

Z. LIBER^{1,2}, D. ŠKRTIĆ¹, I. RADOSAVLJEVIĆ^{1,2}, M JUG-DUJAKOVIĆ³, R. DI PIETRO⁴, Z. ŠATOVIĆ^{2,5}



¹Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

²Znanstveni centar izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja, Zagreb

³Institut za jadranske kulture i melioraciju krša Split

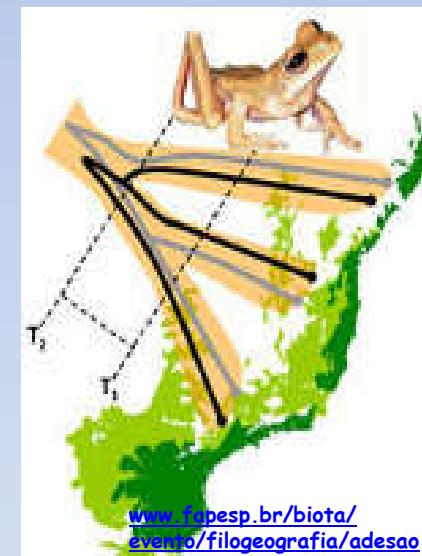
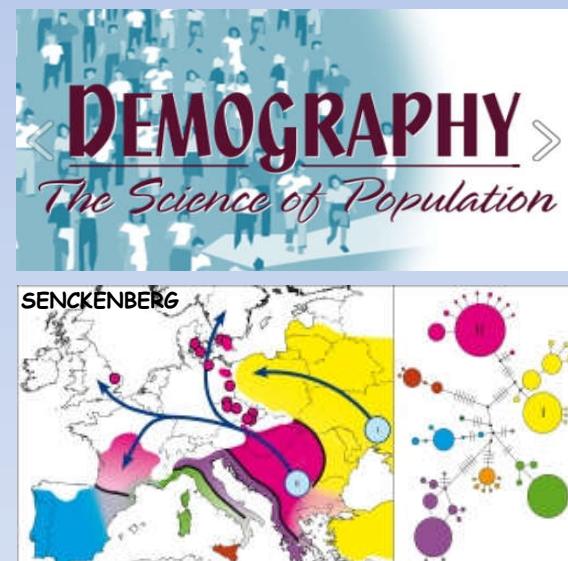
⁴Sapienza Università di Roma, Dipartimento di Pianificazione, Design e Tecnologia dell'Architettura, Roma

⁵Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb

RAZNOLIKOST KLOROPLASTNE DNA I FILOGEOGRAFIJA LJEKOVITE KADULJE (*SALVIA OFFICINALIS* L.)

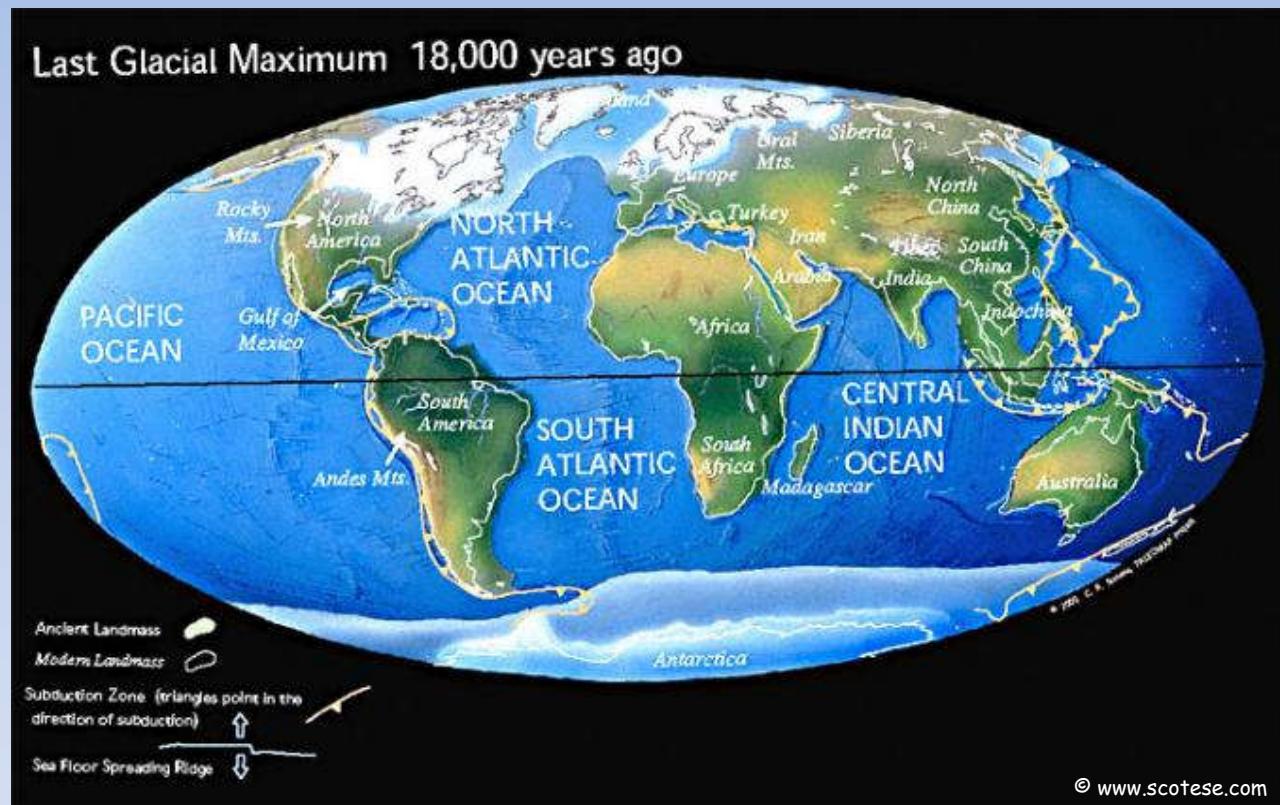


- **Filogeografija** - znanstvena disciplina koja proučava odnose između geografske rasprostranjenost i genetičke raznolikost unutar neke vrste
- **Demografija** - društvena znanost o dinamici **stanovništva** koja proučava njegovu veličinu, strukturu i razdiobu u prostoru te promjene tijekom vremena

