu od 15 mL odpipetira se 200 µL razrijeđenog ekstrakta, doda 1,35 mL destilirane vode te 150 µL FC reagensa i dobro promućka. Nakon 5 min doda se 1.5 mL 6% (w/v) otopine natrijevog karbonata i dobro promućka. Plavo obojenje se razvija nakon 30 min na 50 °C. Nakon hlađenja uzoraka pod mlazom hladne vode, mjeri se apsorbancija svake otopine na 725 nm. Kao slijepa proba koristi se mjerna otopina pripremljena s ekstrakcijskim sredstvom. Udio ukupnih fenola iskazuje se kao ekvivalent galne kiseline (GAE) (Slika 3.).

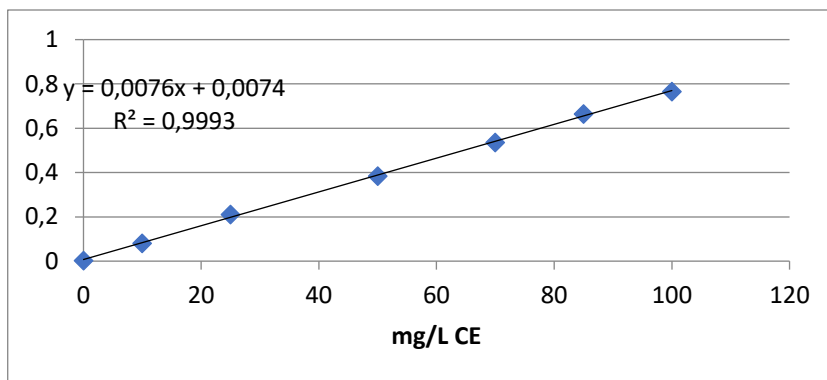


Slika 3. Baždarni pravac i jednadžba baždarnog pravca za ekvivalent galne kiseline (mg GAE/L)

3.6.3. Određivanje flavonoida

Udio flavonoida u istraživanim uzorcima ploda i lista rogača određen je spektrofotometrijskom metodom s AlCl_3 (Zhisen i sur., 1999). Metoda se temelji na reakciji ekstrakta fenola s natrijevim nitratom pri čemu se formira flavonoid-aluminij kompleks maksimalne apsorbancije na 510 nm.

U 1mL razrijeđenog ekstrakta (125 µL ekstrakta u 875 µL etanola) doda se 4 mL destilirane vode i 300 µL 5 % NaNO_2 . Nakon 5 min doda se 300 µL 10 % AlCl_3 . U 6. min doda se 2 mL 1M NaOH i reakcijska smjesa se nadopuni na 10 mL. Apsorbancija se mjeri na 510 nm. Udio flavonoida se iskazuje kao mg ekvivalenta katehina (CE)/L (Slika 4.).



Slika 4. Baždarni pravac i jednadžba baždarnog pravca za ekvivalent katehina

3.6.4. Određivanje tanina

Za određivanje tanina koristi se postupak taloženja s polivinilpolipirrolidinom (PVPP) (Makkar i sur., 1995). Metoda se temelji na svojstvu tanina da, kao i ostali polifenolni spojevi, reagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom te na svojstvu da s polivinilpolipirrolidinom (molekularne mase od 2 do 35 000) stvaraju netopljive komplekse koji se talože i tako odvajaju od ostalih fenolnih spojeva u uzorku.

Iz odmašćenih uzoraka brašna rogača tanini su izolirani pod istim uvjetima i istim ekstrakcijskim reagensima kao i frakcije ekstraktibilnih fenola te su u dobivenim ekstraktima istaloženi dodatkom PVPP-a. Nakon taloženja udio preostalih fenolnih spojeva u supernatantu određen je spektrofotometrijski Folin-Ciocalteu metodom.

U Falconici se 4 mL 10 puta razrijeđenog ekstrakta rogača ploda pomiješa s 30 mg PVPP-a. Suspenzija se vorteksira 30 sek te ostavi stajati 30 min na 4 °C nakon čega se profiltrira kroz gusti filter papir. Dobiveni filtrat koristi se za određivanje fenolne frakcije bez tanina Folin-Ciocalteu metodom.

Udio tanina izračuna se iz razlike predhodno određenog udjela ekstraktibilnih fenola uzorka i udjela fenola preostalih u supernatantu nakon taloženja tanina PVPP-om, a iskazan je kao ekvivalent taninske kiseline.

3.6.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Zbog kompleksnosti oksidacijskih procesa potrebno je koristiti više metoda da bi se odredio antioksidativni potencijal uzorka. Zbog toga je, u okviru ovih istraživanja, antioksidativna aktivnost ploda i lista istraživanih populacija rogača određena korištenjem

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) i FRAP (Ferring Reducing Power) metoda.

3.6.5.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

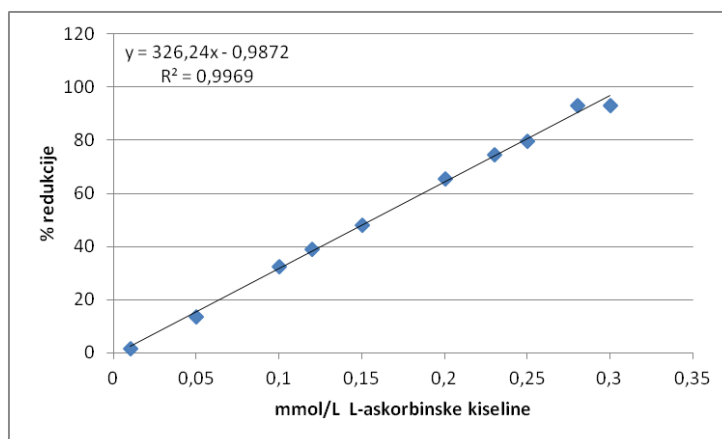
Ova metoda temelji se na mjerenju sposobnosti antioksidansa da neutralizira stabilni 2,2'-difenil-1 pikrilhidrazil (DPPH[•]) radikal pri čemu se on, nakon reakcije s proton donorom, reducira u odgovarajući hidrazin (Kirigaya i sur., 1971, modificirano prema Shimada i sur. 1992). DPPH radikal radi svog nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra pri valnoj duljini od 517 nm (ljubičasta boja). U prisutnosti elektron donora – AH, antioksidansa koji gasi slobodne radikale, dolazi do sparivanja elektronskog para ljubičastog kromogenog DPPH radikala, odnosno do redukcije antioksidansom do određenog žutog hidrazina pri čemu je vidljiva promjena ljubičaste boje otopine u blijedo žutu ili bezbojnu. Promjena boje najčešće se izražava pomoću parametra učinkovite koncentracije (EC₅₀), odnosno koncentracije antioksidansa koja uzrokuje 50 % - tno smanjenje početne koncentracije DPPH. Antioksidacijski kapacitet se određuje u organskom mediju praćenjem pada apsorpcije na 515 – 528 nm sve dok apsorpcija ne postane konstantna (Segundo i sur., 2008).

Ekstrakt uzorka lista rogača razrijedi se etanolom (50 µL/10 mL). Zatim se u Falcon kivetu (15 mL) otpipetira 600 µL razrijeđenog ekstrakta, 1,4 mL otopine metanola i doda 1,5 mL otopine DPPH (dnevno svježe) i uključi štoperica. Nakon dodatka DPPH uzorak je potrebno dobro promućkati, ostavi stajati, te se nakon 30 min mjeri apsorpcija otopine na 528 nm (A_{t=30}). Kod serije uzoraka apsorpcija se mjeri redoslijedom dodavanja DPPH. Otopina koja pokazuje početnu apsorpciju (A_{t=0}) priredi se kao i otopina uzorka uz dodatak čistog etanola umjesto uzorka.

Postotak neutralizacije slobodnih radikala u otopini proporcionalan je smanjenju apsorpcije mjerene otopine i računa se prema jednadžbi:

$$\text{postotak neutralizacije (\%)} = \left[1 - \frac{A_{t=0}}{A_{t=30}} \right] \times 100$$

Rezultati se izražavaju kao mol ekvivalent L askorbinske kiseline (Slika 5).



Slika 5. Baždarni pravac i jednadžba baždarnog pravca za ekvivalent L askorbinske kiseline

Zbog velikog utjecaja matriksa kod ekstrakata uzoraka ploda rogača nije korišten baždarni dijagram već je svaki uzorak analiziran po istom protokolu u više koncentracija te je antioksidacijska aktivnost izražena kao EC_{50} , odnosno djelatna koncentracija u $\mu\text{g/mL}$.

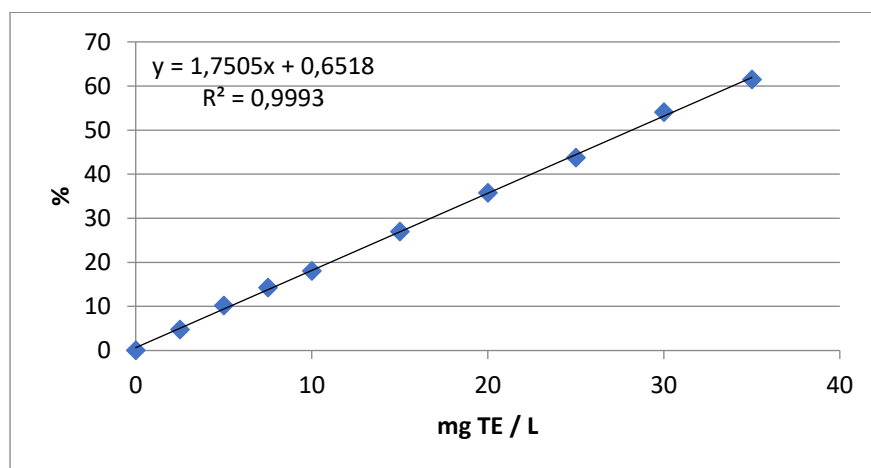
3.6.5.2. Određivanje antioksidativnog potencijala TEAC metodom

TEAC (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) metoda (Re i sur., 1999) temelji se na mjerenju sposobnosti antioksidansa da neutralizira ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilenbenzotiazolin-6-sulfonat) radikal kation. Rezultat toga je obezbojenje reakcijske otopine odnosno smanjenje apsorbancije koje se mjeri kao postotak inhibicije apsorbancije na 734 nm. Stabilni ABTS radikal kation se priprema miješanjem 7 mM otopine ABTS-a i kalijevog persulfata u jednakim omjerima. Tada počinje trenutno nastajanje ABTS radikala pri čemu dolazi do nastanka plavo zelenog obojenja otopine. Nastala plavozelena otopina generirana je djelovanjem oksidacijskog sredstva, u ovom slučaju kalijeva persulfata, $K_2S_2O_8$ na ABTS.

Budući da je reakcija nastajanja radikala u potpunosti završena tek nakon više od 6 sati, reakcijska smjesa se ostavi inkubirati na tamnom mjestu kroz 12 sati do nastanka konačnog intenziteta boje. Nakon inkubacije, otopina se razrijedi tako da njena apsorbancija mjerena na 732 nm bude 0.700 ± 0.02 (1 mL u 40 mL vode). Ispitivani uzorak se dodaje otopini prethodno generiranog ABTS radikal kationa. Antioksidansi iz uzorka „hvataju“ ABTS radikale što dovodi do smanjenja intenziteta obojenja reakcijske smjese. Nakon dodavanja uzorka otopini ABTS radikala i inkubacije u trajanju od 3 min na sobnoj temperaturi mjeri se apsorbancija. Rezultati se prikazuju kao Trolox ekvivalent (mmol/L), odnosno kao koncentracija Trolox-a koja pokazuje istu antioksidativnu aktivnost kao 1mmol/L otopine istraživanog uzorka. Trolox

je vodotopljivi oblik vitamina E koji predstavlja standard za određivanje antioksidativne aktivnosti.

U kvarcnu kivetu otpipetira se 2,5 mL otopine ABTS-a radikala i nakon toga 300 μ L razrijeđenog ekstrakta lista ili ploda (50 μ L u 10 ml etanola). Pripremljena otopina se inkubira tri minute na sobnoj temperaturi i nakon toga se mjeri apsorbancija na 732 nm. Apsorbancija bi se trebala mjeriti dvaput, u trenutku dodavanja uzorka smjese radikala (A_0) i nakon završetka inkubacije reakcijske smjese ($A_{3\text{min}}$). Međutim, A_0 je zapravo nemoguće izmjeriti jer se obezbojenje reakcijske smjese događi vrlo brzo. Zbog toga se A_0 određuje tako da se umjesto uzorka u reakcijsku smjesu doda ista količina etanola (300 μ L) i tako odredi početna apsorbancija. Iz razlike apsorbancije na početku mjerenja (A_0) i na kraju mjerenja ($A_{3\text{min}}$) izračuna se postotak obezbojenja i iz baždarnog dijagrama očita antioksidacijski potencijal izražen kao μ g ekvivalenta Trolox-a u mL ekstrakta.



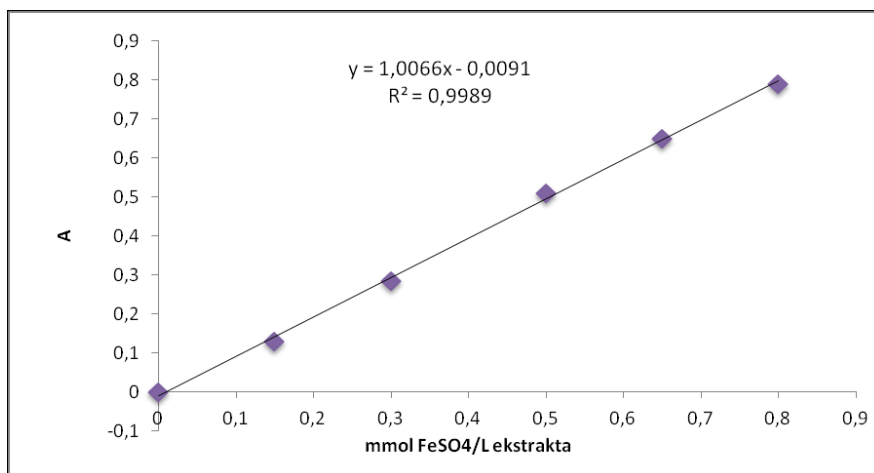
Slika 6. Postotak gašenja apsorbancije otopine ABTS-a u ovisnosti o koncentraciji Trolox-a u reakcijskoj smjesi

3.6.5.3. Određivanje redukativnog potencijala FRAP metodom

Metoda (Benzie i Strain, 1996) se temelji na redukciji Fe(III)-2,4,6, tripiridil-s-triazin kompleksa žute boje u plavo obojeni Fe(II) produkt u prisutnosti antioksidansa (Fe^{3+} -TPTZ - Fe^{2+} -TPTZ). Reakcija je ovisna o pH, pri čemu je optimalan pH 3,6. Maksimalna apsorbancija kompleksa je na 593 nm. Smanjenje apsorbancije proporcionalno je količini antioksidansa u uzorku.

Reakcijska smjesa napravljena miješanjem 2,7 mL FRAP reagensa, 270 μ L destilirane vode i 150 μ L razrijeđenog ekstrakta (50 μ L u 10 mL etanola) se inkubira na 37 $^{\circ}$ C. Točno nakon 40 min apsorbancija smjese mjeri se na 593 nm. Svaki puta radi se i slijepa proba

koja umjesto ekstrakta sadrži etanol. Intenzitet razvijenog obojenja mjera je reduktivne moći uzorka. Između dva mjerenja potrebno je ostaviti barem 3 min razmaka tako da su svi mjereni uzorci inkubirani jednako (nakon 40 min inkubacije boja još uvijek nije u potpunosti stabilna). FRAP reagens mora biti tijekom rada potpuno bistar.



Slika 7. Baždarni pravac i jednadžba baždarnog pravca za izračunavanje FRAP redukcijskog potencijala

3.6.6. Određivanje makro i mikroelemenata

Prije spektroskopske analize određivanih minerala provedena je predobrada uzoraka rogača (plod, list) koja uključuje spaljivanje uzoraka u jedinici za mikrovalnu digestiju uz korištenje oksidacijskih sredstava 65 % HNO₃ i 30 % H₂O₂ prema zadanom digestijskom programu (Tablica 8):

Tablica 8. Uvjeti mikrovalne digestije uzoraka ploda i lista rogača

1. 250 W	1 min	/lagana oksidacija organske tvari/
2. 0 W	1 min	/radi spriječavanja nastanka previsoke temperature i tlaka reakcija se nastavlja bez dodatnog dovođenja energije/
3. 250 W	5 min	/završetak blage oksidacije organske tvari/
4. 400 W	5 min	/za potpuno dovršenje oksidacije organske tvari
5. 650 W	5 min.	dovođenje jače energije/

Postupak mikrovalne digestije je odabran zbog vrlo male mogućnosti kontaminacije uzorka i kratkog vremena trajanja spaljivanja organskog dijela uzorka. Nakon hlađenja digerirani uzorci su u volumetrijskim tikvicama razrijeđeni na 50 mL s demineraliziranom vodom i prebačeni u polietilenske bočice. Svaki uzorak digeriran je u duplikatu.

Potreban laboratorijski pribor i posuđe prije korištenja odstajalo je 24 sata u 10 % HNO₃ i nakon toga dobro isprano s demineraliziranom vodom i osušeno na zraku.

Koncentracije makroelemenata (Ca, K, Mg i Na) i mikroelemenata (Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Se i Zn), nakon predobrade uzoraka ploda i lista istraživanih populacija rogača, određene su spektroskopijom mase uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS) na uređaju s kolizijskom/reakcijskom komorom kako bi se smanjio utjecaj mogućih smetnji uzrokovanih neidentificiranim reaktivnim vrstama. Kolizijska/reakcijska komora ima mogućnost djelovanja u 3 različita moda: „no-gas“ mod za mjerenje Al ($m/z=27$), vodikov mod za mjerenje Cr ($m/z = 52$) i Se ($m/z = 78$), te helijev mod za mjerenje As ($m/z = 75$), Ca ($m/z = 43$), Cd ($m/z = 114$), Co ($m/z = 59$), Cu ($m/z = 63$), Fe ($m/z = 56$), K ($m/z = 39$), Mg ($m/z = 24$), Mn ($m/z = 55$), Mo ($m/z = 95$), Na ($m/z = 23$), Ni ($m/z = 60$), Pb ($m/z = 208$) i Zn ($m/z = 8$). Za analizu su korišteni argon, helij i vodik visoke čistoće (99.999 % v/v). Uzorci su analizirani uz dodatak unutarnjih standarda, skandija (Sc, $m/z=45$), germanija (Ge, $m/z = 72$, $m/z = 74$), rodija (Rh, $m/z = 103$), terbija (Tb, $m/z = 159$), iridija (Ir, $m/z = 193$) i lutecija (Lu, $m/z = 175$).

Mjerne otopine uzoraka rogača pripremljene su neposredno prije analize miješanjem 1 mL razorenog uzorka i 2 mL 1 % HNO₃. Kalibracijski standardi pripravljeni su tako da koncentracije svih metala u mjerenim uzorcima budu unutar odabranog koncentracijskog raspona. U otopinu diluenta dodani su interni standardi (Sc, Ge, Rh, Tb, Iri i Lu) tako da njihova konačna koncentracija iznosi 1 µg/L. Osjetljivost instrumenta tijekom rada kontrolirana je mjerenjem odabranog kalibracijskog standarda svakih 20 uzoraka. Svaki uzorak je pripremljen i analiziran u duplikatu. Laboratorijsko posuđe je prije korištenja oprano u 10 % v/v HNO₃ i isprano ultračistom vodom.

3.6.7. Statistička obrada podataka

Za analizu i interpretaciju rezultata morfoloških i fitokemijskih istraživanja su korišteni standardni statistički testovi. Rezultati su prikazivani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija istraživanih uzoraka ili kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija paralelnih određivanja a međusobno su uspoređivani korištenjem studentovog t-testa, jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) uz Bonferoni post hoc test i UPGMA klaster analizom. Za utvrđivanje korelacije korištena je Pearsonova korelacija (korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$).

4. REZULTATI

4.1. Rezultati morfoloških istraživanja rogača

Za razumijevanje populacijske varijabilnosti veliku važnost imaju deskriptivni statistički pokazatelji minimum – maksimum, aritmetička sredina, standardna devijacija (SD) i relativna standardna devijacija (RSD) mjerenih svojstava, koji ukazuju na prisutnost postupnih promjena vrijednosti parametara. Nakon obavljenih mjerenja istraživanih morfoloških značajki ploda (duljina, širina, debljina, duljina peteljke ploda i broj sjemenki), sjemenki (masa, duljina, širina i debljina) i lista (duljina i širina lista, duljina peteljke lista, broj liski lista, duljina i širina liske i duljina peteljčice liske lista), pristupilo se obradi osnovnih deskriptivnih statističkih pokazatelja koji su predstavljeni u Tablicama od 9 do 43 i slikama od 8 do 27 za svaku od 12 istraživanih populacija rogača. Rezultati istraživanja statistički su obrađeni korištenjem Studentova t-testa i UPGMA klaster analizom.

4.1.1. Morfometrija ploda rogača

Morfološke značajke određene su svakom od 100 plodova (N = 100) iz pojedine istraživane populacije rogača (ukupno 1200 mahuna). Varijabilnost parametara unutar populacija iskazana je relativnom standardnom devijacijom (RSD).

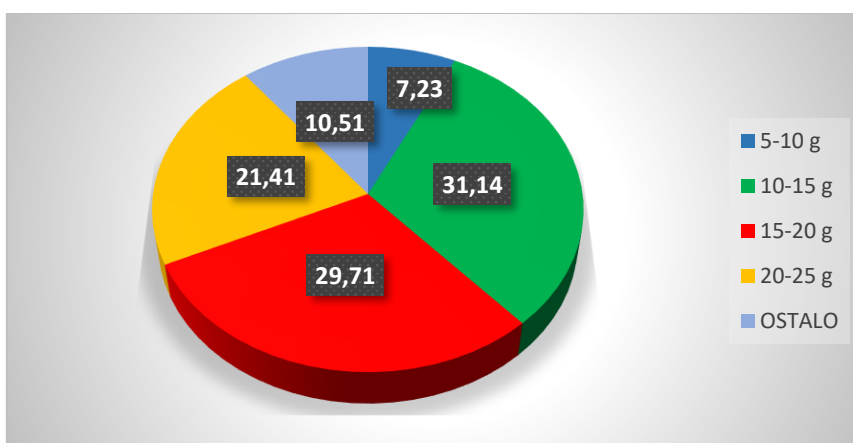
Tablica 9. Deskriptivni statistički pokazatelji za masu ploda rogača

Populacija	*N	Masa ploda (g)		
		** $\bar{x} \pm SD$	minimum	maksimum
Šolta	100	18,03 ± 5,03	8,29	28,58
Brač	100	17,83 ± 5,03	10,12	35,53
Podgora	100	17,96 ± 5,97	7,09	35,15
Hvar	100	18,75 ± 5,15	6,62	30,33
Vis	100	21,17 ± 3,97	13,65	34,49
Pelješac	100	19,64 ± 6,17	8,91	31,71
Lastovo	100	14,35 ± 4,27	5,17	27,59
Mljet	100	15,70 ± 5,18	7,39	28,99
Korčula	100	17,54 ± 4,22	10,12	27,68
Šipan	100	18,75 ± 7,38	5,57	38,96
Orašac	100	12,68 ± 3,81	7,01	26,66
Molunat	100	17,26 ± 4,39	10,19	28,47

* broj plodova; **srednja vrijednost mase ploda ± standardna devijacija

Prosječna vrijednost mase ploda ovisno o populaciji (Tablica 9.) kreće se u rasponu od 12,68 g (Orašac) do 21,17 g (Vis). Minimalna masa ploda (5,17 g) izmjerena je u populaciji Lastovo, a maksimalna (38,96 g) u populaciji Šipan. Najmanja varijabilnost mase određena je kod populacije Vis (RSD = 18,73%) a najveća kod populacije Šipan (RSD = 39,35 %).

Masa ploda razdijeljena je na grupe od po 5 grama. Najveći broj mahuna (31,14 %) ima masu 10 – 15 g, zatim slijedi 29,71 % s masom od 15 do 20 g, 21,41 % od 20 do 25 g i 7,23 % s masom od 5 do 10 g. Samo 20 mahuna ima masu između 30 i 35 g. Tri ploda iz populacija Podgora, Brač i Šipan imaju masu veću od 35 g (Slika 8.).



Slika 8. Postotak zastupljenosti mase ploda u istraživanim populacijama rogača

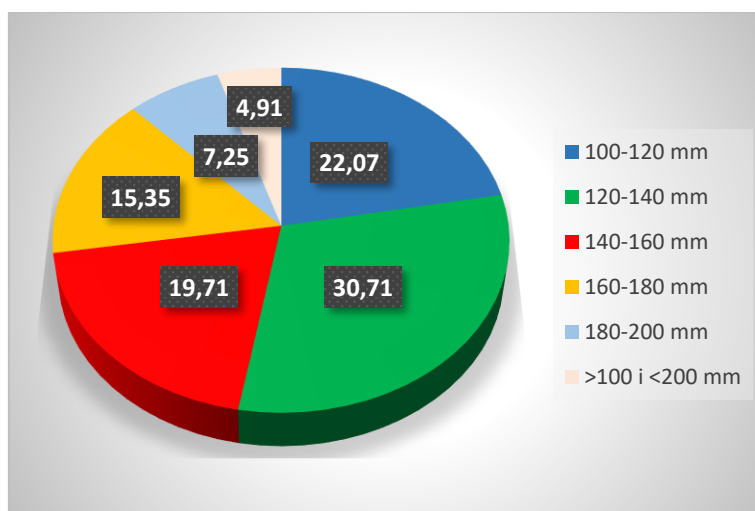
Duljina ploda istraživanih populacija vrlo je različita (Tablica 10.) i kreće se od 74,93 mm (Mljet) do 217,15 mm (Šipan). Prosječna duljina mahuna je u rasponu od 124,56 mm (Orašac) do 152,58 mm (Pelješac). Duljina ploda najmanje je varijabilna u populaciji Orašac (RSD = 10,33 %), a najviše u populaciji Lastovo (RSD = 22,80 %).

Duljina ploda je razdijeljena na grupe od po 20 milimetara (Slika 9.). Najveći broj mahuna (30,71 %) ima duljinu od 120 do 140 mm. Slijede sa 22,07 % mahune duljine od 100 do 120 mm, sa 19,71 % duljine od 140 do 160 mm, 15,35 % duljine od 160 do 180 mm, zatim 7,25 % duljine 180 – 200 mm te 4,91 % mahuna duljine manje od 100 i veće od 200 mm (pretežno iz populacija Šolta, Brač, Lastovo i Korčula).

Tablica 10. Deskriptivni statistički pokazatelji za duljinu ploda rogača

Populacija	*N	Duljina ploda (mm)		
		** $\bar{x} \pm SD$	minimum	maximum
Šolta	100	128,81 ± 23,05	78,85	179,30
Brač	100	127,76 ± 27,88	76,31	215,86
Podgora	100	141,35 ± 24,11	75,40	198,82
Hvar	100	149,18 ± 26,22	86,37	200,51
Vis	100	128,87 ± 18,14	100,13	168,25
Pelješac	100	152,58 ± 30,10	98,32	212,10
Lastovo	100	142,50 ± 32,19	93,06	215,57
Mljet	100	135,80 ± 30,96	74,93	196,83
Korčula	100	144,70 ± 27,09	94,34	212,73
Šipan	100	147,92 ± 29,24	93,10	217,15
Orašac	100	124,56 ± 12,86	101,29	175,32
Molunat	100	152,47 ± 20,55	108,25	201,22

* broj plodova; ** srednja vrijednost duljine ploda ± standardna devijacija



Slika 9. Postotak zastupljenosti duljine ploda rogača

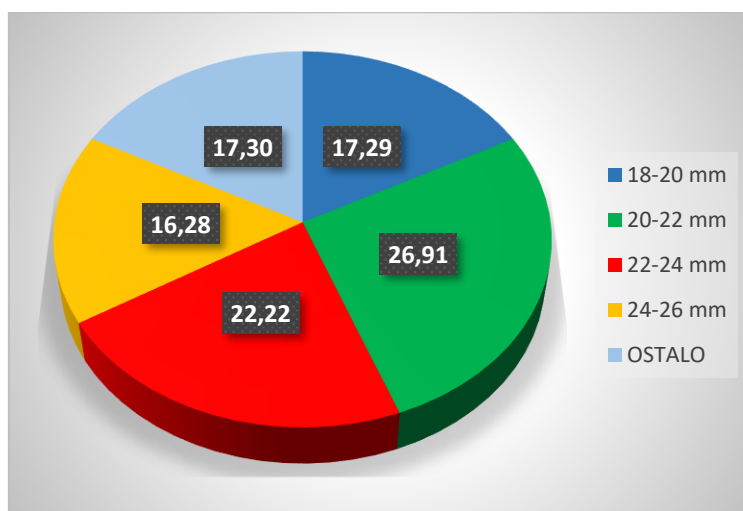
Ovisno o populaciji prosječna širina mahune (Tablica 11.) kreće se od 19,72 mm (Orašac) do 26,54 mm (Vis). Minimalna širina mahune od 15,54 mm izmjerena je u populaciji Lastovo a maksimalna od 35,38 mm u populaciji Podgora. Najmanja varijabilnost određena je kod populacije Vis (RSD = 6,67 %), a najveća kod populacije Podgora (RSD = 13,58 %).

Tablica 11. Deskriptivni statistički pokazatelji za širinu ploda rogača

Populacija	*N	Širina ploda (mm)		
		** $\bar{x} \pm SD$	minimum	maksimum
Šolta	100	23,61 ± 2,54	17,69	28,53
Brač	100	22,98 ± 2,15	17,13	28,36
Podgora	100	23,62 ± 3,21	16,82	35,38
Hvar	100	22,31 ± 1,96	16,52	25,83
Vis	100	26,54 ± 1,77	18,82	30,70
Pelješac	100	21,96 ± 2,00	17,88	26,41
Lastovo	100	20,94 ± 2,49	15,54	27,50
Mljet	100	20,62 ± 2,11	16,55	27,32
Korčula	100	21,72 ± 1,85	17,68	26,85
Šipan	100	21,77 ± 2,64	15,94	27,13
Orašac	100	19,72 ± 2,70	16,35	29,28
Molunat	100	21,89 ± 2,45	17,59	29,28

* broj plodova; ** srednja vrijednost širine ploda ± standardna devijacija

Širina ploda razdijeljena je na grupe od po 2 mm. Najveći broj plodova (26,91 %) ima širinu između 20 i 22 mm. Slijedi 22,22 % širine od 22 do 24 mm, 17,29 % od 18 do 20 mm te 16,28 % širine od 24 do 26 mm. Preostalih 17,30 % ima širinu ploda manju od 18 mm odnosno veću od 26 mm. Širinu manju od 16 mm imaju mahune iz populacija Lastovo i Šipan, a populacija Podgora ima jedina mahune širine preko 30 mm (Slika 10.).

**Slika 10.** Postotak zastupljenosti širine ploda rogača

Prosječna debljina ploda (Tablica 12.), ovisno o istraživanoj populaciji, kreće se od 7,54 mm (Lastovo) do 11,87 mm (Vis). Minimalna debljina ploda od 3,88 mm izmjerena je u

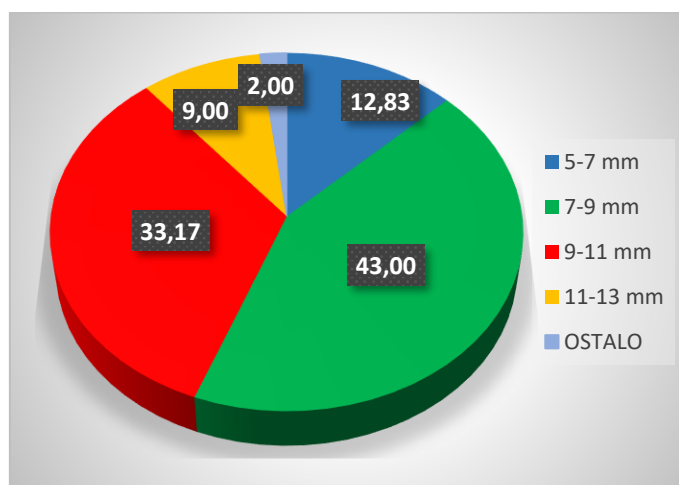
populaciji Šipan, a maksimalna od 13,93 mm u populaciji Vis. Unutar pojedine populacije najmanja varijabilnost debljine ploda je kod populacije Vis (RSD = 8,05 %), a najveća u populaciji Šipan (RSD = 14,45 %).

Tablica 12. Deskriptivni statistički pokazatelji za debljinu ploda rogača

Populacija	*N	Debljina ploda (mm)		
		** $\bar{x} \pm SD$	minimum	maksimum
Šolta	100	9,45 ± 1,34	6,15	12,08
Brač	100	9,20 ± 1,19	6,11	11,92
Podgora	100	8,44 ± 1,17	5,86	12,05
Hvar	100	8,94 ± 1,09	5,78	10,91
Vis	100	11,87 ± 0,96	8,50	13,93
Pelješac	100	9,04 ± 1,58	5,46	12,48
Lastovo	100	7,54 ± 1,20	4,78	10,71
Mljet	100	8,61 ± 1,11	5,40	11,66
Korčula	100	8,12 ± 1,66	4,42	11,87
Šipan	100	8,36 ± 2,05	3,88	12,34
Orašac	100	7,77 ± 1,30	4,96	10,91
Molunat	100	8,04 ± 1,30	5,50	11,90

* broj plodova; ** srednja vrijednost debljine ploda ± standardna devijacija

Vrijednosti za debljinu mahune razdijeljene su na grupe od po 2 mm (Slika 11.). Najveći broj plodova (43,00 %) ima debljinu između 7 i 9 mm, slijedi 33,17 % mahuna debljine 9 – 11 mm, 12,83 % debljine od 5 do 7 mm. Debljinu od 11 do 13 mm ima 9,00 % mahuna. Preostalih 2,00 % su plodovi debljine manje od 5 mm (Korčula i Šipan) i veći od 13 mm (Vis).



Slika 11. Postotak zastupljenosti debljine ploda rogača

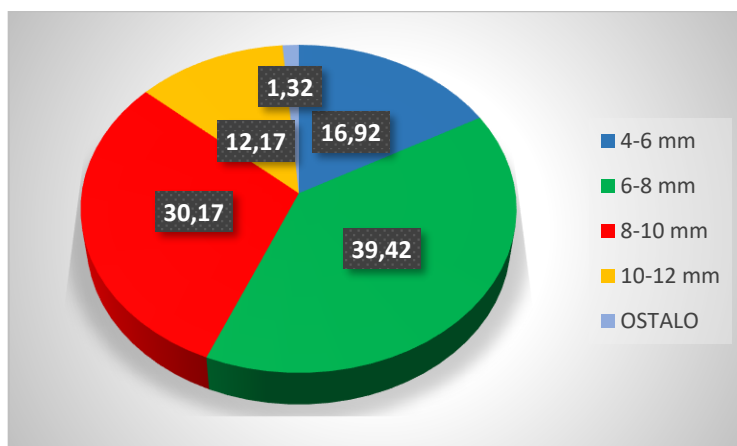
Prosječna duljina peteljke (Tablica 13.) ploda kreće se od 6,55 mm (Šolta) do 9,44 mm (Šipan). Minimalnu duljinu od 2,47 mm ima peteljka iz populacije Šolta, a maksimalnu od 14,69 mm iz populacije Šipan. Najmanja varijabilnost određena je kod populacija Brač i Orašac (RSD = 15,79 %), a najveća kod populacije Šipan (RSD = 29,15 %).

Tablica 13. Deskriptivni statistički pokazatelji za duljinu peteljke ploda rogača

Populacija	*N	Duljina peteljke (mm)		
		** $\bar{x} \pm SD$	minimum	maksimum
Šolta	100	6,55 ± 1,45	2,47	10,56
Brač	100	7,16 ± 1,27	4,44	10,63
Podgora	100	7,73 ± 1,54	5,12	14,00
Hvar	100	8,34 ± 1,97	3,45	13,25
Vis	100	7,02 ± 1,34	4,28	11,23
Pelješac	100	9,09 ± 1,83	4,29	15,61
Lastovo	100	7,81 ± 1,68	5,30	11,88
Mljet	100	7,68 ± 1,67	4,62	12,50
Korčula	100	7,65 ± 2,23	3,35	12,44
Šipan	100	9,44 ± 1,56	5,96	14,69
Orašac	100	8,03 ± 1,27	5,40	11,55
Molunat	100	6,86 ± 1,46	4,18	10,48

* broj plodova; ** srednja vrijednost duljine peteljke ploda ± standardna devijacija

Duljina peteljke razdijeljena je na grupe od po 2 mm. Najveći broj mahuna (39,42 %) ima duljinu peteljke od 6 do 8 mm, slijedi 30,17 % sa duljinom od 8 do 10 mm, 16,92 % od 4 do 6 mm i 12,17 % sa duljinom od 10 do 12 mm. Ostale mahune (1,32 %) imaju peteljke manje od 4 mm i veće od 12 mm. Samo jedna mahuna (populacija Šolta) ima duljinu peteljke manju od 3 mm i to je ujedno i najmanje izmjerena duljina peteljke ploda (Slika 12.).



Slika 12. Postotak zastupljenosti duljine peteljke ploda rogača

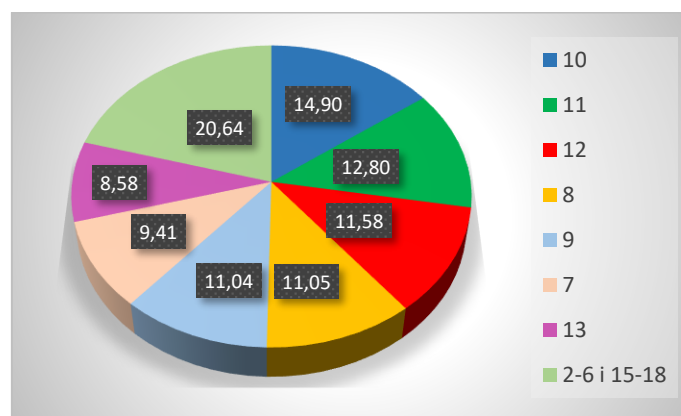
Broj sjemenki kreće se ovisno o populaciji od 8 (pretežno u populaciji Brač) do 12 (pretežno u populaciji Orašac) (Tablica 14.). Minimalan broj sjemenki (2 sjemenke) određen je u populaciji Podgora a maksimalan broj (18 sjemenki) kod populacije Molunat. Najmanja varijabilnost određena je unutar populacije Orašac (RSD = 14,13 %), a najveća unutar populacije Šipan (RSD = 32,24 %).

