

# Prostorno-genetska analiza spolnog razmnožavanja populacije kratkozupčaste kadulje (*Salvia brachyodon* Vandas) s poluotoka Pelješca

---

Horvat, Denis

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:058715>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

DENIS HORVAT

**Prostorno-genetska analiza spolnog razmnožavanja  
populacije kratkozupčaste kadulje (*Salvia  
brachyodon* Vandas) s poluotoka Pelješca**

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2020.

Ovaj rad izrađen je u laboratoriju za sistematsku botaniku i floru na Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc.dr.sc. Ivana Radosavljevića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja Magistar edukacije biologije i kemije.

## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Prostorno-genetska analiza spolnog razmnožavanja populacije kratkozupčaste kadulje (*Salvia brachyodon* Vandas) s poluotoka Pelješca**

Denis Horvat

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Kratkozupčasta kadulja (*Salvia brahyodon* Vandas) je endemična biljna vrsta iz porodice usnača (Lamiaceae), koja je uz spolno, karakterizirana i naglašenim nespolnim (klonalnim) razmnožavanjem. Ovaj diplomski rad proveden je u sklopu opsežnijeg istraživanja kojim će se provesti detaljna analiza spolnog razmnožavanja najveće populacije ove vrste, smještene na poluotoku Pelješcu (Dalmacija, Hrvatska). Za potrebe ovog rada, analizom osam mikrosatelitnih lokusa provedena je genotipizacija 245 uzoraka sjemenskog materijala porijeklom s 14 odabranih majčinskih biljaka. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na prisutnost značajne razine samooplodnje unutar istraživane populacije, dok istovremeno negativan utjecaj samooplodnje na ukupnu genetsku varijabilnost populacije nije zabilježen. Također, analizirani set sjemenki je karakteriziran razmjerno visokim razinama očekivane i uočene heterozigotnosti te alelnog bogatstva, što je u skladu s vrijednostima na razini čitave populacije dobivenima u ranijim istraživanjima. Povezanost između specifične prostorno-genetičke strukture populacije i njezinog spolnog razmnožavanja tj. zabilježenih razina samooplodnje nije utvrđena, vjerojatno zbog premalog broja analiziranih jedinki. Na posljetku, utvrđeni prosječni doseg polinatora, tj. udaljenost između donora i akceptora polena iznosi 32,3 m iz čega proizlazi zaključak da doseg oprašivača ne može predstavljati ograničavajući faktor za stranooplodnju unutar istraživane populacije.

(56 stranica, 10 slika, 5 tablica, 81 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

**Ključne riječi:** *Salvia brachyodon*, klonalnost, mikrosateliti, spolno razmnožavanje

**Voditelj:** Dr.sc. Ivan Radosavljević, doc.

**Ocjenitelji:** Dr.sc. Ivan Radosavljević, doc.

Dr. sc. Vesna Petrović Peroković izv. prof.

Dr. sc. Mirela Sertić Perić doc.

**Rad prihvaćen:** 18.06.2020.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

### **Spatial-genetic analysis of sexual reproduction of a population of a short-toothed sage (*Salvia brachyodon* Vandas) from Pelješac peninsula**

Denis Horvat

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

The short-toothed sage (*Salvia brachyodon* Vandas) is an endemic plant species from the Lamiaceae family. In addition to sexual intercourse, it is characterized and recognized by asexual (clonal) reproduction. This thesis includes a framework of extensive research that investigates and produces a detailed analysis of the plants sexual reproduction as the largest population of this species, which is located on the Pelješac peninsula (Dalmatia, Croatia). For the purpose of this work, the analysis of eight microsatellite loci was performed by genotyping 245 samples of seed material originating from 14 selected mother plants. The results of this study indicate the presence of significant levels of self-fertilization within the studied populations, while active negative self-fertilization on the total genetic variability of the population was not recorded. Also, the analyzed set of seeds was characterized by relatively high various expectations, heterozygosity and allelic richness, which is consistent with the value at the level of read populations obtained in previous studies. The association between specific spatial-genetic structures of the population and its sexual reproduction, in other words the recorded level of self-fertilization, has not been established. This is probably due to the small number of analyzed individuals. Finally, the average doses of pollinators were determined. The distance between the donor and the pollen acceptor is 32.3 m, from which it was concluded that the dose of pollinators cannot be a limiting factor for in vitro fertilization within the studied populations.

(56 pages, 10 figures, 5 tables, 81 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

**Keywords:** *Salvia brachyodon*, clonality, microsatellites, sexual reproduction

**Supervisor:** Dr. Ivan Radosavljević, Asst. Prof.

**Reviewers:** Dr. Ivan Radosavljević, Asst. Prof.

Dr. Vesna Petrović Peroković, Assoc. Prof.

Dr. Mirela Sertić Perić, Asst. Prof.

**Thesis accepted:** 18.06.2020.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Klonalno razmnožavanje kod biljaka .....	1
1.2. Entomofilija .....	3
1.3. Rod <i>Salvia</i> .....	4
1.4. <i>Salvia brachyodon</i> .....	7
1.5. Mikrosateliti kao molekularni biljezi .....	12
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>14</b>
3.1. Uzorkovanje biljnog materijala i izolacija stanične DNA .....	14
3.2. Lančana reakcija polimerazom i utvrđivanje veličine alela mikrosatelitnih lokusa .....	16
3.3. Statistička obrada podataka .....	19
3.3.1. Utvrđivanje prisutnosti klonalnih jedinki i osnovnih populacijsko-genetičkih vrijednosti .....	19
3.3.2. Utvrđivanje srodstvenih odnosa iz F <sub>1</sub> generacije .....	21
3.3.3. Korelacija .....	21
3.3.4. Utvrđivanje udaljenosti između polen donora i polen akceptora .....	22
3.4. Laboratorijska oprema i pribor .....	23
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>24</b>
4.1. Stope samooplodnje i stranooplodnje .....	25
4.2. Osnovni populacijsko–genetički pokazatelji .....	27
4.3. Prostorna analiza kratkozupčaste kadulje .....	28
4.4. Linearna korelacija između polen donora i površine kolonije .....	29
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>31</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>35</b>
<b>7. ZAHVALA.....</b>	<b>36</b>
<b>8. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>37</b>
<b>9. PRILOZI.....</b>	<b>44</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>56</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Klonalno razmnožavanje kod biljaka

Prijenos genetskog materijala s roditeljske na generaciju potomaka predstavlja osnovu nasljeđivanja živoga svijeta. Sam prijenos može se ostvariti pomoću dva osnovna modela: nespolnim i spolnim razmnožavanjem. Nespolni način razmnožavanja evolucijski je stariji, a spolni način razvio se naknadno. Spolnim razmnožavanjem omogućeno je stvaranje genetički bitno različitijih organizama, dok nespolnim načinom nastaju identični organizmi (Otto 2009, Vallejo-Marín i sur. 2010) kod kojih malobrojne genetske različitosti potječu iz rijetkih somatskih mutacija. Dok određene skupine organizama (npr. mikroorganizmi) preferiraju nespolni način razmnožavanja, kod drugih skupina (npr. većina životinja) dominantno je spolno razmnožavanje (Vallejo-Marín i sur. 2010). Istovremeno, kod većine biljaka prisutna je kombinacija oba modela (Vallejo-Marín i sur. 2010) pa je tako procijenjeno da se oko 80 % vrsta kritosjemenjača razmnožava i spolnim i nespolnim putem (Klimeš i sur. 1997).

Vegetativni način razmnožavanja poznat još i pod nazivom klonalno razmnožavanje, najčešća je vrsta nespolnog razmnožavanja biljaka pomoću vegetativnih organa (stabljike, lista, korijena). Za cijeli klonalni organizam koji stvara veliki broj genetički identičnih izdanaka (eng. *ramets*, u daljnjem tekstu: izdanci), a izvorno je nastao spolnim razmnožavanjem, tj. iz oplodene jajne stanice te je karakteriziran jedinstvenim genotipom, u daljnjem tekstu će se koristiti termin „jedinka“ (eng. *genet*). Izdanci nastali nespolnim načinom razmnožavanja sposobni su samostalno rasti i dalje se razmnožavati (Vallejo-Marín i sur. 2010). Nespolni način razmnožavanja ima brojne prednosti u uvjetima koji nisu pogodni za spolni način. Tako npr. prisutnost polinatora, okolišni faktori nužni za uspješno cvjetanje, razvijanje plodova, klijanje sjemenki ili razvoj klijanaca nisu ograničavajući elementi kao što je to slučaj kod spolnog razmnožavanja (Barrett 2015, Silvertown 2008). Sposobnost jedinki da koriste potrebne resurse u heterogenim okruženjima, raspodjela rizika od smrti između izdanaka i mogućnost različitih stupnjeva integracije i podjele funkcija među izdancima, jedne su od prednosti ovog načina razmnožavanja (Caraco i Kelly 1991, Vallejo-Marín i sur. 2010). Geitonogamija, kao tip oprašivanja uslijed kojeg dolazi do prijenosa polena između cvjetova iste jedinke, često je prisutna kod klonalnih vrsta. Istraživanja provedena na vrsti *Decodon verticillatus* pokazala su da je u prosjeku 30 % stvorenih sjemenki rezultat samooplodnje, od čega je 28 % sjemenki rezultat geitonogamije (Eckert i Barrett 1994, Vallejo-Marín i sur. 2010). Dodatna saznanja o povezanosti geitonogamije i klonalnosti je pružilo istraživanje provedeno na vrsti *Aconitum*

*kusnezoffii* (Liao i sur. 2009) kojim je utvrđeno da na razini jedinke, prisutnost više cvjetova rezultira stvaranjem manjeg ukupnog broja plodova i sjemenki, kao i relativno manjeg broja sjemenki po pojedinom cvijetu. Međutim, imajući na umu da se populacije tipično sastoje od velikog broja jedinki, u konačnosti klonalna ekspanzija rezultira nastankom više cvjetnih izdanaka te većom reproduktivnom sposobnošću (Vallejo-Marín i sur. 2010). Nadalje, uočeno je da je kod nekih vrsta karakteriziranih intenzivnim klonalnim razmnožavanjem prisutan potpuni izostanak bilo kakvog oblika spolnog razmnožavanja. Međutim, tek je rijetkim istraživanjima utvrđeno da gubitak seksualnosti u podlozi može imati genetičku osnovu (Dorken i sur. 2004), dok je puno češći uzrok ovoj pojavi izloženost promatrane populacije okolišnim faktorima krajnje nepogodnima za spolno razmnožavanje (npr. Salisbury 1942, Barrett i sur. 1993) ili izostanak jedinki suprotnog spola, a što se često javlja kod dvodomnih biljaka prilikom kolonizacije novih prostora (Barrett i sur. 2008).

Jedna od posljedica klonalnog razmnožavanja je i ta što broj izdanaka u populaciji ne odražava stvaran broj jedinki. Odnos između tih dviju veličina ukazuje na stupanj klonalnosti u promatranoj populaciji (Vallejo-Marín i sur. 2010). S jedne strane spektra, pojedine naizgled velike populacije se mogu sastojati od samo jedne jedinke ili tek nekoliko njih i velike množine njihovih genetski identičnih izdanaka, čineći tako populaciju iznimno genetički siromašnom, te izloženu povećanom riziku od izumiranja. Istovremeno, na drugom se kraju spektra nalaze populacije iznimne genotipske varijabilnosti u kojima je klonalnost jedva prisutna te kod kojih zabilježen broj izdanaka značajno ne odstupa od ukupnog broja genotipova (Burke i sur. 2000, Ruggiero i sur. 2005). Stoga je prepoznavanje razine klonalnosti od iznimnog značenja, posebno prilikom planiranja i provedbe konzervacijskih aktivnosti na ugroženim i rijetkim biljnim vrstama.

Osim veličine klona, na spolno razmnožavanje utječe i prostorni raspored izdanaka različitih jedinki poznat kao klonalna arhitektura. Biljke koje se vegetativno razmnožavaju pomoću struktura koje se ne mogu lako rasprostranjivati, ili koje nastaju relativno blizu matične biljke (npr. gomolji ili podanci) očekivano imaju visoku razinu prostorne grupiranosti izdanaka. Takvo usko grupiranje izdanaka koje isključuje druge jedinke naziva se falang strategija (eng. *phalanx*). Suprotno tome, vrste koje se razmnožavaju pomoću vriježa i bulbila vjerojatno će imati znatno manje izraženo prostorno grupiranje izdanaka tj. genetički identičnih jedinki. Takva strategija karakterizirana većim stupnjem prostorne udaljenosti između izdanaka naziva se gerila strategija (eng. *guerrilla*) (Vallejo-Marín i sur. 2010). Kako pojedina strategija utječe na spolno razmnožavanje još je uvijek diskutabilno i bez mnogo konkretnih dokaza, tj.



istraživanja koja su se time bavila, no za očekivati je da će geitonogamija biti zastupljenija kod onih vrsta kod kojih je dominantna falang strategija klonalnog razmnožavanja (Charpentier 2002).

## 1.2. Entomofilija

Prijenos polena na njušku tučka unutar istog cvijeta ili s jednog cvijeta na drugi unutar iste biljke ili između različitih jedinki, važna je sastavnica spolnog načina razmnožavanja. Pritom, velik doprinos daju brojne životinjske vrste koje omogućuju prijenos polena kod iznimno velikog broja biljnih vrsta. Uz abiotske tipove oprašivanja (npr. vjetrom), entomofilija i ornitofilija pretpostavljeni su glavni načini oprašivanja kod većine kritosjemenjača (Nikolić 2013).

Unutar osjetila vida, kod mnogih vrsta kukaca razvile su se strukture koje omogućuju prepoznavanje ultraljubičaste (UV) svjetlosti. Cvjetni elementi izloženi sunčevom svjetlu reflektiraju zračenje u UV dijelu spektra te zahvaljujući razvijenim prilagodbama za njegovu detekciju, oprašivači ih iznimno lako uočavaju. Zahvaljujući tome, oprašivači razlikuju latice i ostale strukture te uspješnije dolaze do polena i nektara, a time ostvaruju prijenos polena, tj. oprašivanje (Menzel i Backhaus 1989, Cuthill i sur. 2000). Nadalje, poznato je kako brojni oprašivači ostavljaju tragove lipidnog i/ili ugljikohidratnog sastava kutikule prilikom obilaženja cvjetova. Svaka vrsta ili manja populacija unutar iste vrste ima specifičan trag što signalizira ostalima da je cvijet bio već posjećen (Goulson i sur. 1998, Goulson i sur. 2000, Goulson i sur. 2001). Istraživanje provedeno na vrstama *Lamium maculatum* L. i *Bombus pascuorum* (Scopoli, 1763) (Eltz 2006) je pokazalo kako bumbari pasivno obilježavaju cvijet koji oprašuju ugljikohidratnim tragovima na način da prilikom slijetanja na cvijet dio kutikule i dlačica koje imaju po tijelu otpadne. Na takav način ostale jedinke znaju da je taj cvijet bio posjećen od strane druge jedinke iste vrste te ga neće posjetiti određeno vrijeme. Sličan obrazac ponašanja i obilježavanja tragovima utvrđen je i kod pčela (Willmer 2011).

Različite vrste oprašivača karakterizirane su specifičnim dometima leta, tj. udaljenostima koje prelaze u potrazi za polenom i nektarom. Manje pčele imaju manji domet letenja u odnosu na veće, a što je površina koju zauzimaju biljke bogate nektarom veća to je domet letenja manji (Ne'eman i Dafni 1999). Solitarne pčele, ovisno o vrsti, maksimalno lete u rasponu od 150 do 600 m (Gathmann i Tschardt 2000) udaljenosti od svoje kolonije. S druge strane, medonosne pčele i bumbari imaju puno veći domet letenja (Delaplane i Mayer 2000, Beekman i Ratnieks 2000, Wolf i Moritz 2008). Također, za veće populacije očekivana je veća posjećenost kukcima što pogoduje oplodnji u odnosu na manje populacije (Sih i Baltus

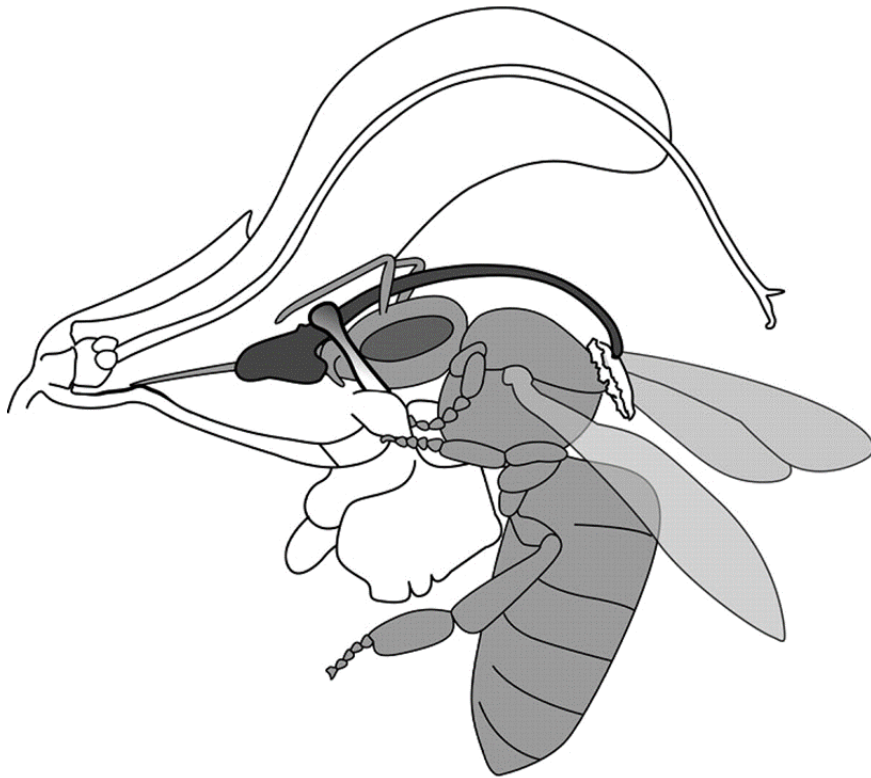
1987, Ågren 1996). Međutim, veličina populacije ne mora nužno značiti i slabiju reprodukcijску uspješnost jedinke (Mustajärvi i sur. 2000).