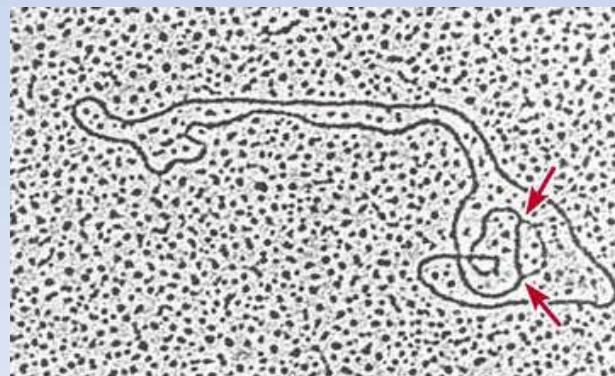
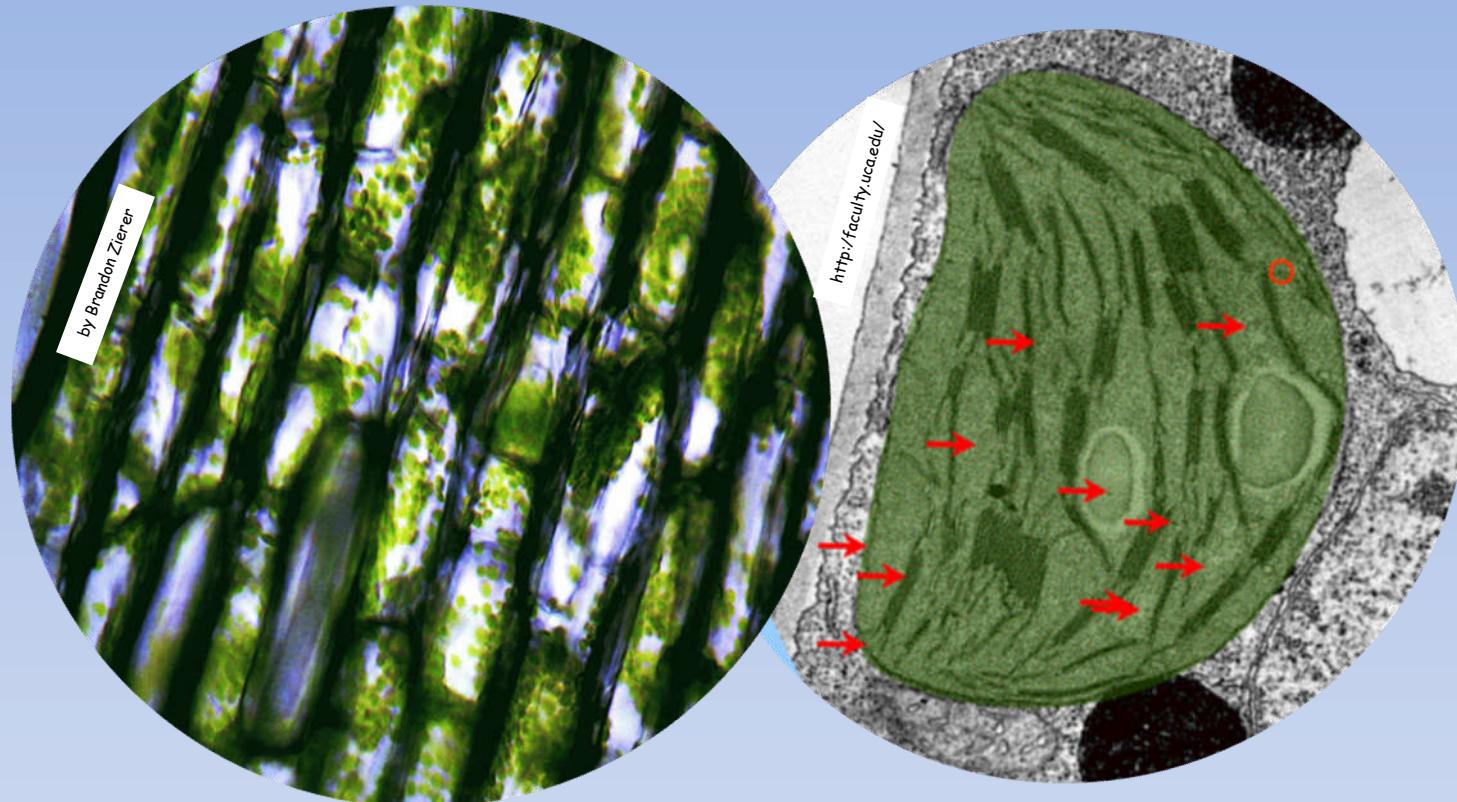


- **Filogeografija** - znanost o dinamici **populacija neke vrste** koja proučava njihovu genetičku raznolikost, veličinu, broj, strukturu i razdiobu u prostoru i vremenu.

- najveći utjecaj na današnju filogeografsku sliku europskih biljnih vrsta svakako su imale glacijacije u pleistocenu (~ od 2,5 milijuna do 12.000 godina), a u posljednjih nekoliko tisuća godina glavni čimbenik je čovjek

