

Zlatko Liber

Biološki odsjek PMF-a, Sveučilište u Zagrebu

Testiranje hibridizacijske hipoteze primjenom morfoloških i molekularnih analiza: Studija slučaja hrvatskih endemičnih kadulja



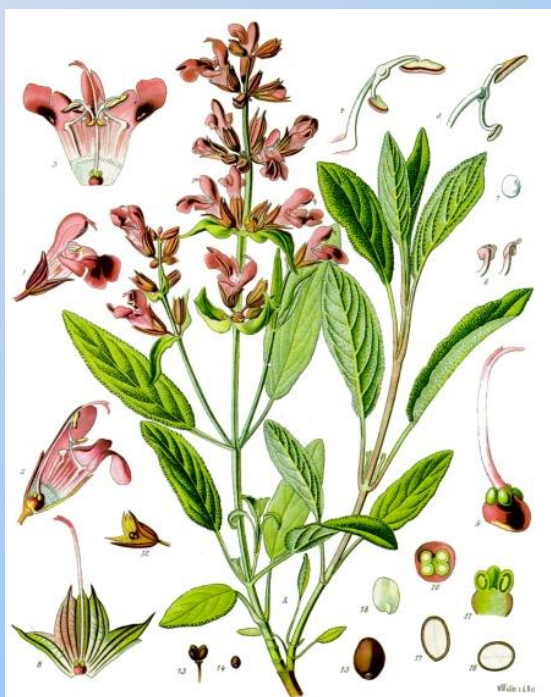
X



Projekt Hrvatske zaklade
za znanost

Epigenetička vs. genetička raznolikost prirodnih biljnih populacija:
Studija slučaja hrvatskih endemičnih kadulja

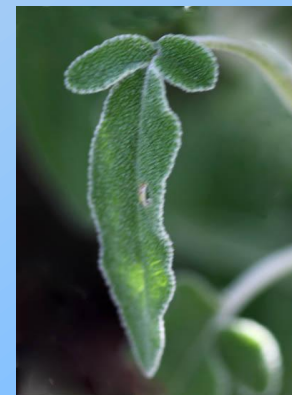
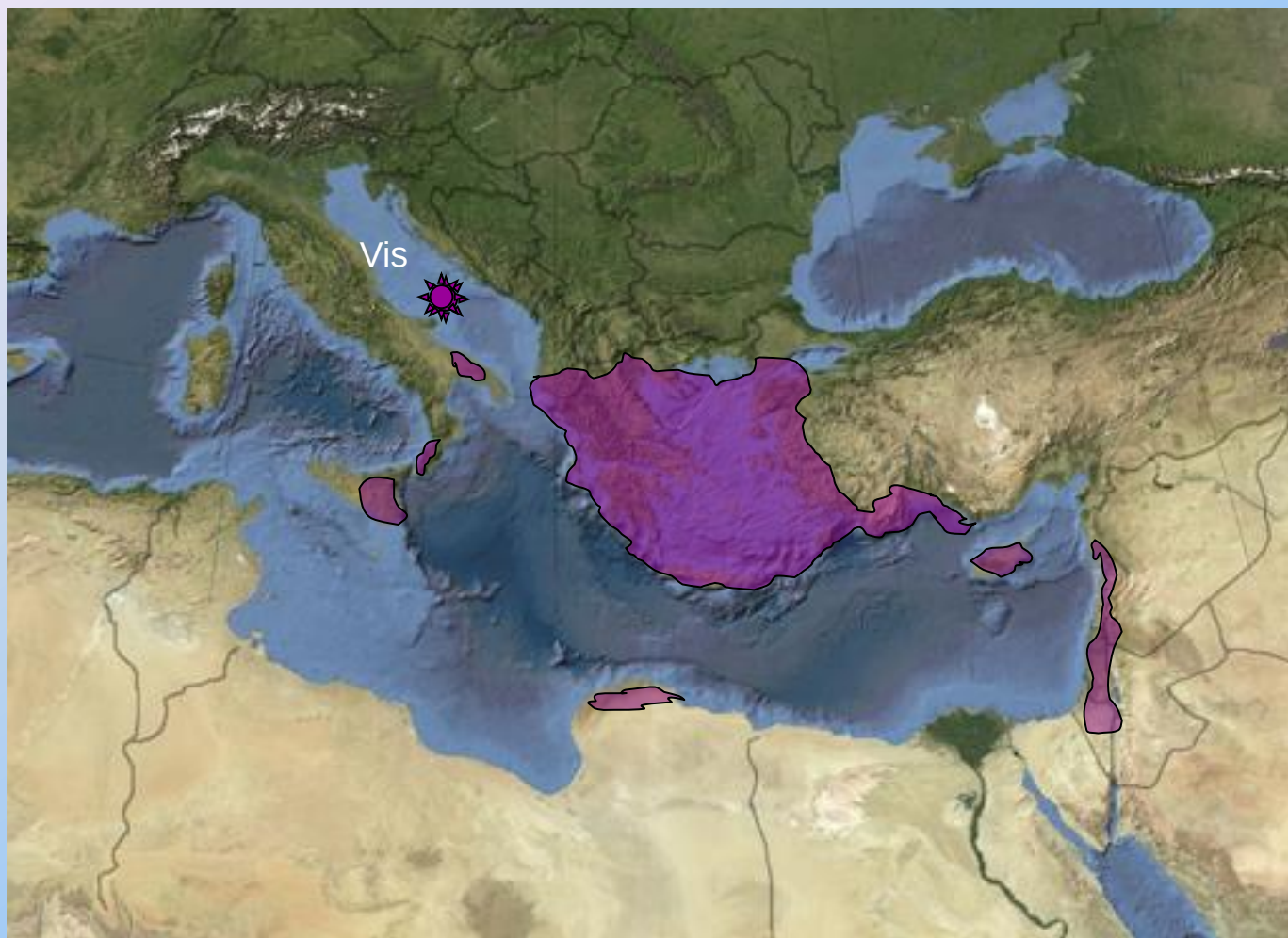
Ljekovita (dalmatinska) kadulja (*Salvia officinalis* L.)



Salvia officinalis L.
Image processed by Thomas Schoepke
www.plant-pictures.de

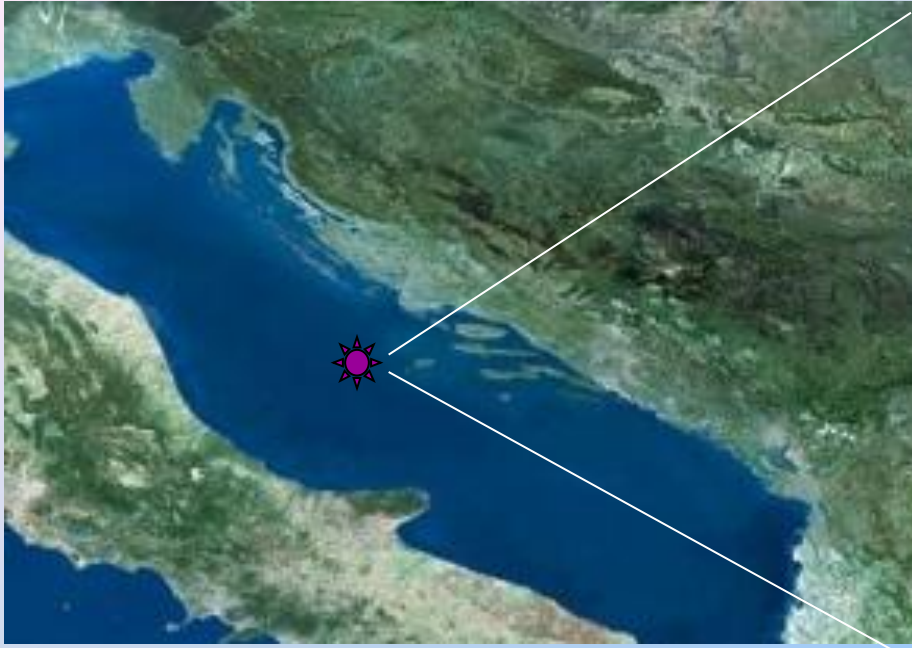


Grčka kadulja (*Salvia fruticosa* Mill.)



syn. *Salvia triloba* L.





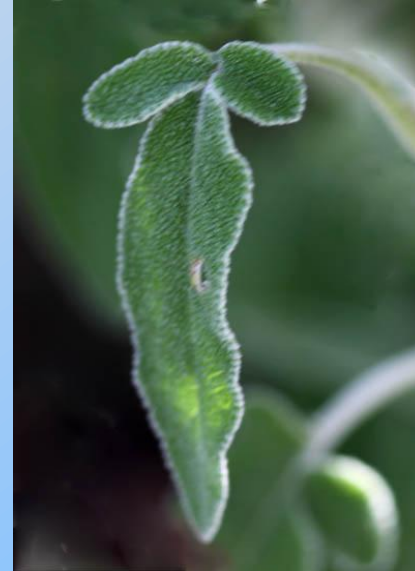
Hibridna kadulja

(*Salvia x auriculata* Mill.)

- poznato je nekoliko hibridi dobivenih oplemenjivačkim radom (Putievsky et al. 1990; Dudai et al. 1999)
- na otoku Visu veliki broj jedinki svojom vanjskom morfologijom izgleda kao fini prijelaz između dalmatinske i grčke kadulje



S. fruticosa



X



S. officinalis



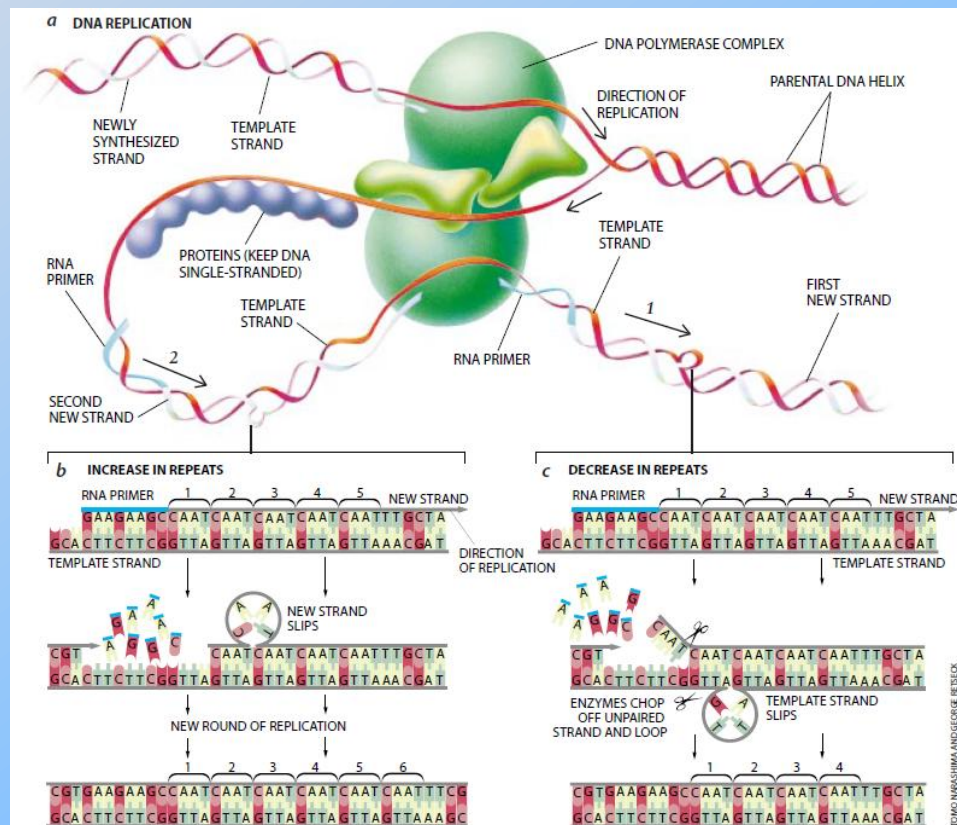
Cilj istraživanja:

- (1) pronaći pogodne molekularne i morfološke biljege koje je moguće primijeniti u dalmatinskoj i grčkoj kadulji,
- (2) primijeniti molekularne i morfološke biljege kako bi se potvrdila ili odbacila hipoteza o postojanju hibrida,
- (3) usporediti razinu morfološke i molekularne varijabilnosti između roditeljskih vrsta i hibrida,
- (4) utvrditi prirodu i razinu međuvrsnog protoka gena (eng. gene flow)
- (5) izlučiti lako uočljive morfološke osobine koje uspješno determiniraju roditeljske vrste i hibrid

Preduvjeti:

- (1) postojanje molekularnih biljega koji bi bili pogodni za istraživanje obje vrste,
- (2) postojanje pogodnih morfoloških biljega,
- (3) sakupljen biljni materijal pogodan za izolaciju DNA i morfološku analizu

MIKROSATELITI (SSR – eng. Simple Sequence Repeats)



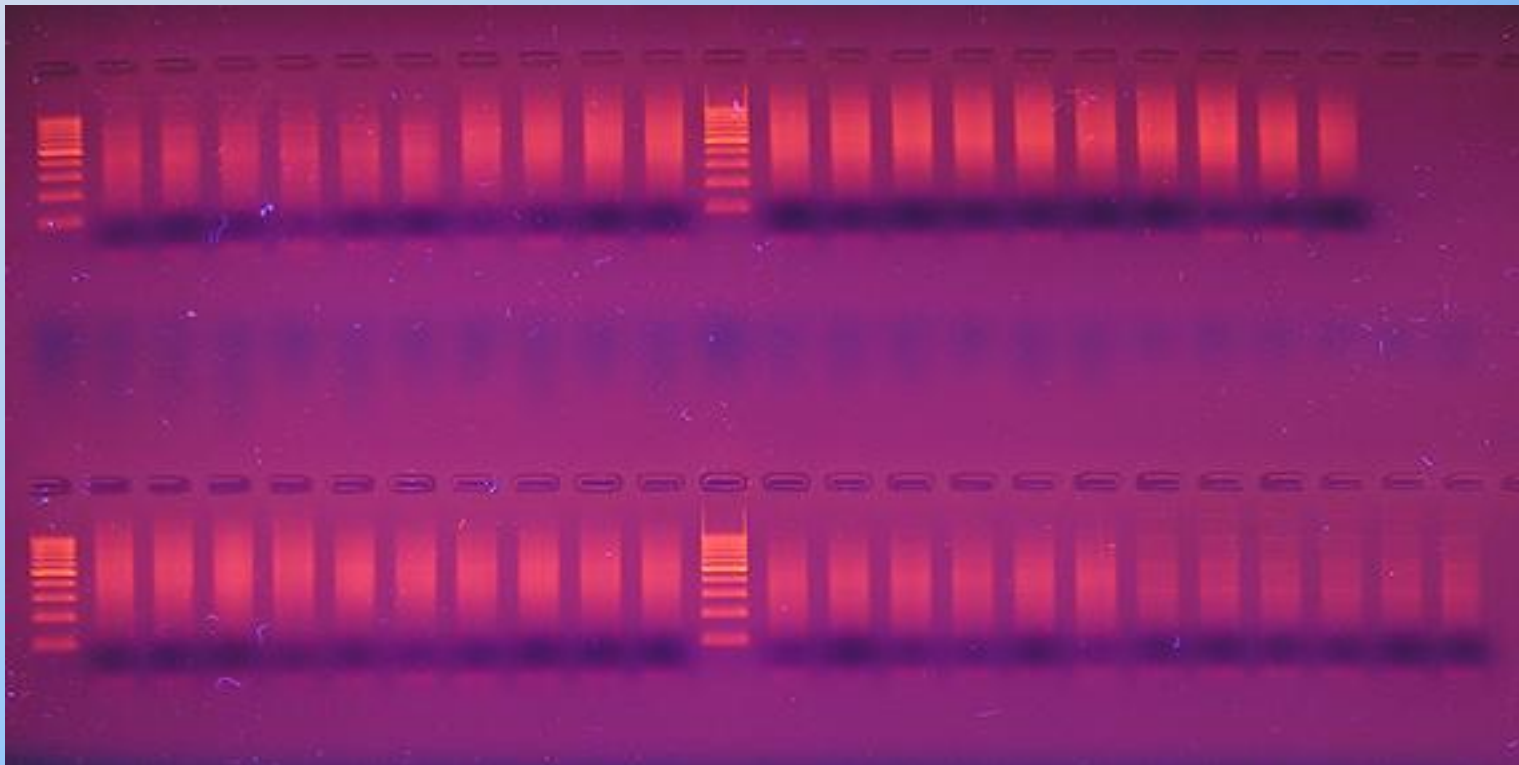
Moxon and Wills 1998

RAZVOJ NOVIH MIKROSATELITNIH BILJEGA ZA LJEKOVITU KADULJU

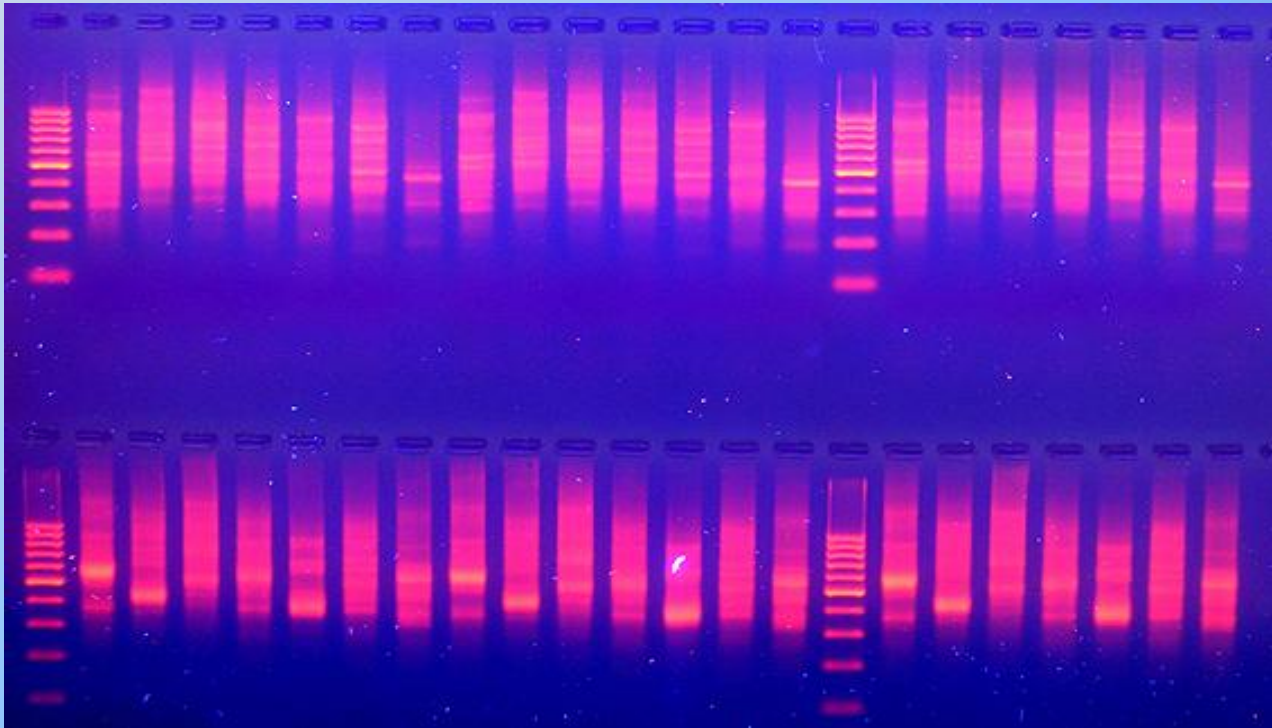
(Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium 2010; Radosavljević i sur. 2011;
Radosavljević i sur. 2012)

1. Izolacija DNA

2. Fragmentiranje genomske DNA “koktelom” restrikcijskih enzima



3. Priprema linkera i njihova ligacija na DNA fragmente dobivene restrikcijom.
Redoslijed baza je u linkeru poznat, što je kasnije važno za PCR!!
4. Hibridizacija – pomoću membrana specifičnih za svaki pojedini mikrosatelitni motiv
5. Ispiranje membrana – oslobađanje fiksiranih fragmenata i njihovo PCR umnožavanje