### 1.3. Rod *Salvia*

Ljekovita svojstva brojnih predstavnika iz roda *Salvia* poznata su još od davnina pa tako i sam naziv roda potječe od latinske riječi *salvare* - spasiti ili od riječi *salvus* - zdrav. Rod pripada porodici Lamiaceae - usnače i broji oko 900 vrsta te je rasprostranjen kozmopolitski. Na prostorima središnje Azije i Europe nalazimo oko 250 vrsta, istočne Azije oko 90 vrsta, Sjeverne i Južne Amerike oko 530 vrsta te oko 30 vrsta u Africi (Walker i sur. 2004). Unutar roda možemo pronaći jednogodišnje, dvogodišnje i višegodišnje vrste koje se razlikuju po zeljastoj ili drvenastoj stabljici. Cvjetovi su zigomorfni, različitih boja ovisno o vrsti te mogu formirati različite cvatove (Nikolić 2013). Andrecej se sastoji od dva prašnika koji oblikuju mehanizam poluge karakterističan za rod *Salvia*, što doprinosi oprašivanju kukcima. Međutim, unutar roda sama morfologija prašnika razlikuje se između vrsta te nije nužno specijalizirana na određenu skupinu oprašivača (Wester i Clasen-Bockhoff 2007). Donedavno su brojni znanstvenici smatrali da je jedinstveni oprašivački mehanizam ključan za specijaciju roda *Salvia* i time tumačili monofiletsko porijeklo toga roda. Međutim, kasnija filogenetska istraživanja (Walker i sur. 2004; Walker i Sytsma, 2007) pokazala su kako je taj mehanizam evoluirao nezavisno više puta, čime je dokazano da se radi o polifiletskoj skupini. Navedeno vrijedi za cijeli rod *Salvia*, dok se istovremeno smatra da su europski predstavnici roda monofiletskog podrijetla (Walker i sur. 2004; Walker i Sytsma, 2007).

Mehanizam poluge detaljno je opisan kod europske vrste *Salvia pratensis* L. (Claßen-Bockhoff i sur. 2003, Reith i sur. 2007) te se sastoji od tri osnovna koraka: 1) aktivacija poluge od strane oprašivača, 2) stanje mirovanja u kojoj oprašivač crpi nektar iz cvijeta te 3) vraćanje poluge u početnu poziciju (odlazak oprašivača). Oprašivači u potrazi za nektarom slijeću na cvijet te se koriste donjom usnom vjenčića kao uporištem. Prilikom tog slijetanja dorzalna strana toraksa oprašivača dolazi u doticaj s dvokrpastom njuškom tučkom na koju se odlaže polen prethodno pokupljen s drugog cvijeta (Reith i sur. 2007, Herrel i sur. 2006). Uvođenjem glave s proboscisom u cijev vjenčića dolazi do pomicanja poluge (Slika 1.) (Habdija i sur. 2011). Međutim, zbog same morfologije cvijeta, a pogotovo suženja cijevi vjenčića, veći dio glave oprašivača ne može ući te se time biljka osigurava da oprašivač ne može otuđiti sav nektar. Također, sila koju je potrebno uložiti da bi se pomaknula poluga i sam oprašivač došao do nektara selektirajući je faktor za brojne potencijalne oprašivače (Herrel i sur. 2006). U drugom koraku oprašivanja polenovnice dodiruju dorzalnu stranu toraksa te se pritom prenose peludna

zrnca na oprašivača (Reith i sur. 2007). Na taj način osiguran je prijenos polena s jednog cvijeta na drugi i time je smanjena vjerojatnost samooplodnje na razini cvijeta. Međutim, valja spomenuti kako je kod ornitofilnih vrsta roda *Salvia* došlo do redukcije mehanizma poluge, a kod nekih i do potpunog nestanka (Wester i Claßen-Bockhoff 2006). Procijenjeno je da se unutar roda oko 20 % vrsta i to pretežito onih koje nalazimo na nadmorskim visinama od 1500 - 3000 m oprašuje pticama (Wester i Claßen-Bockhoff 2006, Wester i Claßen-Bockhoff 2007).



**Slika 1.** Prikaz mehanizma poluge u interakciji između oprašivača (pčele) i cvijeta vrste livadne kadulje - *Salvia pratensis* (slike preuzete iz Reith i sur. 2007, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2735310/> pristupljeno 20.03.2020.)

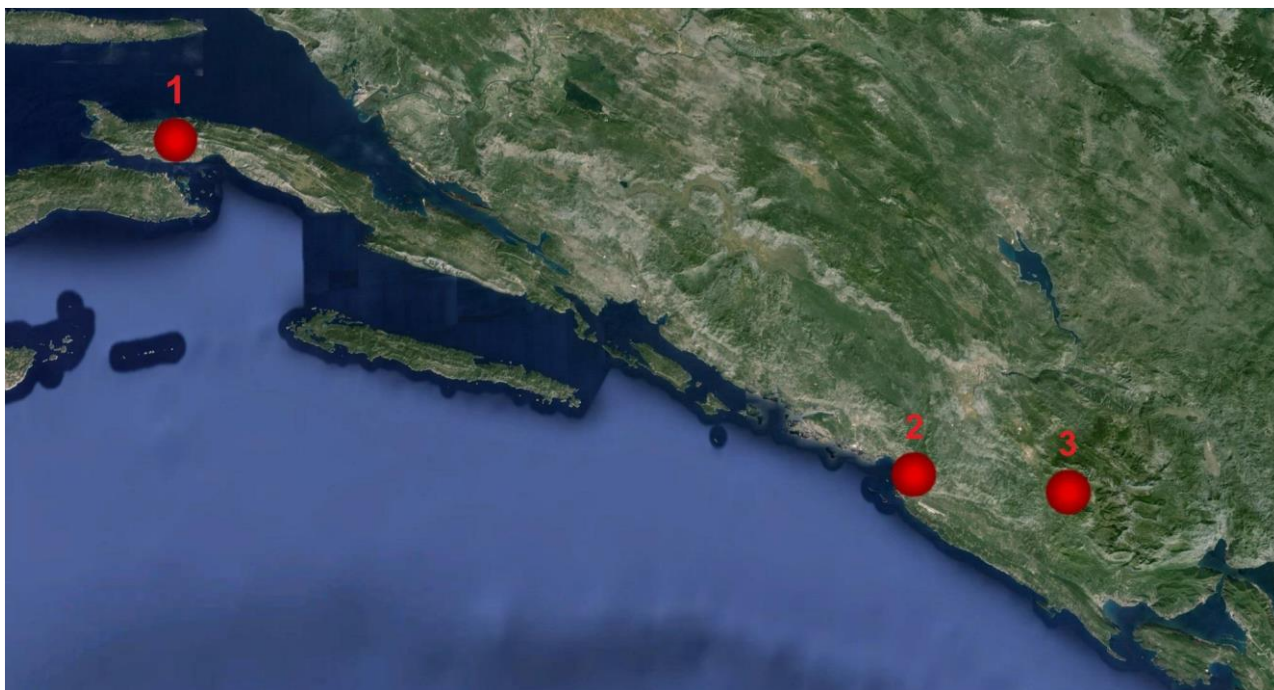
Europske vrste roda *Salvia* poznate su po entomofiliji kao pretpostavljenom osnovnom tipu spolnog načina razmnožavanja. Sama morfologija cvijeta kadulja upućuje na specijaliziranost oprašivanja koje je posljedica dugotrajne koevolucije s oprašivačima (Huck 1992). Kao potencijalno važni oprašivači uzimaju se u obzir pčele i bumbari koji su vrlo značajni oprašivači za mnoge biljne vrste unutar porodice Lamiaceae i za sam rod *Salvia* (Herrel i sur. 2006).

#### **1.4. *Salvia brachyodon***

Kratkozupčasta kadulja, *Salvia brachyodon* Vandas (Vandas 1899) je u našim krajevima poznata i pod nazivima kratkozupčasta žalfija, veliki krstac, crni pelin itd. (Nikolić 2015). U graničnom području Bosne i Hercegovine te Crne Gore, točnije na planini Orjen (Slika 2.), Karl Vandas je otkrio vrstu 1899. godine. Dolomitno-vapnenačko plitko tlo planine Orjen i rubovi termofilnih šuma te šikara, područja su na kojima raste lokalna populacija *Salvia brachyodon* (Abadžić i Šilić 1982). S druge strane, na poluotoku Pelješcu (Slika 2.) 1904. godine E. Brandis pronalazi istu vrstu, na zaravni jugozapadno od vrha Sv. Ilije, na visini od oko 900 m n.v. Nalaz iz 1904. godine prvi spominje L. Keller (1915) u svom radu *Doprinos otočnoj flori Dalmacije* te spominje tradicionalni naziv veliki krstac.

Dolomitno-vapnenačka podloga karakterizira i poluotok Pelješac gdje na plitkom, a ponekad i nešto više humusom bogatijem tlu raste populacija kratkozupčaste kadulje. Osim na izloženom prostoru bez visoke vegetacije, dijelovi njezine populacije prisutni su i u svijetlim šumama dalmatinskog bora, *Pinus nigra* L. (Trinajstić 1986). Požari koji su na području Mediterana česta i uobičajena prirodna pojava, pogoduju rasprostranjivanju kratkozupčaste kadulje jer onemogućuju prevladavanje šumske vegetacije te pospješuje održavanje staništa otvorenog tipa koje ova vrsta preferira (Barbalić 1956).

S tek tri poznate populacije, kratkozupčasta kadulja je endemska i jedna od najrjeđih vrsta dinarskog krša. Ekološka sukcesija prisutna na lokalitetima gdje raste, doprinosi ugroženosti kratkozupčaste kadulje te se ona može smatrati vrstom visokog rizika od izumiranja (Radosavljević i sur. 2012). Međutim, neopravdano je službeno kategorizirana tek kao gotovo ugrožena vrsta (NT) (Nikolić i sur. 2015).



**Slika 2.** Geografski položaj triju nalazišta populacija kratkozupčaste kadulje; 1- poluotok Pelješac, 2- Konavle, 3- planina Orjen

Kratkozupčastu kadulju karakterizira uspravna, četverbridna stabljika cvata koja u donjim dijelovima poprima bijelo vunasto dlakavi pokrov koji postepeno prema vršku gubi na dlakavosti. Višegodišnja je biljka čiji listovi tvore rozetu, a cvat se tijekom ljetnih mjeseci razvija iz pojedinih izdanaka. Listovi mogu narasti 6-14 cm u dužinu i 1,5-4 cm u širinu čija se nerazdijeljena ili perasto razdijeljena plojka nalazi na dugoj lisnoj peteljci (Šilić 1984). Mladi listovi su na licu slabo dlakavi, nemaju istaknute žile, a na naličju gusto dlakavi. Stari listovi su kožasti i oskudnije dlakavi. Vrsta je heliofit te raste u obliku niskog i gustog polugrma (Šilić 1984).

Cvat čini rahlocvjetna metlica sastavljena od 2 do 5 cvijeta izražene zigomorfne simetrije (Slika 3.). Čaška je dvousnata i smještena na četinjastoj cvjetnoj stapci, cjevasto-zvonolikog oblika s izraženim žilama i dužine oko 9 mm. Zupci čaške međusobno su gotovo jednaki, široko trokutastog oblika te na vrhu ušiljeni. Vjenčić je sinpetalan, blijedoružičasti sa žljezdastim dlakama te dužine od 35 do 45 mm (Barbalić 1956, Šilić 1984). Gornja usna vjenčića gotovo je ravna, a donja (veća usna) izgrađena od tri krpasta dijela (Barbalić 1956). Andrecej se sastoji od dva fertilna prašnika s kratkim filamentima, koji formiraju haplostemon te su sastavnici karakterističnog mehanizma oprašivanja (mehanizam poluge) za rod *Salvia*. Još jednu sastavnicu mehanizma čini i ginecej koji je sinkarpan, drugim riječima svi plodni listovi

formiraju jedan tučak (Nikolić 2013), građen od dva plodna lista te u odnosu na cvjetište nadrastao (Šilić 1984, Nikolić 2017).

Prethodno provedenim istraživanjima na ovoj vrsti (Liber i sur. 2014, Radosavljević i sur. 2015a, Radosavljević i sur. 2015b, Radosavljević i sur. neobjavljeni rezultati) utvrđeno je kako je uz spolno, kod nje prisutno i klonalno razmnožavanje podzemnim stolonima (Slika 4.). Podzemni stoloni predstavljaju tip podzemne stabljike s adventivnim korijenjem što vrsti omogućava osvajanje dodatnog životnog prostora te stvaranje velikog broja fertilnih izdanaka (Nikolić 2017). Posljedično, nastaju klonalne kolonije koje se u prirodnim populacijama mogu jasno prepoznati (Slika 5. i 6.). Vezano za spolno razmnožavanje, tijekom brojnih, ranije provedenih terenskih istraživanja prirodnih populacija kratkozupčaste kadulje (Radosavljević i sur. neobjavljeni rezultati) koja sadržajno nisu dio ovog diplomskog rada, bumbari (*Bombus terrestris* (Linné, 1758)), medonosne pčele (*Apis mellifera* (Linné 1758)), kao i brojne vrste solitarnih pčela su prepoznati kao potencijalni oprašivači ove vrste.





**Slika 3.** *Salvia brachyodon*; cvijet (fotografija: Ivan Radosavljević)



**Slika 4.** *Salvia brachyodon*; struktura kolonije gdje se jasno uočava mehanizam klonalnog razmnožavanja podzemnim stolonima (fotografija: Ivan Radosavljević)





**Slika 5.** *Salvia brachyodon*; tipična kolonija u prirodnom staništu (fotografija: Ivan Radosavljević)



**Slika 6.** *Salvia brachyodon*; pogled na istraživanu populaciju s Pelješca (fotografija: Ivan Radosavljević)

## 1.5. Mikrosateliti kao molekularni biljezi

U posljednjih nekoliko desetljeća mikrosateliti su postali jedni od najpopularnijih molekularnih biljega. Mikrosateliti ili jednostavne ponavljajuće sekvence (SSR - *Simple Sequence Repeats*) su ponavljajući motivi od 1 do 6 nukleotida. Mikrosatelitne regije zastupljene su i u kodirajućim i nekodirajućim regijama prokariotske i eukariotske DNA te mogu biti velike i do nekoliko stotina nukleotida (Zane i sur. 2001). Zbog jednostavnosti primjene, kodominantnosti, visoke razine informativnosti, pouzdanosti i ponovljivosti, SSR biljezi koriste se u različitim tipovima populacijsko-genetičkih istraživanja (Varshney i sur. 2004). Široku primjenu imaju u mnogim područjima genetike uključujući konzervacijsku i populacijsku genetiku, molekularno oplemenjivanje, utvrđivanje očinstva i druga područja (Oliveira i sur. 2006). Visoke stope mutacije u mikrosatelitnim regijama, koje variraju u rasponu od  $10^{-2}$  do  $10^{-6}$  po lokusu po generaciji, čini ih iznimno varijabilnima, a samim time i vrlo informativnima što je od velike važnosti za populacijsko-genetička istraživanja (Sia i sur. 2000, Radosavljević 2012). Međutim, njihov najveći nedostatak je što su specifični za pojedinu vrstu. Mikrosatelitni biljezi razvijeni za određenu vrstu se ne mogu primijeniti u istraživanjima na drugoj vrsti, osim tek ponekad i to samo u slučaju kada se radi o blisko srodnim svojstama (npr. Miah i sur. 2013, Radosavljević i sur. 2019). Iz tog razloga moraju biti karakterizirani *de novo* za sve vrste na kojima se planiraju primijeniti po prvi put (Zane i sur. 2002). Proces razvoja novih mikrosatelitnih početnica je metodološki zahtjevan te uz znatnu laboratorijsku stručnost podrazumijeva i utrošak značajnijih financijskih sredstava. Međutim, jednom konstruirane PCR početnice, omogućuju jednostavno umnožavanje mikrosatelitnih regija lančanom reakcijom polimeraze (Greguraš 2013).



## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Analizom osam polimorfnih mikrosatelitnih lokusa na odabranom setu uzoraka kratkozupčaste kadulje s poluotoka Pelješca, ovim diplomskim radom žele se utvrditi: (1) razine samooplodnje i stranooplodnje istraživane populacije, (2) prosječne udaljenosti prijenosa polena unutar istraživane populacije, tj. domet aktivnih polinatorskih vrsta, (3) moguća povezanost veličine jedinki s razinama samooplodnje/stranooplodnje, te (4) postoji li utjecaj prostorno-genetičke strukture na spolno razmnožavanje unutar istraživane populacije.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Uzorkovanje biljnog materijala i izolacija stanične DNA

U sklopu većeg istraživanja kojim se ovaj diplomski rad sadržajno ne bavi, na poluotoku Pelješcu 2018. godine prikupljena je ukupno 1541 sjemenka porijeklom s 320 majčinskih biljaka kratkozupčaste kadulje. U sklopu ovoga rada, izdvojen je uzorak od 245 sjemenki porijeklom s 14 majčinskih biljaka. Prilikom uzorkovanja, sjemenke nisu posebno tretirane, dok je lisno tkivo s majčinskih biljaka stavljeno u silika gel radi brzog isušivanja. Prilikom uzorkovanja biljnog materijala, za svaku majčinsku biljku, odnosno izdanak s kojeg je sjeme prikupljeno, određen je prostorni smještaj unutar internog koordinatnog sustava. Interni koordinatni sustav na razini cijele populacije konstruiran je korištenjem brojnih mehaničkih pomagala poput pletenih mreža površine 5 x 5 m, mjernih metara različitih duljina, laserskih mjernih instrumenata itd.

DNA iz svih uzoraka izolirao sam pomoću izolacijskog kompleta *GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)*. Pojedinu sjemenku usitnio sam uređajem *Tissuelyser (QIAGEN)*. Nakon usitnjavanja, u mikroeprevete dodao sam dvije otopine za razgradnju biljnih stanica: 350 µL otopine A (*Lysis Solution A*) i 50 µL otopine B (*Lysis Solution B*). Sadržaj mikroepreveta temeljito sam promiješao vorteksom. Zatim sam uzorke kroz 10 minuta inkubirao na 65 °C u grijačem bloku, uz povremeno miješanje. U tom koraku izolacije DNA odvija se razgradnja stanica i neutralizacija enzima koji bi potencijalno mogli oštetiti genomsku DNA.