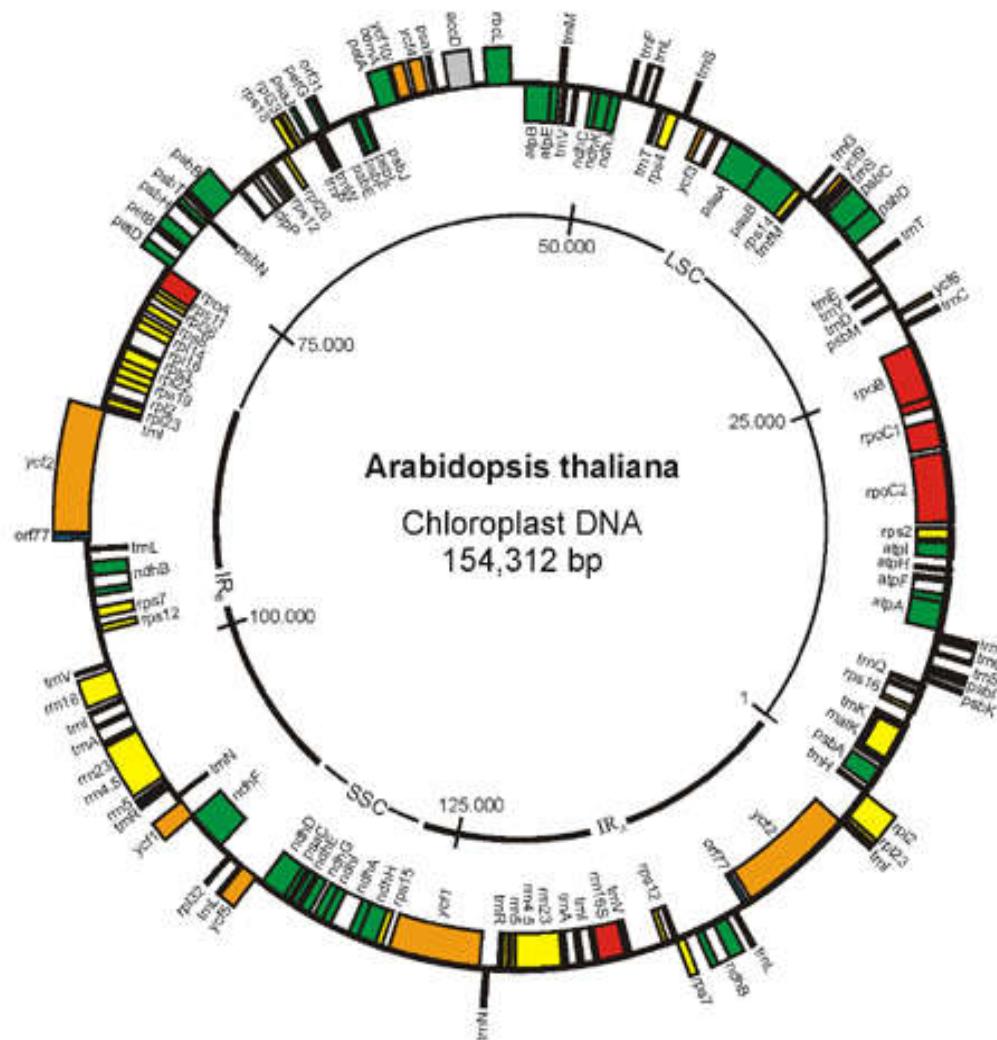


- filogeografska proučavanja biljnih vrsta intenzivirala su se otkrićem regija DNA odgovarajućeg evolucijskog tempa (npr. regije unutar kloroplastne DNA)



<https://www.slideshare.net>

$0.25 \mu\text{m}$

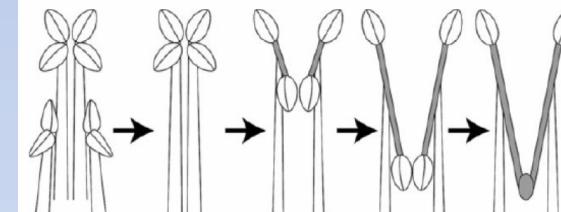
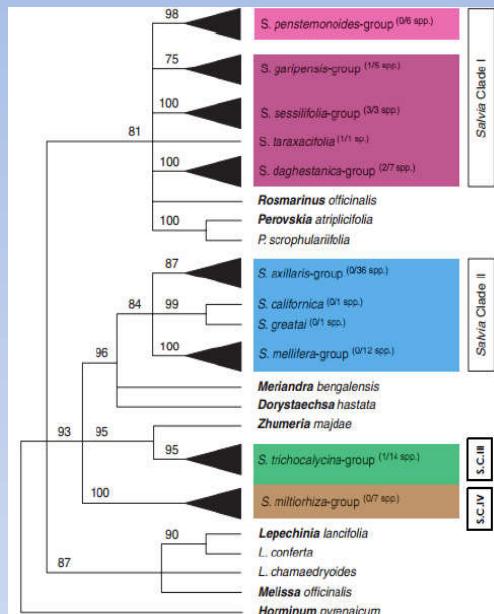
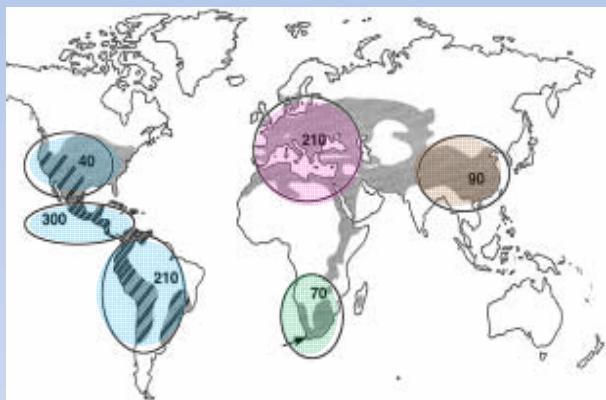


A. thaliana chloroplast DNA (inner circle: clockwise, outer: counter-clockwise). Function: transcription (red), translation (yellow), photosynthesis (green), tRNA (black), other (gray), unknown (orange). Sequence: AP000423

- veći broj kružnih ili linearnih DNA u svakom kloroplastu (cpDNA)
 - oko 100 gena
 - tijekom evolucije jedan dio gena ugradio se u jezgrin genom
 - nasljeđuje se uniparentalno (uglavnom majčinski)
 - evolucija kloroplastnih gena je puno sporija od onih u jezgri
 - filogenija cvjetnica *rbcL*
 - intergenerijski dijelovi cpDNA su bržeg evolucijskog tempa pogodni za filogeografske studije

Ljekovita kadulja (*Salvia officinalis* L.)

klasifikacija:
porodica Lamiaceae
rod *Salvia* (oko 1000 vrsta
Walker i sur. 2007)



Salvia officinalis L. je unutar roda klasificirana s još 12 europskih vrsta u sekciju *Salvia* (Hedge 1972)

Ljekovita kadulja je u domaćoj znanstvenoj i stručnoj literaturi te narodu poznata još i kao dalmatinska kadulja, mirisava kadulja, ljekovita žalfija, kuš, pelin, slavulja, šalvija, žalvija, narugvana kadulja, žalfija itd.

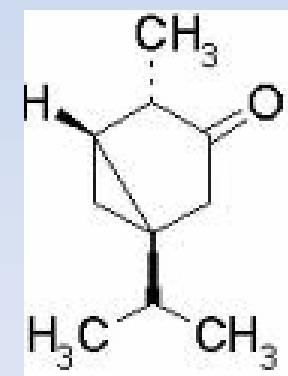
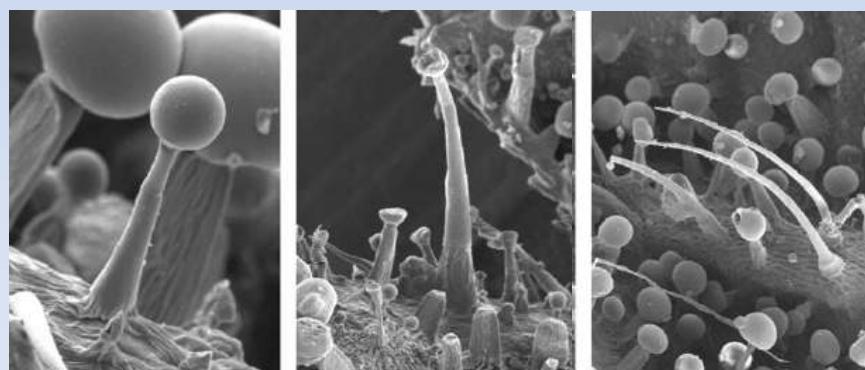
- višegodišnji grm otvorenih staništa



- cvjeta od ožujka do srpnja

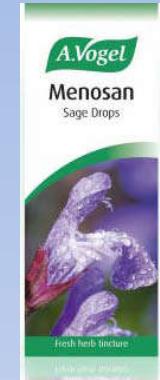


- vrijednost kadulje su njezina eterična ulja (100-tinjak spojeva, Jug-Dujaković i sur. 2012)



tujon

- ljekovita svojstva: protuupalno, antidepresivno, antiviralno, antibakterijsko, fungicidno, antioksidativno, protiv znojenja, hipoglikemijsko, digestivno itd.
- upotreba : kao medonosna biljka, kao ljekovita biljka, u prehrambenoj industriji, kemijskoj i farmaceutskoj industriji, hortikulturi itd.



