

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

mr Danilo Lj. Stojanović

**STAROST I POREKLO
POPULACIJA VRSTE
Salvia officinalis L. (Lamiaceae)
U CENTRALNOM DELU
BALKANSKOG POLUOSTRVA -
MORFOMETRIJSKI I MOLEKULARNI
POKAZATELJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

MSci Danilo Lj. Stojanović

**THE AGE AND ORIGIN OF
Salvia officinalis L. (Lamiaceae)
POPULATIONS FROM THE CENTRAL
PART OF THE BALKAN PENINSULA –
MORPHOMETRICAL AND MOLECULAR
PARAMETERS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

Mentor:

dr Vladimir Stevanović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet,
redovni član SANU

Članovi komisije:

dr Radiša Jančić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu
Farmaceutski fakultet

dr Jelena Aleksić, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Datum odbrane:

Najiskrenije se zahvaljujem:

Mentoru, prof. dr Vladimiru Stevanoviću na ukazanom poverenju, izrazitoj predusretljivosti, strpljenju i savetima.

Prof. dr Radiši Jančiću koji je predložio temu istraživanja i pružio mi neizmernu podršku i razumevanje u svim segmentima rada i života.

Dr Jeleni Aleksić na nesebičnoj pomoći prilikom učenja molekularnih metoda i izrade disertacije, na istrajnosti i prijateljskoj podršci.

Prof. dr Dmitru Lakušiću na korisnim idejama i diskusijama i pomoći oko statističke obrade rezultata.

Prof. dr Marini Milenković i članovima Katedre za mikrobiologiju i imunologiju Farmaceutskog fakulteta što su mi omogućili rad u njihovoj laboratoriji, a posebno Ivanu Jančiću na optimizmu i savetima.

Dr Olji Vasić i dr Marjanu Niketiću na pomoći i pristupu herbarijumu Prirodnjačkog muzeja u Beogradu.

Dr Gordani Tomović, dr Tamari Rakić, dr Jasni Šinžar-Sekulić, dr Maji Lazarević, mr Ivani Živković i ostalim članovima Katedre za ekologiju i geografiju biljaka, Biološkog fakulteta na svesrdnoj pomoći, sugestijama i podršci.

Prof. dr Branislavi Lakušić i doc. dr Violeti Slavkovskoj na ogromnom razumevanju i značajnoj podršci.

Profesorki Branki Stevanović na pomoći koju mi je uvek pružala u važnim trenucima.

Dr Valentini Đorđević za mudre i korisne predloge.

Dr Branislavu Šileru i dr Ivani Bjedov na pomoći oko ekstrakcije DNK.

Goranu Foduloviću i Slobodanu Trmčiću na saradnji, bodrenju i svim danima zajedničkog rada na terenu i u laboratoriji.

Neizmerno sam zahvalan i mnogim, meni dragim osobama, čija podrška i dobronamernost su mi bili od ogromne pomoći kada mi je ponestajalo vere u sebe.

I najzad, najveću zahvalnost dugujem članovima moje porodice: mami, Verici i Dunji, čija ljubav i razumevanje mi pružaju radost i snagu svakog dana.

STAROST I POREKLO POPULACIJA VRSTE

Salvia officinalis L. (Lamiaceae)

U CENTRALNOM DELU BALKANSKOG POLUOSTRVA - MORFOMETRIJSKI I MOLEKULARNI POKAZATELJI

REZIME

Areal žalfije, *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae), na Balkanskom poluostrvu zahvata jadransko primorje i zaleđe. Postavlja se međutim, pitanje autohtonosti disjunktne, kontinentalne populacije u centralnom delu poluostrva, jer se ova termofilna vrsta od davnina koristi u lekovite svrhe, pa postoji mogućnost da su ove populacije antropogene, nastale nakon ledenog doba.

Da bi se utvrdila starost i poreklo ovih disjunktne populacije uzorkovano je 8 populacija za molekularna i 11 populacija za morfološka ispitivanja. Za filogeografski deo istraživanja korišćene su sekvence dva intragenska spejsera hloroplasta 3' *rps16-5'trnK* and *rpl32-trnL*. Detektovano je sedam haplotipova koji nisu bili nasumično zastupljeni i poseduju filogeografsku strukturu, kao i visok ukupni genetički diverzitet ($H_T = 0.695$) i genetičku diferencijaciju ($G_{ST} = 0.682$).

Prema molekularnom satu i bajeziskoj analizi, razdvajanja predačkog genskog pula *S. officinalis* na dve linije desilo se u pliocenu (pre 3,267 mil. godina), što se podudara sa vremenom kada su centralni deo Balkana prekrile velike vodene površine i po svoj prilici podelile pretpostavljeni predački areal *S. officinalis*. Strukturirana, manje divergentna kontinentalno-primorska linija (*CAL*, $H_d = 0.426$, $\pi = 0.00106$) i divergentnija isključivo primorska linija (*PAL*, $H_d = 0.403$, $\pi = 0.00257$) nemaju odlike nedavne demografske ekspanzije i danas se preklapaju na jugoistočnom delu jadranskog primorja, koje je označeno kao glavni glacialni refugijum *S. officinalis*.

Četiri populacije iz kontinentalnog dela Balkanskog poluostrva, koje čine kontinentalnu podliniju *CAL* odlikuje skoro isključivo prisustvo posebnog haplotipa koji je redak u primorskoj podliniji *CAL* i odsutan u *PAL*. Zbog bliske genealoške veze ovog i ancestralnog haplotipa prema parsimonijskoj statističkoj analizi, kao i zbog specifičnih odlika kontinentalne populacije, one su okarakterisane kao reliktno i refugijalne. Zbog

osobene istorije i izrazito ograničenog protoka semena ($Nm = 0.15$), preporučene su mere zaštite ovih populacija.

Prema koeficijentu varijacije, kao najviše varijabilni morfološki karakteri unutar vrste ističu se dužina cvasti i visina izdanka a kao najmanje varijabilni izdvajaju se dimenzije čašice. S obzirom da nije pronađena pravilnost u prostornoj distribuciji morfoloških osobenosti, dosadašnja infraspecijska taksonomija na ispitivanom području se mora preispitati.

Jasna korelacija između morfoloških i molekularnih podataka nije pronađena. Za razliku od distribucije haplotipova koja je geografski skoro sasvim diferencirana, morfološka varijabilnost ne odlikava geografsku udaljenost i izolovanost kontinentalnih populacija *S. officinalis*.

Ključne reči: *Salvia officinalis*, Balkan, filogeografija, morfometrija, plastidni genom, genetički diverzitet, disjunktan areal, glacijalni refugijum

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biljna taksonomija i fitogeografija

UDK broj: 635. 74 : 581. 527. 9 (043.3)

913 (4) (043.3)

**THE AGE AND ORIGIN OF *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae)
POPULATIONS FROM THE CENTRAL PART OF THE BALKAN
PENINSULA – MORPHOMETRICAL AND MOLECULAR
PARAMETERS**

ABSTRACT

Within Balkan Peninsula, *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae), common or Dalmatian sage, grows naturally along the Adriatic coast. However, the indigeneity of its distant continental disjunctions in Central Balkans is questionable, since this thermophilous species has been used in medicine for thousands of years and it may have been established post-glacially via anthropogenic mediation.

To reveal the origin and the age of its disjunctions, 8 and 11 populations were sampled for molecular and morphometrical investigation, respectively. Sequences of two chloroplast intergenic spacers, 3'*rps16*-5'*trnK* and *rpl32-trnL*, were used for phylogeographic study. Seven haplotypes, non-randomly distributed in space were found as well as high total gene diversity ($H_T = 0.695$) and genetic differentiation ($G_{ST} = 0.682$) showing a phylogeographic structure.

According to the strict clock Bayesian analysis, the divergence of an ancient *S. officinalis* gene pool to two lineages was dated to the Pliocene (3.267 Ma), which coincides with the period when the vast water bodies covered the central part of the Peninsula and presumably divided the paleo-distribution of *S. officinalis*. A sub-structured and less diverse *continental-Adriatic lineage* (*CAL*, $H_d = 0.426$, $\pi = 0.00106$) and a more diverse, *purely Adriatic lineage* (*PAL*, $H_d = 0.403$, $\pi = 0.00257$) do not exhibit signs of recent demographic expansions and currently overlap on the southeastern Adriatic coast, a region designated as the main glacial refugium of *S. officinalis*.

All four populations from the continental Balkans comprising the continental sub-lineage of *CAL* were almost fixed for a distinct haplotype which was rare in the Adriatic sub-lineage of *CAL* and absent in *PAL*. Given the close genealogical relation of that haplotype to the ancestral haplotype as inferred from a statistical parsimony analysis and other features of these populations, they were characterized as relict and

refugial. Conservation measures accounting for the historical distinctiveness of populations and exceptionally limited seed flow ($Nm = 0.15$) have been recommended.

According to the coefficient of variation, the most variable morphological characters were the height of the shoot and the length of the inflorescence, and the most conservative were characters of the flower. The regularity in the spatial distribution of the morphological distinctiveness was not found, which suggests that the previous infraspecific taxonomy in investigated area should be reassessed.

The clear correlation between morphological and molecular findings was not found. In contrast to the haplotype distribution, which was geographically almost completely differentiated, morphological variability does not reflect the geographical distance and isolation of continental populations of *S. officinalis*.

Keywords *Salvia officinalis*, the Balkans, phylogeography, morphometry, plastid genome, genetic diversity, disjunctions, glacial refugia,

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Plant taxonomy and phytogeography

UDK number: 635.74 : 581.527.9 (043.3)

913 (4) (043.3)

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Geneza Balkanskog poluostrva i njegovog biljnog sveta	3
1.2.	Žalfija (<i>Salvia officinalis</i> L.)	8
1.2.1.	Diverzitet, rasprostranjenje i poreklo roda <i>Salvia</i> L. (<i>Lamiaceae</i>).....	8
1.2.2.	Taksonomska i horološka pitanja o vrsti <i>Salvia officinalis</i> L.	11
1.2.3.	Deskripcija vrste	17
1.2.4.	Pregled istraživanja morfološke varijabilnosti <i>S. officinalis</i> na Balkanskom poluostrvu.....	18
1.2.5.	Ekologija i migratorne sposobnosti <i>S. officinalis</i>	21
1.2.6.	Uslovljenost distribucije žalfije njenim lekovitim svojstvima.....	23
1.3.	Molekularna (DNK) istraživanja	27
1.3.1.	Filogeografija	27
1.3.2.	Pregled dosadašnjih molekularnih istraživanja <i>S. officinalis</i>	31
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	34
3.	MATERIJAL I METODE	35
3.1.	Uzorkovanje biljnog materijala	35
3.2.	Molekularna ispitivanja	39
3.1.1.	Izolacija ukupne DNK	39
3.1.2.	PCR amplifikacija i sekvenciranje	40
3.1.3.	Elektroforeza na agaroznom gelu	41
3.1.4.	Seqvenciranje PCR produkata	42
3.1.5.	Procena genetičkog diverziteta i prostorne genetičke strukture	42
3.1.6.	Filogenetska analiza i procena vremena razdvajanja.....	45
3.1.7.	Test neutralnosti i demografske ekspanzije	46
3.3.	Morfometrijska ispitivanja	47
3.3.1.	Statistička obrada rezultata morfometrije	48
4.	REZULTATI.....	50
4.1.	Rezultati istraživanja molekularnih parametara	50
4.1.1.	Polimorfizam genskih markera, genetički diverzitet i prostorna genetička struktura.....	50

4.1.2. <i>Filogenetska analiza i procena vremena razdavajanja</i>	59
4.1.3. <i>Demografska analiza</i>	59
4.2. Rezultati analize morfoloških parametara.....	60
5. DISKUSIJA.....	75
5.1. Genetički diverzitet ispitivanih populacija <i>S. officinalis</i>	75
5.2. Fragmentacija paleo-areala <i>S. officinalis</i> u pliocenu	76
5.3. Evolutivna istorija <i>S. officinalis</i> u pleistocenu i pitanje autohtonosti kontinentalnih populacija	77
5.4. Pretpostavljeni glacijalni refugijumi <i>S. officinalis</i>	81
5.5. <i>S. officinalis</i> u holocenu (antropocenu)	82
5.6. Ugroženost i zaštita <i>S. officinalis</i> prema molekularnim nalazima	83
5.7. Morfološka varijabilnost <i>S. officinalis</i>	85
6. ZAKLJUČCI.....	90
7. LITERATURA	92
8. PRILOZI	104

1. UVOD

Salvia officinalis L. (Lamiaceae) je mediteranska aromatična vrsta koja na Balkanskom poluostrvu raste duž jadranske obale od Istre do Albanije. Nekoliko populacija, međutim, prisutno je i u centralnom delu poluostrva. Ove kontinentalne populacije su prostorno udaljene i reproduktivno izolovane od populacija iz glavnine areala.

Postavlja se pitanje porekla i starosti populacija žalfije, vrste skromnih ekspanzivnih sposobnosti, tako duboko u kopnu.

Mediteranski florni elementi prisutni u vegetaciji kontinentalnog dela Balkanskog poluostrva često se tretiraju kao relikti drevne vegetacije, koja je, sudeći prema fosilnim nalazima iz pliocena, imala dominantno mediteranski karakter. Mnoge vrste termofilnih krečnjačkih i serpentinitičkih staništa koje su ograničene na kontinentalne delove poluostrva pripadaju drevnim mediteranskim elementima. Međutim, većina mediteranskih elementa dopire u unutrašnjost kontinenta zahvaljujući antropogenim uticajima i stvaranjem povoljnih termofilnih staništa. Ovo se naročito odnosi na jednogodišnje vrste sa velikim reproduktivnim potencijalom (ADAMOVIĆ 1908, MIŠIĆ 1981, JANKOVIĆ 1990, STEVANOVIĆ I SAR 1995).

Zato se kod razmatranja distribucije *S. officinalis*, mora se uzeti u obzir i mogućnost antropogenog uticaja, jer konkretni fosilni dokazi o starosti i poreklu ove vrste (u centralnom delu Balkana) ne postoje, a biljka se od davnina gaji i upotrebljava zbog svojih blagotvornih svojstava.

Rekonstrukcija evolutivne istorije taksona do pre par decenija zasnivala se isključivo na poređenju distribucije savremenih predstavnika i fosilnih nalaza njihovih srodnika. Analiza polena u sedimentima pružila je značajne podatke o sukcesivnim promenama u rasprostranjenju anemofilnih drvenastih vrsta pre, za vreme i nakon glacijacije (PANTIĆ 1984, TABERLET I SAR 1998). Kod entomofilnih vrsta, međutim, zbog male produkcije polena, ovo nije bilo moguće.

Danas, međutim, metode molekularne biologije omogućavaju da se na osnovu savremene geografske distribucije genetičkih varijanti (alela) u populacijama i njihovih genealoških odnosa, stekne predstava o istorijskim promenama u rasprostranjenju

taksona. Naime, iako između savremenih prirodnih populacija jedne vrste postoje barijere koje ograničavaju ili sprečavaju protok gena, čak i u slučajevima izrazite disjunkcije areala, protok gena je morao postojati u prošlosti, odnosno populacije moraju posedovati u određenom udelu i zajedničke ili blisko srodne genetičke varijante (alele).

Protok gena skrivenosemenica odvija se na dva moguća načina: oprašivanjem (polenovim zrnima) ili rasejavanjem (semenima). Ako zanemarimo vegetativno razmnožavanje, ograničenog dometa, skrivenosemenice uglavnom semenima osvajaju nove prostore. Zbog toga je savremena distribucija svake vrste, ma koliko uslovljena njenom tolerancijom na kolebanja ekoloških faktora i kompetitivnim sposobnostima, rezultat njene evolutivne istorije odnosno svedočanstvo protoka gena putem semena.

Morfološka varijabilnost između jedinki unutar i između populacija, najčešće posebno izražena u slučaju izolovanih i marginalnih populacija, nesumnjivo je rezultat sadejstva endogenih - genetičkih i egzogenih - ekoloških faktora. Faktori životne sredine utiču na stepen preživljavanja i reproduktivni uspeh različitih fenotipova ali ujedno predstavljaju i činilac razvića koji utiče na opseg fenotipova koje će proizvesti dati genotip (fenotipska plastičnost). Na genetičkom nivou, varijabilnost se ogleda u učestalosti različitih genetičkih varijanti (alela).

Prema Kimurinoj teoriji „neutralne selekcije“, međutim, većina promena na molekulskom nivou čine mutacije čiji su efekti na adaptivnu vrednost toliko mali, da prirodna selekcija praktično nema nikakav uticaj na njihovu učestalost i distribuciju. Te mutacije nazvane su neutralnim i genetički drift se tretira kao osnovni mehanizam njihove fiksacije ili eliminacije u populacijama (KIMURA 1968).

Prema hipotezi „molekularnog sata“ neutralne mutacije odvijaju se konstantnom stopom, što omogućava da se koriste za ispitivanje evolutivnih i genealoških odnosa kao i vremena divergencije između evolutivnih linija (TUCIĆ 2003).

Istraživanje genetičke varijabilnosti i distribucije genetičkih varijanti odabranih nekodirajućih regiona DNK hloroplasta u populacijama žalfije, uz povezivanje sa dinamičnim geološkim i klimatskim promenama koje su se dešavale u prošlosti Bakanskog poluostrva, predstavlja put za rekonstrukciju njihovih genealoških odnosa i za tumačenje porekla i starosti kontinentalnih populacija.

1.1. Geneza Balkanskog poluostrva i njegovog biljnog sveta

U biogeografskom pogledu Balkansko poluostrvo predstavlja najveći deo jugoistočne Evrope, koji obuhvata područja južno od Save i Dunava, sa rekom Kupom i Istrom kao granicom na zapadu, Kritom i Kikladama na jugu i Crnim morem, Bosforom i istočnim Egejskim ostrvima na istoku. Sa preko 8000 vrsta vaskularnih biljaka, od kojih je 2600 do 2700 endemičnih, Balkansko poluostrvo je floristički najraznovrsniji deo Evrope (STEVANOVIĆ 2005, 2008). Na Balkanu se u horizontalnoj distribuciji zonalnih fitohorija sučeljavaju mediteranski, srednje-evropski, i pontsko-južnosibirski floristički regioni i florogenetski uticaji dok su u vertikalnoj distribuciji to srednjeevropsko planinski i južnoevropsko planinski (STEVANOVIĆ I SAR 1995).

Populacije koje su predmet našeg istraživanja, nalaze se u Srbiji, Crnoj Gori i Makedoniji.

Posmatrana u celini, balkanska flora ima dominantno mediteranski karakter ali se postavlja pitanje porekla mediteranskih flornih elemenata u centralnom - kontinentalnom delu Balkanskog poluostrva (u Srbiji pre svega) s obzirom na prisustvo visokih planina u zaleđu Jadranskog mora koje predstavljaju barijeru za njihov prodor dublje u kopno gde vladaju sasvim drugačiji klimatski uslovi.

Nema sumnje da se uzroci sadašnjeg florističkog i vegetacijskog diverziteta Balkanskog poluostrva mogu tražiti u njegovom specifičnom geografskom položaju, kompleksnom reljefu i različitim klimatskim uticajima, međutim za objašnjenje ovog fenomena od najvećeg značaja su velike i dinamične geomorfloške i klimatske promene koje su se desile tokom evolucije Balkana i Mediterana u celini. Za nastanak savremene balkanske flore i vegetacije najvažnija su dešavanja koja su se na ovom prostoru odvijala krajem Tercijara, odnosno u poslednjih 30 miliona godina, od vremena kada su i nastale prve konture savremenog balkanskog kopna (UTESCHER I SAR 2007, SAVIĆ 2008, NIKETIĆ 2012, KRSTIĆ I SAR 2012) pa do glacijacije i postglacijalnih antropogenih promena (WILLIS 1994).

O biljnom svetu balkanskog poluostrva početkom Tercijara moguće je steći predstavu samo posredno, na osnovu fosilnih ostataka i paleopalnoloških istraživanja. Prema fosilnim podacima iz eocenskih i oligocenskih sedimenata, biljni svet "budućeg" Balkanskog poluostrva imao je tropski i subtropski karakter. Na ovom prostoru rasli su

predstavnicu tropskih familija *Proteaceae* i *Myrtaceae* kao i vrste iz rodova *Cinammomum*, *Myrica* i *Passania* koje se danas mogu sresti u tropskim područjima Azije na pr. (JANKOVIĆ 1984).

Za ovu i sledeće epohe ne može se ni govoriti o *poluostrvu* jer je geodinamička evolucija ovog prostora još uvek u punom jeku. U oligocenu (pre oko 30 mil. godina), kao rezultat sudara afričke i evropske kontinentalne ploče, započinje uzdizanje planinskih lanaca Alpa, Dinarida, Balkanida i Helenida koje se u još većoj meri nastavlja i u miocenu. Zahvaljujući ovom procesu, poznatom kao alpska orogeneza, uspostavljena je veza između srednje Evrope, Balkana i Male Azije čime je odvojen Paratetis od Mediterana. Pred kraj miocena (pre oko 7 mil. godina), planinski lukovi Karpata uzdizanjem, izoluju panonski deo Paratetisa koji se praktično pretvara u jezero. Novonastalo Panonsko more je, izvesno vreme, osim panonske nizije prekrivalo i dobar deo današnje Moravske udoline (NIKETIĆ 2012).

Prema teoriji o “srpskom jezeru”, glavni deo kopnene mase Balkana početkom Miocena čine dva “megaostrva” (Dinaridsko i Karpato-balkanidsko) između kojih se nalazio moreuz između Paratetisa i Mediterana (delom današnja prostrana dolina Morave) sa razuđenom obalom ispresecanom poprečnim depresijama (KRSTIĆ I SAR. 2012).

U miocenu i pliocenu, najveći deo teritorije Srbije bio je pokriven vodenim basenima, koje je povremeno ispunjavala jezerska, a povremeno morska voda. Planine Srbije predstavljale su obale ili ostrva ovih velikih vodenih površina. Krajem pliocena, Panonsko more “ističe” kroz Đerdapski prolaz u Crno more (slika 1). Današnje velike naslage lignita u kolubarskom, kostolačkom i kosovskom basenu, izgrađene najvećim delom od nekadašnjih močvarnih šuma *Taxodium*-a, najneposredniji su dokaz postojanja karakteristične vegetacije na obalama jezera sa maksimalnom ekstenzijom u ovom delu poluostrva u periodu miocen-pliocen.

Kopnena veza Balkana sa Malom Azijom, sa manjim prekidima, trajala je sve do holocena kada je, probijanjem Bosforskog moreuza, konačno formirano poluostrvo.

Pliocenska flora Balkanskog poluostrva, prema fosilnim nalazima, predstavlja mešavinu savremene balkanske flore i u izvesnom smislu, mnogo bogatije arko-tercijerne nemoralne flore koja danas odlikuje istočnu Aziju i Severnu Ameriku a u manjoj meri i srednju Evropu. Prema pronađenim rodovima (*Pterocarpia*,

Glyptostrobus, Buettneria, Alnus, Juglans, Corylus, Picea, Abies, Quercus, Fagus, Typha, Phragmites, Laurus, Cinammomum i td.), može se zaključiti da je pliocenska balkanska vegetacija imala mešoviti karakter, pri čemu se ističu zimzelene mediteranske, zimzelene četinarske i listopadne – umerene šumske i žbunaste zajednice sa vodenom i barskom vegetacijom u nizijskim predelima i depresijama između šumskih kompleksa (JANKOVIĆ 1984).



Slika 1. Položaj miocenskih (levo) i pliocenskih (desno) vodenih basena na Balkanskom poluostrvu na osnovu dosadašnjih geoloških i fosilnih nalaza. (prema KRSTIĆ I SAR. 2012.)

Krajem Tercijara, u drugoj polovini pliocena (pre oko 2,4 miliona godina), dolazi do postepenog pogoršanja klimatskih uslova koje prethodi velikom zahlađenju početkom Kvartara. Dolaskom Ledenog doba u pleistocenu izmenjeni su klimatski uslovi za život biljaka na Balkanu, ali neuporedivo blaže nego što je to bilo u severnim i centralnim delovima Evrope koji su za vreme Ris i Virm glacijacije bili pokriveni ledom. Ove klimatske promene će dovesti do suštinskih promena u sastavu i bogatstvu flore i konačno, formiranja kompleksne savremene vegetacije Balkanskog poluostrva.

Veliko Ledeno doba se sastojalo od 4 glacijacije i 4 interglacijacije koje su se odlikovale otopljanjem klime. Takva dinamika Lednih doba uslovlila je veoma dinamične migracione procese flore iz refugijuma poluostrva prema srednoj Evropi i obratno za vreme ledenih doba prema Balkanskom i drugim južnim delovima Evrope.

Ovi procesi u velikoj meri su se odrazili na današnju kompoziciju flore Balkanskog poluostrva u kojoj drevni reliktni elementi imaju posebno mesto i dokaz su njegove refugijalnosti.

Posledice Ledenog doba na biljni svet Balkana, mogu se posmatrati kao tri međusobno uslovljena fenomena:

Za vreme diluvijuma Balkan je postao refugijum za mnoge tercijarne vrste koje su "u potrazi" za povoljnijim uslovima "stigle" iz evropskih prostora. Pod uticajem burnih klimatskih i demografskih promena došlo je i do izmena u distribuciji predstavnika "stare" balkanske flore, do fragmentacija areala mnogih od njih i na kraju do formiranja novih vrsta (neoendemita) u drugačijim ekološkim okolnostima. Ova tri fenomena bila su predmet proučavanja kako za područje Balkana tako i za druga dva velika evropska glacijalna refugijuma, Pirinejsko i Apeninsko poluostrvo.

O značaju južno-evropskih refugijuma kao centara očuvanja genoma i genotipova koji su nakon glacijacije ponovo naselili dobar deo evropskog kontinenta, tokom proteklih decenija napisan je niz radova koji se baziraju na molekularnim istraživanjima (TABERLET I SAR. 1998. HEWITT 1999, GÓMEZ I LUNT 2007).

Rezultati ovih radova, na osnovu filogeografskih analiza, razumljivo pokazuju da je poimanje južno-evropskih poluostrva kao jedinstvenih utočišta za arko-tercijarnu floru i suviše pojednostavljeno s obzirom na svu složenost ovih regiona po sebi. U pretpostavljenim "refugijalnim" populacijama, često je genetički diverzitet (izražen brojem haplotipova ili alela) bio manji nego u populacijama koje su nastale ponovnim naseljavanjem migranata iz refugijuma, što je istaklo svu složenost pitanja refugijuma i florogenetskih procesa. O ovoj temi su pisali i STEWART I SAR. (2010) koji ukazuju na značaj "kriptičnih" refugijuma za vreme glacijacija i inteerglacijacija, kao i individualnih ekoloških odlika taksona u formiranju njihove savremene distribucije.

Autori ovih radova ističu potrebu za definisanjem takozvanih filogeografskih "vrućih mesta", odnosno lokalnih područja koji se odlikuju visokim stepenom genetičkog diverziteta (za odgovarajući takson), analogno centrima diverziteta endemizma, koje odlikuje izuzetna brojnost endemičnih taksona. MEDAIL I DIADEMA (2009) posebno važnim smatraju područja u kojima se poklapaju visok stepen endemizma i genetičkog diverziteta. Zanimljivo je da na njihovoj mapi "vrućih mesta" Mediterana i pored poznate činjenice o broju endemičnih taksona na Balkanu, ovaj

region ostaje obeležen znakom pitanja, verovatno zbog malog broja radova o genetičkom diverzitetu zasnovanim na molekularnim istraživanjima, koji bi potkrepili značaj “lokalnih” balkanskih tercijarnih ili glacijalnih refugijuma kao što su, na primer, kanjoni i klisure u zapadnom i centralnom delu poluostrva.

Ne treba zaboraviti da o nivou genetičkog diverziteta osim velikog broja alela (odnosno haplotipova) govori i prisustvo retkih, ili jedinstvenih takozvanih privatnih haplotipova karakterističnih za pripadnike pojedinačnih populacija, što je zapaženo u slučaju populacija ramondi (LAZAREVIĆ 2012.) i žalfije (STOJANOVIĆ I SAR. 2012.) u Sićevačkoj klisuri.

Prisustvo meditranskih predstavnika familije Lamiaceae u flori Srbije (*Teucrium polium* L., *Salvia sclarea* L., *Calamintha nepeta* Savi., *C. grandiflora* Mnch., *Ziziphora capitata* L. i dr.) razmatrala je VASIĆ (1997) koja posebno ističe autohtonost i reliktni karakter populacija *S. officinalis* i zajednice *Artemisio-Salvietum* NIKOLIĆ I DIKLIĆ (1966) u istočnoj Srbiji. Još je ADAMOVIĆ (1908) ukazao na značaj nalazišta žalfije u Sićevačkoj klisuri. Prema njegovom mišljenju ovako udaljeno nalazište jedne mediteranske vrste od glavnog areala može da predstavlja samo reliktnu vegetaciju poreklom iz tercijara. Autohtonost *S. officinalis* u istočnoj Srbiji, on ne dovodi u pitanje, jer još nekoliko biljnih vrsta, (sub)mediteranskih flornih elemenata, raste na ovom području. Postavlja se, međutim, pitanje porekla ovih populacija, tako daleko od glavnog dela areala.

1.2. *Žalfija (Salvia officinalis L.)*

1.2.1. *Diverzitet, rasprostranjenje i poreklo roda Salvia L. (Lamiaceae)*

Rod *Salvia* predstavlja najbrojniji rod familije Lamiaceae sa skoro 1000 vrsta. Predstavnici roda pokrivaju čitav spektar životnih formi, morfolgije cvetova, tipova polinatora i sekundarnih metabolita (WALKER I SYTSMA 2007).

Prema klasifikaciji koju su predložili CANTINO I SAR. (1992) a koju prihvataju HARLEY I SAR. (2004) rod *Salvia* pripada subtribusu Salviine, tribusa Mentheae, u okviru podfamilije Nepetoideae. *Salvia officinalis* L. označena je kao tipska vrsta roda *Salvia*.

Građa cvetova sigurno spada u najintrigantnije karakterstike predstavnika roda. Imajući u vidu visok stepen adaptiranosti cvetova na polinatore, insekte i ptice, kao glavna sinapomorfoza pripadnika ovog roda izdvaja se prisustvo dva prašnika kratkog filameta i izduženog, zglobljenog konektiva u vidu poluge, sa najčešće jednom fertilnom poluanterom a drugom delimično ili potpuno abortiranom ili metamorfoziranom u papučicu pomoću koje se fertilna pomera - spušta ka oprašivaču. Ovakva anatomija prašnika klasičan je primer koadaptacije nototribnih cvetova i polinatora. CLASSEN – BOCHOFF I SAR. (2003) smatraju da je adaptivna radijacija u okviru roda nastala kao rezultat diverziteta polinatora, različitih grupa insekata i ptica. Razlike u građi prašnika „sa polugom“ predstavnika roda *Salvia* bila je osnova za Bentham – ovu, prvu, subgeneričku podelu na četiri podroda: *Salvia*, *Sclarea*, *Leonia* i *Calosphace* (BENTHAM 1836). Prva dva podroda obuhvataju prvenstveno azijske i evropske vrste. *Leonia* vrste su zastupljene u Severnoj Americi a *Calosphace*, najbrojniji od podrodova (sa 105 sekcija i oko 500 vrsta), objedinjuje centralno- i južnoameričke vrste.

Prema BOISSIER-u (1879), rod *Salvia* se deli na sekcije: *Eusphace*, *Hymenosphace*, *Drymosphace*, *Aethiops*, *Horminium*, *Eremosphace* i *Hemisphace*.

U "Flori Kine" (WU I LI 1977) rod je podeljen na podrodove *Salvia*, *Sclarea* (Moench) Benth. *Jungia* (Moench) Briq i *Allagospadonopsis* Briq. U Flori Evrope, HEDGE (1972) je podelio rod na sledeće sekcije: *Salvia*, *Hymenosphace* Bentham, *Aethiops* Bentham, *Drymosphace* Bentham, *Plethiosphace* Bentham, *Horminium* Dumort i *Hemisphace* Bentham. U flori Srbije (DIKLIĆ 1974) nije data infragenerička klasifikacija roda *Salvia*, ali se prema prihvaćenoj klasifikaciji može zaključiti da je na teritoriji Srbije

zastupljeno 16 vrsta u okviru sekcija *Salvia*, *Aethiops*, *Drymosphace*, *Plethiosphace*, *Horminium* i *Hemisphace*.

Vrste roda *Salvia* rastu na teritoriji Evrope, Azije, Afrike, Severne i Južne Amerike, pa se može reći da rod ima subkosmopolitsko rasprostranjenje (HEDGE 1992). RODRIGEZ I SAR. (1992) navode četiri centra diverziteta roda: Mediteran, sa oko 250 vrsta, centralnu Aziju (90 vrsta), visoravni Meksika (oko 300 vrsta), i Južnoameričke Ande (200 vrsta).

Na evroazijskom kopnu, najveći broj vrsta navodi se za teritoriju Kine, 80 (WU I LI 1977), u Turskoj ih ima oko 70 vrsta (GREUTER 1986), a u flori Kavkaza 41 (GROSSHEIM 1967). U flori Evrope registrovano je 36 vrsta (HEDGE 1972). Značajan broj vrsta raste i u Africi, na samom jugu oko 70 vrsta, a u meditranskom delu 32 vrste (GREUTER 1986, CLASSEN-BOCKHOFF I SAR 2003).

Predstavnici roda *Salvia* do sada nisu pronađeni u fosilnom obliku. Najstariji nalazi polena, koji se pripisuju ovom rodu, datiraju iz miocena sa nalazišta u Meksiku i na Aljasci. Starost im je procenjena na 25 miliona godina (HARLEY I SAR 2004). I pored nedostatka palinoloških nalaza u Evropi i Aziji i preko 80% endemičnih taksona u Meksiku (RODRIGEZ I SAR 1992), HEDGE (1992) pretpostavlja da je jugozapadno-centralna Azija glavni centar radijacije roda, a kao glavni argument za ovu tvrdnju uzima visok stepen endemizma i veliku morfološku raznovrsnost azijskih vrsta. DIERINGER I SAR. (1991) međutim, (na osnovu istih parametara) smatraju da je centar porekla roda Mediteranski basen.

Većina dosadašnjih radova o poreklu i evoluciji roda *Salvia* uzimaju u razmatranje morfologiju cvetova. U novije vreme istraživači su posvetili posebnu pažnju uporednom embrionalnom razvoju prašnika predstavnika roda (CLASSEN-BOCKHOFF I SAR. 2003, 2004), eko-morfološkim osnovama diverzifikacije (BAIKOVA 2005) i filogenijom roda na molekularnom nivou (WALKER I SAR. 2004, 2007).

Prema istraživanjima morfoloških zakonitosti evolucije roda *Salvia* BAIKOVE (2005) predački takson roda *Salvia* pripadao je paleotropskoj flori. Najverovatnije je pripadao životnoj formi sličnoj današnjim poluodrvnelim i odrvenelim hamefitama (Ch frut i CH suffrut), plastične ontogenije i promenljivog stepena lignifikacije stabla. Do radijacije i ekološke specijalizacije dolazi u suptropskim i umerenim klimatskim uslovima, sa tendencijom skraćivanja ontogenije i kserofitizacije i heliofitizacije na

morfološkom nivou. Tokom Miocena i Pliocena, u vreme orogeneze glavnih planinskih venaca kako u „Starom“ tako i u „Novom svetu“ areal roda je zauzeo velike prostore, čak do južne Afrike. Do najveće diverzifikacije na morfološkom nivou, prema Baikovoj, došlo je kod *Salvia* starog sveta koje su poreklom iz mediteranske flore.

WALKER I SAR. (2004, 2007), su korišćenjem molekularnih markera utvrdili da rod *Salvia* ne može biti monofiletskog porekla. Oni su pokazali da je srodnost između pripadnika američkih i evroazijskih sekcija roda manja nego između sekcija roda „starog sveta“ (*Salvia*) i nekih drugih rodova iz tribusa Mentheae (*Rosmarinus*, *Origanum*, *Thymus*).

Oko 400 vrsta roda *Salvia* se koristi u medicini i običajima naroda širom sveta. Vrste bogate etarskim uljima upotrebljavaju se u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji a desetak južnoameričkih vrsta ima dekorativni značaj. Ekonomski najvažnije vrste su *S. officinalis*, *S. bowleyana*, *S. coccinea*, *S. columbariae*, *S. digitaloides*, *S. divinorum*, *S. hispanica*, *S. horminum*, *S. lavandulaefolia*, *S. miltiorrhiza*, *S. plebeia*, *S. triloba*, *S. pomifera*, *S. repens*, *S. rugosa*, *S. runcinata*, *S. sisymbriifolia*, *S. sclarea*, *S. serotina*, *S. verbenaca* i *S. yunnanensis* (KINTZIOS 2000, JANČIĆ I STOJANOVIĆ 2008).

