

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

MAGISTRSKO DELO

VREDNOTENJE GENETSKE IN MORFOLOŠKE
RAZNOLIKOSTI LAŠKEGA SMILJA
(*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don)

TJAŠA ANTOLINC

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Magistrsko delo

**Vrednotenje genetske in morfološke raznolikosti laškega smilja
(*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don)**

(Evaluation of the genetic and morphological diversity of immortelle
(*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don))

Ime in priimek: Tjaša Antolinc

Študijski program: Varstvo narave, 2. stopnja

Mentor: izr. prof. dr. Dunja Bandelj

Somentor: dr. Alenka Baruca Arbeiter

Koper, september 2022

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Tjaša ANTOLINC

Naslov magistrskega dela: Vrednotenje genetske in morfološke raznolikosti laškega smilja (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don)

Kraj: Koper

Leto: 2022

Število listov: 58 Število slik: 8 Število preglednic: 4

Število prilog: 2 Št. strani prilog: 2

Število referenc: 45

Mentor: izr. prof. dr. Dunja Bandelj

Somentor: dr. Alenka Baruca Arbeiter

UDK: 582.991:581.4(043.2)

Ključne besede: laški smilj, morfološko vrednotenje, mikrosateliti, genetsko vrednotenje, reintrodukcija.

Izvleček:

Na podlagi pregleda herbarijskih zbirk smo ugotovili, da je bil laški smilj (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) nekoč prisoten tudi v Sloveniji. Prvi primerek so našli leta 1844 pri Ilirski Bistrici. V Sloveniji laški smilj trenutno ni več prisoten, zato bi bilo smiselno razmisliti o njegovi reintrodukciji na območja, kjer je že bil prisoten. Najbolj primeren genetski material za ponovno naselitev laškega smilja v Sloveniji, bi zaradi geografske bližine, lahko predstavljala bližnja nahajališča laškega smilja v Hrvaški Istri. V magistrski nalogi smo predstavili nekatere osnovne smernice za izbiro genetskega materiala, ki bi bil primeren za reintrodukcijo. Izvedli smo morfološko analizo raznolikosti rastlin ter raziskavo nadgradili še z metodo, ki omogočajo proučevanje na ravni genotipa. Uporabili smo mikrosatelitske označevalce, ki so jih razvili raziskovalci UP FAMNIT. Poleti leta 2021 smo v nasadu Bonistra d.o.o., vzorčili 29 rastlin laškega smilja katerih izvorni material je s Cresa in Kamenjaka. Ugotovili smo, da se rastline z dveh lokacij med seboj razlikujejo v dolžini listov in številu koškov v pakobulastem socvetju ter, da med njimi obstaja statistično značilna razlika. Z mikrosatelitskimi označevalci smo pomnožili 65 polimorfnih alelov s povprečjem 8,13 alela na lokus. S pomočjo izbranih parametrov smo ugotovili, da so vsi lokusi, razen HiUP-16 zelo informativni. Odkrili smo 29 edinstvenih alelov, od tega smo jih 6 odkrili pri vzorcih, ki izvirajo s Cresa, in 23 pri vzorcih s Kamenjaka. Izrisali smo tudi dendrogram, na podlagi katerega smo ugotovili, da se rastline razvrstijo v 4 skupine.

Key document information

Name and SURNAME: Tjaša ANTOLINC

Title of the thesis: Evaluation of genetic and morphological diversity of immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don)

Place: Koper

Year: 2022

Number of pages: 58

Number of figures: 8

Number of tables: 4

Number of appendix: 2

Number of appendix pages: 2

Number of references: 45

Mentor: Assoc. Prof. Dunja Bandelj, PhD

Co-Mentor: Alenka Baruca Arbeiter, PhD

UDC: 582.991:581.4(043.2)

Keywords: immortelle, morphologic evaluation, microsatellites, genetic evaluation, reintroduction

Abstract:

Based on the herbarium collections reviewed, we determined that immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) was present in Slovenia as well. The first specimen was found near Ilirska Bistrica in 1844. Currently, immortelle can no longer be found in Slovenia, so its reintroduction to the areas where it was once present would be sensible. The most suitable genetic material used for the reintroduction of immortelle to Slovenia could be found on nearby immortelle sites in Croatian Istria, due to their geographic proximity. In this master's thesis, we presented basic guidelines on how to select genetic material for reintroduction. Having conducted a morphologic analysis of plant diversity, we upgraded the research using method that allow genotype-level research. We used microsatellite markers developed by UP FAMNIT researchers. During summer 2021, we sampled 29 immortelle plants from Bonistra d.o.o. the source material of which was collected on Cres and Kamenjak. We determined that plants from the two locations differ in terms of leaf length and the number of capitula per synflorescence and that the difference between them is statistically significant. Using microsatellite markers, we multiplied 65 polymorph alleles, with average 8.13 allele per locus. Considering the selected parameters, we determined that all loci, except for HiUP-16, are very informative. We discovered 29 unique alleles, of which 6 were found in samples originating from Cres and 23 in samples originating from Kamenjak. We also drew a dendrogram, based on which we determined that the plants can be classified into four groups

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. Dunji Bandelj za sprejem mentorstva, za strokovne nasvete in napotke pri pisanju magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi somentorici dr. Alenki Baruca Arbeiter za vso pomoč pri izvedbi praktičnega dela magistrske naloge, usmerjanje, nasvete in njeno razumevanje pri izdelavi magistrske naloge. Iskrena hvala tudi doc. dr. Matjažu Hladniku za pomoč pri statistični obdelavi rezultatov morfološkega vrednotenja.

Hvala gospe Jani Bergant, ki nam je omogočila vzorčenje rastlinskega materiala v njenem nasadu Bonistra d.o.o.

Hvala staršem za vso finančno in moralno podporo skozi vsa leta študija. Hvala tudi ostalim družinskim članom in prijateljem za vso podporo!

Iskrena hvala tudi mojemu dediju, ki ga ni več med nami, za vso podporo in pomoč v času mojega študija v Kopru. Hvala, ker mi nisi dovolil obupati v najtežjih trenutkih!

Hvala vam!

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	Laški smilj	2
1.2	Taksonomska klasifikacija in areali razširjenosti	4
1.3	Morfološki znaki za ločevanje podvrst	5
1.4	Molekularni označevalci DNA za proučevanje raznolikosti	6
1.5	Ekološke zahteve	7
1.6	Uporaba laškega smilja	7
1.6.1	Eterično olje laškega smilja	8
1.6.2	Izvlečki laškega smilja	10
1.7	Namen, cilji ter raziskovalne hipoteze magistrskega dela	10
2	MATERIALI IN METODE	12
2.1	Kabinetno delo	12
2.2	Rastlinski material	12
2.3	Morfološko vrednotenje	13
2.3.1	Meritve morfoloških lastnosti	13
2.3.2	Statistična obdelava rezultatov	13
2.4	Genetsko vrednotenje	14
2.4.1	Izolacija DNA iz rastlinskega materiala	14
2.4.2	Določanje koncentracije izolirane DNA in redčenje vzorcev	15
2.4.3	Pomnoževanje mikrosatelitskih označevalcev	15
2.4.4	Vrednotenje dolžin pomnoženih alelov in statistična obdelava podatkov	17
3	REZULTATI	18
3.1	Kabinetno delo	18
3.1.1	Slovenska zakonodaja	19
3.1.2	Smernice za reintrodukcijo laškega smilja v naravno okolje	19
3.2	Morfološko vrednotenje	22
3.3	Karakterizacija mikrosatelitskih lokusov	25
3.4	Razvrščanje laškega smilja v sorodnostne skupine	31
4	DISKUSIJA	33
4.1	Smernice za reintrodukcijo laškega smilja	33
4.2	Morfološko vrednotenje	34
4.3	Karakterizacija mikrosatelitskih lokusov	36
4.4	Razvrščanje vzorcev smilja v sorodnostne skupine vzorcev	37
5	LITERATURA IN VIRI	39

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela 1: Seznam parov začetnih oligonukleotidov uporabljenih mikrosatelitskih lokusov in osnovni motiv mikrosatelita.	16
Tabela 2: Parametri genetske variabilnosti po posameznih lokusih. Število alelov (n), število edinstvenih alelov (nu), opažena (H_o) in pričakovana (H_e) heterozigotnost, informacijska vrednost polimorfizma (PIC) in verjetnost enakosti genotipov (PI).	26
Tabela 3: Opažena (H_o) in pričakovana (H_e) heterozigotnost, vrednost P ter statistična značilnost izračunane v testu Hardy-Weinbergovega ravnovesja.	28
Tabela 4: Edinstveni aleli.	29

KAZALO SLIK IN GRAFIKONOV

Slika 1: Cvet laškega smilja.	4
Slika 2: Areali razširjenosti podvrst laškega smilja.	5
Slika 3: Nasad laškega smilja, ki je v lasti podjetja Bonistra d.o.o.	13
Slika 4: Škatla z brki za število koškov v pakobulastem socvetju laškega smilja – obe lokaciji.	23
Slika 5: Škatla z brki za dolžino listov laškega smilja - obe lokaciji.	24
Slika 6: Vzorci razdeljeni v 3 gruče z metodo k-povprečij.	25
Slika 7: Opažena (H_o) in pričakovana (H_e) heterozigotnost na posameznem lokusu.	27
Slika 8: Dendrogram podobnosti po metodi UPGMA.	31

KAZALO PRILOG

PRILOGA A *Rezultati statistične analize števila koškov*

PRILOGA B *Rezultati statistične analize povprečne dolžine listov*

SEZNAM KRATIC

AFLP	polimorfizem dolžin namnoženih fragmentov (angl. Amplified Fragment Length Polymorphism)
angl.	angleško
°C	stopinja Celzija, enota za merjenje temperature
CTAB	cetil trimetil amonijev bromid
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. Deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
LME	linearni mešani modeli (angl. Linear Mixed Effect Model)
M	molarnost, mol/l
MgCl₂	magnezijev klorid
NaCl	natrijev klorid
pufer TE	raztopina Trisa in EDTA
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
PI	verjetnost enakosti genotipov (angl. Probability of identity)
PIC	informacijska vrednost polimorfizma (angl. Polymorphic information content)
RAPD	naključno namnožena polimorfna DNA (angl. Randomly Amplified Polymorphic DNA)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov
SSLP	polimorfizem dolžin enostavnih zaporedij (angl. Simple Sequence Length Polymorphism)
SSR	ponovitve enostavnih zaporedij (angl. Simple Sequence Repeats)
STR	kratke tandemske ponovitve (angl. Short Tandem Repeats)
VNTR	spremenljivo število tandemskih ponovitev (angl. Variable Number of Tandem Repeats)
UPGMA	metoda aritmetičnega povprečja neutržnih parov (angl. Unweighted Pair Group Method)

1 UVOD

Laški smilj (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) je sredozemska rastlina, ki je najbolj poznan in cenjen zaradi vsebnosti številnih biološko aktivnih spojin. Zaradi značilnega vonja je prisoten v številnih blagovnih znamkah kozmetične in parfumske industrije (Hellivan 2009). Listi in cvetovi smilja se tradicionalno uporabljajo pri zdravljenju različnih zdravstvenih težav, kot so alergije, prehladi, kašelj, bolezni kože, jeter, žolčnika raznih okužb in nespečnosti (Viegas in sod. 2013). Eterično olje, ki je pridobljeno iz vseh zelenih delov rastline, uporabljajo v kozmetične in medicinske namene (Dimitrova in Nacheva 2018). V nekaterih sredozemskih državah smilj uporabljajo za aromatiziranje hrane in žganja, kot nadomestek hmelja pri proizvodnji piva ter kot vir za pridelavo obmorskega medu (Appendino in sod. 2015).

V prvi polovici 20. stoletja je laški smilj uspeval tudi v Sloveniji. Na podlagi herbarijskih primerkov, ki jih hranijo v herbarijski zbirki Univerze v Ljubljani, je bil laški smilj v preteklosti prisoten na jugozahodnem območju Slovenije. Prvi primerek iz herbarijske zbirke je bil nabran leta 1844 v kraju Harije pri Ilirski Bistrici. Zadnji herbarijski primerki so bili nabrani v sredini 20. stoletja. V nadaljevanju so naštetih herbarijski primerki laškega smilja skupaj z letnico in lokacijo najdbe:

- 1844 – Harije (pri Ilirski Bistrici),
- 1903 – vznožje Slavnika pri Podgorju,
- 1904 – travniki Kojnika nad Podgorjem,
- 1905 – med vasema Brce in Tominje,
- 1956 – dolina Dragonje,
- 1957 – Slavnik nad Podgorjem,
- 1959 – nad vasico Karli pri Sočergi in
- letnica na herbarijski etiketi ni navedena – Prem v dolini Reke.

Laški smilj v naravnem okolju na območju Slovenije trenutno ne raste. Predvideva se, da je to posledica zaraščanja površin, kar je privedlo do izgube življenjskega prostora, saj je smilj sonceljubna rastlina (Bandelj in sod. 2020 (a)). Smiselno bi bilo proučiti možnosti za reintrodukcijo oz. ponovno naselitev laškega smilja v naravno okolje. Pri prenosu rastlin v naravno okolje je pomembna pravilna identifikacija rastlin ter sledljivost sadilnega materiala. Identifikacijo lahko izvedemo na osnovi morfoloških znakov rastlin. A zaradi prisotnega polimorfizma v morfologiji smilja je podvrste težko razlikovati. Klasifikacija laškega smilja v podvrste se med različnimi avtorji razlikuje. Galbany – Casals in sod. (2006) so klasificirali 3 podvrste *H. italicum* in sicer: *H. italicum* subsp. *italicum*, *H. italicum* subsp. *sicilum* in *H. italicum* subsp. *microphyllum*. Herrando-Moraira in sod. (2016) so predlagali razdelitev na 4 podvrste in sicer na *H. italicum* subsp. *italicum*, *H.*

italicum subsp. *microphyllum*, *H. italicum* subsp. *sicilum* in *H. italicum* subsp. *tyrrhenicum*. V tovrstnih primerih, ko je za rastlino značilna izjemna morfološka raznolikost, je morfološko vrednotenje smiselno dopolniti s sodobnimi molekularnimi označevalci DNA, med katere sodijo mikrosateliti.