- prinos i sastav eteričnog ulja kadulje ovisi o: podrijetlu biljke, odnosu dijelova biljke u sirovini, starosti organa, godišnjem dobu, godini, klimatskim uvjetima, lokaciji (Jug-Dujaković 2015)



S. o. 'Icterina'



S. o. 'Berggarton'

Ciljevi istraživanja:

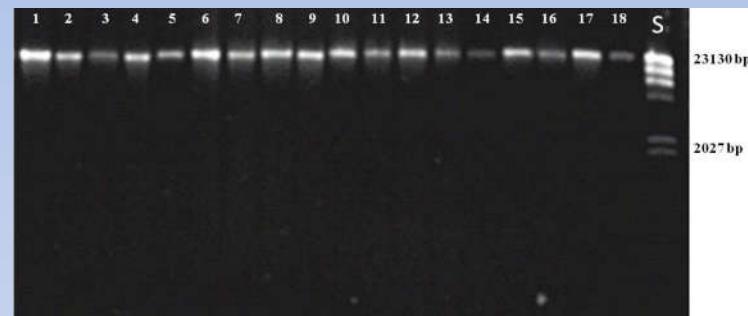
- 1) provesti sekvenciranje dvije nekodirajuće kloroplastne DNA regije na 318 jedinki iz 61 prirodne populacije s Balkanskog i Apeninskog poluotoka
- 2) primjenom odgovarajućih statističkih metoda i računalnih programa iz sekvenci kloroplastnih DNA utvrditi broj, populacijski sastav i distribuciju kloroplastnih haplotipova
- 3) procijeniti lokacije glacijacijskih utočišta i migracijske smjerove iz tih utočišta nakon zadnje oledbe,
- 4) utvrditi centre biološke raznolikosti i jedinstvenosti osobito važne u zaštiti i budućem uzgoju ove vrste
- 5) iz dobivenih rezultata procijeniti ljudski utjecaj na širenje ove ekonomski zanimljive vrste.



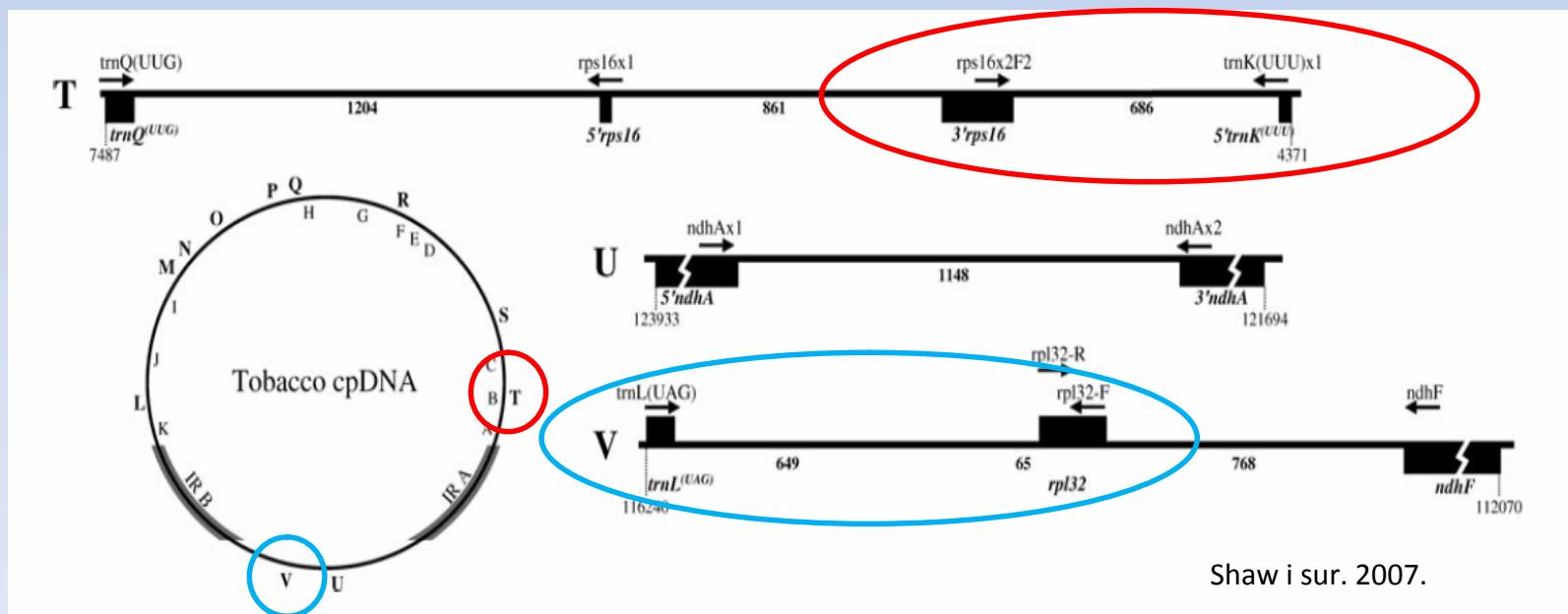
318 jedinki iz 61 populacije

Izolacija DNA:

- ukupna stanična DNA je izolirana iz 20 mg silika-gel osušenog lisnog tkiva pomoću GenElute™ Plant Genomic DNA kompleta (Sigma®).
- koncentracija i čistoća izolirane DNA je izmjerena pomoću Nanophotometra (Implen®) te agaroznom gel elektroforezom



PCR:



Shaw i sur. 2007.