1.2.2. Taksonomska i horološka pitanja o vrsti *Salvia officinalis* L.

Prema klasifikaciji roda *Salvia* u Flori Evrope *S. officinalis* L. pripada sekciji *Salvia* (Sect *Eusphace* Benth), zajedno sa vrstama *S. lavandulifolia* Vahl., *S. grandiflora* Etlinger (*S. tomentosa* Mill), *S. eichlerana* Heldr., *S. triloba* L. (*S. fruticosa* Mill), *S. candelabrum* Boiss., *S. x hegelmaieri* Porta & Rigo, *S. blancoana* Webb & Heldr. *S. brachyodon* Vandas, *S. ringens* Sibith. & Sm., *S. pinnata* L., *S. scabiosifolia* Lam i *S. bracteata* Banks & Solander. Karakteri koji objedinjuju taksone u sekciji su životna forma, čašica koja nije razrasla, manje ili više prava krunica i prašnici sa asimetričnim konektivom kraćim ili jednakim sa filamentom (HEDGE 1972).

Iako se taksonomski status, pa i rasprostranjenje pojedinih pripadnika sekcije *Salvia* prema Hedge-u mora uzeti sa rezervom, kada se upoređi distribucija nabrojanih vrsta, može se zapaziti nekoliko pravilnosti:

- Objedinjeni areali navedenih taksona zahvataju Južnu Evropu, Malu Aziju, bliski istok i severne oblasti Afrike odnosno prevashodno Mediteranski basen i njegovo zaleđe.
- Svojevrsni vikarizam postoji između taksona nešto šireg rasprostranjenja u evropskom delu Mediterana: *S. lavandulifolia*, *S. officinalis*, *S. triloba* i *S. grandiflora*. Ove vrste ujedno imaju isti broj hromozoma ($2n = 14$ eventualno 16). Ostale vrste imaju ograničeno rasprostranjenje i predstavljaju uglavnom lokalne endemite.

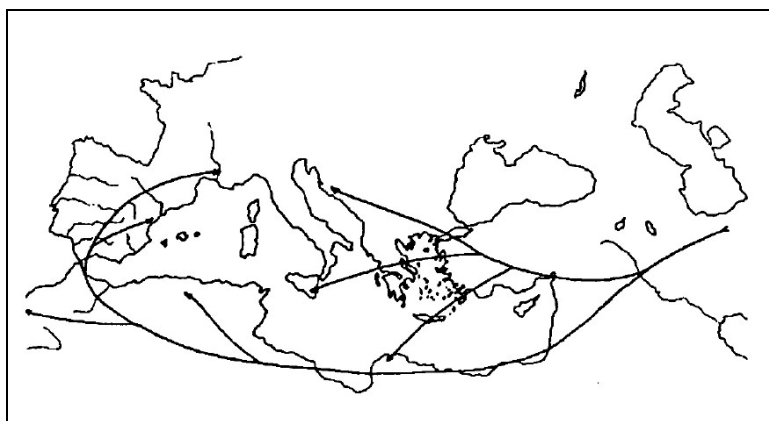
Ako se navedene činjenice uzmu u obzir, moglo bi se pretpostaviti da su pripadnici sekcije *Salvia* nastali iz ishodišnog prataksona čiji je jedinstveni evromediterranski areal fragmentisan velikim klimatskim i geomorfološkim promenama poput uzdizanja visokih planinskih lanaca ili pojavom velikih vodenih površina koje su predstavljale prepreku za protok gena. U novim, izmenjenim ekološkim uslovima dolazi do ekološke diferencijacije, praćene morfološkom diverzifikacijom. Kao rezultat ovog procesa radijacije izdvajaju se novi taksoni, čiji areali predstavljaju izmenjene delove predačkog areala (DAVIS I HEDGE 1971, ROSUA I BLANCA 1990).

Najveći uticaj na sadašnji izgled areala ovih taksona verovatno su imale promene koje su se dešavale tokom miocena, pliocena i pleistocena u Mediteranskom regionu, a od kojih su najvažnije: uspostavljanje, pa zatim raskidanje veze između

afričkog i evropskog kopna koje je uslovalo promene u nivou i salinitetu Sredozemnog mora; nastanak kopnene veze Balkana i Anadolije; orogeneze evromediterranskih masiva, sudbina Paratetisa i konačno glacijacija. (DAVIS I HEDGE 1971). Za sada je međutim, teško proceniti u kojoj meri su ova dešavanja uticala na specijaciju “glavnih” taksona.

Uprkos navedenom, DAVIS I HEDGE (1971), napominju da je pogrešno suditi o florističkoj istoriji samo na osnovu sadašnjeg rasprostranjenja i da, bez uvida u fosilne dokaze, diskusija ovakvog tipa može jedino da bude podstrek za dalja istraživanja.

Veoma su zanimljiva pretpostavke o vikarizmu i poreklu pripadnika sekcije koje su objavili ROSUA I BLANCA (1990). Autori su razmatrali distribuciju taksona “primitivnih” morfoloških odlika kao što su perasto složeni listovi (subsekcija *pinnatifolia* Boiss.), prisustvo fertile druge poluantere, kao i broj hromozoma. Rosua i Blanca su zaključili da su evropski pripadnici sekcije irano-turanskog porekla i da su u “osvajanje Evrope” krenuli iz dva pravca: preko Male Azije na Balkan (*S. fruticosa*, *S. triloba*, *S. ringens*) i nakon “migracije” preko severne Afrike, iz “Maroka” na Pirinijesko poluostrvo i u Francusku (*S. lavandulifolia*, *S. candelabrum*, *S. blancoana*). (slika 2.) Autori ne raspravljaju o poreklu *S. officinalis* ali ukazuju na njen vikarizam sa pomenutim taksonima.



Slika 2. “Osvajanje Evrope” pripadnika sekcije *Salvia* (preuzeto iz ROSUA I BLANCA 1990).

U Flori Evrope, *S. officinalis* se navodi kao samonikla vrsta za Balkansko poluostrvo, severoistočnu Španiju, Italiju i pod znakom pitanja za Južnu Francusku (HEDGE 1972).

Prema Med-Checklisti, međutim, žalfija je autohtona na području bivše Jugoslavije, u Albaniji, Grčkoj i Italiji. Prisustvo ove vrste na ostalim područjima, u Španiji, Portugaliji, Francuskoj, Bugarskoj, na Sardiniji i Korzici, prema ovom izvoru sekundarnog je porekla (GREUTER I SAR. 1986). Da stvar bude komplikovanija, Euro + Med PlantBase navodi da je *S. officinalis* nativna u Španiji, Francuskoj, Alžiru, Maroku pa čak i u Švajcarskoj i Nemačkoj (Euro + Med, 2011).

Potpuno je neshvatljivo da se i pored odavno poznatih podataka o distribuciji *S. officinalis*, u pojedinim savremenim literaturnim izvorima koji se bave upotrebnim značajem žalfije može naići na podatak da su ovu vrstu na tlo Evrope doneli Rimljani iz Egipta (DWECK 2000)!

Pri definisanju prirodnog areala *S. officinalis* nameće se nekoliko problema. Osim činjenice da se radi o vrsti koja se vekovima gaji po baštama širom Evrope kao lekovita i medonosna biljka pa postoji izvesna verovatnoća da se subspontano proširila iz kulture na odgovarajuća staništa, osnovni problem je generalno odnos prema opsegu vrste, odnosno klasifikacija nekoliko morfološki sličnih i srodnih taksona. Naime, još prema klasifikaciji koju su predložili GAMS I MARZELL (1924), *S. officinalis* se može podeliti na *S. officinalis* ssp. *lavandulifolia* (Vahl); *S. officinalis* ssp. *minor* Gams i *S. officinalis* ssp. *major* (Garsault) Gams. Iako je većina botaničara danas napustila Gamsovu podelu i pod *S. officinalis* L. podrazumeva samo Gamsovu ssp. *minor*, a ssp. *major* tretira kao zastareo sinonim za *S. grandiflora* Etlinger, (syn. *S. tomentosa* Miller) rasprostranjenu u jugoistočnim delovima Balkanskog poluostrva, u Turskoj i na Krimu, status podvrste *lavandulifolia* i dalje je problematičan. Naime, pojedini autori (ROSUA I BLANCA 1996) ovaj varijabilan španski takson tretiraju kao posebnu vrstu (*S. lavandulifolia* Vahl), dok drugi (REALES I SAR. 2004) čvrsto podržavaju Gamsov stav da se radi o podvrsti.

DEVETAK (1963) je mišljenja da je u izvesnom smislu “*Gams imao pravo kad je ovako povezao inače bliže svojte proizišle od jedne ishodne pravrste. Možda je kod toga mogao obuhvatiti i ostale svojte kao na primjer S. triloba L. koja se može veoma lako dovesti u filogenetsku vezu s našom kaduljom.*“ U prilog ovakvom stavu ide i činjenica da *S. officinalis* i *S. triloba* (obe sa $2n = 14$ hromozoma) spontano hibridizuju na Visu, jedinom lokalitetu gde rastu u simpatriji (RADOSAVLJEVIĆ I SAR 2012a). Herbarske

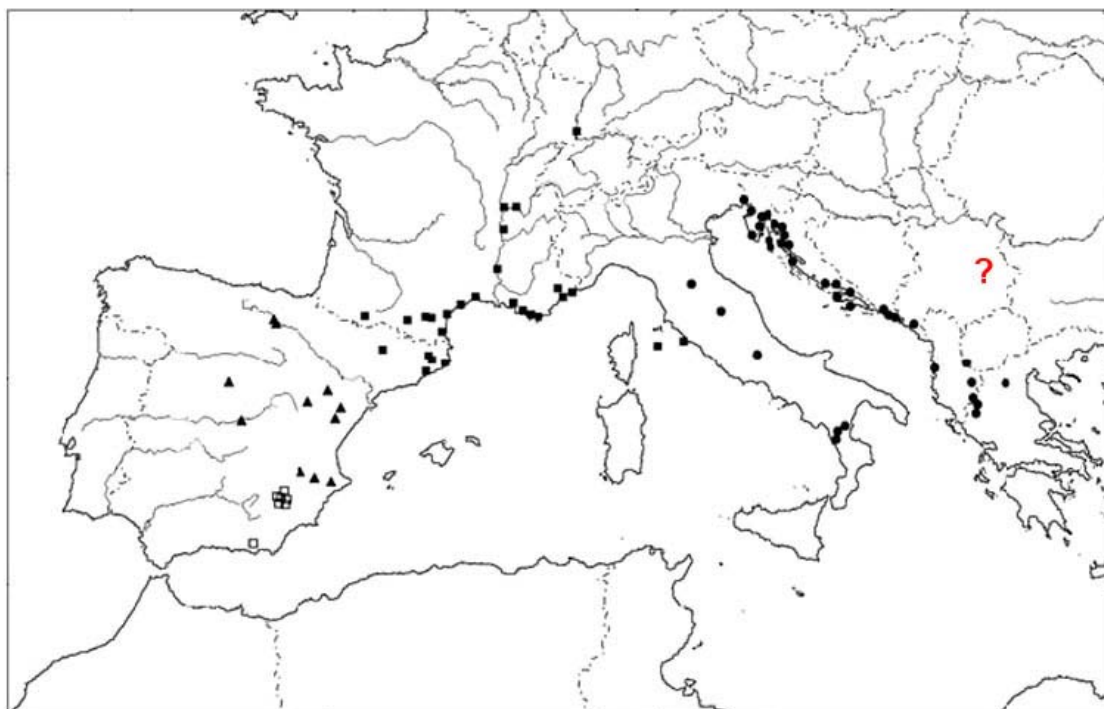
primerke nototaksona koji su posedovali morfološke osobine između ove dve vrste, bez obzira na poreklo, REALES I SAR. (2004.) prikazuju pod imenom *S. x auriculata* Mill.

Nedoumicu o prisutvu *S. officinalis* u Španiji pokušali su da reše još VALDES I LOPEZ (1977). Nakon revizije Herbarijuma Botaničke bašte u Madridu (MA) i Herbarijuma Farmaceutskog fakulteta u Madridu (MAF) zaključili su da se svi navodi o prisustvu *S. officinalis* odnose na *S. lavandulifolia* izuzev dva eksikata čije spontano poreklo dovode u pitanje. U svojoj reviziji roda *Salvia* u zapadnom Mediteranu, ROSUA I BLANCA (1986.) su *S. officinalis* prikazali samo kao gajenu vrstu. Kao osnovni diferencijalni karakter između *S. lavandulifolia* i *S. officinalis*, autori ističu simetriju čašice, koja je kod drugog taksona izrazito zigomorfna.

REALES I SAR. (2004) međutim, imaju sasvim drugačiji stav o prisustvu *S. officinalis* u Španiji i generalno o opsegu vrste. Autori su, nakon numeričke analize mikro i makro morfoloških karaktera eksikata *S. officinalis*, *S. triloba* i *S. lavandulifolia*, poslednju “podelili” na dve grupe. Jedna je “prešla” u *S. blancoana* a druga u *S. officinalis*. U klaster analizi koja je prethodila njihovom predlogu klasifikacije, najveći doprinos u razdvajanju grupa imali su karakteri indumentuma čašice. Autori konačno predlažu sledeću subspecijsku podelu i distribuciju *S. officinalis* (slika 3):

1. *S. officinalis* ssp. *officinalis* – čašica izraženo dvousnata, naborana između nerava. Centralni i severni Mediteran, od nivoa mora do 1000 m n.v.
2. *S. officinalis* ssp. *gallica* - čašica blago dvousnata, zvonasta, slabo naborana između nerava. Severozapadni Mediteran od od nivoa mora do 1000 m n.v.
3. *S. officinalis* ssp. *lavandulifolia* – čašica aktinomorfna, cevasta, bez nabora između nerava, sa zupcima do 3 mm dugim, izraženo dlakava istočno Iberijsko poluostrvo, od 500 do 1200 m.
4. *S. officinalis* ssp. *oxyodon* – čašica aktinomorfna, cevasta, bez nabora, sa zupcima dužim od 3 mm, glatka ili slabo dlakava. Južna Španija od 800 do 2100 m n.v.

Podvrstu *S. officinalis* ssp. *multiflora*, autori ne spominju a na njihovoj karti distribucije nedostaju lokaliteti iz Srbije, iako su imali uvid u uzorak iznad manastira Sv. Petka kod Sićeve (koji nisu uveli u numeričku analizu!).



Slika 3. Mapa rasprostranjenja *S. officinalis* sa podvrstama prema Reales i sar. (●)ssp. *officinalis*, (■)ssp. *gallica*, (▲)ssp. *lavandulifolia*, (□)ssp. *oxyodon* (?)ssp. *multiflora* (izmenjeno, prema REALES I SAR 2004).

REALES I SAR. (2004) ističu značaj mikromorfoloških osobina indumentuma čašice kao diferencijalnih karaktera u razdvajanju *S. officinalis* i ostalih srodnih vrsta. Ključ za određivanje i status taksona koji predlažu dovode u pitanje dosadašnju klasifikaciju vrsta “*S. officinalis* *agregata*”. Na žalost, u ovom numeričkom istraživanju skoro sasvim je zanemareno Balkansko poluostrvo (uključeni su samo po jedan herbarski primerak iz Trogira i Dubrovnika i “Dalmacije”), pa se rezultati Reales i sar. moraju smatrati nepotpunim.

NIKOLIĆ I DIKLIĆ su još 1966. izneli pretpostavku da je današnji disjunktни areal žalfije u zemljama Mediterana verovatno heterogenog porekla. Prema ovim autorima, prirodni areal vrste obuhvata samo nalazišta u Dalmaciji, Kvarneru, Crnoj Gori, jugoistočnoj Srbiji, Albaniji, Makedoniji i Grčkoj, dok su sva ostala nalazišta sekundarnog porekla, nastala kultivisanjem žalfije, koja je zatim podivljala i nastanila određene krajeve, kako u južnoj tako i srednjoj Evropi (NIKOLIĆ I DIKLIĆ, 1966).

DEVETAK (1963) je izneo sumnju u sposobnost žalfije da se širi u “*za nju nepovoljna područja*” i smatra da je u ranijoj geološkoj prošlosti zauzimala znatno šira područja kao i da su populacije duboko u kontinentu “*ostaci nekadašnjeg areala kadulje. Prodiranjem mezofilnih šuma sa kontinenta, kadulja je stalno potiskivana u pravcu Mediterana*”. Devetak na kraju zaključuje:

“Adamović je označio nalazišta kadulje u Srbiji i Makedoniji kao tercijerne relikte što je prihvaćeno i na tome je ostalo do danas. Da li su to baš relikti iz tercijera to je pitanje koje traži obrazloženje, ali da su to zaista reliktna staništa to je potpuno jasno.”

1.2.3. *Deskripcija vrste*

Salvia officinalis L. je večnozeleni, odrveneli granati polužbun. (*fo semp Mac Ch frut*) visok 20 - 70 cm. Jednogodišnji izdanci su sivo-zeleni, pokriveni belim mehaničkim i žlezdanim dlakama i uzdižu se. Starije grane su razgranate, polegale ili se uzdižu. Kora je sivo mrka i ljušti se. Listovi su naspramno raspoređeni, sa lisnom drškom. Liska je izduženo jajasta, eliptična do lancetasta, ređe objajasta, dugačka 2 – 9 cm, široka do 3 cm, pri osnovi zaokrugljena, ponekad plitko srcasto usečena, okrugla ili zašiljena na vrhu. Obod liske je fino tupo nazubljen. Mlade liske su i sa lica i sa naličja sivo-zelene usled velikog broja dlaka. Potpuno razvijene liske su na licu slabije dlakave - zelenkaste a na naličju sivo-zelene i nešto gušće dlakave, vrlo sitno naborane, sa mrežastom nervaturom. Priperci su lancetastog oblika, na vrhu oštro šiljati, dugački kao čašica. Cvetovi su u verticilasterima (pršljenovima) sa po (4) 6 – 10 (16) cvetova. Pršljenova ima 4 – 8, i formiraju terminalni prividni grozd. Cvetovi su dvopolni, ređe ženski, dugački 1,4 - 3,5 cm. sa cvetnom drškom, 3 – 6 mm dugačkom. Čašica je cevasto zvonasta, dvousnata, ljubičasta ili zelena, 8 – 15 mm dugačka, sa 15 istaknutih nerava, po nervima i obodu prileglo dlakava. Čašični zupci se završavaju osjem, 0,5 – 2,0 mm dugačkim. Krunica je svetloljubičasta, ređe bela ili plavkasto ljubičasta, dlakava, oko 2,5 puta duža od čašice. Krunična cev je prava, postepeno se ka vrhu širi. Gornja usna krunice je plitko urezana u dva kratka zaobljena režnja, natkriljuje prašnike. Donja usna je trorežnjevita, sa obrnuto jajastim srednjim režnjem, koji je na vrhu usečen i veći od ostala dva. Prašnici su sa izduženim konektivima koji su zglobljeni sa filamentumom. Donja poluantera je delimično abortirana i transformisana u papučicu. Tučak je natcvetan, ginobazični stubić izdiže dvodelni žig iznad krunice. (Plodnik je sakriven dlačicama u grotlu krunice.) Plod je merikarpijum od 4 tamno mrka loptasta oraščića, veličine 2-3 mm u dijametru, specifične retikularne ornamentacije. Cveta od maja do jula. *S. officinalis* ima $2n = 14$ hromozoma.



Slika 4. *S. officinalis* na staništu (Orjen, Kruševice)

1.2.4. Pregled istraživanja morfološke varijabilnosti *S. officinalis* na Balkanskom poluostrvu

Prvu detaljniju analizu distribucije i varijabilnosti samonikle žalfije sa različitim lokaliteta uradio je DEVETAK (1963). Poredivši uzorke prikupljene iz dalmatinskih i hercegovačkih populacija, on je zapazio morfološka variranja koja je definisao kao 8 formi:

- *f. ovalifolia* - sa kratkim eliptičnim listom i širokom lisnom pločom;
- *f. lanceolata* - sa dugim listom i uskom lisnom pločom;
- *f. auriculata* - sa lancetastim listovima i lisnim “uškama”;
- *f. albiflora* - sa belim cvetom;
- *f. rozea* - sa bledocrvenkastim cvetovima.
- forma s kratkom i zbijenom inflorescencijom;
- forma s rastresitom inflorescencijom;
- forma kod koje se inflorescencija sužava prema vrhu, tj. broj cvetova prema vrhu postepeno opada.

Devetak zapaža da su sve navedene forme, izuzev poslednje (pronađene u okolini Mostara), više ili manje zastupljene na svim staništima ispitivanog područja i da se najlakše raspoznaju prve dve, između kojih međutim postoji “*cela skala različitih prelaza koje bi bilo veoma teško svrstati u jednu ili drugu.*” DEVETAK zaključuje da veliko morfološko variranje žalfije u više pravaca pokazuje aktivan proces diferencijacije koji je već daleko odmakao, ali možda još ne toliko da bi se mogla postaviti čvršća osnova sistematike unutar vrste.

Posebno zanimljivim smatramo česte nalaze forme sa “okriljenim” listovima (slika 5), jer se ova odlika listova prema (ROSUA I BLANCA 1990) smatra pleziomorfnom unutar sekcije; uzima kao jedan od osnovnih diferencijalnih karaktera za razdvajanje *S. officinalis* i *S. fruticosa* i predstavlja osobinu ranije spomenutog hibrida *S. x auriculata* (REALES I SAR 2004).



Slika 5. “Okriljeni” list *S. officinalisi* (Njeguši)

GAJIĆ (1976) je pri razmatranju morfološke varijabilnosti vrste uzeo u obzir i uzorke iz crnogorskog dela areala i iz Sićevačke klisure. Razlike u habitusu, morfološkim odlikama listova, gustini indumentuma i osobinama cvasti, između primorskih i kontinentalnih uzoraka, Gajić interpretira u svetlu ekoloških karakteristika staništa i predlaže sledeću infraspecijsku klasifikaciju:

- *S. officinalis subsp. lavandulifolia* - cvetne drške su 0 - 3 mm dugačke. Pršljenovi sa 2 - 6 cvetova, čašica gusto pokrivena dlakama, između nerava sa sedećim žlezdanim dlakama. Rasprostranjena u centralnoj, južnoj i zapadnoj Španiji i na francuskim Pirinejima.
- *S. officinalis subsp. officinalis* - cvetne drške 3 - 11 mm dugačke. Pršljenovi sa 5 - 10 (12) cvetova. Rasprostranjena na mediteranskom i submediteranskom području jadranske obale (bivše) Jugoslavije i Albanije.
 - *var. officinalis* - čašica 8-15 mm dugačka. Osje 1.0 do 2.0 mm dugačko.
 - *f. albiflora* - krunica bela. čašica zelenkasta: Istočna Srbija: Sićevačka klisura
 - *f. brevipedicellata* Gajić- Cvetne drške (1) 2 - 4 mm dugačke. Broj cvetova u pršljenu 5 - 7: Crna Gora, okolina Ulcinja.
 - *f. spicata* Gajić - Pršljenova 4 - 5, sabijeni u cvast klasaste forme 5 - 8 cm dugačku: Kruščica južno od Ploča.
 - *f. officinalis* - Pršljenovi nisu sabijeni. Cvast duža, samo donji pršljen s braktejama.
 - *f. bracteata* Kojić et Gajić - nekoliko donjih pršljenova sa braktejama: Crna Gora - Miločer

- *var. longiarstata* Kojić et Gajić - čašica (12-) 15 - 17 mm dugačka. Osje (1.8-) 2.0 - 2,5 mm dugačko. Cvetne drške 4 - 7 (-10) mm dugačke
- *S. officinalis subsp. multiflora* Gajić - broj cvetova u pršljenju (8 -) 10 - 16 (-23)
 - *var multiflora* Gajić - Čašica (9-) 10 - 15 mm dugačka, po nervima poleglo dlakava, češće zelenkasta
 - *f. multiflora* - Pršljenova do 8. Istočna Srbija: Sićevačka klisura
 - *f. multiverticilata* Gajić - Pršljenova 9 - 10, cvast 20 - 24 cm dugačka. Istočna Srbija: Sićevačka klisura
 - *var. frankeii* Gajić Čašica (15 -)16 - 18 mm dugačka, po nervima i na trbušnoj strani razređeno dlakava, crveno ljubičasta. Osje 0,8 – 1,0 mm dugačko. Donja čašična usna duža od čašične cevi. Cvetne drške (6-) 7 mm dugačke. Sićevačka klisura.

U tekstu koji prethodi navedenoj dopuni dijagnoze, Gajić ističe da je formu sa “ušicama” u osnovi listovima (*f. auriculata*), dosta česta na jadranskim ostrvima ali je kasnije ne spominje.

U novije vreme, morfološkom varijabilnošću samoniklih populacija iz Hrvatske i Bosne i Hercegovine bavila se ŽIDOVEC (2004). Analizirajući osobine koji su prevashodno značajne u karakterizaciji hortikulturnih tj. dekorativnih odlika vrste u deset populacija duž jadranske obale, ŽIDOVEC je zaključila da je najviše varijabilno svojstvo broj cvetova a najmanje varijabilan broj internodija cvasti. U zaključku autorka ističe da je najveći deo genotipske i fenotipske varijabilnosti uzrokovan razlikama između jedinki unutar populacije a da je manji deo uzrokovan razlikama između populacija. Autorka se u svom radu ne osvrće na taksonomiju vrste.

U Makedoniji, *S. officinalis* raste u klisuri Crnog Drima, u blizini Lukova (ČERNJAVSKI 1943, DJORDJIEVSKA I MATEVSKA 1999). Koliko je nama poznato, morfološka varijabilnost makedonskih žalfija do sada nije detaljnije istraživana. Prema KARUSOU (2000), populacije *S. officinalis* sa izdvojenih malobrojnih grčkih lokaliteta ne pokazuju značajnu varijabilnost za razliku od *S. fruticosa* rasprostranjene u Grčkoj od Krita, Peloponeza, Egejskih i Jonskih ostrva na sever do Halkidikia i Tasosa.

Naša ranija istraživanja morfološke varijabilnosti populacija žalfije iz Srbije i Crne Gore bila su bazirana na karakterima koje je koristio Gajić u infraspecijskoj sistematici vrste: dužina cvasti; broj nodusa sa cvetovima; broj cvetova u nodusu; dužina

cvetne drške; dužina čašice; dužina zubaca čašice; dužina osja na zupcima; dužina lisne drške; dužina, širina i oblik liske, kao i na mikromorfološkim karakteristikama listova i indumentuma (STOJANOVIĆ I SAR, 2000, STOJANOVIĆ 2002.).

Rezultati statističke analize merenih karaktera pokazali su da populacije *S. officinalis* iz Crne Gore i Srbije i pored izrazite disjunkcije areala, čine jednu relativno homogenu grupu u okviru koje postoje tendencije razdvajanja, najviše izražene u slučaju populacije iz Sićevačke klisure. Upoređivanjem ispitivanih karaktera, kao statistički najznačajniji u diferencijaciji istraživanih populacija izdvojili su se mikromorfološki karakteri listova, pre svega odlike indumentuma, što je pripisano razlikama u ekološkim, odnosno klimatskim uslovima koji vladaju u Crnogorskom primorju i zaleđu, s' jedne, i jugoistočnoj Srbiji sa druge strane. Varijabilnost u broju cvetova i veličini cvasti, koje GAJIĆ (1973) ističe za podvrstu *multiflora*, bila je mnogo više ispoljena unutar populacija nego između njih.

1.2.5. Ekologija i migratorne sposobnosti *S. officinalis*

Pri razmatranju disjunkcije areala *S. officinalis*, uporedo sa istorijskim činiocima, moraju se uzeti u obzir i migratorne sposobnosti vrste kao i tolerancija na kolebanja ekoloških faktora.

Žalfija na prirodnim staništima raste na bazičnim karbonatnim stenama, vrlo retko na andezitu (GAJIĆ 1976), na skeletogenom, neutralnom ili blago bazičnom ili blago kiselom zemljištu, često poput hazmofita izbijajući iz pukotina stena. Za prevashodno mediteransku vrstu, žalfija dobro podnosi niske temperature ali klijanci ne podnose mrazeve (DEVETAK 1963). U Crnoj Gori raste na staništima koja su pod uticajem mediteranske, submediteranske ili prelazne submediteransko – umerenokontinentalne klime a u Srbiji i Makedoniji pod uticajem prelazne submediteransko egejske i umerenokontinentalne klime (STEVANOVIĆ I STEVANOVIĆ 1995.)

S. officinalis je striktna heliofita koja se u prirodi veoma retko nalazi u zaseni ili u gustom sklopu sa drugim vrstama. Ovo je verovatno osnovni razlog što je žalfija zauzela velike površine intrazonalne vegetacije pašnjačkih kamenjara i pukotina krečnjačkih stena, koja se javljaju kao derivat degradiranih klimazonalnih mediteranskih i submediteranskih šuma.

Žalfija se skoro isključivo razmnožava polnim putem. Vegetativno razmnožavanje je sasvim neznatno i ne treba ga uzeti u obzir kod razmatranja migratornih sposobnosti. Izuzetno, u slučaju odrona, ili drugog oblika erozije na strmim padinama, može doći do premeštanja istrnutih delova ili čitavih busenova sa viših na niže položaje, ali je ovo sasvim zanemarljivo (DEVETAK 1963).

Sukcesivnim otvaranjem cvetova i specifičnim mehanizmom oprašivanja (WALKER I SYSTMA 2006) žalfija izbegava autogamiju, ali ona ne može biti isključena. Najčešći oprašivači su insekti iz reda *Hymenoptera*: *Apis mellifera* L., *Bombus pascuorum* Scop., *B. terrestris* L., *Xilocopa violaceae* L i dr. (slika 6a, CORSI I BOTEGA 1999). *S. officinalis* plodonosi tek druge ili treće godine od nicanja.



Slika 6: Oprašivanje (a), sazrevanje orašica (b) žalfije (lokalitet Kruševica, Crna Gora) i šema oslobađanja orašica *Salvia sp* (c).

Orašice su tokom sazrevanja zaštićene unutar čašice koja i sama raste (slika 6b). Po sazrevanju, čašica se suši i čak puca između gornje i donje “usne” Plodići ispadaju iz nje ili se, njihovim stavljanjem na vetru ili ređe na dodir, razbacuju na udaljenost od najviše nekoliko metara (slika 6c). Orašice su mrke, skoro okrugle, oko 3 mm u prečniku, težine oko 9 g za 1000 komada. (ŽIDOVEC 2004). Njihova dalja sudbina u prirodi i dalje ostaje nejasna. DEVETAK (1963) pretpostavlja da je mirmekohorija moguća kod žalfije, jer je na terenu zapazio da krupniji mravi odnose orašice, držeći ih za diskus, ali izražava svoje sumnje u značaj ovakvog načina rasejavanja.

PETIT I VENDRAMIN (2007) ističu značaj oprašivača i herbivora kao i patogena na filogeografske obrasce biljnih taksona. S’ obzirom da različiti oprašivači žalfije imaju panevropsko rasprostranjenje a krupne herbivore je izbegavaju i hraneći se okolnom vegetacijom prave prostor za njeno širenje, životinje sigurno nisu ograničavajući faktor,

već sasvim suprotno, deluju povoljno na rasprostranjenje ove vrste. Nemamo podatke o prisustvu patogena *S. officinalis* u prirodnim uslovima ali sumnjamo u njihov značaj kada je u pitanju diskutovana disjunkcija areala.

Priroda biologije razmnožavanja govori o relativno skromnim ekspanzivnim sposobnostima *S. officinalis* i dovodi u pitanje mogućnost njenog subspontanog širenja na kontinentalnim lokalitetima udaljenim od jadranskog dela areala. Zbog toga se priroda savremenog areala *S. officinalis* u centralnom delu Balkanskog poluostrva mora posmatrati pre svega u svetlu geomorfoloških i klimatskih promena koje su se dešavale na ovom prostoru u celini, ali bez zanemarivanja značaja "ljudskog faktora".

1.2.6. Uslovljenost distribucije žalfije njenim lekovitim svojstvima

Jedna od važnih razlika između *S. officinalis* i drugih taksona slične disjunkcije areala je u tome što se žalfija, zbog svojih lekovitih svojstava, od davnina intenzivno koristi i gaji, pa se mogućnost antropogenog uticaja na sadašnju distribuciju mora uzeti u obzir. Problem autohtonosti većine nalaza *S. officinalis* izvan mediteranskog područja generalno, KAROUSOU (2000) jednostavno rešava na sledeći način: "*Verovatno su je doneli Rimljani u antičko vreme ili monasi u srednjem veku.*"

Poznavanje i upotreba lekovitih biljaka, zasnovano na iskustvu datira u vreme pre pisane istorije pa je najverovatnije takav slučaj i sa žalfijom.

Da li je *S. officinalis* korišćena u Antičkoj Grčkoj teško je reći. Vrsta danas raste samo na nekoliko lokaliteta u severozapadnom delu savremene Grčke (KAROUSOU I SAR. 2000), tako da je Teofrastova *σφάκος*, najverovatnije bila *S. fruticosa* (*syn. S. triloba*), a Aristofanova, *S. pomifera* (ANDREWS 1956). Ime *salvia* potiče iz rimskog perioda (lat: *salvare* – spasiti, izlečiti). Dioskoridova *salvia* je verovatno upravo *S. officinalis*. Ovaj rimski lekar grčkog porekla je o upotrebi žalfije pisao u zborniku o lekovitim sredstvima *De Materia Medica*, koji je vekovima kasnije, kao bukvar lekarstva, prepisivan po manastirima (OSBALDESTON I SAR. 2000). Žalfiju navode svi rimski pisci koji se bave lečenjem. Izuzetno su je cenili i koristili Herodot, Plinije stariji i Galen. Rimljani su je posvetili vrhovnom bogu Jupiteru. Oni su toliko verovali u njenu isceliteljsku moć da iz tog vremena potiče izreka: "*Cur moriatur homo cui salvia crescit in horto?*" - Kako može da umre onaj koji ima žalfiju u svome vrtu? (USHER 1991).

Koliko nam je poznato, o upotrebi *S. officinalis* u antičko vreme na našim prostorima nema pisanih podataka, ali nema razloga za sumnju da je korišćena i u “našem” delu Rimskog carstva. Trgovina ovom lekovitom vrstom mogla je da ima uticaj na njeno prisustvo na odgovarajućim staništima u kontinentu. Naime, blizu istraživanih populacija u Srbiji i Makedoniji pronađeni su ostaci važnih rimskih saobraćajnica. Jedan deo *Via militaris*, između Niša (Naisus) i Sofije (Serдика), čiji se ostaci i danas mogu videti (slika 7.), prolazi neposredno uz populaciju žalfije u Sićevačkoj klisuri (između mesta Sićevo i Gradište). Nije teško zamisliti da su semena ili rasadni materijal žalfije, slučajno ispali iz transporta i pronašli povoljno tle za rast, kao što je to slučaj sa mnogim antropohornim vrstama.



Slika 7. Deo mape rimskih puteva na Balkanskom poluostrvu sa označenim kontinentalnim populacijama *S. officinalis* u blizini puteva (■) i ostatak *Via militaris* iznad manastira Sv. Petka u Sićevačkoj klisuri

Preko vardarske doline, rimski “vojni put” je bio u vezi sa *Via egnatia*, koji je spajao Drač i Konstantinopolj (SYME I BIRLEY 1999). “Ignacijev put” prolazio je severno od Ohridskog jezera, desetak kilometara od ispitivane populacije u dolini Crnog Drima, pa je pređašnji scenario manje verovatan ali ne sasvim nemoguć. Pretpostavimo da je žalfija ipak stigla kao “roba” sa primorja rimskim saobraćajnicama u unutrašnjost

Balkana. Ako je to tako, postavlja se međutim pitanje zašto je nema na još nekom lokalitetu duž ovih puteva u kontinentalnom delu poluostrva.

Prvi pisani podaci o upotrebi žalfije kod Srba mogu se naći u Hilendarskom kodeksu (XV - XVI vek) (JARIĆ I SAR. 2011). Zanimljivo je da je ovo jedan od najpotpunijih zbornika medicinskih rukopisa poteklih iz, tada najuglednije, medicinske škole Salerno-Monpelje. Osnivač škole, Karlo Veliki (742 -814 god.n.e.) u vreme svoje vladavine, izdao je naredbu svim državnim imanjima (a u to vreme to su bili uglavnom manastirska dobra) da gaje lekovite biljke. Na spisku od oko sto vrsta na prvom mestu je bila žalfija, koja se i danas može naći u vrtu skoro svakog katoličkog manastira.

I srpski srednjevekovni lekari/apotekari dakle, poznavali su i koristili žalfiju. Izvesna verovatnoća da je ova biljka “pobegla” iz manastirskih vrtova i raširila se na, za nju, pogodna staništa postoji, ali se mora razmatrati uz poznavanje ekspanzivnih sposobnosti vrste i činjenicu da i pored toga što se može naći u baštama širom naše zemlje, žalfija “na otvorenom” u Srbiji raste samo na par lokaliteta. Mišljenja DEVETKA (1963), NIKOLIĆA I DIKLIĆA (1966) o ovom problemu izneta su ranije.

U današnje vreme listovi *S. officinalis* koriste se širom sveta u fitoterapiji, kao začim ili sirovina za farmaceutsku i kozmetičku industriju (JANČIĆ I STOJANOVIĆ, 2008). Terapijska efikasnost ove biljke naučno je dokazana kod različitih medicinskih stanja. Listovi žalfije imaju adstringentna, baktericidna i antimikotička (BOŽIN I SAR. 2007, BOUAZIZ I SAR. 2009), antiinflamatorna (BARIČEVIĆ I SAR. 2001.), gastroprotektivna (MAYER I SAR. 2009), antidijabetička (EIDI I SAR. 2009), spazmolitička (TODOROV I SAR. 1984) svojstva. Žalfija takođe, pokazuje blagotvorni efekat kod blažih oblika alchajmerove bolesti (AKHONDZADEH I SAR. 2003), povoljno utiče na kognitivne sposobnosti (KENNEDY I SAR. 2005) i inhibira HIV-1 reverznu transkriptazu (WATANABE I SAR. 2000).