V Sloveniji je veliko kmetij, ki se ukvarjajo z gojenjem aromatičnih rastlin, med drugimi narašča zanimanje za gojenje laškega smilja. V Slovenski Istri tako najdemo več kmetij, kjer poleg ostalih aromatičnih rastlin gojijo tudi laški smilj, to so: Bonistra d.o.o. (Jana Bergant) v dolini reke Dragonje, Zeliščni raj Slovenske Istre v Trseku (Sonja Kocjančič Posedi) in Zeliščno-etnološka kmetija Belajevi (Andrejka Cerkenik), ki se nahaja v vasi Kačiče. Dva večja kolekcijska nasada so vzpostavili raziskovalci UP FAMNIT, Oddelka za aplikativno naravoslovje, in sicer prvega leta 2018 na Purissimi (Mediterranski vrt in razvojni center Purissima, Spodnje Škofije) v sodelovanju s kmetijsko zadruzo Agraria Koper, z.o.o. ter drugega leta 2020 v Osapski dolini. Nasada UP FAMNIT sta namenjena predvsem izobraževanju in raziskovanju ter pridobivanju sadilnega materiala s preverjenim izvorom. Prav zaradi vse večjega zanimanja splošne javnosti za gojenje in proizvodnjo izdelkov iz laškega smilja je smiselno uvesti zanesljiv identifikacijski sistem, da lahko zagotovimo sledljivost sadilnega materiala in tako preprečimo vnos rastlin z nepreverjenim poreklom v okolje.

1.1 Laški smilj

Laški smilj je aromatična in zelnata trajnica, značilna za Sredozemlje, ki jo uvrščamo v družino nebinovk (Asteraceae). Laški smilj raste v obliki polgrmička do višine 70 cm. Ima več vegetativnih pokončnih stebel, ki so po celotni dolžini olistana in poraščena z žleznimi in nežleznimi dlačicami ali trihomi. Cvetna stebela so pokončna in listnata ter dolga od 20 do 50 cm. Spodnji in medialni listi na vegetativnih in cvetnih steblih so celi in črtalasti ter dolgi 2–37 mm in široki od 0,4 do 1,8 mm, na zgornji strani so zelenkaste in na spodnji strani srebrnkaste barve. Na zgornji strani so listi brez dlačic do redko dlakavi in praviloma brez žleznih dlačic ter redko žilnati, medtem ko so na spodnji strani listi gosto dlakavi z žleznimi dlačicami in žilnati. Spodnji stebelni listi so zbrani v rozete, drugi pa so izmenično razporejeni po stebelu. Pakobulasto socvetje je velikosti od 4,5–62 x 3–80 mm, in lahko vsebuje od 2 do 120 koškov. Velikost koška je 4–6,5 mm, je cilindrične do ozko zvonaste oblike, obdajajo ga ovojčkovi listi (Ninčević in sod. 2019). Najbolj zunanji ovojčkovi listi so v povprečju dolgi 1,53 mm in široki 0,86 mm ter so črtalasto-suličaste do suličaste oblike. Vrh listne ploskve zunanjih ovojčkovih listov je koničast do delno zaokrožen. So rahlo do zmerno dlakavi in brez žleznih laskov. Najbolj notranji ovojčkovi listi so večji in v povprečju v

dolžino merijo 4,13 mm. Široki so 0,88 mm in so črtalasto-suličaste oblike. Vrh listne ploskve je lahko koničast, zaokrožen ali top. Lahko so goli do rahlo dlakavi ter redkeje ali gosto porasli z žleznimi lasi. V posameznem košku laškega smilja je od 14 do 34 rumenih cvetov, ki jih ločimo na dva tipa (Bandelj in sod., 2020 (a)):

- jezičasti cvetovi, ki so manj številčni in so funkcionalno ženski. V košku jih je približno 6,03. Venec je zrasel v kratko venčno cev in v jeziček ter je v povprečju dolg 3,14 mm;
- večina cvetov je cevastih in so dvospolni (hermafroditski). V povprečju jih je v košku 15,37. Venec je zrasel v cev, je zvezdast ter se končuje s 5 zobci. Dolg je približno 3,55 mm. Prašnice so zrasle v cev, ki obdaja vrat pestiča. Ima 5 prašnikov.

Tako pri jezičastih, kot cevastih cvetovih, je čaša preobražena v kodeljico (papus) iz peresastih ali neperesastih laskov. Povprečno je dolga 3,16 mm. Plod je orešek ali rožka, ki v dolžino meri od 0,9 do 1 mm in je široka od 0,4 do 0,5 mm. Je cilindrične do ovoidne oblike, kjer so beli lasi (kodeljica) enakomerno razporejeni. Vonj, ki ga oddaja rastlina, spominja na kari, zato ponekod laški smilj imenujejo 'kari rastlina'. Ko se cevasti cvetni listi posušijo in odpadejo, ostanejo na rastlini ovojčkovi listi, ki so slamnate barve in zvezdaste oblike. Ravno zaradi teh lastnosti je laški smilj priljubljena rastlina za posušene aranžmaje (Bandelj in sod. 2020 (a)). Laški smilj cveti od (maja) junija do avgusta (septembra) (Ninčević in sod. 2019).



Slika 1: Cvet laškega smilja.

Vir: Lasten 2021.

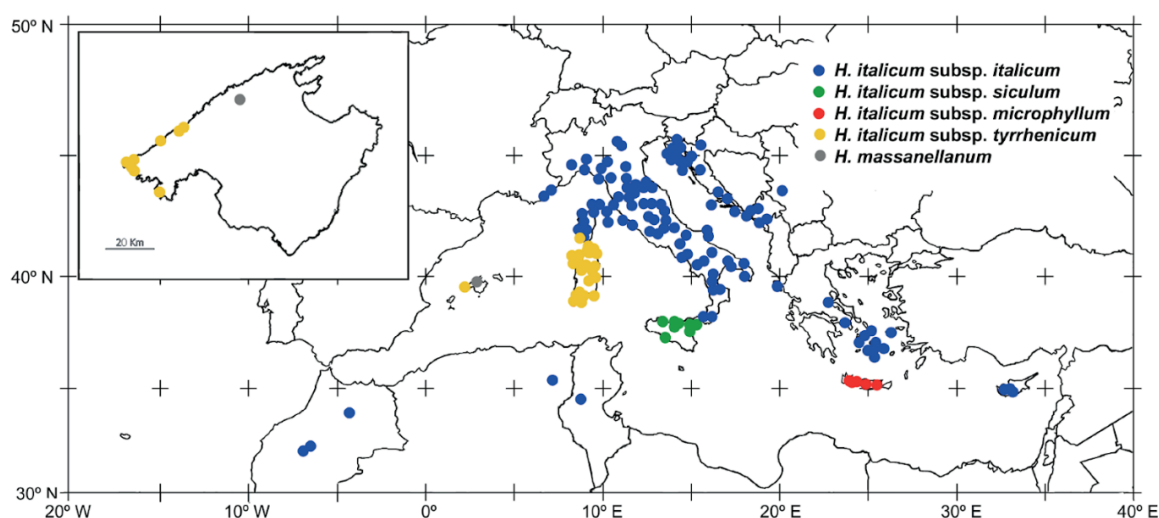
Laški smilj se goji za pridobivanje eteričnega olja in različnih ekstraktov. Eterično olje izločajo žlezni trihomi. To so posebne epidermalne tvorbe, ki jih pri smilju tvori 12 celic: 2 celici v bazalnem delu, 8 celic v medialnem delu in 2 celici na apikalnem delu, ki na površino rastline izločajo eterično olje (Perrini in sod. 2009). Žlezni trihomi se nahajajo na cvetnih, ovojkovih in stebelnih listih ter na stebelu. Pri podvrsti *H. italicum* subsp. *italicum* je gostota žleznih trihomov največja na spodnji povrhnjici stebelnih listov, medtem ko je gostota na stebelu ter ovojkovih in cvetnih listih manjša (Ninčević in sod. 2019).

1.2 Taksonomska klasifikacija in areali razširjenosti

Laški smilj (*Helichrysum italicum*) (Roth) G. Don) spada v rod *Helichrysum*. Pripada sekciji Stoechadina (DC.) Gren. & Godr. ter v subklad, imenovan *Helichrysum italicum* kompleks, v katerega poleg *H. italicum* sodita še vrsti *H. serotinum* (DC.) Boiss. in *H. litoreum* Guss. (Herrando-Moraira in sod. 2016). Rod *Helichrysum* sestavlja približno 600 vrst, ki jih najdemo v Afriki, na Madagaskarju, Makroneziji, osrednji Aziji in Indiji ter v Sredozemlju, kjer uspeva približno 25 nativnih vrst. Ime rodu *Helichrysum* izvira iz dveh grških besed: 'helios', kar pomeni sonce in 'chryos', kar pomeni zlato. Ime se nanaša na zlatorumeno barvo cvetov, ki je značilna za laški smilj. Sekcija Stoechadina vključuje 8 sredozemskih vrst in znotraj skupine se nahaja podskupina *Helichrysum italicum* kompleks, ki vključuje

več podvrst (Bandelj in sod. 2020 (a)). Herrando-Moraira in sod. (2016) so izvedli podrobno multivariatno analizo morfoloških znakov. Na podlagi raziskave so predlagali štiri podvrste *H. italicum*:

1. *H. italicum* subsp. *italicum* (razširjen v Italiji, na Hrvaškem, vzhodno sredozemski obali Francije in Korzike, v Bosni in Hercegovini, Grčiji (Egejski otoki in Ciper),
2. *H. italicum* subsp. *microphyllum* (endemičen na Kreti),
3. *H. italicum* subsp. *siculum* (endemičen na Siciliji) in
4. *H. italicum* subsp. *tyrrhenicum* (na otokih Korzike, Sardinije, Majorke in na otoku Dragonera) (Slika 2).



Slika 2: Areali razširjenosti podvrst laškega smilja.

Vir: Herrando-Moraira in sod. 2016.

1.3 Morfološki znaki za ločevanje podvrst

Pri podvrstah *italicum*, *siculum* in *microphyllum* so bazalni in medialni listi na zgornji strani listne povrhnjice brez dlačic, medtem ko so na spodnji strani gosto dlakavi. Zgornja in spodnja povrhnjica sta različnih barv. Podvrsta *italicum* je najbolj razširjena podvrsta ter najbolj morfološko variabilna. Rastlina je višine do 70 cm z nekaj zalistnimi listnimi snopi (občasno brez njih). Bazalni in medialni listi cvetnih in vegetativnih stebel so dolžine 12–37 mm. Pakobulasto socvetje velikosti 10–35 x 18–55 mm, z 15–94 koški (Herrando-Moraira in sod. 2016).

Podvrsti *siculum* in *microphyllum* zrastle do višine 40 cm in imata številne zalistne listne snope. Pakobulasto socvetje je velikosti 6–23 x 8,5–27 mm in ga sestavlja od 3 do 36 koškov. Podvrsta *H. italicum* subsp. *siculum* ima bazalne in medialne liste cvetočih in

vegetativnih stebel dolžine 10–18,5 mm z listnim robom, ki ni valovit. Podvrsta *H. italicum* subsp. *microphyllum* pa ima bazalne in medialne liste cvetnih in vegetativnih stebel dolžine 3–10 mm z valovitim listnim robom (Herrando-Moraira in sod. 2016).

Pri podvrsti *H. italicum* subsp. *tyrrhenicum* so bazalni in medialni listi, redko dlakavi na zgornji strani in gosto dlakavi na spodnji strani (zaradi prekrivajočega območja razširjenosti na Korziki, so ti znaki značilni tudi za podvrsto *italicum* na tem območju). Rastlina zraste do višine 40 cm in ima številne zalistne listne snope. Bazalni listi cvetnih in vegetativnih stebel so dolžine 3,7–20 mm. Pakobulasto socvetje je velikosti 14–37 mm, s 5–37 koški (Herrando-Moraira in sod. 2016).

1.4 Molekularni označevalci DNA za proučevanje raznolikosti

Molekularni označevalci DNA so koristno orodje za analiziranje genetske raznolikosti in predstavljajo učinkovit način za povezovanje fenotipskih in genotipskih razlik. V zadnjih letih se molekularne označevalce uporablja v različne namene, vključujoč raziskave genetskih razmerij med posamezniki, kartiranje pomembnih genov, selekcijo s pomočjo označevalcev, genetiko populacij in filogenetske študije (Kalia in sod. 2010). Vse analize z označevalci DNA morajo izpolniti merila, kot so zanesljivost, polimorfnost, preprostost, dostopna cena, hitra tehnika izvedbe ter. Poleg tega je prednost tudi v tem, da se za analizo potrebuje majhne količine genetskega materiala (Garrido-Cardenas in sod. 2018).

V preteklosti je že bilo narejenih nekaj raziskav s področja genetike smilja in njegovih podvrst. Galbany-Casals in sod. (2011) so genetsko variabilnost smilja analizirali z metodo polimorfizma dolžin pomnoženih fragmentov (AFLP – angl. Amplified Fragment Length Polymorphism), sekvencami DNA in morfološkimi znaki. Angioni in sod. (2003) so uporabili metodo naključno namnožene polimorfne DNA (RAPD, angl. Random Amplified Polymorphic DNA) za proučevanje genetske raznolikosti podvrste smilja *H. italicum* subsp. *microphyllum* na Sardiniji. Hladnik in sod. (2019) so raziskali celoten genom kloroplasta smilja, ki je bil vzorčen na območju severnega Jadrana.

Med pogosto uporabljene molekularne označevalce DNA sodijo mikrosatelitski označevalci. Mikrosateliti so poznani kot kratke tandemske ponovitve (angl. Short Tandem Repeats – STR) ali kot ponovitve enostavnih zaporedij (angl. Short Sequence Repeats – SSR). Običajno so mikrosateliti tandemske ponovitve od 1 do 6 nukleotidov, ki jih v visokih frekvencah najdemo v jedrnem genomu večine taksonov (Selkoe in Toonen 2006).

Mikrosateliti so pridobili velik pomen v rastlinski genetiki in pri žlahtnjenju, predvsem zaradi številnih zaželenih lastnosti, kot so: hipervariabilnost, kodominantno dedovanje, ponovljivost, relativna številčnost, dobra pokritost v genomu in možnost za avtomatizacijo procesa (Kalia in sod. 2010). Raziskovalci Oddelka za aplikativno naravoslovje UP FAMNIT so sestavili nukleotidno zaporedje celotnega kloroplastnega genoma *Helichrysum italicum* subsp. *italicum*, ki je lahko vir za razvoj novih molekularnih označevalcev za različne aplikacije v genetskih študijah (Hladnik in sod. 2019). Prav tako so iz genoma laškega smilja v letu 2021 kot prvi v svetovnem merilu na UP FAMNIT razvili mikrosatelitske označevalce laškega smilja. Le-ti predstavljajo dragoceno orodje za nadaljnje raziskave laškega smilja, karakterizacijo genskih virov (npr. semena), za populacijske študije ter za študije prenosljivosti med vrstami (Baruca Arbeiter in sod. 2021).