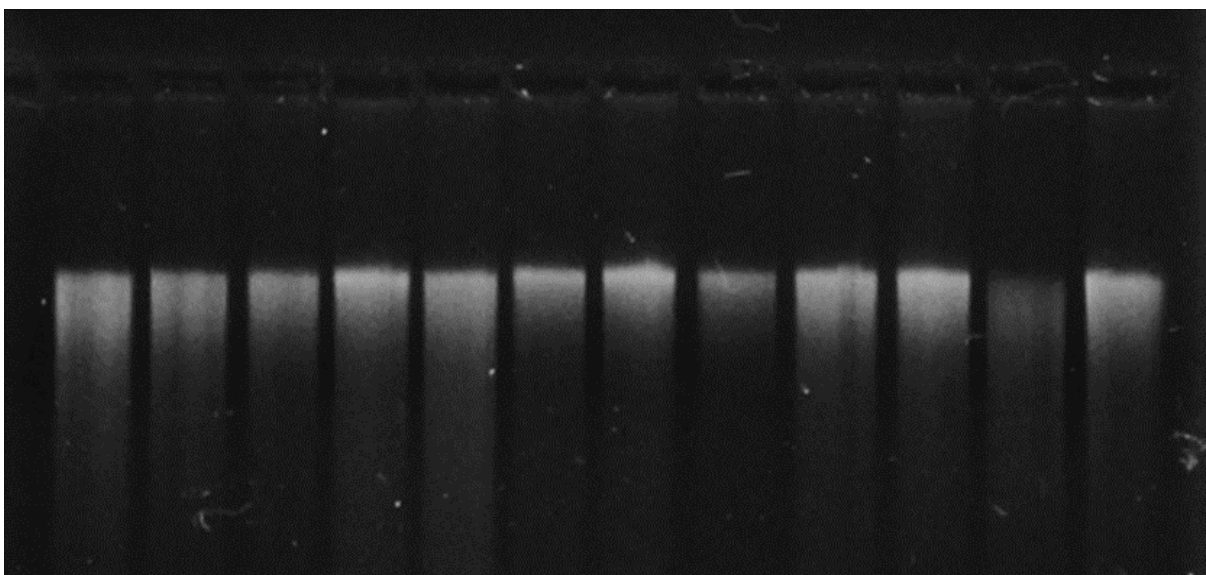
Nakon toga, u svaku mikroeprevetu dodao sam po 130 µL otopine za taloženje mehaničkih ostataka (*Precipitation solution*), uzorke sam ponovno dobro promiješao te inkubirao na -20 °C sljedećih 5 minuta u zamrzivaču. Kako bi se dodatno istaložilo biljno tkivo, uzorke sam centrifugirao brzinom od 15 000 okr./min u trajanju od 5 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant sam otpipetirao u posebnu filtracijsku kolonu te ponovo centrifugirao brzinom 15 000 okr./min kroz 1 minutu. Nakon ovog koraka zaostali dijelovi biljnog materijala prikupljeni na filtracijskoj koloni sam bacio, dok DNA ostaje u vodenom sloju. U uzorke sam potom dodao 700 µL otopine za vezanje DNA (*Binding Solution*). Istovremeno, za prihvatanje DNA pripremio sam i druge kolone na način da se u njih dodaje 500 µL za to predviđenog pufera (*Column Preparation Solution*), nakon čega slijedi centrifugiranje na 10 000 okr./min u trajanju od 1 minute. Puffer se baca, a na kolone dodao sam ranije pripremljenu otopinu DNA. Nakon centrifugiranja (15 000 okr./min, 1 minutu), DNA se

očekivano nalazi vezana na koloni. U sljedećem koraku, kolone s DNA sam dva puta isprao sa za to predviđenim puferom (*Wash Solution*) uz centrifugiranje na 15 000 okr./min kroz 1 minutu. U posljednjem koraku izolacije DNA, kolone sam prebacio u nove mikroeprevete od 1,5  $\mu$ L te im dodao na 65 °C ugrijanu otopinu TE pufera (*Elution Solution*). Završnim centrifugiranjem (15 000 okr./min, 1 min) DNA se ispire s kolone te prelazi u otopinu TE pufera čime je njezina izolacija završena. Na taj način dobivena otopina DNA je vrlo visoke čistoće i spremna za dugotrajnu pohranu na temperaturi od -20 °C.

Isti postupak izolacije DNA koristio sam i prilikom izolacije DNA iz lisnog materijala majčinskih biljaka uz napomenu da je korišteno po 25 mg liofiliziranog tkiva.

Za sve izolate, odredio sam koncentraciju i čistoću DNA izolata spektrofotometrijskom metodom uz korištenje uređaja IMPLEN P330. Razina degradiranosti DNA utvrđena je pomoću elektroforeze na agaroznom gelu (Slika 7.). Ovisno o veličini DNA fragmenata, tijekom elektroforeze dolazi do razdvajanja DNA molekula unutar električnog polja koje je uspostavljeno na agaroznom gelu (Johansson 1972). Nakon tog koraka, gel je uronjen u otopinu boje GelRed™ (Biotinum®) kako bi se kasnije DNA fragmenti mogli detektirati pod UV svjetlom.

Nakon što sam utvrdio koncentraciju DNA u uzorcima, slijedilo je njihovo razrjeđivanje na koncentraciju od 1 ng/ $\mu$ L u svrhu njihova umnožavanja lančanom reakcijom polimeraze (PCR). Izmjerene koncentracije DNA, korišteni volumeni vode i izolirane DNA za dobivanje otopina DNA prikladne koncentracije prikazani su u Prilogu 1.



**Slika 7.** Elektroforeza ukupne stanične DNA izolirane iz 12 sjemenki kratkozupčaste kadulje

### 3.2. Lančana reakcija polimerazom i utvrđivanje veličine alela mikrosatelitnih lokusa

PCR (Polymerase Chain Reaction) ili lančana reakcija polimeraze jeftina je i pouzdana metoda koja se koristi za umnažanje željenog dijela DNA molekule. Kako bismo mogli umnožiti DNA regiju od interesa, potrebno je raspolagati početnicama, kratkim oligonukleotidnim fragmentima koji su komplementarni DNA fragmentima smještenima ispred i iza DNA regije koja se želi umnožiti. Vezanje početnica za DNA omogućuje polimerazi sintezu novih komplementarnih lanaca pridodajući odgovarajuće deoksiribonukleotide (dNTP-ove). DNA polimeraza mora biti stabilna na visokim temperaturama jer bi u protivnom nastupila njezina denaturacija te se stoga najčešće koristi oblik izoliran iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* od kuda i potječe naziv *Taq* DNA polimeraza. PCR se provodi u više ciklusa, a svaki ciklus sastoji se od tri osnovna koraka: 1) razdavanje komplementarnih lanaca DNA pod utjecajem povišene temperature, 2) vezanje početnica za DNA i 3) sinteza komplementarnih DNA lanaca posredstvom *Taq* DNA polimeraze. (Lorenz 2012).

Za umnažanje osam mikrosatelitnih lokusa kratkozupčaste kadulje metodom PCR pripremio sam reakcijsku smjesu ukupnog volumena 20  $\mu\text{L}$  sljedećeg sastava:

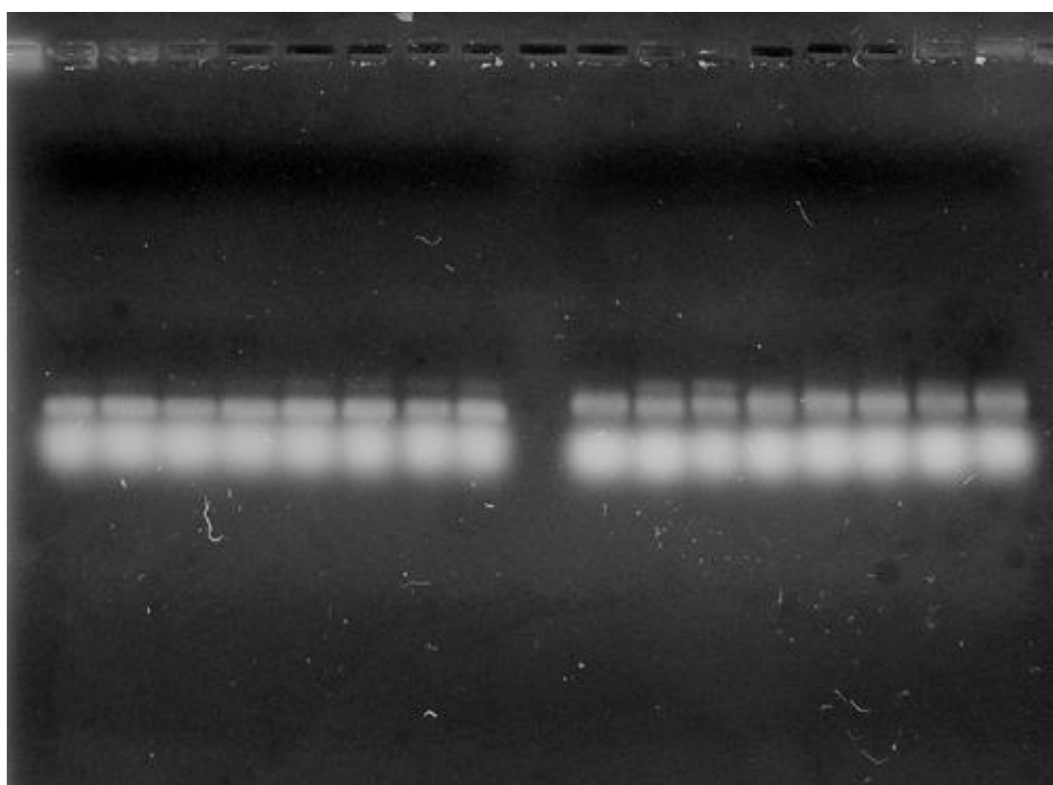
- 5,35  $\mu\text{L}$  deionizirane vode
- 2  $\mu\text{L}$  10x PCR pufer (TAKARA)
- 1,60  $\mu\text{L}$  otopine deoksiribonukleotida (dNTP)  $c=0,2 \text{ mmol/dm}^3$
- 0,15  $\mu\text{L}$  otopine TAIL FOR primer
- 0,4  $\mu\text{L}$  otopine TAIL REV primer
- 0,4  $\mu\text{L}$  otopine M13 primer
- 0,1  $\mu\text{L}$  *Taq* HS *polymerase* (Takara, Bio Inc)
- 10,0  $\mu\text{L}$  otopine DNA uzorka

Za lančanu reakciju polimeraze koristio sam uređaj GeneAmp® PCR System 9700 (*Applied Biosystems*) prema sljedećem protokolu:

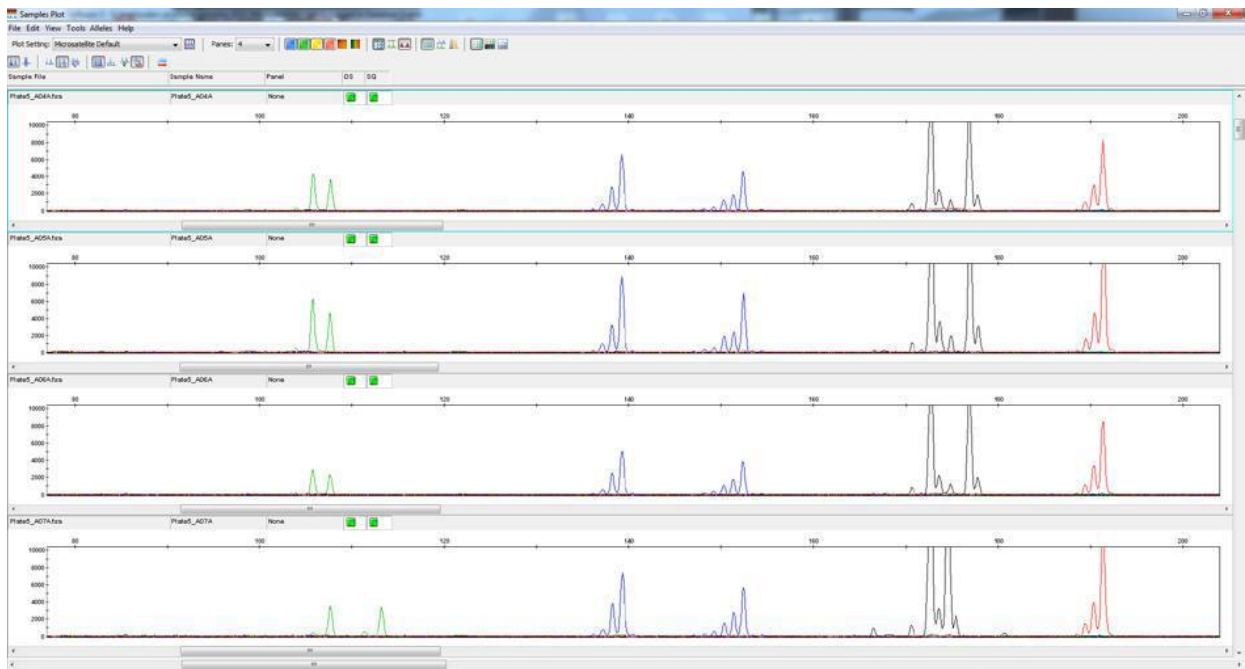
- 94 °C kroz 5 minuta
- 5 ciklusa od 45 s na 94 °C, 30 s na 60 °C, uz snižavanje temperature u svakom od preostala 4 ciklusa za 1 °C, 90 s na 72 °C
- 25 ciklusa od 45 s na 94 °C, 30 s na 55 °C i 90 s na 72 °C
- 8 min na 72 °C

PCR metodom umnoženo je osam polimorfnih mikrosatelitnih lokusa: SoUZ001, SoUZ002, SoUZ004, SoUZ005, SoUZ006, SoUZ007, SoUZ011, SoUZ014.

Za provjeru prisutnosti umnoženih mikrosatelitnih lokusa nakon provedene lančane reakcije polimeraze, ponovno je korištena elektroforeza (Slika 8.). Uzorci kod kojih je na agaroznom gelu potvrđeno uspješno umnažanje mikrosatelitnih lokusa poslani su na detekciju veličine umnoženih fragmenata kapilarnom elektroforezom pomoću uređaju ABI3130xl Genetic Analyzer (Macrogen (Seoul, Južna Koreja)). Rezultati svih analiziranih uzoraka dalje sam pregledavao i analizirao pomoću računalnog programa GeneMapper 5.0 (*Applied Biosystems*) gdje sam očitavao veličinu alela (Slika 9.).



**Slika 8.** Utvrđivanje uspješnosti lančane reakcije polimeraze pomoću elektroforeze za 16 uzoraka kratkozupčaste kadulje.



**Slika 9.** Utvrđivanje veličine alela za četiri uzorka u računalnom programu GeneMapper 5.0, za lokuse SoUZ006, SoUZ007, SoUZ011 i SoUZ014. Veličina pojedinog alela izražena kao broj parova baza očitava se sa x-osi. Gornja tri uzorka imaju zajednički genotip što je vidljivo iz prikaza, dok je genotip donjeg, 4. uzorka jedinstven.



### 3.3. Statistička obrada podataka

#### 3.3.1. Utvrđivanje prisutnosti klonalnih jedinki i osnovnih populacijsko-genetičkih vrijednosti

Za utvrđivanje eventualne prisutnosti klonalnosti na razini uzorkovanih majčinskih biljaka kratkozupčaste kadulje koristio sam R paket RClone (Bailleul i sur. 2016), naredba *mlg\_tab* (*Table of MultiLocus Genotypes*).

Informacijski sadržaj polimorfizma (*PIC*) (Botstein i sur. 1980) predstavlja razinu informativnosti pojedinog lokusa te se procjenjuje na temelju sljedeće jednadžbe:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^I p_i^2 - 2 \sum_{i=j+1}^I p_i^2 \sum_{j=1}^{I-1} p_j^2 p_j^2$$

Pri čemu je:

$p_i$  - učestalost alela  $i$ ,

$p_i^2 \times p_j^2$  - umnožak kvadratne učestalosti za svaki par alela,

$I$  - ukupan broj alela.

U svrhu utvrđivanja informacijskog sadržaja polimorfizma koristio sam računalni program Cervus (Kalinowski i sur. 2007).

Osnovne populacijsko-genetičke parametre utvrdio sam pomoću računalnog paketa GenAlEx (Peakall i Smouse 2012). Utvrđen je prosječan broj alela po lokusu ( $N_a$ ), alelna bogatstvo ( $N_{ar}$ ), zapažena heterozigotnost ( $H_0$ ), očekivana heterozigotnost ( $H_e$ ) (Nei 1978) te koeficijent samooplodnje ( $F_{IS}$ ) (Wright 1931). Alelna bogatstvo predstavlja prosječan broj alela u populaciji neovisno o veličini uzorka. Vrijednost alelnog bogatstva se procjenjuje na temelju sljedeće jednadžbe:

$$N_{ar} = \sum_{i=1}^{n_i} \left[ 1 - \frac{\binom{2N - N}{n_i}}{\binom{2N}{2n}} \right]$$

Pri čemu je:

$N$  – broj uzorkovanih jedinki,

$2N$  – broj uzorkovanih alela,

$N_i$  – broj alela  $i$  u populaciji,

$n$  – broj poduzorkovanih jedinki (veličina najmanjeg uzorka u analizi),

$2n$  – broj poduzorkovanih alela.

Vrijednost zapažene heterozigotnosti ukazuje na udio heterozigotnih jedinki u populaciji, dok očekivana heterozigotnost predstavlja vjerojatnost da nasumičnim odabirom odaberemo dva međusobno različita alela unutar jedne populacije. Očekivana heterozigotnost određuje se pomoću nepristrane formule po Neiju (Nei 1978),:

$$H_E = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{i=1}^I p_i^2 - \frac{H_0}{2n} \right)$$

Pri čemu je:

$H_E$  – nepristrana genetička raznolikost po Neiju,

$n$  – veličina uzorka,

$p_i$  = učestalost alela  $i$  u populaciji,

$I$  – ukupan broj alela,

$H_0$  – zapažena heterozigotnost.

Fiksacijski indeks (Wright 1931) je poznat i pod nazivom koeficijent samooplodnje ( $F_{IS}$ ) te pokazuje u kojoj je mjeri prisutno križanje između blisko srodnih jedinki. Ukoliko je  $F_{IS} = 0$  populacija je u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Ukoliko koeficijent poprima vrijednosti veće od nule u populaciji postoji višak homozigota što može biti uzrokovano povećanom stopom samooplodnje, a ako poprima vrijednosti manje od nule tada sugerira da je udio heterozigota veći od očekivanog u promatranoj populaciji.

$$F_{IS} = 1 - \frac{H_0}{H_E}$$

Pri čemu je:

$F_{IS}$  - fiksacijski indeks,

$H_0$  - zapažena heterozigotnost,

$H_E$  - očekivana heterozigotnost.