Navedeni primeri upotrebe i delovanja žalfije, predstavljaju ilustraciju poznatog i potencijalnog naučnog i ekonomskog značaja ove vrste. S’ obzirom da potražnja za listovima *S. officinalis* raste iz godine u godinu i da se najveće količine i dalje sakupljaju iz prirode, kontinentalne populacije žalfije predstavljaju prirodni resurs koji mora da se zaštititi i sačuva.

Formalno, vrsta je u Srbiji zaštićena Zakonom o zaštiti prirode, odnosno *Pravilnikom o proglašenju i zaštiti strogo zaštićenih i zaštićenih divljih vrsta biljaka,*

životinja i gljiva i ne sme se sakupljati (SLUŽBENI GLASNIK RS, 2011) a u Makedoniji *Zakonom o zaštiti prirode* (SLUŽBEN VESNIK NA RM, 2011) i može se sakupljati uz dozvolu ministarstva.

1.3. Molekularna (DNK) istraživanja

Proteklih decenija objavljen je veliki broj naučnih radova i disertacija koje se zasnivaju na molekularnim istraživanjima genetičke varijabilnosti biljaka. Sa razvojem sve efikasnijih metoda ekstrakcije DNK, umnožavanja i detekcije varijabilnosti na nivou molekula DNK, sa jedne i teorijskih postavki i matematičkih metoda modeliranja i predviđanja sa druge strane, botaničarima je pružena mogućnost da iz novog ugla sagledaju niz evolutivnih fenomena.

Radovi iz populacione genetike, pružili su uvid u mikroevolutivne procese i principe koji utiču na dinamiku zastupljenosti alela u populacijama. Rezultati genetičkih istraživanja vođenih sa ciljem da se utvrde i razjasne filogenetske veze između taksona, odnosno makroevolutivni procesi, u nekim slučajevima su uzdrmali tradicionalnu deskriptivnu sistematiku i filogeniju biljaka. Tako su, na primer, već pomenuta istraživanja WALKER I SAR (2004) i WALKER I SYTSMA (2007) na osnovu markera DNK hloroplasta pokazala da rod *Salvia* nije monofiletskog porekla i da se evolucija dva prašnika sa zglobljenim konektivom i „polugom“, karakteristična za pripadnike ovog roda, desila nezavisno najmanje 3 puta (homoplazija a ne homologija).

Veoma su zanimljivi rezultati obimnog istraživanja molekularne filogenije tribusa Mentheae (DREW I SYTSMA, 2010) koji revidiraju dosadašnju podelu tribusa, ukazuju na mediteransko poreklo svih pet subtribusa kako „Starog“, tako i „Novog sveta“ kao i na to da je većina pripadnika tribusa „Novog sveta“ divergirala nakon jednog disperzionog događaja koji se desio sredinom miocena. Evolucija dva prašnika, prema autorima, desila se najmanje 4 puta nezavisno u okviru tribusa, jednom u subtribusu Salviinae, jednom u subtribusu Lycopinae i dva puta u tribusu Menthinae. Autori smatraju da je generalno zahlađenje klime, najverovatniji uzrok sadašnje distribucije i diverzifikacije tribusa.

1.3.1. Filogeografija

Filogeografija predstavlja konceptualnu vezu između populacione genetike, koja se bavi istraživanjem mikroevolucionih procesa, i filogenije u čijem fokusu je

makroevolucija (SCHAAL I SAR 2003, AVISE 2009). U osnovi, filogeografija je relativno nova naučna disciplina koja proučava istoriju distribucije taksona na osnovu današnjeg geografskog rasprostranjenja genetičkih varijanti i njihovih genealoških veza (DNK) i utvrđivanja značaja istorijskih, odnosno savremenih faktora i procesa na sadašnju distribuciju. Sam termin je ušao u upotrebu 1987. godine (AVISE I SAR 1987) u vreme kada započinju istraživanja porekla čoveka na osnovu geografskog rasprostranjenja alela mitohondrijalne DNK.

Imajući u vidu činjenicu da je *“sadašnje stanje areala rezultat dugogotrajnog procesa u toku kojeg su se menjale geografske, klimatske i ekološke prilike životne sredine kao i biološke i ekološke osobine vrste”* (JANKOVIĆ, 1990), molekularna istraživanja koja imaju za cilj da objasne prirodu (istoriju) savremenog areala ispitivanog taksona moraju se oslanjati i na poznavanje ekologije, reproduktivne biologije taksona kao i poznavanje geomorfoloških i paleo-klimatskih procesa koji su se dešavali na teritoriji zahvaćenoj arealom. Filogeografska istraživanja zbog toga predstavljaju sintezu molekularne genetike, ekologije i biogeografije.

O značaju ranijih filogeografskih istraživanja postglacijalnih puteva rekolonizacije Evrope, govori revijalni rad koji su objavili TABERLET I SARADNICI još 1998. godine. U ovom radu nedvosmisleno je istaknut značaj Balkanskog poluostrva kao refugijalnog prostora na primeru rekonstrukcije puteva rekolonizacije za više vrsta životinja i nekoliko „ključnih“ drvenastih taksona (iz rodova *Abies*, *Picea*, *Quercus*, *Fagus*).

Važan značaj ovakvih istraživanja je i u tome što pružaju uvid u nivo genetičkog diverziteta prirodnih populacija, odnosno u adaptivni potencijal vrste i mogućnost opstanka u uslovima promenljivosti spoljašnje sredine tokom vremena. To je posebno važno u slučaju izolovanih populacija koje su po pravilu na najvećem „udaru“ selekcije. Rezultati ovih istraživanja se sve češće uzimaju u obzir pri donošenju odluka i formiranju strategija za zaštitu i očuvanje ugroženih taksona i prirodnih resursa kao što su populacije samoniklih korisnih biljaka ili divlji srodnici kulturnih ili lekovitih biljaka (MORITZ 1994, FRANKHAM I SAR 2002).

Uvid u nivo genetičke varijabilnosti biljaka se generalno bazira na poređenju varijabilnosti homologih delova DNK, generisanih primenom različitih molekularnih markera, analogno istraživanju morfološke varijabilnosti poređenjem morfoloških

karaktera. Za istraživanja ovog tipa u većini slučajeva zajednički su sledeći koraci (SIMPSON 2006):

- Izbor odgovarajućeg genskog markera,
- Uzorkovanje i ekstrakcija DNK,
- Amplifikacija genskog markera (PCR reakcija),
- Identifikacija markera (sekvencioniranje ili drugi vidovi detekcije varijabilnosti homologih regiona DNK),
- Analiza podataka (sekvenci ili drugih varijabilnih parametara).

Izbor molekularnih markera u najvećoj meri zavisi od razvoja samih molekularnih metoda i ciljeva istraživanja. I danas se u istraživanjima varijabilnosti unutar taksona ili lociranja centra diverziteta koriste biohemijski markeri (izozimi) kao i izvesne tehnike (RAPD, AFLP) koje se zasnivaju na amplifikaciji više anonimnih regiona DNA različite dužine. Ovi dominantni markeri, kao i savremeniji kodominantni markeri kao što su mikrosateliti pretežno se odnose na jedarni genom.

U filogeografskim istraživanjima se međutim, najčešće koriste DNK sekvence, odnosno, primarni redosled nukleotida molekula DNK genoma koji se nasleđuju preko majke, ređe i sekvence genoma koje se nasleđuju preko oca ili preko oba roditelja (AVISE 2009).

Pored nuklearnog, biljke sadrže i dva citoplazmatska genoma, mitohondrijalnu (mt) DNK i DNK hloroplasta (cp). Ono što DNK organela, generalno čini pogodnijim za istraživanje rodoslova je haploidna, ne-rekombinantna priroda ovih molekula, odnosno dobijanje nedvosmislenih rezultata, za razliku od rezultata dobijenih pomoću jedarne DNK, kod koje postoji mogućnost rekombinacija, duplikacija i rearanžmana segmenata molekula.

Istraživanja genealogije životinjskih vrsta pretežno se zasnivaju na korišćenju kompaktne mtDNK ujednačene dimenzije i stope mutacija, koja se nasleđuje preko majčinske linije. Biljna mitohondrijalna DNK je, međutim varijabilna u veličini, načinu nasleđivanja i brzini evolucije sekvenci, tako da, izuzev kod pojedinih grupa (četinari), nije sasvim pogodna za filogeografska istraživanja.

DNK hloroplasta je, s druge strane, pretežno ujednačene veličine (od 120 do 217 kb kod viših biljaka). Nasleđuje se maternalno, (ređe biparentalno ili paternalno) i

poseduje uglavnom ujednačenu dinamiku evolucije sekvenci pa je pogodnija za filogeografska istraživanja biljaka.

Dosadašnja istraživanja nasleđivanja plastida kod predstavnika reda Lamiales, pokazala su da se ove organele nasleđuju preko materinske linije (CORRIVEAU I COLEMAN 1988) odnosno preko semena (a ne polena). Skrivenosemenice zauzimaju nova staništa upravo semenima pa je za utvrđivanje promena u distribuciji taksona, koje su se dogodile u prošlosti, najbolje koristiti markere DNK hloroplasta (cpDNK), i time isključiti doprinos polena u varijabilnosti (ENNOS 1994, SCHAAL I SAR. 1998, NEWTON I SAR. 1999).

Za izolaciju genetičkog materijala, uglavnom se koriste sveži listovi koji se brzo suše u posudi sa silika gelom ili trenutno zamrzavaju u tečnom azotu, čime se obično sačuva netaknuta DNK.

Nakon ekstrakcije i prečišćavanja DNK izolata pristupa se amplifikaciji ciljanih regiona – odabranih lokusa. Za tu svrhu koristi se reakcija lančanog umnožavanja (eng: Polymerase Chain Reaction – PCR) koja omogućava da se odabrani regioni DNK umnože do detektibilne količine. Proizvod PCR reakcije je velika količina identičnih kopija odabranih regiona (u ovom slučaju cpDNK), koji se potom sekvenciraju – utvrđuje se primarni niz nukleotidnih baza (A,T,C,G). Pojedinačne sekvence nukleotida se mogu smatrati nizom karaktera koji predstavljaju svaki uzorak na nivou odgovarajućeg genskog markera.

Da bi mogle da se upoređuju i koriste u analizi genetičke varijabilnosti, sekvence se moraju poravnati u cilju utvrđivanja homologije redosleda nukleotida. To se postiže primenom heuristički baziranog softvera u koji su implementirane određene postavke (TAMURA I SAR. 2011) sa ciljem da se što je moguće više eliminišu greške u utvrđivanju homologije ispitivanih regiona ali se konačna provera homologije obavlja manuelno.

Detektovane različite varijante sekvenci predstavljaju haplotipove, čija distribucija u populacijama, utvrđivanje uzroka distribucije i genealoških odnosa, predstavlja osnovu svake filogeografske studije.

Specifičnosti ovih koraka u istraživanju odabranih populacija žalfije biće detaljno objašnjene u poglavlju Materijal i metode.

1.3.2. Pregled dosadašnjih molekularnih istraživanja *S. officinalis*

U prethodnih 10 godina objavljeno je oko 600 radova u međunarodnim naučnim časopisima o vrsti *Salvia officinalis*. Najveći broj ovih radova bio je posvećen je istraživanju etarskih ulja i drugih sekundarnih metabolita žalfije (KINTZIOS 2000, KAROUSOU I SAR. 2000, COULADIS I SAR. 2002, BARIČEVIĆ I SAR. 2002, BÖSZÖRMÉNYI I SAR. 2009.), zbog kojih se ova vrsta smatra jednom od značajnijih lekovitih biljaka. Izvesna ispitivanja sastava etarskog ulja samoniklih populacija i kultivara *S. officinalis* iz ranijeg perioda ukazala su na prisustvo različitih hemotipova unutar i između populacija, kao i na sezonsku varijabilnost ulja (TUCKER I MACIARELLO 1990, PERRY I SAR 1999, LAKUŠUĆ I SAR 2013). U kojoj meri su ove razlike genetički, a u kojoj ekološki uslovljene do danas je ostalo nejasno i pored rezultata koju su objavili ŠATOVIĆ I SAR. (2011) i JUG-DUJAKOVIĆ I SAR. (2012).

Molekularno-genetička istraživanja *S. officinalis* za sada su retka. Na ovu temu prema našim saznanjima objavljeno je desetak radova, a prema podacima banke gena NCBI (National Center for Biotechnology Information/13. 12. 2012.), do sada je deponovano 128 setova sekvenci za ovu vrstu, od kojih se samo 28 odnosi na regione hloroplasta.

Osnovni problem u istraživanjima aromatičnih biljaka na molekularnom nivou generalno je izolacija kvalitetne prečišćene DNK. Standardni protokoli za ekstrakciju biljne DNK (DOYLE I DOYLE 1987, ROGERS I BENDICH 1988, LODHI I SAR. 1994.) kao i komercijalni kitovi, nisu davali dobre rezultate kod ovih biljaka jer je u njihovim listovima prisutna velika količina polisaharida, polifenolnih jedinjenja i drugih sekundarnih metabolita, koji se tokom izolacije vezuju za DNK i onemogućavaju kvalitetan prinos. Samo nekoliko radova objavljeno je o metodama izolacije DNK žalfije (ABU-ROMAN 2011. ALEKSIĆ I SAR. 2012.) od kojih protokol predložen u drugom radu predstavlja rezultat naših eksperimenata i primenjen je u istraživanju prirodnih populacija koje su predmet ove teze.

Poređenjem komercijalnih uzoraka *S. officinalis* i testiranjem različitih molekularnih markera bavili su se BAZINA I SAR. (2002), ECHEVERRIGARAY I AGOSTINI (2006.), KARAČA I SAR. (2008.), BÖSZÖRMÉNYI I SAR. (2009.), MADER I SAR. (2010.) I RADOSAVLJEVIĆ I SAR. (2012, 2012A). RADOSAVLJEVIĆ I SARADNICI (2012.) testirali su

upotrebu nekoliko SSR markera (ponavljajuće jednostavne sekvence - nuklearni mikrosateliti) na više populacija *S. officinalis* ali i na srodnoj endemičnoj vrsti *Salvia brachyodon* Vandas sa Pelješca. Njihovi rezultati su, kao što se moglo očekivati, pokazali da populacija *S. brachyodon* ima izuzetno nizak genetički diverzitet i da je kritično ugrožena, što nije bio slučaj sa *S. officinalis*.

Genetičkim diverzitetom i strukturom samoniklih populacija žalfije do sada su se bavili ŽIDOVEC (2004) korišćenjem RAPD metoda; JUG-DUJAKOVIĆ (2010) upotrebom AFLP markera i GREGURAŠ I SAR. (2013) koristeći nuklearne mikrosatelite. Istraživanja navedenih autora obuhvatila su populacije sa hrvatskog primorja i ukazala na značajan unutar-populacioni genetičku diverzitet ali relativno malu genetičku diferencijaciju između populacija, uslovljenu njihovom međusobnom razdaljinom. (isolation-by-distance pattern). U navedenim istraživanjima međutim nije razmatrana genealoška struktura populacija, s obzirom na tipove genetičkih markera koji su korišćeni.

Do sada najdetaljnija istraživanja genetičke strukture populacija žalfije sproveli su ŠATOVIĆ I SAR (2011). Oni su ispitivanjem obuhvatili, osim hrvatskih i odabrane populacije žalfije iz Crne Gore, BiH, Albanije, Makedonije, i Srbije (jedan uzorak iz Sićevačke klisure) i kultivare iz Rumunije i Moldavije i sa Kosova i Metohije. Koristeći markere nuklearnih mikrosatelita (SSR) autori su zapazili korelaciju između geografske distribucije i genetičke strukture populacija *Salvia officinalis* duž jadranske obale. Na osnovu klaster analize autori su pretpostavili postojanje 5 genskih pulova na ovom geografskom transektu. Prvi obuhvata populacije iz Slovenije i severnog dela hrvatskog primorja. Drugi je rasprostranjen u središnjem delu hrvatskog primorja. Treći je prisutan kod većine individua južnog hrvatskog primorja, u BiH, u jednoj populaciji iz Crne Gore i jednoj iz Albanije. Četvrti izdvaja individue sa Visa i povezuje ih sa populacijama iz Makedonije, Crne Gore, Albanije i populacijom iz Sićevačke klisure. Peti objedinjuje komercijalne uzorke.

Koliko je nama poznato, markeri DNK hloroplasta do sada nisu primenjivani u istraživanju genetičke raznovrsnosti samoniklih populacija *S. officinalis* i prvi put su korišćeni na populacijama žalfije iz Srbije, Crne Gore i Makedonije u našim istraživanjima. Osim toga, upotrebom ovog tipa markera, omogućeno je da se

pretpostave genealoške veze između populacija i okvirno odredi njihova starost (PETIT I VENDRAMIN, 2007), što u predašnjim istraživanjima nije bilo moguće.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je bio da se na osnovu morfometrijskih i molekularnih parametara utvrde fenetički i genealoški odnosi između odabranih populacija *S. officinalis* u centralnom delu Balkanskog poluostrva, iz primorskog dela areala i kontinentalnih disjunkcija; da se utvrdi genetički diverzitet i genetička struktura populacija kao i vreme razdvajanja detektovanih linija primenom odabranih nekodirajućih regiona DNK hloroplasta; da se ispita morfološka varijabilnost populacija žalfije i ispita korelacija molekularne i morfoške varijabilnosti i da se ukaže na moguću ugroženost istraživanih izolovanih kontinentalnih populacija i značaj njihovih lokaliteta kao lokalnih refugijuma ove vrste.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Uzorkovanje biljnog materijala

Biljni materijal za molekularna istraživanja sakupljen je maja 2010. godine sa 8 lokaliteta u Crnoj Gori, Srbiji i Makedoniji. Izabrane populacija iz Crne Gore predstavljaju uzorke iz jugoistočnog (Rumija - RUM), centralnog (Luštica - LUS) i severozapadnog (Kruševica - ORJ) dela pretežno kontinuiranog *primorskog* areala žalfije, sa oboda ove celine u kopnu (Pelev brijeg - MOR) i iz eksklave, odnosno najsevernijeg crnogorskog lokaliteta (kanjon Pive - PIV). Uzorak iz Sićevačke klisure (SIC) sakupljen je iz centralnog dela srpske disjunkcije a uzorak iz klisure Toponičke reke -Miljkovac (MIL) predstavlja najseverniji poznati lokalitet žalfije u Srbiji. Uzorak iz Makedonije (Modrič pod Jablanicom - JBL) takođe predstavlja disjunkciju areala.

Podaci o geografskom položaju, biogeografskoj i vegetacijskoj pripadnosti uzorkovanih populacija *S. officinalis* nalaze se u tabeli 1. a njihove lokacije prikazane su na slici 8.

Za molekularne analize su sakupljani zdravi mladi listovi, koji su generalno bogati parenhimskim ćelijama i sadrže manje sekundarnih metabolita (DOYLE I DOYLE 1987). Listovi su brani sa izdanaka izraslih iste godine, sa minimum 10 žbunova udaljenih najmanje 15 metara jedan od drugog gde god je to bilo moguće. Za uzorak su birane adultne, više godina stare biljke.

Ubrani listovi su na terenu pakovani u sterilne filter kesice sa silika gelom da bi se brzo osušili. Sušenje u silika gelu nastavljeno je 7 dana na 10 °C do izolacije DNK.

Uzorci za morfometriju sakupljeni su na navedenim i dopunskim lokalitetima tokom maja i juna 2013. godine. Uzorkovanje je urađeno nakon ispitivanja molekularne varijabilnosti sa ciljem da se ispita korelacija između detektovanog genetičkog diverziteta i morfološke varijabilnosti, dodatno ispituju genetički uniformne populacije s jedne strane i izrazito divergentne populacije sa druge.

Morfometrijskom analizom nisu obuhvacene biljke iz genetički monomorfne populacije Miljkovac jer se radi o krajnje ugroženoj populaciji, koja ne broji više od dvadesetak odraslih jedinki, a kao dopunska populacija iz srpske disjunkcije uzeta je populacija žalfije ispod Pleša (PLE) u Sićevačkoj klisuri. Detaljnije je uzorkovana populacija sa Rumije (RUM) jer je kod nje detektovan najveći broj haplotipova, a

dopunske populacije iz Crne Gore predstavljaju populacija iz Grahova (GRA) i Njeguša (NJE). Podaci o uzorkovanim populacijama nalaze se u tabeli 1. Na terenu su makazama odsecani delovi žbunova sa fertilnim izdancima u vreme cvetanja izuzev populacije iz Makedonije (JBL), koja je bila u fazi plodonošenja. Merenje je rađeno na herbarizovanom materijalu. Eksikati su deponovani u herbarijumu Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

Tabela 1. Osnovni podaci o uzorkovanim populacijama *Salvia officinalis* L. za molekularna i morfometrijska istraživanja

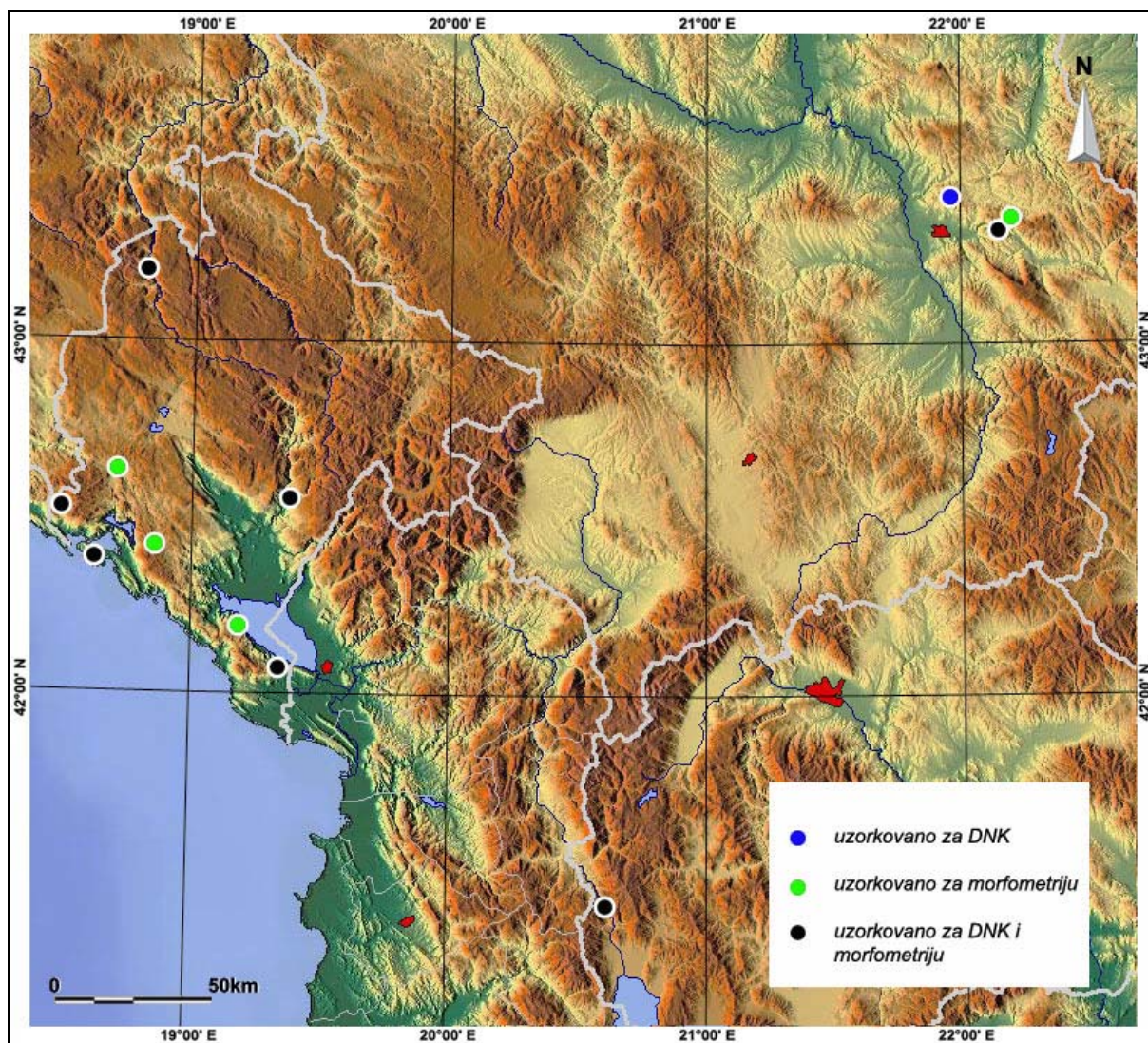
Skraćenica populacije	Država	Lokalitet	biogeografski region	vegetacijska zona	geografska širina (N)	geografska dužina (E)	nadmorska visina (m)	površina populacije (km ²)	br. uzoraka za DNK/morfometrijsku analizu
SIC	Srbija	Ostrovica, Sićevačka klisura	Srednje-Evropski	Quercion frainetto	43.3092	22.1198	518	0.02	9 / 10
MIL*	Srbija	Miljkovačka klisura	Srednje-Evropski	Quercion frainetto	43.4348	21.8712	450	0.005	11 / -
PLE**	Srbija	Ispod Pleša, Sićevačka klisura	Srednje-Evropski	Quercion frainetto	43.3346	22.1641	590	0.02	- / 18
JBL	Makedonija	Modrič, Jablanica	Srednje-Evropski	Quercion frainetto	41.3711	20.5965	750	0.02	10 / 13
PIV	Crna Gora	Kanjon Pive	Srednje-Evropski	Quercion petraeae-cerris	43.1711	18.8582	709	0.01	11 / 11
LUS	Crna Gora	Luštica	Eu-Mediterranski	Quercion iliricis	42.4127	18.5743	188	0.5	11 / 11
MOR	Crna Gora	Pelev brijeg, Morača	Sub- Mediteranski	Ostryo-Carpinion orientalis	42.5664	19.3878	544	0.5	9 / 14
RUN**	Crna Gora	Rumija Sever ka Skadarskom jezeru	Sub- Mediteranski	Ostryo-Carpinion orientalis	42.1617	19.2081	257	>1.5	- / 19
RUS (RUM) [#]	Crna Gora	Rumija Jug Vladimir	Sub- Mediteranski	Ostryo-Carpinion orientalis	42.0649	19.3744	494	1.5	11 / 11
ORJ	Crna Gora	Kruševice, Orjen	Sub- Mediteranski	Ostryo-Carpinion orientalis	42.5284	18.4887	640	0.5	11 / 9
GRA**	Crna Gora	Grahovo	Sub- Mediteranski	Ostryo-Carpinion orientalis	42.6404	18.6838	690	0.5	- / 10
NJE**	Crna Gora	Njeguši	Sub- Mediteranski	Ostryo-Carpinion orientalis	42.4295	18.8146	890	0.5	- / 11

* - populacija nije uzeta u morfometrijsku analizu

** - populacije koje su obrađene samo morfometrijski

[#] - ova populacija u DNK analizi označena je sa RUM

Slika 8. Područje istraživanja i lokacije uzorkovanih populacija *S. officinalis*



3.2. *Molekularna ispitivanja*

3.1.1. *Izolacija ukupne DNK*

Izolacija DNK je urađena u laboratoriji Katedre za biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu prema protokolu koji su objavili ALEKSIĆ I SAR (2012). Izmene u odnosu na standardni CTAB protokol (DOYLE I DOYLE 1987) urađene su sa ciljem da se dobije DNK sa što manje primesa polisaharida i polifenolnih sekundarnih metabolita čije prisustvo kod *S. officinalis* i drugih aromatičnih biljaka generalno predstavlja problem, jer smanjuje prinos i čistoću DNK izolata što ima negativan uticaj na process amplifikacije odabranih regiona DNK putem enzimatkih reakcija (ABU-ROMAN 2011). Specifičnosti modifikovanog protokola koji je korišćen su direktno dodavanje polivinilpirolidona (PVP) i aktivnog uglja koji vezuju i uklanjaju polifenole, dodatni korak sa koncentrisanim rastvorom NaCl radi uklanjanja polisaharida i ponovljeni tretman sa SEVAG (hloroform i izoamilalkohol) radi uklanjanja proteina i drugih ugljovodoničnih kontaminanata koji absorbiraju na talasnim dužinama od 230 nm i manje.

Suvi listovi su trenutno zamrzavani prelivanjem tečnim azotom (-196 °C) i homogenizovani mlevenjem u avanima. 200 mg spršenih zamrznutih listova odmereno je u tubice od 2 ml.

Za ekstrakciju DNK korišćeni su sledeći reagensi: 2 % (w/v) CTAB ekstrakcioni pufer (heksadecil-trimetil-amonijum bromid, Serva); 50 mM EDTA (Etilen-diamin-tetra-sirćetna kiselina, Merck), pH 8.0; 100 mM Tris-HCl (Applichem), pH 8.0; 1.4 M NaCl (Zorka Pharma) i 0.2 % β- merkptoetanol (Sigma), PVP 10 (Sigma), aktivni ugalj (Kemika), Sevag [24:1 (v/v) hloroform (Lachner): izoamilalkohol (Zorka)], isopropanol (Zorka Pharma), 70 % etanol (Zorka Pharma), RNaza A (4 mg/ml, Promega) i sterilna dejonizovana voda. Svaki uzorak obrađen je prema sledećem protokolu:

- Dodati 1 mg PVP 10 i 1 mg aktivnog uglja direktno na zamrznuti biljni materijal koji je na ledu.
- Dodati 750 µl zagrejan (65 °C) CTAB/β- merkptoetanol ekstrakcioni pufer.
- Inkubirati na 65 °C sat vremena sa čestim okretanjem tubica.

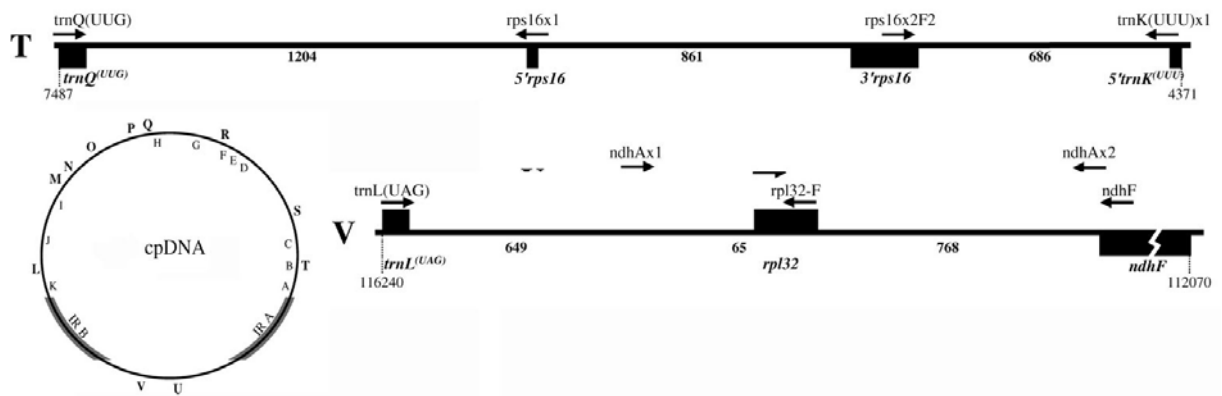
- Dodati 750 μ l SEVAG (hloroform i izoamilalkohol u odnosu 24:1) i dobro promešati inverzijom.
- Centrifugirati na 13 000 rpm 10 min na 4 °C.
- Prebaciti supernatant u nove tubice.
- Dodati 1/2 v hladnog 4 MNaCl i 450 μ l (2/3 v) izopropanola iz zamrzivača, dobro promešati inverzijom i ostaviti na – 20 °C jedan sat do stvarnja klupka DNK.
- Centrifugirati na 13 000 rpm 5 min na 4 °C i prosuti supernatant.
- Dodati 500 μ l 70 % etanola iz zamrzivača promešati okretanjem tubica.
- Centrifugirati na 13 000 rpm 5 min na 4 °C i pažljivo prosuti supernatant.
- Osušiti peletiranu DNK u vakum koncentratoru 10 min (ili na sobnoj temperaturi 2h)
- Resuspendovati klupko DNK u 40 μ l sterilne dH₂O i inkubirati preko noći na 4 °C
- Dodati 0.5 μ l RNAze A i inkubirati na 37 °C 1h.
- kvantifikovati DNK i rastvoriti do koncentracije od 20 ng/ μ l

Ukupan prinos ekstrahovane DNK, kao i prisustvo nečistoća provereni su pomoću NanoVue spektrofotometra na 230, 260 i 280 nm.

3.1.2. PCR amplifikacija i sekvenciranje

Za molekularne analize su odabrani intergenski spejseri (nekodirajući delovi DNK hloroplasta) jer se odlikuju višom stopom mutacije od kodirajućih regiona i pretpostavlja se da poseduju dovoljnu rezoluciju (iskazanu u broju informativnih mesta odnosno mutacija) za filogeografska istraživanja. Korišćena su dva lokusa hloroplastnog genoma: 3' *rps16-5'trnK* iz LSC regiona i *rpl32-trnL* iz SSC regiona DNK hloroplasta (slika 9).

Hloroplastna DNK je dvolančani cirkularni molekul koji sadrži dve identične kopije gena, koje su invertovane u genomu. Ove dve kopije su razdvojene jednim dugačkim (LSC) i jednim kratkim (SSC) jednostrukim regionom, koji su zbog više stope mutacija od dvostrukih, najčešće korišćeni u molekularnim istraživanjima (SHAW I SAR 2007).



Slika 9. Položaj odabranih lokusa hloroplasta i korišćenih prajmera (preuzeto iz SHAW I SAR 2007).

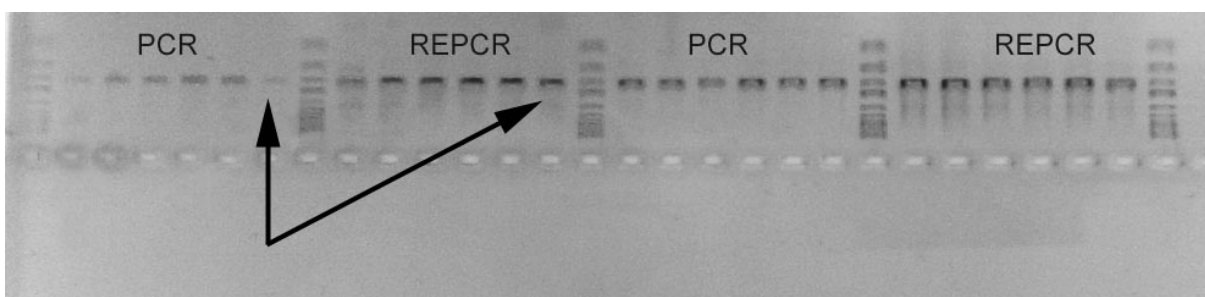
Spejseri su amplifikovani korišćenjem prajmera prema SHAW I SAR (2007). Prajmeri za prvi lokus su: forward, rpS16x2F2: 5' - AAAGTGGGTTTTTATGATCC - 3' i reverzni trnK(UUU): 5' - TTAAAAGCCGAGTACTCTACC - 3' a za drugi: forward prajmer trnL(UAG): 5' - CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT - 3' i rpL32-F: 5' - CAGTTCCAAAAAACGTACTT C - 3' kao reverzni.

PCR amplifikacija je urađena u laboratoriji Katedre za mikrobiologiju i imunologiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Reakcija je za oba genska markera izvedena u zapremini od 25 μ l sledećeg sastava: 25 ng osnovne DNK (za svaku jedinku); 2.5 μ l 10 x *Taq* pufer sa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Invitrogen); 2.5 mM MgCl_2 ; 0.2 mM dNTP (dezoksi nukleotidi); 0.1 μ M oba prajmera; 0.80% BSA (Bovine Serum Albumin, Promega,); i 0.025 U/ μ l „Platinum“ *Taq* (termostabilna) DNK polimeraza (Invitrogen). Za oba regiona korišćen je identičan program PCR amplifikacije: inicijalna denaturacija na 94 °C u trajanju od 10 min; zatim 35 ciklusa denaturacije na 94 °C od 45 s; faze vezivanja prajmera na 53 °C od 1 min i ekstenzije na 72 °C u trajanju od 1 min; i konačne faze ekstenzije 10 min na 72 °C.

3.1.3. Elektroforeza na agaroznom gelu

Prisustvo PCR produkata je provereno elektroferezom na 2% agaroznom gelu u 1 x TAE puferu (24,2g tris – borata, 5,7 ml glacialne sirćetne kiseline i 1, 86g EDTA)

15 min na 140 V, 170 mA, 40 W sa 4 μ l uzorka i 1,2 μ l boje za nanošenje (orange G). Po isteku predviđenog vremena, gel je preličen etidijum bromidom (4 μ l etd bromida u 1996 μ l dH₂O), koji se vezuje za nukleinske kiseline i omogućava da DNK postane vidljiva nakon osvetljavanja UV svetlom u transiluminatoru. Kada je rezultat PCR reakcije bio slab, dobijeni PCR produkti su korišćeni kao osnova za ponovnu amplifikaciju (slika 10).