PCR početnice:

rpl32_trnL

trnL_(UAG): CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT
rpL32-F: CAG TTC CAA AA A AAC GTA CTT C

rps16_trnK

rpS16x2F2: AAA GTG GGT TTT TAT GAT CC
trnK_(UUU)x1: TTA AAA GCC GAG TAC TCT ACC

PCR otopina (ukupno 25 µl):

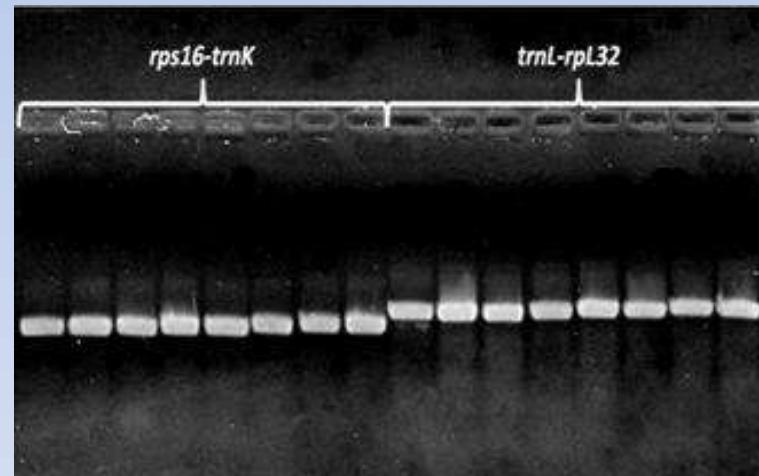
- 8.35 µl sterilizirane deionizirane vode (Qiagen®).
- 2.50 µl 10xPCR Buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂; TaKaRa®)
- 2.00 µl dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) mix (2.5 mM; TaKaRa®)
- 1.00 µl PCR početnica (PCR otopina 1: *rps16x2F2*; PCR otopina 2: *rpl32F*)
- 1.00 µl PCR početnica (PCR otopina 1: *trnK^{UUU}*; PCR otopina 2: *trnL^{UAG}*)
- 0.15 µl Taq HS DNA polymerase (5 U/ µl; TaKaRa)
- 10.00 µl DNA (c=0.5 ng/µl)

PCR program (GeneAmp® PCR System 9700 /Applied Biosystems®/):

- 94 °C 5 min,
- 35 ciklusa:
 - 94 °C 45s (DNA denaturacija),
 - 53 °C 1 min (vezanje početnica),
 - 72 °C 1 min, (unožavanje lanca),
- 72 °C 10 min,

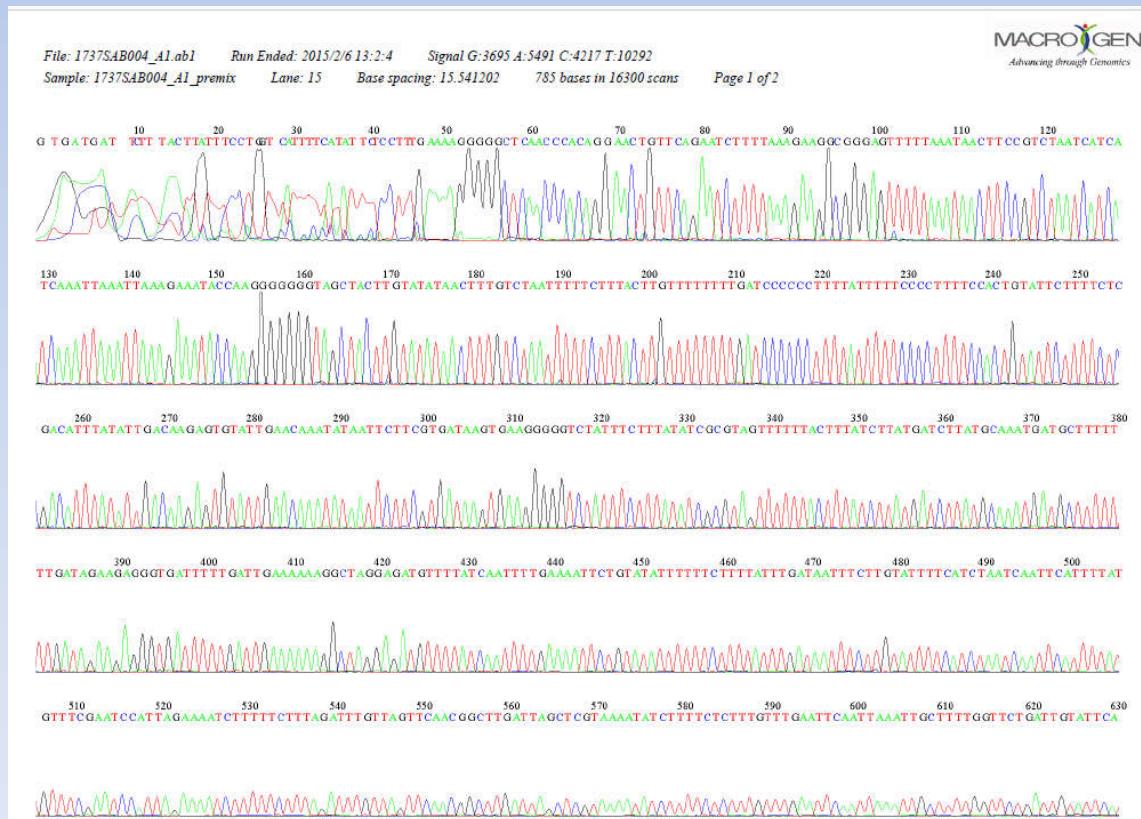
Pročišćavanje PCR produkata:

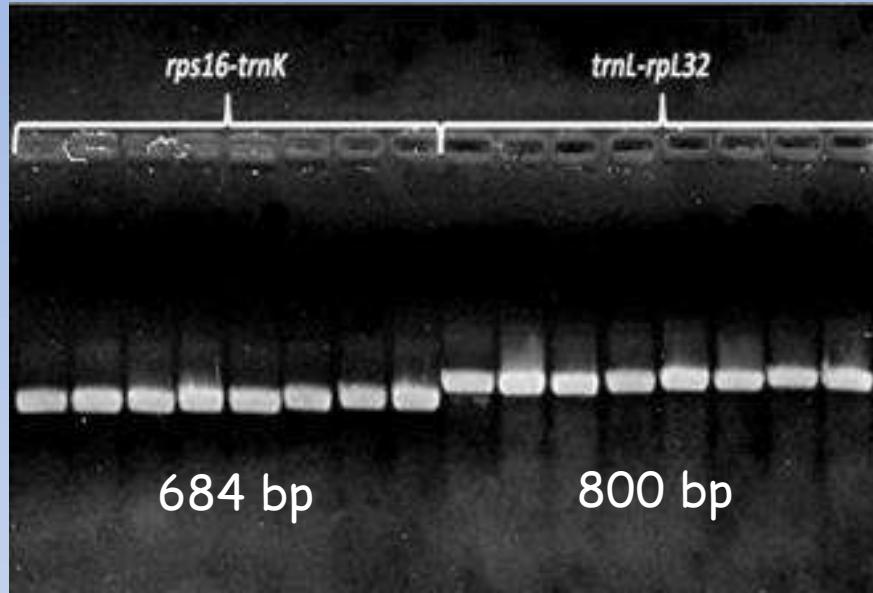
- reakcijska otopina:
 - 5.0 µl PCR produkta
 - 0.5 µl (10 U) egzonukleaze I
 - 1.0 µl (1 U) FastAP™ alkalne fosfataze
- inkubacija na 37 °C 15 min
- zaustavljanje reakcije 85 °C 15 min