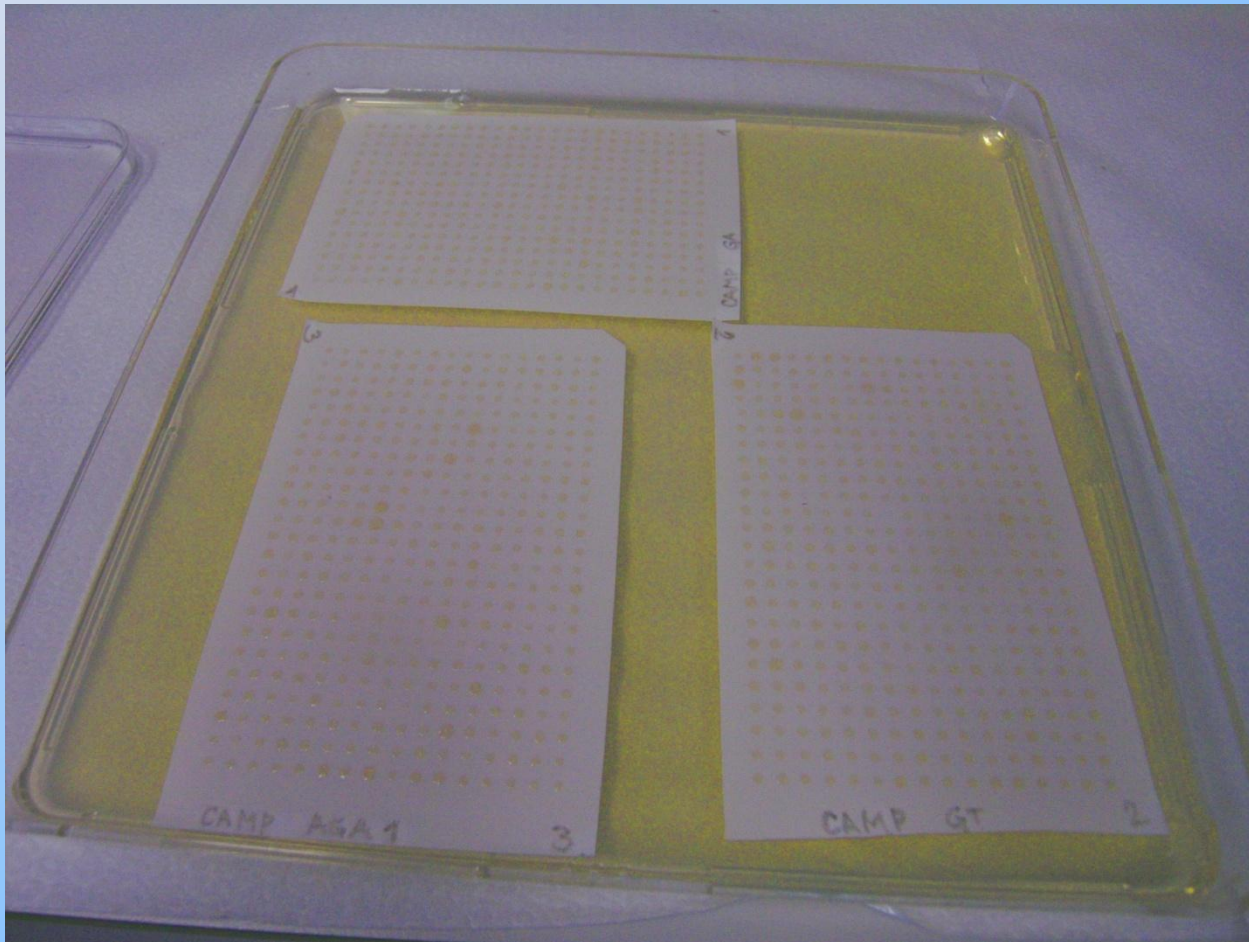
6. Ligacija u vektor i transformacija

7. Razvijanje plavo/bijelih bakterijskih kolonija (bijeke su transformirane!)



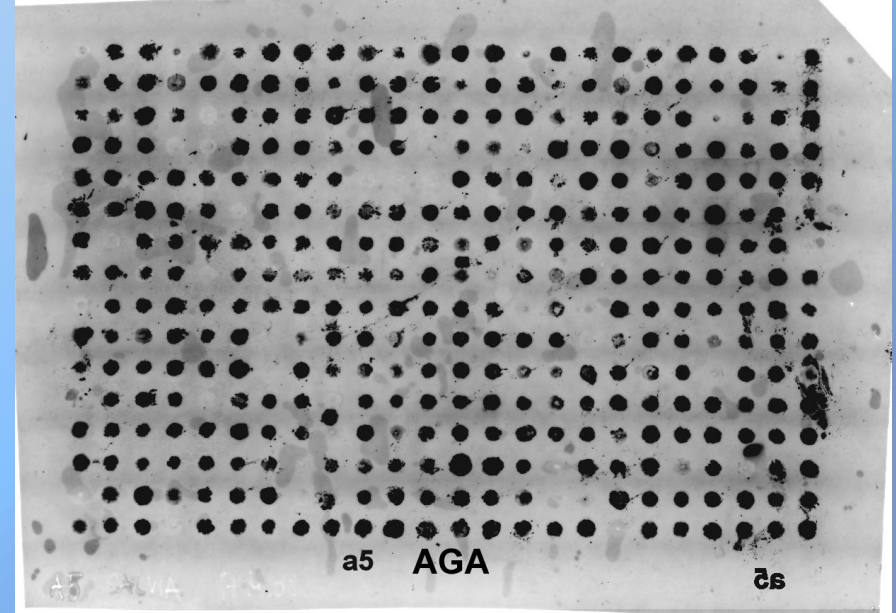
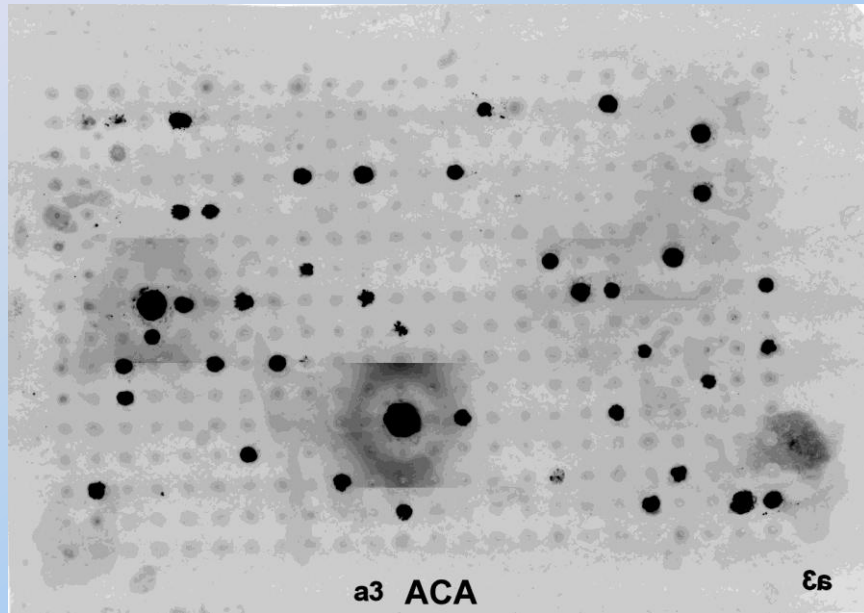
8. Izdvajanje i ponovno umnožavanje transformiranih bakterija

9. Prebacivanje kolonija na porozne najlonske membrane, inkubacija (cilj je dobiti bakterije s plazmidima s mikrosatelitnim regijima fiksirane na membranu, te postići njihov rast zahvaljujući podlozi ispod membrane)



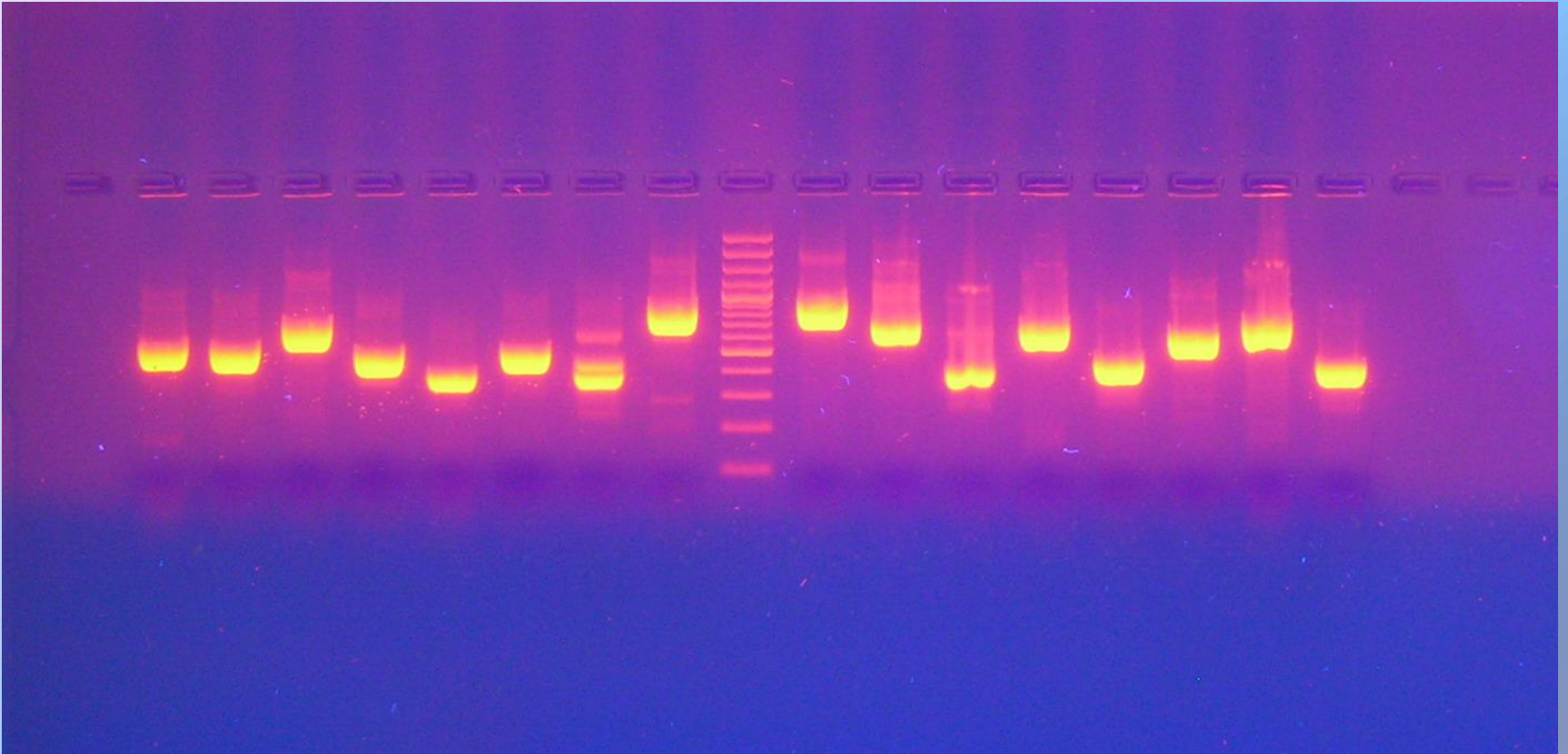
10. Hibridizacija specifičnih sondi (GA, GT...) potrebnih za vizualizaciju “pozitivnih” kolonija tj. plazmida

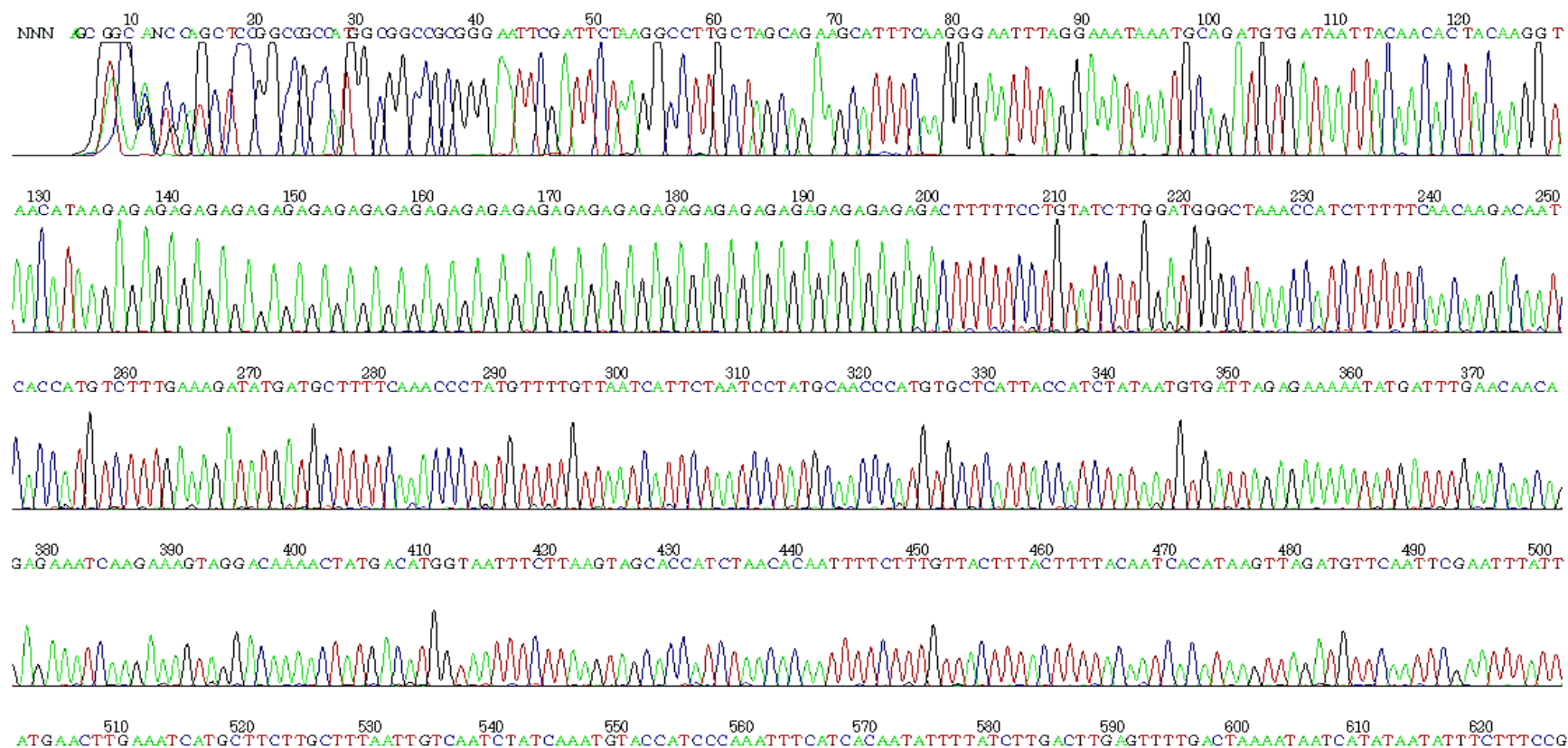
11. Skeniranje (Ettan DIGE Imager (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA).