### 3.3.2. Utvrđivanje srodstvenih odnosa iz F<sub>1</sub> generacije

U skladu s Mendelijevim očekivanjem, svaki par roditelj-potomstvo dijelit će barem jedan alel na svakom lokusu pa se na toj pretpostavci i temelje ovdje primijenjeni testovi roditeljstva. Za svrhu utvrđivanja F<sub>1</sub> odnosa između genotipiziranog sjemenskog materijala, majčinskih biljaka i potencijalnih očinskih biljaka (donora polena), koristio sam R paket SOLOMON (Christie 2013). Za utvrđivanje razina samooplodnje/stranooplodnje koristio sam naredbu Bayesovska analiza s poznatim roditeljskim parovima (*Bayesian Parentage Analysis with known parent-pairs*). U sljedećem koraku, analizu sam proveo naredbom Bayesovska analiza s jednim poznatim roditeljem (*Bayesian Parentage Analysis with one known parent*) kojom je omogućeno prepoznavanje polen donora i to samo za one sjemenke za koje je u prethodnom koraku utvrđeno da su potekle iz stranooplodnje. Pritom je za prepoznavanje potencijalnih donora polena korišten dostupan set podataka iz ranijih istraživanja u sklopu kojih je genotipizirana većina kolonija istraživane populacije (Radosavljević, neobjavljeni rezultati).

### 3.3.3. Korelacija

Za utvrđivanje razine korelacije između pojedinih analiziranih kategorija upotrijebio sam računalni paket PAST (Hammer i sur. 2001). Najčešće korištena korelacija je linearna  $r$  (Pearsonov koeficijent) prikazana sljedećom jednadžbom:

$$r = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}}$$

Pri čemu je:

$r$ - Pearsonov koeficijent,

$x_i$  - uzorak iz skupa  $x$ ,

$y_i$  - uzorak iz skupa  $y$ ,

$\bar{x}$  - srednja vrijednost iz skupa podataka  $x$ ,

$\bar{y}$  - srednja vrijednost iz skupa podataka  $y$ .

Signifikantnost ( $t$ ) se izračunava pomoću sljedeće prikazane jednadžbe dvostrukog  $t$  testa s  $n-2$  stupnja slobode:

$$t = r \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}}$$

Pri čemu je:

$t$ - signifikantnost,  $r$ - Pearsonov koeficijent.

### 3.3.4. Utvrđivanje udaljenosti između polen donora i polen akceptora

Za utvrđivanje udaljenosti između polen donora i polen akceptora koristio sam Pitagorin poučak za određivanje udaljenosti između točaka u koordinatnom sustavu prema jednadžbi:

$$d(A, B) = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}$$

Pri čemu je:

$d(A,B)$  - udaljenost između točke A i točke B

$x_1$  i  $y_1$  - predstavljaju vrijednosti koordinata točke A

$x_2$  i  $y_2$  - predstavljaju vrijednosti koordinata točke B

Uvrštavanjem prostornih koordinata potencijalnih polen donora (detektirane jedinice na razini čitave populacije: Radosavljević, neobjavljeni rezultati) i polen akceptora (14 majčinskih biljaka s kojih je genotipizirano sjeme za potrebe ovog rada) u jednadžbu Pitagorinog poučka omogućen je izračun udaljenosti između očinske i majčinske biljke.

### **3.4.Laboratorijska oprema i pribor**

#### **Uređaji**

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

#### **Pribor**

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

## 4. REZULTATI

Genotipizacija 245 prikupljenih uzoraka sjemenskog materijala, kao i lisnog materijala 14 pripadajućih majčinskih biljaka, uspješno je provedena.

Eventualna prisutnost klonalnosti na razini uzorkovanih majčinskih biljaka kratkozupčaste kadulje nije utvrđena.

### Informativnost mikrosatelitnih lokusa

Informativnost mikrosatelitnih lokusa procjenjuje se na temelju informacijskog sadržaja polimorfizma (*PIC*) i ukupnog broja uočenih alela u analiziranoj populaciji te je određena pomoću računalnog programa Cervus. Vrijednosti informacijskog sadržaja polimorfizma (Tablica 1.) kreću se u rasponu od 0,234 do 0,862 pri čemu najviša vrijednost pripada lokusu SoUZ006, a najmanja lokusu SoUZ004 na uzorku od 245 sjemenki kratkozupčaste kadulje. Prema tome lokus SoUZ004 (Tablica 1.) možemo smatrati najmanje informativnim. Svi lokusi su polimorfni s ukupno zabilježenih 54 alela, a sam broj alela po lokusu varira u rasponu od 4 do 12 (Tablica 1.).

**Tablica 1.** Karakterizacija osam mikrosatelitnih lokusa kratkozupčaste kadulje na uzorku od 245 sjemenki

lokus	GeneBank ID	ponavljajući motiv	veličina (bp)	$N_a$	<i>PIC</i>
SoUZ001	GQ376512	(AG) <sub>15</sub>	158-172	4	0,571
SoUZ002	GQ376513	(TG) <sub>11</sub>	190-194	4	0,498
SoUZ004	GQ376515	(CA) <sub>19</sub>	199-212	4	0,234
SoUZ005	GQ376516	(AC) <sub>20</sub>	122-130	5	0,617
SoUZ006	GQ376517	(CT) <sub>31</sub>	204-233	12	0,862
SoUZ007	GQ376518	(GT) <sub>11</sub>	210-240	10	0,831
SoUZ011	GQ376522	(GA) <sub>25</sub>	230-250	8	0,721
SoUZ014	GQ376525	(AGA) <sub>10</sub>	192-218	7	0,764

$N_a$  - broj alela, *PIC* - informacijskog sadržaja polimorfizma

#### **4.1. Stope samooplodnje i stranooplodnje**

Pomoću računalnog paketa SOLOMON provedena je Bayesovska analiza te je utvrđeno da je od 245 promatranih sjemenki, njih 52 proisteklo iz samooplodnje (prosječna stopa samooplodnje iznosi 23,6 %) (Tablica 2.). Ostatak sjemenki (189) proizlazi iz stranooplodnje između genetički različitih jedinki kratkozupčaste kadulje (prosječna stopa stranooplodnje iznosi 76,4 %) (Tablica 2.) dok za četiri sjemenki nije bilo moguće odrediti tip spolnog razmnožavanja iz kojeg su proistekle.

**Tablica 2.** Odnos stopa samooplodnje i stranooplodnje te broja genotipiziranih sjemenki pojedine majčinske biljke

ID majčinske biljke	broj genotipiziranih sjemenki	broj sjemenki iz samooplodnje	broj sjemenki iz stranooplodnje	stopa samooplodnje / %	stopa stranooplodnje / %
23	5	2	3	40,0	60,0
27	24	0	22	0,0	100,0
144	22	10	12	45,5	54,5
189	5	1	4	20,0	80,0
192	36	4	32	11,1	88,9
196	6	3	3	50,0	50,0
203	21	3	18	14,3	85,7
209	24	12	12	50,0	50,0
211	21	4	17	19,0	81,0
239	6	0	4	0,0	100,0
261	6	2	4	33,3	66,7
267	23	3	20	13,0	87,0
270	23	5	18	21,7	78,3
302	23	3	20	13,0	87,0
<b>UKUPNO</b>	245	52	189		
<b>PROSJEK</b>				23,6	76,4



## 4.2. Osnovni populacijsko–genetički pokazatelji

Osnovni populacijsko–genetički pokazatelji utvrđeni su pomoću računalnog paketa GenAlEx. Analizom osam polimorfnih mikrosatelitnih lokusa utvrđene su prosječne vrijednosti osnovnih populacijsko-genetičkih pokazatelja za sljedeće setove uzoraka: majčinske biljke, sjemenke koje su nastale iz samooplodnje, sjemenke koje su nastale iz stranooplodnje, te svih uzorkovanih sjemenki bez obzira na porijeklo. Utvrđene su vrijednosti za broj alela ( $N_a$ ), opažene heterozigotnosti ( $H_o$ ), očekivane heterozigotnosti ( $H_E$ ) i koeficijenta samooplodnje ( $F_{IS}$ ) (Tablica 3.). Vrijednosti opažene heterozigotnosti kreću se u rasponu od 0,380 do 0,718, dok su vrijednosti očekivane heterozigotnosti u rasponu od 0,641 do 0,701. Očekivano, najmanju vrijednost prosječne opažene heterozigotnosti imaju sjemenke koje su nastale iz samooplodnje (Tablica 3.).

Koeficijent samooplodnje poprima vrijednosti u rasponu od -0,034 do 0,426 (Tablica 3.). Kod majčinskih biljaka, sjemenki iz stranooplodnje i cijele populacije (Radosavljević, neobjavljeni rezultati), koeficijent samooplodnje ima negativnu vrijednost (Tablica 3.), no bez statističke signifikantnosti. Time sugerira da se promatrane skupine jedinki nalaze se u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži te da izraženo križanje u bliskom srodstvu nije prisutno. S druge strane, kod sjemenki proizašlih iz samooplodnje, koeficijent ima izraženu i signifikantnu pozitivnu vrijednost (0,426), čime potvrđuje samooplodnju, tj. rezultat provedene analize. Koeficijent samooplodnje na razini cijelog seta uzorkovanih sjemenki iznosi 0,098 te je nesignifikantan, a (Tablica 3.) što je u skladu s podacima.

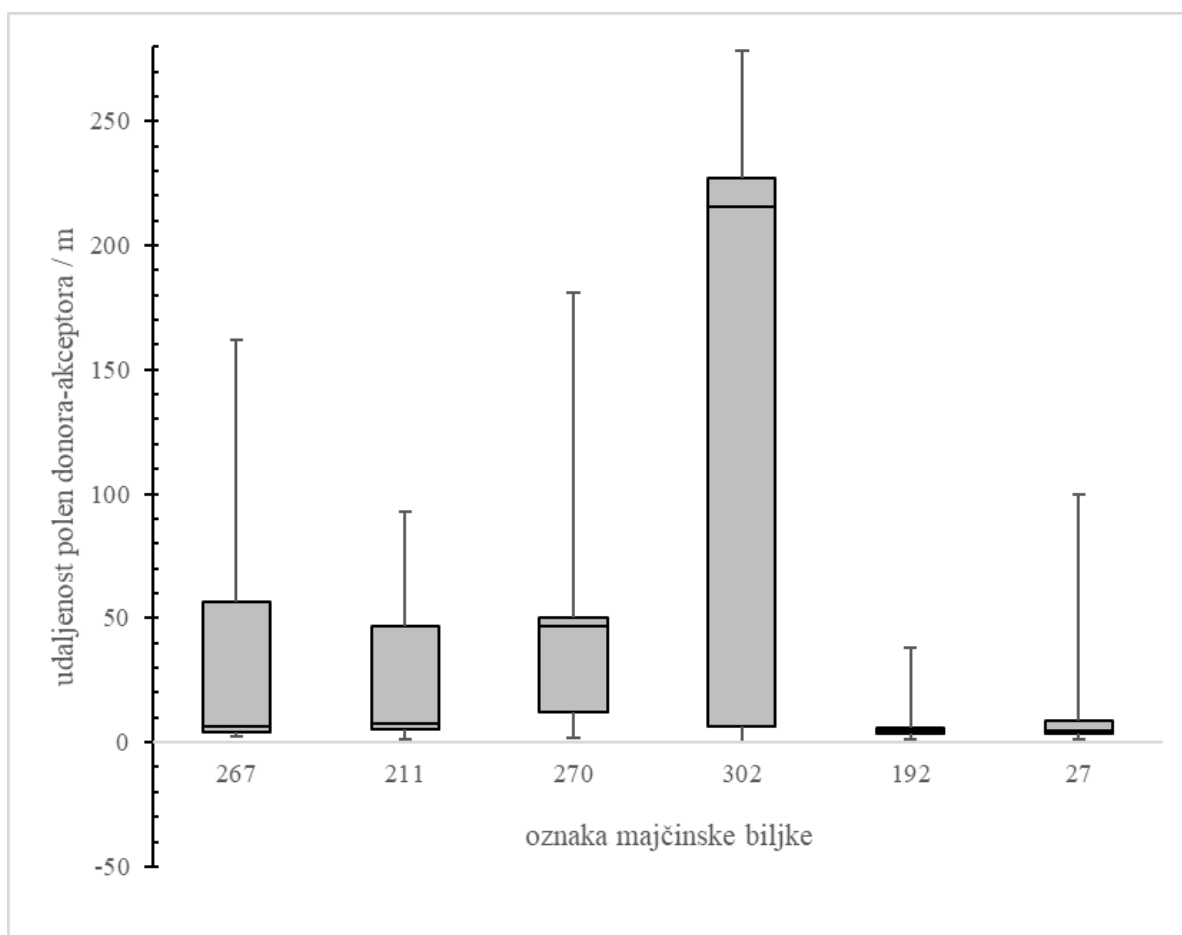
**Tablica 3.** Osnovni populacijsko-genetički pokazatelji - prosječne vrijednosti

	$N$	$N_a$	$H_o$	$H_E$	$F_{IS}$
majčinske biljke	14	6,000	0,679	0,659	-0,034
samooplodnja	52	5,500	0,380	0,641	0,426
stranooplodnja	189	6,750	0,680	0,677	-0,003
sve sjemenke	245	6,750	0,610	0,673	0,098
cijela populacija*	241	9,125	0,718	0,701	-0,023

$N$  - broj jedinki,  $N_a$  - broj alela,  $H_o$  - opažena heterozigotnost,  $H_E$  - očekivana heterozigotnost,  $F_{IS}$  - koeficijent samooplodnje, **cijela populacija\*** - podaci prethodnih istraživanja  
(Radosavljević, neobjavljeni rezultati)

### **4.3. Prostorna analiza kratkozupčaste kadulje**

Prostorna analiza udaljenosti između polen donora i akceptora provedena je temeljem prikupljenih koordinata majčinskih biljaka (tj. polen akceptora) i od ranije poznatog smještaja potencijalnih polen donora na razini čitave populacije (Radosavljević, neobjavljeni rezultati). U svrhu izrade grafičkog prikaza (Slika 10.), a koji podrazumijeva vizualizaciju srednjih vrijednosti i raspona vrijednosti, korišteni su rezultati za samo one majčinske biljke koje su bile karakterizirane prisustvom barem 5 sjemenki za koje je prepoznat donor polena. Minimalne udaljenosti između polen donora i akceptora kreću se od 0,02 m do 2,08 m. Najveća minimalna udaljenost tako pripada majčinskoj biljci oznake 267, dok najmanja vrijednost pripada majčinskoj biljci s oznakom 302 (Slika 10.). Maksimalne udaljenosti između polen donora i akceptora su u rasponu od 38 m do 278 m, pri čemu minimalna maksimalna udaljenost pripada majčinskoj biljci oznake 192, a maksimalna 302 (Slika 10.). Što se tiče prosječnih udaljenosti one se kreću u rasponu od 8 m do 45 m, uz ponovo iznimku majčinske biljke oznake 302 za čije sjemenke je utvrđena prosječna udaljenost u iznosu od 145 m (Slika 10.). Prosječna udaljenost prijenosa polena na cjelokupnom setu od 6 majčinskih biljaka iznosi 32,3 m.



**Slika 10.** Prikaz udaljenosti polen donora i akceptora uz označeni medijan, minimalne i maksimalne udaljenosti

#### 4.4. Linearna korelacija između polen donora i površine kolonije

U svrhu utvrđivanja korelacije između površine jedinki i broja koliko je puta određena jedinka bila donor polena korišten je računalni paket PAST kojim je određena linearna korelacija  $r$  (Pearsonov koeficijent). Kao izvor podataka za površinu jedinki korišteni su podaci prethodnih istraživanja (Radosavljević, neobjavljeni rezultati) (Tablica 4.). Analizom je utvrđeno da ta korelacija nije signifikantna (Tablica 5.).

**Tablica 4.** Prikaz polen donora (jedinke) i površine kolonije

ID klona	N*	površina klona / m <sup>2</sup>	ID klona	N*	površina klona / m <sup>2</sup>
6	1	0,42	327	1	0,09
26	1	0,05	339	3	0,04
39	1	0,15	355	1	0,59
58	1	0,33	375	1	0,04
61	1	0,09	428	1	0,09
79	1	0,04	454	1	0,28
125	1	0,04	465	1	0,13
146	2	1,21	478	1	0,04
149	1	0,04	489	1	0,04
168	1	0,04	506	1	0,05
184	1	0,06	530	1	0,04
196	1	0,09	538	1	0,04
202	2	0,09	581	1	0,09
212	1	0,09	592	2	0,04
214	1	0,04	593	2	0,09
219	1	0,09	595	4	0,04
227	1	0,04	597	8	0,09
232	1	0,35	599	1	0,09
233	1	0,09	605	2	0,04
237	1	0,09	607	1	0,13
240	1	0,07	610	5	11,10
244	2	0,09	611	2	0,78
246	1	0,09	619	2	0,04
248	1	0,09	629	4	0,04
251	2	0,04	630	1	0,30
252	1	0,09	640	2	1,44
254	2	1,54	644	1	0,04
265	2	0,09	645	1	0,04
269	2	68,10	653	2	0,04
272	1	0,09	654	2	0,09
276	1	0,04	661	1	0,04
282	1	0,24	662	3	9,35
283	1	0,09	668	3	0,09
299	2	0,49			

N\*- brojčana vrijednost koliko je puta pojedina jedinka prepoznata kao donor polena

**Tablica 5.** Utvrđivanje korelacije između površine jedinki i broja njihovih F<sub>1</sub> odnosa u svojstvu donor polena

	korelacija
<i>r</i>	0,1244
<i>t</i>	0,3159

*r*- Pearsonov koeficijent, *t*- signifikatnost

## 5. RASPRAVA

Provedenom populacijsko-genetičkom, a zatim i prostornom analizom odabranog seta sjemenki i majčinskih biljaka kratkozupčaste kadulje s poluotoka Pelješca, nastojala se provesti karakterizacija spolnog razmnožavanja ove populacije. Iz ranije provedenih istraživanja, poznato je da se *S. brachyodon* osim spolnim, razmnožava i klonalnim putem, što uvelike utječe na prostorno-genetičku strukturu populacija ove vrste. Također, utvrđeno je da je dominantna klonalna arhitektura u tipu falange (Radosavljević i sur., neobjavljeni rezultati), što znači da izdanci određene jedinke tvore guste kolonije u kojima dominantno ne dolazi do prostornog miješanja izdanaka različitih jedinki (Vallejo-Marín i sur. 2010). Utjecaj ovakve klonalne arhitekture na spolno razmnožavanje može biti različit, ovisno o tome je li je vrsta samooplodna ili stranooplodna. U slučaju da je vrsta isključivo stranooplodna, klonalna arhitektura u tipu falange može ozbiljno potisnuti spolno razmnožavanje u takvoj populaciji time što uzrokuje značajan gubitak polena (Harder i Barrett 1996). Zbog prijenosa polena na cvjetove iste jedinke, a koji se tim polenom ne mogu oploditi, ukupna množina polena se drastično smanjuje te na taj način preostaje manje polena za oprašivanje i oplodnju cvjetova drugih jedinki. Međutim, ako je vrsta samooplodna, u tom slučaju ovaj će tip klonalne arhitekture uzrokovati izraženu produkciju potomaka koji su potekli iz samooplodnje (Charpentier 2002; Albert i sur. 2008), što pak može čitavu populaciju voditi prema depresiji uslijed parenja u srodstvu, tj. genetskoj degradaciji koja za posljedicu može imati brojne negativne učinke, uz izumiranje populacije kao najekstremniji oblik. Zbog navedenoga, istraživanje u sklopu kojeg se provodi i ovaj diplomski rad je od iznimnog značaja, tim više što je proučavana vrsta zastupljena sa samo tri poznate populacije, od kojih je ona s Pelješca najveća.