Tablica 14. Deskriptivni statistički pokazatelji za broj sjemenki ploda rogača

Populacija	*N	Broj sjemenki ploda		
		** $\bar{x} \pm SD$	minimum	maksimum
Šolta	100	9,48 ± 2,49	5,00	14,00
Brač	100	8,12 ± 2,62	3,00	15,00
Podgora	100	8,65 ± 2,64	2,00	14,00
Hvar	100	8,62 ± 2,41	4,00	14,00
Vis	100	9,25 ± 1,91	5,00	15,00
Pelješac	100	10,32 ± 2,18	4,00	15,00
Lastovo	100	9,28 ± 2,71	4,00	16,00
Mljet	100	10,78 ± 2,43	5,00	15,00
Korčula	100	9,81 ± 2,74	4,00	15,00
Šipan	100	10,74 ± 2,81	3,00	17,00
Orašac	100	12,23 ± 1,73	8,00	16,00
Molunat	100	11,43 ± 2,45	6,00	18,00

* broj plodova; ** srednja vrijednost broja sjemenki ploda ± standardna devijacija

Najviše mahuna ima sa po 10 sjemenki (14,90 %). Po brojnosti slijede zatim mahune sa 11 sjemenki (12,80 %). U podjednakom postotku su mahune sa 8, 9 i 12 sjemenki (11,05 %, 11,04 % odnosno 11,58 %) te sa 7 i 13 sjemenki (9,41 % odnosno 8,58 %). Preostalih 20,64 % mahuna ima od 2 – 6 sjemenki (uglavnom Podgora, Brač, Šipan i Lastovo) odnosno od 15 – 18 sjemenki (uglavnom populacije Šipan, Orašac i Molunat) (Slika 13.).



Slika 13. Postotak zastupljenosti broja sjemenki u plodu rogača

Statističkom analizom (Studentov t-test) određene su populacije koje obzirom na morfološke značajke ploda rogača (masa, duljina, širina i debljina ploda te broj sjemenki u plodu) pripadaju istom statističkom skupu ili se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$). Populacije koje pripadaju istom statističkom skupu zatim su grupirane po skupinama.

Obzirom na masu ploda (Tablica 16.) istom statističkom skupu pripadaju populacije Šolta, Brač, Podgora, Hvar, Korčula, Šipan i Molunat, kao prva skupina, zatim Brač, Podgora, Hvar, Korčula, Šipan i Molunat kao druga, te Podgora, Hvar, Pelješac, Korčula i Šipan kao treća skupina. Plodovi populacija Vis, Lastovo i Mljet obzirom na masu statistički su značajno različiti od svih ostalih populacija. Obzirom na duljinu ploda (Tablica 17.) istom statističkom skupu pripadaju populacije Šolta, Brač, Vis, Mljet i Orašac, zatim kao druga skupina Podgora, Lastovo, Mljet, Korčula i Šipan, te kao treća veća skupina Hvar, Pelješac, Lastovo, Korčula, Šipan i Molunat.

Istom statističkom skupu obzirom na širinu ploda (Tablica 18.) pripadaju skupina populacija Šolta, Brač i Podgora, zatim Hvar, Pelješac, Šipan i Molunat kao druga, te populacije Pelješac, Korčula, Šipan i Molunat kao treća skupina. Populacije Vis, Lastovo, Mljet i Orašac statistički se značajno razlikuju po širini ploda od ostalih istraživanih populacija. U odnosu na debljinu ploda (Tablica 19.) populacije Podgora, Pelješac, Mljet, Korčula i Šipan pripadaju istom statističkom skupu kao jedna skupina, a Pelješac, Lastovo, Mljet, Korčula, Šipan, Orašac i Molunat kao druga veća skupina. Plodovi populacija Lastovo statistički se značajno razlikuju po debljini od svih ostalih istraživanih populacija.

Obzirom na duljinu peteljke ploda (Tablica 20.) mogu se izdvojiti četiri manje skupine populacija unutar kojih istraživane populacije pripadaju istom statističkom skupu. To su kako slijedi: Šolta, Vis, Molunat, zatim Brač, Vis, Mljet i Korčula, zatim Podgora, Lastovo, Mljet i Korčula te Vis, Lastovo, Korčula i Molunat. Uzorci plodova populacije Hvar po duljini peteljke ploda slični su samo plodovima populacije Orašac, a statistički se značajno razlikuju od svih ostalih istraživanih populacija.

Po broju sjemenki u plodu istraživanih populacija (Tablica 21.) može se izdvojiti više skupina unutar kojih istraživane populacije pripadaju istom statističkom skupu: Šolta, Vis, Lastovo i Korčula, zatim Podgora, Brač, Hvar, Vis i Lastovo, te Pelješac, Mljet i Korčula. Populacije Šipan i Molunat osim sa Mljetom statistički se značajno razlikuju od drugih istraživanih populacija po broju sjemenka u plodu.

Tablica 16 . Rezultati t-testa za masu ploda istraživanih populacija rogača

Populacija	Šolta	Brač	Podgora	Hvar	Vis	Pelješac	Lastovo	Mljet	Korčula	Šipan	Orašac	Molunat
Šolta	-	0,77799	0,93332	0,31980	0,00000*	0,04531	0,00000	0,00146	0,45346	0,42379	0,00000	0,24963
Brač		-	0,86247	0,20349	0,00000	0,02452	0,00000	0,00358	0,65685	0,32060	0,00000	0,39458
Podgora			-	0,32174	0,00001	0,05337	0,00000	0,00460	0,55926	0,41157	0,00000	0,34245
Hvar				-	0,00026	0,27212	0,00000	0,00005	0,07046	0,99785	0,00000	0,02896
Vis					-	0,03761	0,00000	0,00000	0,00000	0,00427	0,00000	0,00000
Pelješac						-	0,00000	0,00000	0,00553	0,35725	0,00000	0,00196
Lastovo							-	0,04667	0,00000	0,00000	0,00383	0,00000
Mljet								-	0,00651	0,00087	0,00001	0,02259
Korčula									-	0,15653	0,00000	0,64911
Šipan										-	0,00000	0,08491
Orašac											-	0,00000
Molunat												-

* Korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$

Tablica 17. Rezultati t-testa za duljinu ploda istraživanih populacija rogača

Populacija	Šolta	Brač	Podgora	Hvar	Vis	Pelješac	Lastovo	Mljet	Korčula	Šipan	Orašac	Molunat
Šolta	-	0,77348	0,00022	0,00000	0,98376	0,00000	0,00067	0,07155	0,00001	0,00000	0,10943	0,00000
Brač		-	0,00029	0,00000	0,74066	0,00000	0,00066	0,05519	0,00002	0,00000	0,29826	0,00000
Podgora			-	0,02911	0,00005	0,00401	0,77483	0,15905	0,35681	0,08450	0,00000	0,00056
Hvar				-	0,00000	0,39567	0,10939	0,00116	0,23612	0,74888	0,00000	0,32436
Vis					-	0,00000	0,00029	0,05477	0,00002	0,00000	0,05435	0,00000
Pelješac						-	0,02331	0,00014	0,05313	0,26842	0,00000	0,97683
Lastovo							-	0,13523	0,60209	0,21426	0,00000	0,00975
Mljet								-	0,03177	0,00490	0,00096	0,00001
Korčula									-	0,41995	0,00000	0,02334
Šipan										-	0,00000	0,20440
Orašac											-	0,00000
Molunat												-

* Korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$

Tablica 18. Rezultati t-testa za širinu ploda istraživanih populacija rogača

Populacija	Šolta	Brač	Podgora	Hvar	Vis	Pelješac	Lastovo	Mljet	Korčula	Šipan	Orašac	Molunat
Šolta	-	0,06098	0,97858	0,00008	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00001	0,00000	0,00002
Brač		-	0,10018	0,02246	0,00000	0,00061	0,00000	0,00000	0,00001	0,00049	0,00000	0,00097
Podgora			-	0,00062	0,00000	0,00002	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000	0,00003
Hvar				-	0,00000	0,20592	0,00002	0,00000	0,02783	0,10275	0,00000	0,17899
Vis					-	0,00000	0,00000	0,00000	0,0000	0,00000	0,00000	0,00000
Pelješac						-	0,00174	0,00001	0,37793	0,58022	0,00000	0,83076
Lastovo							-	0,31784	0,01337	0,02325	0,00104	0,00736
Mljet								-	0,00012	0,00076	0,00961	0,00012
Korčula									-	0,85989	0,00000	0,57381
Šipan										-	0,00000	0,74812
Orašac											-	0,00000
Molunat												-

* Korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$

Tablica 19. Rezultati t-testa za debljinu ploda istraživanih populacija rogača

Populacija	Šolta	Brač	Podgora	Hvar	Vis	Pelješac	Lastovo	Mljet	Korčula	Šipan	Orašac	Molunat
Šolta	-	0,16889	0,00000	0,00328	0,00000	0,33865	0,00000	0,00003	0,00000	0,00002	0,00000	0,00000
Brač		-	0,00001	0,09989	0,00000	0,32656	0,00000	0,00038	0,00000	0,00049	0,00000	0,00000
Podgora			-	0,00238	0,00000	0,29134	0,00000	0,29453	0,11529	0,73161	0,00014	0,02217
Hvar				-	0,00000	0,31386	0,00000	0,03982	0,00006	0,01434	0,00000	0,00000
Vis					-	0,47170	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Pelješac						-	0,25280	0,29898	0,27725	0,28781	0,26213	0,27375
Lastovo							-	0,00000	0,00489	0,00062	0,20001	0,00485
Mljet								-	0,01500	0,28339	0,00000	0,00097
Korčula									-	0,36229	0,09329	0,70224
Šipan										-	0,01462	0,18575
Orašac											-	0,13530
Molunat												-

* Korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$

Tablica 20. Rezultati t-testa za za duljinu peteljke ploda istraživanih populacija rogača

Populacija	Šolta	Brač	Podgora	Hvar	Vis	Pelješac	Lastovo	Mljet	Korčula	Šipan	Orašac	Molunat
Šolta	-	0,00179	0,00025	0,00000	0,45185	0,00000	0,00291	0,00000	0,00153	0,00000	0,00000	0,13437
Brač		-	0,00488	0,00000	0,37620	0,00000	0,00248	0,05223	0,06106	0,00000	0,00000	0,00425
Podgora			-	0,01569	0,03253	0,00000	0,72341	0,81489	0,80321	0,00000	0,00315	0,00006
Hvar				-	0,00000	0,00245	0,04162	0,03251	0,02055	0,01236	0,19119	0,00000
Vis					-	0,00000	0,34512	0,00258	0,07251	0,00000	0,02571	0,41565
Pelješac						-	0,00000	0,00000	0,00000	0,13572	0,00000	0,00000
Lastovo							-	0,58046	0,87631	0,00000	0,02623	0,00003
Mljet								-	0,90955	0,00000	0,09180	0,001581
Korčula									-	0,00000	0,09180	0,00364
Šipan										-	0,00000	0,00000
Orašac											-	0,00000
Molunat												-

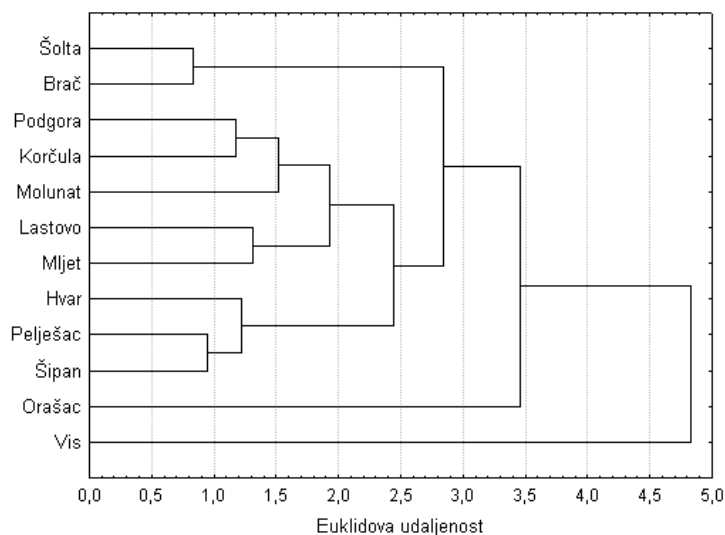
* Korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$

Tablica 21. Rezultati t-testa za broj sjemenki u plodu istraživanih populacija rogača

Populacija	Šolta	Brač	Podgora	Hvar	Vis	Pelješac	Lastovo	Mljet	Korčula	Šipan	Orašac	Molunat
Šolta	-	0,00022	0,02324	0,01389	0,46511	0,01201	0,58747	0,00025	0,37372	0,00095	0,00000	0,00000
Brač		-	0,15541	0,16131	0,00061	0,00000	0,00237	0,00000	0,00001	0,00000	0,00000	0,00000
Podgora			-	0,93313	0,06711	0,00000	0,09720	0,00000	0,00259	0,00000	0,00000	0,00000
Hvar				-	0,04183	0,00000	0,07004	0,00000	0,00129	0,00000	0,00000	0,00000
Vis					-	0,00029	0,92801	0,00000	0,09515	0,00002	0,00000	0,00000
Pelješac						-	0,00315	0,16075	0,14673	0,23919	0,00000	0,00087
Lastovo							-	0,00006	0,17020	0,00024	0,00000	0,00000
Mljet								-	0,00870	0,91437	0,00000	0,06117
Korčula									-	0,01868	0,00000	0,00002
Šipan										-	0,00001	0,06567
Orašac											-	0,00827
Molunat												-

* Korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$

Statistička analiza rezultata (t - test) svakog od istraživanih parametara (Tablice od 16. do 21.) pokazuje koje od istraživanih populacija se međusobno značajno razlikuju odnosno pripadaju istom statističkom skupu obzirom na pojedini parametar. Međutim, da bi se dobio dobar uvid u varijabilnost cijelog ploda između populacija uzeti su u obzir svi istraživani parametri i napravljena je UPGMA klaster analiza (Slika 14.).



Slika 14. UPGMA dendrogram dobiven analizom ploda istraživanih populacija rogača

UPGMA klaster analiza je na temelju morfoloških značajki ploda pokazala grupiranje istraživanih populacija u nekoliko skupina. U prvoj skupini su dvije međusobno najbližije populacije Brač i Šolta, u drugoj skupini su grupirane populacije iz južne Dalmacije Podgora, Korčula, Molunat, Lastovo i Mljet. U trećoj skupini su populacije Hvar, Pelješac i Šipan. Najrazličitiji od svih populacija su, po istraživanim morfološkim značajkama, plodovi populacije Orašac i populacije Vis.

4.1.2. Morfometrija sjemenki rogača

Morfološke karakteristike određene su svakoj od 250 sjemenki iz pojedine istraživane populacije rogača (ukupno 3000 sjemenki). Varijabilnost parametara unutar populacija iskazana je relativnom standardnom devijacijom (RSD).

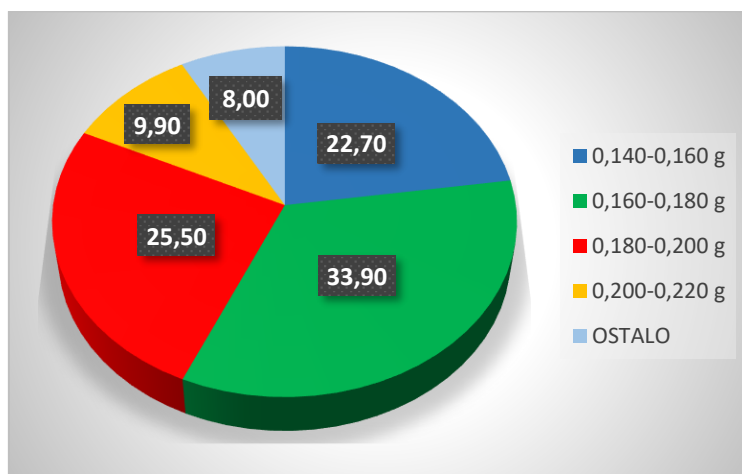
Prosječna masa sjemenki kreće se između 0,149 g (Orašac) i 0,194 g (Korčula) (Tablica 22.). Minimalna masa od 0,084 g određena je u populaciji Orašac, a maksimalna od 0,274 g u populaciji Lastovo. Varijabilnost mase je najmanja kod sjemenki u populaciji Orašac (RSD = 6,89 %), a najveća kod populacije Lastovo (RSD = 17,19 %).

Tablica 22. Deskriptivni statistički pokazatelji za masu sjemenke rogača

Populacija	*N	Masa sjemenki (g)		
		** $\bar{x} \pm SD$	minimum	maksimum
Šolta	250	0,161 ± 0,015	0,115	0,202
Brač	250	0,169 ± 0,018	0,123	0,214
Podgora	250	0,169 ± 0,018	0,116	0,212
Hvar	250	0,174 ± 0,025	0,132	0,210
Vis	250	0,173 ± 0,012	0,140	0,207
Pelješac	250	0,181 ± 0,012	0,150	0,213
Lastovo	250	0,181 ± 0,031	0,115	0,274
Mljet	250	0,163 ± 0,025	0,117	0,224
Korčula	250	0,194 ± 0,023	0,130	0,244
Šipan	250	0,180 ± 0,020	0,112	0,224
Orašac	250	0,149 ± 0,010	0,084	0,184
Molunat	250	0,190 ± 0,020	0,142	0,231

* broj uzoraka sjemenki; ** srednja vrijednost mase sjemenki ± standardna devijacija

Masa sjemenki podijeljena je na grupe od po 0,020 g (Slika 15.). U najvećem postotku (33,90 %) su sjemenke mase od 0,160 do 0,180 g. Slijedi zatim 25,50 % sjemenki mase od 0,180 do 0,200 g, zatim 22,70 % od 0,140 do 0,160 g i 9,90 % mase od 0,200 do 0,220 g. Ostalih 8,00 % čine sjemenke mase manje od 0,140 g i veće od 0,220 g.

**Slika 15.** Postotak zastupljenosti mase sjemenke u plodu rogača

Kod populacija Šolta, Podgora, Lastovo, Mljet, Šipan i Orašac izmjerene su sjemenke sa najmanjim masama a u populaciji Pelješac sve sjemenke imaju masu veću od 0,150 g.

Prosječna duljina sjemenki kreće se između 8,181 mm (Orašac) i 9,783 mm (Molunat) (Tablica 23). Minimalnu duljinu od 4,750 mm ima sjemenka iz populacije Korčula a

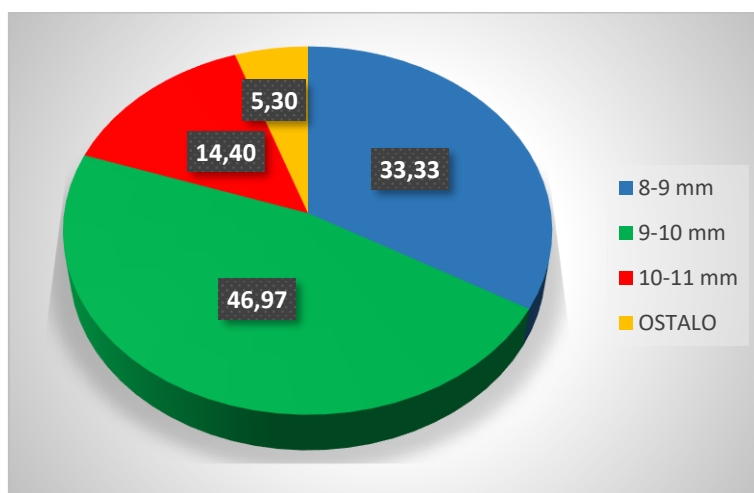
maksimalnu od 11,460 mm iz populacije Molunat. Varijabilnost duljine sjemenki najmanja je u populaciji Vis (RSD = 4,54 %), a najveća u populaciji Korčula (RSD = 10,44 %).

Tablica 23. Deskriptivni statistički pokazatelji za duljinu sjemenke rogača

Populacija	*N	duljina sjemenke (mm)		
		** $\bar{x} \pm SD$	minimum	maksimum
Šolta	250	8,941 ± 0,488	7,190	10,750
Brač	250	9,461 ± 0,617	7,850	10,670
Podgora	250	9,300 ± 0,633	7,790	10,930
Hvar	250	9,160 ± 0,439	7,590	10,290
Vis	250	8,808 ± 0,400	7,540	9,890
Pelješac	250	9,318 ± 0,469	7,880	10,730
Lastovo	250	9,634 ± 0,681	7,910	11,390
Mljet	250	8,769 ± 0,824	7,350	10,550
Korčula	250	9,135 ± 0,955	4,750	10,960
Šipan	250	9,698 ± 0,676	7,940	11,070
Orašac	250	8,181 ± 0,597	5,250	9,260
Molunat	250	9,783 ± 0,645	8,230	11,460

* broj sjemenki; ** srednja vrijednost duljine sjemenki ± standardna devijacija

Duljina sjemenki razdijeljena je na grupe od po 1 mm. Najviše sjemenki (46,97 %) je duljine od 9 do 10 mm. Sa duljinom od 8 do 9 mm je 33,33 % a od 10 do 11 mm je 14,40 % sjemenki. Preostalih 5,30 % su sjemenke manje od 8 mm i veće od 11 mm. Duljinu sjemenke veću od 11 mm imaju populacije Lastovo i Molunat (Slika 16.).



Slika 16. Postotak zastupljenosti duljine sjemenke rogača

Prosječna širina sjemenki istraživanih rogača kreće se od 6,199 mm (Orašac) do 7,407 mm (Korčula) (Tablica 24.). Minimalna širina sjemenke rogača od 4,790 mm izmjerena je u

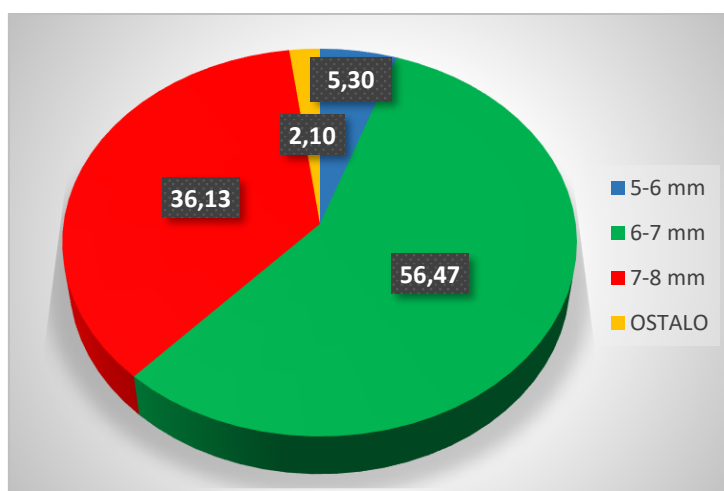
populaciji Molunat, a maksimalna od 9,080 mm u populaciji Korčula. Varijabilnost širine sjemenke kreće se od 3,96 % (Vis) do 9,34 % (Lastovo).

Tablica 24. Deskriptivni statistički pokazatelji za širinu sjemenki rogača

Populacija	*N	Širina sjemenke (mm)		
		** $\bar{x} \pm SD$	minimum	maksimum
Šolta	250	6,349 ± 0,333	4,860	7,340
Brač	250	6,879 ± 0,426	5,720	7,840
Podgora	250	6,765 ± 0,428	4,930	7,830
Hvar	250	6,696 ± 0,369	5,910	8,280
Vis	250	6,939 ± 0,275	6,270	8,010
Pelješac	250	6,854 ± 0,389	5,440	7,920
Lastovo	250	7,116 ± 0,665	5,460	8,640
Mljet	250	6,577 ± 0,499	5,320	8,060
Korčula	250	7,407 ± 0,442	6,110	9,080
Šipan	250	7,086 ± 0,381	6,010	8,240
Orašac	250	6,199 ± 0,293	5,250	7,880
Molunat	250	7,031 ± 0,589	4,790	8,090

* broj sjemenki; ** srednja vrijednost širine sjemenki ± standardna devijacija

Širina sjemenki rogača razdijeljena je u grupe od po 1 mm (Slika 17.). U najvećem postotku (56,47 %) su sjemenke širine 6 – 7 mm i od 7 – 8 mm (36,13 %). Sjemenki širine 5 – 6 mm je 5,30 %. Preostalih 2,10 % sjemenki, uglavnom s lokacija Korčula i Lastovo, imaju širinu veću od 8 mm.



Slika 17. Postotak zastupljenosti širine sjemenke rogača

Prosječna debljina sjemenki kreće se ovisno o populaciji između 3,702 mm (Brač) i 4,183 mm (Orašac) (Tablica 25.). Minimalna i maksimalna debljina sjemenki (2,390 mm

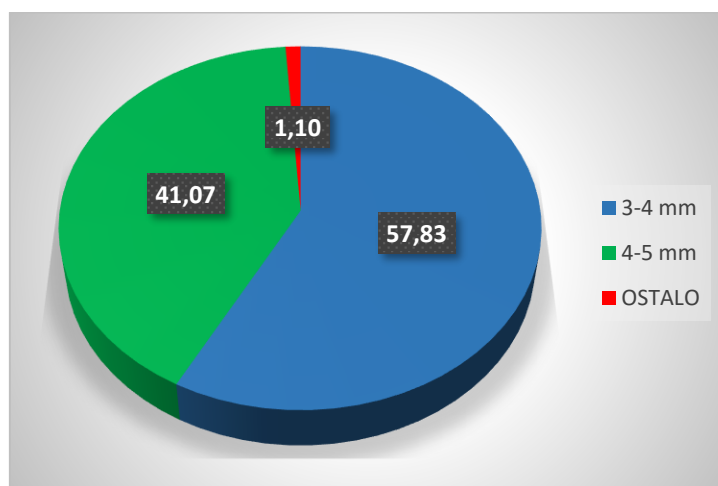
odnosno 5,010 mm) izmjerena je u populaciji Orašac. Najmanja varijabilnost debljine sjemenke je u populaciji Vis (RSD = 5,71 %), a najveća u populaciji Pelješac (RSD = 19,49 %).

Tablica 25. Deskriptivni statistički pokazatelji za debljinu sjemenke rogača

Populacija	Debljina sjemenke (mm)			
	*N	** $\bar{x} \pm SD$	minimum	maximum
Šolta	250	3,926 ± 0,309	3,090	4,810
Brač	250	3,702 ± 0,353	2,870	4,860
Podgora	250	3,886 ± 0,350	3,020	4,830
Hvar	250	3,935 ± 0,311	2,680	4,680
Vis	250	4,019 ± 0,229	3,300	4,610
Pelješac	250	4,122 ± 0,804	3,160	4,790
Lastovo	250	3,714 ± 0,432	2,750	4,890
Mljet	250	3,963 ± 0,347	3,070	4,810
Korčula	250	4,008 ± 0,416	3,120	4,930
Šipan	250	3,731 ± 0,284	2,920	4,620
Orašac	250	4,183 ± 0,347	2,390	5,010
Molunat	250	3,940 ± 0,231	3,240	4,770

* broj sjemenki; ** srednja vrijednost debljine sjemenke ± standardna devijacija

Debljina sjemenke podijeljena je na grupe od po 1 mm (Slika 18.). Najviše sjemenki (57,83 %) ima debljinu od 3 do 4 mm, zatim slijedi 41,07 % debljine 4 do 5 mm. Preostalih 1,10 % su sjemenke debljine manje od 3 mm (pretežno populacije Lastovo i Šipan) i veće od 5 mm (pretežno populacija Pelješac).

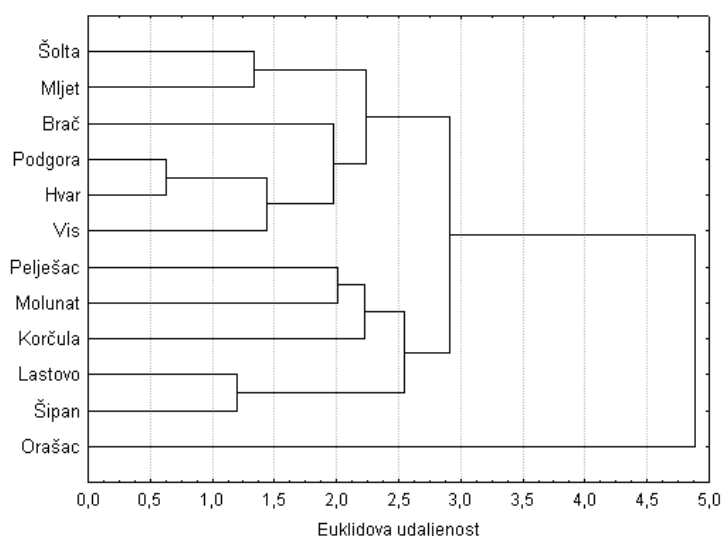


Slika 18. Postotak zastupljenosti debljine sjemenke rogača

Statističkom analizom (Studentov t-test) određene su populacije koje obzirom na morfološke karakteristike sjemenke rogača (masa, duljina, širina i debljina sjemenke) pripadaju istom statističkom skupu ili se statistički značajno razlikuju ($p > 0,05$).

Rezultati statističke analize pokazuju da se obzirom na masu sjemenke ploda (Tablica 26.) istraživane populacije značajno razlikuju te se može izdvojiti samo jedna mala skupina populacija (Pelješac, Lastovi i Šipan) koje pripadaju istom statističkom skupu. Za duljinu i širinu sjemenke također se može ustvrditi da se istraživane populacije značajno razlikuju obzirom na ove parametre (Tablice 27. i 28.). Obzirom na debljinu sjemenke mogu se izdvojiti dvije skupine populacija (Šolta, Podgora, Hvar, Mljet i Molunat kao prva, te Brač, Lastovo i Šipan kao druga skupina) koje pripadaju istom statističkom skupu (Tablica 29.).

Statističkom analizom (t- test) dobiven je uvid u različitost sjemenki istraživanih populacija rogača (Tablice 26 – 29) obzirom na pojedini parametar također je napravljena i UPGMA klaster analiza koja obuhvaća sve parametre (duljina, širina i debljina sjemenke) (Slika 19.).



Slika 19. UPGMA dendrogram dobiven analizom sjemenki istraživanih populacija rogača

UPGMA klaster analiza je na temelju morfoloških značajki sjemenke pokazala grupiranje istraživanih populacija u dvije skupine. U prvoj skupini su Šolta, Mljet, Brač, Podgora, Hvar i Vis. U drugoj skupini su grupirane populacije Pelješac, Molunat, Korčula, Lastovo i Šipan. Sjemenke populacije Orašac najviše se razlikuju od sjemenki ostalih istraživanih populacija.

Tablica 26. Rezultati t-testa za masu sjemenki rogača

Populacija	Šolta	Brač	Podgora	Hvar	Vis	Pelješac	Lastovo	Mljet	Korčula	Šipan	Orašac	Molunat
Šolta	-	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,15455	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Brač		-	0,71964	0,00322	0,00567	0,00000	0,00000	0,00827	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Podgora			-	0,00774	0,00221	0,00000	0,00000	0,00318	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Hvar				-	0,58862	0,00008	0,01168	0,00000	0,00000	0,00393	0,00000	0,00000
Vis					-	0,00000	0,00056	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Pelješac						-	0,76268	0,00000	0,00000	0,45003	0,00000	0,00000
Lastovo							-	0,00000	0,00000	0,83297	0,00000	0,00000
Mljet								-	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Korčula									-	0,00000	0,00000	0,03732
Šipan										-	0,00000	0,00000
Orašac											-	0,00000
Molunat												-

* Korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$

Tablica 27. Rezultati t-testa za duljinu sjemenki rogača

Populacija	Šolta	Brač	Podgora	Hvar	Vis	Pelješac	Lastovo	Mljet	Korčula	Šipan	Orašac	Molunat
Šolta	-	0,00000	0,00000	0,00000	0,00098	0,00000	0,00000	0,00481	0,00278	0,00000	0,00000	0,00000
Brač		-	0,00428	0,00000	0,00000	0,00361	0,00308	0,00000	0,00001	0,00005	0,00000	0,00000
Podgora			-	0,00414	0,00000	0,73068	0,00000	0,00000	0,03222	0,00000	0,00000	0,00000
Hvar				-	0,00000	0,00012	0,00000	0,00000	0,81907	0,00000	0,00000	0,00000
Vis					-	0,00000	0,00000	0,49903	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Pelješac						-	0,00000	0,00000	0,01051	0,00000	0,00000	0,00000
Lastovo							-	0,00000	0,00000	0,28769	0,00000	0,01239
Mljet								-	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Korčula									-	0,00000	0,00000	0,00000
Šipan										-	0,00000	0,00000
Orašac											-	0,00000
Molunat												-

* Korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$

Tablica 28. Rezultati t-testa za širinu sjemenke rogača

Populacija	Šolta	Brač	Podgora	Hvar	Vis	Pelješac	Lastovo	Mljet	Korčula	Šipan	Orašac	Molunat
Šolta	-	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Brač		-	0,00289	0,00000	0,06231	0,48646	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00107
Podgora			-	0,056636	0,00000	0,01541	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Hvar				-	0,00000	0,00000	0,00000	0,00236	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Vis					-	0,00481	0,00012	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,02651
Pelješac						-	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00009
Lastovo							-	0,00000	0,00000	0,53272	0,00000	0,00000
Mljet								-	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Korčula									-	0,00000	0,00000	0,00000
Šipan										-	0,00000	0,21460
Orašac											-	0,00000
Molunat												=

* Korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$

Tablica 29. Rezultati t-testa za debljinu sjemenke rogača

Populacija	Šolta	Brač	Podgora	Hvar	Vis	Pelješac	Lastovo	Mljet	Korčula	Šipan	Orašac	Molunat
Šolta	-	0,0000	0,17919	0,76231	0,000165	0,000360	0,00000	0,20750	0,01342	0,00000	0,00000	0,39656
Brač		-	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,73645	0,00000	0,00000	0,31337	0,00000	0,00000
Podgora			-	0,10493	0,00000	0,00003	0,00000	0,01408	0,00047	0,00000	0,00000	0,02314
Hvar				-	0,00064	0,00064	0,00000	0,33077	0,02688	0,00000	0,00000	0,61569
Vis					-	0,05153	0,00000	0,03601	0,71388	0,00000	0,00000	0,00054
Pelješac						-	0,00000	0,00437	0,04662	0,00000	0,26626	0,00100
Lastovo							-	0,00000	0,00000	0,60276	0,00000	0,00000
Mljet								-	0,19704	0,00000	0,00000	0,53450
Korčula									-	0,00000	0,00000	0,4449
Šipan										-	0,00000	0,00000
Orašac											-	0,00000
Molunat												-

* Korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$

4.1.3. Morfometrija lista rogača

Morfološke karakteristike određene su svakom od 100 listova ($N = 100$) iz pojedine istraživane populacije rogača (ukupno 1200 listova) koji su odabrani metodom slučajnog izbora. Varijabilnost parametara unutar populacija iskazana je relativnom standardnom devijacijom (RSD).

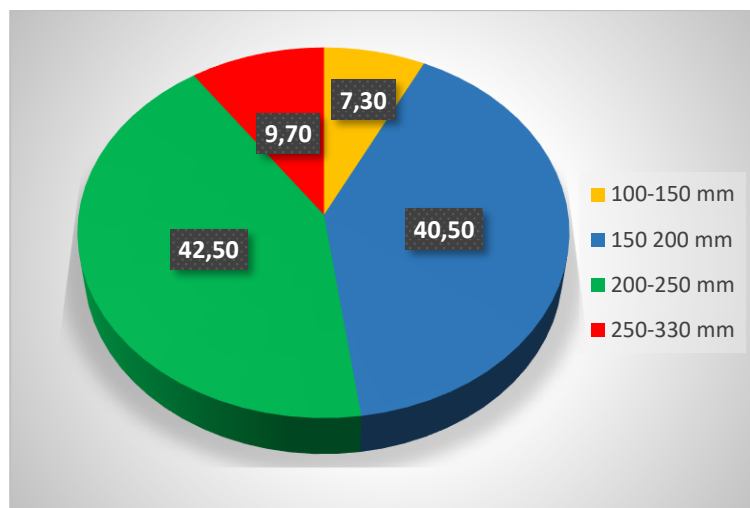
Prosječna duljina lista (Tablica 30.) kreće se od 182,90 mm (populacija Vis) do 214,2 mm (populacija Podgora). Minimalna duljina lista od 112,00 mm izmjerena je u populaciji Pelješac, a maksimalna od 330,00 mm u populaciji Brač. Najmanja varijabilnost u duljini lista zabilježena je kod populacije Šolta (RSD = 13,44 %), a najveća kod populacije Lastovo (RSD = 22,66 %).

Tablica 30. Deskriptivni statistički pokazatelji za duljinu lista rogača

Populacija	*N	Duljina lista (mm)		
		** $\bar{x} \pm SD$	minimum	maksimum
Šolta	100	207,70 ± 27,91	152,00	264,00
Brač	100	195,70 ± 37,48	138,00	330,00
Podgora	100	214,20 ± 40,61	132,00	324,00
Hvar	100	211,80 ± 31,76	144,00	297,00
Vis	100	182,90 ± 29,09	128,00	262,00
Pelješac	100	192,74 ± 43,68	112,00	312,00
Lastovo	100	199,48 ± 44,39	114,00	313,00
Mljet	100	198,38 ± 33,63	139,00	292,00
Korčula	100	193,38 ± 30,21	120,00	252,00
Šipan	100	208,68 ± 35,48	135,00	290,00
Orašac	100	209,20 ± 30,44	135,00	265,00
Molunat	100	207,54 ± 37,25	118,00	293,00

*broj listova; **srednja vrijednost duljine lista ± standardna devijacija

Postupkom razdjeljivanja duljine istraživanih listova na grupe od po 50 mm dobiven je uvid u broj listova u ovisnosti o duljini izražen u postocima (Slika 20.). Najviše listova (42,50 %) ima duljinu između 200 i 250 mm (podjednako obuhvaćene sve populacije). Kod 40,50 % listova duljina se kreće između 150 – 200 mm a kod 7,30 % od 100 do 150 mm. Listova duljine veće od 250 mm ima 9,70 %.



Slika 20. Postotak zastupljenost duljine lista rogača

Ovisno o istraživanoj lokaciji prosječna širina lista (Tablica 31.) kreće se od 103,46 mm (Lastovo) do 122,26 mm (Orašac). Minimalna širina lista kreće se od 68,00 mm (Pelješac) do 92,00 mm (Podgora), a maksimalna u vrlo uskom području od 142,00 mm (Korčula) do 159,00 mm (Podgora), osim populacije Orašac koja ima maksimalnu širinu lista (181,00 mm). Obzirom da je širina listova vrlo ujednačena kod svih istraživanih populacija, relativne standardne devijacije kreću se od 9,72 % (Šolta) do maksimalno 18,68 % (Lastovo).