Sekvenciranje DNA:

- automatsko dideoksi sekvenciranje koristeći BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®) i ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems®) (DNA servis Macrogen®)
 - svaki PCR uzorak sekvenciran je iz oba smjera



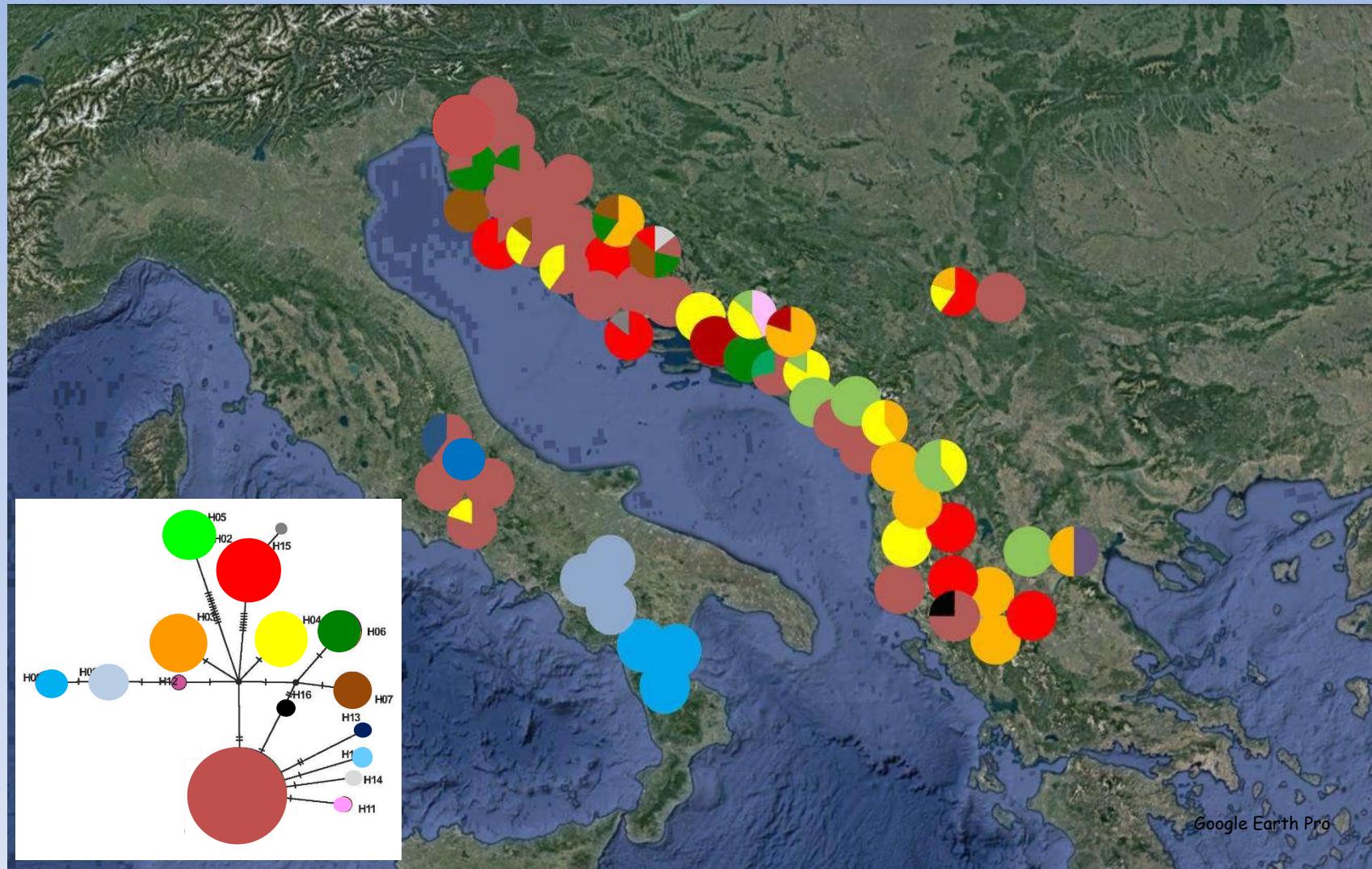


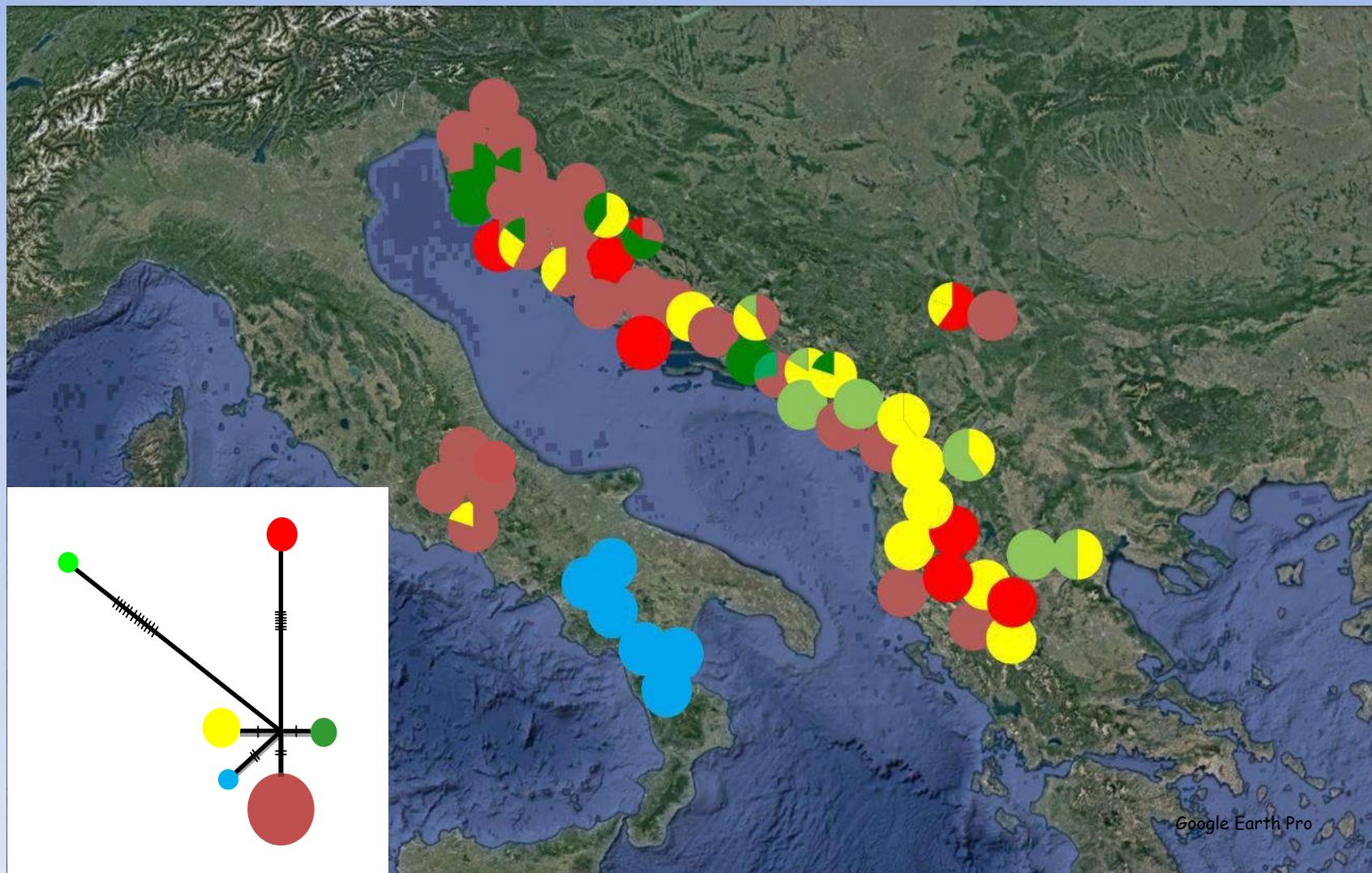
Variable (polymorphic) sites	65
Singleton variable sites	39
Parsimony informative sites	26
Number of haplotypes	16

Haplotype	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16
No. Ind.	113	40	35	30	24	22	17	14	7	4	3	3	2	2	1	1
No. Pop.	28	8	10	11	7	7	6	3	3	1	1	2	1	1	1	1