Osnovna ideja ovog diplomskog rada je bila da se kroz Bayesovsku analizu, tj. analizu utvrđivanja roditeljskih biljaka za svaku genotipiziranu prikupljenu sjemenku, utvrdi razina stranooplodnje u istraživanoj populaciji, tj. konstatira eventualna prisutnost samooplodnje kao mogućeg tipa spolnog razmnožavanja. Nadalje, prepoznavanjem jedinki polen donora, željela se provesti analiza tipičnog dosega oprašivača te time konstatirati da li u slučaju istraživane populacije, zabilježene veličine jedinki i njihovih kolonija mogu značajnije utjecati na razinu stranooplodnje. Naposljetku, htjela se testirati eventualna povezanost između veličine pojedine jedinke odnosno njezine kolonije i razine samooplodnje tj. prepoznati je li je veća razina samooplodnje eventualno prisutna kod prostorno većih jedinki tipično karakteriziranih i s većim brojem fertilnih izdanaka. U navedene svrhe, na zadanom uzorku provedena je analiza osam polimorfničkih mikrosatelitnih lokusa, pri čemu je utvrđeno da približno jedna četvrtina sjemenki

potječe iz samooplodnje. Dobiveni rezultat je iznimno važan jer potvrđuje da je samooplodnja, kao vid spolnog razmnožavanja koji rezultira degradacijom genetskog bogatstva populacije, uistinu prisutan kod ove rijetke i ugrožene biljne vrste. Sam rezultat je potvrđen kroz dvije neovisne statističke analize; izravno kroz samo utvrđivanje roditeljstva, te neizravno kroz utvrđivanje koeficijenta samooplodnje, gdje je detektiran izniman manjak heterozigota u odnosu na očekivanu vrijednost s obzirom na broj zabilježenih alela i to isključivo na onom setu sjemenki koje su u testu roditeljstva prepoznate kao one potekle iz samooplodnje. Ipak, bitno je uočiti da, iako prisutna, samooplodnja ne predstavlja dominantan tip spolnog razmnožavanja unutar istraživane populacije, jer približno 76 % sjemenki potječe iz stranooplodnje. Usporedbom populacijsko-genetičkih parametara između setova sjemenki iz samooplodnje i stranooplodnje, uočljiva je iznimna razlika u razinama uočene heterozigotnosti, što je i u skladu s očekivanjima, dok se istovremeno razine očekivane heterozigotnosti koje su temeljene na ukupnom broju alela, značajno ne razlikuju. Također, usporedbom dobivenih vrijednosti između ukupnog seta svih sjemenki i od ranije poznatih vrijednosti za cijelu populaciju (Radosavljević i sur., neobjavljeni rezultati), očito je da značajne razlike nisu prisutne, te takav rezultat sugerira da ne postoje izraženi selekcijski pritisci tijekom razvoja novih biljaka, a uslijed kojih bi na bilo koji način došlo do eliminacije onih jedinki koje potječu iz samooplodnje. Pritom je bitno uočiti da vrijednosti populacijsko-genetičkih parametara, kako za cjelokupni set analiziranih sjemenki, tako i za cijelu populaciju (Radosavljević i sur., neobjavljeni rezultati), sugeriraju da iako se radi o maloj te prostorno izoliranoj populaciji, njezino genetičko bogatstvo nije narušeno, već se nalazi na prilično visokoj razini s vrijednostima opažene i očekivane heterozigotnosti od oko 0,7. Unatoč tradicionalnom mišljenju da populacije ovoga tipa tipično karakteriziraju niske razine genetskog bogatstva (Gitzendanner i Soltis 2000), ovakav rezultat nije nužno iznenađujući jer je u skladu sa sve većim brojem provedenih istraživanja koja nedvojbeno potvrđuju da brojne prirodne populacije usko-endemičnih svojti, iako malene i prostorno izolirane, nerijetko posjeduju značajno genetsko bogatstvo i raznolikost (Crema i sur., 2009; López-Vinyallonga i sur., 2015; Forrest i sur., 2017).

Na zadanom setu uzoraka, a suprotno očekivanjima, nije uočena korelacija između veličine jedinki i stope samooplodnje. Bilo je za očekivati da će kod prostorno većih jedinki i stopa samooplodnje biti veća zbog pretpostavljanog većeg broja raspoloživih oprašivačkih jedinica tj. cvjetova (Handel, 1985.; Reusch, 2001.), no ovim istraživanjem ta pojava nije uočena. U tom smislu, niti utjecaj prostorno-genetičke strukture populacije (koji se odnosi na

grupiranje genetički identičnih izdanaka u prostoru) na spolno razmnožavanje nije prepoznat. Vjerojatni razlog ovakvog rezultata je taj što je u sklopu ovog rada analiziran relativno mali broj majčinskih biljaka, tj. jedinki, svega njih 14, dok će se nakon provedene analize na bitno većem uzorku od preko 300 majčinskih biljaka i rezultat vrlo vjerojatno promijeniti.

Suprotno očekivanjima, može se zaključiti i da klonalna arhitektura u tipu falange značajno ne doprinosi samooplodnji. Iako bi očekivano razine samooplodnje bile i manje da je dominantna klonalna arhitektura u tipu gerile, ovdje dobiveni rezultat se vjerojatno može objasniti time što velika većina jedinki odnosno njihovih kolonija nije prostorno velika, te je tipično manja od nekoliko kvadratnih metara (Radosavljević i sur., neobjavljeni rezultati). Zahvaljujući tome, učinak prepoznate klonalne arhitekture na spolno razmnožavanje nije izražen, odnosno za očekivati je da bi bio puno naglašeniji kada bi i jedinke zauzimale značajno veće površine. U ovom kontekstu bitno je napomenuti da je 20 godina prije uzorkovanja, lokalitet na kojem se istraživana populacija nalazi opustošio šumski požar, što je rezultiralo uništenjem tada prisutne šume crnog bora (*Pinus nigra* Arnold). Drastična promjena tipa staništa omogućila je ekspanziju populacije kratkozupčaste kadulje koja, kao tipični heliofit, preferira otvorena staništa bez visoke vegetacije. Na temelju danas prisutnog stanja populacije u kojoj dominiraju brojne male jedinke (površine manje od 1 m<sup>2</sup>) naspram tek nekoliko izrazito velikih jedinki površine veće od 10 m<sup>2</sup> (Radosavljević i sur., neobjavljeni rezultati), moguće je zaključiti da se gotovo cijela populacija ove vrste regenerirala iz postojeće banke sjemena u tlu, što je uobičajena strategija za mnoge biljne vrste Mediterana gdje su požari prirodna pojava (npr. Lloret, 1998.; Ne'eman i Dafni, 1999.). Zbog navedenoga, moguće je pretpostaviti da utjecaj klonalne arhitekture u tipu falange nije ujednačen s obzirom na starost populacije, odnosno da će njegov (negativni) utjecaj u smislu generiranja većeg udjela samooplodnih jedinki biti tim izraženiji što je i populacija starija tj. udio velikih jedinki unutar populacije veći.

Nadalje, provedenim istraživanjem je moguće procijeniti očekivanu udaljenost protoka polena unutar istraživane populacije kratkozupčaste kadulje. Imajući na umu da tipičan doseg bilo kojeg od pretpostavljenih oprašivača (medonosne pčele, solitarne pčele i bumbari) u pravilu iznosi nekoliko stotina metara (Visscher i Seeley 1982, Beekman i Ratnieks 2000, Steffan-Dewenter i Kuhn 2003, Zurbuchen i sur. 2010, Wolf i Moritz 2008) te znajući da su najudaljenije točke istraživane populacije udaljene približno 300 m (Radosavljević i sur., neobjavljeni rezultati), očito je da se cijela populacija nalazi u dosegu bilo kojeg od oprašivača. Unatoč tome, za očekivati je da je srednja vrijednost udaljenosti na koju se polen efektivno prenosi znatno manja, što je potvrđeno i ovim istraživanjem, te iznosi 32,3 m. Znajući da

prosječna površina jedinke na razini cijele populacije iznosi približno 0,7 m<sup>2</sup>, očito je da zabilježeni doseg oprašivača ne može predstavljati limitirajući faktor za stranooplodnju unutar istraživane populacije. Istovremeno, zabilježene minimalne udaljenosti prijenosa polena nedvojbeno potvrđuju lakoću kojom dolazi do samooplodnje, a koja će očekivano biti tim veća što su i jedinke veće.

Provedenim istraživanjem dobivene su vrijedne informacije koje se tiču spolnog razmnožavanja usko-endemične vrste, kratkozupčaste kadulje. Po prvi put je utvrđena prisutnost samooplodnje, a koja može značajno utjecati na razinu genetičke varijabilnosti i bogatstva istraživane populacije. Ipak, za sada se taj negativni učinak ne primjećuje, vjerojatno zbog činjenice da je stranooplodnja još uvijek dominantan tip spolnog razmnožavanja unutar populacije. Nadalje, utvrđene su prosječne vrijednosti udaljenosti protoka polena unutar populacije te je zaključeno da klonalna struktura ne može imati značajniji negativan utjecaj na razine stranooplodnje. Također, utjecaj prostorno-genetičke strukture populacije na spolno razmnožavanje nije utvrđen, a vjerojatni razlog takvom rezultatu je premali broj obrađenih uzoraka. S ciljem dobivanja potpunijih i pouzdanijih rezultata kako na razini ove populacije, ali i cijele istraživane vrste, buduća istraživanja ovoga tipa bi trebala uključivati znatno veći broj uzoraka iz istraživane populacije, ali i obuhvatiti preostale dvije populacije.



## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedene populacijsko-genetičke i prostorne analize spolnog razmnožavanja populacije vrste *Salvia brachyodon* s poluotoka Pelješca upotrebom osam polimorfni mikrosatelitnih biljega može se zaključiti sljedeće:

- unutar populacije prisutna je razina samooplodnje koja iznosi 23,6 %
- na cjelokupnom setu analiziranih sjemenki nije zabilježeno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže, dok je očekivani višak homozigota uočen na razini seta sjemenki poteklih iz samooplodnje
- na razini sjemenki kao potencijalne buduće generacije jedinki, populacija je karakterizirana razmjerno visokim razinama genetske raznolikosti
- negativan utjecaj zabilježene samooplodnje na genetsku varijabilnost populacije nije uočen
- usporedbom populacijsko-genetičkih parametara između analiziranog seta sjemenki i cjelokupne populacije, ne uočavaju se značajne razlike u razinama heterozigotnosti, tj. genetske raznolikosti
- utvrđena prosječna udaljenost prijenosa polena unutar populacije iznosi 32,3 m
- utjecaj prostorno-genetičke strukture kao i veličine klonalnih jedinki na stopu samooplodnje nije zabilježen

## **7. ZAHVALA**

Želim se zahvaliti svom mentoru doc.dr.sc. Ivanu Radosavljeviću što mi je omogućio stjecanje životnog iskustva koje mi se vjerojatno tijekom daljnje karijere neće na taj način pružiti. Razumijevanje, strpljivost, nesebična pomoć, korisni savjeti, mogućnost stjecanja laboratorijskog znanja, vještina kao i dragocjeno utrošeno vrijeme prilikom izrade ovog diplomskog rada, djela su na kojima sam iskreno zahvalan.

Zahvaljujem se i svim nastavnicima koji su mi predavali tokom petogodišnjeg studija, omogućili stjecanje znanja i vještina iz različitih područja znanosti. Također, želim se zahvaliti i upravi Botaničkog vrta na literaturi i savjetima.

Na kraju svega, želim se iskreno zahvaliti svojoj obitelji i prijateljima koji su bili uz mene u najtežim trenucima i pružili mi potporu.

## 8. POPIS LITERATURE

- Abadžić S., Šilić Č. (1982): Horologija, ekologija i fitosociološka pripadnost vrste *Salvia brachyodon* Vandas u flori Jugoslavije. Glasnik Republičkog Zavoda za Zaštitu prirode i Prirodnjačkog muzeja u Titogradu **15**: 125-131.
- Ågren, J. (1996): Population size, pollinator limitation, and seed set in the self-incompatible herb *Lythrum salicaria*. Ecology, **77**: 1779–1790.
- Albert T, Raspe O, Jacquemart AL. (2008): Influence of clonal growth on selfing rate in *Vaccinium myrtillus* L. Plant Biology **10**: 643–49
- Bailleul, D., Stoeckel, S. and Arnaud-Haond, S. (2016): RClone: a package to identify MultiLocus Clonal Lineages and handle clonal data sets in R.. Methods Ecol Evol, **7**: 966-970. doi:10.1111/2041-210X.12550
- Barbalić L. (1956): Prilog poznavanju vrste *Salvia brachyodon* Vandas. Biološki glasnik **9**:5-10.
- Barrett SCH. (2015): Influences of clonality on plant sexual reproduction. PNAS **112**:8859-8866.
- Barrett SCH., Eckert C., Husband C. (1993): Evolutionary processes in aquatic plant populations. Aquat.Bot. **44**:105–45
- Barrett SCH., Shore J. (2008): New insights on heterostyly: comparative biology, ecology and genetics. In Self-Incompatibility in Flowering Plants: Evolution, Diversity and Mechanisms, ed. V Franklin-Tong, pp. 3–32. Berlin: Springer-Verlag
- Beekman, M., Ratnieks, F. L. W. (2000): Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. Funct Ecol. **14**:490–496
- Botstein D, White R.L., Sholnick M., David R.W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet **32**: 314–331.
- Burke JM, Bulger MR, Wesselingh RA, Arnold ML. (2000): Frequency and spatial patterning of clonal reproduction in Louisiana iris hybrid populations. Evolution **54**:137–44
- Caraco T, Kelly CK. (1991): On the adaptive value of physiological integration in clonal plants. Ecology **72**:81–93
- Charpentier A. (2002): Consequences of clonal growth for plant mating. Evol. Ecol. **15**:521–30 Reviews how clonal growth strategies may influence pollen dispersal and mating in plant populations.

- Christie M, Tennessen J. A., Blouin M. S. (2013): Bayesian parentage analysis with systematic accountability of genotyping error, missing data and false matching. *Bioinformatics*, **29**: 725–732
- Claßen-Bockhoff R., Wester P., Tweraser E. (2003): The staminal lever mechanism in *Salvia* L. (*Lamiaceae*): a review. *Plant Biology* (Stuttgart) **5**: 33-41.
- Crema S, Cristofolini G, Rossi M, Conte L. (2009): High genetic diversity detected in the endemic *Primula apennina* Widmer (*Primulaceae*) using ISSR fingerprinting. *Plant Systematics and Evolution* **280**: 29-36.
- Cuthill, I. C., Partridge, J. C., Bennett, A. T. D., Church, S. C., Hart, N. S., Hunt, S. (2000): Ultraviolet Vision in Birds. *Advances in the Study of Behavior*, 159–214. doi:10.1016/s0065-3454(08)60105-9
- Delaplane K.S., Mayer D.F. (2000): Crop Pollination by Bees. Department of Entomology University of Georgia and Irrigated Agriculture Research and Extension Center Washington State University
- Dorken M., Neville K., Eckert C. (2004): Evolutionary vestigialization of sex in a clonal plant: selection versus neutral mutation in geographically peripheral populations. *Proc. R. Soc.* **B271**: 2375–8
- Eckert CG, Barrett SCH. (1994): Inbreeding depression in partially self-fertilizing *Decodon verticillatus* (*Lythraceae*): population genetics and experimental analyses. *Evolution* **48**: 952–64
- Eltz T. (2006): Tracing Pollinator Footprints on Natural Flowers. *J Chem Ecol* **32**: 907-915
- Forrest A, Escudero M, Heuertz M, Wilson Y, Cano E, Vargas P. (2017): Testing the hypothesis of low genetic diversity and population structure in narrow endemic species: the endangered *Antirrhinum charidemi* (*Plantaginaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society* **183**: 260-270.
- Gathmann A., Tschardt T. (2000): Habitat evaluation using an abundant wild bee species - body size and sex ratio in *Osmia rufa* (L.) (Hymenoptera: Megachilidae). *U: Mitteilungen Der Deutschen Gesellschaft Fuer Allgemeine Und Angewandte Entomologie. Communications of the German Society for General and Applied Entomology.* 12, 607-610
- Gitzendanner MA, Soltis PS. (2000): Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany* **87**: 783-792.

- Goulson, D., Chapman, J. W., Hughes, W. O. H. (2001): Discrimination of unrewarding flowers by bees; direct detection of rewards and use of repellent scent marks. *J. Insect Behav.* **14**: 669–678.
- Goulson, D., Hawson, S. A., Stout, J. C. (1998): Foraging bumblebees avoid flowers already visited by conspecifics or by other bumblebee species. *Anim. Behav.* **55**:199–206.
- Goulson, D., Stout, J. C., Langley, J., Hughes, W. O. H. (2000): Identity and function of scentmarks deposited by foraging bumblebees. *J. Chem. Ecol.* **26**: 2897– 2911.
- Greguraš D. (2013): Genetička raznolikost i struktura populacija ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.), doktorska disertacija.
- Habdija, I., Primc Habdija B., Radanović I., Špoljar M., Matoničkin Kepčija R., Vujčić Karlo S., Miliša M., Ostojčić A., Sertić Perić M. (2011): Protista-Protozoa i Metazoa-Invertebrata : Strukture i funkcije. Zagreb. Alfa d.d.. 454–460
- Hammer, Ø.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. (2001): PAST. Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontol. Electron.*, **4**, 3–9.
- Handel SN. (1985): The intrusion of clonal growth patterns on plant breeding systems. *American Naturalist* **125**:367–83
- Harder LD, Barrett SCH. (1996): Pollen dispersal and mating patterns in animal-pollinated plants. In: Lloyd DG, Barrett SCH, eds. *Floral Biology. Studies on Floral Evolution in Animal-Pollinated Plants*. New York: Chapman & Hall, 140-190.
- Herrel A., Speck T., Rowe N. P. (2006): *ECOLOGY and BIOMECHANICS. A Mechanical Approach to the Ecology of Animals and Plants*. Taylor & Francis Group,123-142
- Huck R.B. (1992): Overview of pollination biology in the *Lamiaceae*- U Harley R.M., Reynolds T.ed.s.: *Advences in Labiate science*. Royal Botanic Garden, Kew. 167-181
- Johansson B. G. (1972): Agarose Gel Electrophoresis, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 29:sup124, 7-19, DOI: 10.3109/00365517209102747
- Kalinowski, ST, Taper, ML & Marshall, TC (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* **16**:1099-1106.<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03089.x>
- Klimeš L., Klimešova J., Hendriks R., van Groenendael J. (1997): Clonal plant architecture: a comparative analysis of form and function. In: de Kroon H, van Groenendael J, eds. *The Ecology and Evolution of Clonal Plants*. Leiden: Backhuys, 1-29.