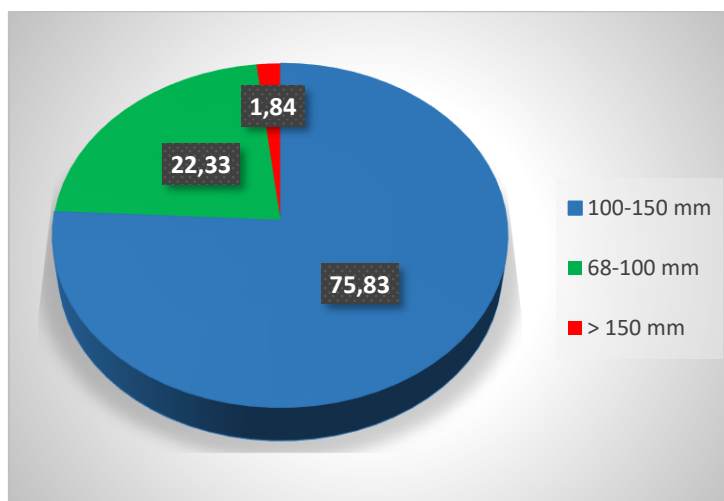
Tablica 31. Deskriptivni statistički pokazatelji za širinu lista rogača

Populacija	N	Širina lista (mm)		
		** $\bar{x} \pm SD$	minimum	maksimum
Šolta	100	122,06 ± 11,86	84,00	148,00
Brač	100	114,84 ± 17,04	79,00	149,00
Podgora	100	121,84 ± 15,72	92,00	159,00
Hvar	100	118,22 ± 16,89	87,00	158,00
Vis	100	110,54 ± 13,44	90,00	151,00
Pelješac	100	106,32 ± 19,86	68,00	155,00
Lastovo	100	103,46 ± 22,64	69,00	155,00
Mljet	100	114,76 ± 17,65	78,00	154,00
Korčula	100	112,66 ± 16,75	77,00	142,00
Šipan	100	113,00 ± 17,73	69,00	148,00
Orašac	100	122,26 ± 16,67	87,00	181,00
Molunat	100	112,26 ± 18,87	71,00	155,00

*broj listova; **srednja vrijednost širine lista ± standardna devijacija

Razdjeljivanjem širine lista na grupe od po 50 mm (Slika 21.) vidljivo je da najviše listova (75,83 %) ima širinu od 100 do 150 mm. Širinu od 68 do 100 mm ima 22,33 % listova.

Preostalih 1,84 % listova ima širinu veću od 150 mm, odnosno manju od 70 mm (populacije Šipan, Lastovo i Pelješac).



Slika 21. Postotak zastupljenost širine lista rogača

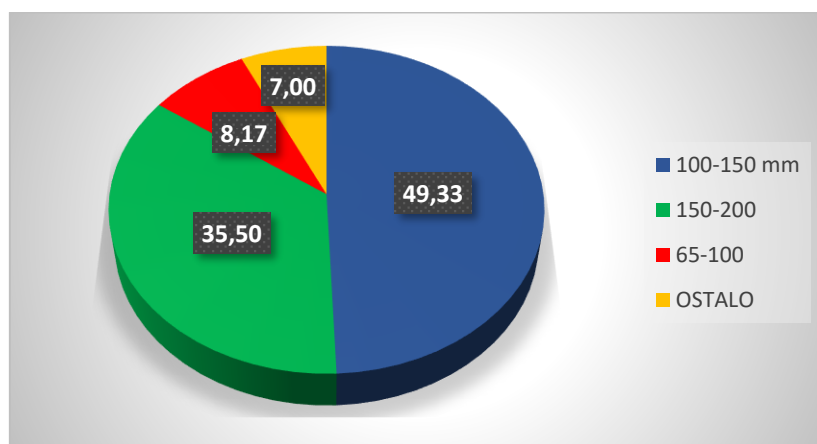
Duljina peteljke lista (Tablica 32.) kreće se od 65,00 mm (Lastovo) do 266,00 mm (Mljet), a vrijednosti prosječne duljine od 128,86 mm (Vis) do 155,58 mm (Mljet). Vrlo visoka varijabilnost u duljini peteljke lista (RSD = 68,34 %) određena je kod populacije s otoka Mljeta dok listovi iz populacije s otoka Šolte nemaju velike razlike u duljini peteljke (RSD = 17,03 %).

Tablica 32. Deskriptivni statistički pokazatelji za duljinu peteljke lista rogača

Populacija	N	Duljina peteljke lista (mm)		
		** $\bar{x} \pm SD$	minimum	maksimum
Šolta	100	150,56 ± 25,64	88,00	200,00
Brač	100	139,08 ± 34,66	74,00	249,00
Podgora	100	155,36 ± 39,23	91,00	252,00
Hvar	100	152,42 ± 28,88	95,00	216,00
Vis	100	128,86 ± 27,66	82,00	202,00
Pelješac	100	138,54 ± 37,05	71,00	243,00
Lastovo	100	143,98 ± 39,41	65,00	232,00
Mljet	100	155,58 ± 41,32	82,00	266,00
Korčula	100	135,04 ± 30,11	68,00	196,00
Šipan	100	150,50 ± 36,24	85,00	240,00
Orašac	100	149,50 ± 27,16	86,00	202,00
Molunat	100	153,52 ± 33,44	78,00	231,00

*broj listova; **srednja vrijednost duljine peteljke lista ± standardna devijacija

Razdjeljivanjem na grupe od po 50 mm (Slika 22.) dobiveni su sljedeći podaci za duljinu peteljke lista: 49,33 % listova ima duljinu peteljke između 100 – 150 mm, 35,50 % od 150 – 200 mm, a 8,17 % od 65–100 mm.



Slika 22. Postotak zastupljenosti duljine peteljke lista rogača

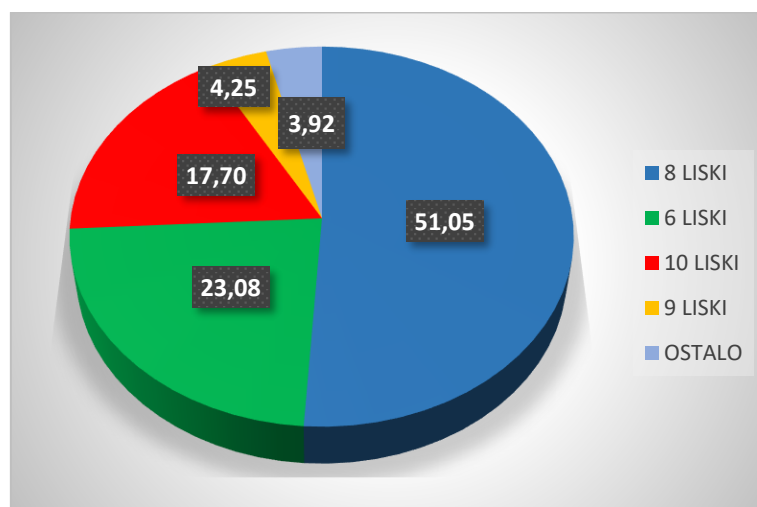
Listovi rogača su perasto sastavljeni od nekoliko nasuprotnih liski, čiji se broj kod istraživanih populacija kreće od minimalno 4 (Podgora) do maksimalno 12 (Podgora, Lastovo i Molunat) liski po listu (Tablica 33.) uz relativno malu varijabilnost unutar populacija. Relativna standardna devijacija kreće se od 13,15 % (Šolta) do 22,72 % (Podgora).

Tablica 33. Deskriptivni statistički pokazatelji za broj liski lista rogača

Populacija	Broj liski lista			
	*N	** $\bar{x} \pm SD$	minimum	maksimum
Šolta	100	7,92 ± 1,04	6,00	10,00
Brač	100	7,60 ± 1,33	6,00	10,00
Podgora	100	8,22 ± 1,87	4,00	12,00
Hvar	100	7,42 ± 1,20	6,00	10,00
Vis	100	7,18 ± 1,08	6,00	10,00
Pelješac	100	7,68 ± 1,23	5,00	10,00
Lastovo	100	7,84 ± 1,38	6,00	12,00
Mljet	100	8,00 ± 1,50	5,00	10,00
Korčula	100	7,86 ± 1,27	6,00	10,00
Šipan	100	8,30 ± 1,42	6,00	11,00
Orašac	100	8,58 ± 1,32	6,00	11,00
Molunat	100	8,62 ± 1,25	6,00	12,00

*broj listova; **srednja vrijednost broja liski listova ± standardna devijacija

Najviše listova (51,05 %) ima 8 liski, zatim 23,08 % i 17,70 % listova ima 6 odnosno 10 liski. Od ostalih listova može se još samo istaknuti 4,25 % odnosno 2,20 % listova s 9, odnosno 7 liski (Slika 23.).



Slika 23. Postotak zastupljenosti broja liski lista rogača

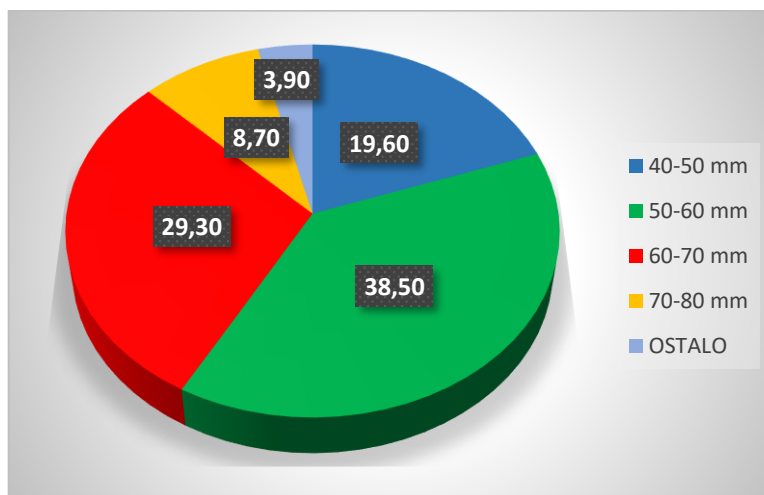
Duljina liske listova (Tablica 34.) kreće se od 25 mm (Vis) do maksimalno 98 mm (Mljet). Prosječna duljina liske je između 52,48 mm (Pelješac) i 61,42 mm (Orašac). Najmanja varijabilnost je unutar populacije Hvar (RSD = 14,02 %), a najveća unutar populacije Pelješac (RSD = 22,55 %).

Tablica 34. Deskriptivni statistički pokazatelji za duljinu liske lista rogača

Populacija	*N	Duljina liske lista (mm).		
		** $\bar{x} \pm SD$	minimum	maksimum
Šolta	396	58,39 ± 9,34	37,00	77,00
Brač	378	57,62 ± 10,80	36,00	92,00
Podgora	416	58,36 ± 9,64	33,00	86,00
Hvar	501	59,76 ± 8,38	41,00	85,00
Vis	395	53,75 ± 8,53	25,00	76,00
Pelješac	384	52,48 ± 11,83	28,00	93,00
Lastovo	392	52,95 ± 10,10	28,00	86,00
Mljet	400	58,28 ± 10,29	26,00	98,00
Korčula	389	55,25 ± 9,49	32,00	84,00
Šipán	415	56,52 ± 8,73	30,00	79,00
Orašac	429	61,42 ± 10,11	32,00	90,00
Molunat	434	55,19 ± 10,18	28,00	94,00

*broj liski; **srednja vrijednost duljine liske ± standardna devijacija

Duljina liske lista razdijeljena je na grupe od po 10 mm. Najveći broj lisiki (38,50 %) ima duljinu od 50 do 60 mm. Po brojnosti slijedeća je grupa od 60 do 70 mm (29,30 %), zatim grupa od 40 do 50 mm (19,60 %), te grupa od 71 do 80 mm (8,70 %). Duljinu veću od 90 mm odnosno manju od 40 mm ima 3,90 % lisiki (Slika 24.).



Slika 24. Postotak zastupljenost duljine liske lista rogača

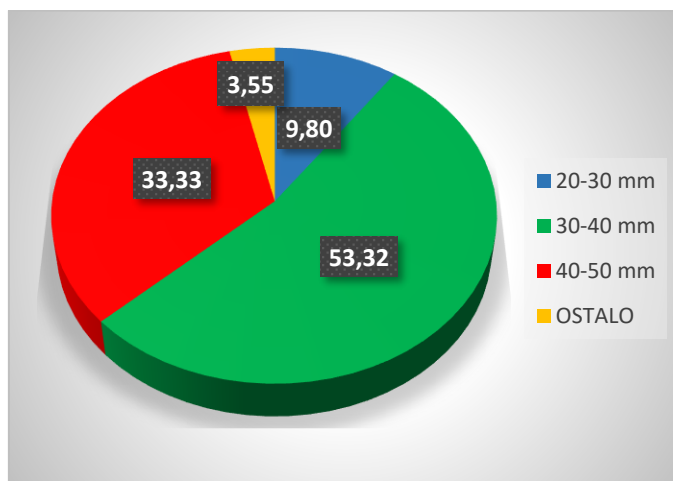
Prosječna vrijednost širine liske lista (Tablica 35.) kreće se u rasponu od 35,08 mm (Lastovo) do 41,82 mm (Šolta). Minimalna širina liske lista od 18 mm izmjerena je u populaciji Vis, a maksimalna od 63 mm populaciji Brač. Najmanja varijabilnost je u populaciji Šolta (RSD = 11,12 %), a najveće u populaciji Molunat (RSD = 18,61 %).

Tablica 35. Deskriptivni statistički pokazatelji za širinu liske lista rogača

Populacija	*N	Širina liske lista (mm)		
		** $\bar{x} \pm SD$	minimum	maksimum
Šolta	396	41,80 ± 4,65	28,00	54,00
Brač	378	38,80 ± 6,75	26,00	63,00
Podgora	416	37,19 ± 6,17	21,00	52,00
Hvar	501	40,43 ± 6,29	25,00	62,00
Vis	395	38,87 ± 5,86	18,00	54,00
Pelješac	384	35,21 ± 6,21	20,00	52,00
Lastovo	392	35,08 ± 6,53	20,00	53,00
Mljet	400	35,46 ± 6,10	19,00	55,00
Korčula	389	37,51 ± 5,55	24,00	56,00
Šipan	415	36,33 ± 5,15	23,00	50,00
Orašac	429	36,68 ± 6,02	20,00	51,00
Molunat	434	36,33 ± 6,83	22,00	60,00

*broj lisiki; **srednja vrijednost širine liske ± standardna devijacija

Širina liske lista razdijeljena je na grupe od po 10 mm. Najviše liski (53,32 %) ima širinu između 30 i 40 mm, zatim 33,33 % od 40 do 50 mm te 9,80 % od 20 do 30 mm. Preostalih 3,55 % ima širinu liske manju od 20 mm (Vis i Šolta) odnosno veću od 50 mm. Samo listovi populacije Hvar i Brač imaju širinu od preko 60 mm (Slika 25.).



Slika 25. Postotak zastupljenosti širine liske lista rogača

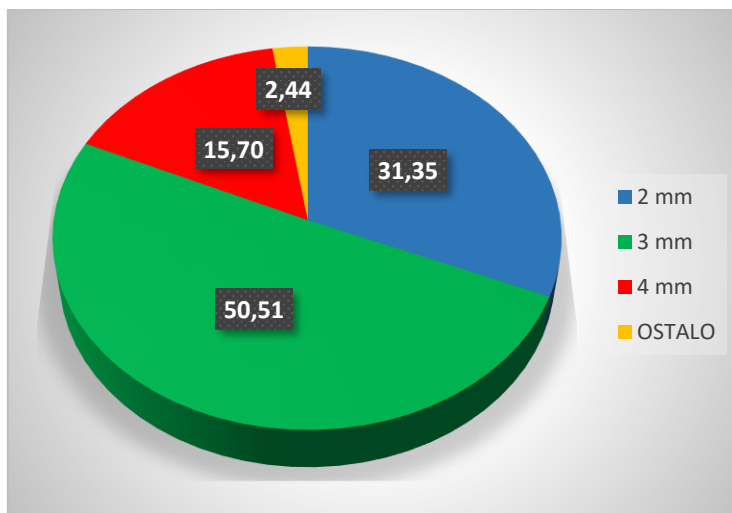
Duljina peteljčice liske lista kreće se od 1 do 6 mm (Tablica 36). Prosječna duljina peteljčice je u rasponu od 2.52 mm (Vis) do 3.40 mm (Podgora). Najmanja varijabilnost u duljini peteljčice određena je kod populacije Hvar (RSD = 18,88 %) a najveća kod populacije Molunat (RSD = 29,11 %).

Tablica 36. Deskriptivni statistički pokazatelji za duljinu peteljčice liske lista rogača

Duljina peteljčice liske lista (mm)				
Populacija	*N	** $\bar{x} \pm SD$	minimum	maksimum
Šolta	396	2,72 ± 0,64	2,00	4,00
Brač	378	2,68 ± 0,64	1,00	5,00
Podgora	416	3,40 ± 0,85	1,00	6,00
Hvar	501	2,91 ± 0,55	2,00	4,00
Vis	395	2,52 ± 0,57	1,00	4,00
Pelješac	384	2,70 ± 0,76	1,00	5,00
Lastovo	392	2,86 ± 0,75	1,00	5,00
Mljet	400	2,62 ± 0,71	1,00	5,00
Korčula	389	2,81 ± 0,60	2,00	5,00
Šipan	415	3,10 ± 0,74	2,00	5,00
Orašac	429	2,78 ± 0,70	1,00	4,00
Molunat	434	3,08 ± 0,90	1,00	6,00

*broj liski; **srednja vrijednost duljine peteljčice liske ± standardna devijacija

Duljina peteljčice liske lista rasčlanjena je na grupe od po 1 milimetar. Najveći broj liski (50,51 %) ima duljinu peteljčice od 3 mm, zatim 31,35 % duljinu od 2 mm te 15,70 % duljinu peteljčice od 4 mm. Ostale peteljčice (2,44 %) su dugačke 1 mm, odnosno 5mm. Samo 9 liski ima peteljčicu duljine 6 mm (populacije Podgora i Molunat) (Slika 26.).



Slika 26. Postotak zastupljenosti duljine peteljčice liske lista rogača

Statističkom analizom (Studentov t-test) određene su populacije koje obzirom na morfološke karakteristike lista rogača (širina i duljina lista, duljina peteljke lista, broj liski lista, duljina i širina liske i duljina peteljčice liske lista) pripadaju istom statističkom skupu ili se značajno razlikuju ($p > 0,05$). Populacije koje pripadaju istom statističkom skupu su grupirane po skupinama.

Obzirom na duljinu lista (Tablica 37.) mogu se istaknuti tri skupine populacija koje pripadaju istom statističkom skupu. Prvu skupinu čine Šolta, Podgora, Hvar, Lastovo, Šipan, Orašac i Molunat, drugu Brač, Pelješac, Lastovo, Mljet i Korčula, a treću Šipan, Orašac i Molunat. Listovi populacije Vis imali su značajno manju prosječnu duljinu od ostalih istraživanih populacija.

Populacije Šolta, Podgora, Hvar i Orašac kao prva skupina, zatim Brač, Hvar, Mljet, Korčula, Šipan i Molunat kao druga skupina te Vis, Pelješac, Mljet, Korčula, Šipan i Molunat kao treća skupina pripadaju, obzirom na širinu lista, istom statističkom skupu (Tablica 38.). Populacija Lastovo ima značajno uže listove u odnosu na ostale populacije (izuzetak je populacija Pelješac).

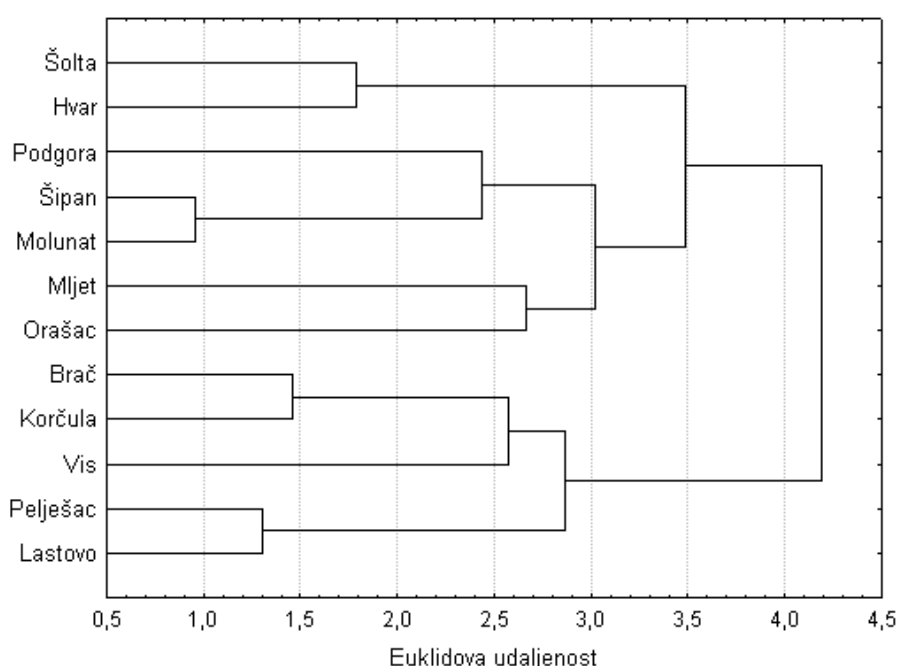
Rezultati statističke analize pokazuju da obzirom na duljinu peteljke lista (Tablica 39.) razlike unutar populacija nisu statistički značajne ($p \geq 0,05$) tako da istom statističkom skupu pripada čak osam populacija tj. Šolta, Podgora, Hvar, Lastovo, Mljet, Šipan, Orašac i

Molunat. Sljedeće dvije veće skupine su Brač, Pelješac, Lastovo, Mljet i Korčula te Podgora, Hvar, Mljet, Šipan, Orašac i Molunat. Duljina peteljke lista populacije Vis je statistički značajno manja od ostalih populacija.

Obzirom na broj liski lista (Tablica 40.) mogu se formirati tri veće skupine populacija koje pripadaju istom statističkom skupu. U prvu skupinu pripadaju Šolta, Brač, Podgora, Pelješac, Lastovo, Mljet i Korčula, u drugu skupinu Brač, Hvar, Pelješac, Lastovo i Korčula a u treću skupinu Podgora, Lastovo, Mljet, Korčula, Šipan, Orašac i Molunat.

Rezultati t-testa za duljinu i širinu liske i duljinu peteljčice liske lista (Tablice od 41. do 43.) pokazuju da se ovi parametri značajno razlikuju između istraživanih populacija. Kao veća skupina populacija mogu se istaknuti samo populacije Šolta, Brač, Pelješac i Orašac koje pripadaju istom skupu obzirom na duljinu peteljčice lista.

Statističkom analizom (t- test) dobiven je uvid u različitost listova istraživanih populacija rogača (Tablice od 37. do 43.) obzirom na pojedini parametar, međutim, napravljena je i UPGMA klaster analiza koja obuhvaća sve parametre (duljina i širina lista, duljina peteljke lista, broj liski lista, duljina i širina liski i duljina peteljke liske) (Slika 27.).



Slika 27. UPGMA dendrogram dobiven analizom listova istraživanih populacija rogača

UPGMA klaster analiza je na temelju morfoloških značajki lista pokazala grupiranje istraživanih populacija u tri skupine. U prvoj skupini su dvije međusobno najslbličnije populacije Šolta i Hvar, u drugu skupinu su grupirane populacije Podgora, Šipan, Molunat, Mljet i Orašac. U trećoj skupini su populacije Brač, Korčula, Vis, Pelješac i Lastovo.

Tablica 37. Rezultati t-testa za duljinu lista rogača.

Populacija	Šolta	Brač	Podgora	Hvar	Vis	Pelješac	Lastovo	Mljet	Korčula	Šipan	Orašac	Molunat
Šolta	-	0,01098	0,18869	0,33337	0,00000	0,00433	0,11855	0,03419	0,00061	0,82838	0,71686	0,97261
Brač		-	0,00980	0,00124	0,00759	0,60765	0,51604	0,59519	0,630042	0,01271	0,00569	0,02617
Podgora			-	0,64206	0,00000	0,00041	0,01529	0,00304	0,00006	0,30828	0,32675	0,22826
Hvar				-	0,00000	0,0052	0,02508	0,00413	0,00004	0,51310	0,55517	0,38518
Vis					-	0,06227	0,00205	0,00061	0,01328	0,00000	0,00000	0,00000
Pelješac						-	0,28043	0,30748	0,90421	0,00509	0,00228	0,01066
Lastovo							-	0,8436	0,25729	0,10704	0,07245	0,16579
Mljet								-	0,27003	0,03638	0,01800	0,06945
Korčula									-	0,00121	0,00029	0,00353
Šipan										-	0,91155	0,82485
Orašac											-	0,73040
Molunat												-

* Korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$.

Tablica 38. Rezultati t-testa za širinu lista rogača

Populacija	Šolta	Brač	Podgora	Hvar	Vis	Pelješac	Lastovo	Mljet	Korčula	Šipan	Orašac	Molunat
Šolta	-	0,00062	0,91114	0,06424	0,00000	0,00000	0,00000	0,00073	0,00001	0,00003	0,96885	0,00002
Brač		-	0,00287	0,16048	0,04899	0,00133	0,00008	0,97402	0,36279	0,45532	0,00250	0,31152
Podgora			-	0,11817	0,00000	0,00000	0,00000	0,00308	0,00009	0,00025	0,89595	0,00013
Hvar				-	0,00047	0,00000	0,00000	0,15818	0,02042	0,03427	0,10010	0,10010
Vis					-	0,08004	0,00778	0,05860	0,32487	0,27032	0,00000	0,45875
Pelješac						-	0,34349	0,00173	0,01557	0,01292	0,00000	0,03134
Lastovo							-	0,00011	0,00128	0,00108	0,00000	0,00319
Mljet								-	0,38918	0,48259	0,000268	0,33442
Korčula									-	0,88930	0,00009	0,87421
Šipan										-	0,00023	0,77536
Orašac											-	0,00012
Molunat												-

* Korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$

Tablica 39. Rezultati t-testa za duljinu peteljke lista rogača

Populacija	Šolta	Brač	Podgora	Hvar	Vis	Pelješac	Lastovo	Mljet	Korčula	Šipan	Orašac	Molunat
Šolta	-	0,00839	0,30707	0,63066	0,00000	0,00828	0,16327	0,64675	0,00012	0,98923	0,77686	0,48333
Brač		-	0,00215	0,00349	0,00640	0,91535	0,35166	0,14168	0,27997	0,02385	0,01892	0,00307
Podgora			-	0,54692	0,00000	0,00210	0,04206	0,98453	0,00006	0,36402	0,22089	0,72157
Hvar				-	0,00000	0,00351	0,08569	0,77456	0,00005	0,67913	0,46228	0,80377
Vis					-	0,01232	0,00047	0,00963	0,04681	0,00001	0,00000	0,00000
Pelješac						-	0,31584	0,13178	0,46441	0,46441	0,02207	0,01700
Lastovo							-	0,30757	0,07300	0,22482	0,25019	0,06647
Mljet								-	0,06455	0,65160	0,58017	0,85356
Korčula									-	0,00122	0,00045	0,00006
Šipan										-	0,82548	0,54104
Orašac											-	0,35194
Molunat												-

* Korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$

Tablica 40. Rezultati t-testa za broj liski lista istraživanih populacija rogača

Populacija	Šolta	Brač	Podgora	Hvar	Vis	Pelješac	Lastovo	Mljet	Korčula	Šipan	Orašac	Molunat
Šolta	-	0,060022	0,16212	0,00198	0,00000	0,13802	0,64456	0,66239	0,71544	0,03252	0,00012	0,00003
Brač		-	0,00749	0,31823	0,01512	0,65968	0,21308	0,04797	0,15975	0,00042	0,00000	0,00000
Podgora			-	0,00041	0,00000	0,01664	0,10358	0,35998	0,11261	0,73376	0,11696	0,07684
Hvar				-	0,13954	0,13304	0,02324	0,00298	0,01290	0,00001	0,00001	0,00001
Vis					-	0,00001	0,00022	0,00002	0,00007	0,00007	0,00000	0,00000
Pelješac						-	0,38842	0,10116	0,31014	0,00117	0,00000	0,00000
Lastovo							-	0,43459	0,91534	0,02156	0,00015	0,00004
Mljet								-	0,00004	0,14922	0,00417	0,00417
Korčula									-	0,02226	0,00012	0,00003
Šipan										-	0,15093	0,09334
Orašac											-	0,82627
Molunat												-

* Korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$

Tablica 41. Rezultati t-testa za duljinu liske lista istraživanih populacija rogača

Populacija	Šolta	Brač	Podgora	Hvar	Vis	Pelješac	Lastovo	Mljet	Korčula	Šipan	Orašac	Molunat
Šolta	-	0,28391	0,95421	0,02164	0,00000	0,00000	0,00000	0,87017	0,00000	0,00318	0,00000	0,00000
Brač		-	0,30861	0,00097	0,00000	0,00000	0,00000	0,38066	0,00132	0,11355	0,00000	0,00104
Podgora			-	0,01868	0,00000	0,00000	0,00000	0,91369	0,00000	0,00404	0,00000	0,00000
Hvar				-	0,00000	0,00000	0,00000	0,01772	0,00000	0,00000	0,00618	0,00000
Vis					-	0,085494	0,22999	0,00000	0,01997	0,00000	0,00000	0,02823
Pelješac						-	0,55184	0,00000	0,00034	0,00000	0,00000	0,00045
Lastovo							-	0,00000	0,00107	0,00000	0,00000	0,00157
Mljet								-	0,00002	0,00840	0,00001	0,00001
Korčula									-	0,04969	0,00000	0,92949
Šipan										-	0,00000	0,04264
Orašac											-	0,00000
Molunat												-

* Korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$

Tablica 42. Rezultati t-testa za širinu liske lista istraživanih populacija rogača

Populacija	Šolta	Brač	Podgora	Hvar	Vis	Pelješac	Lastovo	Mljet	Korčula	Šipan	Orašac	Molunat
Šolta	-	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Brač		-	0,00046	0,00025	0,89217	0,00000	0,00000	0,00000	0,00369	0,00000	0,00000	0,00000
Podgora			-	0,00000	0,00008	0,00000	0,00000	0,00006	0,44889	0,02866	0,22069	0,05394
Hvar				-	0,00015	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Vis					-	0,00000	0,00000	0,00000	0,00090	0,00000	0,00000	0,00000
Pelješac						-	0,77323	0,57129	0,00000	0,00579	0,00068	0,01518
Lastovo							-	0,39634	0,00000	0,00263	0,00028	0,00758
Mljet								-	0,00000	0,02877	0,00398	0,05425
Korčula									-	0,00186	0,04182	0,00722
Šipan										-	0,36447	0,99659
Orašac											-	0,42657
Molunat												-

* Korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$

Tablica 43. Rezultati t-testa za duljinu peteljčice liski istraživanih populacija rogača

Populacija	Šolta	Brač	Podgora	Hvar	Vis	Pelješac	Lastovo	Mljet	Korčula	Šipan	Orašac	Molunat
Šolta	-	0,38733	0,00000	0,00000	0,00000	0,70339	0,00089	0,02914	0,03672	0,00000	0,19268	0,00000
Brač		-	0,00000	0,00000	0,00030	0,68611	0,00005	0,18142	0,00317	0,00000	0,03397	0,00000
Podgora			-	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Hvar				-	0,00000	0,00002	0,50584	0,00000	0,00858	0,00001	0,00123	0,00055
Vis					-	0,00022	0,00000	0,04117	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Pelješac						-	0,00070	0,10413	0,02355	0,00000	0,11824	0,00000
Lastovo							-	0,00000	0,13415	0,00003	0,03995	0,00076
Mljet								-	0,00003	0,00000	0,49336	0,00000
Korčula									-	0,00000	0,49336	0,00001
Šipan										-	0,00000	0,68422
Orašac											-	0,00000
Molunat												-

* Korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$.

4.2. Rezultati genetskih istraživanja

Između 12 istraživanih populacija rogača AFLP metodom pomoću četiri kombinacije početnica, utvrđena su ukupno 483 markera, a udio polimorfnih markera bio je 70,39 % (340 polimorfna markera). Udio polimorfnih markera po kombinaciji početnica između istraživanih populacija kreće se od 61,94 % (E45/M46) do 76,11 % (E36/M36). Najveću PIC-vrijednost ima kombinacija početnica E45/M46 (0,24), a najmanju su pokazale kombinacije početnica E36/M36 i E45/M36 (0,16) (Tablica 44.).

Tablica 44. Broj/udio polimorfnih markera i informacijski sadržaj polimorfizma (PIC)

Kombinacija početnica	Ukupan broj markera	Broj polimorfnih markera	Udio polimorfnih markera (%)	PIC
E36/M46	139	98	71,50	0,22
E36/M36	113	86	76,11	0,16
E45/M46	134	83	61,94	0,24
E45/M36	97	73	75,25	0,16
Ukupno	483	340	70,39	

Udio polimorfnih markera, od ukupnog broja markera utvrđenih pomoću četiri kombinacije početnica, kreće se od 30,0 % (populacija Vis) do 75,9 % (populacija Podgora) (Tablica 45.). Dakle, individue unutar populacije rogača s otoka Visa pokazuju najveću uniformnost (najmanju varijabilnost), dok individue unutar populacije rogača s područja Podgore na razini molekularnih markera imaju najveću varijabilnost. Prosječna vrijednost koeficijenta različitosti između parova individua unutar proučavanih populacija kreće se od 18,76 (Vis) do 48,69 (Korčula). Na temelju rezultata istraživanja utvrđena je najmanja varijabilnost između individua unutar populacije Lastovo kod koje je utvrđena najmanja standardna devijacija ($SD = 6,3$). Najveća varijabilnost individua utvrđena je kod populacije s otoka Šipana ($SD = 15,6$) čiji se koeficijent različitosti kretao od 11 do 78 (Tablica 46.).

Analizom molekularne varijance (AMOVA) procijenjena je i razdijeljena ukupna fenotipska varijanca na varijancu uzrokovanu razlikama između populacija i varijancu između individua unutar populacija, te je testirana značajnost izvora varijabilnosti (Tablica 47.). Većina fenotipske varijance utvrđena je između individua unutar populacija (77,51 %), dok je preostali udio varijance (22,49 %) utvrđen između populacija rogača. Utvrđena je značajna udaljenost između istraživanih populacija ($\Phi_{ST} = 0,24$; $p < 0,001$).

Tablica 45. Broj monomorfnih i polimorfnih markera unutar populacija rogača po kombinaciji početnica

Kombinacija početnica	Između individua unutar populacija												
	Brač	Hvar	Korčula	Lastovo	Mljet	Molunat	Orašac	Pelješac	Podgora	Šolta	Šipan	Vis	
E36/M46	*m	35	36	26	29	39	20	41	31	18	33	38	40
	**p	32	28	50	36	27	49	22	37	67	30	24	18
E36/M36	m	30	34	28	33	30	17	33	28	21	35	17	36
	p	28	9	25	23	19	41	18	21	51	16	34	13
E45/M46	m	33	35	31	32	35	15	33	30	16	35	31	37
	p	31	28	36	33	26	58	28	35	63	25	33	21
E45/M36	m	29	33	12	28	30	19	32	30	15	34	19	34
	p	22	8	42	16	12	33	13	17	40	10	28	11
Ukupno	m	127	138	97	122	134	71	139	119	70	137	105	147
	p	113	73	153	108	84	181	81	110	221	81	119	63
	***p%	47,1	34,6	61,2	47,0	38,5	71,8	36,8	48,0	75,9	37,2	53,1	30,0

*m-broj monomorfnih markera; **p-broj polimorfnih markera; ***p % -udio polimorfnih markera

Tablica 46. Rangiranje koeficijenta različitosti (EucSQ) između istraživanih individua unutar populacija

Populacije	EucSQ \bar{x}	min	max	SD
Šolta	25,64	5	43	10,2
Brač	36,33	7	59	14,1
Podgora	46,32	21	65	7,8
Hvar	23,51	3	43	11,3
Vis	18,76	5	35	8,1
Pelješac	37,84	14	64	10,8
Lastovo	39,64	15	53	6,3
Mljet	31,04	6	46	12,1
Korčula	48,69	21	75	13,3
Šipan	36,80	11	78	15,6
Orašac	25,13	10	39	7,4
Molunat	39,93	23	51	7,2

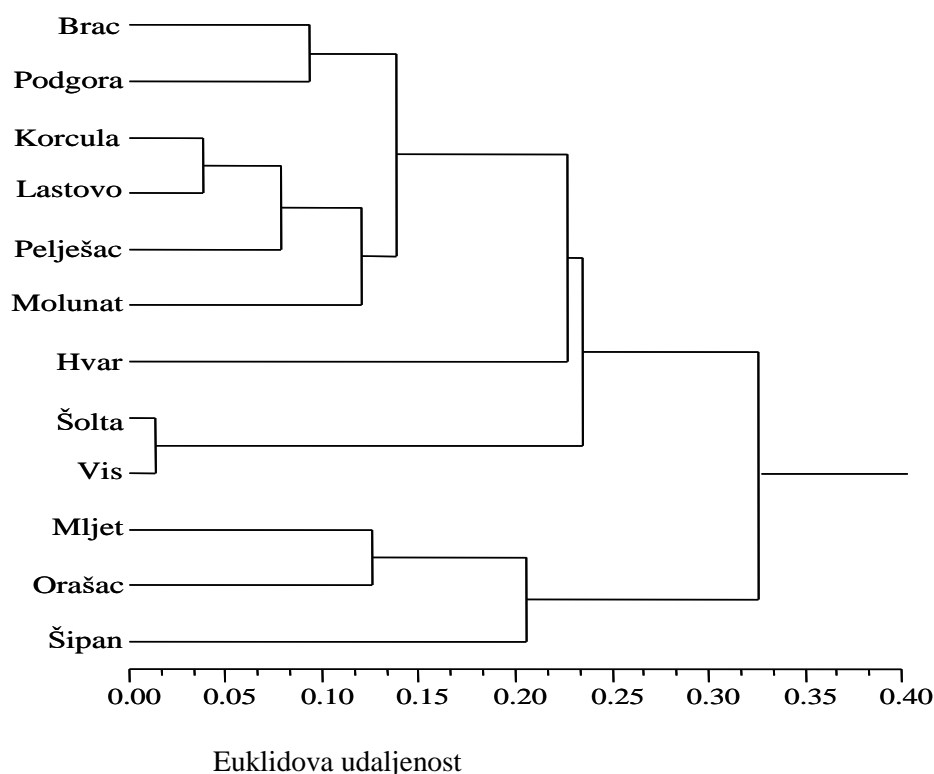
\bar{x} = prosječna vrijednost koeficijenta različitosti; SD = standardna devijacija

Tablica 47. Analiza molekularne varijance 12 populacija rogača

Izvori variranja	n-1	Varijanca	% ukupne varijance	Φ	p (Φ)
Između populacija	11	5,58	22,49	0,24	< 0,001
Između individua unutar populacija	108	17,38	77,51		
Ukupno	119	22,96			

Analizom međupopulacijske udaljenosti (Φ_{ST}) utvrđene su statistički značajne udaljenosti između istraživanih populacija rogača. Najveća međupopulacijska udaljenost utvrđena je između populacija s otoka Visa i Orašca ($\Phi_{ST} = 0,53$, $p < 0.001$), dok je najmanja međupopulacijska udaljenost utvrđena između populacija s otoka Visa i Šolte nije utvrđena statistički značajna razlika, ($\Phi_{ST} = 0,01$; $p = 0,239$) (Tablica 48.).

Iz UPGMA klaster analize vidljivo je grupiranje populacija u tri grupe (Slika 28.). U prvoj grupi (Gr1) je šest populacija rogača koje su porijeklom s otoka Brača, Korčule i Lastova, poluotoka Pelješca i iz područja Podgore i Molunata u priobalju. U drugoj grupi (Gr2) su tri populacije rogača s otoka Hvara, Šolte i Visa, a u trećoj (Gr3) su također tri populacije porijeklom s otoka Mljeta i Šipana i s Orašca u priobalju.