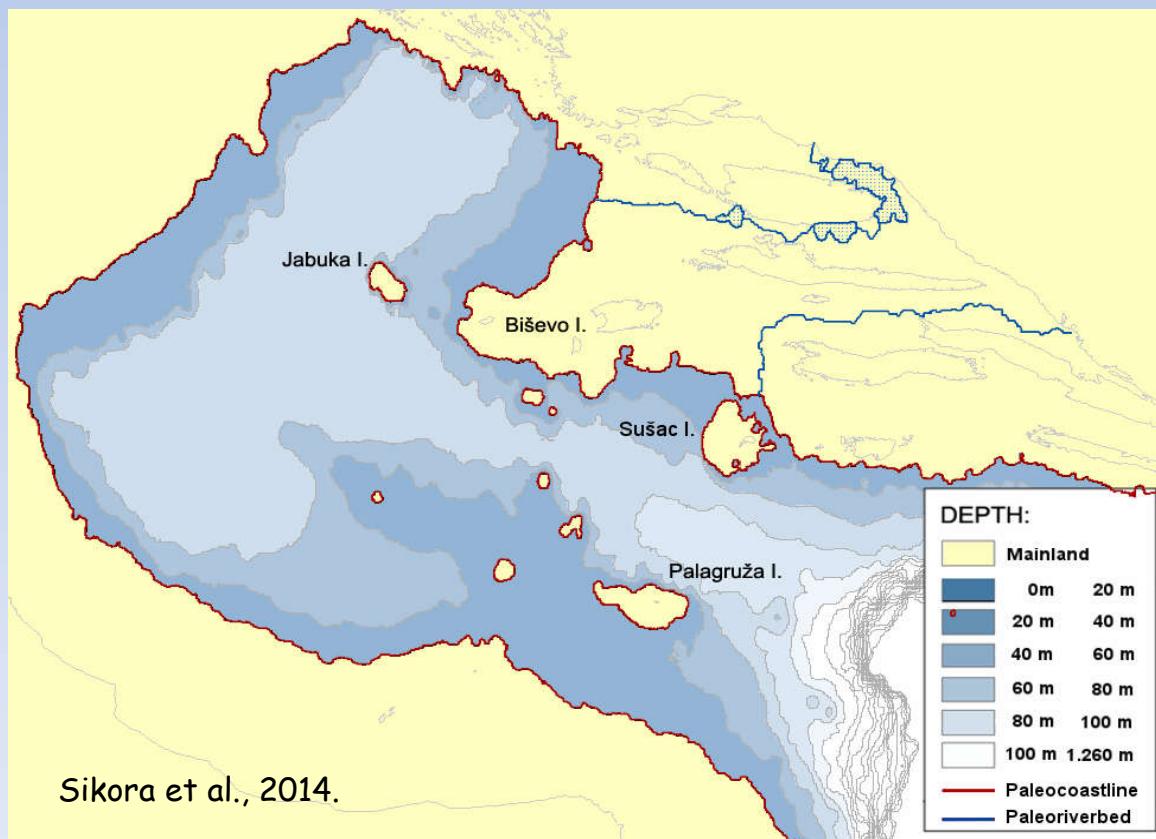
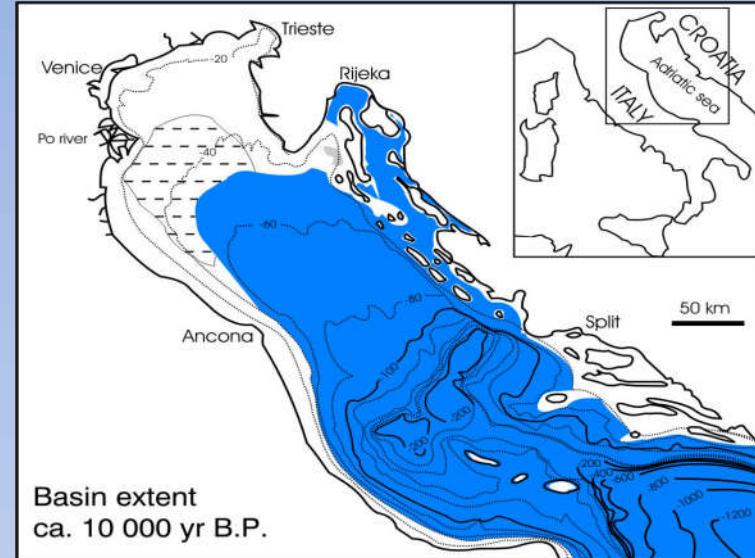
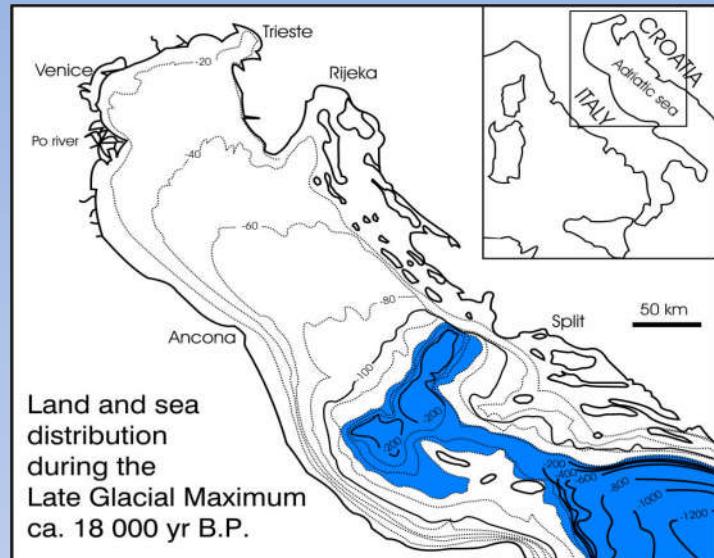
x	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12	H13	H14	H15
H01															
H02	9														
H03	3	8													
H04	3	8	2												
H05	14	19	13	13											
H06	4	9	3	3	14										
H07	4	9	3	3	14	2									
H08	4	9	3	3	14	4	4								
H09	5	10	4	4	15	5	5	1							
H10	1	10	4	4	15	5	5	5	6						
H11	1	10	4	4	15	5	5	5	6	2					
H12	3	8	2	2	13	3	3	1	2	4	4				
H13	2	11	5	5	16	6	6	7	3	3	5				
H14	1	10	4	4	15	5	5	5	2	2	4	3			
H15	10	1	9	9	20	10	10	10	11	11	9	12	11		
H16	1	10	4	4	15	3	5	5	6	2	4	3	2	11	