- Liao, W.-J., Hu, Y., Zhu, B.-R., Zhao, X.-Q., Zeng, Y.-F., & Zhang, D.-Y. (2009): Female reproductive success decreases with display size in monkshood, *Aconitum kusnezoffii* (*Ranunculaceae*). *Annals of Botany*, **104**(7), 1405–1412. doi:10.1093/aob/mcp237
- Liber, Z., Bogdanović, S., Radosavljević, I., Pruša, M., Filipović, M., Stešević, D. i Šatović, Z. (2014). Morphological Analysis of Short-Tooth Sage (*Salvia brachyodon* Vandas) Populations. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, **79** (2), 71-76.
- Lloret F. (1998): Fire, canopy cover and seedling dynamics in Mediterranean shrubland of northeastern Spain. *Journal of Vegetation Science* **9**: 417-430.
- López-Vinyallonga S, López-Pujol J, Constantinidis T, Susanna A, Garcia-Jacas N. (2015): Mountains and refuges: Genetic structure and evolutionary history in closely related, endemic *Centaurea* in continental Greece. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **92**: 243-254.
- Lorenz, T. C. (2012): Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J. Vis. Exp.* (63), e3998, doi:10.3791/3998
- Menzel, R., & Backhaus, W. (1989). Color Vision Honey Bees: Phenomena and Physiological Mechanisms. *Facets of Vision*, 281–297. doi:10.1007/978-3-642-74082-4\_14
- Miah G., Rafii M. Y., Ismail M. R., Puteh A. B., Rahim H. A., Islam Kh. N., Latif M. A. (2013): A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 22499-22528.
- Mustajärvi K., Siikamäki P., Rytönen S., Lammi A. (2000): Consequences of plant population size and density for plant-pollinator interactions and plant performance. *Journal of Ecology* 2001, **89**: 80-87
- Ne'eman G., Dafni A. (1999): Fire, Bees, And Seed Production in a Mediterranean Key Species *Salvia fruticosa* Miller (*Lamiaceae*). *Israel Journal of Plant Science* **47**:157-163.
- Nei M. (1978): Estimation Of Average Heterozygosity And Genetic Distance From A Small Number Of Individuals. *Genetics* **89**: 3 583-590
- Nikolić T. (2013): Sistematska botanika -Raznolikost i evolucija biljnog svijeta. Alfa d.d., Zagreb
- Nikolić T. (2017): Morfologija bilja, razvoj, građa i uloga biljnih tkiva, organa i organskih sustava. ALFA. Sveučilište u Zagrebu, str. 120.

- Nikolić T. i ur. (2015): Flora Croatica baza podataka (<http://hirc.botanic.hr/fcd>). Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (datum pristupa: 29.02. 2020).
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, M. L. C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, **29(2)**: 294–307. doi:10.1590/s1415-47572006000200018
- Otto SP. 2009. The evolutionary enigma of sex. *Am. Nat.* **174**:S1–14
- Peakall, R. and Smouse P.E. (2012): GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* **28**: 2537-2539.
- Radosavljević I. (2012): Izolacija i karakterizacija mikrosatelitnih biljega ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.; *Lamiaceae*). Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb
- Radosavljević I., Šatović Z., Liber Z. (2015a): Causes and consequences of contrasting genetic structure in sympatrically growing and closely related species. *AoB PLANTS* **7**: plv106.
- Radosavljević I., Šatović Z., Jakse J., Javornik B., Greguraš D., Jug-Dujaković M., Liber Z. (2012): Development of new microsatellite markers for *Salvia officinalis* L. and its potential use in conservation-genetic studies of narrow endemic *Salvia brachyodon* Vandas. *International Journal of Molecular Science* **13**: 12082-12093.
- Radosavljević I., Šatović Z., Liber Z. (2015b): Microsatellite evidence for high clonality in narrow endemic and endangered *Salvia brachyodon* (*Lamiaceae*). U: Klobučar G., Kopjar N., Gligora Udovič M., Lukša Ž., Jelić D. (ur.) Book of abstracts of the 12th Croatian Biological Congress. Hrvatsko biološko društvo, 55-54.
- Radosavljević, I., Bogdanović, S., Celep, F. et al. (2019): Morphological, genetic and epigenetic aspects of homoploid hybridization between *Salvia officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Mill..*Sci Rep* **9**, 3276. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40080-0>
- Reith M, Baumann G., Claßen-Bockhoff R., Speck T. (2007): New Insights into the Functional Morphology of the Lever Mechanism of *Salvia pratensis* (*Lamiaceae*), *Annals of Botany*, **100(2)**: 393–400,
- Reusch TBH. (2001): Fitness-consequences of geitonogamous selfing in a clonal marine angiosperm (*Zostera marina*). *Journal of Evolutionary Biology* **14**: 129-38.

- Ruggiero MV, Reusch TBH, Procaccini G. (2005): Local genetic structure in a clonal dioecious angiosperm. *Mol. Ecol.* **14**: 957–67
- Salisbury EJ. (1942): *The Reproductive Capacity of Plants*. London: George Bell
- Sia E. A., Butler C. A., Dominska M., Greenwell P., Fox T. D., Petes T. D. (2000): Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 250-255
- Sih, A. & Baltus, M.-S. (1987): Patch size, pollinator behavior, and pollinator limitation in catnip. *Ecology*, **68**: 1679–1690.
- Silvertown J. (2008): The evolutionary maintenance of sexual reproduction: evidence from the ecological distribution of asexual reproduction in clonal plants. *International Journal of Plant Sciences* **169**: 157-168.
- Steffan-Dewenter, I. & Kuhn, A. (2003): Honeybee foraging in differentially structured landscapes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **270**:569–575
- Šilić Č. (1984): *Endemične biljke*, Svjetlost, OOUR Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Sarajevo – Zavod za udžbenike.
- Trinajstić I. (1986): Šume dalmatinskog crnog bora - *Pinus nigra* Arnold ssp. *dalmatica* (Vis) Franco – sredozemnog područja Hrvatske. *Poljoprivreda i šumarstvo* **32**: 37-48.
- Vallejo-Marín, M., Dorken, M. E., & Barrett, S. C. H. (2010): The Ecological and Evolutionary Consequences of Clonality for Plant Mating. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **41**(1):193–213. doi:10.1146/annurev.ecolsys.110308.120258
- Vandas K. (1899): Beitrage zur Kenntnis der Flora von Sud-Hercegovina. *Osterreich Botanische Zeitschrift* **39**: 178-181.
- Varshney R.K., Graner A., Sorrells M.E. (2004): Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology* **23**: 1
- Visscher, P. K. & Seeley, T. D. (1982): Foraging strategy of honeybee colonies in a temperate deciduous forest. *Ecology* **63**:1790–1801
- Walker, J.B., Sytsma, K.J. (2007): Staminal evolution in the genus *Salvia* (*Lamiaceae*): molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. *Annals of Botany* **100**(2): 375-391.
- Walker, J.B., Sytsma, K.J., Treutlein, J., Wink, M. (2004): *Salvia* (*Lamiaceae*) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological



specializations of *Salvia* and tribe Mentheae. *American Journal of Botany* 91(7): 1115-1125.

- Wester P., Claßen-Bockhoff R. (2007): Floral Diversity and Pollen Transfer Mechanisms in Bird-pollinated *Salvia* Species, *Annals of Botany*, **2**: 401–421,
- Wester, P., Claßen-Bockhoff, R. (2006): Bird pollination in South African *Salvia* species. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, **201(5)**: 396–406. doi:10.1016/j.flora.2005.07.016
- Willmer P. (2011): *Pollination and Floral Ecology*. Princeton University Press. New Jersey. 403-417.
- Wolf, S., Moritz, R. F. A. (2008): Foraging distance in *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* **39**: 419–427
- Wright S. (1931): Evolution in Mendelian populations. *Genetics*.**16**:97–159.
- Zane L., Patarnello B. i T. (2001) Strategies for microsatellite isolation: a review. Dipartimento di Biologia, Università di Padova, Italia: In: Blackwell Science Ltd. *Molecular Ecology*, **11**:1-6.
- Zurbuchen, A. et al. (2010): Maximum foraging ranges in solitary bees: only few individuals have the capability to cover long foraging distances. *Biol Conserv.* **143**: 669–676

## 9. PRILOZI

**Prilog 1.** Izmjerene mase sjemenki, koncentracije DNA i korišteni volumeni vode i izolirane DNA za uzorak od 245 sjemenki prilikom pripreve otopine DNA prikladne koncentracije za lančanu reakciju polimeraze.

**Prilog 2.** Prikaz veličine alela mikrosatelitnih lokusa 245 uzoraka kratkozupčaste kadulje s poluotoka Pelješca

**Prilog 3.** Prikaz veličine alela mikrosatelitnih lokusa 14 uzoraka listova majčinskih biljaka kratkozupčaste kadulje s poluotoka Pelješca

**Prilog 4.** Prikaz odnosa individualne heterozigotnosti i sjemenki za samooplodnju/stranooplodnju

**Prilog 1.** Izmjerene mase sjemenki, koncentracije DNA i korišteni volumeni vode i izolirane DNA za uzorak od 245 sjemenki prilikom pripreve otopine DNA prikladne koncentracije za lančanu reakciju polimeraze

broj uzorka	oznaka	m/mg	$\gamma$ (DNA)/ (ng/ $\mu$ L)	V(DNA)/ $\mu$ L	V(voda)/ $\mu$ L	broj uzorka	oznaka	m/mg	$\gamma$ (DNA)/ (ng/ $\mu$ L)	V(DNA)/ $\mu$ L	V(voda)/ $\mu$ L
1	23/1	9	4	37,5	62,5	64	192/8	7,1	2,5	60,0	40,0
2	23/2	7,2	4,5	33,3	66,7	65	192/9	10,3	4,5	33,3	66,7
3	23/3	6,5	4	37,5	62,5	66	192/10	6,9	4	37,5	62,5
4	23/4	7,4	3	50,0	50,0	67	192/11	7,5	5	30,0	70,0
5	23/5	7,7	5	30,0	70,0	68	192/12	8,6	4,5	33,3	66,7
6	27/1	7,8	2,5	60,0	40,0	69	192/13	9,8	5,5	27,3	72,7
7	27/2	9	-	-	-	70	192/14	9,8	5,75	26,1	73,9
8	27/3	7,4	-	-	-	71	192/15	7,4	4,7	31,9	68,1
9	27/4	7,3	1,5	100,0	0,0	72	192/16	9,4	5,5	27,3	72,7
10	27/5	8	1	-	-	73	192/17	8,1	5,25	28,6	71,4
11	27/6	9,6	2,5	60,0	40,0	74	192/18	9,6	5,25	28,6	71,4
12	27/7	8,2	-	-	-	75	192/19	10,1	6,25	24,0	76,0
13	27/8	9,2	1	-	-	76	192/20	9,8	6	25,0	75,0
14	27/9	9	0,5	-	-	77	192/21	9,6	5	30,0	70,0
15	27/10	8,4	-	-	-	78	192/22	8,4	5,25	28,6	71,4
16	27/11	10,1	0,5	-	-	79	192/24	7,3	6,5	23,1	76,9
17	27/12	7,8	2	75,0	25,0	80	192/25	10,8	6,5	23,1	76,9
18	27/13	8,2	0,5	-	-	81	192/26	9,5	7,25	20,7	79,3
19	27/14	11,9	1,5	100,0	0,0	82	192/27	8,1	4	37,5	62,5
20	27/15	8,1	2,5	60,0	40,0	83	192/28	10,4	5,5	27,3	72,7
21	27/16	9,3	1,5	100,0	0,0	84	192/29	6,2	10,2	14,7	85,3
22	27/17	9,6	-	-	-	85	192/30	7,9	7	21,4	78,6
23	27/18	7,4	1,5	100,0	0,0	86	192/31	8	5,7	26,3	73,7
24	27/19	6,2	-	-	-	87	192/32	6,9	5,25	28,6	71,4
25	27/20	8,3	2	75,0	25,0	88	192/33	7,9	5,5	27,3	72,7
26	27/21	9,2	4,5	33,3	66,7	89	192/34	8,8	5,5	27,3	72,7
27	27/22	10,4	0,5	-	-	90	192/35	8,6	6	25,0	75,0
28	27/23	10	2	75,0	25,0	91	192/36	7,1	5,25	28,6	71,4
29	27/24	7,6	2,5	60,0	40,0	92	192/37	7,5	5,75	26,1	73,9
30	144/1	10,4	8,5	17,6	82,4	93	196/1	9,2	4	37,5	62,5
31	144/2	10,3	8	18,8	81,3	94	196/2	8	4	37,5	62,5
32	144/3	8	4,5	33,3	66,7	95	196/3	8,1	3,5	42,9	57,1
33	144/4	10,8	5,5	27,3	72,7	96	196/4	10,1	3	50,0	50,0
34	144/5	8,4	5	30,0	70,0	97	196/5	10,2	4	37,5	62,5
35	144/6	8,4	3,5	42,9	57,1	98	196/6	10	6	25,0	75,0
36	144/7	8,5	2,5	60,0	40,0	99	203/1	11,4	4	37,5	62,5
37	144/8	10,9	3	50,0	50,0	100	203/2	9,2	3	50,0	50,0
38	144/9	10,4	3,5	42,9	57,1	101	203/3	10	2,5	60,0	40,0
39	144/10	11,3	3,5	42,9	57,1	102	203/4	10,9	2	75,0	25,0
40	144/11	7,6	3,5	42,9	57,1	103	203/5	11	6	25,0	75,0
41	144/12	9,7	2,5	60,0	40,0	104	203/6	9,1	2,5	60,0	40,0
42	144/13	9,6	5	30,0	70,0	105	203/7	10	3	50,0	50,0
43	144/14	10,2	3,5	42,9	57,1	106	203/8	8,5	3	50,0	50,0
44	144/15	7,2	5,5	27,3	72,7	107	203/9	10,3	2	75,0	25,0
45	144/16	12,5	2,5	60,0	40,0	108	203/10	9,4	3	50,0	50,0
46	144/17	10,7	3,5	42,9	57,1	109	203/11	10,7	2,5	60,0	40,0
47	144/18	10,7	3	50,0	50,0	110	203/12	8,6	3	50,0	50,0
48	144/19	9,5	4,5	33,3	66,7	111	203/13	11,2	2,5	60,0	40,0
49	144/20	7,3	2	75,0	25,0	112	203/14	10,2	2	75,0	25,0
50	144/21	9,1	1,5	100,0	0,0	113	203/15	8,1	2	75,0	25,0
51	144/22	9,9	1,5	100,0	0,0	114	203/16	10,6	4	37,5	62,5
52	189/1	7,5	2	75,0	25,0	115	203/17	10,1	1,5	100,0	0,0
53	189/2	9,5	2,5	60,0	40,0	116	203/18	9,9	2	75,0	25,0
54	189/3	8,5	1,5	100,0	0,0	117	203/19	7,5	2,5	60,0	40,0
55	189/4	7,9	2	75,0	25,0	118	203/20	9,3	4	37,5	62,5
56	189/5	9,4	3,5	42,9	57,1	119	203/21	11,9	3,5	42,9	57,1
57	192/1	8,6	5,25	28,6	71,4	120	209/1	10,6	6,5	23,1	76,9
58	192/2	9,1	4,5	33,3	66,7	121	209/2	11,2	5	30,0	70,0
59	192/3	10,6	2	75,0	25,0	122	209/3	11,9	6	25,0	75,0
60	192/4	8	3	50,0	50,0	123	209/4	10	3,75	40,0	60,0
61	192/5	9,4	3,5	42,9	57,1	124	209/5	10	4,25	35,3	64,7
62	192/6	9,8	2,5	60,0	40,0	125	209/6	9,4	4,75	31,6	68,4
63	192/7	6,6	2,5	60,0	40,0	126	209/7	11,7	5,5	27,3	72,7