**Slika 28.** UPGMA dendrogram 12 proučavanih populacija rogača baziran na vrijednostima međupopulacijske udaljenosti (Φ_{ST})

Tablica 48. Analiza međupopulacijske udaljenosti između istraživanih populacija rogača

Populacije	Brač	Hvar	Korčula	Lastovo	Mljet	Molunat	Orašac	Pelješac	Podgora	Šolta	Šipan	Vis
Brač		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Hvar	0,25		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0030	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Korčula	0,13	0,21		0,0290	0,0001	0,0010	0,0001	0,0140	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Lastovo	0,17	0,28	0,04		0,0001	0,0001	0,0001	0,003	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Mljet	0,25	0,37	0,16	0,19		0,0001	0,007	0,0001	0,0001	0,0001	0,005	0,0001
Molunat	0,15	0,25	0,08	0,09	0,19		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Orašac	0,38	0,50	0,30	0,33	0,13	0,23		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Pelješac	0,14	0,11	0,05	0,09	0,22	0,13	0,37		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Podgora	0,08	0,17	0,08	0,15	0,24	0,10	0,31	0,10		0,0001	0,0001	0,0001
Šolta	0,16	0,21	0,22	0,28	0,40	0,23	0,50	0,14	0,15		0,0001	0,2390
Šipan	0,26	0,38	0,17	0,20	0,12	0,17	0,28	0,24	0,21	0,38		0,0001
Vis	0,23	0,26	0,26	0,33	0,43	0,27	0,53	0,18	0,21	0,01	0,41	

Međupopulacijska udaljenost - Φ_{ST} (ispod dijagonale) ; p -vrijednosti (iznad dijagonale), statistički su značajne ako je $p \leq 0,001$

Molekularnom analizom varijance utvrđene su značajne razlike na razini pogreške 5% između grupa populacija rogača Gr1 i Gr2 (Tablica 49.) i između Gr1 i Gr3 (Tablica 50), dok između grupa populacija Gr2 i Gr3 nisu utvrđene statistički značajne razlike (Tablica 51.).

Tablica 49. Analiza molekularne varijance za grupe populacije rogača Gr1 i Gr2

Izvori variranja	n-1	Varijanca	% ukupne varijance	Φ	p (Φ)
Između grupa (Gr1 vs. Gr2)	1	2,33	10,01	0,10	0,0098
Između populacija unutar grupa	7	2,78	11,94	0,13	< 0,00
Između individua unutar populacija	81	18,17	78,05	0,22	< 0,00
Ukupno	89	23,27			

Tablica 50. Analiza molekularne varijance za grupe populacije rogača Gr1 i Gr3

Izvori variranja	n-1	Varijanca	% ukupne varijance	Φ	p (Φ)
Između grupa (Gr1 vs. Gr3)	1	3,48	13,40	0,13	0,0088
Između populacija unutar grupa	7	3,07	11,81	0,14	< 0,00
Između individua unutar populacija	81	19,41	74,79	0,25	< 0,00
Ukupno	89	25,96			

Tablica 51. Analiza molekularne varijance za grupe populacije rogača Gr2 i Gr3

Izvori variranja	n-1	Varijanca	% ukupne varijance	Φ	p (Φ)
Između grupa (Gr2 vs. Gr3)	1	7,82	32,75	0,33	0,1075
Između populacija unutar grupa	4	2,89	12,09	0,18	< 0,00
Između individua unutar populacija	54	13,17	55,17	0,45	< 0,00
Ukupno	59	23,87			

Za istraživane morfološke parametre ploda (masa, duljina, širina, duljina peteljke i broj sjemenki), sjemenke (masa, duljina, širina i debljina) i lista (duljina, širina, duljina, peteljke, broj liski, duljina liske, širina liske i duljina peteljčice liske) proveden je Mantelov test komparacije (Tablica 52). Rezultati testa pokazuju jako značajnu ($p < 0,01$) korelaciju između molekularnih AFLP markera i svih ukupno istraživanih parametara ploda rogača. Također visoku značajnost pokazuju korelacije između AFLP i mase ploda, AFLP i širine ploda, AFLP i broja sjemenki ploda, zatim AFLP i kombinirani morfološki parametri ploda i sjemenke, kao i AFLP i ukupni morfološki parametri ploda, lista i sjemenke rogača. Značajne korelacije ($p < 0,05$) utvrđene su između AFLP i svih ukupno istraživanih parametara sjemenki rogača, te

između AFLP i duljine sjemenke. Između AFLP markera i ostalih istraživanih parametara korelacije nisu značajne.

Tablica 52. Rezultati Mantelovog testa za analizirane parametre rogača

Morfologija		
	AFLP	p
Plod (ukupni parametri)	0,55	0,002**
Masa ploda	0,54	0,006**
Duljina ploda	0,19	0,099
Širina ploda	0,54	0,006**
Debljinaploda	0,34	0,099
Duljina peteljke ploda	0,06	0,350
Broj sjemenki ploda	0,47	0,006**
Sjemenka (ukupni parametri)	0,36	0,039*
Masa sjemenke	0,16	0,201
Duljina sjemenke	0,38	0,040*
Širina sjemenke	0,16	0,187
Debljina sjemenke	0,10	0,266
List (ukupni parametri)	0,22	0,092
Plod + list (ukupni parametri)	–	–
Plod + sjemenka (ukupni parametri)	0,6	0,001**
Plod + sjemenka + list (ukupni parametri)	0,56	0,001**

Korelacija se smatra statistički značajnom ako je * $p < 0,05$; jako značajnom ako je ** $p < 0,01$.

4.3. Rezultati fitokemijskih istraživanja rogača

U okviru fitokemijskih istraživanja određen je udio ukupnih fenola, flavonoida i tanina te antioksidativna aktivnost u plodu (ekstrahirani reprezentativni uzorak izmljevene pulpe mahune) i listu (ekstrahirani reprezentativni uzorak izmljevenog lista) dvanaest istraživanih hrvatskih populacija rogača. Također, u istim uzorcima, određen je udio makroelemanata (kalij, kalcij, magnezij i natrij) i mikroelemenata (željezo, bakar, cink, nikal, aluminij, krom, selen, arsen, kadmij, kobalt, molibden i olovo). Rezultati su iskazani kao srednje vrijednosti tri paralelna određivanja i statistički obrađeni (jednosmjerna analiza varijance, Bonferoni post hoc test, UPGMA klaster analiza).

4.3.1. Udio ukupnih fenola, flavonoida i tanina u plodu rogača

Rezultati određivanja ukupnih fenola, flavonoida i tanina u plodovima istraživanih populacija rogača iskazani kao srednje vrijednosti tri paralelna određivanja \pm standardna devijacija prikazani su u Tablici 53.

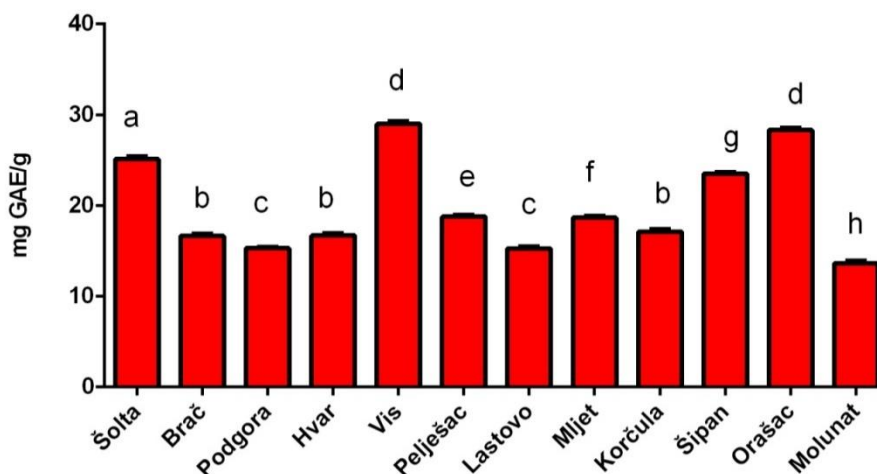
Tablica 53. Udio ukupnih fenola, flavonoida i tanina u plodu istraživanih populacija rogača

Populacija	Ukupni fenoli *(mg GAE/g)	Flavonoidi *(mg CE/g)	Tanini *(mg/g)
Šolta	25,62 \pm 0,278	0,40 \pm 0,009	8,47 \pm 0,442
Brač	17,14 \pm 0,227	0,23 \pm 0,010	6,89 \pm 0,204
Podgora	15,79 \pm 0,126	0,40 \pm 0,013	5,77 \pm 0,201
Hvar	17,09 \pm 0,219	0,08 \pm 0,011	6,12 \pm 0,371
Vis	29,63 \pm 0,326	0,29 \pm 0,013	10,97 \pm 0,459
Pelješac	19,25 \pm 0,207	0,21 \pm 0,014	5,30 \pm 0,255
Lastovo	15,76 \pm 0,224	0,21 \pm 0,000	8,95 \pm 0,101
Mljet	19,16 \pm 0,177	0,23 \pm 0,009	8,66 \pm 0,349
Korčula	17,60 \pm 0,259	0,24 \pm 0,018	5,91 \pm 0,286
Šipan	24,01 \pm 0,177	0,28 \pm 0,011	10,84 \pm 0,353
Orašac	28,81 \pm 0,220	0,51 \pm 0,009	13,18 \pm 0,077
Molunat	14,15 \pm 0,275	0,12 \pm 0,011	5,39 \pm 0,180

*srednje vrijednosti tri paralelna određivanja \pm standardna devijacija; GAE = ekvivalent galne kiseline; CE = ekvivalent katehina

Ovisno o istraživanoj populaciji udio ukupnih fenola u plodu rogača, iskazan kao mg ekvivalenta galne kiseline/g uzorka (mg GAE/g), kreće se od 13,64 mg GAE/g (Molunat) do 29,63 mg GAE/g (Vis). Relativne standardne devijacije tri paralelna određivanja u rasponu su od 0,46 do 9,19 % .

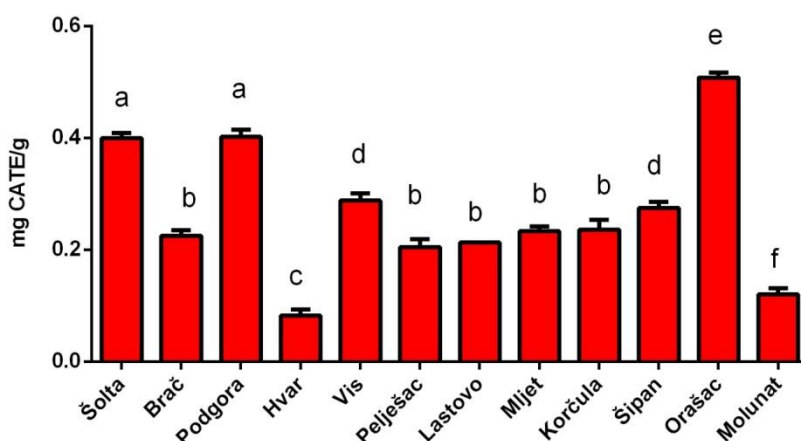
Analizom varijance (ANOVA) utvrđene su statistički značajne razlike u udjelu ukupnih fenola kod pojedinih istraživanih populacija rogača, te je napravljen Bonferoni post hoc test (Slika 29.). Iz analize rezultata vidljivo je da se populacije Šolta, Pelješac, Mljet, Šipan i Molunat statistički značajno razlikuju i međusobno i s ostalim populacijama. Istom statističkom skupu pripadaju populacije Brač, Hvar i Korčula, kao prva skupina, zatim Podgora i Lastovo kao druga, te Vis i Orašac kao treća skupina. Razlika u količini ukupnih fenola između populacija Vis i Molunat je vrlo visoka i iznosi 104,95 %, dok je između populacija Brač i Hvar 0,29 %, odnosno između populacija Podgora i Lastovo svega 0,19 %.



Slika 29. Udio ukupnih fenola (iskazan kao ekvivalent galne kiseline) u plodu istraživanih populacija rogača i rezultati analize varijance i Bonferoni post hoc testa. Jednaka slova označavaju pripadnost istom statističkom skupu

Udio flavonoida izražen kao mg katehina po gramu uzorka (mg CE/g) kreće se od 0,08 mg CE/g (Hvar) do 0,51 mg CE/g (Orašac) (Tablica 53.). Relativne standardne devijacije paralelnih određivanja unutar su raspona 0,05 – 9,18 %.

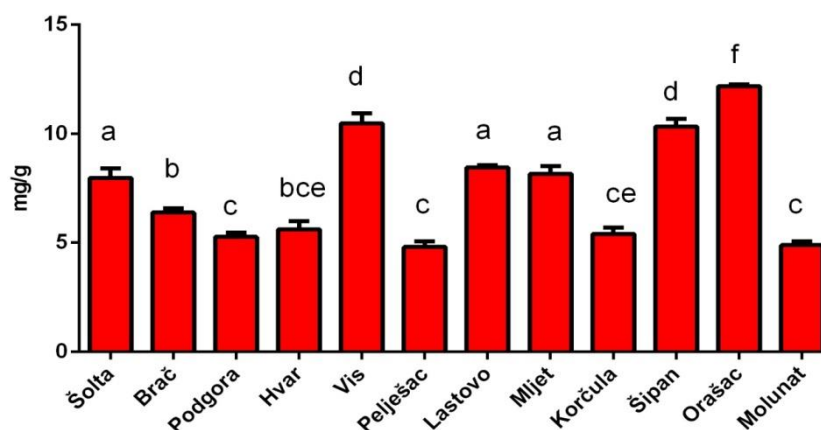
Rezultati analize varijance i Bonferoni post hoc testa pokazuju da se udio flavonoida u skupini populacija Brač, Pelješac, Lastovo, Mljet i Korčula statistički značajno ne razlikuje (Slika 30.). Također se statistički značajno ne razlikuju populacije Vis i Šipan, te Šolta i Podgora. Populacije Hvar, Orašac i Molunat se statistički značajno razlikuju od ostalih istraživanih populacija. Najveća je razlika 519,51 % u količini flavonoida između populacija Hvar i Orašac dok je najmanja između populacija Šolta i Podgora te iznosi 0,50 %.



Slika 30. Udio flavonoida (iskazan kao mg katehina/g uzorka) u plodu istraživanih populacija rogača i rezultati analize varijance i Bonferoni post hoc testa. Jednaka slova označavaju pripadnost istom statističkom skupu

Prosječan udio tanina u plodovima rogača izražen u mg/g se kreće od 5,30 mg/g (Pelješac) do 13,18 mg/g (Orašac) (Tablica 53.). Relativne standardne devijacije kreću se od 0,63 do 4,39 %. U odnosu na populaciju Pelješac udio tanina je za 148,67 % veći u plodovima populacije Orašac. Najmanja razlika u količini tanina (1,92 %) određena je u plodovima rogača populacija Pelješac i Molunat.

Rezultati statističke analize (analiza varijance i Bonferoni post hoc test) pokazuju da, obzirom na količinu tanina u plodu rogača, populacije Podgora, Hvar, Pelješac, Korčula i Molunat kao prva skupina pripadaju istom statističkom skupu, populacija Šolta, Lastovo i Mljet kao druga skupina, te populacije Vis i Šipan kao treća skupina (Slika 31.). Udio tanina u populacijama Brač i Orašac značajno se razlikuje i međusobno i u odnosu na ostale istraživane populacije.



Slika 31. Udio tanina (iskazan kao mg/g uzorka) u plodu istraživanih populacija rogača i rezultati analize varijance i Bonferoni post hoc testa. Jednaka slova označavaju pripadnost istom statističkom skupu

4.3.2. Antioksidativna aktivnost ploda rogača

Rezultati određivanja antioksidativnog potencijala ploda rogača određenog DPPH, FRAP i TEAC metodom iskazani kao srednje vrijednosti tri paralelna određivanja \pm standardna devijacija prikazani su u Tablici 54. Također je napravljena analiza varijance i Bonferoni post hoc test (Slika 32.).

DPPH metodom određene vrijednosti za antioksidativnu aktivnost ploda rogača iskazane su kao postotak redukcije inicijalne apsorbancije otopine DPPH radikala djelovanjem uzoraka različitih koncentracija odnosno kao ekvivalent koncentracije EC_{50} u $\mu\text{g/mL}$. Ovisno o istraživanoj populaciji dobivene vrijednosti se kreću od 956,38 $\mu\text{g/mL}$ (Lastovo) do 404,61 $\mu\text{g/mL}$ (Vis), što ukazuje na vrlo jaki antioksidativni potencijal ploda rogača populacije Vis.

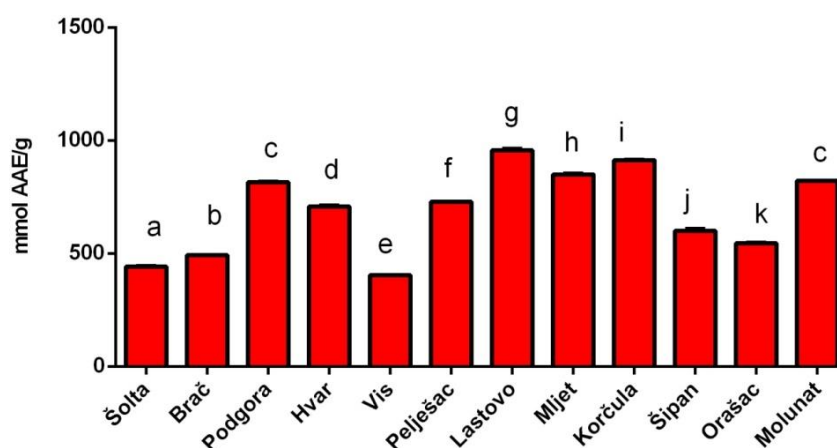
Relativne standardne devijacije paralelnih određivanja vrlo su niske i kreću se u rasponu od 0,01 do 0,80 %.

Tablica 54. Antioksidativna aktivnost ploda istraživanih populacija rogača

Populacija	DPPH *EC ₅₀ (µg/mL)	FRAP *(mmol Fe/g)	TEAC *(mg TE/g)
Šolta	442,32 ± 2,790	0,48 ± 0,011	52,54 ± 0,276
Brač	491,90 ± 0,732	0,57 ± 0,015	55,23 ± 0,441
Podgora	815,50 ± 1,489	0,43 ± 0,009	44,18 ± 0,285
Hvar	703,25 ± 4,180	0,49 ± 0,009	48,17 ± 0,372
Vis	404,61 ± 0,032	0,66 ± 0,004	67,11 ± 0,427
Pelješac	727,90 ± 0,425	0,48 ± 0,006	49,45 ± 0,359
Lastovo	956,38 ± 7,659	0,33 ± 0,008	30,38 ± 0,236
Mljet	849,88 ± 4,264	0,40 ± 0,009	47,27 ± 0,568
Korčula	912,76 ± 1,139	0,45 ± 0,007	40,80 ± 0,550
Šipan	600,66 ± 7,511	0,58 ± 0,009	51,42 ± 0,364
Orašac	545,29 ± 1,803	0,63 ± 0,005	60,84 ± 0,806
Molunat	821,61 ± 0,069	0,57 ± 0,006	50,01 ± 0,161

*srednje vrijednosti tri paralelna određivanja ± standardna devijacija; EC₅₀ = ekvivalent koncentracije; TE = Trolox ekvivalent

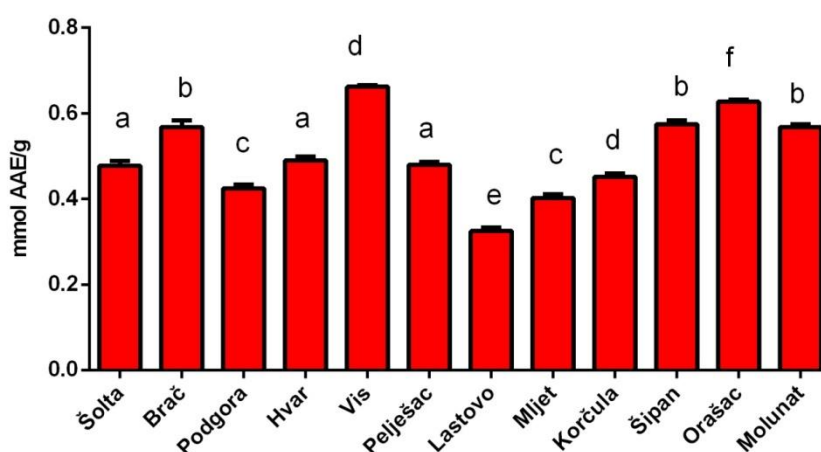
Iz statističke analize vidljivo je (Slika 32.) da je antioksidativni potencijal plodova rogača između istraživanih populacija statistički značajno različit, osim kod populacija Podgora i Molunat koje pripadaju istom statističkom skupu. Plodovi populacije Vis imaju za 136,37 % veći antioksidativni potencijal od plodova populacije Lastovo. Plodovi populacije Podgora imaju za samo 0,75 % veću antioksidativnu aktivnost od plodova populacije Molunat.



Slika 32. Antioksidativna aktivnost (iskazana kao ekvivalent djelatne koncentracije EC₅₀) ploda istraživanih populacija rogača određena DPPH metodom i rezultati analize varijance i Bonferoni post hoc testa. Jednaka slova označavaju pripadnost istom statističkom skupu

Reduktivni potencijal ploda rogača određen FRAP metodom izražen kao mmol Fe/g uzorka (Tablica 54.) kreće se od 0,33 mmol Fe/g (Lastovo) do 0,66 mmol Fe/g (Vis). Relativne standardne devijacije paralelnih određivanja su između 0,08 % i 2,59 %.

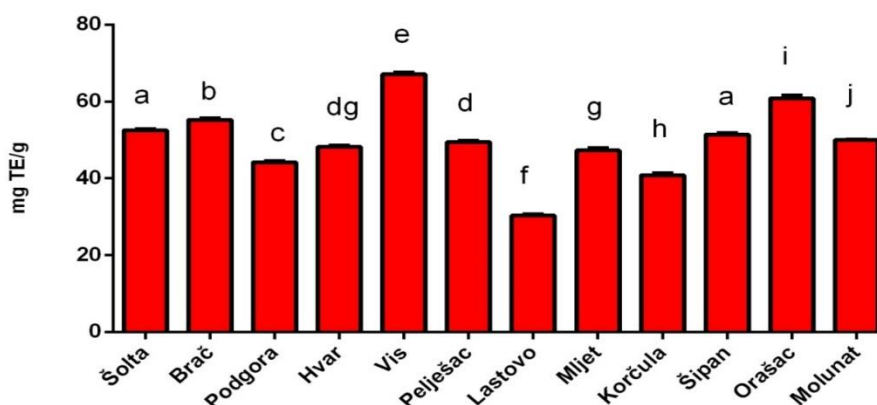
Statističkom analizom dobiveni rezultati (Slika 33.) pokazuju statistički značajne razlike u reduktivnim sposobnostima plodova rogača između populacija Vis, Lastovo, Korčula i Orašac kao i u odnosu na ostale populacije. Kod uzoraka ploda sa Šolte, Hvara i Pelješca kao jedne skupine, zatim Brača, Šipana i Molunata kao druge te Podgore i Mljeta kao treće skupine razlike nisu statistički značajne. Populacije Brač i Molunat imaju vrlo male razlike u reduktivnom potencijalu ploda rogača (4,35 %), dok je najveća razlika utvrđena između uzoraka populacija Vis i Lastovo (103,69 %).



Slika 33. Reduktivni potencijal (iskazan kao mmol Fe/g uzorka) ploda istraživanih populacija rogača određen FRAP metodom i rezultati analize varijance i Bonferoni post hoc testa. Jednaka slova označavaju pripadnost istom statističkom skupu

Antioksidativna aktivnost ploda rogača određena TEAC testom iskazana kao Trolox ekvivalent (TE) kreće se od 30,38 mg TE/g (Lastovo) do 67,11 mg TE/g (Vis) (Tablica 54.). Relativne standardne devijacije paralelnih određivanja su između 0,52 i 1,35 %.

Statistički značajno različita sposobnost vezanja radikala (Slika 34.) utvrđena je kod svih istraživanih populacija, osim između populacija Šolta i Šipana te populacija Hvar, Pelješac i Mljet. Najveća razlika od 120,92 % utvrđena je između uzoraka s lokaliteta Vis i Lastovo, a najmanja između uzoraka s lokaliteta Pelješac i Molunat (1,14 %).



Slika 34. Antioksidativna aktivnost ploda istraživanih populacija rogača određena TEAC metodom (iskazana kao mg Trolox ekvivalenta) i rezultati analize varijance i Bonferoni post hoc testa. Jednaka slova označavaju pripadnost istom statističkom skupu

4.3.3. Udio ukupnih fenola i flavonoida u listu rogača

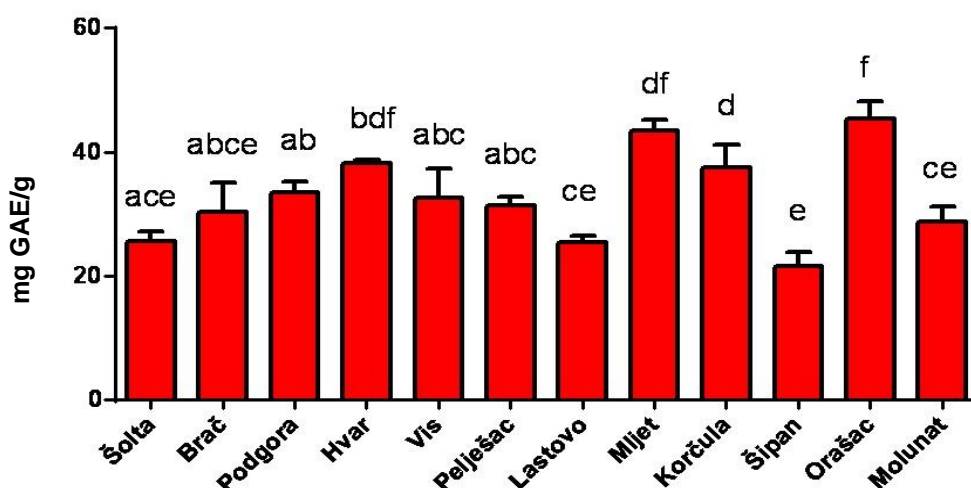
Rezultati određivanja ukupnih fenola i flavonoida u listovima istraživanih populacija rogača prikazani su u Tablici 55. Udio ukupnih fenola u listovima rogača ovisno o populaciji kreće se od 21,53 mg GAE/g (Šipan) do 45,42 mg GAE/g (Orašac) uz relativne standardne devijacije paralelnih određivanja od 1,26 do 8,19 %. Statističkom obradom podataka može se izdvojiti skupina u kojoj su populacije Šolta, Brač, Podgora, Vis i Pelješac koje pripadaju istom statističkom skupu, iako se udjelom ukupnih fenola u listovima neke od njih značajno ne razlikuju od nekih drugih populacija (Slika 35).

Tablica 55. Udio fenola i flavonoida u listu istraživanih populacija rogača

Populacija	Ukupni fenoli *(mg GAE/g)	Flavonoidi *(mg CE/g)
Šolta	25,60 ± 1,649	8,96 ± 0,075
Brač	30,29 ± 4,724	10,04 ± 0,454
Podgora	33,50 ± 1,761	14,82 ± 0,154
Hvar	38,27 ± 0,483	10,44 ± 0,305
Vis	32,60 ± 4,648	12,08 ± 0,410
Pelješac	31,42 ± 1,303	9,07 ± 0,227
Lastovo	25,38 ± 1,134	14,14 ± 1,348
Mljet	43,43 ± 1,724	10,82 ± 0,319
Korčula	37,50 ± 3,747	12,17 ± 0,332
Šipan	21,53 ± 2,371	11,91 ± 0,433
Orašac	45,42 ± 2,735	11,24 ± 0,269
Molunat	28,86 ± 8,198	9,14 ± 0,330

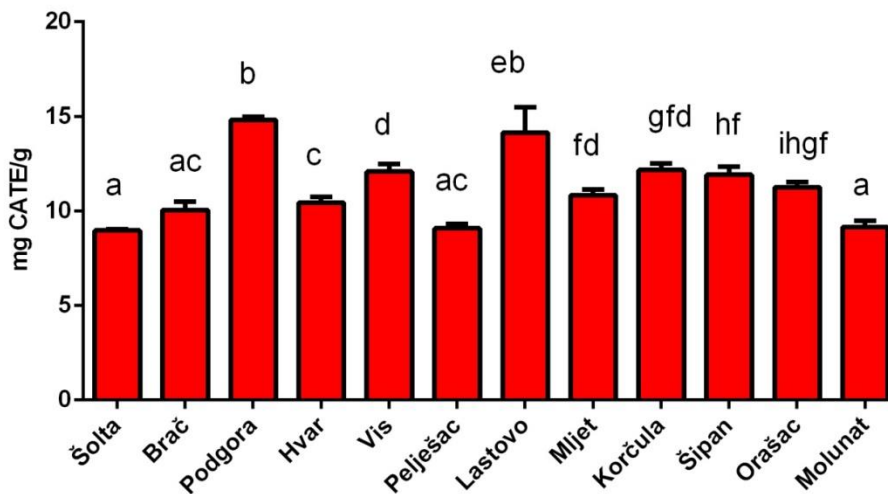
*srednje vrijednosti tri paralelna određivanja ± standardna devijacija; GAE = ekvivalent galne kiseline; CE = ekvivalent katehina

Populacije Šipan, Orašac, Vis i Korčula međusobno se statistički značajno razlikuju po udjelu ukupnih fenola. Najveća razlika određena između populacija Orašac i Šipan iznosi 110,95 %, dok između populacija Šolta i Lastovo, koje pripadaju istom statističkom skupu, iznosi 0,85 %. Udio ukupnih fenola, ovisno o istraživanoj populaciji, veći je u listu u odnosu na plod rogača za 11,01 (Vis) do 132,74 % (Mljet), osim kod populacije Šolta gdje je u plodu veći za samo 1,89 % i Šipan kod koje je manji za 9,13 % .



Slika 35. Udio ukupnih fenola (iskazan kao ekvivalent galne kiseline) u listu istraživanih populacija rogača i rezultati analize varijance i Bonferoni post hoc testa. Jednaka slova označavaju pripadnost istom statističkom skupu

Udio flavonoida u listovima se kreće od 8,96 mg CE/g (Šolta) do 14,82 mg CE/g (Podgora) uz standardne devijacije paralelnih određivanja od 0,84 do 9,54 % (Tablica 55.). Analizom količina flavonoida između populacija ustanovljeno je da populacije Šolta, Brač, Pelješac i Molunat pripadaju istom statističkom skupu. Populacije Korčula i Šipan međusobno se značajno ne razlikuju, ali zato se statistički značajno razlikuju od svih ostalih istraživanih populacija (Slika 36). Također, listovi rogača populacija Podgora i Lastovo koji imaju najveće udjele flavonoida i pripadaju istom skupu statistički se značajno razlikuju od ostalih populacija. Najveća razlika u udjelu flavonoida od 64,46 % utvrđena je između populacija Podgora i Šolta, a najmanja između Molunta i Šolte od 1,96 %.



Slika 36. Udio flavonoida (iskazan kao miligrami katehina/g uzorka) u listu istraživanih populacija rogača i rezultati analize varijance i Bonferoni post hoc testa. Jednaka slova označavaju pripadnost istom statističkom skupu

4.3.4. Antioksidativna aktivnost lista rogača

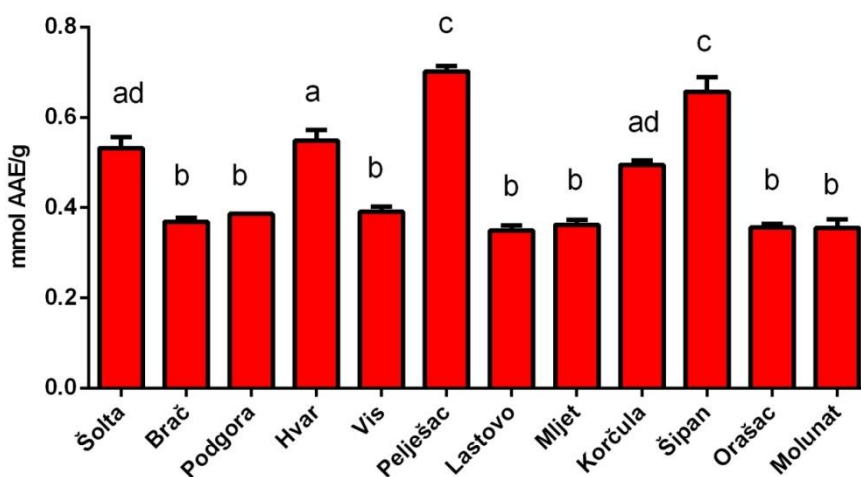
Rezultati određivanja antioksidativnog potencijala lista rogača određenog DPPH, FRAP i TEAC metodom prikazani su u Tablici 56.

Antioksidativna aktivnost u listu rogača određena DPPH testom, iskazana kao ekvivalent L askorbinske kiseline, kreće se od 0,35 mmol/g AAE (Lastovo) do 0,70 mmol/g AAE (Pelješac) uz relativne standardne devijacije od 0,23 do 5,30 %. Iz statističke analize rezultata vidljivo je (Slika 37.) da se antioksidativni potencijal lista populacija Brač, Podgora, Vis, Lastovo, Mljet, Orašac i Molunat statistički značajno ne razlikuje. Populacije Šolta, Hvar i Korčula pripadaju istom statističkom skupu ali se kao i Pelješac i Šipan, koji pripadaju također zasebnom statističkom skupu, statistički značajno razlikuju od ostalih populacija. Najveća razlika koja je određena između populacija Pelješac i Lastovo iznosi 101,146 %, dok populacije Orašac i Molunat imaju iste srednje vrijednosti reduktivnog potencijala.

Tablica 56. Antioksidativna aktivnost lista istraživanih rogača

Populacija	DPPH *mmol/g AAE	FRAP *(mmol Fe/g)	TEAC *(mg TE/g)
Šolta	0,53 ± 0,024	0,99 ± 0,027	70,17 ± 1,481
Brač	0,37 ± 0,008	0,69 ± 0,039	54,87 ± 0,463
Podgora	0,39 ± 0,001	0,77 ± 0,029	59,56 ± 4,253
Hvar	0,55 ± 0,024	0,75 ± 0,042	83,18 ± 1,792
Vis	0,39 ± 0,011	0,67 ± 0,034	60,04 ± 0,322
Pelješac	0,70 ± 0,012	1,04 ± 0,037	95,46 ± 1,144
Lastovo	0,35 ± 0,012	0,50 ± 0,086	82,20 ± 1,072
Mljet	0,36 ± 0,011	0,97 ± 0,025	91,45 ± 1,563
Korčula	0,50 ± 0,010	0,94 ± 0,175	108,43 ± 4,855
Šipan	0,66 ± 0,032	0,24 ± 0,059	75,79 ± 9,694
Orašac	0,36 ± 0,008	0,25 ± 0,025	85,22 ± 0,808
Molunat	0,36 ± 0,019	0,66 ± 0,003	78,26 ± 5,240

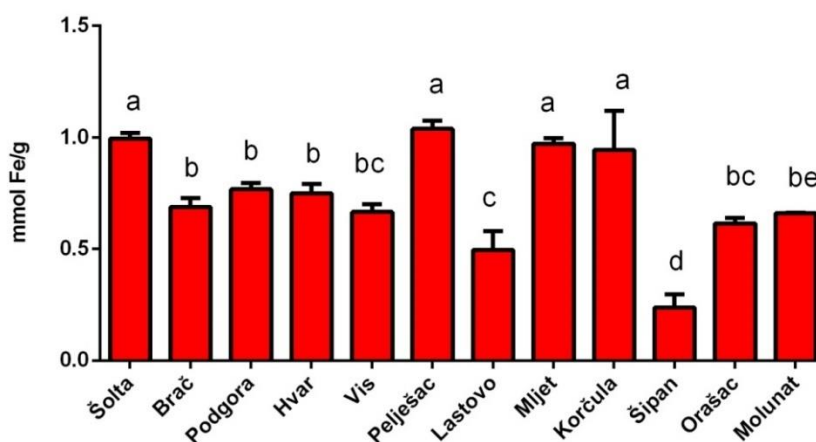
*srednje vrijednosti tri paralelna određivanja ± standardna devijacija; AAE ekvivalent L askorbinske kiseline; TE = Trolox ekvivalent



Slika 37. Antioksidativna aktivnost (iskazana kao mol-ekvivalent L askorbinske kiseline) lista istraživanih populacija rogača određena DPPH testom i rezultati analize varijance i Bonferoni post hoc testa. Jednaka slova označavaju pripadnost istom statističkom skupu

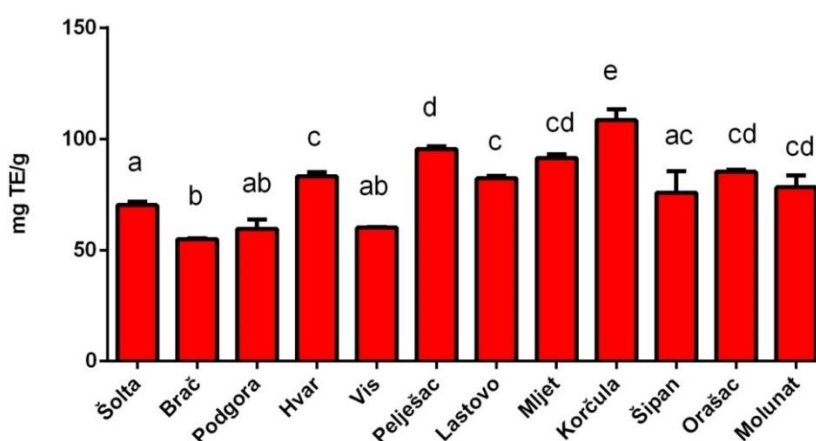
Redukcijska učinkovitost lista određena FRAP metodom u uzorcima istraživanih populacija rogača (Tablica 56.) kreće se u rasponu od 0,24 mmol Fe/g (Šipan) do 1,04 mmol Fe/g (Pelješac) uz relativne standardne devijacije paralelnih određivanja od 2,57 do 18,52 %. Listovi populacija Brač, Podgora, Hvar, Vis, Orašac i Molunat nemaju statistički značajno različiti redukcijski potencijal (Slika 38.). Populacije Šolta, Pelješac, Mljet i Korčula pripadaju istom statističkom skupu i imaju značajno veći reduktivni potencijal u odnosu na ostale

istraživane populacije. Najveća razlika određena između populacija Pelješac i Šipan iznosi 338,39 %, a najmanja 0,91 % između populacija Vis i Molunat.