Haplotype	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16
No. Ind.	113	40	35	30	24	22	17	14	7	4	3	3	2	2	1	1
No. Pop.	28	8	10	11	7	7	6	3	3	1	1	2	1	1	1	1





Google Earth Pro



- starost roda *Salvia* je, prema fosilnim podacima peluda, procjenjena na oko 20 milijuna godina (Kadereit 2004).



- u Pleistocenu (prije 2,5 mil god. do 12000 godina) su zabilježene četiri velike glacijacije (Günz /670000 - 620000 god./; Mindel /480000 - 420000 god./; Riss /200000 do 130000 godina/; Würm /110000- 12000 godina/)



- predpostavlja se da je do diferencijacije roda došlo tijekom kasnog miocena i pliocenu (Claßen-Bockhoff i sur. 2002.)



Zaključci:

- 1) sekvenciranjem dvije nekodirajuće kloroplastne DNA regije 318 jedinki iz 61 prirodne populacije s Balkanskog i Apeninskog poluotoka utvrđeno je 16 kloroplastnih haplotipova
- 2) kloroplastna raznolikost i jedinstvenost haplotipova veća je na Balkanskom poluotoku nego na Apeninima
- 3) najveća unutarpopulacijska raznolikost utvrđena je za populacije kadulje u području ušća rijeka Žrmanja i Neretva
- 4) dobiveni rezultati se mogu povezati s promjenama veličine Jadranskog mora i refugijima tijekom ledenih doba (glacijacija /interglacijacija)
- 5) na južnom dijelu Balkanskog poluotoka zabilježena su dva haplotipa s najvećim brojem mutacija (H5 i H2) što ukazuje na reliktnost ljekovite kadulje u ovom području i vjerojatni centar širenja vrste

- 6) kadulja na Apeninskom poluotoku pokazuje dva jasno razlučena genetička skupa (sjeverni i južni)
- 7) sjeverne apeninske populacije pokazuju većinu kloroplastnih haplotipova karakterističnih za susjednu istočnojadransku obalu (mogućnost migracija tijekom glacijacija?)
- 8) južne apeninske populacije se za četiri (H8) odnosno pet mutacija (H9) razlikuju od najčešćeg haplotipa (H1), odnosno za tri ili četiri mutacije od južno-balkanskih populacija na suprotnoj strani Otrantskih vrata. Ovaj podatak ukazuje na reliktnost ovih populacija
- 9) poznavanjem alelne raznolikosti kloroplastnih DNA na području cijelog areala vrste u mogućnosti smo provesti kvalitetnije mjere zaštite
- 10) poznavanje genetičke raznolikosti ljekovite kadulje važno je za budući uzgoj i oplemenjivanje ove vrste

- Claßen-Bockhoff i sur. 2002. The staminal lever mechanism in *Salvia* L. (Lamiaceae) - A review. *Plant Biology* 5: 33-41.
- Hedge, I.C. *Salvia. U Flora Europaea*; Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A., Ur.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1972; Volume 3, pp. 188-192.
- Jug-Dujaković i sur. 2012. High Diversity of Indigenous Populations of Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.) in Essential-Oil Composition. *Chemistry & Biodiversity* 9: 2309-2323.
- Jug-Dujaković i sur. 2015. Ljekovita kadulja (*Salvia officinalis* L.): upotreba, uzgoj, berba epigenetika. Predavanje, Solin 13. svibnja 2015.
- Kadereit J. W. 2004. The Families and Genera of Vascular Plants Flowering Plants · Dicotyledons Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae), Springer.
- Sato i sur. 1999. Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis*. *DNA Research* 6: 283-290.
- Sikora i sur. 2014. Paleo-coastline of the Central Eastern Adriatic Sea, and Paleo-Channels of the Cetina and Neretva rivers during the last glacial maximum. *Acta Adriatica* 55(1): 3 - 18.
- Walker i sur. 2007. Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): Molecular Phylogenetic Evidence for multiple origins of the staminal lever. *Annals of Botany* 100: 375-391.

HVALA NA PAŽNJI!