Slika 10. Provera rezultata ponovljene PCR reakcije elektroforezom na agaroznom gelu.

3.1.4. Sekvenciranje PCR produkata

Sekvenciranje PCR produkata obavljeno u jednom pravcu, sa forward prajmerom komercijalno, od strane “Macrogen Europe“, u Amsterdamu, Holandija. Korišćena je Sangerova metoda sekvenciranja pomoću 96-capillary 3730xl DNA Analyzer automated sequencer (Applied Biosystems, USA). (<http://dna.macrogen.com/eng/>).

Elektroferogrami su ispravljani ručno pomoću softvera Chromas Lite. (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html).

3.1.5. Procena genetičkog diverziteta i prostorne genetičke strukture

Dobijene sekvence za svaki marker su poravnate ponaosob u softveru MEGA5 (TAMURA I SAR 2011. <http://www.megasoftware.net/>) i sređene ručno, a zatim spojene u matriks koji obuhvata oba cpDNK regiona.

Nivo genetičkog diverziteta unutar i između populacija izražen je putem parametara broj haplotipova (h), diverzitet nukleotida po Neiju (π) i diverzitet

haplotipova (Hd). Ovi parametri su izračunati korišćenjem DnaSP v. 5.10 (LIBRADO I ROZAS 2009).

Diverzitet Nukleotida po Neiju (NEI I LI 1979) je statistički parametar polimorfizma u uzorku sekvenci iz date populacije i predstavlja srednju vrednost razlika u nukleotidima između bilo koje dve nasumično odabrane sekvence DNK iz uzorka. (Označava se sa π a izračunava na sledeći način: $\pi = \sum x_i x_j \pi_{ij}$ gde su x_i i x_j učestalosti sekvenci “ i ” i “ j ” a π_{ij} broj nukleotidnih razlika između ovih sekvenci.)

Diverziteta haplotipova (Hd) je mera jedinstvenosti određenog haplotipa u populaciji.

Takođe, izračunati su unutarpopulacioni diverzitet (Hs) za svaku populaciju i ukupni genetički diverzitet (Ht), pomoću programa PERMUTE (PONS I PETIT 1996).

Parametar genetičke diferencijacije populacija (F_{ST}) je izračunat u programu ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER I SAR. 2005), a statistički značaj je procenjen na temelju 1000 permutacija. Ove vrednosti su korišćene da bi se izračunao efektivan broj “ženskih” migranata po generaciji čime se indirektno procenjuje prosečni nivo protoka semena pri genetičkom driftu u uslovima “neograničenog ostrvskog modela”. Kod haploidnih genoma, efektivni protok semena se izražava preko formule $Nm = 1/2(1/F_{ST} - 1)$, gde je N veličina efektivne “ženske” populacije a m stopa ženskih migranata (SLATKIN 1993). Nm vrednost je izračunata za kompletan uzorak i između svih parova populacija.

U cilju utvrđivanja značaja izolacije populacija usled prostorne udaljenosti na genetičku diferencijaciju (*isolation-by-distance*, IBD), ispitana je korelacija između linearnih genetičkih distanci uparenih populacija izraženih putem Rajtovog indeksa genetičke diferencijacije F_{ST} i logaritam geografskih udaljenosti između parova populacija pomoću. Statistička značajnost korelacija, utvrđenih primenom Mantelovog testa (MANTEL 1967) u programu IBDWS (*Isolation by Distance Web Service*) v. 3.21 (JENSEN ET AL 2005), utvrđena je korišćenjem 30 000 permutacija. U slučajevima kada su uparivane genetički identične tj. monomorfne populacije, korišćene su vrednosti za genetičke distance od 0.0001 za analize.

Za utvrđivanje geografski homogenih i maksimalno međusobno diferenciranih grupa populacija korišćena je SAMOVA analiza (SAMOVA: Prostorna analiza

molekularne varijanse; DUPANLOUP I SAR 2002) koja ne zahteva unapred definisanje grupa populacija već na osnovu genetičkih podataka traži geografske obrasce između potencijalnih grupa populacija. Program traži takav sastav grupa geografski bliskih populacija kod kojeg je maksimalizovana vrednosti molekularne varijanse između linija (F_{CT}) i minimalizovana varijansa između populacija u okviru svake linije (F_{SC}). Zadato je 100 simulacija za broj genetičkih grupa (K) u opsegu od $K = 2$ do $K = 6$, i za svaki od ispitivanih K su zabeležene vrednosti F_{CT} i F_{SC} sa ciljem utvrđivanja one vrednosti K kod koje je dobijena najveća F_{CT} i najmanja F_{SC} , što se smatra optimalnim grupisanjem populacija. SAMOVA je takođe korišćena i za identifikaciju barijera za protok gena između populacija.

Za hierarhisku analizu molekularne varijanse (AMOVA, EXCOFFIER ET AL 1992), korišćene su vrednosti genetičke diferencijacije uparenih populaciji (F_{ST} vrednosti) pomoću programa ARLEQUIN 3.5. AMOVA analiza urađena je da bi se procenila i podelila ukupna molekularna varijansa na tri komponente: između linija (F_{CT}) između populacija za svaku liniju (F_{SC}), i unutar populacija (F_{ST}), a statistička značajnost je testirana sa 10 000 permutacija. Za AMOVA analizu, pretpostavljeno je različito grupisanje populacija, prema prethodno urađenoj SAMOVA analizi. Analiza molekularne varijanse (AMOVA) može da pomogne u potrazi za najoptimalnijim grupisanjem populacija, a to je ono grupisanje populacija kod kojeg je vrednosti F_{CT} najviša, a vrednost F_{SC} najniža, slično kao u slučaju prostorne analize molekularne varijanse (SAMOVA, DUPANLOUP ET AL. 2002). AMOVA ukazuje i na homogenost detektovanih grupa.

Prisustvo filogeografske strukture u okviru areala *S. officinalis* provereno je poređenjem genetičke diferencijacije za “uređene” (N_{ST}) i “neuređene” (G_{ST}) alele, pomoću programa CONTRIB (PETIT I SAR. 1998). Filogeografska struktura postoji kada je N_{ST} veće od G_{ST} jer se srodni haplotipovi češće nalaze u istom geografskom području, nego što bi bio slučaj pri slučajnoj distribuciji. Statistička značajnost između G_{ST} i N_{ST} je utvrđena primenom 1000 permutacija.

Genealoški odnosi između cpDNK haplotipova su određeni metodom statističke parsimonije pomoću programa TCS 1.21 (CLEMENT I SAR. 2000). Naime, pomoću ove metode se, među svim mogućim haplotip stablima koja se mogu konstruisati, traži ono koje zahteva najmanji broj evolutivnih događaja (mutacija). Insercije i delecije (indeli)

u sekvencama su tretirane kao peti karakter, a indeli duži od 1 bp su tretirani kao jedna mutacija. TCS izračunava broj mutacija između svih parova haplotipova i na kraju spaja najbližnje haplotipove u mrežu (stablo) u kojoj je ukupna verovatnoća veća od 95% (TEMPLETON I SAR. 1992).

3.1.6. Filogenetska analiza i procena vremena razdvajanja

Za filogenetsku analizu i utvrđivanje evolutivnih odnosa haplotipova korišćen je bajesovski pristup u programskom paketu BEAST v.1.6.2 (DRUMMOND I RAMBAUT 2007). Ovaj metod omogućava da se analiza izvede bez korišćenja outgrupa za “ukorenjivnje” filogenetskog stabla. Konstruisano je “majority rule consensus” stablo, procenjena statistička podrška za klade izražena pomoću bajesovskih posteriornih verovatnoća (*Bayesian posterior probabilities*) i određeno vreme razdvajanja između detektovanih linija. Indeli nisu uključeni u ovu analizu. Najverovatniji model evolucije sekvenci za dobijene podatke je određen pomoću MEGA 5 softvera. Ovaj softver naime, testira različite evolutivne modele za unete podatke i preko vrednosti određenih kriterijuma sugerise model koji najviše odgovara konkretnom slučaju. Najmanja vrednost bajesovskog informacionog kriterijuma (BIC) dobijena je za model T92 (TAMURA 1992) ali je bila takođe niska i za HKY model (HASEGAWA, KISHINO I YANO 1985), dok je Akaike informacioni kriterijum (AIC) podržavao TN93 (TAMURA I NEI 1993) i HKY supstitucione modele. Zato je odabran HKY model u BEAST analizi. Da bi se smanjio broj promenljivih parametara tokom analize, odabran je demografski model konstantne veličine populacija kao zadata pretpostavka za modeliranje promena u populacijama tokom vremena.

Da bi se prihvatila hipoteza o molekularnom satu testirana je ujednačenost stopa mutacija tri odabrana haplotipa (A, B and F), primenom Tadžiminog testa relativne stope u MEGA softveru. Izabran je model “striktnog molekularnog sata” (konstantna stopa mutacija) preporučen za filogenetske analize na nivou vrste. Procena vremena divergencije između detektovanih grupa zasnovana je na stopi mutacije od 1.01×10^{-9} supstitucije po baznom paru, po godini za sinonimne parove hloroplastne DNK kod semenjača, prema GRAUR I LI (2000), što odgovara proceni stope promena introna i nekodirajućih spejsera DNK organela (CHIANG I SAR 2009.) a već je primenjivano u

istraživanjima ovog tipa kod drugih predstavnika porodice Lamiaceae (MOLINS I SAR 2011), dakle primereno je odabranim markerima za *S. officinalis*.

Imput fajl za BEAST analizu je konstruisan pomoću BEAUti (Bayesian Evolutionary Analysis Utility) interfejsa u BEAST softverskom paketu, nakon čega je izvedena sama analiza sa zadatim parametrima.

Nakon predanalize od 1000000 ponavljanja, svi parametri su uzorkovani na svakih 100 koraka od ukupno 5000000 ponavljanja MCMC (Markov chain Monte Carlo algoritam) tokom analize. U cilju testiranja stacionarnosti parametara i postojanja adekvatne veličine uzorka, koja je za sve parametre premašivala kritičnu vrednost od 200, korišćen je program TRACER v.1.6.2.

Posteriorne distribucije procenjenog vremena razdvajanja za noduse su sumirane u programu TreeAnnotator 1.4.2 (u okviru paketa BEAST), a stablo je napravljeno pomoću programa FigTree 1.0 (Rambaut 2006).

3.1.7. Test neutralnosti i demografske ekspanzije

Da bi se otkrila odstupanja od populacione ravnoteže, urađeni su Fu-ov F_S test neutralnosti (FU 1997) i Tajimov D test (TAJIMA 1989) koji su u sastavu programa ARLEQUIN 3.5. Statistička značajnost oba testa je utvrđena primenom 1000 bootstrap ponovaka. Ovaj program je korišćen i za procenu demografske istorije linija pomoću analize raspodele neusklađenosti (*mismatch distribution analysis*). Pri modelu rapidne ekspanzije populacija u nedavnoj prošlosti očekuje se unimodalna distribucija razlika između uparenih sekvenci, dok je multimodalna raspodela odlika populacija u kojima postoji ravnoteža između mutacija i genetičkog drifta (*mutation-drift equilibrium*) (ROGERS I HARPENDING 1992). Izračunat je i zbir kvadratnih odstupanja (SSD) između dobijene i očekivane raspodele neusklađenosti i dobijene su P vrednosti. Značajna P vrednost ukazuje na to da se podaci ne uklapaju u model nagle ekspanzije odnosno da populacije nisu imale rapidna povećanja brojnosti tokom skorije istorije.

3.3. *Morfometrijska ispitivanja*

Morfometrijska ispitivanja *S. officinalis* urađena su sa ciljem da se ispita i protumači varijabilnost odabranih karaktera unutar i između populacija ispitivanog taksona. Za ispitivanje su odabrane kvalitativne i kvantitativne odlike koje su ranije korišćene kao diferencijalni karakteri na subspecijskom nivou prema različitim izvorima (GAJIĆ 1976, REALES 2004).

Pošto se morfološkim karakterima na ovom taksonomskom nivou ne mogu pripisati pleziomorfna ili apomorfna stanja, ove odlike se ne mogu koristiti u ispitivanju filogenetskih veza između populacija (ili grupa populacija), već isključivo sa ciljem da se utvrdi obrazac međusobnih fenetičkih veza između populacija u vidu klaster analize i da se stekne predstava o eventualnom značaju karaktera u infraspecijskoj taksonomiji vrste.

Preliminarna istraživanja mikomorfoloških karaktera koji su korišćeni u taksonomskoj analizi srodnih *Salvia* taksona u zapadnom delu Mediterana (prisustvo različitih tipova trihoma na čašici, karakteristike orašica (REALES I SAR 2004), pokazala su da ove osobine u ispitivanim populacijama ne pokazuju značajnu varijabilnost pa su isključene iz statističke analize.

U statističku analizu ušla su dva tipa kvantitativnih makromorfoloških karaktera (tabela 2): meristički, čije svojstvo se može izraziti numerički celim brojevima (broj cvetova, broj nodusa složene cvasti, ...) kao i kontinuirani karakteri čije osobine se izražavaju vrednostima koje variraju unutar određenog opsega (dužina i širina listova, dužina cvetne drške...). Analizom su takođe obuhvaćeni i kvalitativni karakteri (prisustvo “ušica” na listovima, razgranatost cvasti i prisustvo brakteja na osnovnim nodusima cvasti). S obzirom da kod žalfije, kao i kod nekoliko drugih mediteranskih taksona (ARONNE I DE MICCO 2001, LIANOPOULOU I SAR 2014), postoji svojevrstan lisni dimorfizam odnosno prisustvo “prezimljujućih” listova na vegetativnim izdancima i “sezonskih” listova na fertilnim izdancima, potrebno je napomenuti da su mereni isključivo listovi sa jednogodišnjih cvetnih izdanaka.

Tabela 2. Spisak karaktera koji su ušli u morfometrijsku analizu

Opis karkatera	Tip karaktera (mera)
Visina fertilnog izdanka	kontinuirani (mm)
Dužina lisne drške	kontinuirani (mm)
Dužina liske	kontinuirani (mm)
Najveća širina liske	kontinuirani (mm)
Udaljenje najveće širine liske od lisne osnove	kontinuirani (mm)
Dužina regiona cvasti	kontinuirani (mm)
Broj verticilastera	merisitički (br)
Broj cvetova u bazalnom nodusu	merisitički (br)
Dužina cvetne drške	kontinuirani (mm)
Duzina čašice	kontinuirani (mm)
Dužina donjeg zupca čašice	kontinuirani (mm)
Dužina gornjeg zupca čašice	kontinuirani (mm)
Dužina oske	kontinuirani (mm)
Prisutnost brakteja na donjim nodusima	kvalitativni
Razgranatost fertilnog izdanka	kvalitativni
Prisutnost “uvca”	kvalitativni

3.3.1. Statistička obrada rezultata morfometrije

Za sve kvantitativne karaktere urađena je osnovna *deskriptivna statistika*, odnosno određene su srednje vrednosti (*sr. vredn.*), varijansa (*Var*), standardna devijacija (*Std. dev.*) i standardna greška (*St. greška*). Izračunat je i koeficijent varijacije (*CV*) koji predstavlja odnos između standardne devijacije i srednje vrednosti uzorka i omogućava poređenje varijabilnosti različitih tipova karaktera i različitih mera.

Za utvrđivanje značaja razlika između srednjih vrednosti karaktera ispitivanih grupa jedinki, na osnovu njihove varijanse, korišćena je **analiza varijanse (ANOVA)**.

Urađena je i **analiza glavnih komponenti (PCA, Principal Component Analysis)**, statistički metod koji se koristi da se veliki set podataka svede na manji broj linearnih komponenti (faktora) koje u višedimenzijalnom prostoru prikazuju odnose između uzoraka. Ovaj metod ima za cilj da se uoče one osobine (karakteristi) koji imaju najveći doprinos u varijabilnosti i razlici između grupa (populacija) i da se odredi struktura varijabilnosti. Nakon izračunavanja eigenvektora, koji opisuju varijabilnost u multidimenzionalnom prostoru, rezultati su prikazani grafički scatterplott-ovima za nekoliko prvih dimenzija, s obzirom da njima pripada najveći deo ukupne varijabilnosti.

Za razmatranje različitosti između grupa urađena je **diskriminantna kanonijska analiza (CDA)**. Ovaj multivarijantni statistički metod se koristi za određivanje seta karaktera koji u najvećoj meri razdvajaju grupe uzoraka (populacije). U analizu su ušli svi karakteri, zatim karakteri za koje je ANOVA analiza pokazala da se značajno razlikuju između grupa i svi PCA značajni karakteri. Rezultati su prikazani grafički u prve dve dimenzije scatterplott-ovima.

Klaster analiza kojom se vizualizuje udaljenost između analiziranih populacija, urađena je na osnovu mahalano-bijusovih distanci, koje su izračunate iz kanonijske diskriminantne analize (CDA). Za klaster analizu odabran je Unweighted pair-group average (UPGMA) hijerarhijski metod u kome je udaljenost između dva klastera izračunata kao srednja vrednost udaljenosti između svih parova objekata u dva različita klastera.

Za utvrđivanje doprinosa kvalitativnih karaktera u razdvajanju populacija urađena je **korespondentna analiza (CA)**, koja postavlja populacije i merene parametre u koordinatni sistem, pri čemu su dobijene vrednosti prikazuju na prve dve korespondentne ose a statistička značajnost rezultata ove metode testira se X^2 testom.

Statistička obrada podataka je urađena u programskom paketu STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc. 2004).

4. REZULTATI

4.1. Rezultati istraživanja molekularnih parametara

4.1.1. Polimorfizam genskih markera, genetički diverzitet i prostorna genetička struktura

Oba intergenska spejsera DNK kloroplasta su uspješno amplificirana za sve uzorkovane individue *S. officinalis*. Dužina poravnatih sekvenci 3'*rps16*-5'*trnK* markera, bila je 658 bp sa 14 informativnih mesta (šest tranzicija, četiri transverzije i četiri mutacije u vidu indela, i tri duplikacije od 3 do 4 bp motiva). Poravante *rpl32-trnL* sekvence bile su dužine 558 bp sa osam informativnih mesta (šest tranzicija, jednom duplikacijom motiva od 6 bp, i jednim poli-T nizom sa varijabilnim brojem nukleotida - mikrosatelit).

U kompletnom uzorku detektovane su tri različite sekvence za *rpl32-trnL* i šest za 3'*rps16*-5'*trnK*. Sekvence su deponovane u NCBI banci gena (accessions JQ771324 do JQ771332, prilog 1).

Dužina spojenih poravnatih sekvenci iznosila je 1216 bp sa 22 informativna mesta, uključujući i mikrosatelite jer se u ranijim istraživanjima pokazalo da se i mikrosateliti mogu koristiti u studijama ovog tipa na infraspecijskom nivou (RENDELL I ENNOS 2003; WALTER I EPPERSON 2005; NACIRI I GAUDEUL 2007). Identifikovano je sedam haplotipova (A – G) (tabela 3).

Broj haplotipova po populacijama varirao je od jednog u većini kontinentalnih populacija do tri u populacijama ORJ i RUM (tabela 3 i slika 5).

Nepristrasni haplotipski diverzitet prema Nei ju (H_d) na nivou populacija se kretao u opsegu od 0.000 (JBL, MIL and PIV) do 0.509 (LUS), a nukleotidni diverzitet (π) od 0.0000 (JBL, MIL and PIV) do 0.0036 (ORJ). Ukupan nepristrasni haplotipski diverzitet u kompletnom uzorku iznosio je 0.641 a ukupan nukleotidni diverzitet 0.0035 (Tabela 4). Prosečan genetički diverzitet u populacijama, H_s , je bio 0.221 (SE = 0.074), a ukupan genetički diverzitet, H_T 0.695 (SE = 0.120).

Tabela 3. Zastupljenost haplotipova u istraživanim populacijama i položaj informativnih mesta u spojenim sekvencama.

Haplotip	zastupljenost. u populacijama	Učestalost haplotipova	<i>rpl32-trnL</i>													<i>3'rps16-5'trnK</i>								
			53*	54	66	70	74	75	76	77	105	136	213	225	441	518	757	913	932	973	1106	1127	1133	1153
A	SIC	0.014	T		T	T	C	A	A	A	C	C	A		d	T		C	T	T	f	T	T	
B	SIC MIL JBL PIV LUS	0.531	T		T	T	C	A	A	A	C	C	A		d	C		C	C	T	f	T	C	
C	LUS MOR RUM ORJ	0.213	T		T	T	C	A	A	A	C	G	G		d	C		C	C	T	f	C	C	
D	MOR	0.014	T		T	T	C	A	A	A	C	G	G		d	C	e	C	C	T	f	T	C	
E	ORJ	0.023	T		T	T	C	A	A	A	T	G	G		d	C		T	C	T	f	T	C	
F	RUM	0.012	G	a	A	C	T	T	G	G	C	G	G	b	c		C		C	C	T	f	T	C
G	RUM ORJ	0.193	G	a	A	C	T	T	G	G	C	G	G	b	c		C		C	C	C	f+1	T	C

* – položaj informativnog mesta; a – 4 bp motiv GGAA; b – 3 bp motiv AAT; c – 6 bp motiv TTTGAA; d – 4 bp motiv TTTG; e – 7 bp motiv TTTCTTT; f i f+1 – poli-T mikrosatelit sa f i f+1 brojem ponovaka

Tabela 4. Diverzitet haplotipova i nukleotidni diverzitet po populacijama

Pop	<i>h</i>	<i>Hd</i> (SE)	π (SE)
SIC	2	0.222 (0.166)	0.0006 (0.0004)
MIL	1	0.000	0.0000
JBL	1	0.000	0.0000
PIV	1	0.000	0.0000
LUS	2	0.509 (0.101)	0.0013 (0.0003)
MOR	2	0.222 (0.166)	0.0002 (0.0001)
RUM	3	0.345 (0.172)	0.0015 (0.0011)
ORJ	3	0.472 (0.162)	0.0036 (0.0012)
TOTAL	7	0.641 (0.040)	0.0035 (0.0004)

Pop – akronim populacije;

h – broj haplotipova

Hd – Diverzitet haplotipova;

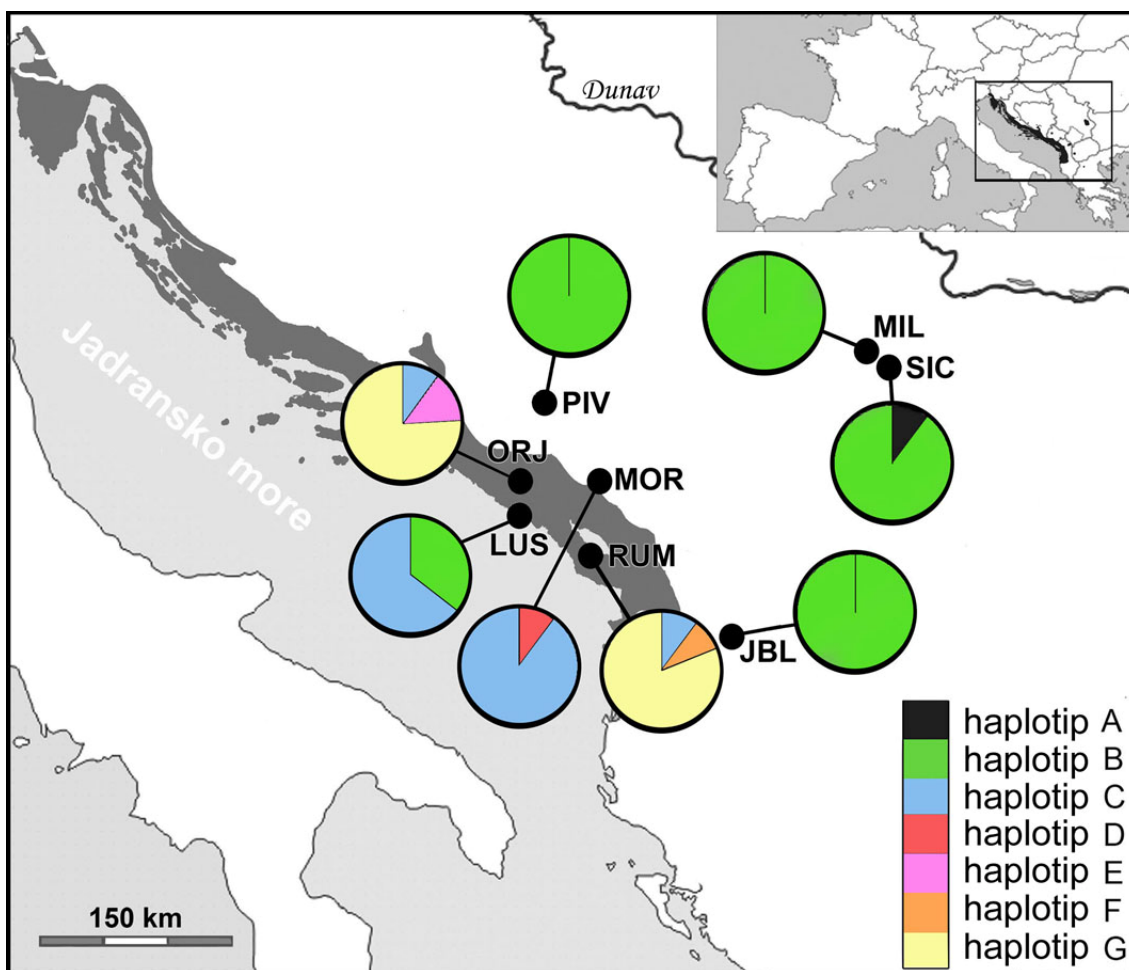
π – Diverzitet nukleotida po Nei;

SE – standardna greška

Detektovani haplotipovi nisu bili zastupljeni nasumično u ispitivanim populacijama *S. officinalis* (slika. 11; tabele 3 i 4). Najzastupljeniji je bio haplotip B (učestalost 0.531, tabela 2) koji je „fiksiran“ u četiri „kontinentalne“ populacije (JBL, MIL, SIC i PIV) i čest u jednoj „primorskoj“ populaciji (LUS).

Haplotip C (učestalost 0.213) je pronađen isključivo u populacijama koje pripadaju kontinuiranom „primorskom“ delu areala. Najbrojniji je u populacijama LUS i MOR a redak u populacijama ORJ i RUM. Haplotip G (učestalost 0.193) je takođe ekskluzivan za „primorske“ populacije, pronađen je samo u populacijama ORJ i RUM. Detektovana su i 4 retka, tzv „privatna“ haplotipa, zastupljena samo u pojedinačnim populacijama kod nekoliko individua. U populaciji SIC pronađen je haplotip A, u populaciji MOR haplotip D, u populaciji ORJ haplotip E i haplotip F u populaciji RUM.

Slika 11. Distribucija i zastupljenost haplotipova u ispitivanim populacijama.



Zastupljenost haplotipova prikazana je isečcima krugova koji su povezani sa lokalitetima dok je kontinuirani deo areala *S. officinalis* na Balkanu (prema Devetku, 1963) zasenčen.

F_{ST} vrednosti za uparene populacije varirale su u opsegu od 0.000 (za kontinentalne monomorfne populacije sa identičnim haplotipom) do 0.934 (između primorske populacije MOR i dve kontinentalne populacije MIL i PIV) (tabela 5).

Tabela 5. Genetička diferencijacija i efektivni protok semena između populacija *S. officinalis*

	SIC	MIL	JBL	PIV	LUS	MOR	RUM	ORJ
SIC		20.84	40.00	20.84	0.50	0.10	0.08	0.23
MIL	0.023		<i>inf</i>	<i>inf</i>	0.33	0.04	0.06	0.19
JBL	0.012	0.000		<i>inf</i>	0.35	0.04	0.06	0.20
PIV	0.023	0.000	0.000		0.33	0.04	0.06	0.19
LUS	0.498	0.600	0.586	0.600		2.23	0.10	0.28
MOR	0.833	0.934	0.930	0.934	0.183		0.08	0.26
RUM	0.868	0.897	0.892	0.897	0.832	0.860		108.73
ORJ	0.687	0.727	0.716	0.727	0.640	0.654	0.004	

F_{ST} vrednosti su prikazane u donjem trouglu;

Nm vrednosti su prikazane u gornjem trouglu;

Poređenja sa vrednostima $P > 0.05$ su boldirana;

Nm vrednosti koje su pristrasne usled niske genetičke varijabilnosti ili njenog odsustva u istraživanim populacijama date su u kurzivu.

F_{ST} vrednosti se nisu statistički značajno razlikovale od nule za sve parove kontinentalnih populacija i za parove primorskih populacija LUS-MOR and ORJ-RUM. Takođe, dobijene F_{ST} vrednosti nisu bile statistički podržane ni kod svih parova kontinentalnih populacija, kao ni između dva para jadranskih populacija, LUS-MOR i ORJ-RUM (Tabela 5). Nm vrednosti (protok semena), procenjene na osnovu F_{ST} vrednosti, iznosile su > 1.00 između populacija koje nisu značajno diferencirane i < 1.00 između izrazito diferenciranih parova populacija (Tabela 5).

Genetička izolacija usled prostorne udaljenosti (*Isolation By Distance*) nije detektovana iako je koeficijent korelacije između linearnih genetičkih distanci (F_{ST} vrednosti) uparenih populacija i logaritama geografskih distanci (prilog 3.) između populacija bio pozitivan, jer je njegova vrednost bila niska i statistički neodržana ($r^2 = 0.003$, $P = 0.351$).

Rezultati prostorne analize molekularne varijanse za različite vrednosti K prikazani su na slici 12. SAMOVA analiza je pokazala postojanje najmanje dve genetičke grupe kod *S. officinalis*. Kada je $K = 2$, diferencijacija između grupa (F_{CT}

vrednost) je visoka i statistički značajna (0.799 , $P = 0.03$, Tabela 5) a F_{SC} vrednost relativno visoka i značajna (0.336 , $P = 0$, Tabela 5). Prvu genetičku grupu čine kontinentalne populacije (JBL, MIL, PIV i SIC) i dve primorske populacije (LUS and MOR) koje se izdvajaju od ostalih primorskih populacija koje čine drugu genetičku grupu (ORJ i RUM). Prva grupa populacija *S. officinalis* označena je kao „kontinentalno primorska linija“ (*CAL*) a druga kao „isključivo primorska linija“ (*PAL*). Međutim, kada je $K = 3$, F_{CT} vrednost je neznatno veća i takođe značajna (0.813 , $P = 0.003$, Tabela 5) dok F_{SC} vrednost naglo opada i ostaje značajna (0.012 , $P = 0$, Table 4). Ako se pretpostave tri linije *S. officinalis*, onda bi se *CAL* linija podelila na grupu od četiri kontinentalne populacije i grupu koju čine obe primorske populacije *CAL* linije. Prema tome posebnu liniju bi činile populacije JBL, MIL, PIV i SIC a posebnu LUS i MOR. Ovakvo grupisanje populacija je u velikoj meri u korelaciji sa biogeografskim regionima u kojima se ove populacije i nalaze (Tabela1).

Sa daljim povećavanjem K u SAMOVA analizi dolazi do razdvajanja ORJ od RUM u *PAL* ($K = 4$), MOR od LUS u *CAL* ($K = 5$), i najzad JBL od MIL, OST i PIV u *CAL* ($K = 6$). Ipak, u slučaju kada je broj genetičkih grupa $K = 4 - 6$, povećanje F_{CT} vrednosti su zanemarljive (0.815 , 0.818 i 0.800 , redom) kao i smanjenje F_{SC} vrednosti (-0.040 , -0.095 i -0.090 , redom). Pri tome, kada je $K = 2$, SAMOVA ukazuje na postojanje geografskih barijera između PIV i geografski bliskih primorskih populacija LUS i ORJ, kao i između RUM i susednih primorskih populacija (LUS, MOR i ORJ) a takođe i kontinentalne populacije JBL. Kada je $K = 3$, barijere su prisutne između PIV i svih susednih primorskih populacija, kao i između MOR i RUM ali ne i između MOR, LUS i ORJ. Ovi nalazi, prema tome, ne mogu da pruže nedvosmislene dokaze o postojanju dve ili tri linije *S. officinalis*.

Tabela 6. Uporedni rezultati AMOVA i SAMOVA statističke analize za alternativne grupe populacija

N	Grupe populacija	Tip varijacije	Procenat varijacije %	Fiksacioni indeks AMOVA	P vredno sti AMOV A	Fiksacioni indeks SAMOVA	P vredno sti SAMO VA
1	CAL	Između populacija	69.72	$F_{ST} = 0.697^{**}$	$P = 0$		
		Unutar populacija	30.28				
2	PAL	Između populacija	0.46	$F_{ST} = 0.004$	$P > 0.05$		
		Unutar populacija	99.54				
Sve populacije	Između 2 linije	Između populacija	79.87	$F_{CT} = 0.799^*$	$P = 0.05$	$F_{CT} = 0.799^*$	$P = 0.03$
		Između populacija unutar svake linije	6.77	$F_{SC} = 0.336^{**}$	$P = 0$	$F_{SC} = 0.336^{**}$	$P = 0$
		Između populacija	13.36	$F_{ST} = 0.866^{**}$	$P = 0$	$F_{ST} = 0.866^{**}$	$P = 0$
1	kontinentalna pod linija CAL	Između populacija	1.95	$F_{ST} = 0.004$	$P > 0.05$		
		Unutar populacija	98.05				
2	primorska podlinija CAL	Između populacija	18.34	$F_{ST} = 0.183$	$P > 0.05$		
		Unutar populacija	81.66				
3	PAL	Između populacija	0.46	$F_{ST} = 0.004$	$P > 0.05$		
		Unutar populacija	99.54				
Sve populacije	Između 2 linije	Između populacija	81.30	$F_{CT} = 0.813^*$	$P = 0.03$	$F_{CT} = 0.813^{**}$	$P = 0.002$
		Između populacija unutar svake linije	0.22	$F_{SC} = 0.012$	$P > 0.05$	$F_{SC} = 0.012^{**}$	$P = 0$
		Između populacija	18.48	$F_{ST} = 0.813^{**}$	$P = 0$	$F_{ST} = 0.813^{**}$	$P = 0$

N – broj pretpostavljenih linija *S. officinalis*; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Slika 12. Grafički prikaz rezultata SAMOVA analize grupisanja populacija za $K = 2$ i $K = 3$
(rezultati SAMOVA za $K = 4$ do 6 nalaze se u prilogu 4.)

a) $K = 2$

Prva grupa: ORJ i RUM

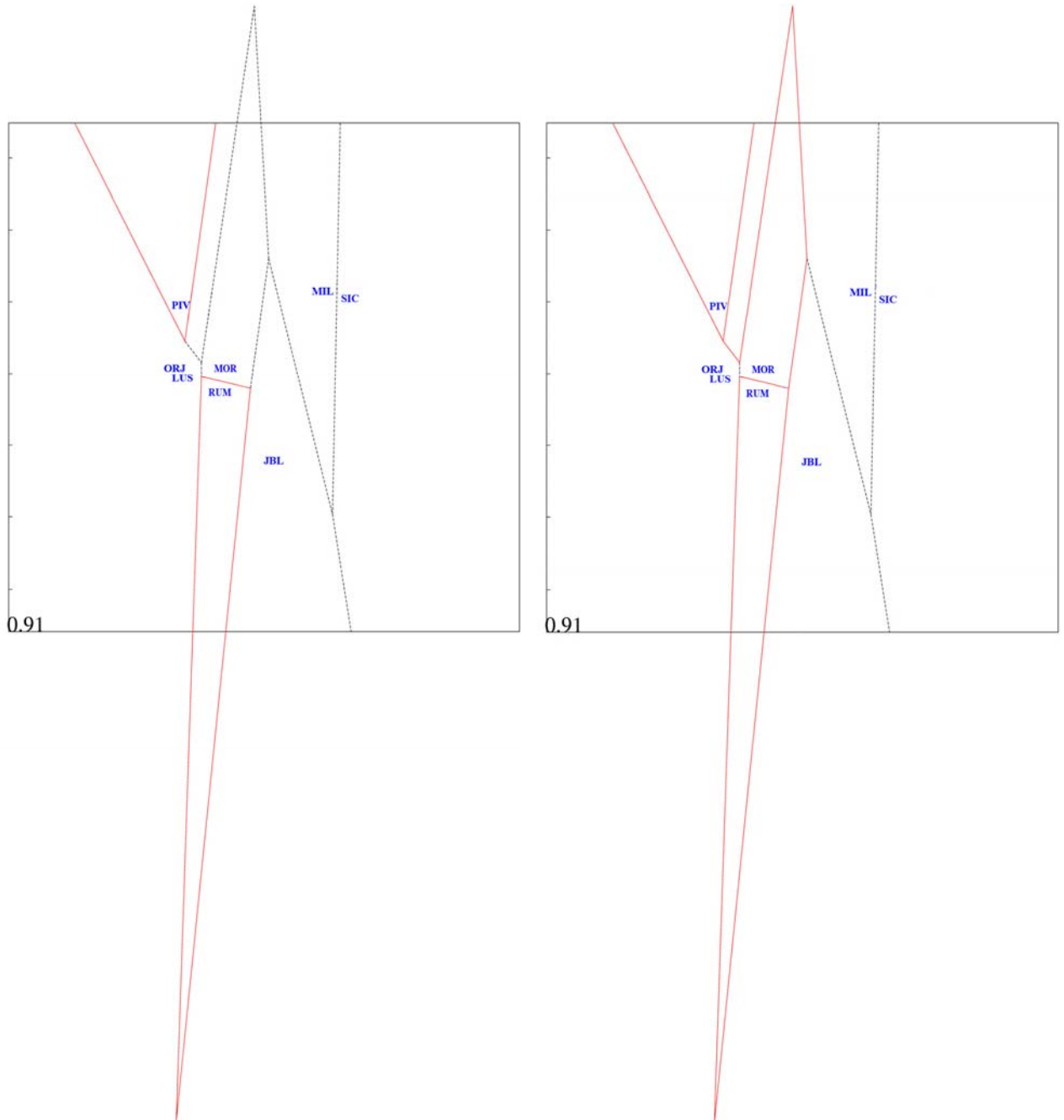
Druga grupa: JBL, LUS, MIL, MOR, OST i PIV

b) $K = 3$

Prva grupa: ORJ i RUM

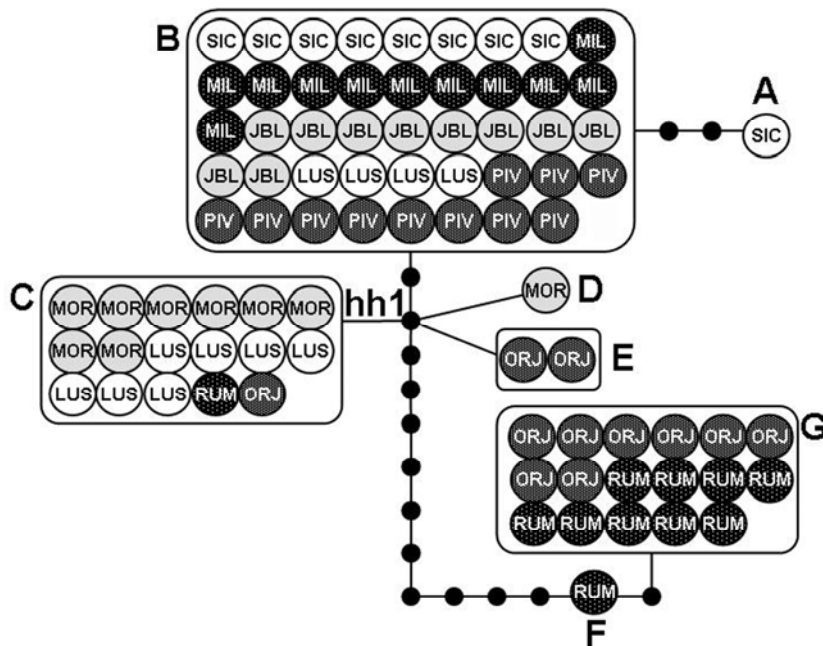
Druga grupa: LUS i MOR

Treća grupa: JBL, MIL, OST i PIV



Podela molekularne varijanse na tri komponente urađena je sa pretpostavkom o postojanju dve, odnosno tri linije *S. officinalis* (tabela 6). U oba slučaja, visoka i slična vrednost molekularne varijanse se može pripisati razlikama između linija (79.87 % i 81.30 %, redom), i obe F_{CT} vrednosti su bile visoke, ali kada je $K = 2$, F_{CT} vrednost je bila marginalno statistički značajna (0.799, $P = 0.05$) dok je sa $K = 3$ (0.813, $P = 0.03$) bila statistički značajna. Ipak, pod pretpostavkom postojanja tri linije, (kontinentalne populacije CAL, primorske populacije CAL i PAL), procenat varijacije između populacija unutar svake od linija bio je niži i nije bio statistički značajan (0.22 %, $F_{SC} = 0.012$, $P > 0.05$) nego pod pretpostavkom postojanja dve linije (CAL i PAL) (6.77 %, $F_{SC} = 0.336$, $P = 0.00$). Niže i statistički nepodržane F_{ST} vrednosti su takođe dobijene unutar svake linije kada se pretpostave tri linije nego kada se pretpostave dve linije. SAMOVA analiza, dakle, nije dala jasnu prednost postojanju dve ili tri linije *S. officinalis*, dok je AMOVA analiza podržala postojanje tri linije ove vrste. Ipak, sa $K = 2$, AMOVA pokazuje da je kontinentalno-primorska linija *S. officinalis* heterogenija nego PAL (CAL: $F_{ST} = 0.697$, $P = 0$; PAL: $F_{ST} = 0.004$, $P > 0.05$).