Slika 38. Reduktivni potencijal (iskazan kao mmol Fe/g uzorka) lista istraživanih populacija rogača određen FRAP metodom i rezultati analize varijance i Bonferoni post hoc testa. Jednaka slova označavaju pripadnost istom statističkom skupu

Primjenom TEAC testa određena antioksidativna aktivnost kreće se od 54,87 mgTE/g (Brač) do 108,43 mgTE/g (Korčula) uz relativne standardne devijacije paralelnih mjerenja između 0.54 i 12.79 % (Tablica 56). Listovi populacije Korčula s vrlo visokom sposobnošću za neutralizaciju ABTS radikal kationa se statistički značajno razlikuju od svih ostalih populacija (Slika 39.). Najveća razlika određena između populacija Korčula i Brač iznosi 97,61 %. Listovi populacija Hvar i Lastovo, koji obzirom na antioksidativni potencijal pripadaju istom statističkom skupu imaju najmanju razliku od 1,16 % .



Slika 39. Antioksidativna aktivnost (iskazana kao mg ekvivalenta Troloxa) lista istraživanih populacija rogača određena TEAC metodom i rezultati analize varijance i Bonferoni post hoc testa. Jednaka slova označavaju pripadnost istom statističkom skupu

Mantelov test, proveden i za istraživane fenolne spojeve u plodu (ukupni fenoli, flavonoidi i tanini) i listu (ukupni fenoli i flavonoidi) pokazuje značajnu korelaciju ($p < 0,05$) između svih istraživanih fenolnih spojeva u plodu i molekularnih (AFLP) markera (Tablica 57.). Također je značajna korelacija između AFLP markera i ukupnih fenola u plodu, AFLP i tanina u plodu, te AFLP i kombiniranih parametara ukupnih fenolnih spojeva ploda i lista. Mantelovim testom komparacije nisu utvrđene značajne korelacije između AFLP i flavonoida u plodu, te AFLP i ukupnih fenolnih spojeva u listu istraživanih populacija rogača.

Tablica 57. Rezultati Mantel testa za analizirane fenolne spojeve u plodu i listu istraživanih populacija rogača

Fenolni spojevi	AFLP	p
Plod (ukupni fenoli, flavonoidi i tanini)	0,38	0,026
Plod (ukupni fenoli)	0,32	0,036
Plod (flavonoidi)	0,29	0,069
Plod (tanini)	0,33	0,030
List (ukupni fenoli, flavonoidi)	0,006	0,478
List (ukupni fenoli)	–	–
List (flavonoidi)	–	–
Plod+list (ukupni fenoli, flavonoidi i tanini)	0,35	0,033

Korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p < 0,05$; jako značajnom ako je $p < 0,01$

4.3.5. Udio makro i mikroelemenata u plodu rogača

Udio makroelemenata (kalij, kalcij, magnezij i natrij) u plodovima istraživanih hrvatskih populacija rogača prikazan je u Tablici 58. Rezultati su iskazani kao srednje vrijednosti tri paralelna određivanja \pm standardna devijacija i izraženi u mg/kg uzorka.

Udio kalija, kao najzastupljenijeg makroelementa u plodu rogača, kreće se od 9020,09 mg/kg (Brač) do 11208,97 mg/kg (Orašac) uz relativne standardne devijacije paralelnih mjerenja od 0,04 do 4,19 %. Najveća razlika utvrđena između uzoraka s lokaliteta Orašac i Brač iznosi 24,27 %, dok je najmanja (0,2 %) između lokaliteta Pelješac i Šolta.

Tablica 58. Udio makroelemenata u plodu istraživanih populacija rogača

Populacija	* Makroelementi (mg/kg)			
	K	Ca	Mg	Na
Šolta	10115,02 ± 335,20	2368,18 ± 59,99	566,49 ± 13,45	30,71 ± 0,69
Brač	9020,09 ± 190,76	1880,57 ± 37,38	472,27 ± 4,87	56,52 ± 10,16
Podgora	10664,31 ± 120,54	2179,15 ± 3,87	558,64 ± 9,79	46,40 ± 6,04
Hvar	10266,68 ± 138,83	2388,82 ± 41,48	541,06 ± 1,34	110,38 ± 4,17
Vis	9503,69 ± 253,47	2811,57 ± 48,25	566,69 ± 9,63	75,77 ± 1,63
Pelješac	10137,80 ± 159,32	2754,49 ± 89,34	498,39 ± 0,68	42,77 ± 6,88
Lastovo	10311,58 ± 135,11	2053,63 ± 10,87	507,65 ± 0,99	136,70 ± 16,94
Mljet	10565,12 ± 3,97	1730,71 ± 45,93	530,76 ± 0,88	53,17 ± 6,02
Korčula	9822,71 ± 411,49	1712,49 ± 33,68	520,12 ± 16,29	52,79 ± 4,80
Šipan	9959,63 ± 108,16	2446,43 ± 16,10	581,45 ± 2,82	75,10 ± 5,33
Orašac	11208,97 ± 131,26	2539,07 ± 84,01	664,87 ± 17,8	43,89 ± 4,83
Molunat	9067,79 ± 73,22	1784,93 ± 110,18	409,79 ± 8,76	23,77 ± 4,35

*srednje vrijednosti tri paralelna određivanja ± standardna devijacija

Količine kalcija u plodovima istraživanih populacija rogača, kreću se u rasponu od 1712,49 mg/kg u populaciji Korčula do 2811,57 mg/kg u populaciji Vis, a relativne standardne devijacije paralelnih određivanja od 0,53 do 3,87 %. Najveća razlika utvrđena između ove dvije populacije iznosi 39,09 %, a najmanja 0,87 % između uzoraka s lokaliteta Šolta i Hvar.

Količina magnezija u plodu kreće se u relativno uskom rasponu od 409,79 mg/kg (Molunat) do 664,87 mg/kg (Orašac). Relativne standardne devijacije paralelnih određivanja su u rasponu od 0,14 do 3,13 %. U populacijama Vis i Šolta udio magnezija je gotovo isti (razlika 0,04 %), dok je najveća razlika (62,25 %) između populacija Molunat i Orašac koje imaju najniži, odnosno najviši udio magnezija.

U plodovima istraživanih populacija rogača udio natrija kreće se unutar širokog raspona od 23,77 mg/kg (Molunat) do 136,70 mg/kg (Lastovo) uz relativnu standardnu devijaciju paralelnih određivanja od 2,15 do 18,31 %. Razlika u količini natrija između ove dvije populacije je vrlo velika i iznosi 475,39 %. Najmanja razlika u količinama natrija (0,71 %) utvrđena je između populacija Mljet i Korčula. Vrlo niski udio natrija u plodu rogača u odnosu na ostale makroelemente se očekivao, obzirom da je ovaj za ljudski organizam makroelement u biljkama zastupljen u relativno niskim koncentracijama.

Udio mikroelemenata (željezo, bakar, cink, mangan, nikal, aluminij i krom) u plodovima istraživanih populacija rogača prikazan je u Tablici 59. Rezultati su iskazani kao srednje vrijednosti tri paralelna određivanja ± standardna devijacija i izraženi u mg/kg uzorka.

Željezo je najzastupljeniji mikroelement u plodu rogača i njegov udio se kreće od 13,71 mg/kg u populaciji Brač do 26,50 mg/kg u populaciji Šolta uz relativne standardne devijacije paralelnih određivanja od 0,04 do 15,10%. Razlika između uzoraka s ova dva lokaliteta iznosi 93,29 %. Relativno male razlike u količini željeza (4,26%) određene su između populacija Brač i Pelješac.

Udio bakra u plodu kreće se od 2,81 mg/kg (Lastovo) do 5,15 mg/kg (Hvar). Relativne standardne devijacije paralelnih određivanja su između 0,03 i 5,26 %. Uzorci ploda populacije Hvar imaju 83,27 % veću količinu ovog mikroelemanta u odnosu na plodove populacije Lastovo. Najmanja razlika od 1,89% određena je između populacija Vis i Podgora.

Iako su relativno male količine cinka prisutne u plodovima istraživanih uzoraka, vrlo su varijabilne, tako da je razlika između minimalne (0,84 mg/kg Molunat) i maksimalne količine cinka (6,38 mg/kg Šolta) vrlo visokih 659,52 %. Relativne standardne devijacije paralelnih određivanja kreću se od 12,25 do 31,42 %. Vrlo slični plodovi po udjelu cinka su sa lokaliteta Vis i Korčula, uz razliku od 1,97 %.

Količina mangana u plodovima kreće se od 4,61 mg/kg (Mljet) do 7,68 mg/kg (Podgora) uz relativnu standardnu devijaciju paralelnih određivanja od 0,03 do 11,55 %. U odnosu na ostale mikroelemente varijabilnost mangana između istraživanih populacija nije velika te je razlika između populacije s maksimalnim i minimalnim udjelom 66,59 %. Najmanja razlika je između uzoraka s lokaliteta Šolta i Korčula (0,59 %).

U okviru ovih istraživanja određivane koncentracije selena i nekih toksičnih ili potencijalno toksičnih minerala (arsen, kadmij, kobalt, molibden i olovo) bile su prisutne u tragovima, odnosno ispod granice detekcije.

Udio nikla u plodu rogača vrlo je nizak i kreće se od 0,18 mg/kg u populaciji Molunat do 0,50 mg/kg u populaciji Orašac (relativna standardna devijacija paralelnih određivanja 0,03 - 11,55 %). Razlika u količinama mangana između ove dvije populacije iznosi 177,78 %. Interesantno je istaknuti da su populacije Brač, Vis i Šipan imale isti udio mangana (0,29 mg/kg ploda rogača).

Količina aluminija ovisno o istraživanoj populaciji kreće se od 3,42 mg/kg (Molunat) do 14,73 mg/kg (Orašac). Relativne standardne devijacije paralelnih određivanja u rasponu su od 1,56 do 10,09 %. Razlika u udjelu aluminija između uzoraka Molunat i Orašac vrlo je velika (330,70 %). Međutim, treba primjetiti da između ostalih istraživanih populacija, osim Lastova, varijabilnost aluminija nije tako visoka. Najmanja razlika je između uzoraka s lokaliteta Brač i Pelješac i iznosi 0,21 %.

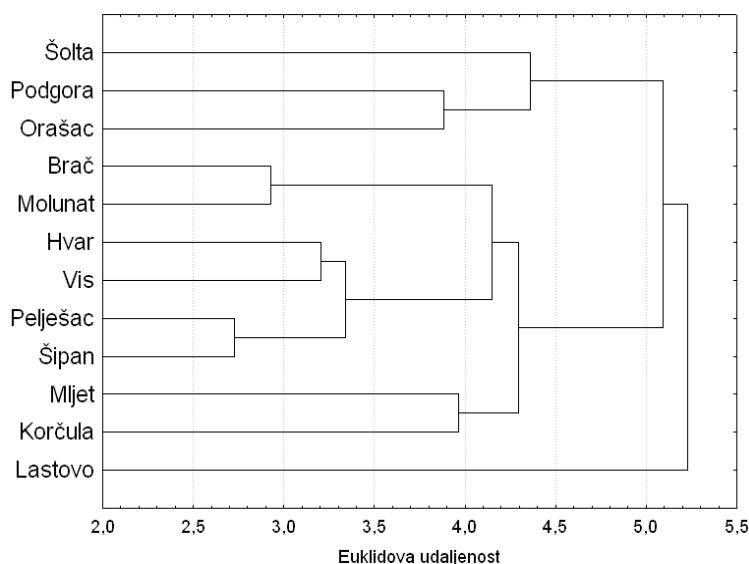
Tablica 59. Udio mikroelemenata u plodu istraživanih populacija rogača

Populacija	Mikroelementi * (mg/kg)						
	Fe	Cu	Zn	Mn	Ni	Al	Cr
Šolta	26,50 ± 2,81	3,10 ± 0.16	5,72 ± 0.70	5,09 ± 0.53	0,48 ± 0.08	6,46 ± 0.37	0,04 ± 0.01
Brač	13,71 ± 0.44	4,55 ± 0.04	3,10 ± 0.57	7,34 ± 0.30	0,29 ± 0.02	4,77 ± 0.07	0,02 ± 0.00
Podgora	17,81 ± 1.28	4,31 ± 0.23	3.72 ± 2.83	7,68 ± 0.89	0,59 ± 0.07	5,86 ± 0.78	0,03 ± 0.00
Hvar	22,26 ± 3.36	5,15 ± 0.00	2.92 ± 1.24	5,72 ± 0.45	0,27 ± 0.02	4,92 ± 0.21	0,03 ± 0.03
Vis	18,34 ± 2.24	4,23 ± 0.04	4.14 ± 3.00	6,70 ± 0.39	0,29 ± 0.00	4,76 ± 0.44	0,01 ± 0.00
Pelješac	13,15 ± 1.35	4,51 ± 0.09	1.56 ± 2.22	6,31 ± 0.07	0,32 ± 0.01	4,37 ± 1.30	0,05 ± 0.03
Lastovo	26,07 ± 3.52	2,81 ± 0.04	0.87 ± 0.89	5,81 ± 0.07	0,39 ± 0.01	10,67 ± 2.28	0,02 ± 0.00
Mljet	14,08 ± 0.09	4,52 ± 0.04	6.38 ± 2.79	4,61 ± 0.15	0,20 ± 0.01	4,44 ± 0.20	0,03 ± 0.01
Korčula	23,47 ± 0.00	3,72 ± 0.00	4.06 ± 1.28	5,06 ± 0.07	0,34 ± 0.06	7,67 ± 0.20	0,00 ± 0.00
Šipan	14,73 ± 0.99	4,00 ± 0.10	1.35 ± 1.17	5,38 ± 0.00	0,29 ± 0.01	4,72 ± 0.52	0,03 ± 0.00
Orašac	22,53 ± 1.42	4,17 ± 0.04	6.19 ± 5.33	7,25 ± 0.16	0,50 ± 0.03	14,73 ± 1,29	0,03 ± 0.00
Molunat	20,97 ± 1.07	4,34 ± 0.03	0,84 ± 1.18	5,96 ± 0.48	0,18 ± 0.00	3,42 ± 0,16	0,02 ± 0.00

*srednje vrijednosti tri paralelna određivanja ± standardna devijacija.

Udio kroma u plodovima istraživanih populacija rogača vrlo je varijabilan ali i nizak, te se može govoriti o količinama u tragovima. Minimalne vrijednosti (0,01 mg/kg) određene su u plodu rogača populacije Vis, a maksimalne (0,05 mg/kg) populacije Pelješac. Relativne standardne devijacije paralelnih mjerenja obzirom na vrlo niske koncentracije u rasponu su od 4,89 do vrlo visokih 64,49 %. U plodu populacije Korčula količine kroma su ispod granice detekcije.

Kao što je vidljivo iz rezultata varijabilnost makro i mikroelemenata u plodu istraživanih populacija je velika. Međutim, napravljena je UPGMA klaster analiza koja je pokazala da se, na temelju dobivenih rezultata za udio makro i mikroelemenata u plodu, istraživane populacije rogača mogu grupirati u nekoliko skupina (Slika 40.).



Slika 40. UPGMA dendrogram analiza makro i mikroelemenata u plodu istraživanih populacija rogača

Populacije Pelješac i Šipan, koje su po količinama makro i mikroelemenata u plodu najsličnije između istraživanih populacija, s Hvarom, Visom, Bračom i Molunatom čine prvu skupinu. U drugoj skupini su Mljet i Korčula, dok treću skupinu čine populacije Šolta, Podgora i Orašac. Zanimljivo je da je Lastovo, jedna od najizoliranijih populacija na Jadranskom području, ujedno i najrazličitija populacija prema rezultatima UPGMA analize za udio makro i mikroelemenata u plodu rogača.

4.3.6. Udio makro i mikroelemenata u listu rogača

Udio makroelemenata (kalij, kalcij, magnezij i natrij) u listovima istraživanih hrvatskih populacija rogača prikazan je u Tablici 60. Rezultati su iskazani kao srednje vrijednosti tri paralelna određivanja \pm standardna devijacija i izraženi u mg/kg uzorka.

U listu, kalij je mineral drugi po zastupljenosti. Ovisno o lokalitetu njegove količine se kreću od 5689,19 mg/kg (Vis) do 8823,49 mg/kg (Lastovo) uz relativne standardne devijacije paralelnih određivanja od 0,05 do 2,25 %. Razlika utvrđena između ova dva lokaliteta iznosi 55,09 %. Uzorci listova populacije Mljet imaju za samo 0,79 % veći udio kalija od populacije Podgora.

Tablica 60. Udio makroelemenata u listovima istraživanih populacija rogača

Populacija	Makroelementi (*mg/kg)			
	K	Ca	Mg	Na
Šolta	6527,02 \pm 30,99	14692,67 \pm 279,78	2113,34 \pm 7,70	53,22 \pm 0,78
Brač	6019,66 \pm 135,62	18551,37 \pm 76,63	1953,70 \pm 41,05	243,55 \pm 0,79
Podgora	7600,20 \pm 0,29	15588,90 \pm 0,14	2432,87 \pm 0,18	84,13 \pm 0,00
Hvar	6226,09 \pm 47,65	14444,18 \pm 61,91	2162,29 \pm 13,99	179,04 \pm 2,75
Vis	5689,19 \pm 61,17	14296,29 \pm 142,49	1530,67 \pm 9,01	71,38 \pm 2,87
Pelješac	7860,14 \pm 47,76	19237,56 \pm 149,51	1251,10 \pm 6,90	63,71 \pm 2,95
Lastovo	8823,49 \pm 65,32	11059,67 \pm 62,85	1867,91 \pm 16,21	157,97 \pm 5,09
Mljet	7660,07 \pm 47,76	13376,55 \pm 0,97	1740,37 \pm 9,76	195,39 \pm 2,19
Korčula	5859,94 \pm 25,61	16824,18 \pm 198,93	1975,19 \pm 14,19	161,57 \pm 1,40
Šipán	8631,93 \pm 57,25	14985,76 \pm 135,94	2684,74 \pm 27,45	95,21 \pm 13,22
Orašac	7050,64 \pm 92,82	22756,81 \pm 198,24	1880,23 \pm 21,69	168,14 \pm 3,80
Molunat	7419,75 \pm 42,16	17505,67 \pm 68,70	1671,61 \pm 34,45	118,72 \pm 27,08

*srednje vrijednosti tri paralelna određivanja \pm standardna devijacija

Najzastupljeniji mineral u listu je kalcij i njegov izrazito visoki udio, u odnosu na plod rogača, kreće se od 11059,67 mg/kg (Lastovo) do 22756,81 mg/kg (Orašac). Relativne standardne devijacije paralelnih mjerenja u rasponu su od 0,01 do 1,90 %. Najveća razlika u količini kalcija je utvrđena u listovima lokaliteta Orašac i Lastovo (105,76 %) a najmanja između uzoraka s lokaliteta Hvar i Vis (1,03 %).

Količina magnezija se kreće od 1251,10 mg/kg (Pelješac) do 2684,74 mg/kg (Šipán) uz relativne standardne devijacije paralelnih mjerenja između 0,01 i 2,10 %. Najveća je varijabilnost utvrđena između listova s lokaliteta Šipán i Pelješac (114,59 %), a najmanja između uzoraka s lokaliteta Lastovo i Orašac (0,65 %).

Udio natrija se kreće u rasponu od 53,22 mg/kg (Šolta) i 243,55 mg/kg (Brač) uz relativne standarne devijacije paralelnih određivanja između 0,32 i 13,89 %. Razlika u količini Na između ove dvije populacije je 357,01 %, a najmanja između populacija Vis i Pelješac iznosi 12,05 %,

Udio mikroelemenata (željezo, bakar, cink, mangan, nikal, aluminij i krom) u listovima istraživanih populacija rogača prikazan je u Tablici 61. Rezultati su iskazani kao srednje vrijednosti tri paralelna određivanja \pm standardna devijacija i izraženi u mg/kg uzorka. Kao i u plodovima rogača selen i nekih toksičnih ili potencijalno toksičnih minerala (arsen, kadmij, kobalt, molibden i olovo) nema ili su prisutni samo u tragovima odnosno, ispod granice detekcije.

Udio željeza u listovima rogača kreće se od 29,72 mg/kg (Mljet) do 47,42 mg/kg (Lastovo) uz relativne standarne devijacije paralelnih određivanja od 0,06 do 15,63 %. Razlika u količini željeza između ovih dviju populacija iznosi 59,56 %. Između uzoraka s lokaliteta Podgora i Orašac određena je najmanja razlika od svega 0,27 %.

Udio bakra se kreće od 2,71 mg/kg (Šolta) do 4,89 mg/kg (Mljet). Relativna standardna devijacija paralelnih određivanja je između 0,38 i 1,96 %. Najveća razlika utvrđena između uzoraka s lokaliteta Mljet i Šolta je 80,44 % a najmanja između uzoraka s lokaliteta Vis i Šipan je 0,24 %.

Udio cinka u listu rogača kreće se od 5,30 mg/kg (Korčula) do 16,51 mg/kg (Pelješac) uz relativne standarne devijacije paralelnih određivanja između 0,01 i 78,11 %. Najveća razlika utvrđena između ove dvije populacije iznosi 211,51 %. Uzorci lista s lokaliteta Brač i Podgora imaju iste količine cinka.

Količina mangana u uzorcima se kreće od 23,03 mg/kg (Mljet) do 56,29 mg/kg (Podgora). Relativne standarne devijacije paralelnih određivanja su u rasponu od 2,38 do 4,75 %. Najveća razlika utvrđena je između uzoraka s lokaliteta Podgora i Mljet (144%) a najmanja između lokaliteta Molunat i Brač (0,37 %).

Udio nikla u listu se kreće od 0,38 mg/kg (Šolta) do 0,92 mg/kg (Podgora) uz relativne standarne devijacije paralelnih određivanja između 0,01 i 23,43 %. Najveća razlika je između uzoraka s lokaliteta Šolta i Podgora (142%), a najmanja između uzoraka s lokaliteta Šolta, Mljet i Molunat koji imaju gotovo jednake ili jednake količine nikla.

Udio aluminija u listovima istraživanih populacija se kreće od 16,83 mg/kg (Šipan) do 45,24 mg/kg (Korčula). Relativne standarne devijacije paralelnih određivanja su između 0,25 i 5,37 %. Najveća je razlika između uzoraka s lokaliteta Korčula i Šipan (168,81 %) a najmanja između uzoraka s lokaliteta Lastovo i Molunat (0,15 %).

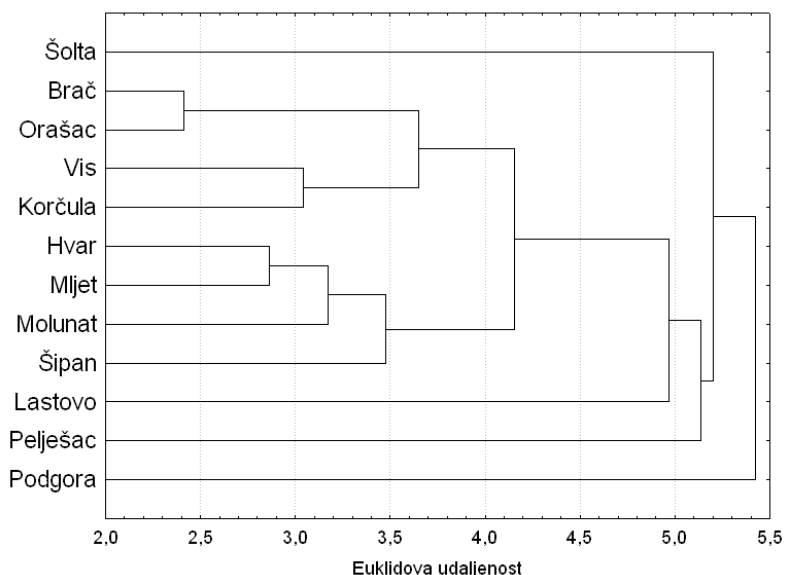
Tablica 61. Udio mikroelemenata u listu istraživanih populacija rogača

Populacija	Mikroelementi *(mg/kg)						
	Fe	Cu	Zn	Mn	Ni	Al	Cr
Šolta	32,10 ± 0.54	2,71±0.02	14,09 ± 8.68	30,80 ± 1.17	0,38 ± 0.05	23,12 ± 0.10	0,08 ± 0.00
Brač	40,21 ± 0.05	3,33±0.02	9,77 ± 2.08	37,70 ± 0.89	0,59 ± 0.01	31,49 ± 0.56	0,04 ± 0.00
Podgora	37,11 ± 0.02	4,20±0.00	9,77 ± 0.00	56,29 ± 0.00	0,92 ± 0.00	34,16 ± 0.00	0,05 ± 0.00
Hvar	32,92 ± 5.14	4,34±0.03	6,93 ± 0.98	28,41 ± 0.95	0,46 ± 0.02	18,78 ± 0.96	0,05 ± 0.00
Vis	35,79 ± 0.71	4,11±0.03	7,38 ± 0.81	26,19 ± 1.29	0,49 ± 0.08	27,79 ± 0.26	0,03 ± 0.00
Pelješac	41,36 ± 0.63	4,52±0.16	16,51 ± 1.56	33,54 ± 0.76	0,47 ± 0.00	37,39 ± 0.09	0,05 ± 0.00
Lastovo	47,4 2 ± 2.30	3,27±0.11	7,19 ± 0.29	26,29 ± 0.58	0,75 ± 0.18	19,60 ± 0.70	0,03 ± 0.00
Mljet	29,7 2 ± 0.06	4,89±0.08	11,07 ± 1.19	23,03 ± 0.55	0,39 ± 0.01	21,17 ± 0.53	0,03 ± 0.01
Korčula	36,68 ± 0.07	3,61±0.01	5,30 ± 0.61	25,71 ± 1.22	0,49 ± 0.04	45,24 ± 1.80	0,03 ± 0.00
Šipan	34,83 ± 0.31	4,10±0.03	9,32 ± 0.89	32,85 ± 0.80	0,43 ± 0.05	16,83 ± 0.90	0,03 ± 0.00
Orašac	37,01 ± 0.94	3,02±0.02	8,04 ± 0.05	34,13 ± 0.95	0,56 ± 0.02	27,84 ± 0.84	0,03 ± 0.01
Molunat	30,38 ± 1.98	4,16±0.08	10,59 ± 2.15	37,56 ± 3.00	0,39 ± 0.15	19,63 ± 0.06	0,02 ± 0.00

*srednje vrijednosti tri paralelna određivanja ± standardna devijacija

Udio kroma u listu vrlo je nizak i ovisno o lokalitetu kreće se od 0,02 mg/kg (Molunat) do 0,05 mg/kg (Podgora i Hvar). Izuzetak su listovi populacije Šolta koji imaju značajno veću količinu kroma (400,00 % veću u odnosu na najnižu vrijednost). Relativne standardne devijacije paralelnih određivanja unutar populacija kreću se od 0,32 do 17,70 %.

Kao i kod ploda i u listu istraživanih populacija rogača je napravljena UPGMA klaster analiza za makro i mikroelemente (Slika 41.).



Slika 41. UPGMA dendrogram analiza makro i mikroelemenata u listu istraživanih populacija rogača

Iz analize rezultata vidljivo je da se istraživane populacije mogu grupirati u dvije veće skupine. Najsličnije populacije su Brač i Orašac koje s populacijama Vis i Korčula čine prvu skupinu. Drugu skupinu, s većom razdvojenošću, čine populacije Hvar, Mljet, Molunat i Šipan. Ostale populacije (Šolta, Lastovo, Pelješac i Podgora) imaju visoki stupanj razdvojenosti i ne mogu se grupirati u niti u jednu skupinu.

5. RASPRAVA

Rogač kao jedna od "starih" ali vrlo cijenjenih kultura predmetom je mnogih istraživanja u zemljama koje se bave njegovim intenzivnim uzgojem, upravo zbog nutritivne vrijednosti njegovih plodova i nezanemarive koristi listova (Sakakibara i sur., 2003; Owen i sur., 2003, Sidina i sur., 2009; Hajaji i sur., 2010; Hsouna i sur., 2011). U Hrvatskoj je uzgoj rogača nažalost zapostavljen pa su i istraživanja vezana uz rogač koji raste na našem podneblju nedostatna da bi se potaknula revitalizacija ove izuzetno kvalitetne kulture koja u nas ima dugu tradiciju uzgoja. Ovim radom, u okviru šireg projekta, obuhvaćena su istraživanja varijabilnosti morfoloških, genetskih i fitokemijskih značajki ploda i lista dvanaest populacija rogača s otoka i priobalja srednje i južne Dalmacije.

5.1. Morfološke značajke ploda, sjemenke i lista populacija rogača u Hrvatskoj

Rezultati naših istraživanja morfoloških značajki ploda rogača (masa, duljina, širina i debljina ploda, duljina peteljke ploda i broj sjemenki u plodu) ukazuju na statistički značajnu varijabilnost između pojedinih populacija. Pri tome se, ovisno o istraživanom parametru, koeficijent varijabilnosti kreće od 6,67 do 39,35 %. Prosječne vrijednosti mase ploda (12,68 – 21,17g), duljine ploda (74,93 – 217,15 mm), širine ploda (19,72 – 26,54 mm), debljine ploda (7,54 – 11,87 mm), duljine peteljke ploda (6,55 – 9,44 mm) i broja sjemenki u plodu (8,12 – 12,23) rogača populacija koje su obuhvaćene ovim istraživanjem uspoređene su s literaturnim podacima rezultata istraživanja plodova rogača uzgojenih na različitim lokacijama u Tunisu (Naghmouchi i sur., 2009). Srednja vrijednost mase ploda (16,39 g) devetnaest tuniških populacija odgovara srednjoj vrijednosti mase ploda (16,93 g) istraživanih hrvatskih populacija rogača. Međutim, prema srednjim vrijednostima za duljinu, širinu, debljinu i broj sjemenki ploda (168,90 mm, 20,51 mm, 8,30 mm i 12,26), plodovi naših populacija rogača su 5 – 10 % kraći, širi i deblji.

Sličnost u morfološkim značajkama ploda je vidljiva i kod plodova rogača s područja Antalije u Turskoj (Biner i sur., 2007; Gubbuk i sur., 2009), čija se masa kreće u rasponu od 7,45 do 36,25 g, duljina od 149,80 do 196,01 mm i širina od 19,30 do 25,30 mm. Međutim neke druge turske populacije rogača (Tetik i sur. 2011) u odnosu na hrvatske populacije značajno se razlikuju u masi plodova. Plodovi divljih i kultiviranih stabala rogača imali su veliku prosječnu masu (71,71 – 147,91 g) sa sjemenkama također izrazito velike mase (5,76 – 11,72 g). Samo

radi usporedbe masa sjemenki naših populacija kretala se od 0,163 do 0,194 g. Autori naglašavaju da je tako uzgojena vrsta rogača korisna i cijenjena u prehrambenoj industriji.

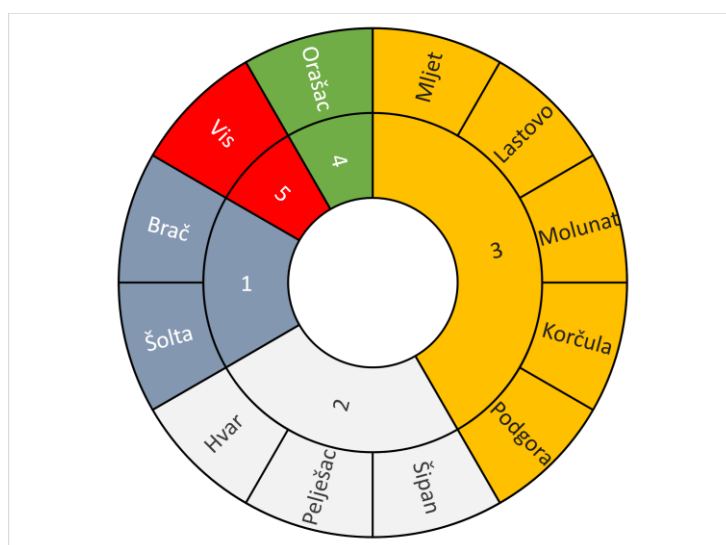
Sidina i sur. (2009) u okviru svoje studije prate varijabilnost morfoloških značajki ploda i sjemenki u trinaest kultiviranih marokanskih populacija rogača. Njihovi rezultati su za sve istraživane parametre ploda i sjemenke značajno niži od naših rezultata za iste parametre. Rezultati istraživanja morfoloških karakteristika ploda rogača sa sjevera Maroka (Khlifa i sur., 2013) za prosječnu dužinu (114,1 mm) i širinu ploda (22,5 mm) u skladu su s našim rezultatima. Međutim po masi (12,4 g) i debljini (6,6 mm) istraživani plodovi hrvatskih populacija su teži i deblji. Varijabilnost morfoloških parametara ploda rogača autori pripisuju razlikama između geografskih varijeteta i uvjeta uzgoja.

U Hrvatskoj je istraživanje morfoloških značajki ploda obzirom na duljinu i širinu provedeno na dva tipa rogača s otoka Vis (Strikić i sur., 2006). Autori nisu utvrdili značajne razlike između dva istraživana uzorka, a rezultati od 12,10 cm za duljinu i 2,31 cm za širinu odgovaraju našim rezultatima za populaciju Vis (duljina 12,89 cm i širina 2,65 cm). Obzirom da su broj i masa sjemenki važne karakteristike ploda rogača, isti autori su odredili i ove parametre. Prema njihovom istraživanju broj sjemenki se kretao od 5 do 15, po plodu odnosno prosječna vrijednost jednog uzorka bila je 9,8 a drugog 8,8 sjemenki. Prosječna masa sjemenki bila je 0,17 g odnosno 0,15 g. Dobivene vrijednosti u skladu su s našim rezultatima za prosječan broj i masu sjemenki populacije Vis (9,25 sjemenki po plodu i masa sjemenki od 0,173 g). Usporedba morfometrijskih karakteristika ploda i sjemenki provedena je i na populacijama rogača s Malog Lošinja i Drvenik Mali (Srećec i sur., 2016). Autori su zaključili da su razlike u standardnim morfološkim karakteristikama između ove dvije populacije posljedica genetskih i mikro-klimatskih faktora.

Rezultati naših istraživanja morfoloških značajki ploda između populacija ukazuju na relativno veliku varijabilnost i statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$) između pojedinih populacija (Studentov-test), ali ukazuju i na populacije koje pripadaju istim statističkim skupinama (Tablice 16 – 21.). UPGMA klaster analizom koja je također napravljena (Slika 14.), a u kojoj su uzeti u obzir svi istraživani parametri (masa, duljina, širina i debljina ploda, duljina peteljke ploda i broj sjemenki ploda), istaknute se tri skupine populacija unutar kojih se plod s obzirom na morfološke značajke značajno ne razlikuje. Najviše se razlikuju populacije Orašac i Vis koje se razlikuju i međusobno a i ne pripadaju niti jednoj od tri skupine. Prvoj skupini pripadaju populacije Brač i Šolta, drugoj populacije Podgora, Korčula, Molunat, Lastovo i Mljet a trećoj Hvar, Pelješac i Šipan (Slika 43.). Po svojim morfološkim značajkama plodovi populacije Orašac mogu se okarakterizirati kao najslabije kakvoće obzirom na prinos jer im je

prosječna vrijednost mase, duljine, širine i debljine ploda vrlo mala u odnosu na ostale istraživane populacije (Tablice 8. – 11.). Populacija Vis se najviše razlikuje od svih ostalih populacija, ali u pozitivnom smislu jer plodovi ove populacije imaju najveću prosječnu masu, širinu i debljinu, što se smatra vrlo dobrim karakteristikama ploda rogača. Što se tiče duljine plodova populacije Vis, iako njihova prosječna vrijednost nije bila najveća, treba naglasiti da su minimalna i maksimalna duljine ploda ove populacije bile dulje od plodova ostalih populacija, što je također jedna od poželjnih karakteristika ploda. Ovakav rezultat se može obrazložiti višestoljetnom selekcijom rogača na otoku Visu. Sigurno je da je intenzivan dugogodišnji uzgoj rezultiran izbacivanjem iz uzgoja stabala malih plodova.

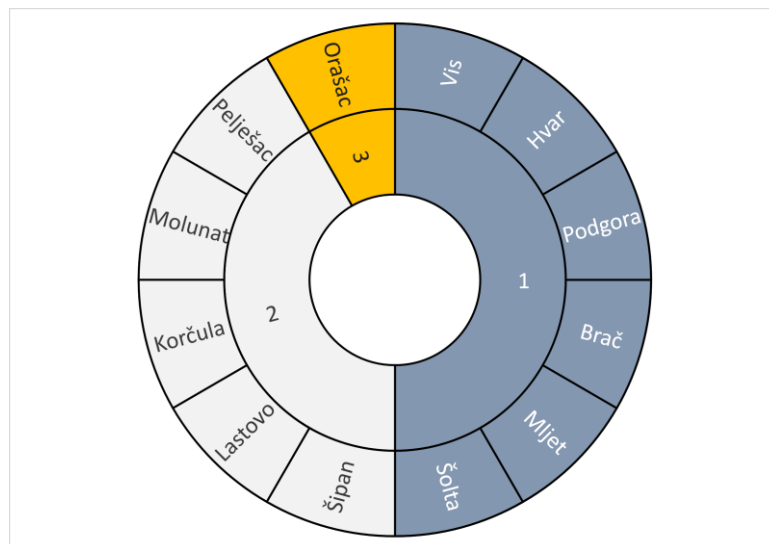
Klaster analiza (Slika 14.) je također pokazala da su obzirom na morfološke značajke ploda međusobno najbližije populacije Brač i Šolta. To se može objasniti blizinom ova dva otoka, te se može pretpostaviti da su rogači na ova dva lokaliteta istog podrijetla, jer su ih ljudi prenosili s otoka na otok. Kroz razgovor s lokalnim stanovništvom ova pretpostavka je potkrijepljena pričom kako su ljudi s otoka na kojem nije bilo drva rogača ili su plodovi rogača bili loše kakvoće prenosili plemke na druge otoke. Tako su često uzimane plemke rogača upravo s otoka Visa te su na drugim otocima cijepljene na podlogu stabala rogača znatno slabije kakvoće. Također, obzirom na malu geografsku udaljenost između ova dva otoka može se pretpostaviti da su klimatski uvjeti, koji su također jedan od čimbenika koji utječe na morfološka svojstva ploda, za vrijeme razvoja ploda bili vrlo slični. Osim populacije Orašac i Vis čiji se plodovi značajno razlikuju, ostale populacije mogu se grupirati u tri skupine, koje po morfološkim značajkama ploda pripadaju istom statističkom skupu (Slika 43).



Slika 43. Skupine populacija dobivene UPGMA klaster analizom ploda rogača

Rezultati istraživanja morfoloških značajki sjemenki rogača (masa, duljina, širina i debljina sjemenke) ukazuju na manju varijabilnost između pojedinih populacija, što se moglo i očekivati obzirom da su sjemenke manje podložne utjecaju okoliša od ploda (Baracosa i sur., 2007; Karababa i Coskuner, 2013). Ovisno o istraživanom parametru koeficijent varijacije se kreće od 3,96 do 19,49 %. Prosječne vrijednosti mase sjemenke (0,149 – 0,181 g), duljine sjemenke (8,181 – 9,783 mm), širine sjemenki (6,199 – 7,407 mm), debljine sjemenki (3,702 – 4,183 mm) u skladu su s rezultatima svih istraživanih parametara Barracose i sur. (2007) i Naghmouchi i sur., (2009), koji su istraživali morfološke karakteristike (duljina, širina i debljina) sjemenki ploda populacija rogača uzgojenih u Portugalu (9,10 mm, 6,90 mm i 4,1 mm) i Tunisu (9,71 mm, 7,39 mm i 4,06 mm). Njihove prosječne vrijednosti za masu sjemenki (0,20 g u portugalskim, odnosno 0,23 g u tuniškim populacijama rogača) nešto su više u usporedbi sa našim podacima. Karababe i Coskunera (2013) u rezultatima svojih istraživanja morfoloških karakteristika sjemenki rogača uzgojenih na različitim lokalitetima u Turskoj, dijele sjemenke po veličini na tri skupine (male, srednje i velike). Naši rezultati za masu, duljinu, širinu i debljinu sjemenki odgovaraju njihovoj skupini sjemenki srednje veličine (0,165 g, 8,84 mm, 6,47 mm odnosno 3,90 mm).