1.5 Ekološke zahteve

Laški smilj raste na bazičnih, suhih, peščenih in revnih tleh. Najdemo ga na nadmorski višini od 0 do 2200 metrov (Ninčević in sod. 2019). Za rast potrebuje tla, ki so bogata s kalcijem. Laški smilj ne uspeva v tleh, ki so kisla in težka ter vsebujejo večjo količino vode. Je sonceljubna rastlina. Prenese tako vroča poletja kot mrzle zime. Na višje ležečih rastiščih je pomemben dejavnik snežna odeja, ki deluje kot toplotni izolator, saj ščiti laški smilj pred zmrzaljo. Laški smilj prenese tudi močne vetrove (Bandelj in sod. 2020 (b)). Laški smilj je rastlina, ki je relativno dobro odporna proti boleznim in škodljivcem. Lahko se pojavijo glivične bolezni in razni škodljivci. Škodo povzročajo odrasli hrošči dveh vrst rilčkarjev, listne in ščitaste uši, molji, cvetlični resar in listni zavrtači. Od bolezni se lahko v vlažnih tleh pojavi siva plesen. Talna gliva iz rodu *Rhizoctonia* sp. se lahko pojavi v fazi pridelave in gojenja sadik ter prizadene mlade rastline. V hladnem in vlažnem okolju ter težkih tleh so zaznali talno glivo iz rodu *Pythium* sp. (Pohajda in sod. 2015).

1.6 Uporaba laškega smilja

Laški smilj je zaradi mnogih biološko aktivnih spojin vedno bolj iskana rastlina v kozmetični in farmacevtski industriji (Rajić in sod. 2015). V sredozemskih državah uporabljajo laški smilj v tradicionalnem zdravilstvu. V večini se uporabljajo prevretki oz. poparki iz cvetnih in listnih poganjkov, eterično olje, hidrolat in macerat. Laški smilj se uporablja za zdravljenje alergij, prehlada, bronhitisa, laringitisa, astme, bolezni kože, jeter, ledvic, prebavnega trakta, uporablja se ga proti vnetjem, infekcijam, pri motnjah spanja ter za spiranje ustne votline (Viegas 2013).

O koristnem vplivu smilja na zdravje so poročali v etnofarmakoloških raziskavah, ki so podprte z *in vivo* in *in vitro* raziskavami. V grško-rimskem času so smilj uporabljali kot protivnetno in protiinfekcijsko sredstvo. Smilj se v te namene uporablja še danes. Je zelo bogat s fenolnimi spojinami, ki so priznana kot učinkovine za krepitev zdravja. Antioksidativne lastnosti fenolnih spojin naj bi imele veliko vlogo tudi pri preprečevanju in zdravljenju bolezni, ki so povezane z oksidativnim stresom (rak, kardiovaskularne in nevrodegenerativne bolezni). Smilj je rastlina z že raziskanim vplivom na zdravje, vendar vpliva na zdravje še ni ocenil Odbor za zdravila rastlinskega izvora. Prav tako tradicionalna uporaba smilja na območju Evrope ni temeljitejše raziskana. Izvesti bi bilo treba klinične študije, pri čemer bi bil smilj in njegov vpliv na zdravje edina komponenta raziskave (Kramberger in sod. 2021).

Danes je povpraševanje za laški smilj izjemno veliko, saj naj bi laški smilj pomagal tudi pri zmanjševanju prvih znakov staranja na koži, zato Francozi laškemu smilju pravijo 'immortelle', kar v prevodu pomeni nesmrten in ga v večini uporabljajo v kozmetični industriji. Spojine v laškem smilju, ki pomagajo pri zmanjševanju prvih znakov staranja, so antioksidanti, predvsem polifenoli in flavonoidi (Rajić in sod. 2015).

1.6.1 Eterično olje laškega smilja

Eterično olje se pri laškem smilju kopiči v žleznihi trihomih in se v obliki kapljic izloča na vegetativnih (stebela, spodnja in zgornja listna povrhnjica) in generativnih (socvetje) delih rastline. Za pridobivanje eteričnega olja žanjemo cvetove in listne poganjke skupaj, na višini 15 do 20 cm rastline (Bandelj in sod. 2020 (a)). Laški smilj žanjemo v času, ko rastlina cveti (junij) oz. ko je odprta približno 1/3 cvetov (Rajić in sod. 2015).

Eterično olje laškega smilja pridobivamo z destilacijo, pri čemer ločimo dve vrsti destilacije:

- Destilacija z vodo in vodno paro: kotel za destilacijo je opremljen s preluknjano ploščo ali mrežo, ki je nad predvideno ravno vodo. Rastlinski material in voda nista v neposrednem stiku. Vodna para prehaja z dna kotla preko rastlinskega materiala ter s seboj ponese hlapne spojine. Za to metodo je značilen krajši čas destilacije, manj kemijskih sprememb hlapnih spojin ter manjše izgube polarnih spojin v vodi (El Asbahami in sod. 2015). Uporabimo lahko svež ali posušen rastlinski material (Kočevar Glavač 2018).
- Parna destilacija: nastajanje hlapov poteka zunaj destilacijskega kotla. Para je lahko nasičena ali pregreta. Nekoliko nad atmosferskim tlakom se paro uvede v spodnji del kotla in ta nato prehaja skozi rastlinski material ter s seboj ponese hlapne spojine (El Asbahami in sod. 2015).

Številni raziskovalci so v preteklosti že raziskovali kemijsko sestavo in raznolikost sestave eteričnega olja laškega smilja. Ugotovili so, da je raznolikost v sestavi eteričnega olja odvisna od geografskega porekla, faze rasti in okoljskih pogojev. Ugotovili so, da glede na geografsko poreklo obstaja več tipov eteričnega olja (Ninčević in sod. 2019):

- korziška olja v večini vsebujejo spojine, ki so nasičene s kisikom (neril acetat, neril propionat, alifatski ketoni in β -diketoni) ter manjši delež ogljikovodikov (γ -kurkumen, α -kurkumen in limonen),
- eterična olja iz območja nekdanje Jugoslavije vsebujejo visoke vrednosti α -pinena (22 %), sledi γ -kurkumen, β -selinen, neril acetat in β -kariofilen. Ob Jadranski obali so glavne spojine α -kurkumen ali γ -kurkumen ali α -pinen ter neril acetat,
- v grških eteričnih oljih so glavne spojine geraniol, geranil acetat in nerolidol,
- v toskanskih oljih sta glavni sestavini α -pinen ali neril acetat. Vsebujejo pa tudi visoke vrednosti seskviterpenov, ogljikovodikovih seskviterpenov s precejšnjim deležem β -selinena, β -kariofilena in α -selinena.

Eterična olja iz Hrvaške imajo podobno sestavo kot eterična olja iz Italije. Glavne sestavine eteričnega olja s Hrvaške so α -pinen, neril acetat, α -cedren, nerol, α -kurkumen, γ -kurkumen in geranil acetat (Ninčević in sod. 2019).

Raziskave kažejo, da na sestavo eteričnih olj vplivajo tudi fenofaze rastline. Blažević in sod. (1995) so proučevali sestavo eteričnega olja laškega smilja v 6 fenofazah: zgodnji poganjki, formacija cvetov, pred cvetenjem, med cvetenjem in po cvetenju. Ugotovili so, da je prisotnost neril acetata višja pri poganjkih pred cvetenjem in najnižja po cvetenju. To pomeni, da so najvišje vrednosti neril acetata prisotne v začetnih stopnjah rasti rastline, v poznejših (po cvetenju) pa se vrednosti znižajo. Iz tega se lahko sklepa, da monoterpeni prevladujejo v zgodnejših fazah rasti, medtem, ko so seskviterpeni najbolj zastopani v času cvetenja in po cvetenju. Mnogo avtorjev je izpostavilo vpliv nadmorske višine na sestavo eteričnega olja. Usai in sod. (2010) predlagajo nabiranje rastlin na nadmorski višini med 500–700 metri, da se zagotovi bogatost olja z aldehidi, ki so odgovorni za glavno aromo rastline. Ugotovili so, da različne nadmorske višine in izpostavljenost soncu vplivajo na kemijsko sestavo eteričnega olja (Ninčević in sod. 2019).

Bianchini in sod. (2009) so raziskovali vpliv ekoloških dejavnikov in različnih tipov tal na sestavo eteričnega olja laškega smilja. Vzorčili so na 48 lokacijah Korzike in uporabili rastline v različnih razvojnih fazah. Rezultati so pokazali veliko variabilnost v kemijski sestavi eteričnega olja, pri čemer je večina kot glavni spojini vsebovala oksigenirane monoterpeni in neril acetat. Ugotovili so, da anorganska sestava rastlin in tal ter razvojna faza rastline manj vplivajo na kemijsko sestavo eteričnega olja laškega smilja (Ninčević in sod. 2019).

1.6.2 Izvlečki laškega smilja

Izvlečke laškega smilja lahko pridobimo tudi v laboratoriju. Gre za ekstrakcijo z različnimi topili, ki omogočajo izločanje v topilu topnih spojin rastline. Ekstrakcija se večinoma pripravlja z etanolom, metanolom in acetonom. Alkohol je najpogosteje uporabljeno organsko topilo za ekstrakcijo izvlečkov laškega smilja. Pri tem pridobimo izvlečke, ki vsebujejo flavonoide in njihove glikozidne derivate. Z uporabo metanola kot topila so pridobili izvlečke, ki so v glavnem vsebovali flavonoide in acetofone. Aceton je najučinkovitejše topilo za izolacijo arzanola, ki mu pripisujejo največjo biološko aktivnost. Arzanol ima močno protivnetno delovanje, ki so ga proučili na človeških črevesnih epitelnih celicah. Pregled literature potrjuje različne biološke aktivnosti ekstraktov: protivnetne, protivirusne, antioksidativne, protimikrobne, protiglivne, spazmolitične in citotoksične (Maksimović in sod. 2017).

Kramberger in sod. (2020) so izvedli raziskavo, v kateri so ugotavljali metabolični profil dveh podvrst laškega smilja, in sicer: *H. italicum* subsp. *Italicum* ter *H. italicum* subsp. *tyrrhenicum*, ki ju gojijo v poskusnem nasadu v Sloveniji. Primerjali so kemijsko sestavo izvlečkov, glede na topilo, ki je bilo uporabljeno v ekstrakciji. Izvlečki so bili pripravljeni z dvema običajnim postopkoma: maceracija in infuzija. Pripravili so hidroalkoholne in vodne izvlečke (uporabili so hladno in vročo vodo). V vzorcih je bilo identificiranih kar 100 spojin, med katerimi so bile nekatere prvič identificirane. Ključna ugotovitev raziskave je bila, da so se vodni ekstrakti, pripravljeni z vročo vodo, izkazali kot primerljivo aktivni z alkoholnimi, kar potrjuje visok komercialni potencial zeliščnih pripravkov laškega smilja (Kramberger in sod. 2020).

1.7 Namen, cilji ter raziskovalne hipoteze magistrskega dela

Namen magistrskega dela je bil proučiti obseg raznolikosti rastlin laškega smilja v komercialnem nasadu Bonistra d.o.o., kjer najdemo kolekcijo rastlin laškega smilja z otoka Cres in z območja istrskega polotoka Kamenjak. Rastline so bile vzgojene iz semena, pridobljenega iz naravnih rastišč laškega smilja na Cresu in Kamenjaku.

Cilj magistrskega dela je bil potrditi podvrsto laškega smilja ter ugotoviti, ali ustreza deskriptivnim znakom, ki so jih opisali Herrando-Moraira in sod. (2016) ter oblikovati smernice za izbiro genetskega materiala, če bi se odločili za ponovno introdukcijo laškega smilja na območja v Sloveniji, kjer je v preteklosti že uspeval.

Po izvedeni morfološki raziskavi raznolikosti rastlin smo raziskavo nadgradili še z metodami, ki omogočajo proučevanje na ravni genotipa oziroma molekule DNA. V zadnjih dvajsetih letih so bili razviti različni molekularni označevalci. Mikrosateliti se uporabljajo v genetskih raziskavah rastlin za študije raznolikosti, starševske analize, izdelavo genetskih kart in DNA profiliranje rastlin (Bandelj 2006). Mikrosatelitske označevalce je treba razviti za vsako vrsto posebej. Omogočajo razlikovanje med posamezniki znotraj določene vrste. Raziskovalna skupina na UP FAMNIT je tako razvila prve mikrosatelitske označevalce za laški smilj (Baruca Arbeiter in sod., 2021), ki smo jih uporabili za analizo genetske raznolikosti proučevanih rastlin smilja iz komercialnega nasada Bonistra d.o.o.

Zastavili smo si 2 delovni hipotezi:

1. Rastline laškega smilja se morfološko razlikujejo po nekaterih morfoloških znakih: dolžina pravih listov in število koškov v pakobulastem socvetju. Raznolikost je posledica navzkrižne in spontane hibridizacije v naravi.
2. Med geografsko ločenima populacijama z otoka Cres in polotoka v Istri, Rta Kamenjaka, je pričakovati genetske razlike, ki se kažejo v raznolikosti nekaterih morfoloških znakov in polimorfizmu mikrosatelitov.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Kabinetno delo

V sklopu kabinetnega dela smo pregledali literaturo, ki se navezuje na reintrodukcijo rastlin v naravo. Proučili smo slovensko zakonodajo, ki jo je treba upoštevati pri reintrodukciji rastlin. Osredotočili smo se na Uredbo o zavarovanih prostoživečih rastlinskih vrstah (2004) in Zakon o ohranjanju narave (1999). Poiskali smo članke, ki opisujejo projekte, kjer so se ukvarjali z reintrodukcijo.