Slika 13. Haplotip stablo dobijeno primenom metode statističke parsimonije na osnovu dva cpDNK regiona kod ispitivanih populacija *S. officinalis*



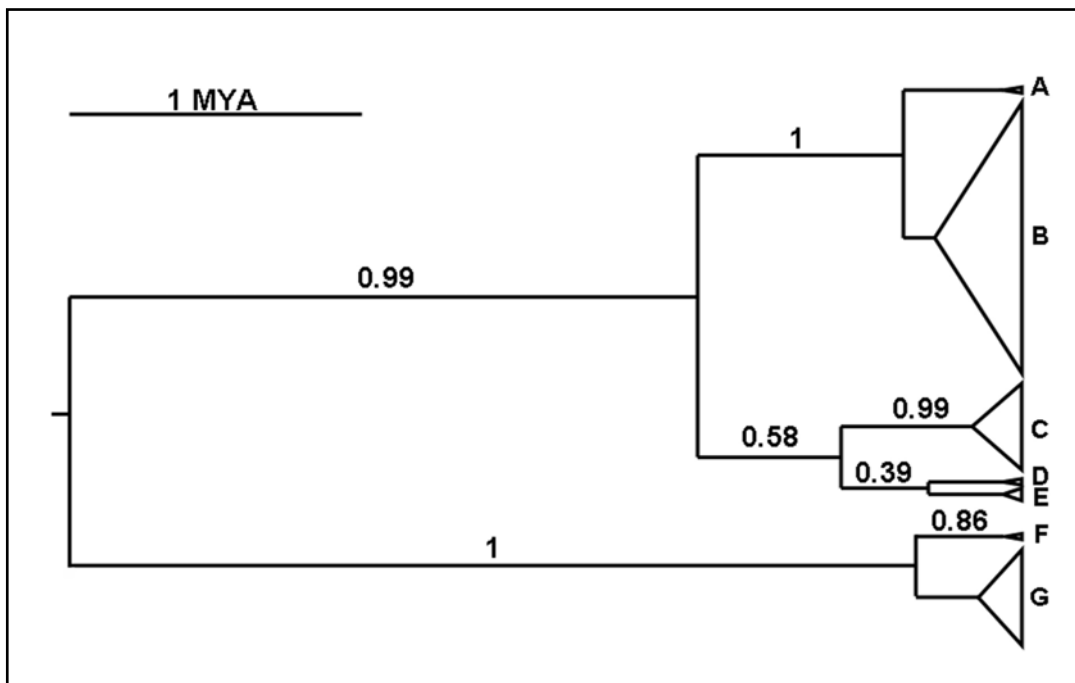
hh1 – hipotetički ancestralni haplotip za celokupan uzorak. A-G – detektovani haplotipovi u istraživanim populacijama. Crne tačke predstavljaju hipotetičke haplotipove a linije između njih pojedinačne mutacione korake.

Poređenje N_{ST} i G_{ST} vrednosti ($N_{ST} = 0.764$, $SE = 0.046$; $G_{ST} = 0.682$, $SE = 0.066$; $P = 0.000$), ukazuje na postojanje filogeografskog obrasca pošto je N_{ST} vrednost statistički značajno veća od G_{ST} vrednosti .

Haplotip stablo dobijeno metodom statističke parsimonije u programu TCS 1.21 prikazano je na slici 13.

Haplotipovi B, C, D i E su udaljeni jednu ili dve mutacije od hipotetičkog haplotipa 1 (*hh1*), koji bi se mogao smatrati ancestralnim. Haplotip G je razdvojen sa 13 mutacija od *hh1*. Haplotipovi A (koji je za dve mutacije udaljen od haplotipa B), B, C i D se jedino mogu naći u populacijama koje čine *CAL liniju* izuzev haplotipa C koji se takođe može naći u dve individue *PAL*. Ovi haplotipovi su mnogo srodniji sa hipotetičkim ancestralnim haplotipom *hh1* nego što je to slučaj sa haplotipom G koji se jedino može naći u jugoistočnim primorskim populacijama *PAL*. *PAL* jedino deli haplotip C sa *CAL*, i sadrži dva specifična haplotipa, E (ORJ) i F (RUM). Na osnovu haplotip stabla ne može se sa sigurnošću utvrditi postojanje dve ili tri nezavisne linije kod *S. officinalis*.

Slika 14. „Majority rule“ konsenzus stablo prema bajesovskoj analizi „striktnog sata“



Brojevi duž grana su bajesovske posteriorne verovatnoće;

Jedinke sa identičnim haplotipovima su grupisane i prikazane u vidu trouglova a njihova vertikalna dimenzija odgovara broju individua.

Stablo sa svim jedinkama prikazano je u **prilogu 2**.

4.1.2. Filogenetska analiza i procena vremena razdvajanja

„Majority rule“ konsenzus stablo, dobijeno bajesovskom analizom u kojoj je pretpostavljena konstantna stopa mutacija („striktni sat“) i posteriorne verovatnoće nodusa prikazano je na slici 14. Koren stabla postavljen je između haplotipova F i G sa jedne strane, koji su prisutni u populacijama iz *PAL* linije, i sa druge haplotipova A, B, C, D i E, koji su svi detektovani u populacijama koje pripadaju *CAL* liniji sa izuzetkom haplotipa E. Posteriorne verovatnoće za ove osnovne grane, dobijene bajesovskom analizom, su veoma visoke (1,00 i 0,99, redom) i jasno podržavaju pretpostavku o postojanju dve linije *S. officinalis*, *CAL* i *PAL*. Razdvajanje haplotipova A i B koji su pronalazeni isključivo kod predstavnika kontinentalnih populacija JBL, MIL, PIV i SIC od ostalih haplotipova ove linije (C i D) takođe je snažno podržano (posteriorna verovatnoća 1,00), dok je razdvajanje haplotipova C i D koji su detektovani u primorskim populacijama LUS i MOR slabo podržano (posteriorna verovatnoća od 0,58).

Prema BEAST analizi *poslednji zajednički predak* sadašnjeg uzorka datiran je pre 3,267 miliona godina (niža 95 % najviša posteriorna gustina, HDP = 1,584 MYA, viša 95 % HPD = 5,247 MYA), čime se vreme osnovnog razdvajanja dve linije *S. officinalis* smešta u pliocen. Pretpostavljena diverzifikacija *CAL* na kontinentalnu i primorsku podliniju desila se sredinom pleistocena [1,188 MYA (0,495 – 2,079 MYA)], dok se razdvajanje *PAL* procenjuje na 0,396 MYA (0,099 – 0,990 MYA). Razdvajanja unutar jadranske i primorske podlinije *CAL*, procenjeno je na 0,693 MYA (0,198 - 1,287 MYA) za prvu i 0,495 MYA (0,099 - 0,891 MYA), za drugu.

4.1.3. Demografska analiza

Tabela 7. Rezultati analize raspodele neusklađenosti (*mismatch distribution analysis*) i testova neutralnosti za populacije ukupno i odvojeno za dve linije *S. officinalis*.

Lineage	SSD	<i>P</i>	Tadžimina <i>D</i> vrednost	<i>P</i> vrednost	Fuova F_S vrednost	<i>P</i>
CAL	0.06540*	0.01833	- 0.15338	0.70383	0.89142	n.a.
PAL	0.20714*	0.04550	- 0.55528	0.40450	4.80511	0.96100
ukupno	0.10083*	0.02500				

* $P < 0.05$

Rezultati Tadžiminog *D* testa ($D = -0.15338$, $P = 0.70383$ za *CAL*; $D = -0.55528$, $P = 0.40450$ za *PAL*) (TAJIMA 1989) kao i Fu-ovog F_S testa neutralnosti (0.89142, $P = n.a.$ za

CAL; 4.80511, $P = 0.96100$ za PAL) s (FU 1997) su pokazali da nema odstupanja od populacione ravnoteže (tabela 6), odnosno, da populacije nisu prolazile kroz rapidna povećanja brojnosti (ekspanzije) tokom nedavne istorije.

Značajne SSD vrednosti (0.06540, $P = 0.01833$ za CAL i 0.20714, $P = 0.04559$ za PAL) takođe odbacuju model brze ekspanzije u nedavnoj prošlosti za linije *S. officinalis* (Table 7), a osim toga, analiza raspodele neusklađenosti (*mismatch distribution analysis*) ukazuje na multimodalnu raspodelu kod obe linije.

4.2. Rezultati analize morfoloških parametara

Visine jednogodišnjeg fertilnog izdanka prikazane su u tabeli 8. Najviše izdanke prema srednjoj vrednosti imala je populacija GRA iz okoline Grahova (307 mm) kod koje je izmeren i izdanak maksimalne visine (420 mm), dok su najsitnije izdanke imale jedinke iz populacije PLE u Sićevačkoj klisuri u blizini Rimskog puta ispod Pleša (207,94 mm). Najveću varijabilnost visine izdanka imala je populacija RUN sa severne strane Rumije (St. dev = 63,31 a CV = 26,21%) a najujednačeniju visinu imale su jedinke iz populacije PIV iz kanjona Pive (St. dev = 35,67) i sa Orijena (ORJ, CV = 16,31%).

Tabela 8. Rezultati univariacione analize prosečne visine fertilnog izdanka (mm)

populacija	N	Sr. vrednost	Min.	Maks.	Var.	Std.dev.	St. greška	CV
SIC	10	209,00	130	290	2 898,89	53,84	17,03	25,76
PLE	18	207,94	150	310	2 653,00	51,51	12,14	24,77
JBL	13	211,92	145	295	2 831,41	53,21	14,76	25,11
PIV	10	208,50	160	260	1 272,50	35,67	11,28	17,11
LUS	11	221,36	170	280	1 540,45	39,25	11,83	17,73
MOR	14	209,93	150	315	2 189,30	46,79	12,51	22,29
RUN	19	241,58	120	350	4 008,04	63,31	14,52	26,21
RUS	10	174,90	120	280	1 888,99	43,46	13,74	24,85
ORJ	7	281,86	220	360	2 113,81	45,98	17,38	16,31
GRA	10	307,00	230	420	2 522,00	50,22	15,88	16,36
NJE	11	254,09	160	400	3 679,09	60,66	18,29	23,87

Dužina lisne drške prvih (najnižih) listova na jednogodišnjim fertilnim izdancima (tabela 9), bile su u proseku najkraće kod jedinki iz populacije LUS u blizini Krašića na Luštici (14,18 mm) a najduže u makedonskoj populaciji JBL (25,62 mm). Najvarijabilnije populacije prema ovom parametru su populacije SIC kod Ostrovice u

Sićevačkoj klisuri (St. dev = 6,14) i RUS sa Rumije na putu za mesto Vladimir (CV = 30,31%) a najmanje varijabilna bila je populacija PIV u kanjonu Pive (St. dev = 2,54, CV = 15,87%)

Tabela 9. Rezultati univariacione analize dužine lisne drške (mm)

populacija	N	Sr. vrednost	Min.	Maks.	Var.	Std.dev.	St. greška	CV
SIC	10	20,90	12	30	37,66	6,14	1,94	29,36
PLE	18	20,17	11	30	20,62	4,54	1,07	22,52
JBL	13	25,62	15	32	25,42	5,04	1,40	19,68
PIV	10	16,00	13	20	6,44	2,54	0,80	15,87
LUS	11	14,18	10	20	6,76	2,60	0,78	18,34
MOR	14	15,93	10	22	14,23	3,77	1,01	23,68
RUN	19	18,79	15	25	12,40	3,52	0,81	18,74
RUS	10	17,40	12	30	27,82	5,27	1,67	30,31
ORJ	7	16,29	12	22	11,24	3,35	1,27	20,58
GRA	10	22,70	19	30	13,57	3,68	1,16	16,23
NJE	11	18,36	14	25	15,65	3,96	1,19	21,55

Dužina liske prvih (najnižih) listova (tabela 10) bila je najveća u populaciji JBL (60,62 mm) a najmanja u populaciji LUS (40,55 mm i min = 27 mm). Najvarijabilniju dužinu listova imala je populacija RUN (st. dev = 13,65 i CV = 28,25%) kod koje je detektovan i list najveće dužine (85 mm), dok su najmanje varijabilne populacije bile SIC prema koeficijentu varijacije (9,93%) i populacija NJE u blizini Njeguša, prema standardnoj devijaciji (4,87).

Tabela 10. Rezultati univariacione analize dužine liske (mm)

populacija	N	Sr. vrednost	Min.	Maks.	Var.	Std.dev.	St. greška	CV
SIC	10	49,90	40	55	24,54	4,95	1,57	9,93
PLE	18	52,44	40	65	64,38	8,02	1,89	15,30
JBL	13	60,62	50	80	70,92	8,42	2,34	13,89
PIV	10	45,90	30	56	78,10	8,84	2,79	19,25
LUS	11	40,55	27	60	101,27	10,06	3,03	24,82
MOR	14	47,07	35	68	126,38	11,24	3,00	23,88
RUN	19	48,32	30	85	186,34	13,65	3,13	28,25
RUS	10	37,30	25	50	73,57	8,58	2,71	22,99
ORJ	7	51,00	45	58	28,67	5,35	2,02	10,50
GRA	10	54,70	38	70	93,34	9,66	3,06	17,66
NJE	11	45,09	40	52	23,69	4,87	1,47	10,79

Najveću širinu liske (tabela 11) imale su jedinke iz populacije PLE (18 mm) među kojima je izmeren i list najveće širine (max = 29 mm) a biljke iz populacije RUS

imale su najuže listove (sr vred. = 11,7 mm i min = 8 mm). Populacija LUS je bila najvarijabilnija kada je ovaj karakter u pitanju (st dev = 4,07 i CV = 30,87%) a najmanje varijabilna bila je populacija ORJ (st.dev. = 0,98, CV = 6,76%)

Tabela 11. Rezultati univariacione analize najveće širine lisne drške (mm)

populacija	N	Sr. vrednost	Min.	Maks.	Var.	Std.dev.	St. greška	CV
SIC	10	16,80	14	18	1,73	1,32	0,42	7,84
PLE	18	18,00	14	29	10,47	3,24	0,76	17,98
JBL	13	15,31	12	18	3,56	1,89	0,52	12,33
PIV	10	15,40	10	21	11,38	3,37	1,07	21,90
LUS	11	13,18	8	20	16,56	4,07	1,23	30,87
MOR	14	13,79	10	18	7,41	2,72	0,73	19,75
RUN	19	16,11	10	26	22,21	4,71	1,08	29,26
RUS	10	11,70	8	16	10,01	3,16	1,00	27,04
ORJ	7	14,43	13	16	0,95	0,98	0,37	6,76
GRA	10	15,20	8	22	12,62	3,55	1,12	23,37
NJE	11	14,64	12	20	4,25	2,06	0,62	14,09

Udaljenje najveće širine liske od lisne osnove kao mera koja bliže opisuje oblik lista (tabela 12) najveću varijabilnost imala je u populacijama JBL (st. dev = 5,30) i PLE (CV = 22,85%), a najmanju u populaciji ORJ (st. dev = 2,36 i CV = 10,39%). S obzirom da se radi o dopunskoj meri koja je zavisna od dužine liske, maksimalne i minimalne vrednosti nezavisno nemaju značaj u opštoj proceni varijabilnosti.

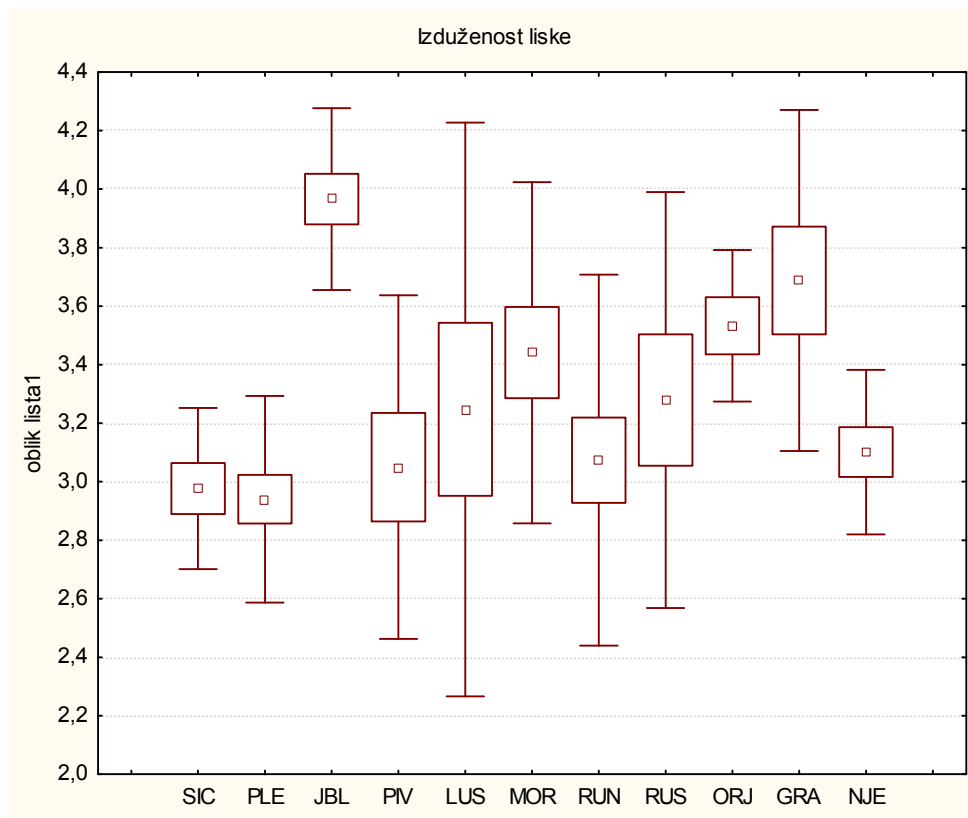
Tabela 12. Rezultati univariacione analize udaljenja najšireg dela liske od osnove (mm)

populacija	N	Sr. vrednost	Min.	Maks.	Var.	Std.dev.	St. greška	CV
SIC	10	24,00	20	35	26,44	5,14	1,63	21,43
PLE	18	22,67	12	31	26,82	5,18	1,22	22,85
JBL	13	25,69	20	40	28,06	5,30	1,47	20,62
PIV	10	21,40	15	32	27,16	5,21	1,65	24,35
LUS	11	19,82	14	27	18,36	4,29	1,29	21,62
MOR	14	20,29	14	35	30,07	5,48	1,47	27,03
RUN	19	21,79	15	30	19,51	4,42	1,01	20,27
RUS	10	18,70	10	25	23,57	4,85	1,54	25,96
ORJ	7	22,71	20	25	5,57	2,36	0,89	10,39
GRA	10	26,10	20	38	26,99	5,20	1,64	19,90
NJE	11	20,55	17	27	11,27	3,36	1,01	16,34

Poređenjem dužine i širine liske kao i položaja najšireg dela u odnosu na dužinu liske dobijeni su izvedeni karakteri oblika lista: *izduženost i oblik liske* (slika 15). S obzirom da izvedeni karakteri ne mogu da se uključe u dalju statističku obradu, prikazani su samo grafički (grafikoni 1 i 2) Najizduženiji listovi pronađeni su u

populaciji JBL a najmanje izduženi odnosno najviše ovalni listovi, bili su listovi iz populacije PLE. najveća varijabilnost izduženosti detektovana je u populaciji LUS a najmanja u populaciji ORJ.

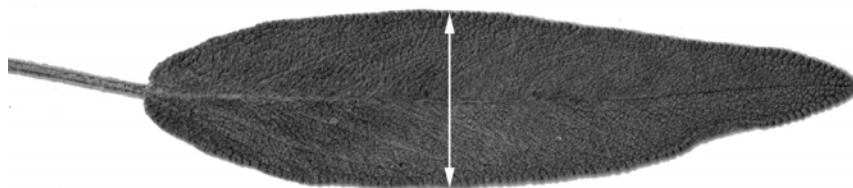
Grafikon 1.



Oblik liske žalfije u populacijama varira od objajastog (< 2) preko eliptičnog (2) do jajastog (> 2) koji je najzastupljeniji. Prema srednjim vrednostima može se zapaziti da su u svim populacijama najčešći jajasti listovi ali i da u većini populacija postoje i listovi objajastog oblika. Njaveću varijabilnost oblika imaju listovi iz populacije PLE, dok su najmanje varijabilni listovi iz GRA.

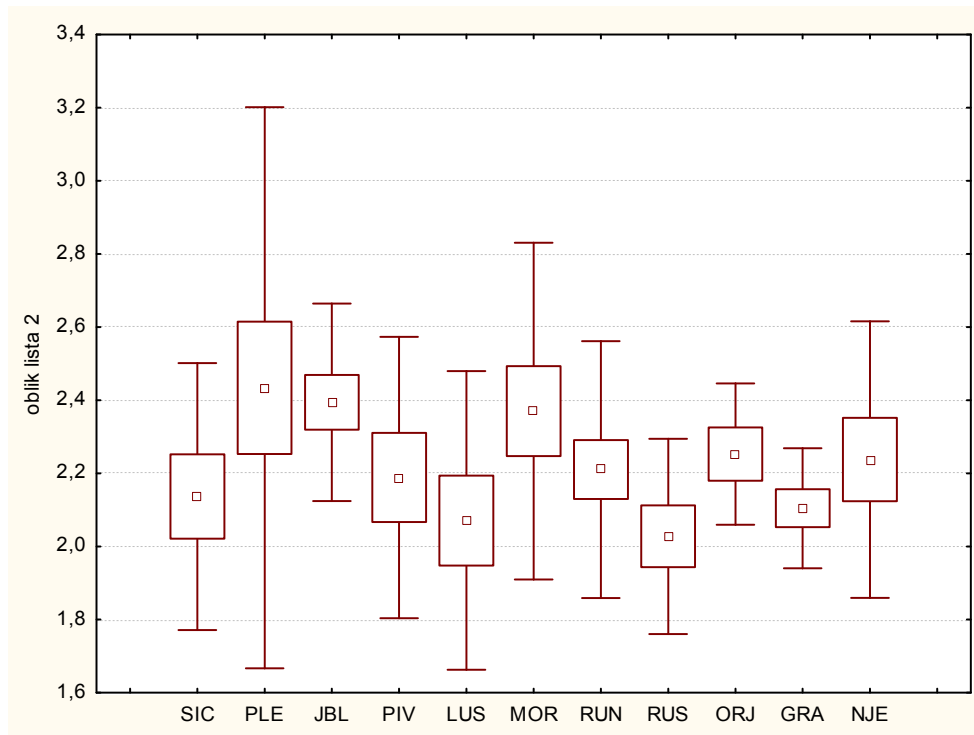
Slika 15. Oblik liske

>2 ← 2 → <2



Oblik liske izražen je kao odnos dužine liske i udaljenosti najšireg dela od osnove.

Grafikon 2.



Dužina regiona cvasti (tabela 13), kao izrazito varijabilan karakter, bila je najveća u populaciji GRA (sr. vred. =115,20 mm i max = 150 mm) a najmanja u proseku u populaciji RUS (77,00 mm). Najvarijabilnija je populacija SIC (st dev = 29,01 i CV = 34,41 %) a najmanje varijabilna populacija ORJ (st. dev = 11,24 , CV = 11,13 %)

Tabela 13. Rezultati univariacione analize dužine cvasti (mm)

populacija	N	Sr. vrednost	Min.	Maks.	Var.	Std.dev.	St. greška	CV
SIC	10	84,30	45	130	841,34	29,01	9,17	34,41
PLE	18	78,78	45	120	447,01	21,14	4,98	26,84
JBL	13	78,77	45	112	566,36	23,80	6,60	30,21
PIV	10	82,60	55	115	293,16	17,12	5,41	20,73
LUS	11	77,73	60	110	221,82	14,89	4,49	19,16
MOR	14	82,50	40	115	525,96	22,93	6,13	27,80
RUN	19	91,11	55	130	688,21	26,23	6,02	28,80
RUS	10	77,00	45	125	567,78	23,83	7,54	30,95
ORJ	7	101,00	85	115	126,33	11,24	4,25	11,13
GRA	10	115,20	75	150	448,18	21,17	6,69	18,38
NJE	11	89,18	66	120	414,36	20,36	6,14	22,83

Broj verticilastera – pršljenova u cvastima (tabela 14), jedan od merističkih karaktera koji su ranije korišćeni u taksonomskom definisanju infraspecijske varijabilnosti vrste, prema srednjim vrednostima prilično je ujednačen u analiziranim populacijama (5,64 – 6,14). Najveći broj cvetnih pršljenova u složenoj cvasti u proseku bio je u populaciji ORJ (6,14 vertic.) a najmanji u populaciji RUS sa jugoistočnog dela Rumije (5,5 vertic). Varijabilnost ovog karaktera koja je generalno mala bila je najizraženija u populaciji JBL (st. dev = 1,54 i CV = 26,62%) a najmanje izražena u populaciji ORJ (st. dev = 0,38 i CV = 6,15%).

Tabela 14. Rezultati univariacione analize broja verticilastera

populacija	N	Sr. vrednost	Min.	Maks.	Var.	Std.dev.	St. greška	CV
SIC	10	5,9	5	8	0,99	0,99	0,31	16,85
PLE	18	5,89	4	8	0,93	0,96	0,23	16,36
JBL	13	5,77	4	8	2,36	1,54	0,43	26,62
PIV	10	6,10	5	7	0,32	0,57	0,18	9,31
LUS	11	6,00	5	7	0,60	0,77	0,23	12,91
MOR	14	5,64	4	7	1,17	1,08	0,29	19,17
RUN	19	6,05	5	8	0,72	0,85	0,19	14,01
RUS	10	5,50	4	7	0,72	0,85	0,27	15,45
ORJ	7	6,14	6	7	0,14	0,38	0,14	6,15
GRA	10	5,90	5	7	0,32	0,57	0,18	9,62
NJE	11	5,73	4	8	1,62	1,27	0,38	22,21

Broj cvetova u bazalnom nodusu, koji predstavlja ključni karakter prema kome je definisana podvrsta *Salvia officinalis* ssp. *multiflora* u Sićevačkoj klisuri, prema srednjim vrednostim izrazito je ujednačen u analiziranim populacijama, sa minimalnom srednjom vrednošću (9,30 cvetova) u populaciji RUS i maksimalnom u populaciji NJE (11 cvetova). Najvarijabilnija je bila populacija MOR sa 6 - 16 cvetova (st. dev = 2,68 i CV = 27,77 %), a najmanje varijabilna GRA (st. dev = 1,45 i CV = 14,35 %).

Tabela 15. Rezultati univariacione analize broja cvetova u osnovnom nodusu

populacija	N	Sr. vrednost	Min.	Maks.	Var.	Std.dev.	St. greška	CV
SIC	10	9,80	8	14	4,18	2,04	0,65	20,86
PLE	18	10,39	6	14	4,02	2,00	0,47	19,29
JBL	13	10,38	8	14	4,42	2,10	0,58	20,25
PIV	10	10,30	8	14	3,12	1,77	0,56	17,16
LUS	11	10,18	8	14	2,76	1,66	0,50	16,33
MOR	14	9,64	6	16	7,17	2,68	0,72	27,77
RUN	19	10,95	8	16	6,05	2,46	0,56	22,47
RUS	10	9,30	7	12	2,90	1,70	0,54	18,31

ORJ	7	10,14	8	13	3,14	1,77	0,67	17,48
GRA	10	10,10	7	12	2,10	1,45	0,46	14,35
NJE	11	11,00	8	14	4,40	2,10	0,63	19,07

Dužina cvetne drške (tabela 16), otvorenih cvetova u najnižem verticilasteru cvasti, takođe spada u ujednačene karaktere. Najkraću dršku imali su cvetovi iz populacije SIC (4,4 mm) a najdužu cvetovi iz populacije ORJ (5,21 mm). Varijabilnost ove osobine najizraženija je u populaciji MOR (st. dev = 0,65 i CV = 14,45 %) a najmanje u populaciji RUM (st. dev = 0,33 i CV = 6,71 %)

Tabela 16. Rezultati univariacione analize dužine cvetne drške (mm)

populacija	N	Sr. vrednost	Min.	Maks.	Var.	Std.dev.	St. greška	CV
SIC	10	4,40	4	5	0,16	0,39	0,12	8,96
PLE	18	5,19	4	6	0,27	0,52	0,12	9,98
JBL	13	4,15	4	5	0,18	0,43	0,12	10,29
PIV	10	4,85	4	6	0,34	0,58	0,18	11,95
LUS	11	4,64	4	5	0,25	0,50	0,15	10,88
MOR	14	4,50	3	5	0,42	0,65	0,17	14,45
RUN	19	4,87	4	5	0,11	0,33	0,07	6,71
RUS	10	4,80	4	6	0,40	0,63	0,20	13,18
ORJ	7	5,21	5	6	0,15	0,39	0,15	7,54
GRA	10	5,00	4	6	0,44	0,67	0,21	13,33
NJE	11	5,45	5	6	0,27	0,52	0,16	9,57

Duzina čašice (tabela 17), merena od kraja cv. drške do spoja gornje i donje “usne”, prema srednjoj vrednosti bila je najveća u populaciji SIC (6,95 mm) a najmanja u populaciji RUN (5,53 mm). Najvarijabilnija populacija za ovaj karakter bila je GRA (st. dev = 0,82 i CV = 13,61 %) a najmanje varijabilne bile su PIV i RUS (st. dev = 0,48 i CV = 7,67 %).