broj uzorka	oznaka	m/mg	$\gamma$ (DNA)/ (ng/ $\mu$ L)	V(DNA)/ $\mu$ L	V(voda)/ $\mu$ L	broj uzorka	oznaka	m/mg	$\gamma$ (DNA)/ (ng/ $\mu$ L)	V(DNA)/ $\mu$ L	V(voda)/ $\mu$ L
127	209/8	9,8	4,75	31,6	68,4	190	267/14	11,1	9	16,7	83,3
128	209/9	9,7	7,25	20,7	79,3	191	267/15	10,2	7,7	19,5	80,5
129	209/10	7,6	6,5	23,1	76,9	192	267/16	10,3	8,2	18,3	81,7
130	209/11	11,1	6,5	23,1	76,9	193	267/17	9,8	8,5	17,6	82,4
131	209/12	9,8	4,75	31,6	68,4	194	267/18	10	6,2	24,2	75,8
132	209/13	10,5	6,5	23,1	76,9	195	267/19	10,6	6,7	22,4	77,6
133	209/14	8,8	5,75	26,1	73,9	196	267/20	6,4	7,5	20,0	80,0
134	209/15	6,3	5,75	26,1	73,9	197	267/21	7,7	5,7	26,3	73,7
135	209/16	8,9	4,75	31,6	68,4	198	267/22	12,1	8	18,8	81,3
136	209/17	9,5	4,25	35,3	64,7	199	267/23	13,7	8,7	17,2	82,8
137	209/18	8,8	4,75	31,6	68,4	200	270/1	8,2	7,5	20,0	80,0
138	209/19	9,8	5,5	27,3	72,7	201	270/2	8,5	8,2	18,3	81,7
139	209/20	10,3	5,25	28,6	71,4	202	270/3	10,3	6	25,0	75,0
140	209/21	11,5	6	25,0	75,0	203	270/4	10,6	9,2	16,3	83,7
141	209/22	8,7	6,5	23,1	76,9	204	270/5	11,2	6,2	24,2	75,8
142	209/23	9,6	4	37,5	62,5	205	270/6	10,3	4,7	31,9	68,1
143	209/24	8,8	5,25	28,6	71,4	206	270/7	11,2	6,2	24,2	75,8
144	211/1	6,8	7	21,4	78,6	207	270/8	12,6	8,2	18,3	81,7
145	211/2	9,5	5	30,0	70,0	208	270/9	8,7	6,2	24,2	75,8
146	211/3	11,5	2,25	66,7	33,3	209	270/10	12,2	6,2	24,2	75,8
147	211/4	7,2	5,75	26,1	73,9	210	270/11	10,2	7	21,4	78,6
148	211/5	8,9	2,25	66,7	33,3	211	270/12	10,7	10,5	14,3	85,7
149	211/7	9,8	3,75	40,0	60,0	212	270/13	10,7	7	21,4	78,6
150	211/8	6,9	6,25	24,0	76,0	213	270/14	10,1	10,8	13,9	86,1
151	211/9	7	4	37,5	62,5	214	270/15	10,8	7,5	20,0	80,0
152	211/10	12,1	3,25	46,2	53,8	215	270/16	10,6	11,2	13,4	86,6
153	211/11	8,5	6,5	23,1	76,9	216	270/17	8,5	7,2	20,8	79,2
154	211/12	11,1	4,25	35,3	64,7	217	270/18	10,3	6,7	22,4	77,6
155	211/13	6,4	7	21,4	78,6	218	270/19	11,7	7,5	20,0	80,0
156	211/14	10	3,5	42,9	57,1	219	270/20	8	8,2	18,3	81,7
157	211/15	11,4	5,25	28,6	71,4	220	270/21	8,5	7,7	19,5	80,5
158	211/16	10,4	4	37,5	62,5	221	270/22	12,5	7	21,4	78,6
159	211/17	11,2	5	30,0	70,0	222	270/23	10,2	7	21,4	78,6
160	211/18	9,6	2,25	66,7	33,3	223	302B/2	11,1	3,5	42,9	57,1
161	211/19	11,1	4,25	35,3	64,7	224	302B/3	6,7	9,5	15,8	84,2
162	211/21	11,1	3,5	42,9	57,1	225	302B/4	9,4	5	30,0	70,0
163	211/22	9,9	5,5	27,3	72,7	226	302B/5	8,2	5	30,0	70,0
164	211/23	9,3	5	30,0	70,0	227	302B/6	8,6	4	37,5	62,5
165	239/1	8,9	3	50,0	50,0	228	302B/7	8,3	4,5	33,3	66,7
166	239/2	7,3	3,5	42,9	57,1	229	302B/8	10,2	3,5	42,9	57,1
167	239/3	10	6	25,0	75,0	230	302B/9	8,7	6	25,0	75,0
168	239/4	9,6	5	30,0	70,0	231	302B/10	11,1	4	37,5	62,5
169	239/5	11,1	4	37,5	62,5	232	302B/11	8,2	3,5	42,9	57,1
170	239/6	9,4	6	25,0	75,0	233	302B/12	12,3	5,5	27,3	72,7
171	261/1	11,1	3,5	42,9	57,1	234	302B/13	9,6	4	37,5	62,5
172	261/2	10,1	2,5	60,0	40,0	235	302B/14	9,5	3,5	42,9	57,1
173	261/3	9,7	3,5	42,9	57,1	236	302B/15	11,2	3,5	42,9	57,1
174	261/4	9,6	3	50,0	50,0	237	302B/16	11,2	4	37,5	62,5
175	261/6	11,9	4	37,5	62,5	238	302B/17	10,7	3	50,0	50,0
176	261/7	12	4,5	33,3	66,7	239	302B/18	9,8	4	37,5	62,5
177	267/1	13,4	8,7	17,2	82,8	240	302B/19	13,2	3	50,0	50,0
178	267/2	12,2	6,7	22,4	77,6	241	302B/20	8,1	4	37,5	62,5
179	267/3	9,5	7,2	20,8	79,2	242	302B/21	9,2	3	50,0	50,0
180	267/4	13,3	6,2	24,2	75,8	243	302B/22	9,3	3,5	42,9	57,1
181	267/5	10,9	9,5	15,8	84,2	244	302B/23	11,3	3,5	42,9	57,1
182	267/6	11,2	8	18,8	81,3	245	302B/24	11	7	21,4	78,6
183	267/7	9,8	6	25,0	75,0						
184	267/8	10,4	9,5	15,8	84,2						
185	267/9	10,3	7,5	20,0	80,0						
186	267/10	11,5	11,5	13,0	87,0						
187	267/11	8,8	7,2	20,8	79,2						
188	267/12	12,7	7,5	20,0	80,0						
189	267/13	7,3	1,2	125,0	-						

**Prilog 2.** Prikaz veličine alela mikrosatelitnih lokusa 245 uzoraka kratkozupčaste kadulje s poluotoka Pelješca

oznaka	pop	SoUZ001		SoUZ002		SoUZ005		SoUZ004		SoUZ011		SoUZ006		SoUZ014		SoUZ007	
192/1	PELJ	140	140	173	177	107	107	191	191	221	227	214	214	174	201	206	206
192/2	PELJ	140	140	173	173	107	109	191	191	221	221	198	204	174	180	202	206
192/3	PELJ	140	146	173	177	107	109	191	191	211	227	196	214	198	201	194	198
192/4	PELJ	140	140	173	173	107	109	183	191	211	227	204	214	198	201	196	198
192/5	PELJ	140	152	173	173	107	109	191	191	215	221	194	204	174	198	196	198
192/6	PELJ	140	152	173	177	107	109	191	191	211	221	196	204	201	201	200	206
192/7	PELJ	140	146	173	177	107	111	191	191	211	221	198	204	174	180	200	206
192/8	PELJ	140	140	173	177	107	107	191	191	221	221	204	204	174	174	198	206
192/9	PELJ	140	140	173	173	107	109	183	191	211	221	204	204	174	198	196	206
192/10	PELJ	140	140	173	173	107	107	191	191	221	221	204	204	174	201	206	206
192/11	PELJ	140	140	173	175	107	109	191	193	221	227	210	214	174	201	198	198
192/12	PELJ	140	140	173	177	107	109	191	191	221	227	198	214	198	201	196	198
192/13	PELJ	140	146	173	177	107	111	183	191	211	227	204	214	174	198	200	206
192/14	PELJ	140	146	173	177	107	109	183	191	211	221	204	204	174	180	200	206
192/15	PELJ	140	140	173	173	107	107	191	191	211	221	198	204	174	180	200	206
192/16	PELJ	140	152	173	173	105	107	191	191	227	227	202	214	174	195	198	198
192/17	PELJ	140	152	173	177	105	107	191	191	227	227	214	214	174	201	198	198
192/18	PELJ	140	140	177	177	107	109	183	191	211	221	204	204	201	201	200	206
192/19	PELJ	140	152	173	177	107	109	191	191	211	227	198	214	201	201	194	206
192/20	PELJ	140	140	173	177	107	107	191	191	221	227	204	214	174	201	198	206
192/21	PELJ	140	146	173	177	107	109	183	191	211	227	204	214	180	201	200	206
192/22	PELJ	140	140	177	177	105	107	191	191	211	221	204	214	201	201	198	200
192/24	PELJ	140	152	173	173	105	107	191	191	221	227	186	214	198	201	198	204
192/25	PELJ	140	146	173	177	107	107	191	191	219	227	214	214	198	201	198	200
192/26	PELJ	140	152	177	177	105	107	183	191	227	227	204	214	174	201	198	200
192/27	PELJ	140	140	173	177	107	107	191	191	211	227	204	214	174	201	198	198
192/28	PELJ	140	140	177	177	107	107	191	191	211	227	204	214	174	201	198	206
192/29	PELJ	140	152	177	177	105	107	191	191	211	227	198	214	201	201	200	206
192/30	PELJ	140	140	173	173	107	109	183	191	211	221	204	204	180	201	200	206
192/31	PELJ	140	140	177	177	107	107	183	191	211	221	204	204	180	201	198	200
192/32	PELJ	140	152	177	177	105	107	191	191	221	227	204	214	180	201	198	206
192/33	PELJ	140	152	173	173	105	107	191	191	221	227	202	204	174	198	206	206
192/34	PELJ	140	152	175	177	105	107	191	191	221	227	186	214	198	201	198	212
192/35	PELJ	140	146	173	177	107	107	191	191	211	221	198	204	174	180	200	206
192/36	PELJ	140	140	173	177	107	107	191	191	211	227	198	214	174	201	198	206
192/37	PELJ	140	146	177	177	107	109	183	191	211	221	204	214	198	201	202	206
302/2	PELJ	140	146	173	177	107	109	191	191	221	229	192	196	180	192	196	196

302/3	PELJ	140	140	173	177	107	111	183	191	211	211	186	204	180	192	196	200
302/4	PELJ	140	140	173	177	107	109	191	191	221	229	192	196	174	192	196	212
302/5	PELJ	140	146	173	175	107	109	191	191	221	221	192	194	192	195	194	196
302/6	PELJ	140	140	173	173	107	109	191	191	211	221	186	194	174	192	196	212
302/7	PELJ	140	146	173	195	107	109	191	191	211	221	192	196	174	192	196	218
302/8	PELJ	146	146	173	173	107	107	191	191	211	229	186	196	180	192	196	212
302/9	PELJ	140	146	173	173	107	109	191	191	211	221	186	194	180	192	196	212
302/10	PELJ	140	146	173	173	105	107	191	191	211	221	186	192	180	201	196	212
302/11	PELJ	140	146	173	173	107	107	191	191	211	221	186	192	180	192	212	212
302/12	PELJ	146	146	173	173	107	109	191	191	211	221	186	194	180	192	196	212
302/13	PELJ	140	146	173	173	107	109	191	191	221	229	192	196	180	192	196	196
302/14	PELJ	140	140	173	173	107	109	191	191	221	229	192	196	180	180	196	212
302/15	PELJ	146	146	173	173	107	107	191	191	211	221	192	196	180	192	196	204
302/16	PELJ	140	146	173	173	107	107	191	191	211	221	186	192	180	180	196	212
302/17	PELJ	146	146	173	173	107	109	191	191	211	211	186	196	180	180	204	212
302/18	PELJ	140	146	173	173	107	109	191	193	211	221	186	186	174	192	196	212
302/19	PELJ	140	140	173	175	107	109	191	191	221	221	192	194	192	195	196	212
302/20	PELJ	140	146	173	173	107	109	191	191	211	221	186	194	180	195	196	212
302/21	PELJ	140	146	173	173	107	107	191	191	219	221	186	192	180	192	196	196
302/22	PELJ	140	146	173	173	107	107	191	191	211	221	186	192	180	192	196	212
302/23	PELJ	140	146	173	173	107	109	191	191	211	219	186	186	192	198	196	212
302/24	PELJ	140	152	173	173	105	107	191	191	211	221	186	194	174	180	202	212
209/1	PELJ	152	152	173	173	109	109	183	191	215	227	194	204	174	180	200	202
209/2	PELJ	140	152	173	177	107	109	183	191	211	211	196	204	192	201	202	204
209/3	PELJ	140	152	177	177	105	109	183	191	211	227	204	214	180	201	200	202
209/4	PELJ	140	152	173	175	109	109	191	191	211	227	186	214	180	201	200	204
209/5	PELJ	146	152	173	177	105	109	183	183	211	211	204	204	180	201	200	202
209/6	PELJ	140	140	177	177	109	109	183	183	211	211	204	204	198	201	196	202
209/7	PELJ	152	152	177	177	105	109	183	191	211	227	204	214	180	201	200	200
209/8	PELJ	140	152	173	177	109	109	191	191	211	221	198	214	180	201	200	202
209/9	PELJ	140	152	177	177	105	109	191	191	227	227	214	214	201	201	200	202
209/10	PELJ	152	152	173	173	105	109	183	183	211	211	204	204	180	180	202	202
209/11	PELJ	152	152	177	177	109	109	183	183	211	211	204	204	201	201	200	200
209/12	PELJ	140	140	173	177	105	109	183	191	211	221	198	204	180	201	196	200
209/13	PELJ	140	152	173	177	105	105	183	191	211	227	204	214	180	201	200	202
209/14	PELJ	140	140	173	177	105	107	183	191	211	227	204	214	180	201	200	202
209/15	PELJ	140	140	173	177	105	105	183	191	211	227	204	214	180	201	200	202
209/16	PELJ	140	140	173	173	105	109	183	191	211	227	204	214	180	201	196	202
209/17	PELJ	140	152	173	177	109	109	183	191	221	227	198	204	180	180	196	200
209/18	PELJ	140	152	173	177	109	109	191	191	221	227	198	214	180	198	196	200

209/19	PELJ	140	152	173	173	109	109	191	191	227	227	214	214	180	201	200	202
209/20	PELJ	140	140	173	177	105	109	191	191	227	227	214	214	180	201	200	200
209/21	PELJ	140	140	173	177	105	109	183	191	211	227	204	214	201	201	200	202
209/22	PELJ	140	140	173	177	109	109	183	183	211	211	204	204	180	180	200	200
209/23	PELJ	140	152	177	177	107	109	183	191	211	221	204	204	201	201	198	202
209/24	PELJ	140	152	173	177	105	109	183	183	211	211	204	204	180	180	202	202
270/1	PELJ	140	140	173	175	105	105	191	191	221	229	198	200	198	198	200	212
270/2	PELJ	140	140	173	175	105	107	191	191	215	219	198	200	174	198	194	206
270/3	PELJ	152	152	173	175	109	113	191	191	211	229	198	200	174	198	196	200
270/4	PELJ	140	152	173	177	107	109	191	191	215	215	186	194	174	198	200	212
270/5	PELJ	140	140	173	175	107	109	191	191	211	229	200	202	174	198	194	200
270/6	PELJ	152	152	173	173	105	109	191	191	215	229	186	200	174	198	194	200
270/7	PELJ	140	140	175	177	105	109	191	191	219	229	198	200	174	198	200	200
270/8	PELJ	140	140	173	173	107	109	191	191	219	229	198	200	174	198	200	206
270/9	PELJ	146	152	173	173	105	109	191	191	221	229	198	200	174	180	196	200
270/10	PELJ	140	154	175	177	105	113	191	191	211	215	186	198	174	198	196	200
270/11	PELJ	140	152	175	177	105	107	191	191	211	229	186	200	174	174	194	200
270/12	PELJ	152	152	173	177	109	113	191	191	211	215	186	198	198	198	200	200
270/13	PELJ	140	152	173	173	105	109	191	191	215	225	186	208	174	180	194	200
270/14	PELJ	140	152	173	175	105	109	191	191	211	215	186	196	180	198	194	196
270/15	PELJ	140	152	173	173	105	109	191	191	215	215	186	202	174	174	194	200
270/16	PELJ	140	152	173	173	105	107	191	191	211	229	200	202	174	180	194	200
270/17	PELJ	152	152	173	175	105	105	191	191	229	229	200	200	174	198	194	200
270/18	PELJ	140	140	173	175	107	109	191	191	215	225	186	208	174	174	194	202
270/19	PELJ	140	140	173	175	105	105	191	191	215	215	186	186	174	198	194	194
270/20	PELJ	140	152	173	175	105	107	191	191	215	227	186	202	174	198	194	206
270/21	PELJ	140	152	173	173	105	109	191	191	215	229	186	200	174	174	194	200
270/22	PELJ	140	152	175	177	105	109	191	191	225	229	186	208	180	198	194	200
270/23	PELJ	140	152	175	175	105	109	191	191	229	229	200	200	174	198	194	200
267/1	PELJ	140	152	173	173	105	107	191	191	225	229	200	208	180	198	200	202
267/2	PELJ	140	140	173	173	105	107	191	191	215	225	194	208	174	180	196	202
267/3	PELJ	140	140	173	195	107	109	191	191	221	225	186	208	174	195	196	202
267/4	PELJ	140	140	173	173	107	107	191	191	225	225	208	208	174	180	194	202
267/5	PELJ	140	140	173	173	107	107	191	191	225	225	208	208	174	180	202	202
267/6	PELJ	140	140	173	173	107	107	191	191	211	211	202	202	174	180	194	202
267/7	PELJ	140	140	173	173	107	107	191	191	211	227	202	202	174	174	194	206
267/8	PELJ	140	140	173	175	107	107	191	191	219	225	202	208	180	180	202	212
267/9	PELJ	140	140	173	177	107	107	191	191	225	227	202	208	174	180	202	206
267/10	PELJ	140	146	173	173	107	107	191	191	219	225	202	208	174	180	194	212
267/11	PELJ	140	140	173	195	107	107	191	191	219	225	198	208	180	180	202	218

267/12	PELJ	140	152	173	195	107	109	191	191	211	215	194	202	174	198	194	200
267/13	PELJ	140	146	173	173	105	107	191	191	211	231	200	202	180	180	194	196
267/14	PELJ	140	154	173	173	105	107	191	191	211	219	188	202	180	180	194	196
267/15	PELJ	140	152	173	195	105	107	191	191	211	215	194	202	174	180	194	212
267/16	PELJ	140	140	173	175	105	107	191	191	215	225	186	208	174	198	194	202
267/17	PELJ	140	140	173	175	105	107	191	191	211	229	200	202	180	198	194	200
267/18	PELJ	140	140	173	173	107	107	191	191	211	219	198	202	174	180	194	212
267/19	PELJ	140	152	173	173	105	107	191	191	211	229	200	202	174	180	194	200
267/20	PELJ	140	140	173	173	107	109	191	191	211	221	192	202	180	180	194	200
267/21	PELJ	140	146	173	173	107	109	191	191	225	225	186	208	180	198	200	202
267/22	PELJ	140	140	173	173	105	107	191	191	211	215	186	202	180	198	194	194
267/23	PELJ	140	152	173	173	105	107	191	191	211	221	186	202	174	174	194	200
261/1	PELJ	140	152	173	177	107	109	191	191	219	219	188	198	174	174	196	200
261/2	PELJ	140	152	173	173	107	109	191	191	219	219	188	198	174	174	200	200
261/3	PELJ	140	140	173	173	107	109	191	191	219	231	194	198	174	174	200	204
261/4	PELJ	140	152	173	173	107	109	191	191	219	229	186	198	174	180	200	204
261/6	PELJ	140	152	173	177	107	107	191	191	211	219	186	188	174	180	196	200
261/7	PELJ	140	146	173	173	107	109	191	191	219	231	188	194	174	180	196	200
196/1	PELJ	140	152	177	177	105	107	191	191	227	227	214	214	201	201	198	206
196/2	PELJ	140	152	177	177	107	107	191	191	211	227	198	198	180	180	198	198
196/3	PELJ	152	152	177	177	105	107	191	191	211	227	214	214	201	201	200	200
196/4	PELJ	140	140	173	177	105	109	183	191	211	227	204	214	180	180	198	202
196/5	PELJ	140	152	173	177	107	109	191	191	211	211	196	198	180	201	198	200
196/6	PELJ	152	152	177	177	105	105	191	191	211	227	198	214	180	201	198	200
239/1	PELJ	152	152	173	175	107	109	191	191	211	211	196	196	174	174	196	196
239/2	PELJ	140	146	173	177	107	109	191	191	211	231	186	188	174	180	196	204
239/3	PELJ	140	152	173	175	105	109	191	191	211	221	196	198	174	180	196	200
239/4	PELJ	140	152	175	177	109	109	191	191	215	221	186	186	174	198	196	200
239/5	PELJ	140	140	173	175	107	109	191	193	211	221	186	196	174	174	196	212
239/6	PELJ	140	140	175	195	105	105	191	191	221	221	186	186	174	174	196	212
23/1	PELJ	152	152	173	175	107	107	191	191	215	219	186	198	174	174	200	202
23/2	PELJ	140	152	173	195	105	109	183	191	219	221	198	214	174	198	194	202
23/3	PELJ	140	152	175	195	109	113	191	193	215	219	186	186	174	180	198	200
23/4	PELJ	152	152	173	173	107	109	191	191	219	219	198	198	174	174	200	202
23/5	PELJ	140	146	173	173	107	109	191	191	215	221	186	202	174	198	200	206
189/1	PELJ	140	146	177	177	107	107	183	183	211	211	204	204	201	201	200	200
189/2	PELJ	146	146	173	177	105	109	191	191	211	211	198	198	198	201	194	200
189/3	PELJ	140	140	173	177	107	109	191	191	211	211	198	202	174	201	194	200
189/4	PELJ	140	152	173	173	105	109	183	191	211	211	198	198	180	180	194	200
189/5	PELJ	146	152	177	177	107	107	183	191	211	227	204	214	180	201	198	200