Pregledali smo primere dobre prakse iz Srbije, kjer so ponovno naselili rtanjsko metvico (*Nepeta rtanjensis*) (Mišić in sod. 2005) in s Sardinije, kjer so ponovno naselili rastlinsko vrsto *Dianthus morisianus* Vals. (Caryophyllaceae) (Cogoni in sod. 2013). Na podlagi pregledane literature in zakonodaje smo oblikovali smernice za reintrodukcijo laškega smilja v naravo na območju Slovenske Istre oziroma na območja, kjer je na podlagi herbarijskih primerkov že uspeval v preteklosti.

2.2 Rastlinski material

Rastlinski material za morfološko in genetsko vrednotenje smo nabrali v nasadu, ki je last podjetja Bonistra d.o.o. (lastnica ga. Jana Bergant). Lastnica nasada je semena laškega smilja pridobila iz naravnih rastišč na otoku Cres in polotoku Kamenjak (Hrvaška). Rastlinski material za morfološko in genetsko vrednotenje smo nabrali 11. 6. 2021 ob jasnem in sončnem vremenu. Rastline laškega smilja so bile v fazi cvetenja. V morfološko in genetsko vrednotenje je bilo vključenih 29 rastlin laškega smilja (23 rastlin s Kamenjaka ter 6 rastlin s Cresa).

Za morfološko vrednotenje smo s posameznega grmička nabrali 5 cvetnih poganjkov. Vseh 29 rastlin, ki so bile vključene v morfološko vrednotenje, smo analizirali s pomočjo mikrosatelitskih označevalcev. Za genetsko vrednotenje smo za vsako vključeno rastlino vzorčili mlade liste. Liste smo takoj po odvzemu prenesli v 2 ml centrifugirko ter prelili s pufrom NaCl – CTAB, da smo preprečili oksidacijo rastlinskega materiala. Na pokrovček centrifugirke smo napisali oznako vzorca rastlinskega materiala. Centrifugirke smo med vzorčenjem na terenu shranjevali v hladilni torbi, nato pa v hladilniku na 4 °C do izolacije DNA.



Slika 3: Nasad laškega smilja, ki je v lasti podjetja Bonistra d.o.o.
Vir: Lasten 2021.

2.3 Morfološko vrednotenje

2.3.1 Meritve morfoloških lastnosti

Morfološko vrednotenje smo izvedli na 29 vzorcih rastlin laškega smilja. Morfološko vrednotenje je zajemalo štetje koškov v pakobulastem socvetju ter merjenje dolžine stebelnih listov laškega smilja. Za morfološko vrednotenje smo potrebovali digitalno pomično merilo za meritve stebelnih listov ter pinceto za lažje štetje števila koškov v pakobulastem socvetju. Za vsako rastlino laškega smilja smo merili po 5 cvetnih poganjkov. Med morfološkim vrednotenjem smo posamezne vzorce fotografirali s pomočjo stereolupe z vgrajeno kamero LEICA EZ4. Morfološke znake smo izbrali na podlagi obsežne študije, ki so jo izvedli Herrando-Moraira in sod. (2016).

2.3.2 Statistična obdelava rezultatov

Statistično obdelavo rezultatov morfološkega vrednotenja laškega smilja smo izvedli v statističnem programu R 3.5.1. Gručenje rastlin, upoštevajoč dolžino listov in število koškov v pakobulastem socvetju, smo izvedli z metodo k-povprečij (funkcija kmeans). Povprečne vrednosti, izračunane za posamezno rastlino, smo pred gručenjem standardizirali s funkcijo scale (pretvorba podatkov na skupno povprečje z vrednostjo 0 in standardnim odklonom z vrednostjo 1). Za določitev števila gručenj smo uporabili funkcijo NbClust (knjižnica NbClust),

ki omogoča hkratno testiranje več indeksov in število gruč določi glede na pravilo večine. Razporeditev rastlin po gručah smo prikazali s funkcijo `fviz_cluster` iz knjižnice `factoextra`. Za primerjavo podatkov med lokacijama smo določili linearni mešani model (angl. Linear Mixed Effect Model – LME), pri čemer smo za slučajni dejavnik določili posamezno rastlino, fiksni dejavnik pa lokacijo. Linearni mešani model smo določili s funkcijo `lmer` (R knjižnica `lme4`) in `p` vrednost pridobili s pomočjo `lmerTest` knjižnice.

2.4 Genetsko vrednotenje

Laboratorijsko delo je potekalo junija 2021 v Laboratoriju za molekularno ekologijo v Izoli.

2.4.1 Izolacija DNA iz rastlinskega materiala

DNA laškega smilja iz 29 vzorcev rastlin laškega smilja smo izolirali iz mladih listnih poganjkov po protokolu, ki so ga objavili Kump in sod. (1992). Postopek izolacije je bil naslednji:

1. Prvi korak pri izolaciji DNA (deoksiribonukleinska kislina) iz rastlinskih tkiv je razbijanje celic, pri čemer se prekinajo vezi med celicami, razbije se celična stena in membrana ter tako sprostimo vsebino celic. Rastlinski material za vsak posamezen vzorec smo zdrobili v terilnici ter mu dodali 1 ml na 65 °C segretega pufra CTAB-PVP (cetil trimetil amonijev bromid – polivinil pirolidon) [2 % (w/v) CTAB, 2 % PVP, 2 M NaCl, 25mM EDTA (pH 8,0), 300 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 % (w/v) β-merkaptoetanol].
2. Nastalo suspenzijo smo prenesli v 2 ml centrifugirko in vzorec 30 minut inkubirali v vodni kopeli pri 65 °C. Vzorec smo vsakih 5 minut premešali.
3. Dodali smo 500 µl topila fenol kloroform: izoamilalkohola (25:24:1) ter dobro premešali na mešalcu (vortex), da je nastala suspenzija. Suspenzijo smo centrifugirali 15 minut pri 14.000 obratih/minuto in pri 4 °C.
4. Supernatant smo previdno odpipetirali v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko. Dodali smo 70 µl 3M Na-acetata (pH 5,2) in 700 µl ledeno hladnega izopropanola.
5. Vzorce smo dobro premešali ter jih dali v zamrzovalnik na -80 °C za 30 minut. Pri tem koraku se DNA obori.
6. Vzorce smo nato 30 minut centrifugirali pri 14000 obratih/minuto. Oborjena DNA se je usedla na dno mikrocentrifugirke. Supernatant smo nato previdno odpipetirali ter dodali 500 µl 70 % etanola in rahlo obračali centrifugirko, da se je DNA odlepila od dna mikrocentrifugirke.
7. Nato smo ponovno centrifugirali 5 minut pri 14000 obratih/minuto. Po končanem centrifugiranju smo previdno odpipetirali etanol ter DNA posušili.

8. Dodali smo 40 μ l pufru TE (raztopina Trisa in EDTA) [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] ter vzorce do nadaljnjih analiz shranili na 4 °C.

Laški smilj je aromatična rastlina in vsebuje številne sekundarne metabolite, zato smo ponovili postopek izolacije z namenom pridobitve čim bolj čiste DNA. DNA raztopljeni v pufru TE, smo ponovno dodali 65 °C segret pufer CTAB-PVP (lizirajoč pufer) ter ponovili vse korake izolacije (Baruca Arbeiter in sod. 2021).

2.4.2 Določanje koncentracije izolirane DNA in redčenje vzorcev

Koncentracijo DNA vseh 29 vzorcev smo izmerili s pomočjo fluorimetra QubitTM (Invitrogen, ZDA) in kompleta za merjenje koncentracije Quant[®] dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, ZDA). Postopek merjenja koncentracije je bil naslednji:

1. Najprej smo pripravili delovno raztopino tako, da smo reagent (Quant – iT Reagent) redčili s pufrom (Quant-iT Buffer) v razmerju 1 : 200.
2. Po 190 μ l delovne raztopine smo odpipetirali v merilni centrifugirki (Quant[®] assay tubes) za standarda. V eno centrifugirko smo dodali 10 μ l standarda 1 (Quant-iT Standard #1), ki ne vsebuje DNA, v drugo centrifugirko pa 10 μ l standarda 2 (Quant-iT Standard #2), ki vsebuje 100 ng/ μ l DNA.
3. Potem smo pripravili še vzorce. V Qubit meritveno posodico smo odpipetirali 198 μ l delovne raztopine in dodali po 2 μ l izolirane DNA. Meritvene posodico smo zaprli in vzorce rahlo premešali, ter počakali 3 min.
4. Na fluorimetru smo izbrali program Quant-iT dsDNA BR in fluorimeter najprej umerili s standardoma 1 (0 ng/ μ L DNA) in 2 (100 ng/ μ L DNA), nato pa izmerili koncentracijo DNA naših vzorcev v μ g/ml.
5. Na podlagi meritev smo vse vzorce razredčili z destilirano vodo na 10 ng/ μ L ter jih do nadaljnjih analiz shranili na -20 °C.

2.4.3 Pomnoževanje mikrosatelitskih označevalcev

Za pomnoževanje DNA laškega smilja smo izbrali mikrosatelitske lokuse, ki so jih razvili in okarakterizirali raziskovalci raziskovalne skupine UP FAMNIT (Baruca Arbeiter in sod. 2021). Seznam osmih izbranih mikrosatelitskih lokusov in nukleotidno zaporedje pripadajočih parov začetnih oligonukleotidov je v Tabeli 1.

Tabela 1: Seznam parov začetnih oligonukleotidov uporabljenih mikrosatelitskih lokusov in osnovni motiv mikrosatelita.

LOKUS	MOTIV	Nukleotidno zaporedje parov začetnih nukleotidov v smeri 5'-3'
HiUP-01	(GT) ₁₀	F: CAACATCAAACATGGCATCTG* R: ATGTAATCCGCCCAATGCT
HiUP-02	(GT) ₁₀	F: TTGCTTTGTATTGCTGTCTATCC* R: GGAAACGTCCTGCAAGATTA
HiUP-09	(TG) ₁₅	F: ACCGTAAGAAGGGCCAATTT* R: CCCATGTTGCCACCTCTAAT
HiUP-13	(TGA) ₈	F: CCAAGTTGATGATCTCCAATGA* R: TATCCATGGCTTTCTACCCA
HiUP-16	(CAG) ₇	F: GGGCCTGTAATGAAGGTGTT* R: TATTGCGCGATCCTGATTCT
HiUP-18	(TAG) ₇	F: CCACTAACCATTCAACCCTGG* R: ATGATGATCCATCGAACTGTAATC
HiUP-22	(AAT) ₇	F: TTGCTCACACCTGGATTCTG* R: CGTATTGATTGCAATGCCTTT
HiUP-24	(TTA) ₉	F: TTGGAGTACAAGGTTGGGAA* R: CCGGTACATTAACACCCACC

*eden od začetnih nukleotidov na 5' koncu je podaljšan z 18 baznih parov dolгим univerzalnim zaporedjem M13 (-21) (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3')

Za pomnoževanje mikrosatelitskih označevalcev smo pripravili 12,5 µL reakcijske mešanice, ki je vsebovala 0,2 µM vsakega lokusno specifičnega začetnega oligonukleotida, 0,25 µM univerzalnega začetnega oligonukleotida M13 (-21), označenega s fluorescentnim barvilom 6-FAM. VIC, PET ali NED (Applied Biosystems), 1-krat priložen pufer AllTaq PCR (Qiagen), 1x priložena raztopina Q (Qiagen), 2mM MgCl₂, mešanico dNTP (0,2 mM vsakega dNTP) (Qiagen), 1,25 enot AllTaq DNA polimeraze (Qiagen) in 40 ng vzorčne DNA. Za pomnoževanje DNA smo uporabili ciklični termostaat SimpliAmp™ (ThermoFisher Scientific) in naslednji temperaturni profil:

- 5-minutna denaturacija pri 94 °C,
- 30 ciklov s ponavljanjem:
 - 30 sekund pri 94 °C,
 - 45 sekund pri 56 °C,
 - 45 sekund pri 72 °C;
- 8 ciklov s ponavljanjem:
 - 30 sekund pri 94 °C,
 - 45 sekund pri 53 °C,
 - 45 sekund pri 72 °C;
- zadnji korak pomnoževanja pri 72 °C, ki je trajal 8 minut (Schuelke 2000).

Vzorci smo do nadaljnjih analiz shranili v hladilniku na 4 °C.

2.4.4 Vrednotenje dolžin pomnoženih alelov in statistična obdelava podatkov

Fragmentna analiza je bila izvedena na genetskem analizatorju SeqStudio™ (ThermoFisher Scientific), za velikostni razred pa smo uporabili GeneScan™ 500 LIZ (ThermoFisher Scientific). Dobljene rezultate fragmentne analize smo uvozili v programski paket Gene mapper v. 4.1. (ThermoFisher Scientific) in s pomočjo programa pridobili podatke o prisotnosti, dolžinah alelov in intenziteti fluorescentnega signala.

Za izračun opažene heterozigotnosti (H_o), pričakovane heterozigotnosti (H_e), števila alelov na lokus (n) ter informacijske vrednosti polimorfizma (PIC) smo uporabili računalniški program Cervus 3.0.3. (Marshall in sod. , 1998). S programom Identity 1.0 (Wagner in Sefc 1999) smo izračunali vrednost verjetnosti enakosti genotipov (PI). V programu GenAlEx 6.5 (Peakall in Smouse 2012) smo izračunali število edinstvenih alelov (n_u) in Hardy-Weinbergovo ravnovesje. Za izračun genetskih razdalj smo uporabili Dice-ov koeficient podobnosti, ki meri delež skupnih namnoženih fragmentov. Vrednosti izračunanih koeficientov so med 0, kar pomeni, da genotipa nimata skupnega alela, in 1, kjer imata genotipa prisotne identične alele – sta identična. Binarno matriko koeficientov smo uporabili za razvrstitev vzorcev v sorodstvene skupine z metodo aritmetičnega povprečja neutežnih parov (UPGMA – angl. Unweighted Pair Group Method). Za izračun koeficientov podobnosti in razvrstitev vzorcev v sorodnostne skupine smo uporabili računalniški program PAST 3.25. (Hammer in sod. 2001).