Tabela 17. Rezultati univariacione analize dužine čašice (mm)

populacija	N	Sr. vrednost	Min.	Maks.	Var.	Std.dev.	St. greška	CV
SIC	10	6,95	6	8	0,47	0,69	0,22	9,86
PLE	18	5,78	5	7	0,39	0,62	0,15	10,79
JBL	11	6,45	5	8	0,67	0,82	0,25	12,71
PIV	10	6,30	6	7	0,23	0,48	0,15	7,67
LUS	11	5,64	5	6	0,25	0,50	0,15	8,95
MOR	14	6,29	5	7	0,37	0,61	0,16	9,72
RUN	19	5,53	5	6	0,26	0,51	0,12	9,28
RUS	10	6,30	6	7	0,23	0,48	0,15	7,67
ORJ	7	6,00	5	7	0,33	0,58	0,22	9,62
GRA	10	6,00	5	7	0,67	0,82	0,26	13,61
NJE	11	5,91	5	7	0,29	0,54	0,16	9,13

Dužina donjeg zupca čašice (tabela 18), bila je najveća prema srednjoj vrednosti u populaciji SIC (sr. vred. = 10,70 mm) a najmanja u proseku u populaciji GRA (9,63 mm). Najvarijabilnija je populacija PIV (st dev = 1,08 i CV = 10,29 %) a najmanje varijabilna populacija ORJ (st. dev = 0,53 i CV = 5,13 %)

Tabela 18. Rezultati univariacione analize dužine donjeg zupca čašice (mm)

populacija	N	Sr. vrednost	Min.	Maks.	Var.	Std.dev.	St. greška	CV
SIC	10	10,70	10	12	0,46	0,67	0,21	6,31
PLE	18	10,08	9	11	0,60	0,77	0,18	7,65
JBL	11	10,55	9	12	0,67	0,82	0,25	7,78
PIV	10	10,50	9	12	1,17	1,08	0,34	10,29
LUS	11	9,73	9	11	0,62	0,79	0,24	8,08
MOR	14	10,07	8	11	0,69	0,83	0,22	8,23
RUN	19	10,26	9	11	0,32	0,56	0,13	5,48
RUS	10	10,00	9	11	0,67	0,82	0,26	8,16
ORJ	7	10,43	10	11	0,29	0,53	0,20	5,13
GRA	10	9,60	8	11	0,71	0,84	0,27	8,78
NJE	11	9,82	8	11	0,56	0,75	0,23	7,65

Dužina gornjeg zupca čašice (tabela 19), najmanja je bila u populaciji NJE (8,82 mm) a najveća u populaciji ORJ (9,71 mm). Kao i preostali karakteri cveta, i ova osobina je slabo varijabilna. najviše u populaciji PIV (st dev = 0,97) i populaciji MOR (CV = 10,29%) a najmanje u populaciji ORJ (st dev = 0,49 i CV = 5,02%)

Tabela 19. Rezultati univariacione analize dužine gornjeg zupca čašice (mm)

populacija	N	Sr. vrednost	Min.	Maks.	Var.	Std.dev.	St. greška	CV
SIC	10	9,70	8	11	0,68	0,82	0,26	8,49
PLE	18	9,19	8	10	0,62	0,79	0,19	8,58
JBL	11	9,45	8	10	0,47	0,69	0,21	7,27
PIV	10	9,60	8	11	0,93	0,97	0,31	10,06
LUS	11	9,00	8	10	0,60	0,77	0,23	8,61
MOR	14	9,14	7	10	0,90	0,95	0,25	10,38
RUN	19	9,42	8	10	0,37	0,61	0,14	6,44
RUS	10	9,00	8	10	0,67	0,82	0,26	9,07
ORJ	7	9,71	9	10	0,24	0,49	0,18	5,02
GRA	10	9,00	8	10	0,44	0,67	0,21	7,41
NJE	11	8,82	7	10	0,56	0,75	0,23	8,51

Dužina “oske” čašičnog zupca (tabela 20), prema kojoj je definisana forma aristata bila je najveća u populaciji RUS (1,89 mm) a najmanja u populaciji SIC (1,40 mm). Najvarijabilnija populacija bila je populacija NJE (st dev = 0,39 i CV = 24,02 %) a najmanje varijabilna populacija NJE (st dev = 0,24 i CV = 13,23 %)

Tabela 20. Rezultati univariacione analize dužine oske (mm)

populacija	N	Sr. vrednost	Min.	Maks.	Var.	Std.dev.	St. greška	CV
SIC	10	1,40	1	2	0,10	0,32	0,10	22,59
PLE	18	1,83	2	2	0,06	0,24	0,06	13,23
JBL	11	1,55	1	2	0,07	0,27	0,08	17,45
PIV	10	1,55	1	2	0,08	0,28	0,09	18,31
LUS	11	1,86	2	3	0,10	0,32	0,10	17,35
MOR	14	1,75	1	2	0,11	0,33	0,09	18,58
RUN	19	1,76	1	2	0,09	0,31	0,07	17,35
RUS	10	1,95	1,5	2,5	0,08	0,28	0,09	14,56
ORJ	7	1,64	1	2	0,14	0,38	0,14	23,01
GRA	10	1,65	2	2	0,06	0,24	0,08	14,64
NJE	11	1,64	1	2	0,15	0,39	0,12	24,02

Tabela 21. Uporedni prikaz koeficijenta varijacije (%) za ispitivane karaktere po populacijama

populacija.	visina izdanka	lisna drška	dužina liske	širina liske	udaljenje najšir. dela	dužina cvasti	broj verticil.	broj cvetova	cvetna drška	dužina čašice	dužina d. zupca	dužina g. zupca	oske	prosek
SIC	25,76	29,36	9,93	7,84	21,43	34,41	16,85	20,86	8,96	9,86	6,31	8,49	22,59	17,13
PLE	24,77	22,52	15,30	17,98	22,85	26,84	16,36	19,29	9,98	10,79	7,65	8,58	13,23	16,63
JBL	25,11	19,68	13,89	12,33	20,62	30,21	26,62	20,25	10,29	12,71	7,78	7,27	17,45	17,25
PIV	17,11	15,87	19,25	21,90	24,35	20,73	9,31	17,16	11,95	7,67	10,29	10,06	18,31	15,69
LUS	17,73	18,34	24,82	30,87	21,62	19,16	12,91	16,33	10,88	8,95	8,08	8,61	17,35	16,59
MOR	22,29	23,68	23,88	19,75	27,03	27,80	19,17	27,77	14,45	9,72	8,23	10,38	18,58	19,44
RUN	26,21	18,74	28,25	29,26	20,27	28,80	14,01	22,47	6,71	9,28	5,48	6,44	17,35	17,94
RUS	24,85	30,31	22,99	27,04	25,96	30,95	15,45	18,31	13,18	7,67	8,16	9,07	14,56	19,12
ORJ	16,31	20,58	10,50	6,76	10,39	11,13	6,15	17,48	7,54	9,62	5,13	5,02	23,01	11,51
GRA	16,36	16,23	17,66	23,37	19,90	18,38	9,62	14,35	13,33	13,61	8,78	7,41	14,64	14,90
NJE	23,87	21,55	10,79	14,09	16,34	22,83	22,21	19,07	9,57	9,13	7,65	8,51	24,02	16,13
prosek	21,55	20,65	17,43	18,42	20,48	24,03	15,32	19,50	10,37	10,13	7,54	8,08	18,65	

Analiza varijanse (ANOVA), pokazala je da se najveći broj morfoloških parametara statistički značajno razlikuje između populacija ($p < 0, 05$). Međutim, Kruskal-Wallis ANOVA i median test koji testiraju značaj merističkih karaktera u razdvajanju grupa, kao i neparametrijska analiza koja se koristi kod merističkih karaktera pokazali su da broj cvetova i broj verticilastera nemaju statističkog značaja u razdvajanju ispitivanih populacija. ($p > 0, 05$). (tabela 22).

Tabela 22. Rezultati analize varijanse merenih karaktera

	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
visina izdanka	144895,67	10	14489,57	321803,14	122,00	2637,73	5,49	0,0000
dužina lisne drske	1325,72	10	132,57	2124,67	122,00	17,42	7,61	0,0000
dužina liske	4801,58	10	480,16	10790,19	122,00	88,44	5,43	0,0000
najveća širina liske	385,79	10	38,58	1252,51	122,00	10,27	3,76	0,0002
udaljenje najšireg dela od osnove	624,31	10	62,43	2801,98	122,00	22,97	2,72	0,0048
dužina cvasti	14201,04	10	1420,10	60094,63	122,00	492,58	2,88	0,0029
broj verticilastera	4,34	10	0,43	116,49	122,00	0,95	0,45	0,9157
broj cvetova u osnovnom nodusu	32,60	10	3,26	524,71	122,00	4,30	0,76	0,6687
dužina cvetne drske	17,76	10	1,78	32,41	122,00	0,27	6,69	0,0000
dužina čašice	20,43	10	2,04	45,00	121,00	0,37	5,49	0,0000
dužina donjeg zupca	13,10	10	1,31	72,27	121,00	0,60	2,19	0,0225
dužina gornjeg zupca	10,22	10	1,02	71,48	121,00	0,59	1,73	0,0813
dužina oske	3,05	10	0,30	11,38	121,00	0,09	3,24	0,0010

Analiza osnovnih komponenti (PCA) urađena je sa svim merenim parametrima kao i samo sa onim koji su pokazali statistički značaj u analizi varijanse. S obzirom da u dobijenim grafikonima nema značajnih razlika, prikazani su samo grafikoni pozicija jedinki u prostoru analize osnovnih komponenti za sve parametre i to za prve tri PCA ose jer one pokrivaju preko 50 % kumulativne varijabilnosti (tabela 23). Morfološki karakteri koji su dali PCA rezultate veće od 0,7 su dužina liske i dužina cvasti na prvoj PCA osi i dužina čašice, dužina donjeg kao i dužina gornjeg zupca čašice, na drugoj PCA osi (tabela 24).

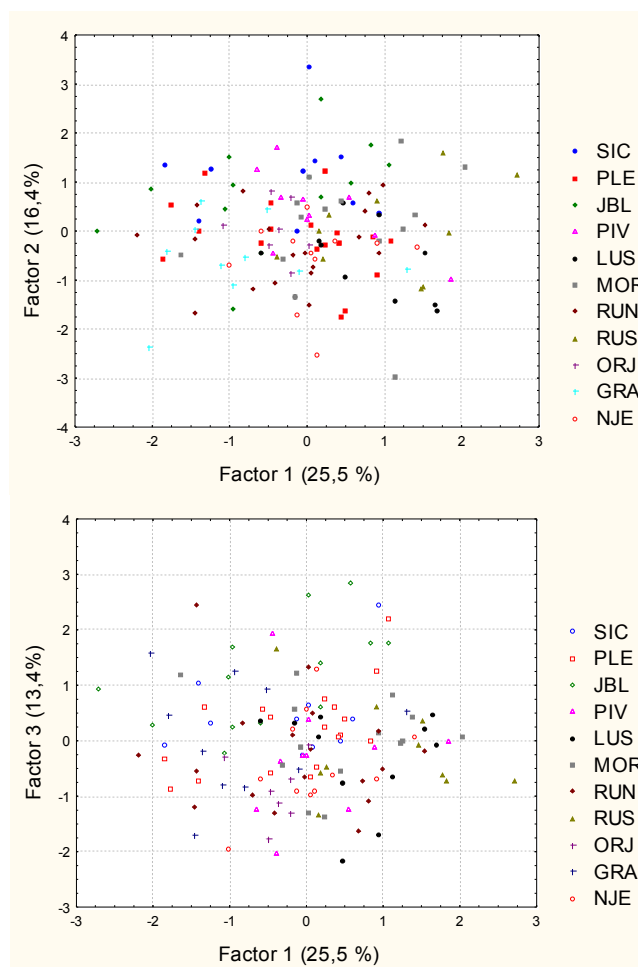
Tabela 23. Vrednosti Eigen-vektora i procenti varijabilnosti koja je opisana na prve tri ose analize osnovnih komponenti sa uključenim svim parametrima

Svi parametri	<i>Eigenvrednosti</i>	%	<i>kumulativne vrednosti</i>	<i>kumulativni efekat(%)</i>
PCA 1	3,310752	25,46733	3,310752	25,46733
PCA 2	2,134229	16,41715	5,444982	41,88448
PCA 3	1,747159	13,43968	7,192140	55,32416

Tabela 24 Opterećenje merenih parametara na prve tri ose analize osnovnih komponenti

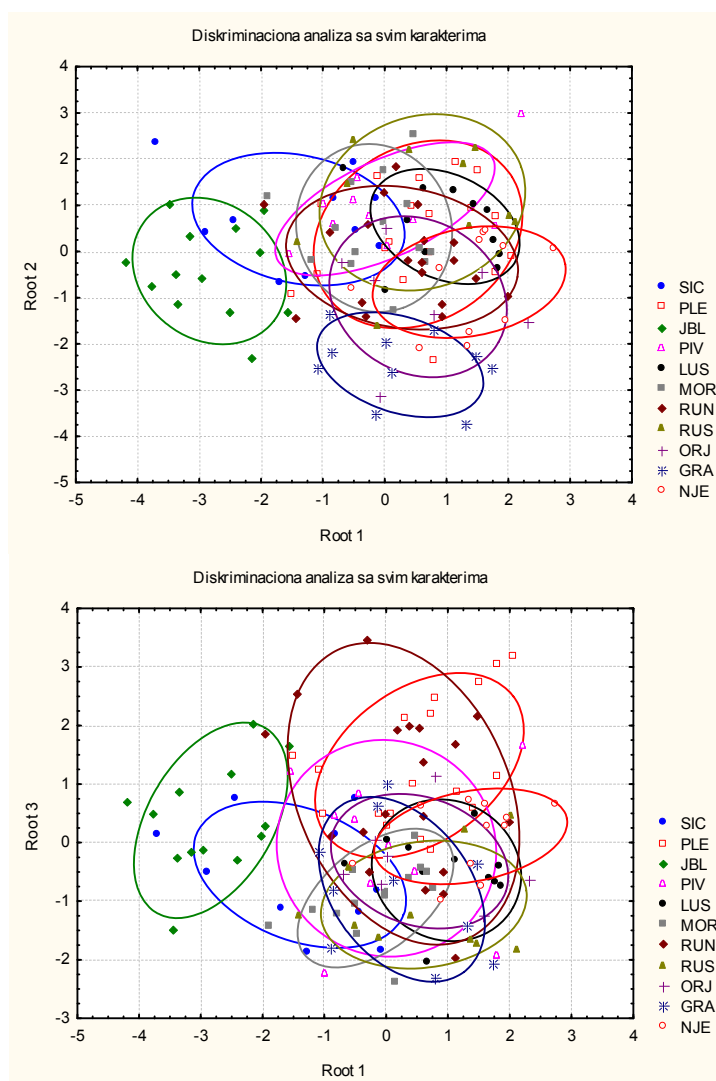
	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3
visina izdanka	-0,681374	-0,244998	-0,398429
dužina lisne drske	-0,452348	0,237732	0,455673
dužina liske	-0,805842	0,094874	0,422857
najveća širina liske	-0,651875	0,018657	0,245216
udaljenje najšireg dela od osnove	-0,657396	0,059445	0,401604
dužina cvasti	-0,735992	-0,232621	-0,418163
broj verticilastera	-0,589575	-0,301977	-0,250381
broj cvetova u osnovnom nodusu	-0,385751	-0,285521	-0,188812
dužina cvetne drske	-0,070230	-0,095833	-0,542454
dužina čašice	-0,146345	0,717813	0,058337
dužina donjeg zupca	-0,160517	0,831727	-0,381518
dužina gornjeg zupca	-0,207403	0,728101	-0,444589
dužina oske	0,046404	-0,177883	-0,257828

Grafikon 3. Pozicije jedinki u prostoru u prve tri ose analize osnovnih komponenti

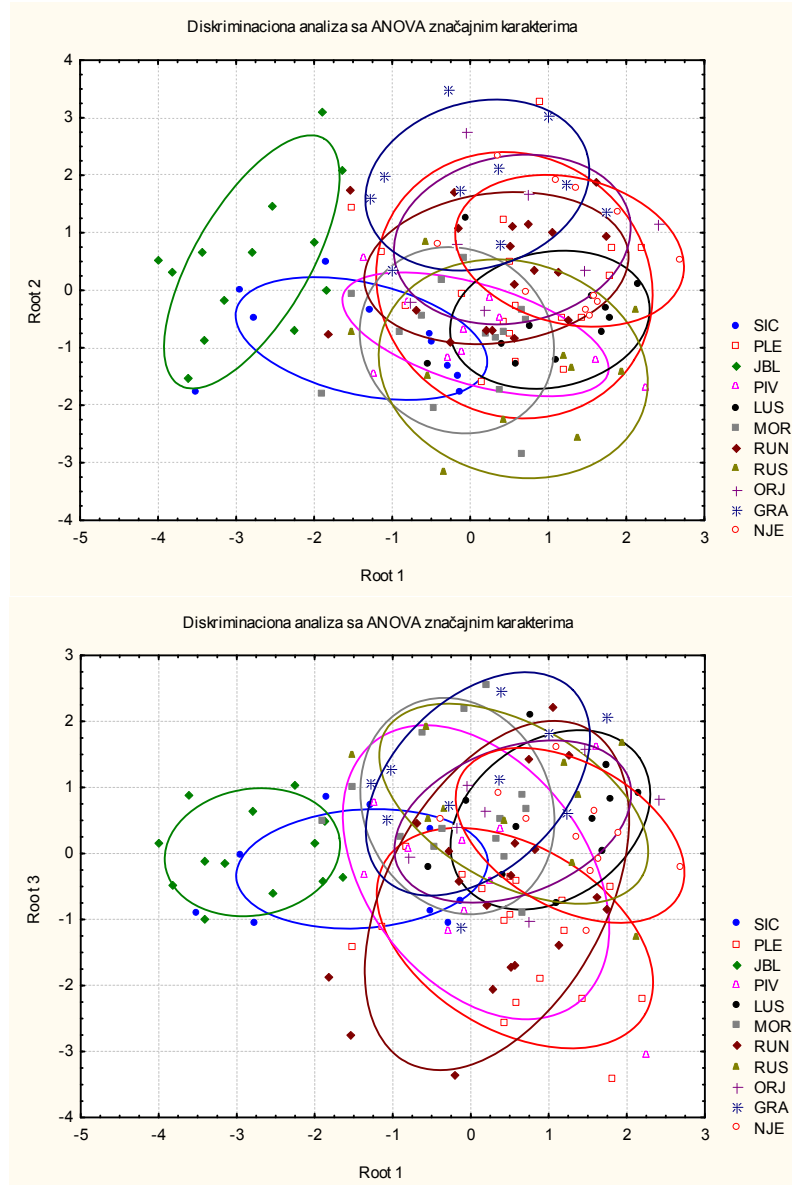


Diskriminantna kanonijska analiza (CDA) urađena sa svim merenim karakterima i sa karakterima koji su pokazali statistički značaj u ANOVA analizi dala je slične rezultate na prve tri ose (grafikoni 4 i 5) i ukazuje na zanemarljivu diskriminaciju između većine populacija i delimičnu diskriminaciju makedonske populacije JBL, pri čemu najveći značaj u diskriminaciji imaju karakteri listova (dužina lisne drške i dužina liske). Osim toga u analizi sa svim karakterima, na prvoj osi se delimično izdvaja i populacija GRA (prema karakterima visine izdanka i dužine cvasti). S druge strane, kanonijska diskriminaciona analiza sa karakterima koji su se pokazali značajnim u PCA analizi dala je homogenu grupu u kojoj nema jasnog izdvajanja grupa.

Grafikon 4. Pozicije populacija *S. officinalis* u prve tri diskriminantne ose za sve karaktere

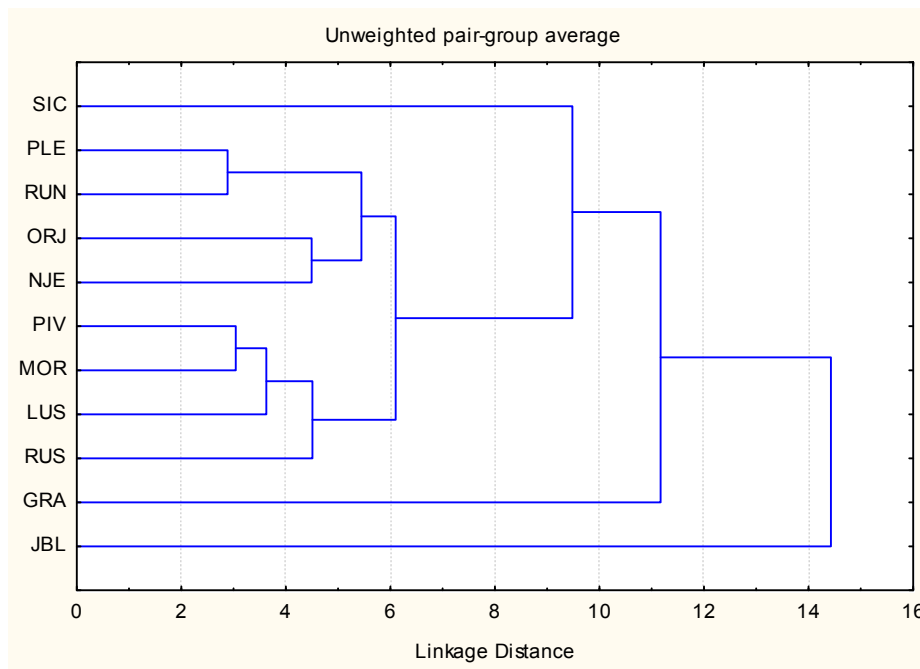


Grafikon 5 Pozicije populacija *S. officinalis* u prve tri diskriminantne ose za ANOVA značajne karaktere

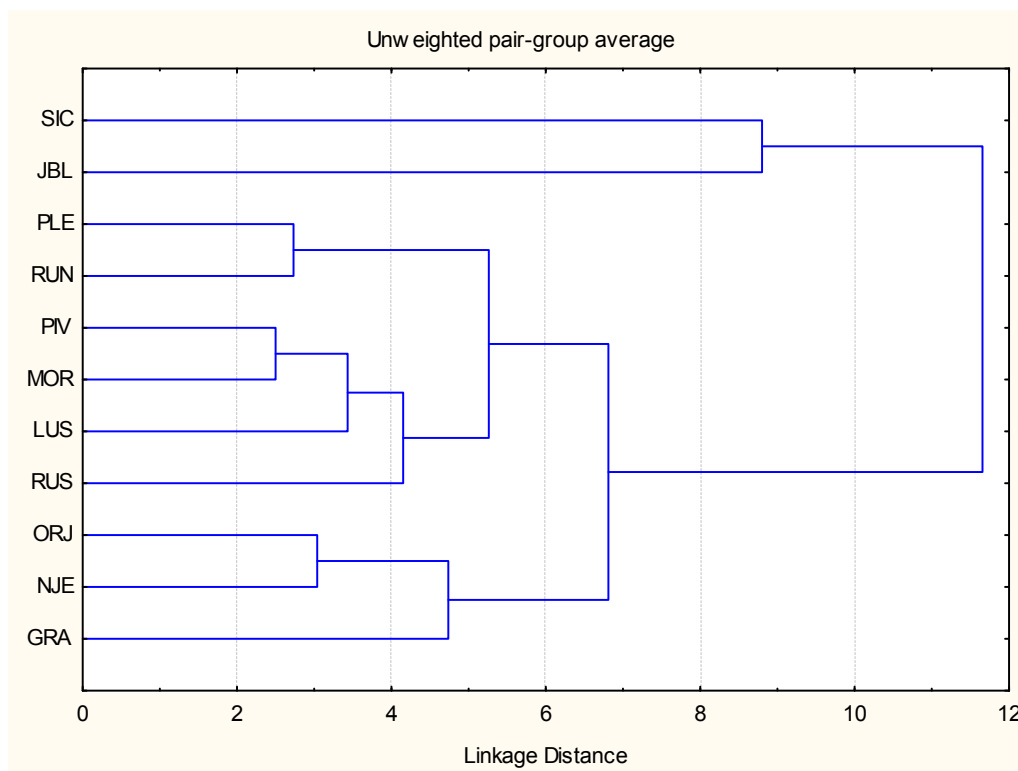


Na osnovu mahalanobijusovih distanci dobijenih CDA analizom urađena je **klaster analiza** čiji rezultati su prikazani u fenogramu 1 (na osnovu svih karakterata), i u fenogramu 2 (na osnovu svih ANOVA statistički značajnih karakterata).

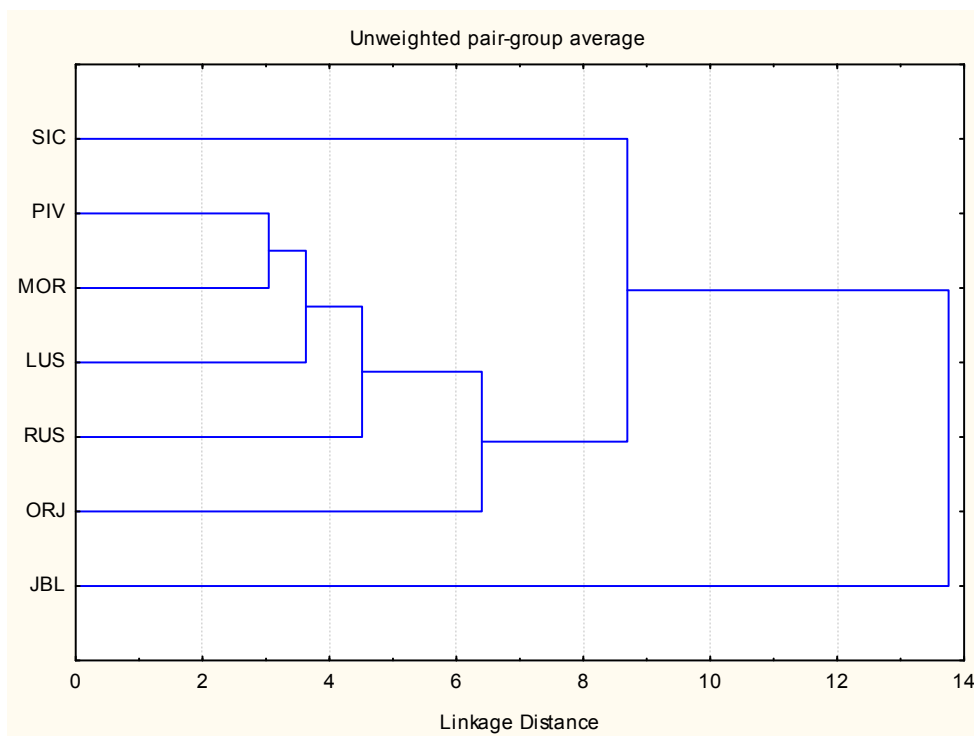
Fenogram 1. Pozicije populacija *S. officinalis* na osnovu kanonijske analize sa svim merenim karakterima



Fenogram 2. Pozicije populacija *S. officinalis* na osnovu kanonijske analize sa ANOVA značajnim karakterima.



U fenogramu 3 su prikazani fenetički odnosi (na osnovu ANOVA značajnih rezultata morfometrije) između populacija za koje je urađena analiza DNK markera. Na osnovu mahalanobijusovih distanci, ističe se generalno mala razlika između istraživanih populacija.



Fenogram 3. Klaster analiza na osnovu CDA rezultata populacija za koje je urađena DNK analiza

Korespondentna analiza (CA), koja je korišćena za analizu kvalitativnih karaktera (prisutnost brakteja, „ušica“ na listovima i razgranatosti fertilnih izdanaka), na osnovu čijeg kvadrat testa pokazala je da ni jedan od navedenih parametara nema statistički značaj u razdvajanju populacija (prilozi 5 i 6).

5. DISKUSIJA

5.1. Genetički diverzitet ispitivanih populacija *S. officinalis*

Da bi se moglo raspravljati o poreklu izolovanih kontinentalnih populacija *S. officinalis* u svetlu geomorfoloških i klimatskih promena za vreme neogena na Balkanskom poluostrvu, a koje su mogle imati uticaj na sadašnju disjunkciju areala, u nedostatku fosilnih podataka neophodno je osvrnuti se na genetičku strukturu odnosno diverzitet populacija ove vrste.

Izolovane populacije *S. officinalis* u centralnom delu Balkana odlikuju se niskim haplotipskim diverzitetom i genetički su uniformne na nivou ispitivanih molekularnih markera (izuzev Sićeva), sa najučestalijim haplotipom B koji je pronađen u svim „kontinentalnim“ populacijama, ali i u populaciji na Luštici. Haplotip B je dva mutaciona koraka udaljen od hipotetičkog ancestralnog haplotipa (*hh1*).

Znatno veći diverzitet haplotipova imaju populacije iz kontinuiranog dela areala sa haplotipom C koji je prisutan u svim „primorskim“ populacijama i koji je samo jedan korak udaljen od *hh1*, kao i dva specifična haplotipa D i E. Haplotip G, koji je zastupljen u populacijama na Orjenu i Rumiji, udaljen je 13 mutacija od ancestralnog haplotipa, a specifični haplotip F sa Rumije, samo dva koraka manje.

Ovakva distribucija haplotipova i njihova međusobna genealoška veza, ukazuje na složenu i burnu evolutivnu istoriju vrste, koja se na osnovu filogenetske analize i procenjenog vremena razdvajanja detektovanih linija može tumačiti dešavanjima na Balkanskom poluostrvu od pliocena pa sve do kraja poslednjeg ledenog doba.

Tabela 25 Hronologija hipotetičkih promena u distribuciji *S. officinalis* na Balkanskom poluostrvu

Vremenska skala			promene u distribuciji <i>Salvia officinalis</i> na Balkanskom poluostrvu	
Kvartar	Neogen	Holocen	od 11 500 do danas	<ul style="list-style-type: none"> • Postglacijalna ekspanzija primorske linije delom usled antopo -zoogene degradacije šumske vegetacije
		Pleistocen	od 1,8 miliona do 11 500 godina	<ul style="list-style-type: none"> • Usled pogoršanja klime u vreme glacijacija, migracije u smeru sever- jug i potiskivanje u refugijume
Tercijar	Neogen	Pliocen	od 5,3 do 1,8 miliona godina	<ul style="list-style-type: none"> • Razdvajanje buduće “kontinentalne” i “primorske” linije u vreme prisustva velikih vodenih površina nakon isticanja Panonskog mora
		Miocen	od 23 do 5.3 miliona godina	<ul style="list-style-type: none"> • Pretpostavljena ekspanzija osnovne predačke linije • U Srbiji prema fos. nalazima subtropska vegetacija
	Paleogen	Oligocen	od 34 do 23 miliona godina	<ul style="list-style-type: none"> • Nastanak današnjeg Balkanskog poluostrva • Prema fos. nalazima u Srbiji tropska i subtrop. vegetacija

5.2. Fragmentacija paleo-areala *S. officinalis* u pliocenu

Balkansko poluostrvo je, kao što je to ranije rečeno, nastalo krajem oligocena (pre 25 miliona godina) spajanjem istočnog stabilnog evropskog dela i zapadnog ostrva nastalog nabiranjem tektonske ploče koja je nekada pripadala afričkom kopnu. KRSTIĆ I SAR (2012) su istakli svu složenost sudbine Paratetisa i periodičnog prisustva velikih vodenih (jezerskih ili marinskih) celina na Balkanu za vreme miocena i pliocena. Sredinom miocena (15 – 11 miliona godina), centralni deo Balkana bio je pokriven vodom (*Srpsko jezero*), ali je krajem miocena najveći deo poluostrva bio „suv“ ili sa manjim vodenim površinama (slika 1a). Sa druge strane, prema fosilnim nalazima (PANTIĆ 1984, UTESCHER I SAR 2007), na Balkanskom „kopnu“ tokom ovog perioda rasle su „mediteranske“ i „subtropske“ vrste, pa se može pretpostaviti da je to period kada je predačka linija *S. officinalis* dostigla svoje „najsevernije“ rasprostranjenje.

Krajem pliocena, (pre oko 3,6 miliona godina) Balkansko poluostrvo ponovo je pretežno prekriveno vodom. Sa severne strane je Panonsko more u povlačenju, a sa

istoka i juga vode Egejskog i Crnog mora preplavile su nizije centralnog dela poluostrva (slika 1b). Ovo je vreme koje se u velikoj meri podudara sa procenjenim vremenom razdvajanja predačkog genskog pula *S. officinalis* u dve izdvojene linije [3,267 (1,584 – 5,247) miliona godina], čije potomke predstavljaju sadašnje populacije koje formiraju strukturiranu *kontinentalno primorsku* (*CAL*) i homogenu *primorsku* liniju (*PAL*).

Zanimljivo je da je se ovaj period hronološki prilično poklapa sa nalazima o diverzifikaciji vrste *Thymus herba-barona* endemične za ostrva zapadnog Mediterana, ali se kao osnovni razlog razdvajanja tri detektovane linije navodi aridifikacija staništa (MOLINS I SAR 2011).

5.3. Evolutivna istorija *S. officinalis* u pleistocenu i pitanje autohtonosti kontinentalnih populacija

Pleistocensko drastično zahlađenje klime, nesumnjivo je dovelo do daljih promena dve predačke linije *S. officinalis*. „Zvezdasta“ radijacija haplotipova od ancestralnog hipotetičkog haplotipa, kao što je u slučaju *CAL* linije (A, B, C i D) (slika 13), obično se objašnjava adaptivnom radijacijom na osvojenim novim pogodnim staništima (POSADA I CRANDALL 2001, SCHAAL I SAR 2003). Kao što je dobro poznato ledeno doba na Balkanu dovelo je do sukcesivnih migracija kontinentalnih (termofilnih) šuma ka jugu, što je svakako uticalo i na distribuciju žalfije, odnosno do njenog povlačenja ne samo u kanjone i klisure, nego i sa „kontinentalnijih“, ka staništima bližim Jadranskom moru.

Ovo je verovatno razlog daljeg razdvajanja *CAL* linije na *kontinentalnu* i *primorsku* podliniju, koje se prema našim rezultatima desilo sredinom pleistocena [1,188 Ma (0,495 – 2,079 Ma)]. Može se pretpostaviti da su u novonastalim uslovima, populacije *CAL* prošle kroz niz dramatičnih promena, kao što su fragmentacija, genetički drift i uska grla, što je prouzrokovalo isčezavanje *hhl* i opstanak izvedenih srodnih haplotipova u geografski udaljenim populacijama (B u populacijama koje čine kontinentalnu podliniju i C u populacijama koje čine primorsku podliniju).

Analiza neutralnosti i raspodele neusklađenosti pokazale su da *CAL* ne pokazuje znake nedavne demografske ekspanzije, već naprotiv, postepeno smanjenje veličine, što se vidi iz odnosa nepristrasnog haplotipskog diverziteta ($Hd = 0.426$, visok) i nukeotidnog diverziteta ($\pi = 0.00106$, nizak).

Kontinentalna podlinija *CAL* je najverovatnije nekada bila šire rasprostranjena u unutrašnjosti Balkanskog poluostrva, ali je danas, kao rezultat promena u pleistocenu, čine četiri preostale disjunktne populacije *S. officinalis* koje su smeštene u klisurama od kojih su dve relativno blizu primorske glavnine areala (JBL and PIV) a druge dve duboko u „kopnu“ (srpski lokaliteti, MIL i SIC).

Značaj klisura Srbije kao tercijarnih refugijuma, dobro je poznat (MIŠIĆ 1981, STEVANOVIĆ I SAR 1995). Na lokalitetima populacija žalfije u Srbiji, zajedno sa ovom vrstom rastu i tercijarni relikti (*Carpinus orientalis*, *Acer intermedium*, *Ostrya carpinifolia* i dr), ali i druge submediteranske vrste kao što su, *Arum italicum*, *Paliurus spina-christi*, *Ruta graveolens*, *Hissopus officinalis*, *Ziziphora capitata*, *Micromeria cristata*. Već samo prisustvo navedenih termofilnih vrsta podržava teoriju o autohtonosti i refugijalnoj prirodi populacija žalfije na ovim mestima, jer bi u suprotnom teško bilo objasniti njihovo eventualno antropogeno poreklo kada se uzme u obzir činjenica da ove vrste nemaju naročit praktični značaj za čoveka.

Osim toga, populacije žalfije iz klisura kontinentalnog Balkana imaju reliktni karakter. Izolovane su, malobrojne i genetički uniformne (izuzev Sićevačke) i sve odlikuje prisustvo haplotipa B, koji je po svemu sudeći bio najzastupljeniji u predačkom genskom pulu ove podlinije. Ovaj haplotip fiksiran je, a ostali retki, eliminisani su usled fragmentacije predačkih populacija i efekta uskog grla. Što se *jedinstvenog* Sićevačkog haplotipa A tiče, on je dva mutaciona koraka udaljen od haplotipa B, što ukazuje na njegovu eventualnu evoluciju u ovom području nakon razdvajanja osnovnih linija ili na retenciju ancestralne forme.

Navedene činjenice, uključujući i blisku genealošku vezu haplotipa B sa ancestralnim *hh1*, govore nasuprot teze o antropogenom poreklu populacija *S. officinalis* u centralnom, kontinentalnom delu Balkanskog poluostrva.

Čak i kada bi pretpostavili da su semena (orašice) žalfije namerno ili slučajno stigla na ova mesta, ljudskom delatnošću (Sićevo na pr.), bilo bi veoma teško objasniti njihovo poreklo jer poseduju primitivniji, stariji tip haplotipa, koji je prisutan u svim kontinentalnim populacijama ali samo u jednoj primorskoj populaciji, na Luštici i to kod manjine jedinki. Morali bi onda da pretpostavimo i da su sva semena prenošena samo između kontinentalnih populacija, jer među njima nema haplotipova primorskih žalfija,

ili da su baš odabrane jedinice sa Luštica izvor rasadnog materijala za *S. officinalis* koje rastu u klisurama Srbije, Pive i Crnog Drima.

Verovatnoća da su, ne jedna, već sve kontinentalne populacije *S. officinalis*, pri tom skrivene u klisurama, poreklom od semena (orašica) baš određenih jedinki koje poseduju redak cpDNK tip, sa jednog jedinog lokaliteta, prilično je zanemarljiva. Drugim rečima, prema detektivanom savremenoj distribuciji haplotipova, veća je verovatnoća hipotetičkog scenarija prema kome su rimski legionari prolazeći „vojnim putem“ ubrali žalfiju iz Sićeva i odneli je na more (Luštica) nego da su je poneli sa mora i usput „zasejavali“ po klisurama u unutrašnjosti poluostrva.

Teorija o „bekstvu“ žalfije iz manastirskih bašti i širenju na povoljna staništa, kojom se „objašnjava“ njeno prisustvo u centralnoj i delom u južnoj Evropi (NIKOLIĆ I DIKLIĆ 1966, KAROUSOU 2000), je pod znakom pitanja kada su u pitanju populacije u kontinentalnom delu Balkana, jer se radi o vrsti koja je skromnih kompetitivnih osobina (ne trpi zasenu) retko se vegetativno razmnožava (DEVETAK 1963) i što je najvažnije, prema našim rezultatima, odlikuje se izrazito niskim protokom semena (ukupno $Nm = 0.15$ semena po generaciji), što sve zajedno govori o slabim ekspanzivnim sposobnostima vrste.

Primorsku podliniju *CAL* čine populacije LUS i MOR koje se nalaze u pretežno kontinuiranom (primorskom) delu areala. Potrebno je međutim, naglasiti da zaključci o grupisanju ovih populacija u *CAL* liniju nisu sasvim jednoznačno dobijeni ni SAMOVA ni AMOVA analizom (Tabela 4) niti metodom statističke parsimonije (slika 13). Definitivno razgraničenje nije utvrđeno ni poređenjem F_{ST} vrednosti za uparene populacije (Tabela 5). Navedeno ide u prilog tome da se kao rezultat dugotrajne evolutivne istorije vrste na refugijalnom prostoru poput Balkana javljaju složeni savremeni genetički i filogeografski obrasci, koji se moraju oprezno tumačiti.

Uz pretpostavku da populacije LUS i MOR, pripadaju *CAL* liniji, predačka kontinentalna linija ovih populacija, prema našim rezultatima o razdvajanju *CAL*, stigla je do sadašnjeg primorskog položaja sredinom pleistocena, [1.188 Ma (0.495, 2.079 Ma)]. Zanimljivo je da se populacija LUS, koja poseduje „kontinentalni“ haplotip B, nalazi u eumediteranskom biogeografskom regionu koji odgovara vegetaciji sveze Quercion iliricis i njenim žbunastim derivatima, dok se populacija MOR, kao i ostale (primorske) populacije nalaze u submediteranskom biogeografskom regionu i vegetaciji

Ostryo- *Carpinion orientalis*. U pitanju su međutim slična staništa, jer žalfija pretežno zauzima kamenjare koji su nastali degradacijom osnovne šumske vegetacije. Za razliku od izolovanih populacija *CAL*, ove „primorske“ populacije *CAL* se nalaze unutar kontinuiranog dela areala *S. officinalis* na staništima koja su za ovu vrstu ekološki i klimatski povoljnija danas, nego što su bila u prošlosti (UTESCHER I SAR. 2007; SURINA I SAR. 2011). Naime, ove populacije su brojnije i genetički raznovrsnije (Tabela 4). Ovakva demografska i genetička priroda ove dve populacije nije rezultat nagle ekspanzije u skorijoj prošlosti, prema rezultatima testa neutralnosti i analizi raspodele neusklađenosti (mismatch distribution), već oslikava nivo genetičkog diverziteta cpDNK velikih populacija koje su dugo vremena prisutne u stabilnim i povoljnim ekološkim uslovima.