27/1	PELJ	140	152	173	175	105	113	191	191	211	211	198	214	174	195	198	202
27/2	PELJ	152	154	173	175	105	107	193	197	211	219	186	194	180	195	198	202
27/3	PELJ	146	152	175	195	107	113	191	193	211	219	186	194	174	195	196	198
27/4	PELJ	140	152	175	175	107	113	191	193	211	219	186	194	195	198	194	202
27/5	PELJ	146	152	173	195	105	113	191	193	219	221	186	198	180	195	196	202
27/6	PELJ	140	152	195	195	107	107	183	191	211	221	198	214	180	180	198	204
27/7	PELJ	140	152	175	195	105	107	191	191	211	229	198	198	174	180	198	202
27/8	PELJ	152	154	175	177	107	113	191	193	219	227	186	198	195	198	198	202
27/9	PELJ	140	152	175	175	105	107	191	193	219	221	186	202	180	195	196	198
27/10	PELJ	152	154	175	177	105	107	191	197	211	211	194	198	180	195	198	202
27/11	PELJ	152	152	175	177	105	113	191	193	215	219	186	194	174	195	198	202
27/12	PELJ	152	152	177	195	105	107	191	193	215	219	186	194	174	180	198	202
27/13	PELJ	152	152	173	175	107	113	191	193	211	215	186	194	195	195	196	198
27/14	PELJ	152	154	195	195	107	111	191	193	215	219	186	186	180	198	198	198
27/15	PELJ	152	152	177	195	107	113	191	193	215	219	186	194	174	195	198	202
27/16	PELJ	152	152	175	175	105	113	191	193	219	221	186	202	180	195	196	198
27/17	PELJ	140	152	177	195	113	113	191	191	211	215	186	198	180	198	198	222
27/18	PELJ	146	152	173	175	109	113	191	191	211	221	198	214	174	195	194	202
27/19	PELJ	152	152	175	175	107	107	191	191	211	221	198	202	180	180	198	200
27/20	PELJ	152	152	175	175	105	113	191	193	219	221	186	202	180	180	200	202
27/21	PELJ	152	152	175	175	107	113	191	191	219	227	198	202	174	195	200	202
27/22	PELJ	140	152	177	195	107	107	191	193	219	221	186	202	174	180	196	198
27/23	PELJ	152	154	173	195	107	113	191	193	215	219	186	186	195	195	198	202
27/24	PELJ	140	152	173	175	105	113	191	191	211	215	186	198	195	195	198	198
211/1	PELJ	146	154	173	173	109	109	191	191	211	231	194	194	180	192	202	204
211/2	PELJ	146	152	173	173	109	109	191	191	211	211	196	198	180	192	196	204
211/3	PELJ	152	154	173	173	109	109	191	191	211	211	196	198	174	192	196	202
211/4	PELJ	146	154	173	177	105	109	191	191	211	211	196	198	180	192	194	202
211/5	PELJ	146	154	173	173	109	109	191	191	211	231	194	196	192	192	204	204
211/7	PELJ	146	154	173	173	105	109	191	191	211	231	194	198	180	201	200	204
211/8	PELJ	140	146	173	173	109	109	191	191	221	231	194	198	180	198	196	204
211/9	PELJ	146	146	173	173	109	109	191	191	211	231	194	196	192	192	202	204
211/10	PELJ	140	154	173	177	107	109	191	191	227	231	194	214	192	201	202	206
211/11	PELJ	146	146	173	173	105	109	191	191	211	211	196	196	180	198	200	202
211/12	PELJ	146	152	173	177	105	109	183	191	211	231	194	204	192	201	200	202
211/13	PELJ	140	154	173	173	105	109	191	191	221	231	194	214	180	198	194	204
211/14	PELJ	140	146	173	173	107	109	191	191	211	221	196	200	192	192	202	204
211/15	PELJ	146	152	173	177	105	109	191	191	211	227	196	214	180	201	200	202
211/16	PELJ	146	152	173	173	109	109	191	191	211	211	196	196	174	180	196	202
211/17	PELJ	146	152	173	177	109	109	191	191	227	231	194	214	180	192	200	204

211/18	PELJ	140	154	173	173	107	109	191	191	211	231	194	202	174	180	194	204
211/19	PELJ	146	146	173	173	105	109	191	191	211	219	196	214	192	198	200	202
211/21	PELJ	140	146	173	177	109	109	183	191	211	211	196	204	192	198	202	202
211/22	PELJ	146	146	173	173	105	109	191	191	211	211	196	198	180	198	200	202
211/23	PELJ	154	154	173	173	109	109	191	191	211	211	194	196	192	192	202	202
144/1	PELJ	146	152	173	173	109	109	191	191	211	211	196	196	198	201	200	200
144/2	PELJ	146	152	173	177	109	109	191	191	211	225	196	208	174	198	194	200
144/3	PELJ	146	152	173	173	109	109	191	191	211	211	196	198	198	201	194	200
144/4	PELJ	152	152	173	177	105	109	191	191	211	211	196	198	180	201	198	200
144/5	PELJ	140	146	173	173	109	109	183	191	211	211	196	204	180	201	194	196
144/6	PELJ	146	146	173	173	105	109	191	191	211	211	198	198	198	201	194	194
144/7	PELJ	146	152	173	173	105	105	191	191	211	211	196	196	198	201	194	200
144/8	PELJ	152	152	173	173	109	109	191	191	211	211	196	196	198	201	194	200
144/9	PELJ	140	146	173	173	105	107	191	191	211	219	196	198	174	198	194	206
144/10	PELJ	152	154	173	173	105	109	191	191	211	219	198	198	177	201	194	196
144/11	PELJ	140	146	173	177	105	105	191	191	211	227	198	214	180	201	194	200
144/12	PELJ	146	146	173	173	105	109	191	191	211	211	196	198	198	201	194	200
144/13	PELJ	146	152	173	173	105	107	191	191	211	211	196	198	180	201	200	200
144/14	PELJ	152	152	173	173	109	109	191	191	211	211	196	196	198	201	194	194
144/15	PELJ	146	152	173	173	105	109	191	191	211	211	196	198	198	201	200	200
144/16	PELJ	146	152	173	173	105	109	191	191	211	211	196	198	198	201	194	200
144/17	PELJ	140	152	173	173	109	109	191	191	211	211	196	198	180	201	200	200
144/18	PELJ	140	146	173	173	105	109	183	191	211	211	198	204	180	198	200	202
144/19	PELJ	146	146	173	173	105	107	191	191	211	219	196	214	198	201	194	206
144/20	PELJ	146	152	173	173	105	105	191	191	211	211	198	198	198	201	194	194
144/21	PELJ	140	152	173	173	109	109	191	191	211	221	196	198	180	201	194	196
144/22	PELJ	140	146	173	173	109	109	183	191	211	211	196	204	180	201	194	202
203/1	PELJ	140	152	173	177	107	109	191	191	211	211	196	198	180	198	198	200
203/2	PELJ	140	140	173	173	109	109	191	191	211	211	196	196	198	198	198	204
203/3	PELJ	140	140	173	177	109	109	191	191	211	211	196	198	180	198	200	204
203/4	PELJ	140	140	173	177	109	109	191	191	211	211	196	198	198	201	198	200
203/5	PELJ	140	152	173	173	105	109	191	191	211	215	194	196	180	198	196	198
203/6	PELJ	140	152	173	173	105	109	191	191	211	211	196	198	198	201	194	198
203/7	PELJ	140	140	173	173	109	109	191	191	211	221	196	198	180	198	198	202
203/8	PELJ	140	140	177	177	109	109	191	191	211	211	196	196	198	198	198	198
203/9	PELJ	140	146	173	177	109	109	191	191	211	231	194	196	180	198	202	204
203/10	PELJ	140	140	173	177	109	109	191	191	211	211	196	196	198	198	198	198
203/11	PELJ	140	140	173	177	109	109	191	191	211	221	196	198	198	198	196	204
203/12	PELJ	140	152	173	173	109	109	191	191	211	227	196	214	198	201	202	204
203/13	PELJ	140	140	173	173	109	109	191	191	211	221	196	198	180	198	196	204

203/14	PELJ	140	152	173	173	109	109	191	191	211	211	196	196	198	201	194	204
203/15	PELJ	140	152	173	177	109	109	191	191	211	211	196	198	198	198	194	204
203/16	PELJ	140	140	173	177	109	109	183	191	211	211	196	204	198	198	202	204
203/17	PELJ	140	146	173	173	105	109	191	191	211	211	196	196	198	198	198	200
203/18	PELJ	140	140	173	177	109	109	191	191	211	211	196	214	180	198	198	202
203/19	PELJ	140	140	173	173	109	109	191	191	211	211	196	196	198	198	198	198
203/20	PELJ	140	140	173	177	109	109	191	191	211	211	196	198	198	198	198	200
203/21	PELJ	140	152	173	177	107	109	191	191	211	211	196	198	198	201	198	200

**Prilog 3.** Prikaz veličine alela mikrosatelitnih lokusa 14 uzoraka listova majčinskih biljaka kratkozupčaste kadulje s poluotoka Pelješca

oznaka	pop	SoUZ001	SoUZ002	SoUZ005	SoUZ004	SoUZ011	SoUZ006	SoUZ014	SoUZ007								
192x	PELJ	140	140	173	177	107	107	191	191	221	227	204	214	174	201	198	206
302x	PELJ	140	146	173	173	107	107	191	191	211	221	186	192	180	192	196	212
209x	PELJ	140	152	173	177	105	109	183	191	211	227	204	214	180	201	200	202
270x	PELJ	140	152	173	175	105	109	191	191	215	229	186	200	174	198	194	200
267x	PELJ	140	140	173	173	107	107	191	191	211	225	202	208	174	180	194	202
261x	PELJ	140	152	173	177	107	109	191	191	219	219	188	198	174	174	196	200
196x	PELJ	140	152	177	177	105	107	191	191	211	227	198	214	180	201	198	200
239x	PELJ	140	152	175	177	109	109	191	191	211	221	186	196	174	174	196	212
23x	PELJ	140	152	173	175	107	109	191	191	215	219	186	198	174	174	200	202
189x	PELJ	140	146	173	177	107	109	183	191	211	211	198	204	180	201	200	200
27x	PELJ	152	152	175	195	107	113	191	193	211	219	186	198	180	195	198	202
211x	PELJ	146	154	173	173	109	109	191	191	211	231	194	196	180	192	202	204
144x	PELJ	146	152	173	173	105	109	191	191	211	211	196	198	198	201	194	200
203x	PELJ	140	140	173	177	109	109	191	191	211	211	196	196	198	198	198	204

**Prilog 4.** Prikaz odnosa individualne heterozigotnosti i sjemenki za samooplodnju/stranooplodnju.

SAMOOPLODNJA					
oznaka sjemenke	broj heterozigota	udio/ %	oznaka sjemenke	broj heterozigota	udio/ %
23/1	4	50	209/10	1	12,5
23/4	2	25	209/11	0	0
144/1	2	25	209/13	7	87,5
144/3	4	50	209/15	6	75
144/6	2	25	209/19	3	37,5
144/7	3	37,5	209/20	3	37,5
144/8	2	25	209/21	6	75
144/12	4	50	209/22	1	12,5
144/14	1	12,5	209/24	3	37,5
144/15	4	50	211/1	4	50
144/16	5	62,5	211/5	3	37,5
144/20	2	25	211/9	3	37,5
189/1	1	12,5	211/23	1	12,5
192/1	3	37,5	261/1	5	62,5
192/8	2	25	261/2	3	37,5
192/10	1	12,5	267/4	2	25
192/20	5	62,5	267/5	1	12,5
196/2	2	25	267/6	2	25
196/3	2	25	270/6	5	62,5
196/6	4	50	270/17	3	37,5
203/2	1	12,5	270/19	2	25
203/8	0	0	270/21	5	62,5
203/10	1	12,5	270/23	4	50
209/3	7	87,5	302/11	4	50
209/7	5	62,5	302/16	4	50
209/9	3	37,5	302/22	5	62,5

STRANOOPLODNJA								
oznaka sjemenke	broj heterozigota	udio/ %	oznaka sjemenke	broj heterozigota	udio/ %	oznaka sjemenke	broj heterozigota	udio/ %
23/2	8	100	192/28	4	50	239/5	6	75
23/3	7	87,5	192/29	5	62,5	261/3	4	50
23/5	6	75	192/30	5	62,5	261/4	6	75
27/1	6	75	192/31	4	50	261/6	6	75
27/2	8	100	192/32	6	75	261/7	6	75
27/3	8	100	192/33	5	62,5	267/1	6	75
27/4	7	87,5	192/34	7	87,5	267/2	5	62,5
27/5	8	100	192/35	6	75	267/3	6	75
27/6	5	62,5	192/36	5	62,5	267/7	2	25
27/7	6	75	192/37	7	87,5	267/8	4	50
27/8	8	100	196/1	3	37,5	267/9	5	62,5
27/9	7	87,5	196/4	6	75	267/10	5	62,5
27/10	7	87,5	196/5	6	75	267/11	4	50
27/11	7	87,5	203/1	6	75	267/12	7	87,5
27/12	7	87,5	203/3	4	50	267/13	5	62,5
27/13	6	75	203/4	4	50	267/14	5	62,5
27/14	5	62,5	203/5	6	75	267/15	7	87,5
27/15	7	87,5	203/6	5	62,5	267/16	6	75
27/16	6	75	203/7	4	50	267/17	6	75
27/17	6	75	203/9	6	75	267/18	4	50
27/18	7	87,5	203/11	4	50	267/19	6	75
27/20	5	62,5	203/12	5	62,5	267/20	4	50
27/21	5	62,5	203/13	4	50	267/21	5	62,5
27/22	7	87,5	203/14	3	37,5	267/22	4	50
27/24	5	62,5	203/15	4	50	267/23	5	62,5
144/2	6	75	203/16	4	50	270/1	4	50
144/4	5	62,5	203/17	3	37,5	270/2	6	75
144/5	5	62,5	203/18	4	50	270/3	6	75
144/9	6	75	203/19	0	0	270/4	6	75
144/10	5	62,5	203/20	3	37,5	270/5	6	75
144/11	6	75	203/21	6	75	270/7	5	62,5
144/13	4	50	209/1	5	62,5	270/8	5	62,5
144/17	3	37,5	209/2	7	87,5	270/9	6	75
144/18	6	75	209/4	6	75	270/10	7	87,5
144/19	5	62,5	209/5	5	62,5	270/11	6	75
144/21	5	62,5	209/6	2	25	270/12	4	50
144/22	5	62,5	209/8	6	75	270/13	6	75
189/2	4	50	209/12	7	87,5	270/14	7	87,5
189/3	5	62,5	209/14	7	87,5	270/15	4	50
189/4	4	50	209/16	6	75	270/16	6	75
189/5	6	75	209/17	6	75	270/18	5	62,5
192/2	4	50	209/18	6	75	270/20	7	87,5
192/3	7	87,5	209/23	5	62,5	270/22	7	87,5
192/4	6	75	211/2	4	50	302/2	6	75
192/5	6	75	211/3	4	50	302/3	6	75
192/6	6	75	211/4	6	75	302/4	6	75
192/7	7	87,5	211/7	6	75	302/5	6	75
192/9	5	62,5	211/8	5	62,5	302/6	5	62,5
192/11	6	75	211/10	7	87,5	302/7	7	87,5
192/12	6	75	211/11	3	37,5	302/8	4	50
192/13	8	100	211/12	8	100	302/9	6	75
192/14	7	87,5	211/13	6	75	302/10	6	75
192/15	4	50	211/14	5	62,5	302/12	5	62,5
192/16	4	50	211/15	7	87,5	302/13	5	62,5
192/17	4	50	211/16	3	37,5	302/14	4	50
192/18	4	50	211/17	6	75	302/15	4	50
192/19	6	75	211/18	6	75	302/17	3	37,5
192/21	8	100	211/19	5	62,5	302/18	6	75
192/22	4	50	211/21	5	62,5	302/19	5	62,5
192/24	6	75	211/22	4	50	302/20	6	75
192/25	5	62,5	239/2	7	87,5	302/21	4	50
192/26	6	75	239/3	7	87,5	302/23	5	62,5
192/27	4	50	239/4	5	62,5	302/24	6	75

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođen sam 26.06.1996. godine u Čakovcu. Tamo sam završio II. osnovnu školu Čakovec i Srednju školu Čakovec, smjer opće gimnazije. 2015. godine upisao sam se na integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije; smjer: nastavnički, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od samog početka obrazovanja aktivno sudjelujem u različitim manifestacijama i njihovoj organizaciji poput GLOBE programa, Dani otvorenih vrata Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, itd. 2018. godine postao sam vodič Botaničkog vrta Prirodoslovno-matematičkog fakulteta gdje aktivno sudjelujem u vođenju posjetitelja kroz vrt. Svojim radom na području obrazovnog sustava doprinosim edukaciji i popularizaciji biologije i kemije među učenicima različite dobi.