3 REZULTATI

3.1 Kabinetno delo

V sklopu kabinetnega dela smo proučili veljavno zakonodajo, primere dobrih praks ter oblikovali smernice za reintrodukcijo laškega smilja v okolje, kjer je v preteklosti že uspeval. Avtohtonim rastlinskim vrstam pretijo vse večje grožnje, ki so posledica degradacije življenjskega prostora. Degradacija je posledica onesnaženja, zaraščanja, intenzivnega kmetijstva ter vnosa tujerodnih vrst, pomemben vpliv pa imajo tudi globalne podnebne spremembe (Ricketts in sod. 2005; Thuiller 2007 v Godefroid in sod. 2011). V prihodnosti je pričakovati, da se bodo potrebe po naravnih virih še povečale, zaradi česar bo najverjetneje nastalo še več degradiranih območij ter vse več bo rastlinskih in živalskih vrst, ki bodo izumrle ali pa bodo potisnjene na rob izumrtja (McNaughton 1989 v Godefroid in sod. 2011). Učinkovit naravovarstveni ukrep je obnova habitatov, katerega cilj je ohranjanje in zavarovanje rastlinskih vrst, ne da bi bila potrebna njihova ponovna naselitev (Menges 2008 v Godefroid 2011). Prednostno se spodbujata varovanje vrst in ohranjanje populacij v njihovem naravnem habitatu, vendar v nekaterih primerih to ni mogoče. V takšnih primerih predstavlja rešitev reintrodukcija posameznih rastlin v naravo (Akeroyd in Jackson 1995 v Godefroid in sod. 2011). Osnovni biološki namen reintrodukcije je vzpostavitev novih ali okrepitev obstoječih populacij z namenom povečati možnost preživetja vrst (Pavlik 1996; Van Groenendael in sod. 1998; Luijten in sod. 2002 v Godefroid in sod. 2011).

Pri pregledu dobrih praks smo se osredotočili na dva primera. V Srbiji so ponovno naselili rtanjsko metvico (*Nepeta rtanjensis* Diklic & B.Milojevic), ki je endemična in kritično ogrožena. Na območje, kjer je rastlina v preteklosti že uspevala, so posadili 1000 rastlin in v sklopu rednega monitoringa spremljali uspeh reintrodukcije. Sam proces je bil uspešen, saj so rastline rastle in uspevale (Mišić in sod. 2005). Drugi primer je rastlina *Dianthus morisianus* Vals. (Caryophyllaceae), ki je endemična za Sardinijo. Reintrodukcijo so izvedli v novembru leta 2010. Preživelih 113 rastlin so posadili 150 m stran od naravne populacije na istem območju. Monitoringe so izvajali redno, vsak mesec. Dve leti pozneje je bila stopnja preživetja večja kot 95 %. Ta raziskava poudarja predvsem, kako pomembno je prepoznati pravilen mikrohabitat za reintrodukcijo izbrane rastline. Uporaba juvenilnih osebkov rastline je pomagala pri uspehu ponovne uvedbe, saj so zmanjšali stopnjo umrljivosti (Cogoni in sod. 2013).

3.1.1 Slovenska zakonodaja

V Uredbi o zavarovanih prostoživečih rastlinskih vrstah (2004) je v 6. členu zapisano, da potrebujemo dovoljenje za uničevanje, odvzem iz narave, poškodovanje ali zbiranje rastlin. Poleg tega potrebujemo dovoljenje tudi za obnovitev rastlinske populacije, doseljevanje in ponovno naseljevanje rastlin. Dovoljenje mora vključevati načine razmnoževanja teh rastlin oziroma možnosti pridobitve začetne kulture za gojenje rastlin. Na priloženem seznamu zavarovanih avtohtonih slovenskih rastlinskih vrst ne najdemo laškega smilja. Zato vemo, da laški smilj pri nas ni zavarovana vrsta in da zanjo ne potrebujemo posebnih dovoljenj za odvzem iz narave.

Zakon o ohranjanju narave (1999) v 11. členu opredeli pojem gojitev rastlin kot gojenje rastlin domorodnih ali tujerodnih vrst z namenom pridobivanja hrane, prodaje, za okras, za industrijske ali zdravilne namene, namene učno-vzgojnega ali znanstvenoraziskovalnega dela ter zaradi ohranitve vrste.

3.1.2 Smernice za reintrodukcijo laškega smilja v naravno okolje

V skladu z Uredbo o zavarovanih prostoživečih rastlinskih vrstah (2004) je treba pridobiti dovoljenja za obnovitev rastlinske populacije, doseljevanje in ponovno naseljevanje rastlin. Treba je vključiti tudi možnosti pridobitve začetne kulture za gojenje rastlin. Na podlagi herbarijskih zbirk je treba preveriti lokacije, kjer se je laški smilj že nahajal, ter ugotoviti ali so lokacije primerne za ponovno uvedbo rastline v naravno okolje (pregled rastišč in tal). V preteklosti laškemu smilju niso posvečali velike pozornosti.

Laški smilj je v preteklosti uspeval na območju jugozahodne Slovenije. Prvi primerek rastline so našli leta 1844 pri Ilirski Bistrici. V naravnem okolju na območju Slovenije laški smilj trenutno ne raste. Domneva se, da je to posledica zaraščanja površin in opuščanje paše živali (Bandelj in sod. 2020 (b)). Uspeval je na območju, kjer ima na klimatske razmere velik vpliv morje. Gre torej za območje, kjer je značilna visoka minimalna temperatura skozi celotno leto. Količina padavin je nizka, saj v povprečju pade okoli 1450 mm padavin. V poletnem času pade najmanj padavin. Temperaturni režim je skoraj enak sredozemskemu. To podnebje poimenujemo omiljeno sredozemsko podnebje (Kozjek 2016).

V zadnjih 15 letih je zanimanje za laški smilj naraslo, predvsem zaradi eteričnega olja, ki na trgu dosegajo visoko ceno in velja za enega najdražjih (Bandelj in sod. 2020 (b)). Vse večje zanimanje za laški smilj je sprožilo gojenje v kmetijstvu, kjer laški smilj velja za uspešno in pionirsko rastlino. To pomeni, da se po končanih motnjah, ki so prisotne v okolju, laški smilj pojavi kot prva rastlina. Laški smilj je rastlina, ki je prilagojena na ekstremne (rast na

visokih nadmorskih višinah) in ostre pogoje (aridnost, vetrovi). Zaradi vse bolj ekstremnih podnebnih razmer in odpornosti laškega smilja na le te, bi veljalo razmisliti o reintrodukciji rastline. Reintrodukcija oz. ponovna uvedba vključuje vzpostavitev novih populacij in ponovno naselitev izginulih populacij. Z reintrodukcijo lahko izboljšamo ali povečamo že obstoječe populacije. Ponovna uvedba ne vključuje translokacije (z odstranitvijo in presaditvijo) naravno prisotnih rastlin z ene lokacije na drugo. Osnovni biološki namen je vzpostavljanje nove ali povečanje velikosti ali raznolikosti že obstoječih populacij. Projekti reintrodukcije lahko služijo tudi izobraževanju javnosti (Guerrant in Kaye 2007).

Stanje območja je ključni dejavnik pri uspehu reintrodukcije. Pogoje, ki jih ponuja lokacija, je treba poznati že pred samim začetkom projekta. Tla so eden izmed najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na preživetje rastlin. Raziskati moramo: teksturo tal, ki vpliva na nivo vlage in izmenjavo hranil; pH, ki vpliva na zmožnost rastlin za črpanje hranil; organski material, ki vpliva na dostopnost hranil in stopnjo vlage; kompaktnost tal, ki otežuje koreninam, da prodrejo v tla in vpliva tudi na kroženje hranil, ter ostanke herbicidov ali pesticidov, ki lahko prizadenejo rastline in z njimi povezane žuželke. Različne rastline imajo rade različne ravni vlage. Hidrologija izbrane lokacije bo določila količino vode, ki je na voljo rastlinam skozi celo leto. Poznati moramo aktualno rastlinsko sestavo lokacije, kamor želimo ponovno naseliti rastline. Vedeti moramo, ali bo ponovna uvedba rastlin vplivala na že prisotne rastline ter ali to lahko povzroči težave pri ponovni naselitvi. Poznati moramo tudi motnje, ki so prisotne v izbranem ekosistemu, saj ga le-te oblikujejo (Dorner 2002). Laški smilj najdemo v tleh z različno podlago. Reintrodukcijo moramo tako načrtovati v dobro odcednih, lahkih peščenih, plitkih in srednje težkih ilovnatih tleh. Tla morajo biti bogata s kalcijem, vendar ne smejo imeti kislega pH. Tla ne smejo biti težka in vsebovati večjih količin vode. V primeru povečane vlage v tleh bi lahko pričakovali pojav bolezni, ki jih povzročajo glive. Laški smilj je izrazito sonceljubna rastlina, zato moramo reintrodukcijo izvesti na dobro osončenih legah. V senci in polsenci rastline slabo uspevajo (Bandelj 2020 (b)). Prav tako je pomembno poznavanje rabe tal oziroma dejavnosti, ki se odvijajo na mestu, kamor načrtujemo zasaditev (paša, košnja travnikov, prisotnost zaraščanja zaradi opuščanja tradicionalne rabe tal).

Razumeti moramo, do katerih motenj je prišlo v preteklosti, ki so morda vplivale na lokalno skupnost in povzročile, da so rastline izginile z območja (kemično onesnaženje, fragmentacija, paša, invazivne vrste, urbanizacija, zaraščanje prostora). Poznati moramo tudi motnje, ki se lahko zgodijo v prihodnosti in vplivajo na ekološko ravnovesje. Podnebje območja in specifična mikroklima lokacije ponovne naselitve sta pomembna dejavnika, ki vplivata na razpoložljivost vode, količino sončne svetlobe ter najvišje in najnižje temperature. Vsi ti dejavniki vplivajo na sposobnost vsake rastline, da raste in preživi (Dorner 2002).

Po pregledu stanja lokacij, kjer je laški smilj uspeval v preteklosti, sledi izbor in priprava rastlinskega materiala, ki bi ga uporabili v postopku ponovne naselitve. Rastlinski material za reintrodukcijo lahko vzgojimo iz semen, nabranih v naravi in s pomočjo vegetativnega razmnoževanja (potaknjenci). Pri tem je treba pozornost nameniti pravilni identifikaciji sadilnega materiala, izbiri zdravih rastlin, s katerih nabereмо semena, nabiranje zrelih semen. Celoten postopek je treba skrbno beležiti (lažje odpravimo napake) ter uporabljati čiste pripomočke, da preprečimo kontaminacijo rastlinskega materiala (Marshall 2011).

Zaradi varovanja obstoječih naravnih rastišč laškega smilja je najprimernejši način nabiranje semen ter nadaljnje generativno razmnoževanje vrste. Najbolj primeren genski material za ponovno naselitev laškega smilja v Sloveniji bi zaradi bližine in večje možnosti podobnosti genetskega materiala predstavljale lokacije v Istri, od Dragonje, Savudrije do Kamenjaka, ter morda tudi nekoliko bolj oddaljene lokacije od Reke do Velebita. Republika Hrvaška je podpisnica Nagojskega protokola o dostopu do genskih virov ter pošteni in pravični delitvi koristi, ki izhajajo iz njihove uporabe (2014), kar pomeni, da je predhodno potrebno preveriti veljavno zakonodajo in regulativne zahteve o dostopu in delitvi koristi do rabe genskih virov.

Naša dejavnost ne sme ogroziti preživetja ali ustvarjati motenj v ekosistemu avtohtonih rastlin. Dobro bi se bilo povezati tudi s hrvaškimi pridelovalci laškega smilja. Sledi vzgoja sadik iz izbranih semen v rastlinjaki. Sadike je treba gojiti najmanj dve leti, da se rastline okrepijo in ustrezno razrastejo ter da razvijejo močan koreninski sistem. Po saditvi rastlin je potrebno redno ocenjevanje biološkega uspeha na podlagi rednega monitoringa. Poskusne zasaditve redno spremljamo z namenom, da se ugotovi ali ima izbrano območje potrebne pogoje za rast ter nadaljnje samostojno razmnoževanje posajenih rastlin.

V začetku ponovne naselitve je dobro izvajati pogostejše monitoringe, saj s tem ugotovimo, kateri način zasaditve bo najustreznejši (semena ali sadike). Monitoring običajno vključuje: spremljanje zaraščanja z drugimi invazivnimi vrstami, ki so prisotne na območju, pojav škodljivcev in širjenje patogenov, prisotnost opraševalcev. Odvzeti je potrebno tudi vzorce novih rastlin in analizirali njihovo genetsko raznolikost, s čimer pridobimo podatke o uspešnosti spontane hibridizacije oziroma generativnega razmnoževanja. Po uspešni poskusni reintrodukciji se lahko načrtuje posaditev na druge primerne lokacije. Zgodovinske lokacije so bile od 500 do 700 m nadmorske višine, zato bi najprej poskusili reintroducirati rastlino na tej višini.

Tudi reintrodukcija ima lahko potencialne pozitivne vplive. Če je reintrodukcija uspešna in rastline uspešno rastejo pomeni, da imamo v naravi ponovno prisotno rastlino, ki je zaradi zaraščanja habitata izginila iz narave. Lokalno prebivalstvo na izbranih območjih ponovne

naselitve je treba poučiti, da so varuhi posajenih rastlin. Lokalno prebivalstvo lahko opozarja in nadzoruje obiskovalce, da se rastlin v njihovem naravnem okolju ne trga. Ponekod na Hrvaškem je bil problem ravno nenadzorovano odnašanje rastlinskega materiala iz narave.