12. Umnožavanje odabranih bakterijskih kolonija

13. Izolacija i sekvenciranje plazmida





14. Konstrukcija početnica i njihova narudžba (48 parova početnica)

CodonCode Aligner software v. 2.0.6 – analiza sekvenci

MISA – detekcija mikrosatelitnih nizova unutar sekvenci (Thiel et al. 2003)

PRIMER 3 – računalna konstrukcija početnica (Rozen, 2000)

15. Probno testiranje početnica na po 5 uzoraka

16. Odabir 20 početnica, te njihovo testiranje (utvrđivanje informativnosti) na uzorku od 25 jedinki (Tablica 1.)

GeneMapper 4.0 software – vizualizacija i analiza dobivenih podataka

Micro-Checker v. 2.2.3 – prisutnost null alela (van Oosterhout *et al.* 2004)

PowerMarker v. 3.23 – izračunavanje sljedećih parametara (Liu, Muse 2005):

Na – prosječan broj alela po lokusu

Ho – zapažena heterozigotnost (Nei, 1987)

He – očekivana heterozigotnost (= genska raznolikost; Nei, 1987)

PIC – informacijski sadržaj polimorfizma (Botstein *et al.*, 1980)

GENEPOP v. 3.4 – utvrđivanje odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže (Raymond 1995.)

Tablica 1. Testiranje 20 parova početnica na 25 jedinki ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.)

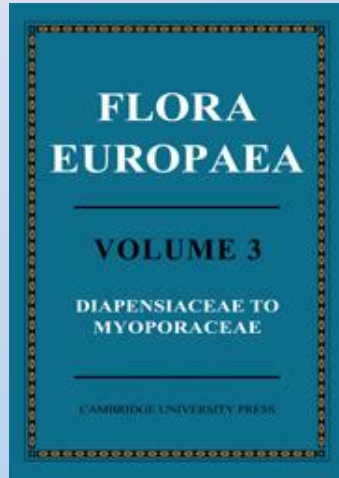
Locus	GenBank	Repeat motif	T _a (°C)	Size range (bp)	N _a	H _O	H _E	PIC
SoUZ001	GQ376512	(AG) ₁₅	55	159-195	15	0.833	0.905	0.897
SoUZ002	GQ376513	(TG) ₁₁	55	199-222	11	0.600	0.772	0.744
SoUZ003	GQ376514	(GT) ₁₃	55	193-210	9	0.640	0.666	0.641
SoUZ004	GQ376515	(CA) ₁₉	55	195-227	12	0.625	0.824	0.804
SoUZ005	GQ376516	(AC) ₂₀	55	131-160	9	0.300	0.808 ^{***}	0.787
SoUZ006	GQ376517	(CT) ₃₁	55	204-244	14	0.833	0.882	0.872
SoUZ007	GQ376518	(GT) ₁₁	55	214-227	8	0.583	0.722	0.691
SoUZ008	GQ376519	(TC) ₁₅	55	190-210	10	0.708	0.800	0.773
SoUZ009	GQ376520	(TG) ₁₅	55	209-250	9	0.609	0.738 [*]	0.699
SoUZ010	GQ376521	(GA) ₂₂	55	137-222	26	0.800	0.934 [*]	0.931
SoUZ011	GQ376522	(GA) ₂₅	55	175-227	19	0.760	0.930	0.926
SoUZ012	GQ376523	(CTT) ₂₆	55	179-281	25	0.880	0.921	0.916
SoUZ013	GQ376524	(AAC) ₈	55	202-229	8	0.739	0.740	0.702
SoUZ014	GQ376525	(AGA) ₁₀	55	201-237	12	0.870	0.878	0.866
SoUZ015	GQ376526	(GTT) ₁₂	55	136-188	14	0.720	0.853	0.839
SoUZ016	GQ376527	(TTC) ₂₀	55	128-191	21	0.880	0.927	0.923
SoUZ017	HQ401010	(CAA) ₁₃	55	198-231	7	0.375	0.624	0.585
SoUZ018	HQ401011	(GAA) ₂₀	55	170-260	21	0.417	0.931 ^{***}	0.927
SoUZ019	HQ401012	(AGA) ₁₆	55	153-183	9	0.667	0.701	0.675
SoUZ020	HQ401013	(GAA) ₁₆	55	198-246	10	0.500	0.769	0.736

Testovi unakrsnog PCR umnožavanja na srodnim vrstama

SSR lokus	<i>S.brachyodon</i>	<i>S. fruticosa</i>	<i>S. pratensis</i>	<i>S. sclarea</i>	<i>S. verticilata</i>	<i>R. officinalis</i>
SoUZ001	+	-	-	-	-	-
SoUZ002	+	-	-	-	-	+
SoUZ003	-	+	-	+	-	-
SoUZ004	+	-	-	-	-	-
SoUZ005	+	+	+	-	-	-
SoUZ006	+	+	+	+	-	-
SoUZ007	+	+	-	-	-	+
SoUZ008	+	-	+	-	+	+
SoUZ009	+	+	+	+	+	+
SoUZ010	-	-	-	-	-	-
SoUZ011	+	-	-	-	-	-
SoUZ012	-	-	-	-	-	-
SoUZ013	+	+	-	-	-	-
SoUZ014	+	+	+	+	+	-
SoUZ015	-	-	-	-	-	-
SoUZ016	-	+	-	-	-	-
SoUZ017	-	-	-	-	-	-
SoUZ018	-	-	-	-	-	-
SoUZ019	-	-	-	-	-	-
SoUZ020	+	+	-	-	+	-

Preduvjeti:

- (1) postojanje molekularnih biljega pogodnih za istraživanje obje vrste,
- (2) izbor pogodnih morfoloških biljega,
- (3) posjedovanje bilnog materijala pogodnog za izolaciju DNA i morfološku analizu



Botanical Journal of the Linnean Society, 2004, 145, 353–371. With 16 figures

Numerical taxonomy study of *Salvia* sect. *Salvia* (Labiatae)

ANTONIO REALES¹, DIEGO RIVERA FLS^{1*}, JOSÉ ANTONIO PALAZÓN²
and CONCEPCIÓN OBÓN FLS^{2*}

¹Department of Plant Biology, and

²Department of Ecology and Hydrology, University of Murcia, E-30100 Espinardo, Murcia, Spain

³Department of Applied Botany, University Miguel Hernandez, E-03312 Orihuela, Alicante, Spain

Received June 2003; accepted for publication February 2004

Multivariate analysis was carried out in order to elucidate the taxonomic relationships between *Salvia officinalis* L., the type species of the genus, and *S. fruticosa* Mill., both taxa included in section *Salvia* (Labiatae). Seventy-five different herbarium specimens from all over the Mediterranean Region, belonging to these two taxa, were analysed. Twenty-four specimens belonging to *S. lavandulifolia* Vahl, s.l., were used as outgroups. Twenty-six morphological characters were measured and a data matrix was constructed prior to multivariate analysis by means of R software. Multiple correspondence analysis was used to obtain a single dendrogram, applying Ward's minimum variance algorithm. This tree was used as a basis to propose a key for the determination of the species and subspecies studied. *S. lavandulifolia* is separated in two groups, one belonging to *S. officinalis* and another one representing what was called *S. blancoana*. *Salvia officinalis* L. ssp. *gallica* (W. Lippert) Reales, D. Rivera & Obón and *S. officinalis* L. ssp. *oxyodon* (Webb & Heldr.) Reales, D. Rivera & Obón are discussed as new combinations. In addition, a hybrid between *S. officinalis* and *S. fruticosa* is identified and its importance in gardening and cultivation is discussed. © 2004 The Linnean Society of London, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2004, 145, 353–371.

ADDITIONAL KEYWORDS: horticulture – hybrids – Mediterranean – morphometry – sage – systematics – trichomes.

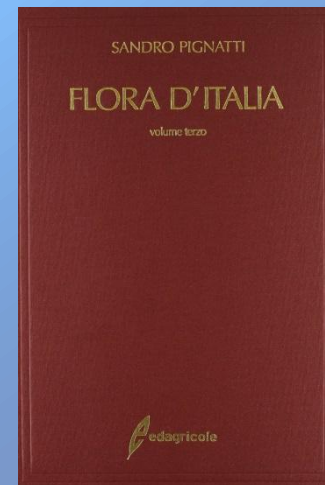
Acta Botánica Malacitana, 11: 227-272

Málaga, 1986

REVISION DEL GENERO *SALVIA* L. (*LAMIACEAE*) EN EL MEDITERRANEO OCCIDENTAL: LA SECCION *SALVIA*

J.L. ROSUA & G. BLANCA

RESUMEN: Se efectúa la revisión de la sect. *Salvia* en el Mediterráneo Occidental. Se delimitan los distintos táxones de la misma y se discute el valor de los caracteres morfológicos, en la separación de éstos. Se reconocen 3 especies, 10 subespecies y 4 variedades. Para cada taxon se indica el nombre correcto, sinónimos, descripción, tipo, número cromosómico, distribución, ecología, fitosociología y localidades estudiadas. Se proponen las siguientes nuevas combinaciones: *S. lavandulifolia* subsp. *mesatlantica* (Maire) Rosúa & Blanca, *S. lavandulifolia* subsp. *aethystea* (Enberger & Maire in Maire) Rosúa & Blanca, *S. lavandulifolia* subsp. *maurorum* (Ball) Rosúa & Blanca, *S. lavandulifolia* subsp. *blancoana* (Webb & Heldr.) Rosúa & Blanca, *S. lavandulifolia* subsp. *blancoana* var. *aurasiaca* (Maire) Rosúa & Blanca, *S. lavandulifolia* subsp. *vellerea* (Cuatr.) Rivas Goday & Rivas Martínez var. *lagascana* (Webb) Rosúa & Blanca.

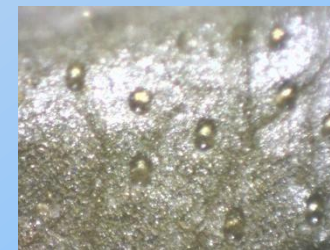


23 kvalitativna (binarna) morfološka svojstva mjerena kod *S. officinalis*, *S. fruticosa* i njihovih hibrida

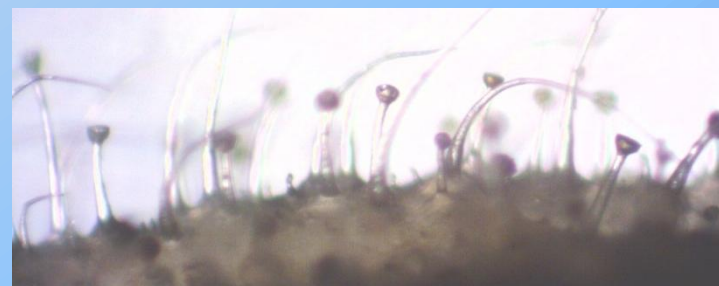
Br.	Organ	Svojstvo	Skr.
1	Cvat	Postojanje brakteje u prvom donjem pršljenu	BLV
2	Cvat	Postojanje brakteje u drugom i gornjim pršljenima	BUV
3	Cvat	Postojanje listova u zoni cvata	LI
4	Os cvata	Tip dlaka: 1 Nežljezdaste 1.1 Stršeće	IEP
5	Os cvata	Tip dlaka: 1 Nežljezdaste 1.2 Gotovo prilegle	IEA
6	Os cvata	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.1 Kratke žljezdaste	IGS
7	Os cvata	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.2 Dugačke glavičaste	IGL
8	Os cvata	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.3 Sjedeće	IGSS
9	Os cvata	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.4 Žljezdaste na stalku	IGST
10	Ogranci cvata	Postojanje sekundarnih ogranaka	OSB
11	Cvjetna brakteja	Tip dlaka: 1 Nežljezdaste 1.1 Stršeće	BEP
12	Cvjetna brakteja	Tip dlaka: 1 Nežljezdaste 1.2 Gotovo prilegle	BEA
13	Cvjetna brakteja	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.1 Kratke žljezdaste	BGS
14	Cvjetna brakteja	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.2 Dugačke glavičaste	BGL
15	Cvjetna brakteja	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.3 Sjedeće	BGSS
16	Cvjetna brakteja	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.4 Žljezdaste na stalku	BGST
17	Cvjetna stapka	Tip dlaka: 1 Nežljezdaste 1.1 Stršeće	FEP
18	Cvjetna stapka	Tip dlaka: 1 Nežljezdaste 1.2 Gotovo prilegle	FEA
19	Cvjetna stapka	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.1 Kratke žljezdaste	FGS
20	Cvjetna stapka	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.2 Dugačke glavičaste	FGL
21	Cvjetna stapka	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.3 Sjedeće	FGSS
22	Cvjetna stapka	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.4 Žljezdaste na stalku	FGST
23	Čaška	Nastavci čaške	CAP