Iako je statističkom analizom (t- test) dobiven uvid u različitost sjemenki istraživanih populacija rogača obzirom na pojedini parametar, (Tablice 26 – 29.) napravljena je UPGMA klaster analiza (Slika 19.) koja obuhvaća sve parametre sjemenke (masa, duljina, širina i debljina sjemenke).



Slika 44. Skupine populacija dobivene UPGMA klaster analizom sjemenke rogača

Rezultati klaster analize na temelju morfoloških značajki sjemenki ukazuju na mogućnost grupiranja populacija na dvije skupine unutar kojih se populacije značajno ne

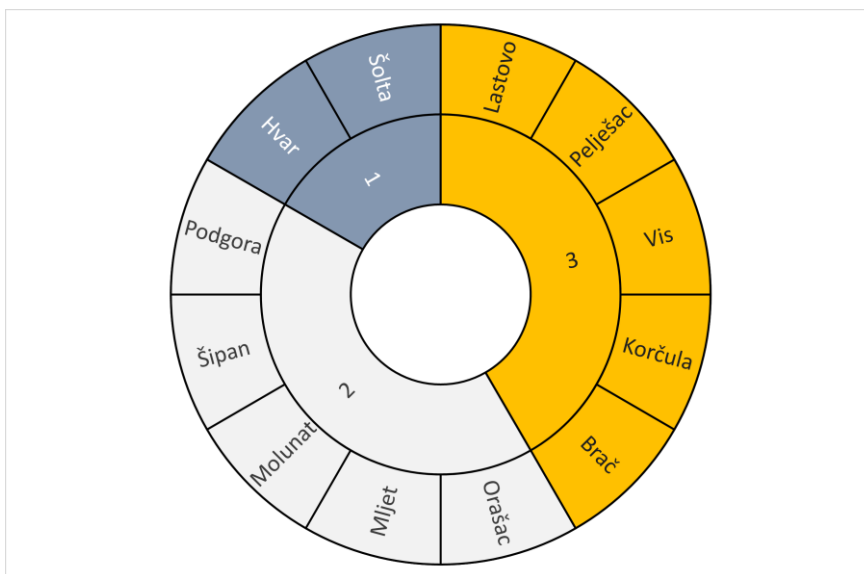
razlikuju i populaciju Orašac koja se najviše razlikuje od svih istraživanih populacija (Slika 44.). U prvoj skupini se nalaze populacije Šolta, Mljet, Brač, Podgora, Hvar i Vis, a u drugoj populacije Pelješac, Molunat, Korčula, Lastovo i Šipan. Sjemenke populacije Orašac, u odnosu na sjemenke ostalih populacija, imaju najmanje prosječne vrijednosti za masu, duljinu i širinu a najveću za debljinu (Tablice 22. – 25.).

Literaturni podaci o morfološkim značajkama lista rogača su vrlo rijetki. Battle i Tous (1997) navode neke od osnovnih parametara (duljina lista od 10 do 20 cm, duljina liske od 3 do 7 cm). Strikić i sur. (2006) u okviru svojih istraživanja dva tipa rogača s otoka Visa određuju boju i površinu lista.

Rezultati naših istraživanja duljine i širine lista, duljine peteljke lista, broja liski lista, duljine i širine liske i duljine peteljčice liske lista ukazuju na značajnu varijabilnost između pojedinih populacija (ovisno o istraživanom parametru koeficijent varijacije se kreće od 9,72 do 68,34 %). Prosječne vrijednosti za duljinu lista istraživanih populacija kreću se od 182,90 do 214,20 mm, za širinu lista od 103,46 do 122,26 mm, za duljinu peteljke lista od 128,86 do 155,58 mm, za broj liski lista od 7,18 do 8,62 mm, za duljinu liski lista od 52,48 do 61,42 mm, za širinu liske od 35,08 do 41,82 mm i za duljinu peteljčice lista od 2,52 do 3,40 mm. Dobiveni rezultati u skladu su s raspoloživim literaturnim podacima istraživanja provedenih na sedam marokanskih populacija rogača za širinu lista (95,00 – 122,05 mm), za broj liski lista (8 – 10), dužinu liske (49,80 – 65,50 mm) i širinu liske (30,81 – 65,50 mm), odnosno veći su samo za duljinu lista (134,91 – 185,80 mm) (El Kahkahi i sur., 2015).

Rezultati istraživanja morfoloških značajki lista sa stabala rogača uzgajanih na tri lokaliteta također u Maroku (Seghir i sur., 2016) kreću se za duljinu lista od 113,82 do 145,03 mm, za širinu lista od 93,79 do 109,99 mm, za duljinu peteljke od 32,33 do 41,25 mm. Prosječan broj liski je između 6,30 i 7,08. Ukoliko usporedimo rezultate ovih istraživanja s našim rezultatima vidljivo je da su, iako je bila velika varijabilnost između listova s različitih lokacija, svi istraživani listovi bili duži, širi i s većim brojem liski.

Statističkom analizom (t-test) rezultata (Tablice 37 – 43.) određene su populacije koje se značajno razlikuju ili pripadaju istom statističkom skupu obzirom na pojedini parametar lista. UPGMA klaster analizom (Slika 27) koja uključuje sve parametre (duljina i širina lista, duljina peteljke lista, broj liski, duljina i širina liske i duljina peteljčice liske) dobiveni su podaci za varijabilnost cijelog lista između istraživanih populacija. Vidljivo je da se istraživane populacije po sličnosti prosječnih vrijednosti istraživanih parametara lista mogu grupirati u tri skupine (Slika 45.).



Slika 45. Skupine populacija dobivene UPGMA klaster analizom lista rogača

Prva skupina obuhvaća populacije Šolta i Hvar, druga populacije Podgora, Šipan, Molunat, Mljet i Orašac a treća skupina populacije Brač, Korčula, Vis, Pelješac i Lastovo. Iako je varijabilnost morfoloških značajki lista istraživanih populacija rogača značajno veća u odnosu na plod i sjemenke rogača, rezultati naših istraživanja pokazuju da se listovi nekih populacija vrlo malo razlikuju.

5.2. Genetske značajke populacija rogača u Hrvatskoj

Poznavanje genetske varijabilnosti unutar taksona biljke može se iskoristiti da se nadopune informacije o fenotipu (Baracossa i sur 2008), tako se i kultivari rogača mogu bolje okarakterizirati ako se uzmu u obzir fenotipske i genotipske značajke. Istraživanja vezana uz genetsku raznolikost između populacija rogača na području Mediterana vrlo su oskudna, osobito vezano uz metode korištene u ovom radu. Komparativne studije korištenja RFLP, RAPD, AFLP i mikrosatelita, pokazale su da je između tih metoda AFLP najučinkovitija za procjenu genetske varijabilnosti zbog velike reproducibilnosti, tehničke jednostavnosti, niskih troškova i visoke polimorfnosti biljega (Powell i sur., 1996, Russel i sur., 1997). Također AFLP metoda otkriva više polimorfizma te je više pouzdan i robustan genetsko-molekularni marker test, iako mu je mana što se ponekad ne mogu razlikovati genotipovi koji se razlikuju u jednoj ili samo nekoliko genetskih mutacija (Wunsch i Hormaza, 2002).

Istraživanja molekularnih značajki populacija rogača obuhvaćenih ovim radom ukazuju na značajnu varijabilnost između svih 12 istraživanih populacija. AFLP analizom dobiveno je ukupno 483 markera. Od toga je 340 markera (70,39 %) polimorfni, a 143 (29,61 %) monomorfni.

monomorfnih. Najveću polimorfnost pokazale su kombinacije početnica E36/M36 s udjelom polimorfnih markera od 76,11 %, a najmanju kombinacije početnica E45/46 s udjelom od 61,94 %. Baracossa i sur. (2008) uspoređivali su genetsku varijabilnost kultivara rogača korištenjem RAPD i AFLP markera da bi dobili informacije o genetičkoj varijabilnosti devet većinom glavnih kultivara i nekoliko različitih divljih svojiti rogača na području Algarve u Portugalu, te ih usporedili s morfološkom analizom istih. Autori su korištenjem AFLP metode s također 4 kombinacija početnica dobili 346 fragmenata od kojih je 110 (31,8 %) bilo polimorfnih a 236 fragmenata odnosno 68,2 % monomorfnih. Rezultati ovih istraživanja u usporedbi s našim rezultatima pokazuju znatno veću homogenost populacija rogača koja se djelomično može objasniti zbog korištenja uglavnom kultivara poznatih portugalskih domaćih sorti, a manje divljih jedinki rogača. Autori naglašavaju da je kultivar „Mulata“, koji je najrašireniji kultivar, bio dugo korišten kao izvor domestikacije divljih sorti rogača na području Portugala. Isto tako geografska udaljenost od centra podrijetla i relativna homogenost okolišnih čimbenika mogu ograničiti stvarnu genetsku varijabilnost ovih populacija rogača.

Kod populacije rogača s područja Podgore u odnosu na ostale istraživane populacije utvrđen je najveći broj polimorfnih markera – 221 polimorfni marker (Tablica 45). Od ukupno 241 markera utvrđenih kod populacije rogača iz Podgore 75,9 % otpada na polimorfne markere što ukazuje na njihovu visoku heterogenost populacije. Populacija rogača s otoka Visa IMA najmanji broj polimorfnih markera. Od ukupno 210 detektiranih markera unutar populacije rogača s otoka Visa, 30 % otpada na polimorfne markere te je to i najmanje varijabilna populacija. Najmanja vrijednost koeficijenta različitosti ($\bar{x} = 18,76$) utvrđena je također kod populacije s otoka Visa što pokazuje blisku srodnost individua u toj populaciji. Suprotno tome najveća prosječna udaljenost između individua ($\bar{x} = 48,69$) određena je unutar populacije s otoka Korčule.

AFLP metodu za istraživanje genotipova divljih i kultiviranih, uglavnom talijanskih i španjolskih, sorti rogača na području istočnog i zapadnog Mediterana, također su koristili Caruso i sur. (2007). U toj studiji korišteno je 7 kombinacija početnica od početnih 8 koje su dale 267 pikova od kojih je 96 (36 %) bilo polimorfno. Od 96 polimorfnih markera 15 ih je jedinstveno prisutnih ili ih nema u pojedinačnim genotipovima. U toj studiji AFLP markeri su otkrili različite izvore genetske varijabilnosti i bili su vrlo korisni kod *fingerprintinga*. Prisutnost hermafroditnih oblika zajedno sa diecičnim individuama u pojedinim populacijama je česta kod rogača. Hermafroditna stabla prisutna su u divljim tuniškim populacijama (Tous i sur., 2006), dok su u drugim zemljama kao na primjer Izraelu individue posve diecične (Caruso i sur., 2008). Zohary (2002) ističe da se ne može sa sigurnošću reći da li su hermafroditne biljke

tipično dio prirodnih populacija ili je njihova prisutnost rezultat antropomorfni utjecaja. U istraživanjima Carussa i sur. (2007), hermafroditne jedinice uključene u analizu pokazale su veliku sličnost neovisno o tome gdje su sakupljene. Autori ističu da se čini da neki hermafroditi sakupljeni u Italiji imaju isti *gene pool* kao neke španjolske sorte. Zbog vrlo rijetkih nasada u Libanonu je rogač uvršten u nacionalni popis prioritetnih šumskih genetskih resursa kao zaštićena biljka (Talhok i sur., 2005). Kao što je već rečeno osim AFLP metode, za ispitivanje varijabilnosti na molekularnoj razini koriste se i druge metode. Za određivanje fenotipske i genetske različitosti između 10 populacija, s različitih područja Maroka, Konate i sur. (2007) koristili su RAPD metodu kojom je ustanovljena velika različitost između istraživanih populacija. Najbližije populacije imale su sličnost manju od 65 %, te su ustanovili da se morfološka i molekularna povezanost između kultivara rogača mogu prilično razlikovati. Ovakvo opažanje je također ustanovljeno i u istraživanjima indijskog oraščića (*Anacardium occidentale* L.) koji imaju slične morfološke karakteristike, ali se mogu uveliko razlikovati jedan od drugog na genotipskoj razini (Samal i sur., 2003).

Studije koje se odnose na genetsku raznolikost i diferencijaciju između divljih populacija rogača su jako limitirane. Afif i sur. (2008) koristili su RAPD metodu za određivanje genetske varijabilnosti i strukture tuniških divljih populacija rogača s različitih lokaliteta. Korišteno je 7 RAPD markera pomoću kojih je ustanovljena velika raznolikost unutar populacija. Talhok i sur., 2005 su korištenjem RAPD markera, pokazali da su istraživane libanonske poludivlje populacije rogača održale značajnu genetsku varijabilnost između i unutar istraživanih populacija. Populacije nisu raspoređene prema njihovoj geografskoj udaljenosti, te autori zaključuju da preostale populacije čine vrijedne genetske resurse, te se trebaju smatrati zaštićenom biljnom vrstom. Korištenjem markera izoenzima kao metode za identifikaciju sorte u mnogim biljnim kulturama, postignut je samo nizak stupanj polimorfizma između kultivara istog kao i različitog porijekla (Barracosa i sur., 1996; Batlle i sur., 1996).). Afif i sur., 2006 su u svojim ranijim istraživanjima također potvrdili relativno nižu genetsku raznolikost baziranu na korištenju izoenzima u odnosu na onu dobivenu korištenjem RAPD markera za iste populacije. Da bi se izbjegli ovi nedostaci DNA markeri predstavljaju vrlo učinkovito sredstvo za brzu analizu genetske raznolikosti unutar kultivara.

Konate i sur. (2009) su ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) markerima potvrdili visoku varijabilnost populacija u Maroku dobivenu u svojoj ranijoj studiji kada su koristili RAPD markere (Konate i sur., 2007), uz samo nekoliko razlika. Prema Zietkiewicz i sur. (1994), ISSR markeri mogu učinkovito detektirati vrlo niske razine genetske varijabilnosti, tako da su uspješno korišteni za određivanje raznolikosti mnogih biljaka kao što su *Sorghum*

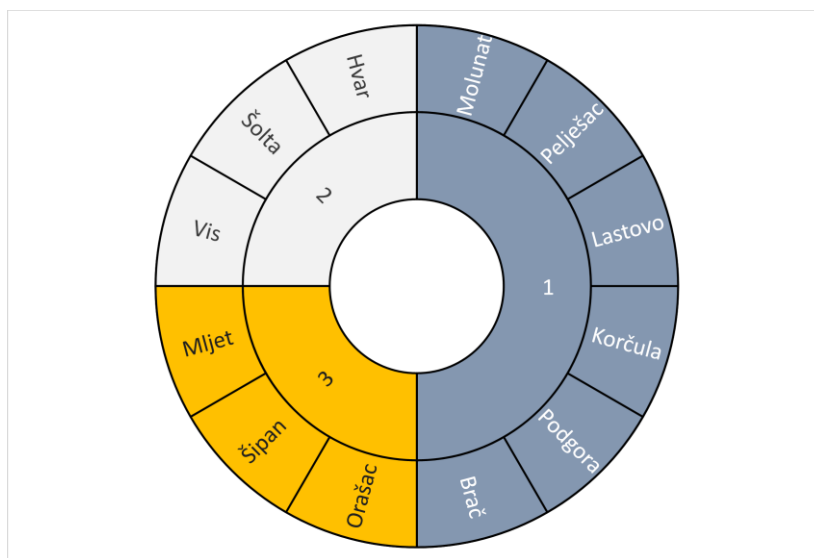
bicolour L. (Yang i sur., 1996), *Lupinus spp.* (Talhinhas i sur., 2003), *Asparagus acutifolus* L. (Sica i sur., 2005) i *Bombyx mori* (Pradeep i sur., 2005). Barracosa i sur., (2008) u usporedbi morfoloških, AFLP i RAPD metoda koristili su Mantelov test, ali nije bilo značajnih korelacija između tih metoda.

U našim istraživanjima također je korišten Mantelov test za usporebu molekularnih AFLP markera i morfoloških parametara ploda, sjemenke i lista svih istraživanih populacija rogača (Tablica 52.). Testom su dobivene značajne ($P < 0,05$) i vrlo značajne ($P < 0,01$) i korelacije između AFLP i većine parametara ploda i sjemenki, te AFLP markera i svih parametara ploda i sjemenke zajedno, kao i AFLP markera i svih parametara ploda, sjemenke i lista zajedno. Rezultati testa AFLP markera i istraživanih parametara lista nisu pokazali značajne korelacije što može značiti da identičan fenotip lista rogača može biti uzrokovan potpuno različitim genotipskom konstitucijom. Zato se na temelju molekularnih markera može uočiti razlika između populacija, a samo na temelju morfoloških ne može.

Za analizu genetske udaljenosti istraživanih populacija rogača sastavljenih prema različitim kriterijima, u ovom radu korištena je metoda analize molekularne varijance AMOVA kojom je izračunata varijabilnost između i unutar populacija. Analizom molekularne varijance je utvrđeno da 22,49 % od ukupne varijabilnosti pripada varijabilnosti između populacija, dok između individua unutar populacija varijabilnost iznosi 77,51 % (Tablica 47.). Ovakav rezultat pokazuje da su populacije heterogene, a mogao se i očekivati s obzirom da se radi o stranooplodnoj vrsti. Dobiveni rezultati pokazuju sličnost sa studijom (Afif i sur., 2008) u kojoj je istraživanjem genetske varijabilnosti na 10 tuniških populacija rogača, s različitih geografskih i bioklimatskih zona, utvrđena genetska varijabilnost od 77,11 % između individua unutar populacija, te 28,29 % genetske varijabilnosti između populacija (ili ekoloških grupa 15,66 %). Autori tako visoku genetsku raznolikost pripisuju izoliranosti pojedinih populacija što je moguće i kod populacija u našem istraživanju. U njihovoj studiji genetska struktura je u skladu sa bioklimatskim uvjetima što pokazuje da ekološki čimbenici također mogu utjecati na genetsku raznolikost.

Analizom međupopulacijske udaljenosti (Φ_{ST}) utvrđene su statistički značajne udaljenosti između gotovo svih istraživanih naših populacija rogača. Najveća međupopulacijska udaljenost utvrđena je između populacija s otoka Visa i populacija s područja Orašac. Između populacija s otoka Visa i Šolte nije utvrđena statistički značajna razlika i imaju najmanju vrijednost međupopulacijske udaljenosti što pokazuje da su te populacije iste (Tablica 48).

Na temelju rezultata međupopulacijske udaljenosti provedena je UPGMA klaster analiza (Slika 28.). Može se uočiti razdvajanje dendrograma prema kojem se više podgrupa nadovezuju jedna na drugu te se mogu grupirati u više skupina. Iz analize rezultata vidljivo je da populacije Brač, Podgora, Korčula, Lastovo, Pelješac i Molunat čine prvu skupinu. U drugoj skupini nalaze se tri populacije Hvar, Šolta i Vis, dok treća skupina obuhvaća također tri populacije Mljet, Šipan i Orašac (Slika 46.)



Slika 46. Skupine populacija dobivene UPGMA klaster analizom rogača. Populacije unutar skupine 1, 2 i 3 pripadaju istom statističkom skupu.

5.3. Fitokemijske značajke ploda i lista populacija rogača u Hrvatskoj

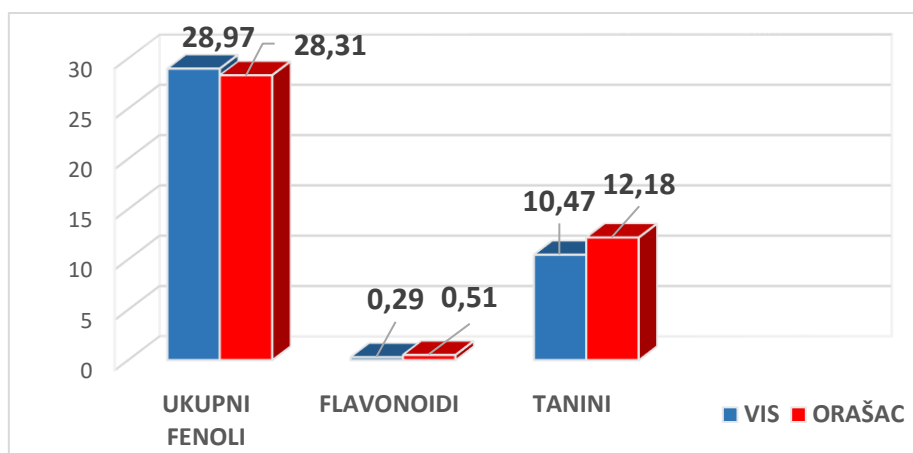
5.3.1. Polifenoli i antioksidativna aktivnost ploda rogača

Rezultati naših istraživanja o udjelu ukupnih fenola u plodu dvanaest hrvatskih populacija rogača ukazuju na značajnu varijabilnost između istraživanih populacija (0,15 – 104,95 %). Rezultati su u skladu s rezultatima studije koju su proveli Avallone i sur. (1997) na plodovima rogača uzgajanih na nekoliko različitih lokacija istočne Italije. Autori zaključuju da je udio ukupnih fenola varijabilan i vrlo visok u svim plodovima istraživanih rogača ($\bar{x} = 19,00$ mg GAE/g). Prosječni udio fenola u plodovima naših populacija rogača ($\bar{x} = 19,83$ mg GAE/g) u potpunosti odgovara njihovim rezultatima. Iz analize rezultata također se može zaključiti da se udio ukupnih fenola (13,64 – 28,98 mg GAE/g) u plodovima istraživanih populacija vrlo malo razlikuje od količina fenola (11,6 – 29,0 mg GAE/g) koje su određene u plodovima šest

različitih populacija portugalskih rogača (Custodio i sur., 2011). Autori naglašavaju snažan utjecaj ne samo kultivara nego i spola na udio fenola u plodu rogača, a u oba istraživanja se radi o ženskim stablima rogača. U istim uzorcima ploda rogača Custodio i sur., (2011) određuju i udio flavonoida i tanina koji su također ovisno o populaciji vrlo varijabilni (0,5 – 1,8 mg RE/g odnosno 1,1 – 10,0 CE/g). Ove rezultate ne možemo usporediti s našim rezultatima, koji su se kretali za flavonoide od 0,08 do 0,51 mg CE/g, a za tanine od 4,80 do 12,18 mg/g, jer su rezultati za flavonoide različito iskazani, a za određivanje tanina korišten je i drugačiji postupak. Međutim, naši rezultati su u skladu s rezultatima Bouzdoudi i sur. (2016) za udio ukupnih fenola u brašnu divljih populacija rogača u Maroku (19,36 mg GAE/g) koji su, zaključuju autori, bogatiji polifenolima u odnosu na kultivirane plodove rogača. Iste zaključke donose i za flavonoide i tanine koje su određivali u istim uzorcima.

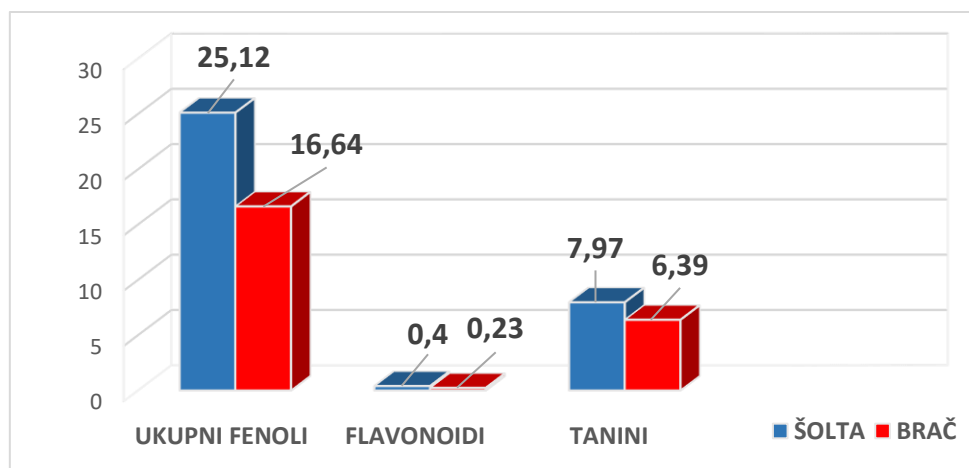
Kao što je vidljivo iz rezultata istraživanja u ovom radu udio flavonoida i tanina u plodovima rogača je vrlo varijabilan. Razlike u količinama flavonoida između populacija se kreću od 0,50 do 519 %, odnosno tanina od 1,92 do 148,68 %, te se kao i kod ukupnih fenola statistički značajno razlikuju ($p \leq 0,05$) između pojedinih populacija (Slike 29. – 31.).

Analiza rezultata o udjelu ukupnih fenola, flavonoida i tanina u istraživanim populacijama ploda rogača (Tablica 53.) pokazuje da je udio ovih fenolnih spojeva najveći u plodovima populacije Orašac, čiji plodovi sa stajališta morfoloških značajki imaju najmanju masu ploda, najkraći su, najuži i najtanji i najviše se razlikuju od plodova ostalih populacija. Sljedeća populacija koja se ističe sa visokim udjelom ovih spojeva je Vis, populacija s plodovima koji se također značajno razlikuju od plodova ostalih istraživanih populacija (Slika 47.) ali plodovi ove populacije su, upravo suprotno od plodova populacije Orašac, okarakterizirani kao najkvalitetniji obzirom na morfološke parametre (Battle i Tous, 1997). Također treba naglasiti da je između populacija Vis i Orašac molekularnom AFLP analizom utvrđena najveća međupopulacijsku udaljenost što opravdava njihove statistički vrlo značajne razlike obzirom na morfološka svojstva (Tablica 48.). Što se tiče geografske udaljenosti, populaciji Orašac, osim populacije Šolta, najudaljenija je populacija Vis. Nadmorske visine Orašca (16 m) i Visa (96 m) su također bitno različite. Osim toga, može se pretpostaviti da su i mikroklimatski uvjeti različiti, obzirom da se radi o različitim staništima odnosno priobalju (Orašac) i otoku (Vis). Međutim, obzirom na gotovo jednake količine ukupnih fenola u plodovima populacije Vis i Orašac može se zaključiti da niti jedan od spomenutih parametara nije značajno utjecao na njihov udio u ove dvije populacije što se ne može reći za udio flavonoida i tanina koji su značajno različiti.



Slika 47. Udio ukupnih fenola, flavonoida i tanina u plodu populacija rogača koje se obzirom na morfološke značajke statistički značajno razlikuju a i međupopulacijska udaljenost im je značajno različita

Iz dobivenih rezultata, vidljivo je da se populacije Šolta i Brač statistički značajno razlikuju u udjelu ukupnih fenola, flavonoida i tanina (Slika 48), iako sa stajališta morfoloških značajki ploda, imaju najbližnje plodove i pripadaju istom statističkom skupu. Također na vrlo su maloj geografskoj udaljenosti, a time se može pretpostaviti da su pod utjecajem vrlo slične mikroklimе. Plodovi populacije Šolta imaju za 50,96 % više ukupnih fenola, za 74,78 % više flavonoida te za 33,76 % veći udio tanina od populacije Brač.



Slika 48. Udio ukupnih fenola, flavonoida i tanina u plodu populacija rogača koje obzirom na morfološke značajke ploda pripadaju istom statističkom skupu, ali im je međupopulacijska udaljenost značajno različita

Na temelju ovih razmatranja vrlo je teško zaključiti da li i uolikoj mjeri morfologija ploda i ekogeografski uvjeti mogu imati utjecaj na udio ukupnih fenola, flavonoida i tanina u plodu ovih istraživanih populacija rogača. Međutim iz Mantelovog testa (Tablica 57.) koji je napravljen da bi se dobio uvid u korelaciju između molekularnih AFLP markera i istraživanih fitokemijskih parametara, vidljiva je značajna korelacija ($p < 0,05$) između AFLP i ukupnih

fenola, zatim AFLP i tanina dok korelacija AFLP i flavonoida nije bila značajna ($p = 0,069$) vjerojatno zbog vrlo niskih količina flavonoida u plodu rogača. Očito je interpretacija rezultata ovisna o tome da li promatramo sve istraživane populacije ili samo neke izdvojene skupine.

Obzirom na dobar nutritivni sastav i niz kvalitetnih svojstava ploda rogača kao vrijedne sirovine u proizvodnji funkcionalne hrane (Kumazawa i sur., 2002; Goulas i sur., 2016) jedan od ciljeva naših istraživanja bio je i određivanje antioksidativnog potencijala plodova istraživanih hrvatskih populacija rogača.

Iz rezultata naših istraživanja (Tablica 54.) vidljivo je da je antioksidativna aktivnost ploda rogača, određena DPPH, FRAP i TEAC metodama, između istraživanih populacija vrlo varijabilna (0,75 – 136,37 %). Plodovi populacije Vis, iza koje slijedi populacija Orašac, imaju najveći antioksidativni potencijal bez obzira kojom je metodom određen. To se moglo i očekivati obzirom da plodovi ovih populacija imaju visoki udio ukupnih fenola koji su, smatra se, glavni nositelji antioksidativnog potencijala (Hajaji i sur., 2010). Populacija Lastovo s značajno nižim udjelom ukupnih fenola i najnižim antioksidativnim potencijalom potvrđuje ovu pretpostavku. Rezultati naših istraživanja u skladu su s zaključcima Custodia i sur. (2011) koji smatraju da je antioksidativni potencijal ploda rogača, osim pod utjecajem spola, obzirom da su svojom studijom obuhvatili osim ženskih i plodove hermafroditnih stabala rogača, karakteristika i kultivara.

Da bi se dobio bolji uvid u doprinos pojedinih fenolnih spojeva na antioksidativni potencijal ploda svih istraživanih populacija rogača napravljena je korelacija između ukupnih fenola, flavonoida i tanina i rezultata dobivenih metodama koje su korištene za određivanje antioksidativnog potencijala ploda rogača. Ujedno je određen i koeficijent korelacije između DPPH, FRAP i TEAC metoda. Dobiveni podaci prikazani su u Tablici 62.

DPPH antioksidativna aktivnost (EC_{50}) ploda rogača statistički značajno ($p \leq 0,05$) negativno korelira sa svim istraživanim fenolnim spojevima kao i sa, ostalim tipovima antioksidativnog potencijala. Ova negativna korelacija upravo ukazuje na fenolne spojeve kao jedne od glavnih nositelja antioksidacijskog potencijala ploda rogača. FRAP i TEAC antioksidativne aktivnosti pozitivno koreliraju s istraživanim parametrima. i to FRAP statistički značajno s ukupnim fenolima i taninima ($p \leq 0,05$), a pozitivno ali ne i značajno s flavonoidima i TEAC metodom ($p \geq 0,05$). TEAC antioksidativna aktivnost također statistički značajno pozitivno korelira s fenolima i taninima ali ne i s flavonoidima. Očito flavonoidi koji su u plodu rogača prisutni u vrlo malim količinama ne utječu na antioksidativni potencijal ploda koliko ostali fenolni spojevi.

Izračunati su i koeficijenti korelacije između ukupnih fenola i flavonoida (koeficijent korelacije = 0,6119; $p = 0,0262$), između ukupnih fenola i tanina (koeficijent korelacije = 0,8418; $p = 0,0003$) i između flavonoida i tanina (koeficijent korelacije = 0,3821; $p = 0,1976$). Sve korelacije su statistički značajno pozitivne ($p \leq 0,05$), osim između flavonoida i tanina.

Tablica 62. Korelacije udjela ukupnih fenola, flavonoida i tanina ploda rogača s DPPH, FRAP i TEAC metodom te korelacija između ovih metoda

	DPPH		FRAP		TEAC	
	koeficijent korelacije	p	koeficijent korelacije	p	koeficijent korelacije	p
ukupni fenoli	- 0,8582	0,0002	0,8256	0,0009	0,8097	0,0008
flavonoidi	- 0,5387	0,0575	0,4315	0,1614	0,4116	0,1623
tanini	-0,5784	0,0384	0,6668	0,0179	0,6861	0,0096
DPPH	–	–	-0,8569	0,0004	- 0,8586	0,0002
FRAP	–	–	–	–	0,9179	2,5580
TEAC	–	–	–	–	–	–

Pearsonov koeficijent korelacije; korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$

5.3.2. Polifenoli i antioksidativni potencijal lista rogača

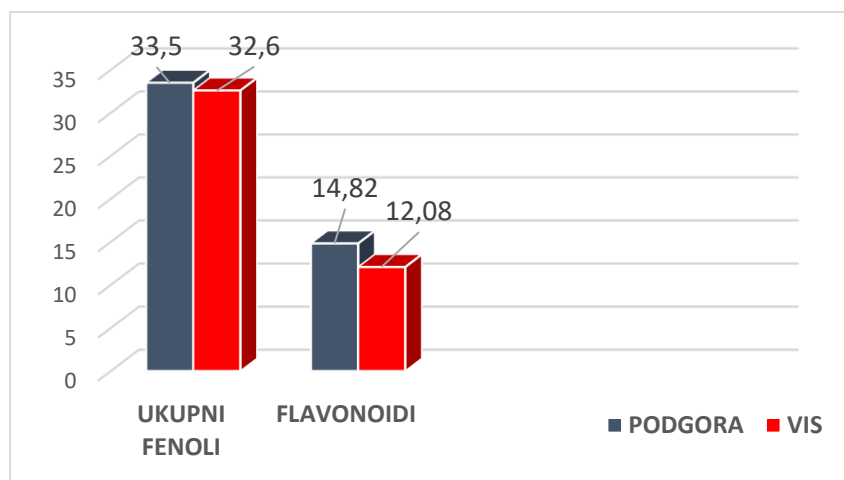
Iako se u literaturi uz plod rogača citira i list kao dobar izvor polifenola (Vaya i Mahmood, 2006; Eldashan, 2010) vrlo je malo podataka koji su vezani uz istraživanja ovih sastavnica u listu rogača. Upravo iz tog razloga, da bi se dobio uvid u antioksidativni potencijal lista rogača i njegovu varijabilnost određen je udio ukupnih fenola, flavonoida i antioksidativna aktivnost lista dvanaest hrvatskih populacija rogača.

Iz rezultata naših istraživanja vidljiva je (Tablica 55.) velika varijabilnost u količini ukupnih fenola između istraživanih populacija (0,85 – 110,95 %), što je u skladu s rezultatima istraživanja Custodio i sur., (2009) koji su ukazali na veliku varijabilnost ukupnih fenola u listovima sa ženskih stabala šest reprezentativnih portugalskih kultivara. Udio ukupnih fenola u listovima njihovih populacija (16,4 – 39,2 mg GAE/g) nešto je niži od naših vrijednosti za udio ukupnih fenola u listu istraživanih populacija rogača (21,53 – 45,42 mg GAE/g). Listovi

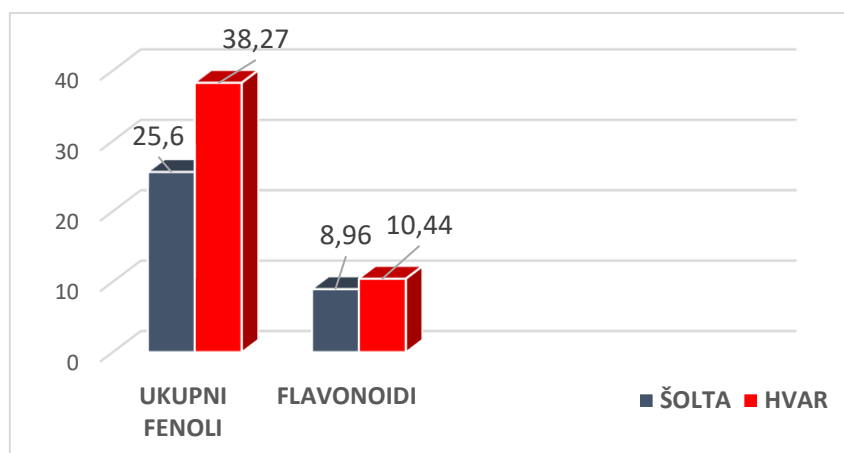
naših populacija imaju veće količine ukupnih fenola (\bar{x} = 32,8 mg GAE/g) i od listova marokanskih kultivara rogača (\bar{x} = 26,0 mg GAE/g) (Hajaji i sur., 2010). Kao najbolji izvori ukupnih fenola ističu se listovi populacija Orašac i Mljet, za razliku od Šipana, Šolte i Lastova koji imaju statistički značajno niže količine ali isto respektabilne.

Varijabilnost flavonoida, iako manja u odnosu na plod rogača, u listu istraživanih populacija također je značajna (1,96 – 65,46 %). Custodio i sur. (2009) su u svojoj studiji istaknuli značajnu varijabilnost u udjelu flavonoida između šest portugalskih kultivara rogača. Rezultati za udio flavonoida u listovima naših populacija, iskazani kao ekvivalent katehina (8,96 – 14,82 mg CE/g) ne mogu se u potpunosti usporediti s njihovim rezultatima koji su iskazani kao ekvivalent rutina (2,1 – 13,4 mg RE/g). Najveće količine flavonoida u listu istraživanih populacija rogača su određene u populacijama Podgora i Lastovo, a najmanje u populacijama Šolta, Pelješac i Molunat.

Iz interpretacije dobivenih rezultata vidljivo je (Slika 49.) da se u listu populacija Vis i Podgora, koje se obzirom na morfološke karakteristike statistički značajno razlikuju (Slika 45.), udio ukupnih fenola i flavonoida statistički značajno ne razlikuje. Očito morfološke značajke lista ne utječu na količinu ovih fenolnih spojeva. Da je to tako potvrđuje i analiza rezultata provedena na dvije populacije koje pripadaju istom statističkom skupu (Šolta i Hvar). Vidljivo je (Slika 50.) da se udio ukupnih fenola i flavonoida statistički značajno razlikuje između ove dvije populacije iako se obzirom na morfološke značajke lista pripadaju istom statističkom skupu. Međutim, također treba naglasiti da su kod oba primjera međupopulacijske udaljenosti statistički značajne.