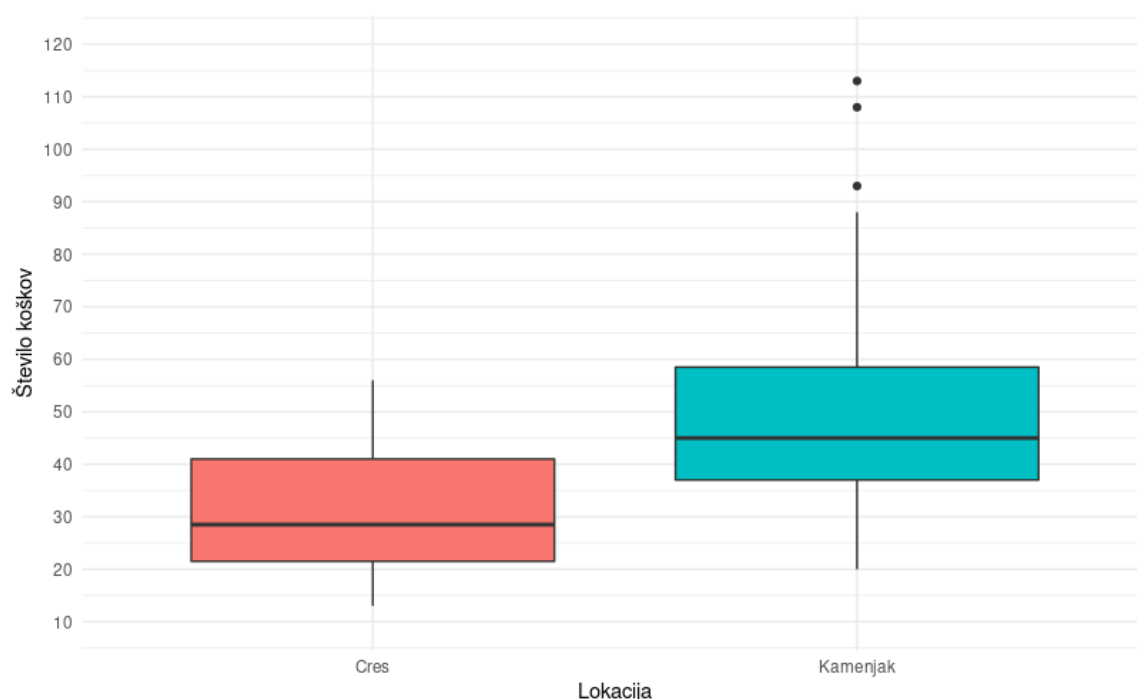
Lokalno prebivalstvo, ki bi sodelovalo pri samem projektu, bi bilo treba poučiti, izvesti seminarje in izobraževanja. Predstaviti jim je treba celoten projekt, tako pozitivne kot negativne vidike, in jih seznaniti s celotnim potekom projekta. Glede financiranja samega projekta bi bilo smiselno razmisliti o prijavi na projekt LIFE.

V kolikor projekt reintrodukcije ni dobro načrtovan in izpeljan, lahko privede do nepopravljive škode. Primarna skrb naravovarstvenikov je ohranjanje genetske spremenljivosti znotraj in med rastlinskimi populacijami. Vse ponovne uvedbe bi morale biti usmerjene v vzpostavljanje prožne in samooskrbne populacije z genskimi viri, ki so potrebni za prihodnje evolucijske spremembe. Reintrodukcija lahko neposredno ali z neprimernim nameščanjem genov iste ali sorodne vrste v domačo rastlinsko populacijo povzroči hibridizacijo in posledično izgubo genetske raznolikosti oz. pestrosti populacije (Parkin 2005). Pri reintrodukciji laškega smilja v naravno okolje bojazni za hibridizacijo ni, saj v naravi trenutno ne uspeva in se posledično osebki ne morejo križati med seboj.

Projekt ponovnega uvajanja je po definiciji eksperimentalen, zato potrebujemo obvezo, da bodo projekti prišli do zaključka. Z malo sreče je lahko rezultat uspešno uveljavljena populacija, a tudi če poskus ne uspe, je treba razumeti, zakaj. Na žalost se zaradi različnih razlogov (prekinitev financiranja, odvrčanje od zgodnjih rezultatov, domneve o sposobnosti populacije, da postane samooskrbna brez stalnega upravljanja itd.) reintrodukcijam posveča vse manj pozornost (Parkin 2005).

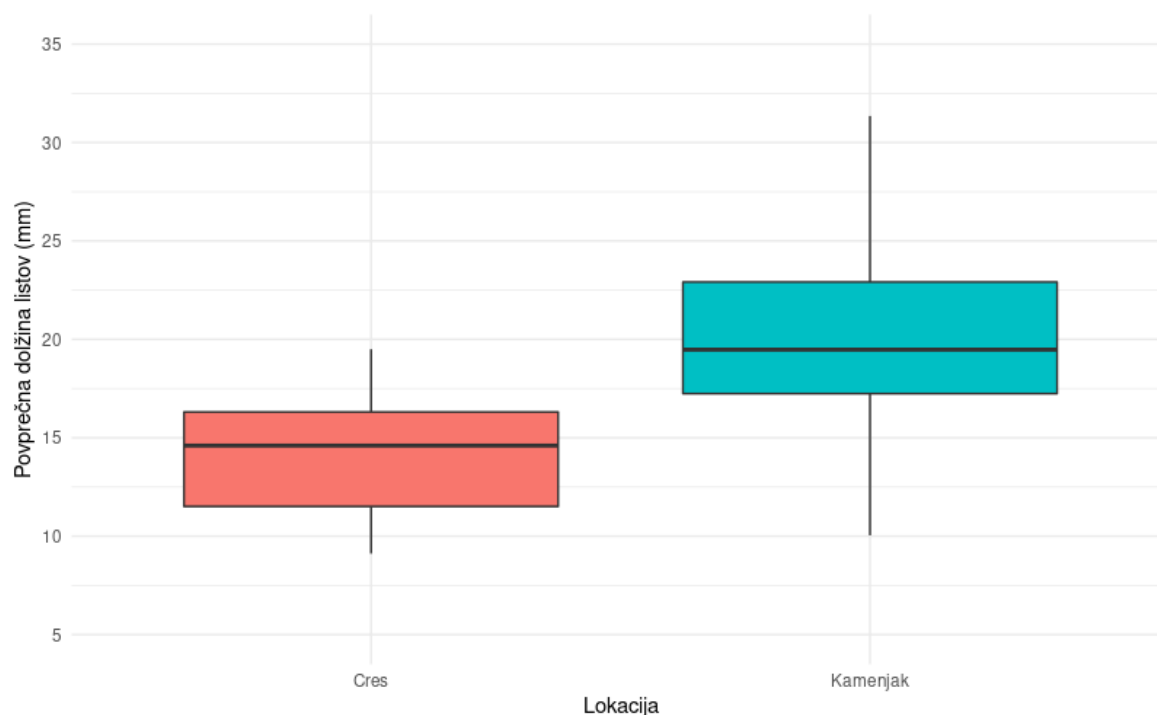
3.2 Morfološko vrednotenje

Iz podatkov meritev dolžine listov in število koškov v pakobulastem socvetju laškega smilja smo v programu R 3.5.1 izdelali škatlo z brki (Slika 4 in 5).



Slika 4: Škatla z brki za število koškov v pakobulastem socvetju laškega smilja – obe lokaciji.

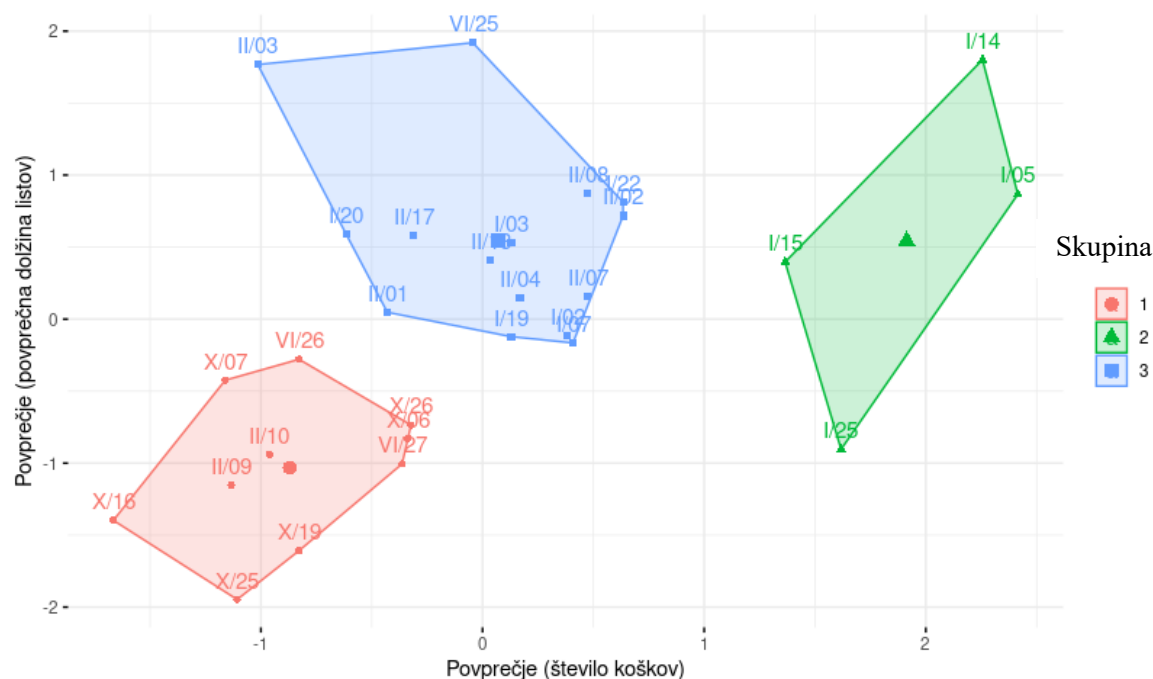
Na Sliki 4 je prikazana škatla z brki za število koškov v pakobulastem socvetju za vseh 29 rastlin laškega smilja, ki smo jih uporabili za morfološko vrednotenje. Vzorci s Cresa so imeli minimalno 13 koškov v pakobulastem socvetju, maksimalno pa 56. Vzorci s Kamenjaka so imeli večje minimalno število koškov v pakobulastem socvetju (20). Tudi maksimalna vrednost koškov v pakobulastem socvetju je bila večja pri vzorcih s Kamenjaka (113). Pri interpretaciji rezultatov je treba poudariti, da so bile rastline, katerih semena izvirajo s polotoka Kamenjak, številčno bolj zastopane, kar pomeni, da bi bili rezultati lahko drugačni, če bi imeli enakomerno število vzorcev iz obeh lokacij.



Slika 5: Škatla z brki za dolžino listov laškega smilja - obe lokaciji.

Na Sliki 5 je prikazana škatla z brki za dolžino listov laškega smilja za vseh 29 vzorcev rastlin, katerih semena izvirajo iz Cresa in Kamenjaka. Tudi tukaj smo izmerili manjše vrednosti dolžine listov pri vzorcih rastlin, katerih semena izvirajo s Cresa. Najkrajša dolžina lista je znašala 9,12 mm, najdaljši list pa je bil dolg 19,50 mm. Pri vzorcih rastlin, katerih semena izvirajo s polotoka Kamenjak, so minimalne in maksimalne vrednosti višje. Najkrajši list je meril 10,05 mm, medtem ko je bil najdaljši list dolg 31,35 mm.

V naslednjem koraku smo za potrebe analize gručenja izračunali povprečno število cvetov in dolžino listov za posamezen grmiček laškega smilja. Sledila je analiza gručenja z metodo k-povprečij. Z metodo, implementirano v funkciji NbClust, smo določili, da lahko rastline razvrstimo v 3 gruče.



Slika 6: Vzorci razdeljeni v 3 gruče z metodo k-povprečij.

Na Sliki 6 je prikazana razvrstitev rastlin v 3 skupine. Razvidno je, da so se v eno skupino razvrstili zgolj vzorci, ki so posajeni v prvi vrsti nasada Bonistra d.o.o. (gruča 2). Vzorci, katerih semena izvirajo s polotoka Kamenjak, so se razvrstili v dve večji skupini (gruči 1 in 3). Poleg tega se v tretji skupini nahaja tudi šest rastlin, katerih semena izvirajo s Cresa.

Za primerjavo podatkov med lokacijama smo določili linearni mešani model. Za omenjeni pristop smo se odločili, ker skupine vzorcev niso enakomerno porazdeljene. V primeru analize dolžin listov smo ugotovili, da variabilnost grmičkov obrazloži 51 % celotne variabilnosti. Na osnovi statistične analize lahko trdimo, da se povprečna dolžina listov med lokacijama statistično značilno razlikuje ($p=0,0056$). Pri analizi števila koškov v pakobulastem socvetju smo ugotovili, da variabilnost med rastlinami predstavlja 47 % celotne variabilnosti. Glede na rezultate statistične analize lahko trdimo, da je tudi razlika v številu koškov med lokacijama statistično značilna ($p=0,0101$).

3.3 Karakterizacija mikrosatelitskih lokusov

Devetindvajset vzorcev laškega smilja (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don), katerih semena izvirajo s Cresa ter polotoka Kamenjak smo genotipizirali z osmimi mikrosatelitskimi lokusi. Parametri genetske variabilnosti so predstavljeni v Tabeli 2. Z osmimi pari lokusno specifičnih oligonukleotidov smo pomnožili 65 polimorfnih alelov.

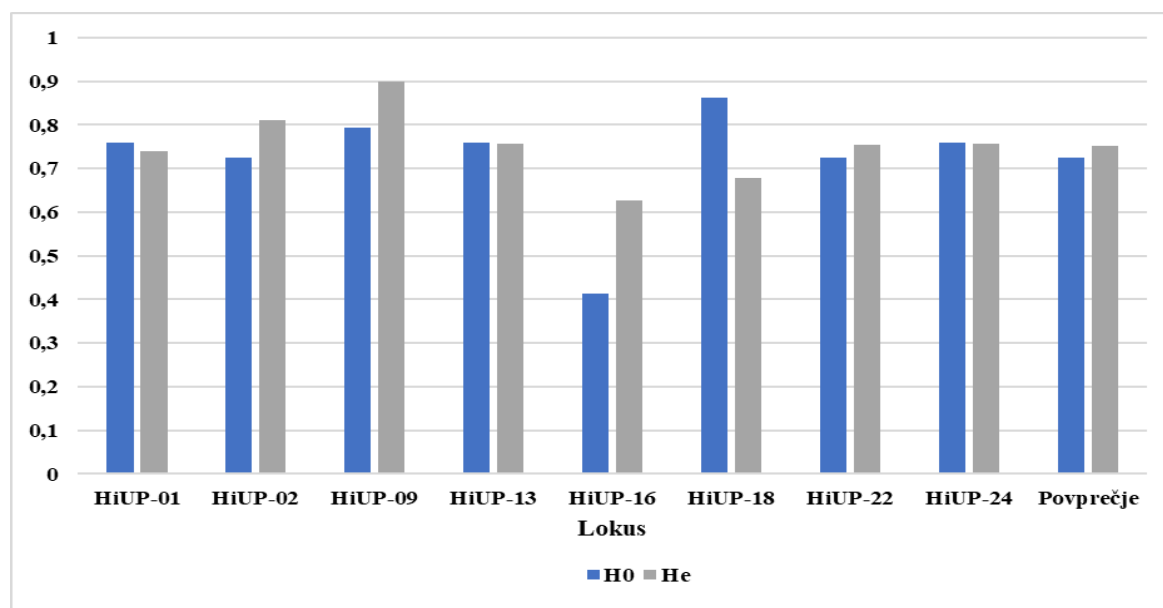
Število alelov na lokusih je bilo med 5 in 13. Največ alelov smo odkrili na lokusu HiUP-09 (13), najmanj pa na lokusu HiUP-16 (5). Povprečno število alelov na lokus je znašalo 8,13.