Žljezdaste na stalku (IGST)



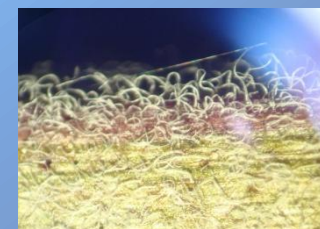
Sjedeće FGSS)



Kratke žljezdaste i dugačke glavičaste dlake (BGS i IGL)



Stršeće (FEP)



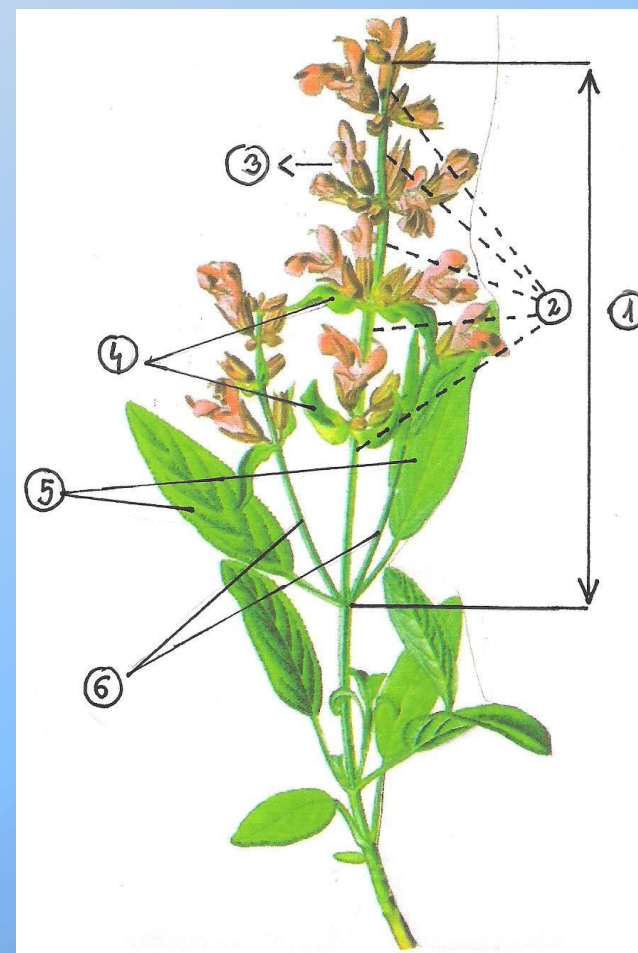
Gotovo prilegle dlake (BEA)



Čaška s nastavcima. Čaška bez nastavaka

19 kvantitativnih morfoloških svojstava mjerenih kod *S. officinalis*, *S. fruticosa* i njihovih hibrida

Br.	Organ	Svojstvo	Skr.
1	Cvat	Duljina cvata (duljina najvišeg izbojka)	IL
2	Cvat	Broj internodija na najvišem izbojku	NII
3	Cvat	Broj cvjetova u najbolje razvijenom pršljenu	NFV
4	Ogranci cvata	Broj primarnih ogranaka	NPB
5	Cvjetna brakteja	Duljina brakteje	BL
6	Cvjetna brakteja	Širina brakteje	BW
7	Čaška	Tip dlaka: 1 Nežljezdaste 1.1 Stršeće	CEP
8	Čaška	Tip dlaka: 1 Nežljezdaste 1.2 Gotovo prilegle	CEA
9	Čaška	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.1 Kratke žljezdaste	CGS
10	Čaška	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.2 Dugačke glavičaste	CGL
11	Čaška	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.3 Sjedeće	CGSS
12	Čaška	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.4 Žljezdaste na stalku	CGST
13	Čaška	Tip čaške: radijalna simetrija	CA
14	Čaška	Tip čaške: gotovo radijalna s.	CAA
15	Čaška	Tip čaške: dvousnata	CZ
16	Čaška	Duljina čaške	CL
17	Čaška	Duljina režnjeva čaške (min)	CLMI
18	Čaška	Duljina režnjeva čaške (max)	CLMX
19	Čaška	Nervatura čaške: mrežasta	CNR



Aktinomorfna čaška (CA)



Duljina čaške (CL) i duljina režnjeva čaške (CLMI i CLMX)

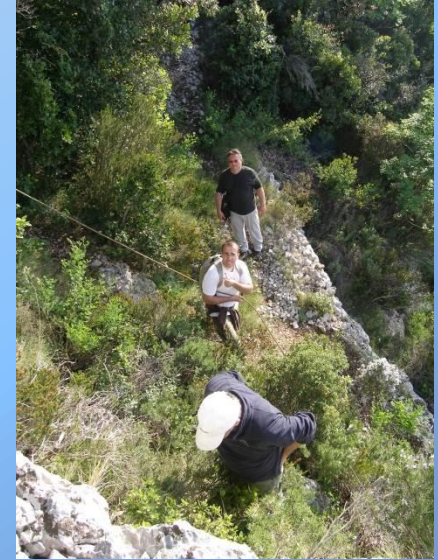


Dvousnata čaška (CZ)

1 - duljina cvata (IL), 2 - broj internodija na najvišem izbojku (NII), 3 - broj cvjetova u najbolje razvijenom pršljenu (NFV), 4 - postojanje brakteje u prvom donjem pršljenu (BLV ili BUV), drugom i gornjim pršljenima, 5 - postojanje listova u zoni cvata (LI), 6 – postojanje i broj ogranaka (primarnih ili sekundarnih) na cvatu (NPB ili OSB).

Preduvjeti:

- (1) postojanje molekularnih biljega pogodnih za istraživanje obje vrste,
- (2) izbor pogodnih morfoloških biljega,
- (3) posjedovanje bilnog materijala pogodnog za izolaciju DNA i morfološku analizu



MATERIJAL I METODE

SSR analiza

Biljni materijal: 72 jedinke u obliku silika gel osušenog lisnog tkiva.

DNA izolacija: ukupna genomska DNA je izolirana iz silika-gel osušenog lisnog tkiva uz pomoć GenElute Plant Genomic DNA Miniprep kompleta, Sigma-Aldrich®

PCR program: sedam mikrosatelitnih lokusa je umnoženo na sljedeći način: 94°C 5 min; 5 ciklusa od 45 s na 94 °C, 30 s na 60 °C, uz snižavanje temperature u svakom od preostala 4 ciklusa za 1 °C, i 90 s na 72 °C; 25 ciklusa od 45 s na 94 °C, 30 s na 55 °C, i 90 s na 72 °C; i 8 min korak produljivanja na 72 °C

Deskriptivna statistika: ukupan broj alela (N_a), Informacijski sadržaj polimorfizma (PIC), zapažena heterozigotnost (H_o), očekivana heterozigotnost ili genska raznolikost (H_E), inbreeding coefficient, F_{IS} , broj jedinstvenih alela (*private alleles*; N_{pr}), alelno bogatstvo (N_{ar}) određeni su uz pomoć računalnih programa GENEPOP, MICROSAT, FSTAT (Raymond and Rousset 1995; Minch i sur 1997; Goudet J. 2002.)

Genetska udaljenost i Neighbor-Net dijagram: uz pomoć računalnog programa MICROSAT izračunata je udaljenost na temelju udjela zajedničkih alela (proportion-of-shared-alleles distances (D_{psa}), a uz pomoć SplitsTree programa (Huson and Bryant 2006) izrađen je dijagram koji prikazuje retikulatne evolucijske događaje

AMOVA: kako bi se utvrdila raspodjela ukupne genetske varijance unutar i između vrsta (skupina) načinjena je analiza molekularne varijance uz pomoć računalnog programa Arlequin; Excoffier 2005)

Genetička struktura populacije i najvjerodostojniji broj izvornih genskih skupova određen je Bayesovom klasterirajućom metodom temeljenom na modelu uz pomoć računalnog programa STRUCTURE; Pritchard i sur 2000)

Određivanje hibridnih kategorija: Šest klasa (dvije roditeljske / *S. officinalis* i *S. fruticosa*/ i četiri hibridne /F₁, F₂, povratni križanci sa jednom, odnosno drugom roditeljskom vrstom) određeni su Bayesovskom pristupom u računalnom programom NewHybrids (Anderson and Thompson 2002)

Morfološka analiza

Biljni materijal 72 jedinke u obliku herbarijskih primjeraka

Gower-ova udaljenost (Gower 1971) je upotrebljena za dobivanje zajedničke matrice udaljenosti svih jedinki na temelju svih kvalitativnih (23) i kvantitativnih (19) morfoloških osobina upotrebom računalnog programa PAST (Hammer i sur. 2001) Gowerove udaljenosti su uspoređene izračunom korelacijskog koeficijenta i provedbom Mantelovog testa računalnim programom NTSYS-pc (Rohlf 2005)

Neighbor-Net dijagram: Iz Gower-ove matrice udaljenosti uz pomoć računalnih programa SplitsTree (Huson and Bryant 2006) dobiven je dijagram koji prikazuje retikulatne evolucijske događaje

Shannonov informacijski indeks je kao mjerilo raznolikosti za kvalitativne podatke izračunat za svako kvalitativno svojstvo, a usporedba Shannonovih informacijskih indeksa između vrsta je provedena analizom varijance za ponovljenja mjerenja pomoću naredbe PROC GLM u programu SAS (SAS/STAT ver. 9.1 2004.). Signifikantne razlike između prosječnih vrijednosti Shannonovih indeksa su utvrđene pomoću Bonferronijevog testa

Korespondentna analiza kategoričkih podataka je provedena u svrhu analize međusobne povezanosti 23 kvalitativne morfološke osobine pomoću naredne PROC CORRESP u računalnom programu SAS)

Jednosmjerna analiza varijance je provedena u svrhu utvrđivanja signifikantnih razlika između vrsta u vrijednostima 19 kvantitativnih morfoloških svojstava uz pomoć naredbe PROC GLM u programu SAS. Razlike između prosječnih vrijednosti kvantitativnih svojstava između vrsta utvrđene su pomoću Tukeyjevog testa ($P < 0.05$)

Korelacije između 19 kvantitativnih morfoloških svojstava izračunate su na temelju Pearsonovog korelacijskog koeficijenta koristeći naredbu PROC CORR u programu SAS

Analiza glavnih sastavnica (PCA) je provedena na temelju 19 kvantitativnih osobina pomoću naredbe PROC PRINCOMP u programu SAS

Diskriminantna analiza (provedena je svrhu procjene važnosti 19 kvantitativnih svojstava u razlikovanju vrsta pomoću naredbe PROC STEPDISC, PROC DISCRIM i PROC CANDISC u programu SAS).