Slika 49. Udio ukupnih fenola i flavonoida u listovima populacija rogača koje se obzirom na morfološke značajke statistički značajno razlikuju i međupopulacijska udaljenost im je statistički značajna



Slika 50. Udio ukupnih fenola i flavonoida u listovima populacija rogača koji obzirom na morfološke značajke ploda pripadaju istom statističkom skupu, ali međupopulacijska udaljenost im je statistički značajna

Antioksidativni potencijal lista određen DPPH, FRAP i TEAC metodama vrlo je varijabilan između pojedinih istraživanih populacija (0,28 – 338,39 %). Međutim iz rezultata analize varijance (Slike 37 – 39.) vidljivo je da obzirom na antioksidativni potencijal lista veliki broj populacija pripada istom statističkom skupu. Populacija s najvišim antioksidativnim potencijalom lista određena DPPH i FRAP metodama je Pelješac a TEAC metodom populacija Korčula i odmah zatim slijedi populacija Pelješac. Statistički značajno nižu antioksidativnu aktivnost imaju listovi populacije Lastovo (DPPH i FRAP metodama) i Brač (TEAC metodom).

Kao i kod ploda rogača napravljena je korelacija između ukupnih fenola i flavonoida lista i metoda koje su korištene za određivanje antioksidativnog potencijala lista rogača. Također je određen i koeficijent korelacije između DPPH, FRAP i TEAC metoda. Dobiveni podaci prikazani su u Tablici 63.

Tablica 63. Korelacije udjela ukupnih fenola, flavonoida lista rogača s DPPH, FRAP i TEAC metodom i korelacija između ovih metoda

	DPPH		FRAP		TEAC	
	koeficijent korelacije	p	koeficijent korelacije	p	koeficijent korelacije	p
ukupni fenoli	-0,0567	0,7834	0,6084	0,0009	0,3889	0,0495
flavonoidi	0,0328	0,8737	0,0513	0,8035	-0,0425	0,8367
DPPH	–	–	0,2254	0,2683	0,5261	0,0058
FRAP	–	–	–	–	0,4696	0,0155
TEAC	–	–	–	–	–	–

Pearsonov koeficijent korelacije; korelacija se smatra statistički značajnom ako je $p \leq 0,05$

DPPH antioksidativna aktivnost lista rogača negativno, ali ne statistički značajno, korelira s ukupnim fenolima ($p \geq 0,05$). S flavonoidima i s FRAP antioksidativnom aktivnošću

korelira pozitivno, ali također statistički ne značajno ($p \geq 0,05$), dok sa TEAC korelira pozitivno i statistički značajno ($p \leq 0,05$). FRAP i TEAC antioksidativne aktivnosti pozitivno i statistički značajno ($p \leq 0,05$) koreliraju s ukupnim fenolima a i međusobno. Što se tiče flavonoida, FRAP antioksidativna aktivnost lista korelira pozitivno, ali ne statistički značajno, a TEAC negativno ali također statistički ne značajno ($p \geq 0,05$). Korelacija između ukupnih fenola i flavonoida je pozitivna, ali vrlo slaba i statistički nije značajna (koeficijent korelacije = 0,2790; $p = 0,1675$).

Rezultati našeg istraživanja antioksidativnog potencijala lista dvanaest populacija rogača s otoka i priobalja južnog Jadrana u skladu su s rezultatima drugih studija (Custodio i sur., 2009; Hajaji i sur., 2010; Hsouna i sur., 2011). Spomenuti autori, koristeći DPPH metodu, smatraju da listovi rogača imaju značajan antioksidativni potencijal i da su dobar izvor prirodnih polifenola.

Iz usporedbe rezultata za udio ukupnih fenola, flavonoida i antioksidativnog potencijala (DPPH, FRAP i TEAC) ploda i lista istraživanih populacija rogača vidljivo je da su sve vrijednosti istraživanih parametara, osim antioksidativnog potencijala određenog DPPH metodom, veće u listu rogača, u odnosu na plod.

Mantelovim testom koji je proveden kao i kod ploda rogača, nisu utvrđene značajne korelacije između molekularnih AFLP markera i ukupnih fenola i flavonoida u listu (Tablica 57), međutim utvrđena je značajna korelacija ($P < 0,05$) između AFLP markera i ukupnih fenola, flavonoida i tanina ploda i lista zajedno.

5.3.3. Makro i mikroelementi u plodu rogača

Rezultati naših istraživanja ukazuju na značajnu varijabilnost makroelemenata (K, Ca, Mg i Na) i mikroelemenata (Fe, Cu, Zn, Mn, Ni, Al i Cr) u plodu hrvatskih populacija rogača. Razlike u udjelu pojedinih makroelemenata između istraživanih populacija kreću se od 0,04 do 62,25 % (za natrij i do visokih 475,39 %) a za mikroelemente od 1,89 do 330,70 % (za bakar, cink i krom i preko 400 %). Osobito velika varijabilnost je kod mikroelemenata s vrlo niskim udjelom. Dobivene vrijednosti za kalij (9020,09 – 11208,97 mg/kg), kalcij (1712,49 – 2811,57 mg/kg) i magnezij (409,79 – 664,87 mg/kg) u skladu su s rezultatima Ayaza i sur., (2007) koji su istraživali udio ovih makroelemenata u plodu populacija rogača s različitih lokaliteta u Anatoliji (Turska). Srednje vrijednosti njihovih rezultata bile su za kalij 9700 mg/kg, za kalcij 3000 mg/kg a za magnezij 600 mg/kg. Što se tiče mikroelemenata, samo za srednje vrijednosti željeza (18,8 mg/kg) može se reći da su relativno u skladu s našim rezultatima za željezo (13,71 – 26,50 mg/kg) dok su ostale srednje vrijednosti udjela mikroelemenata koje su određivali (Mn

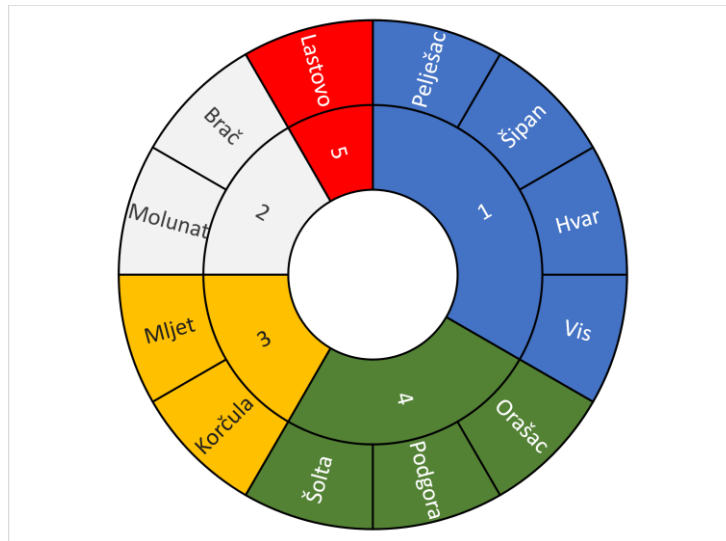
12,9 mg/kg, Zn 7,5 mg/kg i Cu 8,5 mg/kg) bile značajno više od naših rezultata (Mn 4,61 – 7,68 mg/kg, Zn 0,84 – 6,38 mg/kg i Cu 3,10 – 4,55 mg/kg).

U okviru širih istraživanja morfoloških i fitokemijskih karakteristika plodova divljih i kultiviranih stabala rogača s područja Antalije (Turska), Gubbuk i sur. (2010) su odredili i udio makro i mikroelemenata. Zaključili su, da je samo kalij (12300 mg/kg) značajno veći u plodovima divljih stabala rogača. Količine kalija su veće i u odnosu na naše populacije rogača, dok su vrijednosti za Ca (2800 mg/kg), Mg (730 mg/kg), Fe (13,46 mg/kg), Mn (4,45 mg/kg), Cu (2,16 mg/kg) i Zn (6,81 mg/kg) niže od onih vrijednosti koje smo mi dobili. Očito, kao što su i autori zaključili potvrđena je činjenica da uz ekološke uvjete i kultivar ima značajnu ulogu u akumulaciji minerala. Poznato je da biljke ne usvajaju minerale iz vanjske sredine u istom odnosu i količini u kojoj se oni nalaze u sredini iz koje ih biljka usvaja, već u određenim odnosima koji su specifični za pojedinu biljnu vrstu (Marschner, 1976). Vrlo visoke količine kalija u plodovima divljih i cijepljenih rogača također s područja Antalije potvrđene su i u studiji Oziyci i sur. (2014). Fidan i Sapundzhieva (2015) u plodu turskih rogača s područja Mersin odredili su udio Mg (265,01 mg/kg), Fe (16,80 mg/kg), Cu (5,60 mg/kg) Mn (4,42 mg/kg) i Zn (10,80 mg/kg). Dobivene vrijednosti u skladu su s našim rezultatima osim za cink čije količine su značajno veće od količina u plodu istraživanih populacija.

Youssef i sur. (2013) istaknuli su egipatske plodove rogača kao vrlo dobar izvor kalija (8637,64 mg/kg) i kalcija (2123,00 mg/kg), što je u skladu s rezultatima u ovom radu. Međutim udio željeza (381,80 mg/kg) i natrija (505,97 mg/kg) značajno je veći od srednjih vrijednosti naših rezultata (\bar{x} = 19,47 mg/kg za Fe odnosno, 62,33 mg/kg za Na). Rezultati istraživanja minerala u plodu rogača sa sjevera Maroka (Khelifa i sur., 2013) za K (10109,0 mg/kg) i Fe (20,1 mg/kg) mogu se usporediti s našim rezultatima, dok su za Ca (2854,0 mg/kg), Mg (943,9 mg/kg) i Na (104,4 mg/kg) veći, a za Mn (2,9 mg/kg) i Cu (2,9 mg/kg) manji od rezultata ovih elemenata u istraživanim populacijama rogača u Hrvatskoj.

Kao što je već rečeno varijabilnost u udjelu i makro i mikro elemenata između plodova istraživanih hrvatskih populacija je velika, međutim UPGMA klaster analizom dobiven je uvid u kojoj mjeri se pojedine populacije razlikuju odnosno su slične obzirom na udio svih istraživanih minerala (Slika 40.). Rezultati su pokazali da se istraživane populacije mogu grupirati u više skupina. S najmanjim stupanjem razdvojenosti Pelješac i Šipan su najbližije populacije, ali obzirom da su relativno blizu sa Hvarom i Visom ove četiri populacije čine prvu skupinu. Populacije Brač i Molunat s većim stupanjem razdvojenosti čine drugu skupinu a Mljet i Korčula treću. U četvrtoj skupini su populacije Šolta, Podgora i Orašac (Slika 51.). Plodovi populacije Lastovo po udjelu Na (136,70 mg/kg), Fe (26,07 mg/kg) i Al (10,67 mg/kg) značajno

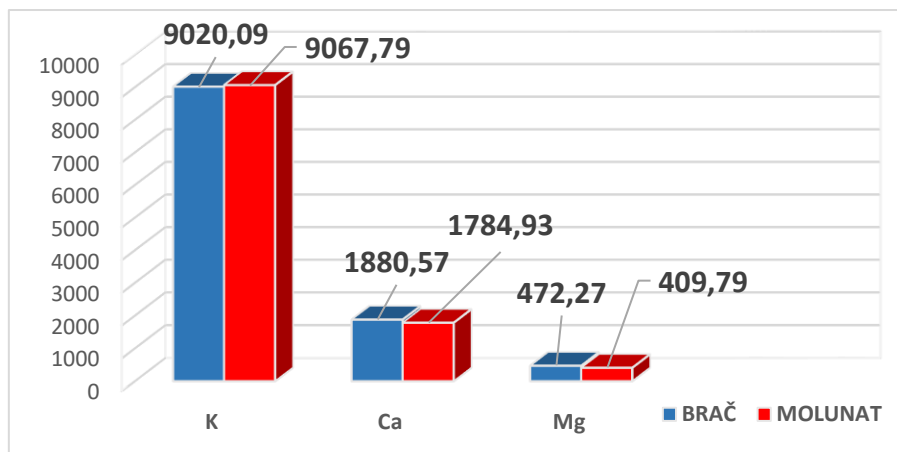
se razlikuju od plodova ostalih populacija pa se obzirom na veliki stupanj razdvojenosti ova populacija ne može svrstati niti u jednu od do sada spomenutih skupina.



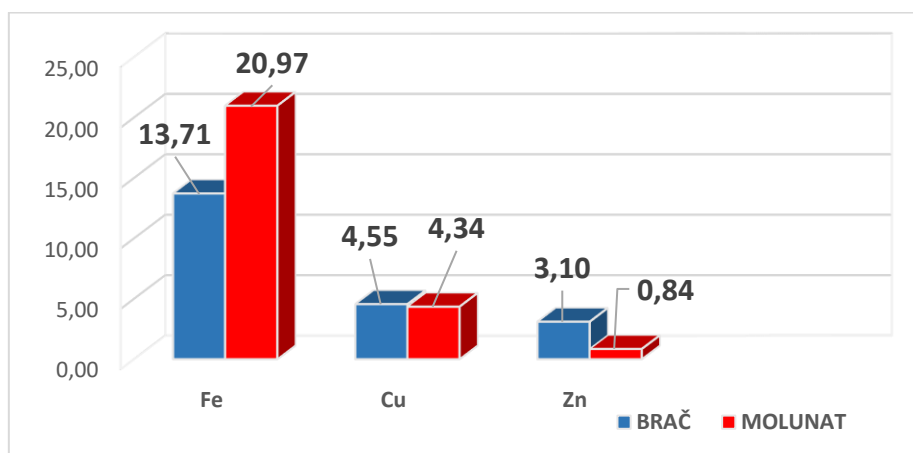
Slika 51. Skupine populacija dobivene UPGMA klaster analizom ploda rogača. Populacije unutar skupine 1,2 ,3 i 4 pripadaju istom statističkom skupu

Usporedbom rezultata može se utvrditi da su svi plodovi istraživanih populacija rogača u Hrvatskoj, usprkos varijabilnosti, bogati izvori makro i mikroelemenata. Najmanje varijabilan je kalij koji je ujedno i najzastupljeniji makroelement kod svih populacija, a slijedi ga kalcij kao drugi po zastupljenosti u plodu rogača. Plodovi populacije Orašac imaju najveći udio kalija, a poslije Pelješca i Visa najveći udio i kalcija. Ukoliko promatramo udio ovih makroelemenata obzirom na morfološke parametre, važno je spomenuti da se populacije Pelješac i Vis, koje su u istoj statističkoj skupini ako gledamo na udio minerala, značajno razlikuju po morfološkim značajkama ploda kao i na molekularnoj razini obzirom da se na temelju rezultata međupopulacijske udaljenosti (UPGMA klaster analiza) ne nalaze u istoj skupini. Isto se može ustvrditi i za populacije Mljet i Korčula.

Da bi se dobio uvid u mogući utjecaj morfoloških i genetskih značajki na udio makro i mikroelemenata u istraživanim populacijama ploda rogača u razmatranje su uzete populacije Brač i Šolta koje obzirom na morfološke značajke ploda pripadaju istom skupu ali im je međupopulacijske udaljenosti (Φ_{ST}) statistički značajna, zatim populacije Orašac i Vis koje se obzirom na morfološke značajke ploda značajno razlikuju a i međupopulacijska udaljenost (Φ_{ST}) im je statistički značajna, te populacije Molunat i Brač koje se obzirom na morfološke značajke ploda značajno ne razlikuju a nije utvrđena ni u međupopulacijskoj udaljenosti (Φ_{ST}) statistički značajna razlika (Slike 52. i 53.).



Slika 52. Udio K, Ca, i Mg u plodu populacija rogača koje se obzirom na morfološke značajke statistički značajno ne razlikuju a i međupopulacijska udaljenost nije im statistički značajna



Slika 53. Udio Fe, Cu i Zn u plodu populacija rogača koje se obzirom na morfološke značajke statistički značajno ne razlikuju a i međupopulacijska udaljenost nije im statistički značajna

Iz analiza rezultata je vidljivo da se udio makroelemenata (K, Ca i Mg) značajno ne razlikuje kod populacija Molunat i Brač, što se i može očekivati, obzirom da se radi o dvije populacije koje imaju morfološki vrlo slične plodove, a nije utvrđena niti statistički značajna razlika međupopulacijske udaljenosti (Slika 52.). Međutim, kod istih populacija udio mikroelemenata (Fe i Zn) bio je značajno različit pa se ne može reći da plodovi rogača sličnih morfoloških značajki imaju podjednaki udio minerala odnosno da bliska međupopulacijska udaljenost istraživanih populacija uvjetuje jednaku kumulaciju makro i mikroelemenata (Slika 53.). Kod ostalih populacija nije nađena neka značajnija povezanost morfoloških i genetskih značajki s udjelom makro i mikroelemenata.

5.3.4. Makro i mikroelementi u listu rogača

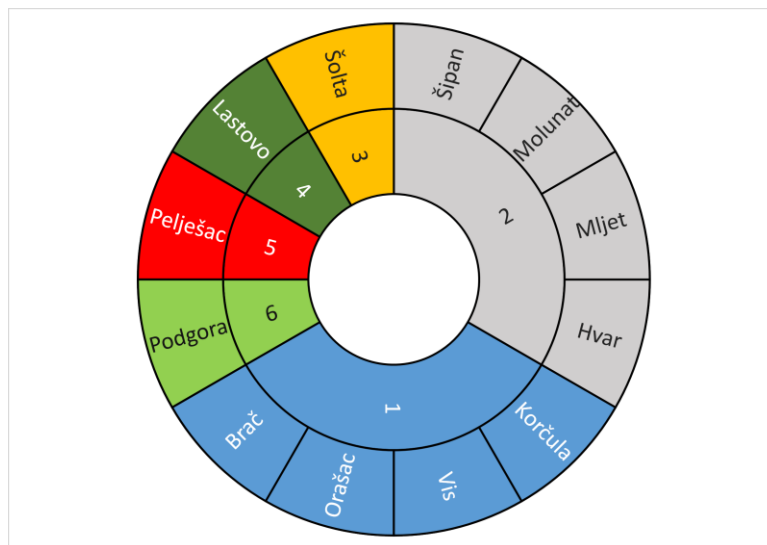
Varijabilnost minerala u listu istraživanih populacija rogača, kao i u plodu, vrlo je visoka. Razlike u udjelu makroelemenata između populacija kreću se od 0,65 do 114,59 % (za natrij i do 357,00 %) a za mikroelemente od 0,15 do 211,59 % (za krom i do 400,00 %). U listu za razliku od ploda rogača kalij (5859,94 – 8631,93 mg/kg) je drugi po zastupljenosti u svim istraživanim populacijama, dok je kalcij s vrlo visokim udjelom najzastupljeniji makroelement (11059,67 – 22756,81 mg/kg). Količine magnezija u listu su također značajno veće (1251,10 – 2684,74 mg/kg), kao i natrija (53,22 – 243,55 mg/kg) koji je u listu samo dviju populacija (Vis i Pelješac) bio nešto niži u odnosu na plod.

Što se tiče mikroelemenata udio Fe (29,72 – 47,42 mg/kg), Zn (5,30 – 14,09 mg/kg), Mn (23,03 – 56,29 mg/kg), Ni (0,38 – 0,92 mg/kg) i Al (16,83 – 45,24 mg/kg) značajno je veći u listu nego u plodu rogača u svim istraživanim populacijama. Količine Cu (2,71 – 4,89 mg/kg) u listu su niže nego u plodu u većini populacija. Veće, ali statistički ne značajno su u populacijama Pelješac, Lastovo, Mljet, Šipan i Molunat. Krom, iako prisutan u vrlo malim količinama (0,02 – 0,05 mg/kg), značajno je viši ili jednak udjelu u plodu.

Obzirom da je akumulacija minerala uvjetovana endogenim i egzogenim čimbenicima većina istraživanja je vezana uz uvjete i doprinose različitih vrsta prihrane na udio minerala u biljkama (Buwalda i Meekings, 1990; Correia i Martins-Loucao, 1997; Correia i sur., 2002). Međutim, vrlo je malo literaturnih podataka o istraživanjima vezanim uz mineralni sastav u listu rogača. Custodio i sur. (2007) prate sezonsku dinamiku minerala u listovima ženskih, muških i hemafroditnih stabala rogača koja rastu na netretiranim lokalitetima južnog dijela Portugala. Rezultati njihovog istraživanja udjela makro i mikroelemenata u listovima s ženskih stabala rogača za K (7100 mg/kg), Ca (14300 mg/kg), Mg (1900 mg/kg) i Zn (8,4 mg/kg) u skladu su s našim rezultatima. Količine Fe (63,5 mg/kg), Mn (42,7 mg/kg) i Cu (6,5 mg/kg) značajno su veće od količina ovih mikroelemenata u istraživanim hrvatskim populacijama. Rezultati studije Panteleitchouk i Cruz (2012) ukazuju na statistički značajne razlike u udjelu makro i mikroelemenata dva od tri kultivara uzgajana na različitim lokalitetima u Portugalu. Dobivene vrijednosti za K, Ca, Mg, Na, Fe, Cu, Cr, Zn i Mn značajno se razlikuju od naših rezultata.

Utvrđena značajna varijabilnost makro i mikroelemenata lista između istraživanih populacija rogača potvrđena je i UPGMA klaster analizom (Slika 41.). Iz analize rezultata vidljivo je da se populacije Šolta, Lastovo Pelješac i Podgora zbog velike razdvojenosti ne mogu grupirati u skupinu (Slika 54.). Ostale populacije se mogu grupirati u dvije skupine (Brač,

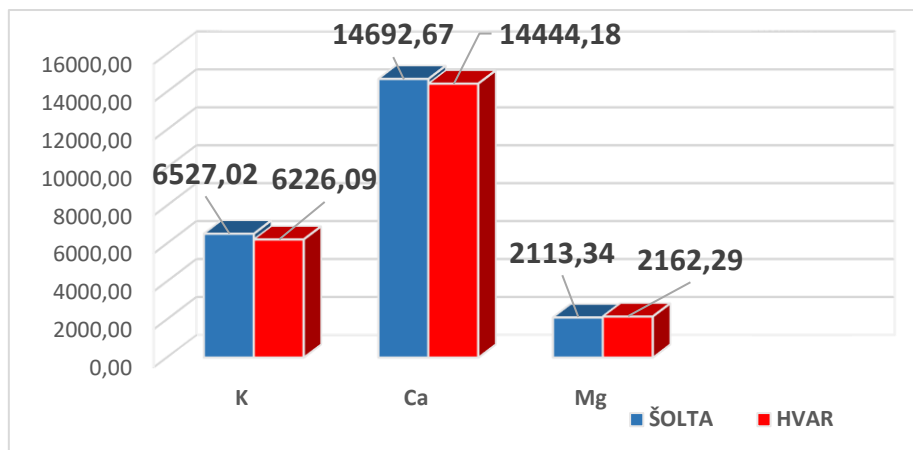
Orašac, Vis i Korčula) i (Hvar, Mljet, Molunat i Šipan). Populacije Brač i Orašac koje imaju najmanji stupanj razdvojenosti obzirom na morfološke karakteristike značajno se razlikuju.



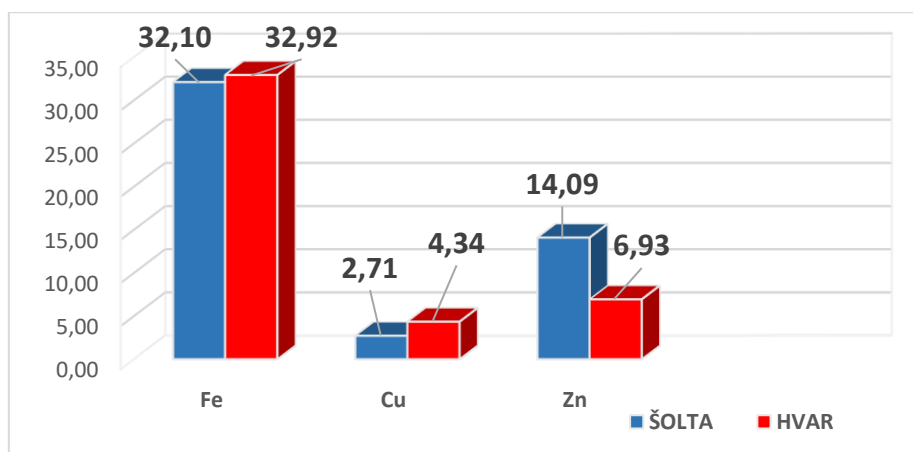
Slika 54. Skupine populacija dobivene UPGMA klaster analizom lista rogača. Populacije unutar skupine 1 i 2 pripadaju istom statističkom skupu

Kao i kod ploda rogača razmatran je mogući utjecaj morfoloških i genetskih značajki na udio makro i mikroelemenata u listu istraživanih populacija rogača. U obzir su uzete populacije koje se obzirom na morfološke značajke statistički značajno ne razlikuju ali im je međupopulacijska udaljenost (Φ_{ST}) statistički značajna (populacije Brač i Vis) te populacije koje se obzirom na morfološke značajke značajno razlikuju a i međupopulacijska udaljenost (Φ_{ST}) im je statistički značajna (Orašac i Brač) te populacije koje po morfološkim značajkama statistički značajno ne razlikuju a međupopulacijska udaljenost (Φ_{ST}) nije im statistički značajna (populacije Šolta i Hvar).

Analizom rezultata je potvrđeno da se, kao i kod ploda rogača, udio makroelemenata (K, Ca i Mg) značajno ne razlikuje u listu populacija koje imaju vrlo slične morfološke značajke a i međupopulacijska udaljenost (Φ_{ST}) im nije statistički značajna (Slika 55.). Za mikroelemente (Fe, Cu i Zn) kod istih populacija (Slika 56.) i za ostale razmatrane populacije nije utvrđena značajna povezanost između morfoloških i genetskih značajki na udio makro i mikroelemenata u listu istraživanih populacija rogača.



Slika 55. Udio K, Ca, i Mg u listu populacija rogača koje se obzirom na morfološke značajke statistički značajno ne razlikuju a i međupopulacijska udaljenost im nije statistički značajna



Slika 56. Udio Fe, Cu i Zn u listu populacija rogača koje se obzirom na morfološke značajke statistički značajno ne razlikuju a i međupopulacijska udaljenost im nije statistički značajna

Očito utjecaj morfoloških i molekularnih parametara se ne mogu isključiti ali nisu čimbenici koji bi značajno utjecali na varijabilnost mineralnog sastava ploda i lista rogača. Osim toga poznato je da mineralni sastav biljke odražava mineralni profil tla, što utječe i na razlike u sadržaju iona u biljkama koje rastu na različitim staništima što je upravo u slučaju s istraživanim populacijama čiji plodovi i listovi su u svrhu ovih istraživanja sakupljeni na različitim lokacijama odnosno na otocima i priobalju srednjeg i južnog Jadrana.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju morfoloških, genetskih i fitokemijskih istraživanja provedenih na dvanaest populacija rogača (*Ceratonia Siliqua* L) s otoka i priobalja južnog dijela Hrvatske utvrđeno je sljedeće:

Morfološke značajke ploda (masa, duljina, širina, duljina peteljke ploda i broj sjemenki) statistički se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$) između pojedinih populacija. Ovisno o istraživanom parametru i populaciji, koeficijent varijacije se kreće od 6,67 do 39,95 %. Sjemenke istraživanih plodova rogača, obzirom na morfološke značajke (masa, duljina, širina i debljina) relativno su manje varijabilne u odnosu na plod (ovisno o populaciji i istraživanom parametru koeficijent varijacije se kreće od 3,96 do 19,49 %), što se može tumačiti njihovom manjom podložnošću na utjecaj okoliša.

Provedena molekularna AFLP analiza također pokazuje značajnu varijabilnost istraživanih populacija. Analizom molekularne varijance (AMOVA) utvrđena je velika heterogenost istraživanih populacija, obzirom da je varijanca između individua unutar populacija (77,51 %) znatno veća od varijance između populacija (22,49 %).

UPGMA klaster analizom dobivenih molekularnih parametara istraživane populacije se mogu grupirati u tri skupine (Brač, Korčula, Lastovo, Pelješac, Podgora, Molunat kao prva skupina, zatim Hvar, Šolta, Vis kao druga, te Mljet, Šipan i Orašac kao treća skupina).

Plodovi populacije Vis se značajno razlikuju, obzirom na morfološke značajke, od ostalih populacija. Imaju najveću masu, širinu i debljinu ploda i prosječnu veličinu sjemenki. Očito je višestoljetna selekcija rogača na otoku Visu rezultirala vrlo dobrim morfološkim značajkama ploda. Na temelju informacijskog sadržaja polimorfizma utvrđeno je da rogači iz populacije Vis, s najmanjim brojem polimorfih markera i najmanjim koeficijentom različitosti, su najmanje varijabilna populacija. To ukazuje na blisku srodnost individua u toj populaciji rogača. Suprotno tome plodovi populacije Orašac, obzirom na morfološke značajke ploda, sve istraživane parametre imaju statistički značajno ($p < 0,001$) niže u odnosu na ostale populacije. Također, utvrđena značajna ($p < 0,001$) međupopulacijska udaljenost najveća je kod populacija Vis i Orašac. Populacija Šipan ima najveću varijabilnost individua u odnosu na ostale populacije.

Najsličnije populacije obzirom na morfološke značajke ploda su populacije Brač i Šolta, što obzirom na geografsku blizinu ova dva otoka i vrlo sličnu mikroklimu, upućuje na

pretpostavku da su ove dvije populacije istog podrijetla. Međutim, analizom međupopulacijske udaljenosti (Φ_{ST}) utvrđene su statistički značajne udaljenosti između ovih dviju populacija.

Udio ukupnih fenola, flavonoida i tanina kao i antioksidacijski potencijal određen DPPH, FRAP i TEAC metodama statistički je značajno varijabilan između istraživanih populacija. Međutim, analizom varijance i Bonferoni post hoc test određene su skupine populacija koje se obzirom na pojedine parametre značajno ne razlikuju. Koeficijenti korelacije između istraživanih parametara, dobiveni korelacijskom analizom, statistički su značajno pozitivni između gotovo svih istraživanih parametara. Plodovi populacija Vis i Orašac ističu se, u odnosu na ostale istraživane populacije, statistički značajno većim udjelom polifenolnih spojeva i antioksidativnim potencijalom.

Udio makro i mikroelemenata značajno je varijabilan između plodova istraživanih populacija. Najmanji koeficijent varijabilnosti ima kalij (0,02 – 24,27 %) koji je i najzastupljeniji makroelement u plodu rogača. Populacije Orašac i Vis uz Podgoru, Pelješac i Hvar se ističu s plodovima koji imaju značajne količine istraživanih minerala. Usprkos značajnoj varijabilnosti, UPGMA klaster analizom istraživane populacije, mogu se grupirati u skupine s najmanjim stupnjem razdvojenosti.

Morfološke značajke lista (duljina, širina, duljina peteljke, broj liski i ostali parametri liski) statistički se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$) između pojedinih populacija. Ovisno o istraživanom parametru i populaciji, koeficijent varijacije se kreće od 9,72 do 68,34 %. Međutim UPGMA klaster analizom istraživane populacije po sličnosti prosječnih vrijednosti mogu se ipak grupirati u tri skupine .

Udio ukupnih fenola i flavonoida u listu kao i antioksidativni potencijal lista značajno su varijabilni između pojedinih istraživanih populacija. Analizom varijance, obzirom na antioksidativni potencijal lista, dobivene su skupine populacija koje pripadaju istom statističkom skupu. Koeficijenti korelacije statistički su značajno pozitivni između većine od istraživanih parametara.

Varijabilnost makro i mikroelemenata u listu istraživanih populacija rogača vrlo je visoka. Za razliku od ploda, u listu rogača kalcij je najzastupljeniji makroelement što je i općenito karakteristika lista biljnih kultura. Svi mikroelementi osim bakra su značajno veći u listu u odnosu na plod istraživanih populacija.

Iako su rezultati morfoloških i provedenih fitokemijskih istraživanja varijabilni između populacija Mantelovim testom komparacije utvrđene su statistički značajne ($p \leq 0,05$) ili jako značajne ($p \leq 0,01$) korelacije između pojedinih molekularnih, morfoloških i fitokemijskih svojstava ploda, lista te ploda i lista istraživanih populacija rogača.

Iz provedenog istraživanja može se zaključiti da su zbog male molekularne međupopulacijske udaljenosti neke skupine istraživanih populacija rogača u Hrvatskoj genetski vrlo bliske, što se odražava manjim razlikama u morfološkim i fitokemijskim značajkama ploda i lista rogača u odnosu na ostale populacije. Također se neke od istraživanih populacija (Vis, Orašac, Šolta, Brač, Šipan) kakvoćom svojih plodova obzirom na morfološke značajke, antioksidativni potencijal i mineralni sastav mogu, prema literaturnim navodima, usporediti s plodovima rogača u zemljama intenzivnog uzgoja ove vrijedne ali, u Hrvatskoj zapostavljene kulture.

7. LITERATURA

Aafi A (1996) Note technique sur le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.). Centre National de la Recherche Forestière, Rabat.

Afif M, Ben Fadhel N, Koudja M L, Boussaid M (2006) Genetic Diversity in Tunisian Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Natural Populations. *Genet. Res. Crop Evol.* 53: 1501–1511.

Afif M, Messaoud C, Boulila A, Chograni H, Bejaoui A, Rejeb M N, Boussaid M (2008) Genetic structure of Tunisian natural carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) populations inferred from RAPD markers. *Ann. For. Sci.* 65: 710

Agullo G, Gamet-Payraastre L, Manenti S, Viala C, Remesy C, Chap H, Payraastre B (1997) Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem. Pharmacol.* 53, 1649 – 1657.

Aissani N, Coroneo V, Fattouch S, Caboni P (2012) Inhibitory effect of carob (*Ceratonia siliqua*) leaves methanolic extract on *Listeria monocytogenes*. *J Agric Food Chem.* 60 (40): 9954 – 8.

Albanell E, Caja G, Plaixats J (1991) Characteristics of Spanish carob pods and nutritive value of carob kibbles. *Options Méditerranéennes* 16:135-136.

Aslan M, Orhan I, Sener B (2002) Comparison of the seed oils of *Pistacia vera* L. of different origins with respect to fatty acids. *International Journal of Food Science and Technology* 37: 333 – 335.

Aspé E, Fernández K (2011) The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. *Ind. Crops Prod.* 34: 838 – 844.

Avallone R, Plessi M, Baraldi M, Monzani A (1997) Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. *J. Food Compos. Anal.* 10: 166 – 172.

Ayaz F A, Torun H, Ayaz S, Correia P J, Alaiz M, Sanz C, Gruz J, Strnad M (2007) Determination of chemical composition of Anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua* L.): sugars,

amino and organic acids, minerals and phenolic compounds. *J. Food Quality*, 30 (6): 1040 – 1055.

Ayaz F A, Torun H, Ayaz S, Correia P J, Alaiz M, Sanz C, Grúz J, Strnad M (2008) Genetic structure of Tunisian natural carob tree (*Ceratonia siliqua L.*) populations inferred from RAPD markers. *Ann. For. Sci.* 65: 710.

Ayaz F A, Torun H, Glew R H, Bak Z D, Chuang L T, Presley J M, Andrews R (2009) Nutrient content of carob pod (*Ceratonia siliqua L.*) flour prepared commercially and domestically. *Plant Foods for Human Nutrition* 64: 286 – 292.

Barracosa P, Almeida M T, Cenis J (1996) Characterization of cultivars of carob tree in Algarve (Portugal). *Proceedings of the III International Carob Symposium*.

Barracosa P, Osorio J, Cravador A (2007) Evaluation of fruit and seed diversity and characterization of carob (*Ceratonia siliqua L.*) cultivars in Algarve region. *Sci Hortic.* 114: 250 – 257.

Barracosa P, Lima M B, Cravador A (2008) Analysis of genetic diversity in Portuguese *Ceratonia siliqua L.* cultivars using RAPD and AFLP markers. *Scientia Hort.* 118: 189 – 199.

Bates T E (1971) Factors affecting critical nutrient concentrations in plants and their evaluation: a review *Soil Sci.* 112: 116 – 130.

Battle I, Rovira M, Tous J (1996) Carob germplasm characterization using izozymes. U: *Proceedings of the III International Carob Symposium*. Cabanas-Tavira, Portugal.

Battle I, Tous J (1997) Carob tree, *Ceratonia siliqua L.* IPGRI, Rome, Italy.

Benchikh Y, Paris C, Louaileche H, Charbonne C, Ghoul M, Chebil L (2016) Comparative characterization of green and ripe carob (*Ceratonia siliqua L.*): physicochemical attributes and phenolic profile *Sdrp journal of food science & technology* 1 (3).

Bernardo- Gill M G, Roque R, Roseiro L B, Duarte L C, Girio F, Esteves P (2011) Supercritical carbon dioxide extraction of acorn oil. *J. Supercrit. Fluids* 59: 36 – 42.

- Biner B, Gubbuk H, Karhan M, Aksu M, Pekmezci M (2007) Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua L.*) in Turkey. *Food Chem.* 100 (4): 1453 – 1455.
- Bolarić S, Barth S, Melching E A, Posselt K U (2005A) Genetic diversity in European perennial ryegrass cultivars investigated with RAPD markers. *Plant Breeding* 124: 161-166.
- Bouzdoudi B E, El Ansari Z N, Mangalagiu I, Mantu D, Badoc A, Lamarti A (2016) Determination of Polyphenols Content in Carob Pulp from Wild and Domesticated Moroccan Trees. *American Journal of Plant Sciences* 7: 14.
- Bouzouita N, Khaldi A, Zgoulli S, Chebil L, Chaabouni M, Thonart P (2007) The analysis of crude and purified locust bean gum: A comparison of samples from different carob tree populations in Tunisia. *Food chem* 101: 1508 – 1515.
- Bravo L, Grados N, Saura-Calixto F J (1994) Composition and potential uses of mesquite pods (*Prosopis pallida L.*): comparison with carob pods (*Ceratonia siliqua L.*) *J Sci. Food Agric.* 65: 303 – 306.
- Bubić, Š. (1977) *Specijalno voćarstvo*, Svjetlost Sarajevo.
- Butchart S H M, Walpole M, Collen, B (2010) Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines. *Science.* 328 (5982): 1164 – 1168.
- Buwalda J G, Meekings J S (1990) Seasonal accumulation of mineral nutrients in leaves and fruits of Japanese pear (*Pyrus serotina Rend.*). *Scientia horticulturae* 41: 209 – 222.
- Calixto F S, Canellas J (1982) Components of nutritional interest in carob pods (*Ceratonia siliqua L.*). *J. Food Sci. Agr.* 33: 1319 – 1323.
- Carlson W A (1986) The carob: evaluation of trees, pods and kernels. *Int. Tree Crops J.* 3:281 – 290.
- Caruso T, Borghini F, Bucci C, Colacevich A, Bargagli R (2007) Modeling local- scale determinants and probability of microarthropod species occurrence in Antarctic soils. *Soil biology and biochemistry* 39: 2949 – 2956.

Caruso M, La Malfa S, Pavlicek T, Frutos D, Gentile A, Tribulato E (2008) Characterization and assessment of genetic diversity in cultivated and wild carob (*Ceratonia siliqua* L.) genotypes using AFLP markers. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 83: 177 – 182.

Catarino F M, Correia O A, Webb E, David M (1981) Morphological and physiological responses of the Mediterranean evergreen sclerophyll, *Ceratonia siliqua*, to different light intensities. *Components of Productivity of Mediterranean Climate Regions. Basic and Applied Aspects* (N.S. Margaris and H.A. Mooney, eds.). Junk Publishers, The Hague.