Populacije ORJ i RUM koje pripadaju *PAL* liniji takođe se nalaze unutar kontinuiranog dela areala uz Jadransku obalu. U pitanju su velike, vijabilne i genetički raznovrsne populacije ($Hd = 0.403$, $\pi = 0.00257$), i prema navedenim analizama, takve su već dugačak vremenski period. Preovlađujući haplotip za ove dve populacije je G, koji je 13 mutacionih koraka udaljen od ancestralnog haplotipa *hh1*. Interesantno je da su oba retka haplotipa iz *PAL* linije - E i F, srodniji, odnosno bliži sa *hh1* nego što je to haplotip G. Njihovo prisustvo u *PAL* podržava teoriju o zajedničkom poreklu obe *S. officinalis* linije. Do dominacije haplotipa G u ovim populacijama i gubitka većine haplotipova koji se nalaze u mutacionim koracima između njega i ancestralnog *hh1*, došlo je najverovatnije nizom događaja koji su imali izrazit osnivački efekat i druge vidove genetičkog drifta, tokom istorije *PAL* linije, nakon kojih su usledile sukcesivne ekspanzije. Alternativno, ove populacije mogu predstavljati nove entitete.

Nalazi haplotipa C kod jedne individue u oba uzorka populacija ORJ i RUM, a koji je preovlađujući u LUS i MOR, ne predstavljaju iznenađenje ako se ima u vidu činjenica da se ove populacije nalaze u kontinuiranom delu areala. Mada je protok gena između ove dve grupe populacija usled geografskih barijera i zbog generalno slabog protoka semena (o čemu je ranije već bilo reči) praktično nemoguć, ove jedinke mogu biti imigranti ili što je verovatnije, predstavljaju ostatak zadržanog ancestralnog genetičkog polimorfizma. Detaljnije tumačenje ovakve distribucije haplotipova u ispitivanim populacijama zahteva poređenje sa rezultatima drugih genskih markera.

Prikazan filogeografski obrazac između kontinentalnih i primorskih populacija *S. officinalis* u izvesnoj meri podržavaju i rezultati istraživanja ŠATOVIĆ I SAR (2011) koji su korišćenjem SSR markera prepostavili vezu između populacija iz Sićevačke klisure sa populacijama iz Makedonije, Crne Gore i sa Visa (!) u okviru jedinstvenog genskog pula.

Uparedna istraživanja genetičkog diverziteta navedenih istraživanih, i populacija iz severozapadnog dela jadranskog areala (Hrvatska), na nivou cpDNK markera koji su primenjeni ovde, planiraju se u sledećem periodu.

5.4. Prepostavljeni glacijalni refugijumi *S. officinalis*

Poređenjem N_{ST} i G_{ST} vrednosti ($N_{ST} = 0.764$, $SE = 0.046$; $G_{ST} = 0.682$, $SE = 0.066$; $P = 0.000$). utvrđena je filogeografska struktura *S. officinalis* koja ima odlike pliocenske populacione dinamike. Obrazac izolacije usled udaljenosti (IBD pattern), međutim nije pronađen ($r^2 = 0.003$, $P = 0.351$) jer populacije koje pripadaju različitim linijama, danas zauzimaju isti region – primorje i zaleđe jugoistočne jadranske obale.

Prema tome, u ovom području genetička sličnost između populacija ne mora obavezno da se ogleda i u njihovoj geografskoj blizini. Ovo je jedna od odlika glacijalnih refugijuma, kod kojih se često javlja prikazan oblik genetičkih, odnosno filogeografskih preklapanja (GÓMEZ I LUNT 2007, HORN I SAR 2009, MÉDAIL I DIADEMA 2009).

Područje jugoistočne jadranske obale i zaleđa je i ranije prepoznato kao glacijalni refugijum na osnovu analize genetičkog diverziteta populacija (SURINA I SAR 2011) kod još jedne termofilne vrste (*Edraianthus tenuifolius*). Da li je i kod *S. officinalis*, kao i kod ove vrste, došlo do ekspanzije areala severozapadno duž jadranske obale tek nakon glacijacije, za sada ne možemo sa sigurnošću da tvrdimo, mada preliminarni rezultati genetičkog diverziteta populacija iz hrvatskog primorja idu u prilog ovoj teoriji (RADOSAVLJEVIĆ I SAR 2013).

Kada su u pitanju disjunktni lokaliteti kontinentalnih populacija koje su istraživane, nema nikakve sumnje da se radi o refugijumima, pre svega jer same populacije imaju reliktni karakter (na osnovu genetičke strukture i diverziteta). Svi kontinentalni lokaliteti *S. officinalis* se nalaze u klisurama ili kanjonima i predstavljaju

glacijalne „refugijume unutar refugijuma“, kako ih nazivaju GÓMEZ I LUNT (2007). Ovo je sasvim očekivano jer su brojna floristička i fitogeografska istraživanja klisura i kanjona Balkanskog poluostrva odavno ukazala na značaj ovih područja kao lokalnih tercijarnih i glacijalnih refugijuma (MIŠIĆ 1981, LAKUŠIĆ R I REDŽIĆ 1989, STEVANOVIĆ 1995; STEVANOVIĆ 1996).

5.5.S. officinalis u holocenu (antropocenu)

Premda rezultati molekularnih istraživanja negiraju antropogeno poreklo populacija *S. officinalis* u kontinentalnom delu Balkanskog poluostrva, bilo bi sasvim pogrešno zanemariti uticaj čoveka na rasprostranjenje ove vrste. Iako stopa mutacija za odabrani region ne dozvoljava da donosimo zaključke o promenama u distribuciji vrste u postglacijalu, o širenju žalfije pod uticajem ljudskih aktivnosti možemo da zaključimo posredno.

Prema analizi polena, sa otopljenjem u holocenu, došlo je do sukcesivnih promena u vegetaciji Balkanskog poluostrva, koje se ogledaju u smeni dominantnih drvenastih vrsta (WILLIS 1994). Klimazonalna vegetacija, međutim, prema Willisu, još pre 5000 godina bila je izmenjena poljoprivredom, a degradacija šumskih zajednica dostigla je svoj maksimum sa pojavom antičkih civilizacija. Uzgoj stoke, dodatno je ubrzao propadanje drvenaste vegetacije (GIOURGA, 1998), a plitko zemljište kiše su često spirale do osnovne stene.

U izmenjenim uslovima, neke druge vrste su (bukvalno) pronašle svoje mesto pod suncem. Jedna od njih, žalfija, vrsta relativno slabih ekspanzivnih sposobnosti, u ovoj borbi za prostor imala je svoje tajno oružje. Naime, životinje su je, zbog prisustva etarskog ulja i tanina u listovima, izbegavale u ishrani (CALSAMIGLIA I SAR 2007), i hraneći se okolnim vrstama, pravile prostor za njeno širenje.

Treba imati u vidu činjenicu da za nekoliko stotina godina širenje takvih slabo ekspanzivnih vrsta može da bude zadivljujuće. Uostalom, uvećanje površina pod kamenjarima, koje je u Mediteranu posebno izraženo, dovelo je do formiranja veoma specifičnih oblika žbunaste vegetacije. Sigurno je da su nukleusi takve vegetacije bila ogoljena staništa na kojima prirodno nije rasla šuma ili gusta žbunasta vegetacije. Čim su se otvorila staništa, ekspanzija je počela i traje već više od 1000 godina. Koze i ovce

su učinile da se mediteranska mirišljava žbunasta i polužbunasta vegetacija proširi do te mere da danas mnogi smatraju da je na takvim mestima bila odvajkada.

Može se zato reći da je u područjima sa odgovarajućim klimatskim i pedološkim uslovima antropo-zoogena degradacija šumske vegetacije Balkanskog poluostrva u primorskim oblastima pogodovala širenju žalfije. Danas kada se sve manje ljudi bavi stočarstvom, žalfija se povlači, jer nije u stanju da izdrži konkurenciju brzorastućih vrsta.

5.6. Ugroženost i zaštita *S. officinalis* prema molekularnim nalazima

Iako se varijabilnost selektivno neutralnih markera često ne poklapa sa varijabilnošću na morfološkom ili ekološkom nivou, o čemu će biti reči kasnije (REED I FRANKHAM 2001, MCKAY I LATA 2002), neutralni molekularni markeri se sve više koriste u konzervacionoj genetici. U principu, visok nivo genetičkog diverziteta se smatra neophodnim preduslovom opstanka odnosno vijabilnosti populacija (na pr. HANSSON I WESTERBERG 2002, REED I FRANKHAM 2003).

Zbirno *S. officinalis* ima visok genetički diverzitet na nivou genoma markera plastida, $H_T = 0.695$, što je u opsegu nivoa koji su ranije objavljeni za populacije samoniklih lekovitih i aromatičnih biljaka (na pr. cp-RFPL podaci kod TARAYRE I SAR 1997, cpDNA podaci YUAN I SAR 2010 i MOLINS I SAR 2011). Ako se uzmu u obzir i podaci o genetičkom diverzitetu populacija u severozapadnom delu jadranskog areala na nivou nuklearnih markera, (ŽIDOVEC 2004, RADOSAVLJEVIĆ I SAR. 2012, GREGURAŠ 2013, JUG-DUJAKOVIĆ 2010, ŠATOVIĆ I SAR 2011) *S. officinalis* se ne može okarakterisati kao ugrožena vrsta, već naprotiv, može se očekivati da i ubuduće zadrži svoj reproduktivni fitnes i adaptira se na eventualne umerene promene u okruženju (FRANKHAM I SAR 2002). Međutim, pošto se radi o vrsti koja se sakuplja u lekovite svrhe i čija staništa su pod velikim pritiskom različitih antropogenih uticaja (turizam, izgradnja infrastruktura, urbanizacija), promene u brojnosti populacija i u primorskom delu areala (u Crnoj Gori) mogu se očekivati.

Na žalost sve istraživane, disjunktne „kontinentalne“ populacije *S. officinalis*, su malobrojne, izolovane i genetički nevarijabilne (izuzev SIC). Mada su srpski *kalaver* i makedonska *žalfija* (populacije JBL, MIL i SIC) zakonski zaštićeni *in situ* (SLUŽBENI GLASNIK, 2011, SLUŽBEN VESNIK 2011), one su pod intenzivnim pritiskom sakupljača jer

imaju svoju komercijalnu vrednost a poseduju slabu mogućnost regeneracije u uslovima konkurencije drugih vrsta. Kao posebno ugrožena, izdvaja se malo-poznata populacija u blizini mesta Miljkovac u klisuri Kravlje/Toponičke reke koja broji ne više od 20 jedinki. Potrebno je napomenuti da je u proteklom periodu od 10 godina, od našeg prvog obilaska, brojnost populacije drastično opala, pre svega jer se drvenasta žbunasta vegetacija na ovom prostoru obnovila i time skoro potpuno potisnula žalfiju.

Prema obavljenim molekularnim istraživanjima, značaj kontinentalnih populacija žalfije u centralnom delu Balkana je u tome što poseduju poseban plastidni genotip, zanemarljivo prisutan u primorju, koji se mora zaštititi s obzirom na brojnost, regenerativne sposobnosti i izolovanost populacija. Prisustvo posebnog plastidnog genotipa upućuje na izdvojen, nezavistan tok evolucije kontinentalnih populacija, pa se stoga može očekivati i niz drugih specifičnosti kako na nivou genoma, tako i na nivou metabolita, čime se potreba za zaštitom samo uvećava.

Da bi se srpske populacije žalfije zaštitile i obezbedila mogućnost očuvanja njihovog posebnog genotipa, (haplotipovi A i B), neophodno je da se preduzmu odgovarajuće mere *ex situ* zaštite. Najjednostavniji i najjeftiniji metod zaštite je sakupljanje semena za čuvanje kroz duži vremenski period (KLUMPP 2005). Potrebno je sakupiti jednake količine semena sa što većeg broja jedinki i deponovati ih u nacionalnu banku gena/semena.

Prema dobijenim rezultatima trebalo bi razmotriti da se *CAL* i *PAL* linije proglase nezavisnim evolutivno značajnim linijama (Independent Evolutionary Significant Units - ESU, CRANDALL ET AL. 2000), dok bi dodatna istraživanja biparentalno naslednih markera bila neophodna za razgraničenje i „upravljačkih jedinica“ (Management Units - MU, CRANDALL ET AL. 2000). U slučaju *ex situ* uzgoja koji bi prethodio reintrodukciji, ukrštanje jedinki iz različitih ESU jedinica trebalo bi izbeći da bi se sačuvao sadašnji genetički profil (ELLSTRAND I ELAM 1993, FENSTER I DUDASH 1994, HUFFORD I MAZER 2003).

Treba napomenuti da iako evolutivna istorija upućuje na razlike između populacija, one ne moraju da se ogledaju i u sastavu sekundarnih metabolita, što je već primećeno u ranijim molekularnim istraživanjima lekovitih/aromatičnih biljaka. (na pr. SKOULA ET AL. 1999; TRINDADE ET AL. 2009). Ipak, jedinke *S. officinalis*, iz populacije u Sićevačkoj klisure (SIC), koje su ranije izdvojene kao posebna podvrsta, *S. officinalis*

ssp. *multiflora* (GAJIĆ 1973) prema izvesnim istraživanjima imaju i drugačiji sastav etarskog ulja (COULADIS ET AL. 2002).

Konačno, postavlja se pitanje, kakav uticaj imaju dobijeni rezultati analize DNK markera na dosadašnja taksonomska razmatranja *S. officinalis* iz centralnog dela Balkanskog poluostrva. Uzevši u obzir izrečenu činjenicu o nepodudaranju genetičke i morfološke varijabilnosti (u slučaju neutralnih markera) generalno, ali sa uvidom u morfološku varijabilnost konkretne vrste na odabranim lokalitetima, može se zaključiti sledeće: Molekularno istraživanje kontinentalnih populacija na nivou markera hloroplasta ukazuje na njihovu uniformnu genetičku strukturu (haplotip B u svim populacijama), koja ne podržava dalju poddelu kontinentalne podlinije *CAL*. Iako Sićevačka populacija sadrži i *jedinstveni* haplotip A, na nivou odabranih markera plastida ne vidi se razlog za izdvajanje sićevačkih jedinki u posebnu podvrstu *S. officinalis* ssp. *multiflora*, kako ju je na osnovu morfoloških specifičnosti definisao Gajić (1973), niti za izdvajanje jedinki iz Kanjona Pive u *S. officinalis* ssp. *pivae*, (LAKUŠIĆ I REDŽIĆ 1989). Ovome idu u prilog i rezultati ŠATOVIĆ I SAR (2011), o kojima je već bilo reči.

Ne treba međutim, zanemariti činjenicu da je bilo slučajeva da rezultati DNK analize ne „vide“ i morfološki dobro diferencirane vrste, zato što u slučaju niske stope (neutralnih) mutacija, čak i recipročno monofiletske vrste mogu da poseduju identičan haplotip (KIZIRIAN I DONNELLY, 2004, VELZEN I SAR. 2012).

O taksonomskom statusu *S. officinalis* iz centralnog dela Balkana biće reči na kraju diskusije morfometrijskih rezultata.

5.7. Morfološka varijabilnost *S. officinalis*

Prema koeficijentu varijacije, ispitivani morfološki karakteri u okviru vrste pokazuju umerenu ($CV > 20\%$) ili slabu varijabilnost ($CV < 20\%$) (tabela 21). Kao najviše varijabilni karakteri unutar vrste ističu se dužina cvasti (24,03 %), koja je bila najvarijabilnija u populaciji SIC (34,41 %) i visina izdanka (21,55 %), što je najizraženije u populaciji RUN (26,21 %). Slede karakteri dimenzije listova (od 20,65 do 17,43 %) a kao najmanje varijabilni, izdvajaju se dimenzije čašice, dužina donjeg i gornjeg zupca (7,54 i 8,08 %).

Ovakvi rezultati sasvim su očekivani. Naime, razlike u visini izdanaka, rastojanju između verticilastera odnosno dužini cvasti u celini, mogu se tumačiti na

prvom mestu formativnim delovanjem svetlosti kao ekološkog faktora, (STEVANOVIĆ I JANKOVIĆ 2001), jer je na više lokaliteta bilo moguće uočiti da su jedinke u delimičnoj zaseni sa dužim internodijama u odnosu na jedinke na otvorenom (slika 16). S druge strane, dimenzije čašica, merene u istoj fenofazi, spadaju u najmanje varijabilne karaktere, pre svega jer njihov oblik i veličina, zajedno sa ostalim morfološkim odlikama cveta a posebno prašnika, predstavljaju specifične adaptacije koje obezbeđuju efikasno (unakrsno) oprašivanje i rezultat su izrazito duge koevolucije sa biologijom polinatora. Rezultati merenja karaktera čašice kod svih populacija su u opsegu koji REALES I SAR (2004) daju za *S. officinalis* ssp. *officinalis*.



Slika 16. Izdanci *S. officinalis* sa zbijenom i izduženom cvasti (Rumija)

Poređenjem koeficijenta varijacije (CV) između populacija, može se zapaziti da generalno najveću varijabilnost imaju velike populacije iz kontinuiranog primorskog dela areala MOR (19,44 %), RUS (19,12 %) i RUN (17,94 %), a najmanju populacija ORJ (11,51 %). Kontinentalne populacije PLE, SIC i JBL ne zaostaju značajno za primorskim populacijama (16,63 - 17,25 %), dok je varijabilnost malobrojne populacija PIV nešto manja (15,69 %).

Analiza osnovnih komponenti i analiza varijanse, koje su prethodile diskriminacionoj i klaster analizi, već su pokazale da jedinke *S. officinalis* iz analiziranih populacija predstavljaju raznovrsnu ali homogenu grupu. Diskriminaciona analiza samo je delimično izdvojila populaciju JBL, međutim UPGMA klaster analiza (fenogrami 1 i 2) nije demonstrirala grupisanje populacija prema geografskoj pripadnosti ni kada su uzeti u obzir svi karakteri, niti sa ANOVA statistički značajnim karakterima.

Subjektivno, tokom poređenja eksikata, izgledalo je da se može uočiti obrazac u zastupljenosti određenog oblika listova u različitim populacijama, ali se to statistički nije potvrdilo. Jedino su se jedinke iz populacije JBL izdvojile na osnovu izduženosti liske. Takođe, prisustvo okriljenih listova, koji su sporadično pronalazeni na vegetativnim izdancima kod pojedinih individua u populacijama PLE, GRA i NJE, uključeno je u statističku obradu zato što, prema ROSUA I BLANCA (1990), ovakvi listovi predstavljaju vezu sa perastim listovima koje autori smatraju primitivnim u okviru sekcije. Prema našem mišljenju insistiranje na značaju ovih karaktera u analizi porekla bilo bi pogrešno, jer ovaj parametar nije pokazao statistički značaj u razdvajanju populacija u korespondentnoj analizi.

U herbarskoj zbirci BEO nisu pronađeni tipski primerci za *Salvia officinalis* L. subsp. *multiflora* Gajić (GAJIĆ 1973, 1976), tako da nije bilo mogućnosti za poređenje sakupljenog materijala sa lokaliteta u Sićevačkoj klisuri sa materijalom koji je sakupio autor.

GAJIĆ u raspravi o varijabilnosti vrste ističe veliki broj cvetova u pršljenovima (10 - 16) i dužinu cvetne drške (6 – 10 mm) kao osnovne dijagnostičke karaktere za podvrstu *multiflora*. Više od deset cvetova u osnovnom nodusu zaista je odlika velikog broja jedinki iz populacija u Sićevačkoj klisuri, međutim, ova osobina nije bila retka ni u populacijama iz primorskog dela areala. U toku našeg istraživanja najveći broj cvetova pronađen je upravo u populacijama iz “kontinuiranog - primorskog” dela areala i to u populacijama na Pelevom brijegu i na Rumiji (16) ali jedinke sa ekstremno velikim brojem cvetova (24), koje autor navodi za Sićevačku klisuru, nisu registrovane ni u jednoj populaciji. Dužina cvetne drške prema našim nalazima, izuzetno je konzervativan karakter i ne prelazi 6 mm u vreme cvetanja ni u jednoj ispitivanoj

populaciji. Čašice u kojima sazrevaju orašice imaju nešto duže cvetne drške ali one nisu uzete u razmatranje.

Salvia officinalis L. ssp. *multiflora* Gajić **forma *multiverticilata*** Gajić, sa 9 i 10 cvetnih pršljenova nije registrovana u toku našeg terenskog istraživanja ni u jednoj populaciji ali je u zbirci BEO pronađen eksikat sa 9 cvetnih pršljenova u cvasti, koji nije bio posebno obeležen. Forma koju odlikuju zbijene cvasti (5 - 8 cm) sa malim brojem cvetnih pršljenova (4 – 5), a koju je Gajić opisao za okolinu Ploča pod imenom *spicata* prema našim rezultatima veoma je česta i u kontinentalnim populacijama.

Prisustvo brakteja na nekoliko donjih pršljenova samo je sporadično zapaženo pa je teško govoriti o lokalitetu žalfije koji karakteriše forma *Salvia officinalis* L. ssp. *officinalis* **forma *bracteata*** Kojić et Gajić. U vreme otvaranja cvetova brakteje sukcesivno opadaju, prvo sa vršnih pa zatim i nižih pršljenova dok se par na osnovnom pršljenu zadržava često i u vreme sazrevanja orašica i otpada tek sa sušenjem celog fertilnog izdanka.

U okviru svog priloga za monografiju *Salvia officinalis* Gajić je varijabilnost morfoloških karaktera razmatrao uzevši u obzir i podvrstu *lavandulifolia* Gams. pored primeraka iz Sićevačke klisure i primerka iz crnogorskih primorskih populacija. Gajić ukazuje na trend povećanja dimenzija listova, dužine listova i broja cvetova od španske podvrste, preko tipske čiji centar areala smešta u područje jadranske obale do podvrste *multiflora* koju je opisao za područje Sićevačke klisure.

Rezultati našeg istraživanja međutim, kao što ranije već rečeno, nisu u saglasnosti sa ovakvim stavom. Osim toga, Gajić za Sićevačku klisuru navodi dve podvrste: i *ssp. officinalis* i *ssp. multiflora*. Zanimljivo je da se na lokalitetu PLE (ispod Pleša a u blizini *Via militaris*, mogu pronaći jedinke žalfije sa izrazito kratkim cvastima, a odvojeno na nekih 100 metara udaljenosti od njih jedinke rastresitih mnogocvetnih cvasti, koje bi se prema Gajićevoj taksonomiji vrste mogle svrstati u jednu, odnosno drugu podvrstu. Teško je međutim zamisliti da između ove dve grupe jedinki postoji reproduktivna izolacija (cvetaju u istom periodu) koja bi fiksirala ove karakteristike na genetičkom nivou i zato smatramo da bi varijabilnost ovakvog tipa trebalo pre da bude definisana na nivou forme nego na nivou podvrste.

Jasna korelacija između morfoloških i molekularnih podataka nije pronađena. Za razliku od distribucije haplotipova koja je geografski skoro sasvim diferencirana (sa

preklapanjem samo u jednoj populaciji, LUS), prema našim rezultatima, morfološka varijabilnost ne odslikava geografsku udaljenost i izolovanost kontinentalnih populacija *S. officinalis* što je bilo očekivano na početku istraživanja.

Poređenjem distribucije haplotipova i fenograma sa ANOVA statistički značajnim karakterima, može se zapaziti izdvajanje populacija (SIC i JBL), u kojima je detektovan haplotip B ali ne i populacije PIV. Takođe, smatramo da bi bilo pogrešno prisustvo *specifičnog* haplotipa A u populaciji kod Ostrovice u Sićevačkoj klisuri tumačiti na bilo koji drugi način osim u svetlu genetičkog diverziteta ispitivane populacije i njene vijabilnosti, po čemu se ona razlikuje od ostalih malobrojnih populacija u kontinentalnom delu Balkanskog poluostrva.

Rezultati DNK analize obrađenih markera hloroplasta kao i nuklearnih SSR markera iz uzoraka koji pokrivaju areal žalfije od Španije do Grčke kao i srodnih taksona iz sekcije *Salvia*, u saradnji sa istraživačima iz regiona koja je u toku, pružiće jasniju sliku o ancestralnosti haplotipova iz centralnog dela Balkanskog poluostrva i dati detaljan prikaz filogeografije *S. officinalis*.

6. ZAKLJUČCI

Da bi se utvrdili starost i poreklo populacija *Salvia officinalis* u centralnom delu Balkanskog poluostrva, urađena je filogeograska analiza 8 populacija i morfometrijska analiza 10 populacija iz Crne gore, Srbije i Makedonije. Iz dobijenih rezultata je moguće zaključiti sledeće:

1. Nakon izolacije DNK prema modifikovanom protokolu i amplifikacije dva regiona hloroplasta (*3' rps16-5' trnK* i *rpl32-trnL*) detektovano je 7 haplotipova za koje su određeni genealoški odnosi metodom parsimonije i konstruisano haplotip stablo.
2. Distribucija haplotipova poseduje filogeografsku strukturu. Najveći broj haplotipova pronađen je u populacijama sa Orjena i Rumije, a najmanji u populacijama iz Pive, Miljkovca i klisure Crnog Drima. Haplotip B je zastupljen u svim kontinentalnim i u populaciji sa Luštice, a haplotip C je pronađen u svim populacijama iz najvećeg dela primorskog areala vrste.
3. Najveći genetički diverzitet u kontinentalnom delu areala registrovan je u populaciji kod Ostrovice u Sićevačkoj klisuri. Prisustvo specifičnog haplotipa A, udaljenog dva mutaciona koraka od haplotipa B ukazuje na njegovu diferencijaciju u ovom području ili zadržavanje ancestralnog genetičkog polimorfizma.
4. Analiza molekularne i prostorne varijanse, ukazala je na postojanje dve nasledne linije: striktno primorske (PAL) i strukturirane kontinentalno primorske linije (CAL).
5. Razdvajanje osnovnih naslednih linija *S. officinalis* prema bajesovskoj analizi „striktnog sata“ smešteno je pre 3,267 miliona godina u pliocen, što se podudara sa vremenom kada su najveći deo centralnog dela Balkana prekrile velike vodene površine, što je uticalo na razdvajanje areala predačkih populacija.
6. Razdvajanje kontinentalno primorske linije na kontinentalnu i primorsku podliniju desilo se sredinom pleistocena, pre 1,188 miliona godina kada je usled drastičnih fluktuacija klime i migracija vegetacije došlo do isčezavanja ancestralnog haplotipa *hh1* i opstanka izvedenih srodnih haplotipova u udaljenim populacijama.

7. Na osnovu genetičke strukture i diverziteta, a posebno na osnovu zastupljenosti haplotipa B i njegove bliske veze sa ancestralnim *hhl*, izolovane populacije žalfije iz klisura i kanjona centralnog dela Balkanskog poluostrva pokazuju reliktni karakter, a njihovi lokaliteti mogu se smatrati glacijalnim refugijumima ove vrste.
8. Morfometrijska analizom obuhvaćeno je 11 kontinuiranih, 2 meristička i 3 kvalitativna karaktera koji su odabrani na osnovu dosadašnje infraspecijske taksonomije *S. officinalis*.
9. Poređenjem koeficijenta varijacije kao najviše varijabilni karakteri u populacijama izdvojili su se visina izdanka i dužina cvasti, a kao najmanje varijabilni karakteri dimenzije čašice. Najveću varijabilnost pokazale su populacije sa Rumije i Pelevog Brijega a najmanju populacije iz kanjona Pive i sa Orjena.
10. Analiza osnovnih komponenti i analiza varijanse su pokazale da merene jedinke žalfije iz analiziranih populacija predstavljaju raznovrsnu ali homogenu grupu, a diskriminanta kanonijska analiza ukazala je na samo delimično izdvajanje populacije iz klisure Crnog Drima.
11. Klaster analiza nije demonstrirala diferenciranje populacija prema geografskoj pripadnosti ni kada su uzeti u obzir svi karakteri, niti sa karakterima koji su pokazali statističku značajnost u ANOVA analizi.
12. Iako prisustvo posebnog plastidnog genotipa upućuje na izdvojen, nezavistan tok evolucije kontinentalnih populacija žalfije, rezultati merenja morfoloških karaktera ne podržavaju izdvajanje individua iz navedenih populacija u rang podvrste.
13. U celini posmatrano, *Salvia officinalis* ima visok genetički diverzitet i ne može se iz tog aspekta smatrati ugroženom vrstom. Međutim, veličina disjunktnih kontinentalnih populacija, po pravilu je mala, a istovremeno, one su genetički uniformne što, uz činjenicu da su redovno pod pritiskom sakupljača, ukazuje na urgentnu potrebu njihove zaštite.

7. LITERATURA

- ABU-ROMAN S (2011): Comparison of methods for isolating high quality DNA from sage (*Salvia officinalis*). Journal of Medicinal Plant Research 5: 938–941
- ADAMOVIĆ L (1908): Die Bedeutung des Vorkommens der Salbei in Serbien. Englers Bot Jahr Bd 41, Leipzig
- AKHONDZADEH S, NOROOZIAN M, MOHAMMADI M, OHADINIA S, JAMSHIDI AH, KHANI M (2003): *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo controlled trial. Journal of clinical pharmacy and therapeutics, 28(1): 53-59.
- ALEKSIĆ J, STOJANOVIĆ D, BANOVIĆ B, JANČIĆ R (2012): A simple and efficient DNA isolation method for *Salvia officinalis* L. Biochemical Genetics 50(11-12): 881-892
- ANDREWS AC (1956): Sage as a condiment in the Graeco-Roman Era. Economic Botany 10: 263–266.
- ARONNE G, DE MICCO V (2001): Seasonal dimorphism in the Mediterranean *Cistus incanus* L. subsp. *incanus*. Annals of Botany 87: 789–794,.
- AVISE J. C. (2000): Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press.
- AVISE JC. (2009): Phylogeography: retrospect and prospect. Journal of Biogeography, 36(1), 3-15.
- AVISE JC, ARNOLD J, BALL RM, BERMINGHAM E, LAMB T, NEIGEL JE, REEB CA I SAUNDERS NC (1987): Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics, Annual Review of Ecology and Systematics 18: 489-522.
- BARIČEVIĆ D, SOSA S, DELLA LOGGIA R, TUBARO A, SIMONOVSKA B, KRASNA A, ZUPANCIĆ A (2001): Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. Journal of ethnopharmacology, 75(2), 125-132.
- BARIČEVIĆ D, BERNATH J, MAGGIONI L, LIPMAN E (2002): Report of a working group on medicinal and aromatic plants. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- BAZINA E, MAKRIS A, VENDER C, SKOULA M (2002): Genetic and chemical relations among selected clones of *Salvia officinalis*, Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants. 9 (4). 269-273
- BENTHAM G (1836): Labiatarum Genera et Species. London: Ridgeway & Sons, 783 pp.
- BOISSIER E (1879): Flora Orientalis, Vol. 4. Genevae et Basileae

- BÖSZÖRMÉNYI A, HÉTHELYI E, FARKAS Á, HORVÁTH G, PAPP N, LEMBERKOVICS É, SZŐKE É (2009): Chemical and genetic relationships among sage (*Salvia officinalis* L.) cultivars and Judean sage (*Salvia judaica* Boiss.). *J Agric Food Chem* 57:4663-4667
- BOUAZIZ M, YANGUI T, SAYADI S, DHOUB A (2009): Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia. *Food and chemical toxicology*, 47(11), 2755-2760.
- BOŽIN B, MIMICA-DUKIĆ N, SAMOJLIK I, JOVIN E (2007): Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7879-7885.
- CALSAMIGLIA S, BUSQUET M, CARDOZO PW, CASTILLEJOS L, FERRET A (2007): Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science*, 90(6), 2580.
- CANTINO PD, HARLEY RM, WAGSTAFF S J (1992): Genera of Labiatae status and classification. Royal Botanic Gardens Kew.
- CHIANG YC, HUNG KH, MOORE SJ, GE XJ, HUNG S, HSU TW, SCHAAL BA, CHIANG TY (2009): Paraphyly of organelle DNAs in *Cycas* Sect. *Asiorientales* due to ancient ancestral polymorphisms. *BMC Evol Biol* 9:161
- CLABEN-BOCKHOFF R, SPECK T, TWERASER E, WESTER P, THIMM S, REITH M (2004): The staminal lever mechanism in *Salvia* L.(*Lamiaceae*): a key innovation for adaptive radiation?. *Organisms Diversity & Evolution*, 4(3), 189-205.
- CLABEN-BOCKHOFF R, WESTER P, TWERASER E (2003): The staminal lever mechanism in *Salvia* L.(*Lamiaceae*)-a review. *Plant Biology*, 5(01), 33-41.
- CLEMENT M, POSADA D, CRANDALL K (2000): TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9:1657–1660
- CORRIVEAU JL, COLEMAN AW (1988): Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. *Am J Bot* 75:1443-1458
- CORSI G, BOTTEGA S (1999): Glandular hairs of *Salvia officinalis*: new data on morphology, localization and histochemistry in relation to function.- *Annals of Botany*, Vol.84, No.5, pp.657-664,
- COULADIS M, TZAKOU O, MIMICA-DUKIĆ N, JANČIĆ BR, STOJANOVIĆ LD (2002): Essential oil of *Salvia officinalis* L. from Serbia and Montenegro. *Flavour Fragr J* 17:119-126

- CRANDALL KA, BININDA-EMONDS ORP, MACE GM, WAYNE RK (2000): Considering evolutionary processes in conservation biology: returning to the original meaning of "evolutionarily significant units". *Trends Ecol Evol* 15:290-295
- CRUSE-SANDERS JM, HAMRICK JL (2004): Spatial and genetic structure within populations of wild American ginseng (*Panax quinquefolius* L., Araliaceae). *J Hered* 95:309-321
- ČERNJAVSKI P (1943): Prilog za floristicko poznavanje šire okoline Ohridskog Jezera. *Ohridski zbornik*, 35:7-88.
- DAVIS PH, HEDGE I C (1971): Floristic links between NW Africa and SW Asia. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, 75, 43-57.
- DEVETAK Z (1963): Prilog poznavanju kadulje u Jugoslaviji. *Radovi Poljoprivrednog Fakulteta u Beogradu* XII:241-261
- DIERINGER G, RAMAMOORTHY T, TENORIO LEZAMA P (1991): Floral visitors and their behavior to sympatric *Salvia* species (*Lamiaceae*) in Mexico. *Acta Bot. Mex.* 13, 75–83.
- DIKLIĆ N (1977): Rod *Salvia* L. In: Josifović M (ed) *Flora SR Srbije*, Supplement IX: 166. SANU, Beograd
- DIKLIĆ N (1974): *Salvia* L. In: Josifović, M. (ed.) *Flora SR Srbije*, tom VI, 432-453. - SANU. Beograd.
- DJORDJIEVSKA Z, MATEVSKA O (1999): Sostojba na naodjalistata na vidovi od lekoviti rastenija vo Makedonija. *Zborn. trudovi od I-kongres na ekolozite na Makedonija. Poseb.izd. na Maked.ekol.drus.*, 5:369-378.
- DOYLE JJ, DOYLE JL (1987): A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11–15
- DREW B, SYTSMA K (2012): Phylogenetics, biogeography, and staminal evolution in the tribe Mentheae (*Lamiaceae*). *American journal of botany*, 99(5), 933-953.
- DRUMMOND AJ, RAMBAUT A (2007): "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees." *BMC Evol Biol* 7:214
- DUPANLOUP I, SCHNEIDER S, EXCOFFIER L (2002): A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol Ecol* 11:2571-2581
- DWECK AC (2000): The folklore and cosmetic use of various *Salvia* species. In: Kintzios SE (ed) *Sage. The genus Salvia*, vol 14, Harwood Academic Publisher, The Netherlands, pp 1–25
- ECHEVERRIGARAY S, AGOSTINI G (2006): Genetic relationships between commercial cultivars and Brazilian accessions of *Salvia officinalis* L. based on RAPD markers. *Rev Bras Pl Med* 8:13-17