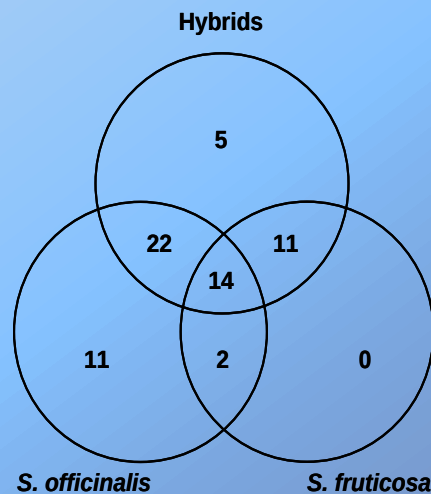
Postupna diskriminantna analiza provedena je svrhu utvrđivanja podskupa od 19 kvantitativnih morfoloških svojstava koji maksimalizira multivarijatnu udaljenost između vrsta /PROC STEPDISC/. Odabrani podskup morfoloških svojstava je korišten u diskriminantnoj analizi /PROC DISCRIM/ u svrhu pridruživanja pojedinačnih jedinki određenoj vrsti i procjene točnosti klasifikacije postupkom unakrsne provjere valjanosti (*cross-validation*).

Kanonička diskriminantna analiza je provedena na temelju podskupa svojstava /PROC CANDISC/. Izračunata je kvadratna Mahalanobisova udaljenost (D^2), a analizirane jedinice i svojstava su prikazane u koordinatnom sustavu određenom prvim dvjema kanoničkim varijablama)

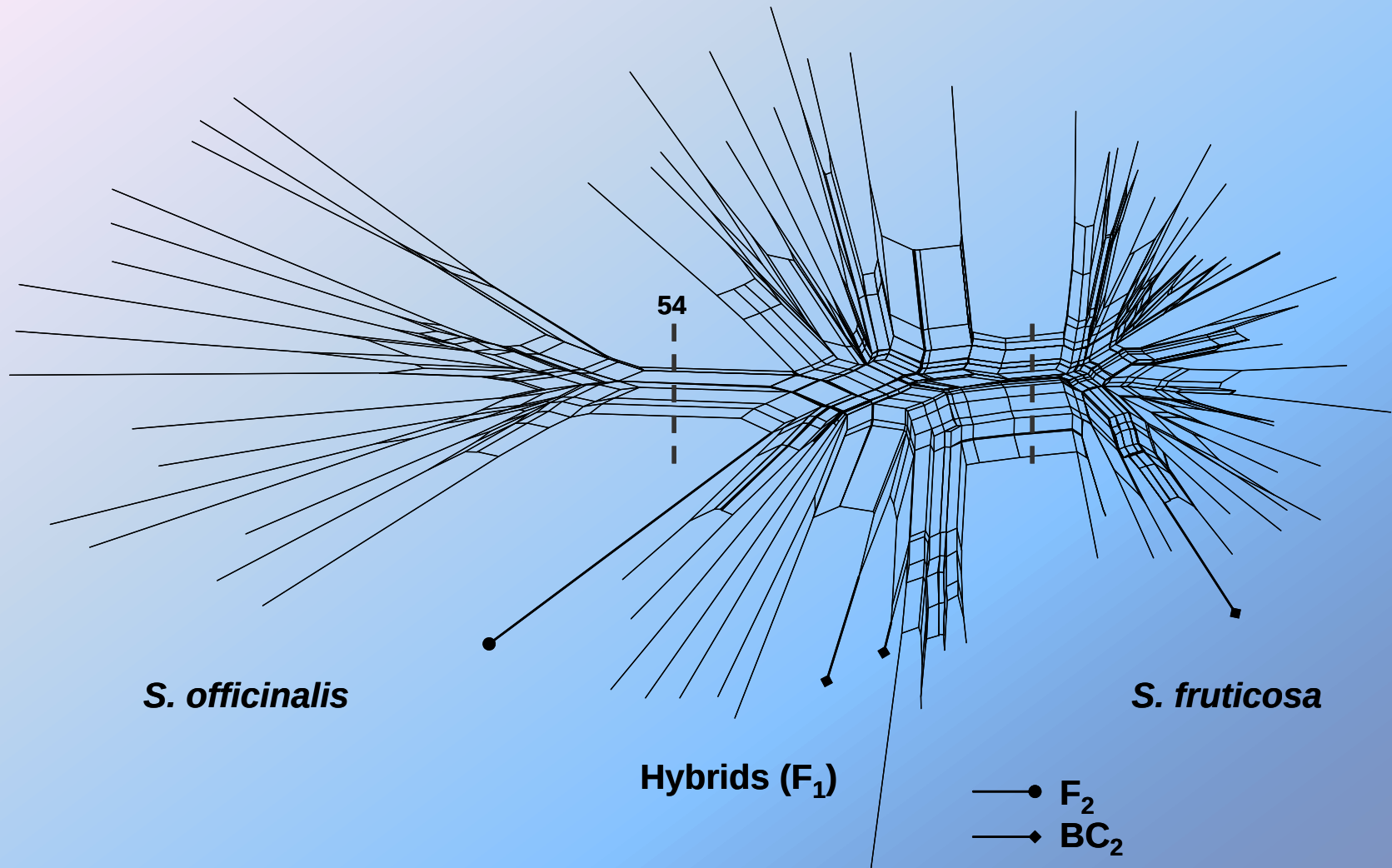
REZULTATI

Raznolikost alela sedam mikrosatelitnih lokusa u 79 jedinki dalmatinske kadulje, grčke kadulje i potencijalnih hibrida s otoka Visa. *Na* - number of alleles; PIC - Polymorphic Information Content

No.	Marker	Repeat Motif	Range	N_a	PIC
1	SoUZ003	(GT) ₁₃	190-212	9	0.739
2	SoUZ006	(CT) ₃₁	209-238	14	0.829
3	SoUZ007	(GT) ₁₁	204-229	7	0.571
4	SoUZ009	(TG) ₁₅	212-229	5	0.314
5	SoUZ013	(AAC) ₈	178-229	10	0.746
6	SoUZ014	(AGA) ₁₀	194-248	14	0.573
7	SoUZ020	(GAA) ₁₆	201-225	6	0.454
Total				65	
Average				9.29	0.604

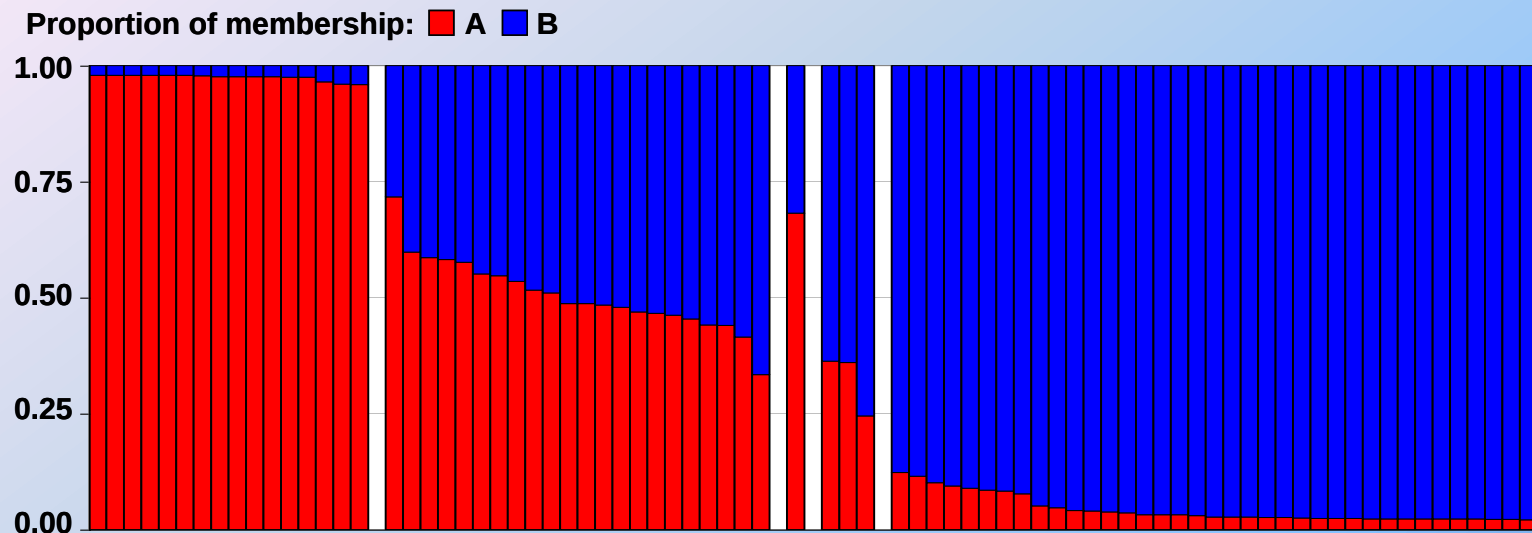


Venn-ov diagram podjele mikrosatelitnih alela između 2 vrste roda *Salvia* i potencijalnog hibrida

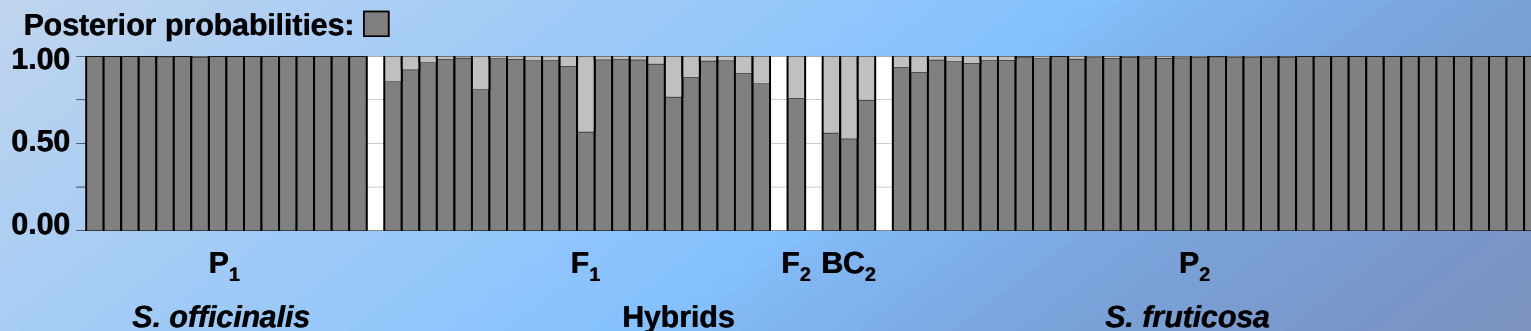


Neighbor-net dijagram temeljen na udjelu zajedničkih alela

Bootstrap podržanost je dobivena iz Neighbor Joining analize. Pripadnost jedinki u pojedine klase (roditeljska *S. officinalis* i *S. fruticosa*, F₁, F₂, i povratni hibridi BC₂) je određena uz pomoć računalnog programa NewHybrids.