Cooper G M (2000) *The cell: A molecular approach*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Correia P J, Martins-Loucao M A (1997) Leaf nutrient variation in mature carob (*Ceratonia siliqua* L.) tree in response to irrigation and fertilization. *Tree Physiol.* 17: 813 – 819.

Correia P J, Anastácio I, Candeias M F, Martins-Loução M A (2002) Nutritional diagnosis in carob-tree (*Ceratonia siliqua* L.): relationships between yield and leaf mineral concentration. *Crop Sci.* 42: 1577 – 1583.

Corsi L, Avallone R, Cosenza F, Farina F, Baraldi C, Baraldi M (2002) Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia* 73 (7): 674 – 684.

Cowan R S (1981) *Caesalpinioideae Advances in Legume Systematics*. Vol. 1 (R.M. Polhill and P.H. Raven, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, England. Cooper I P (2000) *Claim Drafting. Biotechnology and the Law*. West Group, Minnesota.

Crone E E, Miller E Sala A (2009) How do plants know when other plants are flowering? Resource depletion, pollen limitation and mast-seeding in a perennial wildflower. *Ecology Letters* 12: 1119 – 1126.

Custodio L, Correia P J, Martin-Loucao M A, Romano A (2007) Floral Analysis and Seasonal Dynamics of Mineral Levels in Carob Tree Leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 30: 739 – 753.

Custódio L. (2007a) 2nd International Symposium on the Human Health Effects of Fruits and Vegetables, Houston, Texas, USA: 9 – 13.

Custodio L, Fernandes E, Escapa A L, Lopez-Aviles S, Fajardo A, Aligue R, Albericio F, Romano A (2009) Antioxidant activity and in vitro inhibition of tumor cell growth by leaf extracts from the carob tree (*Ceratonia siliqua*). *Pharm Biol* 47(8): 721 – 8.

Custodio L, Fernandes E, Escapa A L, Fajardo A, Aligue R, Albericio F, Neng N R, Nogueira J M F, Romano A (2011) Antioxidant and cytotoxic activities of carob tree fruit pulps are strongly influenced by gender and cultivar. *J Agric Food Chem*. 59: 7005 – 7012.

Custodio L, Escapa A L, Fernandes E, Fajardo A, Aligue R, Albericio F, Neng N, Nogueira J M, Romano A. (2011a) Phytochemical profile, antioxidant and cytotoxic activities of the carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) germ flour extracts. *Plant Foods Hum Nutr* 66(1):78 – 84.

Custodio L, Fernandes E, Escapa A L, Fajardo A, Aligue R, Albericio F, Neng N R, Nogueira J M, Romano A. 2011b. Antioxidant and cytotoxic activities of carob tree fruit pulps are strongly influenced by gender and cultivar. *J. Agric Food Chem* 59(13):7005–12.

Dakia P A, Wathelet B, Paquot M (2007) Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia Siliqua* L.). *Food Chemistry* 102: 1368 – 1374.

De Candolle A (1883) *L'origine des plantes cultivées*. Balaire, Paris.

De Riek J, Calsyn E, Evertaert I, Van Bockstaele E, De Loose M (2001) AFLP based alternatives for the assessment of Distinctness, Uniformity and Stability of sugar beet varieties. *Theoretical Applied Genetics* 103: 1254 – 1265.

Diamantoglou S, Mitrakos K (1981) Leaf longevity in Mediterranean evergreen sclerophylls. *Components of Productivity of Mediterranean-climate Regions – Basic and Applied Aspects* (N.S. Margaritis and H.A. Mooney, eds.). Junk Publishers, The Hague.

Di Pietro R, Dibitonto P, Garziano G, Sciandrello S, Wagensommer R P, Medagli P, Tomaselli V (2009) Preliminary results of floristic and vegetation surveys in three coastal humid areas in the Puglia region (southern Italy).

Durazzo A, Turfani V, Narducci V, Azzini E, Maiani G, Carcea M (2014) Nutritional characterisation and bioactive components of commercial carobs flours *Food Chemistry* 153 109 – 113.

- El-Dahshan A, Ahsanullah, Rademann J (2010) Efficient access to peptidyl ketones and peptidyl diketones via C-alkylations and C-acylations of polymer-supported phosphorus ylides followed by hydrolytic and/or oxidative cleavage *Biopolymers* 94 (2): 220 – 8.
- El-Dengawy E - R F, Hussein A A, Alamri S A (2011) Improving growth and salinity tolerance of carob seedlings (*Ceratonia siliqua* L.) by *Azospirillum* inoculation. *Am.-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 11: 371 – 384.
- El Hajaji H, Lachkar N, Alaoui K, Cherrah Y, Farah A, Ennabili A, El Bali B, Lachkar M (2010) Antioxidant properties and total phenolic content of three varieties of Carob tree leaves from Morocco. *Records of Natural Products* 4 (4): 193 – 204.
- El Kahakahi R, Rachid Z, Diouri M, Errakhi R (2015) Morphological and biochemical characterization of Morocco carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *Int J Biol MedRes* 6 (2): 4946 4952.
- El-Shatnawi M K, Ereifej K I (2001) Chemical composition and livestock ingestion of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seeds. *Journal of Range Management* 54: 669 – 673.
- Excoffier L, Smouse P E J M, Quattro I (1992) Analysis of molecular variance from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479 – 491.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47 – 50.
- Excoffier L, Lischer H E L (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.
- Ferguson I K, (1980) The pollen morphology of *Ceratonia* (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Kew Bull.* 35 (2): 273 – 277.
- Fidan H, Sapundzhieva T (2015) Mineral composition of pods, seeds and flour of grafted carob (*Ceratonia siliqua* L.) Fruits. *Scientific Bulletin Series F. Biotechnologies* 19: 136 – 139.
- Foury A (1954) Les légumineuses fourragères au Maroc. *Les Cahiers de la Recherche Agronomique*, Rabat 3 (5): 33 – 38.

Gao L, Oomah B D, Mazza G (2002) Wheat quality: antioxidant activity wheat millstreams, u: Ng P Wrigley C W, Wheat quality elucidation. AACC International, ACCC Press, St. Paul Mn. 233.

Gharnit N, El Mtili N, Toubi Ennabili A, Ennabili A (2001) Social characterisation and exploitation of carob tree (*Ceratonia siliqua L.*) from Mokrisset and Bab Taza (NW of Morocco). Science Letters 3 (2): 10.

Gharnit N, El Mtili N, Ennabili A, Sayah F (2004) Floral characterization of carob tree (*Ceratonia siliqua L.*) from the province of Chefchaouen (NW of Morocco). Moroccan J. Biol. 1: 41 – 51.

Goldblatt P (1981) Cytology and the phylogeny of the Leguminosae. Advances in Legume Systematics. Vol. 2 (R.M. Polhill and P.H. Raven, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, England.

Goulas V, Stylos E, Chatziathanasiadou V M, Mavromoustakos T, Tzakos A G (2016) Functional Components of carob fruit: linking the chemical and biological space. Int.J. Mol. Sci. 17 (11).

Grljušić S. (2003). Genetska varijabilnost kultivara crvene djeteline (*Trifolium pratense L.*) nakon selekcije u brdsko-planinskim uvjetima. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.

Gruendel S, Garcia A L, Otto B, Mueller C, Steiniger J, Weickert M O, Speth M, Katz N, Koebnick C (2006) Carob pulp preparation rich in insoluble fiber and polyphenols enhances lipid oxidation and lowers postprandial acylated ghrelin. J. Nutr. 136, 1533 – 1538.

Gruendel S, Otto B, Garcia A L, Wagner K, Mueller C, Weickert M O, Heldwein W, Koebnick C (2007a) Carob pulp preparation rich in insoluble dietary fibre and polyphenols increases plasma glucose and serum insulin responses in combination with a glucose load in humans. Br. J. Nutr. 98: 101 – 105.

Gruendel S, Garcia A L, Otto B, Wagner K, Bidlingmaier M, Burget L, Weickert, M O, Dongowski G, Speth M, Katz N, Koebnick C (2007b) Increased acylated plasma ghrelin, but improved lipid profiles 24-h after consumption of carob pulp preparation rich in dietary fibre and polyphenols. Br. J. Nutr. 98: 1170 – 1177.

Güzeldağ G, Çolak Ö (2007) Molecular identification of *Ganoderma lucidum* from Turkey. *Int. J. Agric. Biol.* 9: 767 – 770.

Gubbuk H, Guven D, Gunes E (2009) Physical features of some Turkish carob (*Ceratonia siliqua* L.) pods. *Bull. UASVM Hortic.* 66: 685.

Gubbuk H, Kafkas E, Guven, D, Gunes E (2010) Physical and phytochemical profile of wild and domesticated carob (*Ceratonia siliqua* L.) genotypes. *Spanish J. Agric. Res* 8 (4): 1129 – 1136.

Gübbük H, Güneş E, Balkiç R (2013) Carob Production Potential in Turkey and Uses of Carob. *International caucasian forestry symposium.*

Hajaji H E, Lachkar N, Alaoui K, Cherrah Y, Farah A, Ennabili A, Bali B E, Lachkar M (2010) Antioxidant properties and total phenolic content of three varieties of Carob tree leaves from Morocco. *Rec. Natl. Prod.* 4: 193 – 204.

Hammer K, Knüpffer H, Laghetti G, Perrino P (1992) Seeds from the past. A Catalogue of Crop Germplasm in South Italy and Sicily, Bari.

Heinecke J W (1997) Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis. *Curr Opin Lipid* 8: 268 – 274.

Herrmann D, Poncet B N, Manel S, Rioux D, Gielly L, Taberlet P, Gugerli F (2010). Selection criteria for scoring amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) positively affect the reliability of population genetic parameter estimates. *Genome* 53: 302 – 310.

Hillcoat D, Lewis G, Verdcourt B (1980) A new species of *Ceratonia* (*Leguminosae-Caesalpinioideae*) from Arabia and the Somali Republic. *Kew Bull.* 35 (2): 261 – 271.

Hooper D U, Chapin F S III, Ewel J J, Hector A, Inchausti P, Lavorel S, Lawton J H, Lodge D M, Loreau M, Naeem S (2005) Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecol. Monogr.* 75: 3 – 35.

Hsouna A B, Saoudi M, Trigui M, Jamoussi K, Boudawara T, Jaoua S, Feki A E (2011). Characterization of bioactive compounds and ameliorative effects of *Ceratonia siliqua* leaf extract against CCl₄ induced hepatic oxidative damage and renal failure in rats. *Food Chem. Toxicol.* 49: 3183 – 3191.

Huff M O, Hanic-Joyce P J, Dang H, Rodrigues L A, Ellis S R (1993) Two inactive fragments derived from the yeast mitochondrial ribosomal protein Mrp S28 function in trans to support ribosome assembly and respiratory growth. *J Mol Biol* 233(4): 597 – 605.

Iipumbu L (2008) Compositional Analysis of Locally Cultivated Carob (*Ceratonia siliqua*) Cultivars and Development of Nutritional Food Products for a Range of Market Sectors. University of Stellenbosch, Stellenbosch.

Irwin H S, Barneby R C (1981) Cassieae. *Advances in Legume Systematics*. Vol. 1 (R.M. Polhill and P.H. Raven, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, England.

Jump A, Marchant R, Penuelas J (2009) Environmental change and the option value of genetic diversity, *Trends in Plant Science* 14 (1): 51 – 58.

Karababa E, Coşkuner Y (2013) Physical properties of carob bean (*Ceratonia siliqua L.*): an industrial gum yielding crop. *Ind Crops Prod*. 42: 440 – 6.

Kawamura Y (2008) Guar gum chemical and technical assessment. *Proceedings of the 69th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, Rome, Italy.

Khair El-shatnawi moh'd J, Ereifej Khalil I (2001) Chemical composition and livestock ingestion of carob (*ceratonia siliqua l.*) seeds. *J. range manage*. 54: 669 – 673.

Khaled Nagib L, Eldahshan O A, El-Khatib W F A M (2010) Promising antioxidant and cytotoxic activities of the aqueous ethanolic extract of carob leaves *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 4(6): 330 – 334.

Khlifa M A, Bahloul I, Kitane S (2013) Determination of Chemical Composition of Carob Pod (*Ceratonia Siliqua L.*) and its Morphological Study *M. J. Mater. Environ. Sci.* 4 (3): 2528 – 2028.

Kirigaya N, Kato H, Fujimaki M (1971) Studies on antioxidant activity of nonenzymic browning reaction products. Part 3. Fractionation of browning reaction solution between ammonia and D-glucose and antioxidant activity of resulting fraction. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 45: 292 – 298

Kivçak B, Mert T (2002) Preliminary evaluation of cytotoxic properties of *Laurus nobilis* leaf extracts. *Fitoterapia* 73: 242 – 243.

Klenow S, Glei M, Beyer-Sehlmeyer G, Haber B, Pool-Zobel B L (2004) Carob Fiber - Functional effects on human colon cell line HT29. Poster, Functional Food: Safety Aspects.

Klenow S, Glei M, Haber B, Owen R, Pool-Zobel B L (2008) Carob fibre compounds modulate parameters of cell growth differently in human HT29 colon adenocarcinoma cells than in LT97 colon adenoma cells. *Food Chem Toxicol* 46: 1389 – 97.

Klenow S, Glei M (2009) New insight into the influence of carob extract and gallic acid on hemin induced modulation of HT29 cell growth parameters. *Toxicol In Vitro* 23 (6): 1055 – 61.

Konaté I, Filali-Maltouf A, Berraho E B (2007) Diversity analysis of Moroccan carob (*Ceratonia siliqua* L.) accessions using phenotypic traits and RAPD markers. *Acta Botánica Malacitana* 32: 79 – 90.

Kovačić S, Nikolić T, Ruščić M, Milović M, Stamenković V, Mihelj D, Jasprica N, Bogdanović S, Topić J (2008) Flora jadranske obale i otoka, Školska knjiga, Zagreb.

Kruse, J. 1986. *Ceratonia*. U: Rudolf Mansfelds Verzeichnis landwirtschaftlicher und gärtnerischer Kulturpflanzen (ohne Zierpflanzen) (J. Schultze-Motel, ed.). Akademie Verlag, Berlin, 437 – 438.

Kumazawa S, Taniguchi M, Suzuki Y, Shimura M, Kwon M S, Nakayama T (2002) Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 373 – 377.

Lambraki M, Karagouni A (1987) 2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-2), *Ceratonia siliqua* in Israel: an ancient element or a newcomer? *Israel J. of Bot.* 36: 191-197.

Lambraki M, Karagouni, A. (1998) 2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSO-2).

Liphshitz N (1987) *Ceratonia siliqua* in Israel: an ancient element or a newcomer? *Israel J. of Bot.* 36:191 – 197.

Lo Gullo M, Salleo S (1988) Different strategies of drought resistance in three Mediterranean sclerophyllous trees growing in the same environmental conditions. *New Phytol.* 108: 267 – 276.

Loreau M, Naeem S, Inchausti P, Bengtsson J, Grime J P, Hector A, Hooper D U, Huston M A, Raffaelli D, Schmid B, Tilman D, Wardle D A (2001) Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science* 294: 804 – 808.

Luebberstedt T, Melchinger A E, Dussle C, Vuylsteke M, Kupier M (2000). Relationships among early European Maize inbreeds. IV. Genetic Diversity Realed with AFLP Markers and comparison with RFLP, RAPD and Pedigree Dana. *Crop. Sci.* 40: 783 – 791.

MacLeod G, Forcen M (1992) Analysis of volatile components derived from the carob bean *Ceratonia siliqua*. *Phytochemistry* 31 (9): 3113 – 9.

Magini E, Tulstrup N P (1955) Tree seed notes. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome.

Makkar H P S, Blümmel M, Becker K (1995). Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in in vitro techniques. *Br. J. Nutr.* 73 (6): 897 – 913.

Makris D P, Kefalas P (2004) Carob pods (*Ceratonia siliqua L.*) as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Technology and Biotechnology* 42 (2): 105 – 108.

Mantel N (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research* 27: 209 – 220.

Manthey J A, Guthrie N (2002) Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 5837 – 5843.

Marschner H, Ossenberg-Neuhaus H (1976) Langstreckentransport von Natrium in Bohnenpflanzen. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.* 139: 129 – 142.

Maxted N, Bennett S J (2001) Plant genetic resources of legumes in the Mediterranean. *Current plant science and biotechnology in agriculture*, vol 39, Springer Science + Business Media, Dordrecht.

Mertz W (1982) Trace minerals and atherosclerosis. *Fed. Proc.* 41: 2807 – 2812

Messina M, Barnes S 1991. The role of soy products in reducing risk of cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 83, 541 – 546.

- Miljković I (1991) *Suvremeno voćarstvo*. Znanje, Zagreb.
- Mitrakos K (1981) Temperature germination responses in three mediterranean evergreen sclerophylls. U: *Components of Productivity of Mediterranean-climate Regions - Basic and Applied Aspects* (N.S. Margaris and H.A. Mooney, eds.). Dr.W. Junk Publishers, The Hague/Boston/London, 277 – 279.
- Mitrakos K (1988) The botany of *Ceratonia*. U: *Proceedings of the II International Carob Symposium* (P. Fito and A. Mulet, eds.). Valencia, Spain, 209-218.
- Meyer F G (1980) Carbonized food plants of Pompeii, Herculaneum, and the Villa at Torre Annunziata. *Econ. Bot.* 34(4): 401 – 437.
- Moh'd Khair J, El-Shatnawi, Khalil I Ereifej (2001). Chemical composition and livestock ingestion of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seeds. *Journal of Range Management*. 54: 669 – 673.
- Mohamed D A, Hamed I M, Al-Okbi S Y (2008) *Ceratonia siliqua* pods as a cheap source of functional food components. *Dtsch Lebensmitt Rundsch* 104 (1): 25 – 9.
- Moreira M R, Ponce A G, De Valle C E, Roura S I (2005): Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie-LWT*, 38: 565 – 570.
- Muller C (2005) *Karobpeule* U: *AgriPROBE*. south Africa: Institute for Animal Production, 16 – 17.
- Mukhtar H, Wang Z Y, Katiyar S K, Agarwal R, (1992). Tea components: antimutagenic and anticarcinogenic effects. *Preventive Medicine* 21: 351 – 360
- Naghmouchi S, Khouja M L, Romero A, Tous J, Boussaid M (2009) Tunisian carob (*Ceratonia siliqua* L.) populations: Morphological variability of pods and kernel. *Sci. Hortic.—Amsterdam* 121: 125 – 130.
- Naito H, Melnychenko I, Didie M, Schneiderbanger K, Schubert P (2006) Optimizing engeneered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation* 114: 172 – 8.
- Nielsen S (2003) *Food analysis*, Plenum publishers, New York.

- Nienhuis J, Slocum M K, De Vos D A, Muren R (1993) Genetic similarity among *Brassica oleraceae* genotypes as measured by restriction fragment length polymorphisms. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 118: 298 – 303.
- Nunes M A, Catarino F M, Pinto E (1989) Seasonal drought acclimatation strategies in *Ceratonia siliqua* leaves. *Physiol. Plant.* 77:150 – 156.
- Nunes M A, Ramalho J D C, Rijo P da S (1992) Seasonal changes in some photosynthetic properties of *Ceratonia siliqua* (carob tree) leaves under natural conditions. *Physiologia Plantarum* 86(3): 381 – 387.
- Orhan I, Sener B (2002) Fatty acid content of selected seed oils. *J Herb Pharmacother* 2 (3): 29 – 33.
- Orphanos P I, Papaconstantinou J (1969) The carob varieties of Cyprus. *Tech. Bul.* 5. Cyprus Agricultural Research Institute. Nicosia, Cyprus.
- Ortiz P L, Arista M, Talavera S (1996) Producción de néctar y frecuencia de polinizadores en *Ceratonia siliqua* L. (Caesalpinaceae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 54: 540-546.
- Ouchkif M (1988) Etude sur le caroubier. Append number 8 of Project Oued Srou. MARA (Morocco)-GTZ (Germany), DPA of Khenifra (unpublished).
- Ouzounidou G, Ntougias S, Asfi M, Gaitis F, Zervakis GI (2012) Raw and fungal-treated olive-mill wastewater effects on selected parameters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth--the role of proline. *J Environ Sci Health B* 47(7): 728 – 35.
- Owen R W, Haubner R, Mier W, Giacosa A, Hull W E, Spiegelhalder B, Bartsch H (2003) Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology* 41: 703 – 717.
- Owen R H, Haubner R, Hull W E, Erben G, Parvathy K S, Susheelamma N S, Tharanathan R N, Gaonkar A K (2005) A simple non-aqueous method for carboxymethylation of galactomanans. *Carbohydrate Polymer* 62: 13.
- Oziyci H R, Nedim T, Turhan I, Yatmaz E, Ucgun K, Akgul H, Gubbukc H, Karhan M (2014) Mineral composition of pods and seeds of wild and grafted carob (*Ceratonia siliqua* L.) fruits *Scientia Horticulturae* 167: 149 – 152.

- Panteleitchouk A V, Cruz L, Silva L I B, Rocha-Santos T A P, Duarte A C, Lopes M L, Canhoto J M (2012) Differentiation of Carob Tree (*Ceratonia siliqua* L.) Cultivars by Elemental Fingerprinting of Leaves Acta Hort. 938: 453 – 457.
- Papagiannopoulos M, Wollseifen H R, Mellenthin A, Haber B, Galensa R (2004) Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MS J. Agric. Food. Chem. 52: 3784 – 3791.
- Passos de Carvalho J (1988) Carob pollination aspects. U: Proceedings of the II International Carob Symposium ((Fito P, Mulat A, eds). Valencia, Spania, 281 – 289.
- Paz-Elizur T, Sevilya Z, Leitner-Dagan Y, Elinger D, Roisman L C, Livneh Z (2008) DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: potential application for cancer risk assessment and prevention. Cancer Lett. 266: 60 – 72.
- Pejić I, Kozumplik V, Crnobrnja Z, Dogan Z (1992) Mogućnost Primjene Molekularnih Markera U Oplemenjivanju I Sjemenarstvu Kukuruzna. Sjemenarstvo 9 (6): 319 – 330.
- Pekmezci M, Erkan M, Adak N, Gübrük H, Onus N, Karaşahin I, Eti S, Biner B (2005) Doğu Akdeniz Bölgesinde Yabani ve Kültür Formunda Yetişen Keçiboynuzu Tiplerinin Seleksiyonu, Journal of Bahçe, Yalova 34: 73 – 82.
- Petit M D, Pinilla J M (1995) Production and purification of a sugar pods syrup from carob Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie 28: 145 – 152.
- Polhill R M, Raven P H, Stirton C H (1981) Evolution and systematics of the Leguminosae. U: Advances in Legume Systematics. Vol. 1 (R.M. Polhill and P.H. Raven, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, England, 1 – 26.
- Popis sorti voćnih vrsta (2010) Zavod za sjemenarstvo i rasadničarstvo.
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalasky A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol. Breed 3: 225 – 238.
- Pradeep A R, Chatterjee S N, Nair C V (2005) Genetic differentiation induced by selection in an inbred population of the silkworm *Bombyx mori*, revealed by RAPD and ISSR marker systems. J Appl Genet. 46: 291 – 298.

- Pugnaire F I, Chapin F S. (1992) Environmental and physiological factors governing nutrient resorption efficiency in barley. *Oecologia* 90: 120.
- Pugnaire F I, Chapin F S (1993) Controls over nutrient resorption from leaves of evergreen Mediterranean species. *Ecology* 74: 124 – 129.
- Rakib E, Chicha H, Abouricha S, Alaoui M, Bouli A, Hansali M, Owen R W (2010) Determination of phenolic composition of carob pods grown in different regions of Morocco. *J. Nat. Prod.* 3: 134 – 140.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay *Free Radical Biology and Medicine* 26: 1231 – 1237.
- Rejeb M N, Laffray D, Louguet P (1991) Physiologie du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) en Tunisie. U: Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides. Groupe d'Etude de l'Arbre, Paris, 417 – 426.
- Retana J, Ramoneda J, García del Pino F (1990) Importancia de los insectos en la polinización del algarrobo. *Bol. San. Veg. Plagas* 16: 143 – 150.
- Retana J, Ramoneda J, García del Pino F, Bosch J (1994) Flowering phenology of carob, *Ceratonia siliqua* L. (Caesalpinaceae). *J. Hort. Sci.* 69 (1): 97 – 103.
- Rice-Evans C A, Miller N J, Bolwell P G, Bramle P M, Pridham J B (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 22: 377 – 383.
- Rohlf F J (2008). NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.2. Exeter Software: Setauket, NY.
- Roseiro L, Duarte L C, Oliveira D L, Rauter A P (2013) Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob (*Ceratonia siliqua* L.) biomass: Effect on the phenolic profile and antiproliferative activity. *Ind. Crops and Prod.* 47: 132 – 138.
- Russel J R, Fuller J D, Macaulay M, Hatz B G, Jahoor A, Powell W, Waugh R (1997) Direct comparison of the levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* 95: 714 – 722.

Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, Kanazawa K (2003) Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 571 – 581.

Samal S, Rout G R, Lenkaet P C (2003) Analysis of genetic relationships between populations of cashew (*Anacardium occidentale* L.) by using morphological characterisation and RAPD markers. *Plant Soil Environ.* 49 (4): 176 – 182.

Sanchez-Castillo C P, Dewey P J, Aguirre A, Lara J J, Vaca R, Lean de la Barra P, Ortiz M, Escamilla I, Philip T (1998) The mineral content of Mexican fruits and vegetables. *J Food Compos Anal* 11: 340 – 356.

Seghir1 N, Harki E, Dahchour A, Gharnit N, Ennabili A (2016) Vegetative and efflorescence characterization of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) from the Province of Sefrou, the Middle Atlas of of Morocco. *Moroccan Journal of Biology* 13: 13 – 22.

Segundo E, Carmona M P, Sáez E, Velasco L, Martín G, Ruiz L, Janssen D, Cuadrado I M (2008) Occurrence and incidence of viruses infecting green beans in south-eastern Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* 22: 579 – 591.

Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T (1992) Antioxidative properties of xanthone on the auto oxidation of soybean in cyclodextrin emulsion. *J. Agr. Food Chem.* 40: 945 – 948.

Sica M, Gamba G, Montieri S, Gaudio L and Aceto S (2005) ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* L. *J. BMC Genetics* 6 (17): 1471 – 2156.

Sidina M, El Hansali M, Wahid N, Ouatmane A, Boulli A, Haddioui A (2009) A Fruit and seed diversity of domesticated carob (*Ceratonia siliqua* L.) in Morocco *Scientia Horticulturae* 123: 110 – 116.

Silanikove N, Landau S, Or D, Kababya D, Bruckental I, Nitsan Z (2006) Analytical approach and effects of condensed tannins in carob pods (*Ceratonia siliqua*) on feed intake, digestive and metabolic responses of kids. *Livest Sci.* 99: 29 – 38.

Singleton V L, Rossi J A (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic* 16: 144 – 158.

Soriani M, Rice-Evans C, Tyrrell R M (1998) Modulation of the UV-A activation of haem oxygenase, collagenase and cyclooxygenase gene expression by epigallocatechin in human skin cells. *FEBS Letters*, 439: 253 – 257.

Srećec S, Kremer D, Karlović K, Peremin Volf T, Erhatic R, Augustinović Z, Kvaternjak I, Bolarić S, Dujmović Purgar D, Dunkić V, Bezić N, Randić M (2016) Comparison of Morphological Characteristics of Carob Tree (*Ceratonia siliqua* L.) Pods and Seeds of Populations Collected from Two Distant Croatian Islands: Drvenik Mali and Mali Lošinj. *Agric. Conspec. Sci.* 81 (1): 61 – 64.

Strikić F, Čmelik Z, Perica S (2006) Morfološke osobine dva perspektivna tipa rogača (*Ceratonia siliqua* L.) s otoka Visa. *Pomologia Croatica* 12: 245 – 54.

Šatović Z (1999) Genetski biljezi i njihova uporaba u biljnoj genetici, oplemenjivanju i sjemenarstvu. *Sjemenarstvo* 16(1-2): 73 – 95.

Šatović Z, Lieber Z, Karlović K, Kolak I (2002) Genetic Relatedness Among Basil (*Ocimum* Spp.) Accessions Using Rapd Markers. *Acta Biol. Cracoviensia Seriese Botanica* 44: 155 – 160.

Šilić Č (2005) Atlas dendroflora (drveće i grmlje) Bosne i Hercegovine. Matica hrvatska Čitluk: Franjevačka kuća Masna Luka, Čitluk.

Talhinhas P, Neves-Martins, Leilão J (2003). AFLP, ISSR and RAPD markers reveal high levels of genetic diversity among *Lupinus* spp. *Plant Breed* 122: 507 – 510.

Talhok S N, Breugel P, Zurayk R, Al-Khatib A, Estephan J, Ghalayini A, Debian N, Lychaa D (2005) Status and prospects for the conservation of remnant seminatural carob *Ceratonia siliqua* L. populations in Lebanon. *Forest Ecol Manag* 206: 49 – 59.

Tetik N, Turhan I, Oziyci H R, Gubbuk H, Karhan M, Ercisli S (2011) Physical and chemical characterization of *Ceratonia siliqua* L. germplasm in Turkey. *Sci. Hortic. Amsterdam* 129: 583 – 589.

Tous J, Battle I (1990) *El Algarrobo*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, Spain.

Tous J, Olarte C, Truco M J, Arús P (1992) Isozyme polymorphisms in carob cultivars. *HortScience* 27 (3): 257 – 258.

- Tous J, Romero A, Hermoso J F (2006) High density planting systems, mechanization and crop management in olive. Proceedings of the 2nd International Seminar Olivebioteq, Marsala – Mazara del Vallo, Italy, Special seminars and invited lectures 423 – 430.
- Tous J, Romero A, Hermoso J F, Ninot A, Plana J, Batlle I (2009) Agronomic and commercial performance of four Spanish carob cultivars. HortTechnology 19: 465-470.
- Tucker S C (1988b) Heteromorphic flower development in *Neptunia pubescens*, a mimosoid legume. Amer. J. Bot. 75: 205-224.
- Tucker S C (1992a) The developmental basis for sexual expression in *Ceratonia siliqua* (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cassieae). Am. J. Bot. 79 (3): 318-327.
- Tucker S C (1992b) The role of floral development in studies of legume evolution. Can. J. Bot. 70: 692-700.
- Tucker S C (2000 b) Floral development in tribe Detarieae (Leguminosae: Caesalpinioideae): *Amherstia*, *Brownea*, and *Tamarindus*. American Journal of Botany 87: 1385–1407.
- Tucker S C (2003) Comparative floral ontogeny in Detarieae (Leguminosae: Caesalpinioideae). III. Adaxially initiated whorls in *Julbernardia* and *Sindora*. International Journal of Plant Sciences 164: 275 – 286.
- Valentão P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, de Lourdes Basto M (2002) Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. Biol Pharm Bull 25 (10): 1324 – 1327
- Vardar Y, Ozturk M (1972) Relative transpiration of the old and young leaves of some macchia elements. Phytion (Austria) 14: 251 – 262.
- Vardar Y, Seçmen Ö, Öztürk M (1980) Some distributional problems and biological characteristics of *Ceratonia* in Turkey. Portug. Acta Biol. (A) 16 (1 – 4): 75 – 86.
- Vavilov N I (1951) The Origin, variation, immunity, and breeding of Cultivated Plants The Ronald Press Co, New York.

- Vaya J, Mahmood S (2006) Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia lentiscus* L.). *Biofactors* 28: 169–175
- Vekiari S A, Ouzounidou G, Ozturk M, Görk G (2011) Variation of quality characteristics in Greek and Turkish carob pods during fruit development. *Procedia Soc Behav Sci* 19: 750 – 755.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reljans M, Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kulper M, Zabeau M (1995) AFLP: New Technique For DNA Fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23/21: 4407 – 4414.
- Wadsworth T L, Koop D R (1999) Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochemical Pharmacology* 57: 941 – 949.
- Wünsch A, Hormaza J I (2002) Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica* 125: 56 – 67.
- Würsh P, Del Vedovo S, Rosset J, Smiley M (1984) The tannin granules from ripe carob pod, *LebensmittelWissenschaft und Technologie* 17: 351 – 354.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W The determination of flavonoid percentages in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals (1999) *Food Chemistry* 64: 555 – 559.
- Zografakis N, Dasenakis D (2000) Biomass in Mediterranean, Project No. 238: Studies on the exploitation of carob for bioethanol production. Commission of the European Communities, Directorate General for energy and transport. Regional Energy Agency, Region of Crete.
- Zohary M (1973) *Geobotanical Foundations of the Middle East*, 2 vols. Stuttgart.
- Zohary D (1996) Domestication of the carob tree. U: Proceedings of the III International Carob Symposium. Cabanas-Tavira, Portugal.
- Zunft H J, Luder W, Harde A, Haber B, Graubaum H J, Koebnick C, Grunwald J (2003) Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients. *European J of Nutr.* 42: 235 – 242.
- Zunft H J, Luder W, Harde A, Haber B, Graubaum H J, Gruenwald J (2001) Carob pulp preparation for treatment of hypercholesterolemia *Adv Ther.* 18(5): 230 – 236.

Yamagishi M, Natsume M, Nagaki A, Adachi T, Osakabe N, Takizawa T, Kumon H, Osawa T (2000) Antimutagenic activity of cacao: inhibitory effect of cacao liquor polyphenols on the mutagenic action of heterocyclic amines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 5074 – 5078.

Yang H, Hamada K, Terashima H, Izuta M, Yamaguchi-Sihta E, Kondoh O, Satoh H, Miyazaki M, Arisawa M, Miyamoto C, Kitada K (1996) A point mutation within each of two ATP-binding motifs inactivates the functions of elongation factor 3. *Biochim Biophys Acta* 1310 (3):303 – 8.

Youssef M K E, Hend M A, El-Manfaloty M M (2013) Nutritional Assessment of Wheat Biscuits and Fortified Wheat Biscuits with Carob Pod Powder (*Ceratonia Siliqua L.*) *Food and Public Health* 2013, 3(6): 336 – 340.

Youssef M K E, El-Manfaloty M M, Ali H M (2013) Assessment of proximate chemical composition, nutritional status, fatty acid composition and phenolic compounds of carob (*Ceratonia siliqua L.*). *Food and Public Health* 3(6): 304 – 308.

Yousif A K, Alghzawi H M (2000) Processing and characterization of carob powder. *Food Chemistry* 69 (3): 283-287.

8. ŽIVOTOPIS

Ivna Dragojević Müller rođena je 19.6.1980. u Zagrebu, gdje je završila osnovnu školu i VII gimnaziju, i maturirala 1998. godine. Iste godine upisala je Agronomski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu smjer uređenje krajobraza, a nakon položene prve godine studija i Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilišta u Zagrebu smjer biologija-ekologija. Diplomski rad izradila je na Zoologijskom zavodu pod mentorstvom prof. dr. sc. M. Kerovca i diplomirala u veljači 2006.

Za vrijeme studija bila je član udruge studenata BIUS i udruge Biologija mora. Za vrijeme studija i nakon diplomiranja volontirala je na Cresu u programu zaštite bjeloglavih supova.

Od 2006. do 2007. godine radi kao suradnik na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta.

Od 2008. zaposlena je u Vodoopskrbi i odvodnji d.o.o. kao Samostalni referent za ekologiju i zaštitu voda. Tijekom 2008. godine završila je školovanje za menadžera zaštite okoliša (Environmental systems manager ISO 14001).

2009. godine upisala je poslijediplomski doktorski studij biologije. Od 2014. suradnik je na projektu Taksonomija, ekologija i uporaba rogača (*Ceratonia siliqua* L.) i lovora (*Laurus nobilis* L.) u Hrvatskoj. Udata je i majka dvoje djece.

Izvorni znanstveni radovi u CC časopisima:

Kremer D, Stabentheiner E, Dunkić V, **Dragojević Müller I**, Vujić L, Kosalec I, Ballian D, Bogunić F, Bezić N (2012) Micromorphological and chemotaxonomical Traits of *Micromeria croatica* (Pers.) Schott. Chemistry & Biodiversity 9 (4): 755 – 768.

Kremer D, **Dragojević Müller I**, Dunkić V, Vitali D, Stabentheiner E, Oberländer A, Bezić N, Kosalec I (2012) Chemical traits and antimicrobial activity of endemic *Teucrium arduini* L. from Mt Biokovo (Croatia). Central European Journal of Biology 7 (5): 941 – 947.

Dunkić V, Kremer D, **Dragojević Müller I**, Stabentheiner E, Kuzmić S, Jurišić Grubešić R, Vujić L, Kosalec I, Randić M, Srećec S, Bezić N (2012) Chemotaxonomic and

micromorphological traits of *Satureja montana* L. and *S. subspicata* Vis. (*Lamiaceae*). Chem Biodivers. 9 (12): 2825 – 42

Kremer D, Vitali Čepo D, Dunkić D, **Dragojević Müller I**, Kosalec I, Bezić N, Stabentheiner E (2013) Phytochemical and micromorphological traits of *Geranium dalmaticum* (Beck) Rech.f. and *G. macrorrhizum* L. (*Geraniaceae*). Natural product communications 8 (5): 645 – 650.

Kremer D, **Dragojević Müller I**, Stabentheiner E, Vitali Čepo D, Kopričanec M, Ruščić M, Kosalec I, Bezić N, Dunkić V (2013) Phytochemical and micromorphological Traits of Endemic *Micromeria pseudocroatica* (*Lamiaceae*). Natural product communications 7 (12): 1667 – 1670.

Radovi u zbornicima skupova:

Dragojević Müller I, Kremer D, Vujić L, Vitali D (2011) Variability of macro and trace elements content in winter savory. EuroFood Chem XVI, Translating food chemistry into health benefits. Gdansk. Poljska, 06 – 08. 07. 2011.

Vitali D, Vinković Vrček I, **Dragojević Müller I**, Vujić L (2011) Protein content and digestibility of conventionally and organically grown wheat varieties. EuroFood Chem XVI, Translating food chemistry into health benefits. Gdansk. Poljska, 06 – 08.07.2011.

Dragojević Müller I, Kopričanec M, Kremer D, Vujić L (2011) Variability of minerals content in open Dinaride populations of Illyrian savory (*Satureja subspicata* Vis.). 7th International congress of food technologists, biotechnologists and nutritionists Opatija, Hrvatska, 20 – 23. 09. 2011.

Vitali Čepo D, Ergarac D, Kendeš M, **Dragojević Müller I** (2012) Formation and bioavailability of melanoidins and ages in carob pods as affected by roasting conditions. Fifth International symposium "With food to health", Tuzla, Bosna i Hercegovina, 21 – 22. 09. 2012.

Srećec S, **Dragojević Müller I**, Erhatic R, Kremer D, Karlović K, Bolarić S, Peremin Volf T, Augustinović Z, Dujmović Prugar D, Ruščić M, Vitali Čepo D (2017) Usporedba morfoloških

svojtava mahuna i sjemenki rogača iz populacija srednjodalmatinskih otoka s osvrtom na lokalnu sortu "Komižki rogač". 3 Genetics, Plant Breeding and Seed Production 52nd Croatian and 12th international symposium on agriculture, Dubrovnik, Croatia.