- EIDI A, EIDI M (2009): Antidiabetic effects of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 3(1), 40-44.
- ELLSTRAND NC, ELAM DR (1993): Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Ann Rev Ecol Syst* 24:217-242
- ENNOS RA (1994): Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* 72:250-259
- EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S (2005): Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47-50
- FENSTER CB, DUDASH MR (1994): Genetic considerations for plant population conservation and restoration. In: Bowles ML, Whelan C (eds) *Restoration of endangered species: Conceptual issues, planning, and implementation*. Cambridge University Press, pp 34-62
- FRANKHAM R, BALLOU JD, BRISCOE DA (2002): *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- FU YX (1997): Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915-925
- GAJIĆ M (1973): Varijabilnost žalfije (*Salvia officinalis* L.). Nova podvrsta (*S. officinalis* L. subsp. *multiflora* Gajić subsp. nova). *Glasn Prir Muz Beograd C* 7:29-51
- GAJIĆ M (1976): Građa za monografije nekih biljnih vrsta. - *Glasnik Prirodnjačkog muzeja u Beogradu, Serija B, Knjiga* 31, 5
- GAMS H, MARZELL H (1924): *Salvia* L. In *Hegi Floras von Mittel Europa*, Bd. V. teil, Munchen
- GIOURGA H, MARGARIS N, VOKOU D (1998): Effects of grazing pressure on succession process and productivity of old fields on Mediterranean islands. *Environmental Management*, 22(4), 589-596.
- GÓMEZ A, LUNT D (2007): Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. In: Weiss S, Ferrand N (eds) *Phylogeography of southern European refugia*. Springer, Berlin, pp 155–188
- GRAUR D, LI W (2000): *Fundamentals in molecular evolution*. Sinauer Associates, Sunderland
- GREGURAŠ D (2013): Genetic diversity and population structure of Dalmatian sage (*Salvia officinalis*), Doktorska disertacija. PMF, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- GREUTER W, BURDET HM, LONG D (1986): *Med-Checklist 3., Dicotyledones (Convulvaceae-Labiata)*. - Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Geneve; Botanischer Garten & Botanisches Museum Berlin-Dahlem.
- GROSSHEIM A A (1967): *Flora Caucasia, VII (Umbeliferae and Scrophulariaceae)*

- HANSSON B, WESTERBERG L (2002): On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Molecular Ecology*, 11(12), 2467-2474.
- HARLEY R, ATKINS S, BUDANTSEV A, CANTINO P, CONN B, GRAYER R I SAR. (2004): *Labiatae*. Flowering Plants· *Dicotyledons*, 167-275.
- HASEGAWA M, KISHINO H, YANO T (1985): "Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA". *Journal of Molecular Evolution* 22(2): 160–174.
- HEDGE IC (1972): *Salvia* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (eds) *Flora Europaea* 3, Cambridge University Press, Cambridge. 188-192
- HEDGE IC(1992): A global survey of the biogeography of the *Labiatae*. In: R.M. Harley, T. Reynolds (Editors). - *Advances in Labiate Science*, pp. 7-77. Royal Botanic Gardens, Kew.
- HEWITT GM (1999): Post-glacial recolonisation of European Biota. *Biol J Linn Soc* 68:87-112
- HUFFORD K, MAZER SJ (2003): Plant ecotypes: Genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends Ecol Evol* 18:147-155
- JANČIĆ R, STOJANOVIĆ D (2008): *Ekonomika botanika*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, pp 243-244
- JANKOVIĆ MM (1984): *Vegetacija SR Srbije: Istorija i opšte karakteristike*.- In: Sarić, M. (ed.), *Vegetacija SR Srbije I, Srpska Akademija nauka i umetnosti*, Beograd, 1-166.
- JANKOVIĆ MM (1990): *Fitogeografija*. - Naučna knjiga, Beograd
- JARIĆ S, MITROVIĆ M, DJURDJEVIĆ L, KOSTIĆ O, GAJIĆ G, PAVLOVIĆ D, PAVLOVIĆ P (2011): Phytotherapy in medieval Serbian medicine according to the pharmacological manuscripts of the Chilandar Medical Codex (15–16th centuries). *Journal of ethnopharmacology*, 137(1), 601-619.
- JENSEN JL, BOHONAK AJ, KELLEY ST (2005): Isolation by distance, web service. *BMC Genet* 11:6-13. Available: <http://ibdws.sdsu.edu/~ibdws/DNA.html>
- JUG-DUJAKOVIC M (2010): *Genetska i biokemijska raznolikost ljekovite kadulje (Salvia officinalis L.)*, doktorska disertacija. Zagreb, Agronomski fakultet
- JUG-DUJAKOVIC M, RISTIĆ M, PLJEVLJAKUŠIĆ D, DAJIĆ- STEVANOVIĆ Z, LIBER Z, HANČEVIĆ K, RADIĆ T, ŠATOVIĆ Z. (2012): High diversity of indigenous populations of Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.) in essential-oil composition. *Chem. Biodiv.* 9: 2309-2323.
- KARAČA M, GUL INCE A, TUGRUL AY S, TURGUT K, NACI ONUS A (2008): PCR-RFLP and DAMD-PCR genotyping for *Salvia* species. *J Sci Food Agric* 88: 2508–2516

- KAROUSOU K, HANLIDOU E, KOKKINI S (2000): The Sage plants of Greece: Distribution and Intraspecific variation. In Kintizios, S. E. (ed.) Sage, The Genus *Salvia*. - Harwood Academic Publishers.
- KIMURA M. (1968): Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217(5129), 624-626.
- KENNEDY DO, PACE S, HASKELL C, OKELLO E J, MILNE A, SCHOLEY, A. B. (2005): Effects of cholinesterase inhibiting sage (*Salvia officinalis*) on mood, anxiety and performance on a psychological stressor battery. *Neuropsychopharmacology*, 31(4), 845-852.
- KINTZIOS SE (2000): Medicinal and aromatic plants-industrial profiles, vol 14, Sage, The Genus *Salvia*, Harwood Academic Publishers, The Netherlands
- KIZIRIAN D, DONNELLY MA (2004): The criterion of reciprocal monophyly and classification of nested diversity at the species level. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(3), 1072-1076.
- KLUMPP RT (2005): Seed and pollen storage: European Focus. In: Geburek T, Turok J (Eds) Conservation and management of forest genetic resources in Europe. Arbora Publishers, Zvolen, pp 601-622
- KRSTIĆ N, SAVIĆ L, JOVANOVIĆ G (2012): The Neogene lakes on the Balkan land. *Geološki anali Balkanskoga poluostrva*, (73), 37-60.
- LAKUŠIĆ BS, RISTIĆ MS, SLAVKOVSKA VN, STOJANOVIĆ DL, LAKUŠIĆ DV (2013): Variations in essential oil yields and compositions of *Salvia officinalis* (Lamiaceae) at different developmental stages. *Botanica Serbica*, 37(2), 127-139.
- LAKUŠIĆ R, REDŽIĆ S (1989): Flora i vegetacija vaskularnih biljaka u refugijalno-reliktnim ekosistemima kanjona reke Drine i njenih pritoka. *Glasnik Odeljenja Prir. nauka SANU* 16:107-205 (Summary in English)
- LAZAREVIĆ M (2012): Citogenetička, palinološka i filogeografska istraživanja roda *Ramonda* (Gesneriaceae) na Balkanskom poluostrvu, Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu
- LIANOPOULOU V, PATAKAS A, BOSABALIDIS A (2014): Seasonal dimorphism and winter chilling stress in *Thymus sibthorpii*. *Biologia Plantarum*, 58(1), 139-146.
- LIBRADO P, ROZAS J (2009): DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452
- LODHI MA, YE GN, WEEDEN NF, REISCH BI (1994): A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. *Plant Mol Biol Rep* 12:6-13

- MADER E, LOHWASSER U, BÖRNER A, NOVAK J (2010): Population structures of genebank accessions of *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) revealed by high resolution melting analysis. *Biochem Syst Ecol* 38:178–186
- MANTEL N (1967): The detection of disease clustering and generalize regression approach. *Cancer Res* 27:209-220
- MAYER B, BAGGIO CH, FREITAS CS, DOS SANTOS AC, TWARDOWSCHY A, HORST H, MARQUES MC (2009): Gastroprotective constituents of *Salvia officinalis* L. *Fitoterapia*, 80(7), 421-426.
- MCKAY JK, LATTA RG (2002): Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends Ecol Evol* 17:285-291
- MÉDAIL F, DIADEMA K (2009): Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *J Biogeogr* 36:1333-1345
- MIŠIĆ V (1981): Šumska vegetacija klisura i kanjona istočne Srbije: The Forest Vegetation of Gorges and Canyons in Eastern Serbia. Institut za biološka istraživanja" Siniša Stanković".
- MOLINS A, BACCHETTA G, ROSATO M, ROSSELLÓ JA, MAYOL M (2011): Molecular phylogeography of *Thymus herba-barona* (Lamiaceae): insight into the evolutionary history of the flora of the western Mediterranean islands. *Taxon*,60(5), 1295-1305.
- MORITZ C (1994): Defining “Evolutionary Significant Units” for conservation. *Trends Ecol Evol* 9:373-375
- NACIRI Y, GAUDEUL M (2007): Phylogeography of the endangered *Eryngium alpinum* L. (*Apiaceae*), in the European Alps. *Mol Ecol* 16:2721-2733
- NCBI - National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- NEI M, LI WH (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 5269-5273.
- NEWTON A C, ALLNUTT T R, GILLIES ACM, LOWE AJ, ENNOS R A (1999): Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(4), 140-145.
- NIKETIĆ M (2012): Da li smo blizu rešenja zagonetke o živim fosilima, In: Vasić O (ed) *Drvo ili život sam. prirodnjački muzej i Srpska akademija nauka i umetnosti*, Beograd
- NIKOLIĆ V, DIKLIĆ N (1966): Zajednica žalfije i rudinskog pelina *Artemisio-Salvietum officinalis* (*Salvia officinalis* - *Artemisia lobelii* Grebešenikov 1950) u Sićevačkoj klisuri. *Glasnik Prirodnjačkog Muzeja*, Beograd, serija B, knjiga 21:5-21 (Summary in German)

- OSBALDESTON TTA, WOOD RPA (2000): Dioscorides - De Materia Medica, Ibis Press, Johanseburg
- PANTIĆ NK (1984): On the evolution of land flora based on plant fossils from the territory of Serbia. In: Jankovic M (ed) Vegetation de la republique socialiste de Serbie. Academie serbie des sciences et des arts, Beograd, pp 191-246
- PERRY NB, ANDERSON RE, BRENNAN NJ, DOUGLAS MH, HEANEY AJ, MCGIMPSEY JA SMALLFIELD BM (1999): Essential oils from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): variations among individuals, plant parts, seasons, and sites. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 2048–2054
- PETIT RJ, EL MOUSADIK A, PONS O (1998): Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conserv Biol* 12:844-855
- PETIT R, VENDRAMIN GG (2007): Plant phylogeography based on organelle genes: an introductions., in Weiss and N. Ferrand (eds.), *Phylogeography of Southern European Refugia*, 23.-97, Springer, Dordrecht
- PONS O, PETIT RJ (1996): Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* 144:1237-1245
- POSADA D, CRANDALL KA (2001): Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol Evol* 16:37-45
- Pravilnik o proglašenju i zaštiti strogo zaštićenih i zaštićenih divljih vrsta biljaka, životinja i gljiva („Službeni glasnik RS“, br. 05/2010 i 47/2011),
- RADOSAVLJEVIĆ I, BOGDANOVIĆ S, ŠATOVIĆ Z, LIBER Z (2012): Natural hybridization between *Salvia officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Mill. (Lamiaceae) as revealed by microsatellite markers in Rešetnik, I., Bogdanović, S., Alegro, A. (eds): *Book of Abstracts of International Symposium on Evolution of Balkan Biodiversity*, Zagreb, Croatia, p 65
- RADOSAVLJEVIĆ I, SATOVIĆ Z, JAKSE J, JAVORNIK B, GREGURAŠ D, JUG-DUJAKOVIĆ M, LIBER Z (2012a): Development of New Microsatellite Markers for *Salvia officinalis* L. and Its Potential Use in Conservation-Genetic Studies of Narrow Endemic *Salvia brachyodon* Vandas. *International journal of molecular sciences*, 13(9), 12082-12093.
- RAMBAUT A (2006): FigTree v1.1.1: Tree figure drawing tool. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- REALES A, RIVERA D, PALAZON JA, OBON C (2004): Numerical taxonomy study of *Salvia* sect. *Salvia* (Labiatae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 145(3), 353-371.
- REED DH, FRANKHAM R (2001): How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* 55:1095-1103

- RENDELL S, ENNOS RA (2003): Chloroplast DNA diversity of the dioecious European tree *Ilex aquifolium* L. (English holly). *Mol Ecol* 12:2681-2688
- RODRIGES-HAHN L, ESQUIVEL B, CARDENAS J (1992): The distribution of Diterpenoides in *Salvia*. In: Harley, R.M., Reynolds, T. (eds.) *Advances in Labiatae Science*, 335-347. - Royal Botanic Gardens, Kew.
- ROGERS SO, BENDICH AJ (1988): Extraction of DNA from plant tissues. In: Gelvin SB, Schilperoort RA (eds) *Plant molecular biology manual*. Kluwer Academic, Boston, pp 1–10
- ROGERS AR, HARPENDING H (1992): Population-growth makes waves in the distribution of pairwise genetic-differences. *Mol Biol Evol* 9:552-569
- ROSUA J L, BLANCA G (1986): Revision del genero *Salvia* L. (*Lamiaceae*) en el Mediterraneo Occidental: La seccion *Salvia*. *Acta Botanica Malacitana*, 11: 227 - 272
- ROSUA J L, BLANCA G (1990): Distribution of the *Salvia* section (*Salvia* L. genus, *Lamiaceae*) in the Western Mediterranean region and its vicariance relationships with the East of the Mediterranean basin. *Lagascalía*, 15.
- SAVIĆ IR (2008): Diversification of the Balkan fauna: its origin, historical development and present status. In: Makarov SE, Dimitrijević (eds) *Advances in arachnology and developmental biology: papers dedicated to Professor Božidar P. M. Čurčić*, Monographs 12. Institute of Zoology, Faculty of Biology, University of Belgrade, pp 57-78
- SCHAAL BA, GASKIN JF, CAICEDO AL (2003): Phylogeography, haplotype trees, and invasive plant species. *J Hered* 94:197-204
- SCHAAL BA, HAYWORTH DA, OLSEN KM, RAUSCHER JT, SMITH WA (1998): Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Mol Ecol* 7:465-474
- SIMPSON MG (2006): *Plant systematics*, Elsevier Academic Press, pp 477 - 482
- SHAW J, LICKEY EB, SCHILLING EE, SMALL R (2007): Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in Angiosperms: the tortoise and the hare III. *Am J Bot* 94:275-288
- SKOULA M, EL HILALI I, MAKRIS AM (1999) Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles. *Biochem System Ecol* 27:559-568
- SLATKIN M (1993): Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution* 43:1349-1368
- STEVANOVIĆ B, JANKOVIĆ M (2001): *Ekologija biljaka sa osnovama fiziološke ekologije biljaka*. - NNK International, Beograd

- STEVANOVIĆ V (1996): Analysis of the central European and Mediterranean orophytic element on the mountains of the west and central Balkan Peninsula, with special reference to endemics. *Bocconea* 5:77–97
- STEVANOVIĆ V (2005): Procena biodiverziteta - od interpretacije do konzervacije. Primer endemične vaskularne flore Balkanskog poluostrva. - In: Anđelković, M. (ed.): "Biodiverzitet na početku novog milenijuma", Zbornik radova sa naučnog skupa. - Srpska Akademija Nauka i Umetnosti, Naučni skupovi CXI, Odeljenje hemijskih i bioloških nauka 2: 53-73, Beograd.
- STEVANOVIĆ V (2008): Orofitska flora zapadnog, centralnog i istočnog dela Balkanskog poluostrva sa posebnim osvrtom na glacialne relikte. Manuskript. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- STEVANOVIĆ V, JOVANOVIĆ S, LAKUŠIĆ D, NIKETIĆ M (1995): Diverzitet vaskularne flore Jugoslavije sa pregledom vrsta od međunarodnog značaja. In: Stevanović V, Vasić V (eds.) Biodiverzitet Jugoslavije sa pregledom vrsta od međunarodnog značaja. Biološki fakultet i Ecolibri, Beograd, pp 183-217
- STEVANOVIĆ V, STEVANOVIĆ B (1995): Osnovni klimatski, geološki i pedološki činioci diverziteta kopnenih ekosistema Jugoslavije. In: Stevanović V, Vasić V (eds): Biodiverzitet Jugoslavije sa pregledom vrsta od međunarodnog značaja. - Biološki fakultet i Ecolibri, Beograd.
- STEWART J, LISTER A, BARNES I, DALÉN L (2010): Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1682), 661-671.
- STOJANOVIĆ D (2002): Intraspecijska varijabilnost *Salvia officinalis* L. (*Lamiaceae*) u Jugoslaviji., magistarska teza, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- STOJANOVIĆ D, LAKUŠIĆ B, SLAVKOVSKA V, JANČIĆ R (2000): Anatomy of the multifloral sage *Salvia officinalis* L. subsp. *multiflora* Gajić (*Lamiaceae*). - *Ekologija*. 35(2): 97-103.
- STOJANOVIĆ D, ALEKSIĆ J, JANČIĆ I, JANČIĆ R (2012) The indigeneity of a Mediterranean herb in the continental Balkans: A plastid-based phylogeographic survey of *Salvia officinalis* L. In: Rešetnik I, Bogdanović S, Alegro A (eds). International Symposium on "Evolution of Balkan Biodiversity, Book of abstracts, Zagreb p. 69.
- SURINA B, SCHÖNSWETTER P, SCHNEEWEISS GM (2011): Quaternary range dynamics of ecologically divergent species (*Edraianthus serpyllifolius* and *E. tenuifolius*, *Campanulaceae*) within the Balkan refugium. *J. Biogeogr* 38: 1381–1393
- SYME R, BIRLEY AR (1999): The provincial at Rome: and, Rome and the Balkans 80BC-AD14. University of Exeter Press, Exeter, UK

- ŠATOVIĆ Z. (ed.) (2011): Genetic structure of Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.) populations: A model for a collaborative research on MAP genetic resources. Project Report. - South East European Development Network on Plant Genetic Resources The SEEDNet Medicinal and Aromatic Plants (MAP) Working Group.
- TABERLET P, FUMAGALLI L, WUST-SAUCY A G, COSSON J F (1998): Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7(4), 453-464.
- TAJIMA F (1989): Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595
- TAMURA K (1992): Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9 (4): 678–687
- TAMURA K, NEI M (1993): Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10 (3): 512–526.
- TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, AND KUMAR S (2011): MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739
- TARAYRE M, SAUMITOU-LAPRADE P, CUGUEN J, COUVET D, THOMPSON JD (1997): The spatial genetic structure of cytoplasmic (cpDNA) and nuclear (allozyme) markers within and among populations of the gynodioecious *Thymus vulgaris* (Labiatae) in southern France. *Am J Bot* 84:1675-1684
- TEMPLETON AR, CRANDALL KA, SING CF (1992): A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132:619-633
- TODOROV S, PHILIANOS S, PETKOV V, HARVALA C, ZAMFIROVA R, OLIMPIOU H (1984): Experimental pharmacological study of three species from genus *Salvia*. *Acta physiologica et pharmacologica Bulgarica*, 10(2), 13.
- TRINDADE H, COSTA MM, LIMA SB, PEDRO LG, FIGUEIREDO AC, BARROSO JG (2009): A combined approach using RAPD, ISSR and volatile analysis for the characterization of *Thymus caespititius* from Flores, Corvo and Graciosa islands (Azores, Portugal). *Biochem Syst Ecol* 670-677
- TUCIĆ N (2003): *Evoluciona Biologija*, NNK – International, Beograd: 318 – 320
- TUCKER AO, MACIARELLO MJ (1990): Essential oils of cultivars of Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.). *Essent. Oil Res.* 2:139-144.

- TURRILL WB (1929): The plant life of the Balkan Peninsula, a phytogeographical study. Oxford and the Clarendon Press, Oxford
- USHER J (1991): Simona and Pasquino: "*Cur Moriatur Homo Cui Salvia Crescit in Horto?*" MLN Vol. 106, No. 1, Italian Issue, The Johns Hopkins University Press, pp. 1-14
- UTESCHER T, DJORDJEVIĆ-MILUTINOVIĆ D, BRUCH A, MOSBRUGGER V (2007): Palaeoclimate and vegetation change in Serbia during the last 30 Ma. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 253:141–152
- VALDÉS BERMEJO E, LÓPEZ G (1977): Aportaciones a la flora española. In *Anales Inst. Bot. Cavanilles* (Vol. 34, No. 1, pp. 157-173).
- VASIĆ O (1997): A survey of the mediterranean species of "Lamiaceae" family in the flora of Serbia. *Lagascalia*, 19(1), 263-270.
- VELZEN VAN R, WEITSCHKE E, FELICI G, BAKKER FT (2012): DNA barcoding of recently diverged species: Relative performance of matching methods. *PLoS one* 7:e30490
- Zakon za zaštita na prirodna, Služben vesnik na Republika makedonija 2011
- WALKER J, SYTSMA K, TREUTLEIN J, WINK M (2004): *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: Implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Menthae. *American Journal of Botany*, 91(7), 1115-1125.
- WALKER J, SYTSMA K (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.
- WALTER R, EPPERSON BK (2005): Geographic pattern of genetic diversity in *Pinus resinosa*: contact zone between descendants of glacial refugia. *Am J Bot* 92:92-100
- WATANABE M, KOBAYASHI Y, OGIHARA J, KATO J, OISHI K. (2000): HIV-1 reverse transcriptase-inhibitory compound in *Salvia officinalis*. *Food Science and Technology Research*, 6(3), 216-220.
- WILLIS KJ (1994): The vegetational history of the Balkans. *Quaternary Science Reviews*, 13(8), 769-788.
- WU C, LI H, (1977): *Labiatae*. Fl. Reipubl. Popularis Sin. 65(2): 1-649, 66: 1-647
- YUAN Q-J, ZHANG Z-Y, HU J, GUO L-P, SHAO A-J, HUANG L-Q (2010): Impacts of recent cultivation on genetic diversity pattern of a medicinal plant, *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae). *BMC Genet* 11:29
- ŽIDOVEC V (2004): Varijabilnost prirodnih populacija mirisave kadulje (*Salvia officinalis* L.), doktorska disertacija, Zagreb : Agronomski fakultet
- БАЙКОВА ЕВ (2005): Закономерности морфологической эволюции шалфеев (*Salvia*, Lamiaceae) (Doctoral dissertation, [Центр. сиб. ботан. сад СО РАН]).

8. PRILOZI

Prilog 1. Primer deponovane sekvence u NCBI banci gena

Salvia officinalis voucher 2160 HFFBU rpl32-trnL intergenic spacer, partial sequence; and ribosomal protein L32 (rpl32) gene, partial cds; chloroplast

GenBank: JQ771324.1

LOCUS JQ771324 645 bp DNA linear PLN 30-MAY-2012

DEFINITION *Salvia officinalis* voucher 2160 HFFBU rpl32-trnL intergenic spacer, partial sequence; and ribosomal protein L32 (rpl32) gene, partial cds; chloroplast.

ACCESSION JQ771324

VERSION JQ771324.1 GI:388523142

KEYWORDS .

SOURCE chloroplast *Salvia officinalis* (garden sage)

ORGANISM [Salvia officinalis](#) Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetalae; asterids; lamiids; Lamiales; Lamiaceae; Nepetoideae; Mentheae; *Salvia*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 645)

AUTHORS Stojanovic,D.L., Aleksic,J.M., Jancic,I.R. and Jancic,R.B.

TITLE The indigeneity of a Mediterranean herb in the continental Balkans: A plastid-based phylogeographic survey of *Salvia officinalis* L. and its conservation implications

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 645)

AUTHORS Stojanovic,D.L., Aleksic,J.M., Jancic,I.R. and Jancic,R.B.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (12-MAR-2012) Department of Botany, University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, 450 Vojvode Stepe, Belgrade 11010, Serbia

FEATURES Location/Qualifiers

```
source          1..645
                 /organism="Salvia officinalis"
                 /organelle="plastid:chloroplast"
                 /mol_type="genomic DNA"
                 /specimen_voucher="2160 HFFBU"
                 /db_xref="taxon:38868"
                 /country="Serbia"
                 /collection_date="May-2010"
                 /collected_by="D.Stojanovic, R.Jancic"
misc_feature    complement(<1..501)
                 /note="rpl32-trnL intergenic spacer"
gene            complement(502..>645)
                 /gene="rpl32"
CDS             complement(502..>645)
                 /gene="rpl32"
                 /codon_start=1
                 /transl_table=11
                 /product="ribosomal protein L32"
                 /protein_id="AFK49633.1"
                 /db_xref="GI:388523143"
```

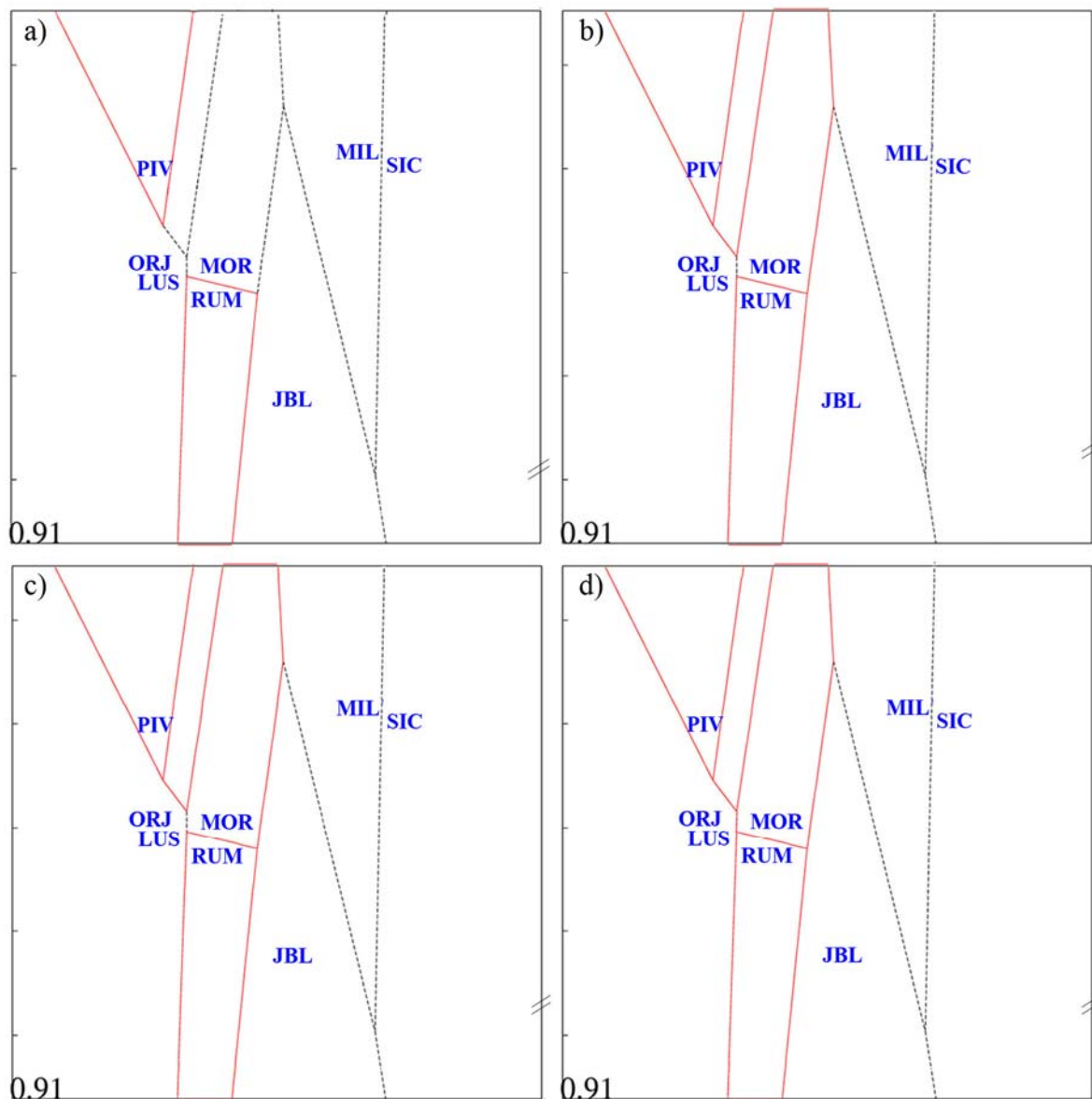
/translation="RTSASKKRIRKNFWKRKGYWAALKAFSLGKSLSTGTSKSFVVRQTNK"
ORIGIN

1 ttaccgttt ttgatttatt tgattttcat ttaaaaaagt acaacccaaa aataagtttt
61 atcaatgaac aaaaaaatat tttagatfff tccaaattca cacatattta tccagaatat
121 ttcathtaag tctttttgcg tgaattgatg gcgagagcta tatgggctct atataagaat
181 ttataaaaa tccaaaagta agcaagtat acaaaaagga aatattatag taaaaataga
241 ttgatgggaa aaagaagact cccatcctgg aaagaaaata tactaaaata taaatcgagt
301 atctgtatt ttttgftaa aaaaactttg tttaaattag gtcaaagtaa acagaagaat
361 tccattcct attgattaat tcaccaggaa atggaattgg ggaatffff tttgaaacg
421 gaagggttcc attttgaat caggtcgatt tatattgtc taaggttcc gctttattc
481 ttaataactt atttttgat tttattgtt tgtttgtcg acaaaaaaac ttttgaagt
541 cccggtagaa agagattcc ctaaagaaaa tgctttaac gccgcccaat agccttcct
601 ttccaaaaa tttttacgaa tacgctttt tgatgcagaa gtacg

Prilog 3. Pravolinijske distance između lokaliteta (km)

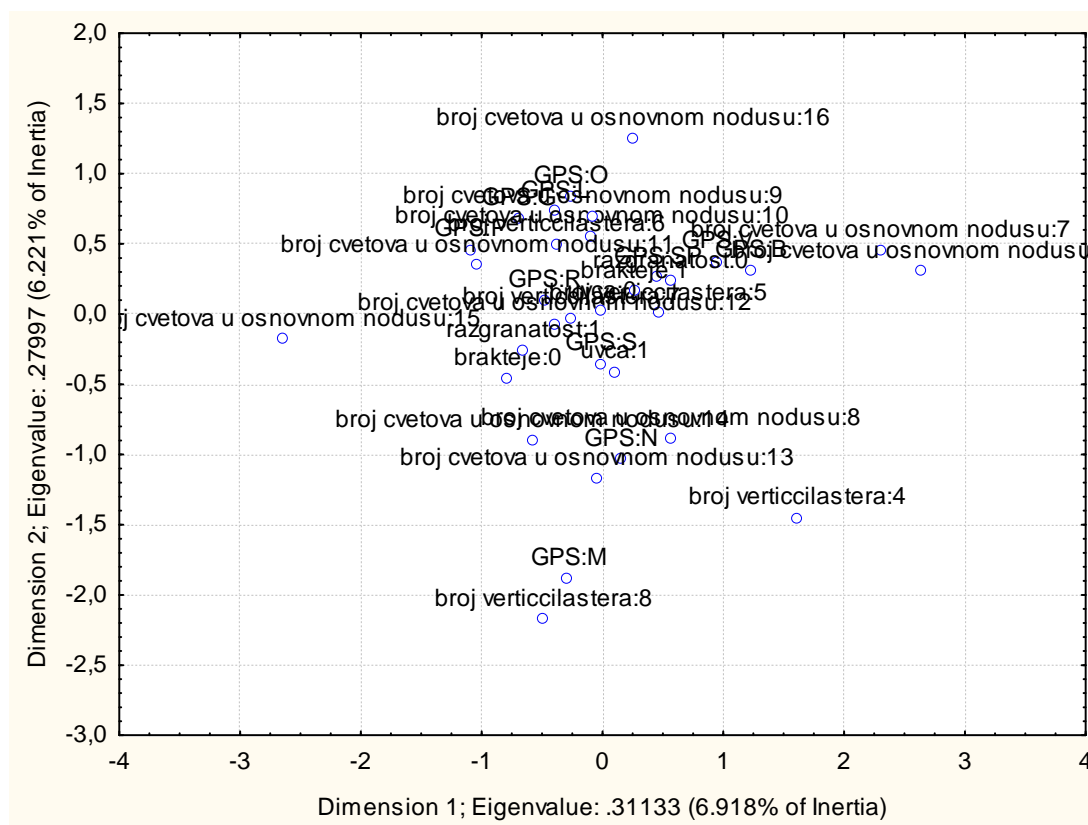
	ORJ	LUS	RUM	MOR	PIV	JBL	MIL	SIC
ORJ		14,6	89,0	73,8	77,3	215,7	293,1	308,6
LUS	14,6		75,7	69,2	87,1	203,9	292,0	306,1
RUM	89,0	75,7		55,5	130,0	128,6	254,5	264,1
MOR	73,8	69,2	55,5		79,4	166,1	224,5	237,1
PIV	77,3	87,1	130,0	79,4		246,7	246,9	265,0
JBL	215,7	203,9	128,6	166,1	246,7		252,4	249,7
MIL	293,1	292,0	254,5	224,5	246,9	252,4		24,5
SIC	308,6	306,1	264,1	237,1	265,0	249,7	24,5	

Prilog 4. Rezultati SAMOVA za $K = 2$ do $K = 5$



- a) $K = 2$ prva grupa: ORJ i RUM; druga grupa: JBL, LUS, MIL, MOR, OST i PIV
- b) $K = 3$ prva grupa: ORJ i RUM; druga grupa: LUS i MOR; treća grupa: JBL, MIL, OST i PIV
- c) $K = 4$ prva grupa: ORJ; druga grupa: RUM; treća grupa: LUS i MOR; četvrta grupa: JBL, MIL, OST i PIV
- d) $K = 5$ prva grupa: ORJ; druga grupa: RUM; treća grupa: LUS; četvrta grupa: MOR; peta grupa: JBL, MIL, OST i PIV

Prilog 5. Pozicije kvalitativnih karaktera ispitivanih populacija vrste *S. officinalis* u prostoru I korespondentne ose



Prilog 6. Doprinos varijabilnosti kvalitativnih karaktera na osnovu či kvadrat testa

	Brakteje			Razgranatost fertilnog izdanka			Prisutnost "uvca"		
	1	0	Total	1	0	Total	1	0	Total
LUS	0,401009	1,16765	1,56865	0,683538	0,596892	1,280430	0,016154	0,41353	0,42969
ORJ	0,119617	0,34830	0,46791	0,021222	0,018532	0,039755	0,010280	0,26316	0,27344
GRA	0,802195	2,33580	3,13800	0,384235	0,335529	0,719764	0,274060	7,01594	7,29000
NJE	0,080532	0,23449	0,31502	0,148347	0,129543	0,277890	0,237745	6,08626	6,32401
RUS	0,325427	0,94757	1,27299	0,592299	0,517219	1,109518	0,014685	0,37594	0,39063
RUN	0,051948	0,15126	0,20321	0,518433	0,452716	0,971149	0,027902	0,71429	0,74219
MOR	0,638224	1,85836	2,49658	0,356961	0,311712	0,668673	0,020559	0,52632	0,54688
PIV	2,652700	7,72404	10,37674	0,093912	0,082008	0,175920	0,014685	0,37594	0,39063
SIC	0,026437	0,07698	0,10342	0,093912	0,082008	0,175920	0,014685	0,37594	0,39063
PLE	0,968081	2,81882	3,78690	1,370368	1,196659	2,567028	0,006034	0,15447	0,16050
JBL	2,260219	6,58123	8,84145	0,620944	0,542233	1,163178	0,019091	0,48872	0,50781
Total	8,326391	24,24449	32,57088	4,884173	4,265052	9,149225	0,655879	16,79051	17,44638

Biografija autora

Danilo Lj. Stojanović rođen je 03. 03. 1967. godine u Sidneju, Australija. Osnovnu i srednju školu završio je u Beogradu. Nakon odsluženja vojnog roka, upisao je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu. Diplomirao je 1994. godine sa opštim uspehom 8,45 a diplomski rad “Rasprostranjenje, ekologija i ugroženost vrsta roda *Paeonia* L. u Jugoslaviji” odbranio je sa ocenom 10. Magistarsku tezu pod nazivom “Infraspecijska varijabilnost *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) u Jugoslaviji”, odbranio je 2002. godine na Biološkom fakultetu.

Od 1995. do kraja 1997. godine radio je u preduzeću Galenika kao stručni saradnik za biotehnologije. Od 1998. godine zaposlen je na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao stručni saradnik, a od 2003. kao asistent na predmetu botanika. Angažovan je u praktičnoj nastavi na predmetima *botanika* i *lekovite biljke i životna sredina*.

Učestvovao je u realizaciji dva nacionalna naučna projekta i organizaciji i realizaciji jednog međunarodnog projekta. Do sada je objavio 10 radova u međunarodnim i nacionalnim časopisima i učestvovao na međunarodnim i nacionalnim naučnim skupovima sa 15 saopštenja.

Autor je “Priručnika za vežbe iz botanike za studente farmacije” koji se od 2005. koristi u nastavi botanike na Farmaceutskom fakultetu, kao i “Ilustrovanog botaničkog rečnika za studente farmacije.” Osim izdanja namenjenih studentima Farmacije, objavio je i udžbenik “Ekonomska botanika” i “Priručnik za održivo sakupljanje lekovitog bilja Stare Planine”.

Rad na doktorskoj disertaciji započet je 2010. godine a deo rezultata svog istraživačkog i naučnog rada objavio je u jednom radu u časopisu od međunarodnog značaja i na dva saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани мр Данило Љ. Стојановић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Старост и порекло популација врсте *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) у централном делу Балканског полуострва – морфометријски и молекуларни показатељи

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 25. 04. 2014.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Старост и порекло популација врсте *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) у централном делу Балканског полуострва – морфометријски и молекуларни показатељи

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. **Ауторство – некомерцијално – без прераде**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 25. 04. 2014.



Stojanović Danilo