Postotak pripadnosti svake jedinice nekom od dva izvorna genska skupa kako je odredio (računalni program STRUCTURE)



Grupiranje jedinice u genske skupove temeljem maksimalnoj posteriorne vjerojatnosti pripadnosti svake pojedine jedinice nekoj od 6 klasa (računalni program NewHybrids)

Udio biljaka koje imaju određeno svojstvo (p) i Shannonov koeficijent raznolikosti (H_j) 23 kvalitativna (binarna) morfološka svojstva kod *S. officinalis*, *S. fruticosa* i njihovih hibrida

Br.	Organ	Svojstvo	Skr.	S. officinalis		Hibridi		S. fruticosa		Ukupno	
				p	H_j	p	H_j	p	H_j	p	H_j
1	Cvat	Postojanje brakteje u prvom donjem pršljenu	BLV	0.867	0.567	0.773	0.773	0.750	0.811	0.781	0.759
2	Cvat	Postojanje brakteje u drugom i gornjim pršljenima	BUV	0.533	0.997	0.636	0.946	0.778	0.764	0.685	0.899
3	Cvat	Postojanje listova u zoni cvata	LI	0.067	0.353	0.636	0.946	0.778	0.764	0.589	0.977
4	Os cvata	Tip dlaka: 1 Nežljezdaste 1.1 Stršeće	IEP	0.067	0.353	0.364	0.946	0.556	0.991	0.397	0.969
5	Os cvata	Tip dlaka: 1 Nežljezdaste 1.2 Gotovo prilegle	IEA	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000
6	Os cvata	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.1 Kratke žljezdaste	IGS	0.000	0.000	0.000	0.000	0.750	0.811	0.370	0.951
7	Os cvata	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.2 Dugačke glavičaste	IGL	0.000	0.000	0.000	0.000	0.389	0.964	0.192	0.705
8	Os cvata	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.3 Sjedeće	IGSS	1.000	0.000	1.000	0.000	0.972	0.183	0.986	0.104
9	Os cvata	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.4 Žljezdaste na stalku	IGST	0.000	0.000	0.000	0.000	0.194	0.711	0.096	0.456
10	Ogranci cvata	Postojanje sekundarnih ogranaka	OSB	0.467	0.997	0.682	0.902	0.833	0.650	0.712	0.866
11	Cvjetna brakteja	Tip dlaka: 1 Nežljezdaste 1.1 Stršeće	BEP	0.067	0.353	0.591	0.976	0.972	0.183	0.671	0.914
12	Cvjetna brakteja	Tip dlaka: 1 Nežljezdaste 1.2 Gotovo prilegle	BEA	1.000	0.000	0.955	0.267	0.667	0.918	0.822	0.676
13	Cvjetna brakteja	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.1 Kratke žljezdaste	BGS	0.000	0.000	0.091	0.439	0.667	0.918	0.356	0.939
14	Cvjetna brakteja	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.2 Dugačke glavičaste	BGL	0.000	0.000	0.045	0.267	0.417	0.980	0.219	0.759
15	Cvjetna brakteja	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.3 Sjedeće	BGSS	1.000	0.000	0.955	0.267	0.972	0.183	0.973	0.181
16	Cvjetna brakteja	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.4 Žljezdaste na stalku	BGST	0.000	0.000	0.045	0.267	0.111	0.503	0.068	0.360
17	Cvjetna stapka	Tip dlaka: 1 Nežljezdaste 1.1 Stršeće	FEP	0.000	0.000	0.455	0.994	0.806	0.711	0.534	0.997
18	Cvjetna stapka	Tip dlaka: 1 Nežljezdaste 1.2 Gotovo prilegle	FEA	1.000	0.000	0.636	0.946	0.333	0.918	0.562	0.989
19	Cvjetna stapka	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.1 Kratke žljezdaste	FGS	0.000	0.000	0.000	0.000	0.111	0.503	0.055	0.306
20	Cvjetna stapka	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.2 Dugačke glavičaste	FGL	0.000	0.000	0.000	0.000	0.167	0.650	0.082	0.410
21	Cvjetna stapka	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.3 Sjedeće	FGSS	1.000	0.000	1.000	0.000	0.694	0.888	0.849	0.612
22	Cvjetna stapka	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.4 Žljezdaste na stalku	FGST	0.000	0.000	0.000	0.000	0.389	0.964	0.192	0.705
23	Čaška	Nastavci čaške	CAP	1.000	0.000	0.955	0.267	0.167	0.650	0.575	0.984
Prosje ¹					0.165 ^c		0.418 ^b		0.710 ^a		0.705
N _{mono} ²					17		9		1		1

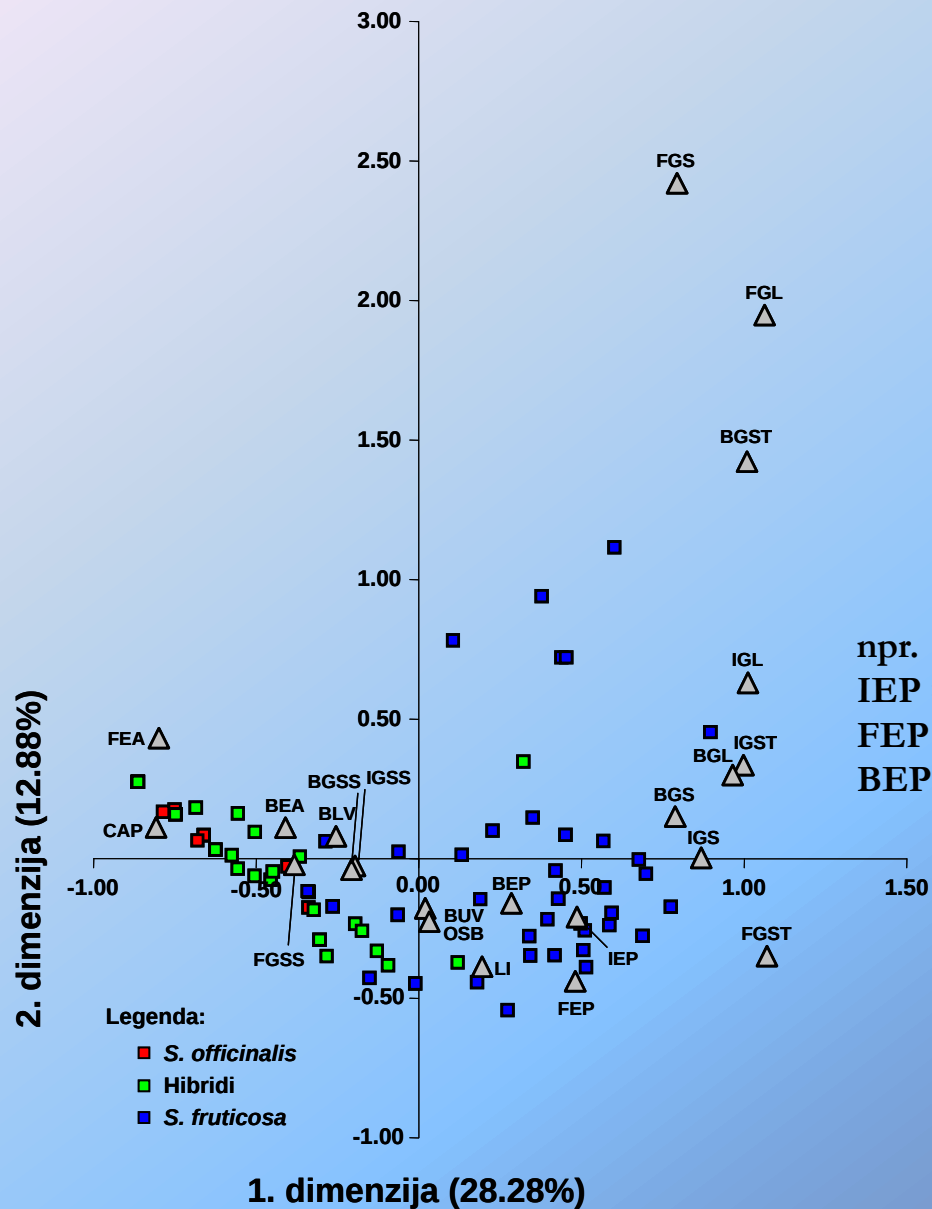
¹Means followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$ after Bonferroni's adjustment.

²Number of monomorphic ($H_j = 0.000$) qualitative traits

0.165^c

0.418^b

0.710^a



npr.

IEP = nežljezdaste stršeće dlake osi cvata

FEP = nežljezdaste stršeće dlake cvjetne stapke

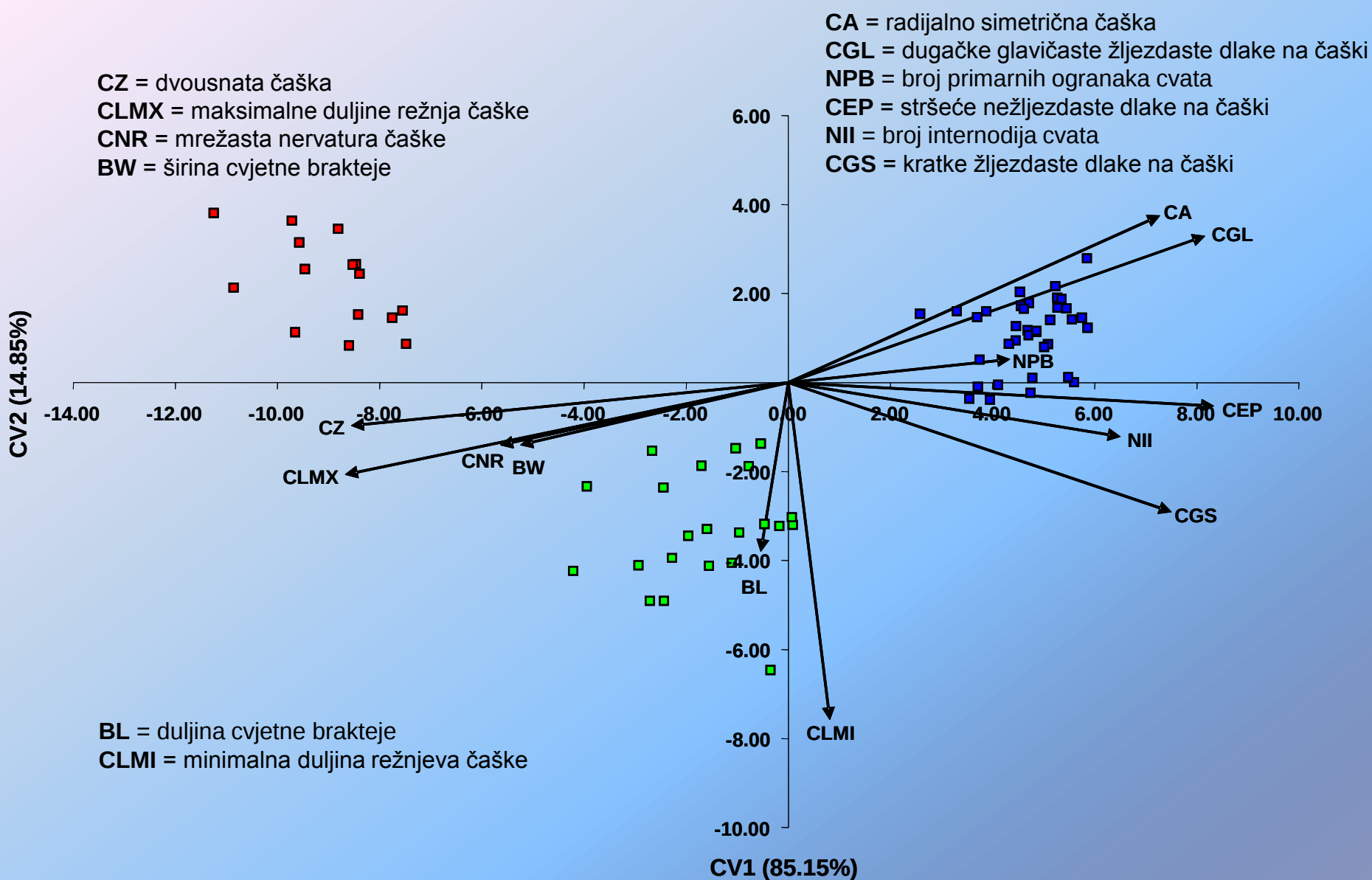
BEP = nežljezdaste stršeće cvjetne brakteje

Prikaz odnosa između 23 polimorfna kvalitativna morfološka svojstva dobiven
korespondentnom analizom 79 biljka kadulje