Tabela 2: Parametri genetske variabilnosti po posameznih lokusih. Število alelov (n), število edinstvenih alelov (nu), opažena (H_o) in pričakovana (H_e) heterozigotnost, informacijska vrednost polimorfizma (PIC) in verjetnost enakosti genotipov (PI).

LOKUS	n/nu	H_o/H_e	PIC	PI
HiUP-01	7/1	0,759/0,739	0,683	0,204
HiUP-02	12/7	0,724/0,811	0,772	0,115
HiUP-09	13/8	0,793/0,900	0,873	0,046
HiUP-13	7/3	0,759/0,756	0,706	0,177
HiUP-16	5/2	0,414/0,627	0,565	0,300
HiUP-18	7/3	0,862/0,679	0,622	0,244
HiUP-22	6/1	0,724/0,754	0,703	0,181
HiUP-24	8/4	0,759/0,757	0,716	0,151
Povprečje	8,13/	0,724/0,752	0,705	/
Skupno	65/29	/	/	$3,82 \times 10^{-7*}$

*Zmnožek PI vrednosti vseh 8 mikrosatelitskih lokusov.

Vrednosti opažene heterozigotnosti (H_o) so se gibale od 0,414 do 0,862. Opažena heterozigotnost je bila pri treh lokusih (HiUP-01, HiUP-13, HiUP-24) enaka, znašala je 0,759. Najnižjo opaženo heterozigotnost smo odkrili pri lokusu HiUP-16, najvišjo opaženo heterozigotnost pa pri lokusu HiUP-18. Povprečna vrednost opažene heterozigotnosti je znašala 0,724. Vrednosti pričakovane heterozigotnosti (H_e) so gibale od 0,627 do 0,900. Najnižjo vrednost smo odkrili pri lokusu HiUP-16, najvišjo pa pri lokusu z oznako HiUP-09. Povprečje pričakovane heterozigotnosti je znašalo 0,752.



Slika 7: Opažena (H_o) in pričakovana (H_e) heterozigotnost na posameznem lokusu.

Iz Slike 7 je razvidno, da je opažena heterozigotnost (H_o) višja od pričakovane na štirih lokusih (HiUP-05, HiUP-13, HiUP-18 in HiUP-24). Največjo razliko med opaženo in pričakovano heterozigotnostjo smo opazili na lokusu HiUP-16.

Izračunali smo tudi informacijsko vrednost polimorfizma (PIC) ter oceno verjetnosti enakosti genotipov (PI). Vrednosti PIC so odvisne od števila alelov in frekvenc posameznih alelov. Najvišjo vrednost PIC smo opazili na lokusu HiUP-09 (0,873), najnižjo pa na lokusu HiUP-16 (0,565). Vsi lokusi so imeli vrednost PIC višjo od 0,5, kar pomeni, da se uvrščajo med informativne lokuse. Lokusi z oznakami HiUP-02, HiUP-09, HiUP-13, HiUP-22 in HiUP-24 so imeli PIC vrednost višjo od 0,7, kar pomeni, da so zelo informativni in so lahko primerni za genetsko kartiranje. Najnižjo vrednost PI (0,046) smo odkrili na lokusu HiUP-09, najvišjo (0,300) pa na lokusu HiUP-16. Verjetnost, da bosta izbrana posameznika laškega smilja identična, je zelo majhna.

Tabela 3: Opažena (H_o) in pričakovana (H_e) heterozigotnost, vrednost P ter statistična značilnost izračunane v testu Hardy-Weinbergovega ravnovesja.

LOKUS	H_o	H_e	Vrednost - P	Statistična značilnost
HiUP-01	0,759	0,739	0,841	statistično neznačilno
HiUP-02	0,724	0,811	0,001	$P < 0,01$
HiUP-09	0,793	0,900	0,125	statistično neznačilno
HiUP-13	0,759	0,756	0,555	statistično neznačilno
HiUP-16	0,414	0,627	0,000	$P < 0,001$
HiUP-18	0,862	0,679	0,686	statistično neznačilno
HiUP-22	0,724	0,754	0,894	statistično neznačilno
HiUP-24	0,759	0,757	0,182	statistično neznačilno

Pri dveh lokusih smo ugotovili, da je P-vrednost manjša od 0,01 (HiUP-02) oz. manjša od 0,001 (HiUP-16). Za ostale mikrosatelitske lokuse velja statistična neznačilnost (Tabela 3).

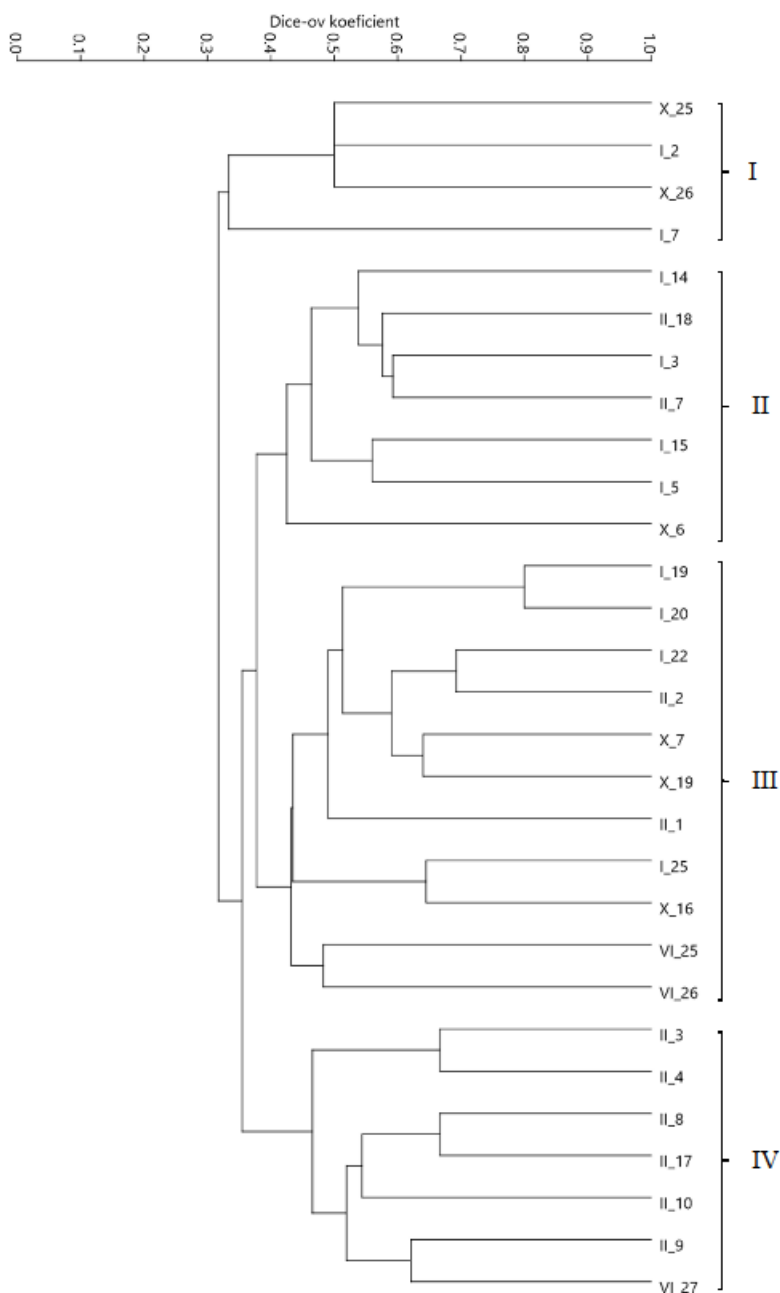
Tabela 4: Edinstveni aleli.

LOKUS	ALEL	VZOREC (vrsta/rastlina)	LOKACIJA
HiUP-01	248	X/26	Cres
HiUP-02	154	I/7	Kamenjak
HiUP-02	158	II/1	Kamenjak
HiUP-02	164	I/3	Kamenjak
HiUP-02	166	I/22	Kamenjak
HiUP-02	171	I/7	Kamenjak
HiUP-02	150	X/25	Cres
HiUP-02	177	X/25	Cres
HiUP-09	280	X/25	Cres
HiUP-09	245	II/9, II/10, II/17, VI/25, VI/26, VI/27	Kamenjak
HiUP-09	247	II/18	Kamenjak
HiUP-09	249	II/2, II/8	Kamenjak
HiUP-09	253	II/1, II/18, VI/25, VI/26	Kamenjak
HiUP-09	259	I/15	Kamenjak
HiUP-09	261	I/15, II/7	Kamenjak
HiUP-09	273	I/5, II/4	Kamenjak
HiUP-13	162	I/7	Kamenjak
HiUP-13	165	I/19, I/20, II/1	Kamenjak
HiUP-13	175	I/3	Kamenjak
HiUP-16	164	II/1, II/18	Kamenjak
HiUP-16	167	I/15	Kamenjak
HiUP-18	196	VI/26	Kamenjak
HiUP-18	211	VI/27	Kamenjak
HiUP-18	223	I/15	Kamenjak
HiUP-22	264	X/6	Cres
HiUP-24	217	X/7, X/16	Cres
HiUP-24	268	I/14, II/7, II/10, II/17	Kamenjak
HiUP-24	280	VI/27	Kamenjak
HiUP-24	282	II/3, II/4, II/9	Kamenjak

Med 65 aleli smo odkrili 29 edinstvenih alelov. Največ alelov je bilo odkritih na lokusu HiUP-09, in sicer 8. Sledil mu je lokus HiUP-02 s 7 odkritimi aleli. Po en alel smo odkrili na lokusu HiUP-01 in HiUP-22, in sicer pri vzorcih, katerih semena izvirajo s Cresa. Za vzorce z izvorom semena s Cresa je bilo odkritih manj alelov, in sicer 6. Ostali odkriti aleli so pri vzorcih z izvorom semena s polotoka Kamenjak (Tabela 4). Eden izmed razlogov za večje

število edinstvenih alelov pri rastlinah s polotoka Kamenjak je lahko večje število vzorcev, vključenih v analizo s tega območja. Veliko število odkritih edinstvenih alelov v splošnem nakazuje na zelo heterogen rastlinski material, kar pomeni, da je laški smilj rastlina z veliko genetsko raznolikostjo.

3.4 Razvrščanje laškega smilja v sorodnostne skupine



Slika 8: Dendrogram podobnosti po metodi UPGMA.

Iz Dice-ovih koeficientov podobnosti med vzorci rastlin laškega smilja smo z metodo UPGMA izdelali sorodstveno drevo oziroma dendrogram (Slika 7). Iz dendrograma je razvidno, da so se vzorci razdelili v 4 zaokrožene skupine. V I. skupino so uvrstili vzorci z oznako X/25 in X/26, katerih semena izvirajo s Cresa, ter vzorca z oznako I/2 in I/7, katerih semena izvirajo s Kamenjaka. V II. skupino se je razvrstilo 7 vzorcev od tega 6 vzorcev, katerih semena izvirajo s Kamenjaka, in en vzorec s poreklom s Cresa. V III.,

najštevilčnejšo skupino se je razvrstilo 11 vzorcev, od tega 8 vzorcev s Kamenjaka in 3 s Cresa. V IV. skupino se je uvrstilo 7 vzorcev. Gre za skupino, ki se je pokazala kot geografsko najbolj homogena skupina, saj so se vanjo uvrstili samo vzorci s Kamenjaka.

4 DISKUSIJA

4.1 Smernice za reintrodukcijo laškega smilja

Laški smilj je aromatična trajnica, ki je razširjena v Sredozemlju. Na podlagi hranjenih herbarijskih primerkov Herbarijske zbirke Univerze v Ljubljani, je v preteklosti uspeval tudi v Sloveniji. Predvideva se, da je zaradi zaraščanja naravnih rastišč prišlo do izgube življenjskega prostora laškega smilja (Bandelj in sod. 2020). Smiselno je proučiti možnosti za reintrodukcijo laškega smilja v naravno okolje, pri čemer strmimo k ponovni vzpostavitvi populacije v okolje, kjer je v preteklosti že uspevala.

Na podlagi pregleda dobrih praks smo ugotovili, da je za reintrodukcijo potrebno dobro poznavanje mikrohabitata, biologije vrste, življenjskega cikla vrste ter morebitne kritične faze življenjskega cikla. Zavedati se moramo, da se je okolje nekoč in danes spremenilo, zato se je treba vprašati, ali so se rastline oziroma rastlinska vrsta, ki jo želimo ponovno naseliti, sposobne uspešno prilagajati na spremembe v okolju. Ko se odločimo za reintrodukcijo je najprej treba pridobiti ustrezna dovoljenja v skladu z veljavno zakonodajo v Sloveniji in v državi, iz katere želimo prenesti rastlinski material. V primeru laškega smilja bi bilo najprimernejše, da se rastlinski material prenese iz sosednje Hrvaške, ker je za obalo in otoke Jadranskega morja značilna podvrsta laškega smilja *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (Bandelj in sod. 2020 (b)).

Iz semen bi vzgojili sadike, po približno dveh letih bi sadike posadili na izbrane mikrolokacije. Nato bi bila nujna spremljanje in monitoring zasaditve, da bi se lahko pravočasno ukrepalo v primeru težav. Po določenem času bi nato lahko ocenili uspešnost reintrodukcije. Če bi bil proces uspešen in bi se osebki v naravi uspešno razmnoževali ter dobro uspevali, bi bilo smiselno razmisliti o povečanju površin za gojenje laškega smilja.

V Slovenski Istri so kmetije, ki se že ukvarjajo z gojenjem aromatičnih rastlin, med katerimi je tudi laški smilj. S takšnimi površinami pripomoremo k zmanjšanju izkoriščanja rastlin v naravi. Zaradi vse večjega zanimanja za laški smilj zaradi njegovih zdravju koristnih lastnosti bi bila lahko na novo vzpostavljena naravna rastišča izpostavljena povečanemu izkoriščanju. To bi lahko privedlo do ponovnega izginotja rastlin z območja ter zmanjšanja biotske pestrosti območja. Zato lahko tudi z nasadi laškega smilja zelo pomembno pripomoremo k manjšemu izkoriščanju laškega smilja v naravi, k zmanjševanju zaraščanja površine ter skrbimo za ohranjanje biotske raznolikosti.