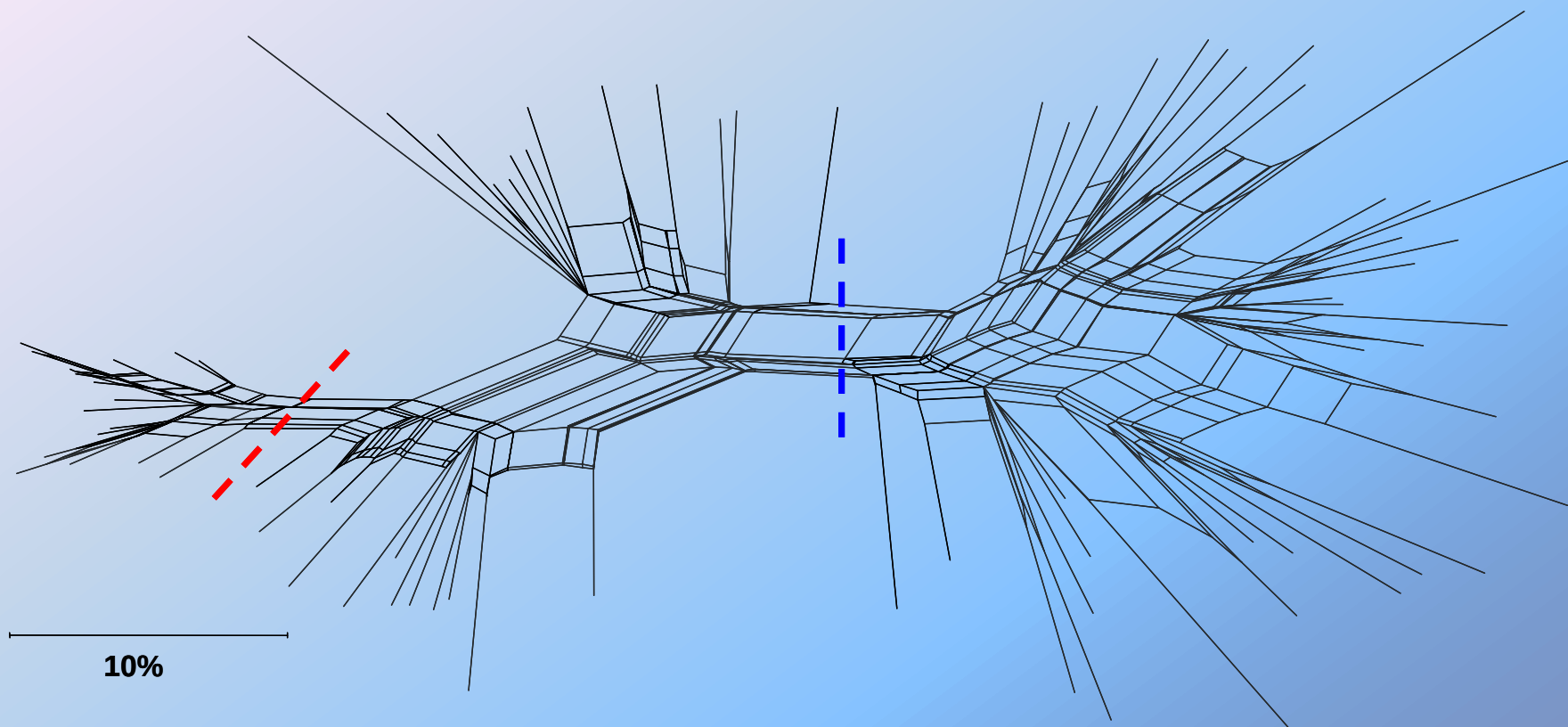
Prosječne vrijednosti i raspon 19 kvantitativnih morfoloških svojstava kod *S. officinalis*, *S. fruticosa* i njihovih hibrida

Br.	Organ	Svojstvo	Skr.	P(F) ¹	<i>S. officinalis</i>		Hibridi		<i>S. fruticosa</i>	
					Prosje ²	Raspon	Prosje ²	Raspon	Prosje ²	Raspon
1	Cvat	Duljina cvata (duljina najvišeg izbojka)	IL	***	11.75 ^b	6.0-21.0	23.79 ^a	9.7-47.5	27.96 ^a	9.7-55.3
2	Cvat	Broj internodija na najvišem izbojku	NII	***	6.07 ^b	4.0-8.0	9.68 ^a	7.0-14.0	11.36 ^a	5.0-19.0
3	Cvat	Broj cvjetova u najbolje razvijenom pršljenu	NFV	*	9.87 ^b	4.0-26.0	15.64 ^{ab}	6.0-41.0	17.67 ^a	5.0-44.0
4	Ogranci cvata	Broj primarnih ogranaka	NPB	***	0.93 ^b	0.0-2.0	2.18 ^{ab}	0.0-8.0	3.78 ^a	0.0-12.0
5	Cvjetna brakteja	Duljina brakteje	BL	**	15.33 ^b	12.3-19.4	18.69 ^a	2.9-30	15.52 ^b	7.3-24.9
6	Cvjetna brakteja	Širina brakteje	BW	***	9.36 ^a	6.1-12.5	8.45 ^a	1.1-14.2	6.44 ^b	3.7-9.1
7	Čaška	Tip dlaka: 1 Nežljezdaste 1.1 Stršeće	CEP	***	0.00 ^c	0.0-0.0	0.58 ^b	0.0-1.0	0.99 ^a	0.6-1.0
8	Čaška	Tip dlaka: 1 Nežljezdaste 1.2 Gotovo prilegle	CEA	***	1.00 ^a	1.0-1.0	0.65 ^b	0.0-1.0	0.11 ^c	0.0-1.0
9	Čaška	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.1 Kratke žljezdaste	CGS	***	0.00 ^b	0.0-0.0	0.75 ^a	0.0-1.0	0.90 ^a	0.0-1.0
10	Čaška	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.2 Dugačke glavičaste	CGL	***	0.00 ^b	0.0-0.0	0.17 ^b	0.0-1.0	0.92 ^a	0.0-1.0
11	Čaška	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.3 Sjedeće	CGSS	***	1.00 ^a	1.0-1.0	0.95 ^a	0.0-1.0	0.29 ^b	0.0-1.0
12	Čaška	Tip dlaka: 2 Žljezdaste 2.4 Žljezdaste na stalku	CGST	***	0.31 ^c	0.0-1.0	0.71 ^b	0.0-1.0	0.99 ^a	0.6-1.0
13	Čaška	Tip čaške: radijalna simetrija	CA	***	0.00 ^b	0.0-0.0	0.05 ^b	0.0-1.0	0.69 ^a	0.0-1.0
14	Čaška	Tip čaške: gotovo radijalna s.	CAA	**	0.00 ^b	0.0-0.0	0.39 ^a	0.0-1.0	0.31 ^a	0.0-1.0
15	Čaška	Tip čaške: dvousnata	CZ	***	1.00 ^a	1.0-1.0	0.55 ^b	0.0-1.0	0.00 ^c	0.0-0.0
16	Čaška	Duljina čaške	CL	***	13.45 ^a	11.9-15.3	12.04 ^b	8.5-15.0	9.27 ^c	8.0-10.6
17	Čaška	Duljina režnjeva čaške (min)	CLMI	***	1.27 ^c	0.6-2.4	2.56 ^a	1.4-4.2	1.67 ^b	1.2-2.5
18	Čaška	Duljina režnjeva čaške (max)	CLMX	***	5.10 ^a	3.6-6.5	4.14 ^b	2.3-5.6	2.25 ^c	1.5-3.3
19	Čaška	Nervatura čaške: mrežasta	CNR	***	0.87 ^a	0.0-1.0	0.66 ^a	0.0-1.0	0.25 ^b	0.0-1.0

¹P(F), signifikantnost F-testa: *** signifikantan pri $P < 0.001$, ** signifikantan pri $0.001 < P < 0.01$, * signifikantan pri $0.01 < P < 0.05$, ns nesignifikantan ($P > 0.05$); ²Prosjeci (u istom redu) označeni različitim slovima su signifikantno različiti na razini $P < 0.05$ na temelju Tukeyjevog testa



Biplot dobiven kanoničkom diskriminantnom analizom na temelju 12 kvantitativnih morfoloških svojstava izabranih na temelju postupne diskriminantne analize u svrhu maksimalizacije multivarijatne udaljenosti između *S. officinalis* ■ *S. fruticosa* ■ i njihovih hibrida ■.



Salvia officinalis

Hybrids

Salvia fruticosa

Prikaz morfoloških odnosa između 79 biljaka kadulje na temelju Gower-ove matrice udaljenosti 23 kvalitativna i 19 kvantitativnih svojstava pomoću dijagrama Neighbor-net (računalni programa Splits Tree;    podjela jedinki kakva je bila pri SSR analizi)

Literatura:

- Anderson E. C., Thompson E. A. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160: 1217–1229.
- Botstein D., White R.L., Sholnick M., David R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
- Dudai N., Lewinsohn E., Larkov O., Katzir I., Ravid U., Chimovitsh D., Sa'adi D., Putievsky E. 1999. Dynamics of yield components and essential oil production in a commercial hybrid sage (*Salvia officinalis* x *Salvia fruticosa* cv. *Neve Ya'ar* No.4). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:4341-4345.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Goudet J. 2002. FSTAT. A program for Windows to estimate and test gene diversities and fixation indices. Version 2.9.3. (www.unil.ch/izea/software/fstat.html)
- Gower J.C. 1971. A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics* 27: 857-874.
- Hammer Ř., Harper D.A.T., Ryan P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9.
- Hedge I. C. 1972. *Salvia* L. In: *Flora Europaea* 3 (T G Tutin, V H Heywood, N A Burges, D H Valentine, S M Walters, D A Webb, eds), Cambridge University Press, New York, London, 188-192.
- Huson D.H., Bryant D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* 23:254–267.
- Liu K., Muse S.V. 2005. PowerMarker—An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21: 2128–2129.
- Minch E., Ruiz-Linares A., Goldstein D., Feldman M., Cavalli-Sforza L.L. 1997. MICROSAT: a computer program for calculating various statistics on microsatellite allele data, ver. 1.5d. Stanford University, Stanford, CA (hpgl.stanford.edu/projects/microsat)

- Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium; An J., Bechet A., Berggren A., Brwon S.K., Bruford M.W., Cai Q., Cassel-Lundhagen A., Cezilly F., Chen S.L. et al. 2010. Permanent genetic resources added to molecular ecology resources database 1 October 2009–30 November 2009. *Molecular Ecology Resources* 10: 404-408.
- Moxon E.R., Wills C. 1999. DNA mikrosatelites: Agents of evolution? *Scientific American* 1: 94-97. Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Pignatti S. 1982. *Salvia* L. *Flora d'Italia* Vol II, Bologna, Egadricole, 502-507.
- Putievsky E., Ravid U., Diwan-Rinzler N., Zohary D. 1990. Genetic affinities and essential oil composition of *Salvia officinalis* L., *S. fruticosa* Mill., *S. tomentosa* and their hybrids. *Flavour and Fragrance Journal* 5:121–123.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Radosavljević I, Satovic Z, Jakse J, Javornik B, Greguraš D, Jug-Dujaković M, Liber Z 2012. development of New Microsatellite Markers for *Salvia officinalis* L. and Its Potential Use in Conservation-Genetic Studies of Narrow Endemic *Salvia brachyodon* Vandas. *International Journal of Molecular Sciences* 13(9): 12082-12093.
- Raymond M., Rousset F. 1995. GenePop (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248–249.
- Reales A., Rivera D., Palazon J.A., Obon C. (2004) Numerical taxonomy study of *Salvia* sect. *Salvia* (Labiatae). *Botanical Journal of Linnean Society* 145: 353–371.
- Rohlf F. J. 2005. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.2. Exeter Software: Setauket, NY
- 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
- Rozen S., Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* 132: 365–386.

SAS/STAT 9.1 2004. Users Guide, SAS Institute Inc., Cary, NC

Thiel T., Michalek W., Varshney R.K., Graner A. 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 106: 411–422.

Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. 2004. Micro-Checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535–538.