4.2 Morfološko vrednotenje

Na 29 vzorcih laškega smilja smo izvedli morfološko vrednotenje, ki je zajemalo štetje koškov v pakobulastem socvetju ter merjenje dolžine stebelnih listov laškega smilja. Morfološke znake smo izbrali na podlagi obsežne raziskave, ki so jo izvedli Herrando-Moraira in sod. (2016), kjer so ugotovili, da se podvrsta *italicum* od ostalih podvrst razlikuje v večjem številu koškov v pakobulastem socvetju in v dolžini lista. Valovitosti listnega roba nismo izbrali, ker menimo, da je to lastnost, ki jo je težko objektivno oceniti in je odvisna od vsakega opazovalca posebej.

Herrando-Moraira in sod. (2016) so natančneje proučili morfološke karakteristike podvrst *H. italicum*. Morfološko vrednotenje so izvedli na podlagi 33 lastnosti, ki so prepoznavne kot taksonomsko relevantne. Triindvajset lastnosti je bilo kvantitativnih, 8 polkvantitativnih in 2 kvalitativni. Cilj raziskave je bil oceniti morfološko variabilnost znotraj vrste *H. italicum* ter analizirati kohezijo že prej priznanih taksonov in moč njihove sorodnosti. Raziskava je pokazala, da je 5 morfoloških znakov, ki imajo največji prispevek k variabilnosti, kar pomeni, da lažje razlikujemo med skupinami. Ti morfološki znaki so: dolžina stebelnega lista, širina pakobulastega socvetja, število koškov v pakobulastem socvetju, valovitost listnega roba in razmerje med dolžino in širino lista.

Herrando-Moraira in sod. (2016) so ugotovili, da se *H. i. subsp. italicum* od ostalih podvrst razlikuje po širših pakobulastih socvetjih in večjem številu koškov v pakobulastem socvetju. V primerjavi z ostalimi podvrstami ima manj aksilarnih listov. Od podvrst *tyrrhenicum* in *microphyllum* se razlikuje po tem, da ima daljše liste. Z upoštevanjem morfoloških značilnosti, genetskih skupin in geografske razširjenosti so predlagali končno taksonomsko razdelitev v 4 taksona na ravni podvrst. Treba je poudariti, da je pretok genov opazen v celotni skupini. Tako genetske kot morfološke razlike niso popolnoma jasne, ampak predstavljajo geografski gradient. Posledično je težko ločevanje med osebki, ki rastejo blizu drug drugega. Hkrati ima *H. italicum* opazno morfološko variacijo v podvrsti *italicum*, ki je najbolj spremenljiva in široko razširjena podvrsta, vsaka druga podvrsta je precej dobro opredeljena s kombinacijo morfoloških značilnosti in dobro ločenega geografskega območja (Herrando-Moraira in sod. 2016).

Povprečna dolžina listov v naših vzorcih je znašala 18,93 mm. Dolžina najkrajšega lista je znašala 9,12 mm in smo jo izmerili pri vzorcu z oznako X/25 (Cres). Najdaljši list je v dolžino meril 31,35 mm in smo ga izmerili pri vzorcu z oznako II/2 (Kamenjak). Dolžine listov, ki so jih Herrando-Moraira in sod. (2016) izmerili za vrsto *H. italicum*, so znašale od 8 do 37 mm. Povprečna dolžina pa je znašala 18,60 mm. Zaključimo lahko, da je povprečna

dolžina listov, ki smo jo izmerili v okviru morfološkega vrednotenja povsem primerljiva s povprečno dolžino listov, ki so jo izmerili Herrando-Moraira in sod. (2016).

Povprečno število koškov v pakobulastem socvetju je bilo pri naših vzorcih 45,06. Najmanj koškov (13) je imel vzorec z oznako X/26 (Cres) kar 113 koškov pa smo prešteli pri vzorcu I/14 (Kamenjak). Herrando-Moraira in sod. (2016) so v povprečju v pakobulstem socvetju prešteli 33,48 koškov. Najmanjše število koškov je bilo 8, največje pa 120. V primerjavi z raziskavo Herrando-Moraira in sod. (2016) je bilo povprečno število koškov v pakobulastem socvetju pri naših vzorcih večje, kar je lahko posledica dejstva, da so Herrando-Moraira in sod. (2016) analizirali populacije z območja Hrvaške, Francije, Grčije, Italije, Črne Gore in Maroka.

Na podlagi statistične analize, ki smo jo izvedli v statističnem programu R 3.5.1, smo ugotovili, da obstaja med lokacijama Cres in Kamenjak glede na dolžino listov in število koškov v pakobulastem socvetju statistično značilna razlika. Prvo hipotezo magistrske naloge lahko potrdimo, saj so se rastline z dveh različnih lokacij med seboj razlikovale v nekaterih morfoloških znakih (dolžina listov in število koškov v pakobulastem socvetju) in med njimi obstaja statistično značilna razlika. Za potrebe analize gručenja smo izračunali povprečno število cvetov in dolžino listov za posamezno rastlino laškega smilja. Sledila je analiza gručenja z metodo k-povprečij. Z metodo, implementirano v funkciji NbClust, smo določili, da lahko rastline razvrstimo v 3 gruče. Ker skupine vzorcev niso bile enakomerno porazdeljene, smo za primerjavo med lokacijama določili linearni mešani model. Na osnovi statistične analize lahko trdimo, da sta se povprečna dolžina listov in število koškov v pakobulstem socvetju med lokacijama statistično značilno razlikovali.

Rastline iz rodu *Helichrysum* kažejo visoko stopnjo morfološke in fenotipske plastičnosti, kar povzroča težave pri taksonomski klasifikaciji (Giuliani in sod. 2016). Obstaja več razlogov za raznolikost smilja. Vrsta je prilagojena na raznoliko rast v habitatih Sredozemlja, ki se razlikujejo v tipih tal in reliefu. Spremembe v podnebjju, predvsem v količini padavin, lahko povzročijo nihanja v fenotipskih lastnostih (Martin in Puech 2001). In prav zaradi visoke stopnje morfološke in fenotipske plastičnosti morfološko vrednotenje ne predstavlja najboljše metode za zanesljivo in natančno določanje podvrste rastlin. S tega vidika je potrebno morfološko vrednotenje dopolniti z genotipizacijo z DNA-označevalci, ki nam zagotovijo dodatne informacije o populacijah.

4.3 Karakterizacija mikrosatelitskih lokusov

Mikrosatelitske označevalce smo vrednotili na osnovi različnih parametrov variabilnosti. Izbrani parametri so bili: opažena heterozigotnost (H_o), ki predstavlja delež heterozigotnih posameznikov v populaciji; pričakovana heterozigotnost (H_e) predstavlja delež populacije, ki bi bila heterozigotna v primeru, da med posamezniki pride do naključnega križanja; informacijska vrednost polimorfizma (PIC) pomeni informativnost posameznega mikrosatelitskega lokusa; verjetnost enakosti genotipov (PI) pa predstavlja verjetnost, da imata katerakoli dva naključno izbrana posameznika dva enaka alela na proučevanem lokusu (Štajner 2010). Manjša kot je vrednost PI, bolj je posamezen lokus primeren za ločevanje med posamezniki (Štajner 2010).

Z osmimi pari lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidov smo pri 29 vzorcih rastlin laškega smilja (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) pomnožili skupno 65 alelov. Povprečno število alelov na lokus je znašalo 8,13. Tudi Baruca Arbeiter in sod. (2021) so pri analizi 28 vzorcev smilja na 8 mikrosatelitskih lokusih odkrili 64 alelov. V povprečju so na lokus zaznali 8 alelov. Opažena heterozigotnot (H_o) je bila najnižja na lokusu HiUP-16 ($H_o = 0,414$). Na lokusu z oznako HiUP-16 smo odkrili 17 homozigotnih genotipov. Najvišjo opaženo heterozigotnot smo odkrili na lokusu HiUP-18 ($H_o = 0,862$), kjer je bilo kar 26 genotipov heterozigotnih. V povprečju je opažena heterozigotnost vseh 8 mikrosatelitskih lokusov znašala 0,724. Opažena heterozigotnost (H_o) je v raziskavi, ki so jo izvedli Baruca Arbeiter in sod. (2021), za 8 izbranih lokusov znašala od 0,429 do 0,786. Povprečna vrednost je znašala 0,593. Visoka povprečna vrednost opažene heterozigotnosti je lahko povezana z generativnim razmnoževanjem, ki je značilno za trajnice. Tudi pri smilju prevladuje generativno razmnoževanje, zato je pričakovati obsežno hibridizacijo genetskega materiala (El-Bakatoushi in Ahmed 2018). Vrednosti pričakovane heterozigotnosti (H_e) so se gibale od 0,627 na lokusu HiUP-16 do 0,900 na lokusu HiUP-09. V povprečju je pričakovana heterozigotnost znašala 0,752. Podobne rezultate so dobili tudi Baruca Arbeiter in sod. (2021), kjer so se vrednosti pričakovane heterozigotnosti za 8 izbranih lokusov gibale od 0,534 do 0,862. Povprečna vrednost pričakovane heterozigotnosti za 8 izbranih lokusov je znašala 0,742.

Vrednosti informacijske vrednosti polimorfizma (PIC) so se gibale med 0,565 (HiUP-16) in 0,873 (HiUP-09). Povprečna vrednost PIC je znašala 0,705. Ocena verjetnosti enakosti genotipov (PI) se je gibala med 0,046 (HiUP-09) ter 0,300 za lokus z oznako HiUP-16. Ugotovili smo, da je lokus z oznako HiUP-09 najbolj primeren lokus za razločevanje med posamezniki, medtem ko je najmanj primeren lokus z oznako HiUP-16. Zmnožek vseh PI

vrednosti 8 mikrosatelitskih lokusov je zelo nizek in znaša $3,82 \times 10^{-7}$. O zelo podobnih rezultatih poročajo tudi Baruca Arbeiter in sod. (2021), kjer so se vrednosti PIC za izbranih 8 mikrosatelitskih lokusov v njihovi raziskavi gibale med 0,511 (HiUP-24) in 0,847 (HiUP-02). Povprečna vrednost PIC je znašala 0,710. Vrednosti PI pa so se gibale med 0,035 in 0,240, z zelo nizkim zmnožkom, ki je znašal $3,50 \times 10^{-9}$.

Med 65 aleli smo odkrili 29 specifičnih alelov, ki so značilni za določeno lokacijo. Največ alelov je bilo odkritih na lokusu HiUP-09, in sicer 8. Sledi mu lokus HiUP-02 s 7 odkritimi aleli. Najmanj alelov smo odkrili na lokusih HiUP-01 in HiUP-22. Ugotovili smo, da je bilo za vzorce, katerih semena izvirajo s Cresa, odkritih manj alelov, in sicer 6. Ostali aleli so bili odkriti pri vzorcih, katerih semena izvirajo s polotoka Kamenjak. Veliko število geografsko specifičnih alelov pomeni, da je vzorčen rastlinski material heterogen. Vse to pomeni, da je laški smilj rastlina, za katero je značilna velika genetska raznolikost.

Povprečna vrednost PIC je znašala 0,705, kar pomeni, da so izbrani mikrosatelitski lokusi visoko informativni ($PIC > 0,5$) (Botstein in sod. 1980). Uporabljeni mikrosatelitski lokusi so dovolj polimorfni in jih lahko uporabimo v raziskavah genetskih lastnosti laškega smilja.

4.4 Razvrščanje vzorcev smilja v sorodnostne skupine vzorcev

Za izračun genetskih razdalj med 29 vzorci laškega smilja, katerih semena izvirajo s Cresa in polotoka Kamenjak, smo uporabili Dice-ov koeficient podobnosti. Na podlagi binarne matrike smo s pomočjo metode UPGMA izdelali sorodstveno drevo oz. dendrogram. Ugotovili smo, da se vzorci razdelijo v 4 zaokrožene skupine. V prvih treh skupinah (I, II, III) se pojavljajo tako vzorci s Cresa, kot vzorci s Kamenjaka. Le IV. skupina je bolj homogena, saj vključuje sedem vzorcev, katerih semena izvirajo s polotoka Kamenjak (II/3, II/4, II/8, II/9, II/10, II/17 in VI/27). Na podlagi teh rezultatov lahko delno potrdimo drugo hipotezo, in sicer, da so med geografsko ločenima populacijama s Cresa in Kamenjaka prisotne genetske razlike, ki so se pokazale v raznolikosti nekaterih morfoloških znakov (dolžina listov in število koškov v pakobulastem socvetju) in polimorfizmu mikrosatelitov. Med tem, ko so v skupinah I, II in III prepletajo vzorci obeh geografsko ločenih populacij.

Klasično botanično identifikacijo danes dopolnjujejo genetski označevalci, ki omogočajo nedvoumno razlikovanje med vrstami. Visoko polimorfni mikrosatelitski označevalci so še vedno stvar izbire za detekcijo rastline. Imajo visoko sposobnost ločevanja sorodnih taksonov, tudi med genetsko zelo podobnimi različicami, kot so podvrste (Baruca A. in sod. 2021).

Povzamemo lahko, da je, zraven morfološkega, priporočljivo tudi genetsko vrednotenje. V magistrski nalogi smo morfološko vrednotenje nadgradili s prvimi mikrosatelitskimi označevalci laškega smilja (Baruca Arbeiter in sod. 2021). Genetsko vrednotenje je nujno, saj se tako izognemo sajenju napačnega rastlinskega materiala v nasade ali vnosu napačnega rastlinskega materiala v naravo pri postopku reintrodukcije. Z genetskim vrednotenjem zmanjšamo ekonomsko škodo, ki bi nastala v primeru saditve napačnih rastlin v nasad. Z vnosom napačnega sadilnega materiala v naravo lahko naredimo več škode kot koristi, lahko povzročimo vnos invazivnih vrst, zmanjšanje biotske pestrosti na območju ter vnos škodljivcev in bolezni na izbrano območje. S pravilno identifikacijo zmanjšamo negativen vpliv na naravo in okolje, ki bi ga imela izbira napačnega rastlinskega materiala.

5 LITERATURA IN VIRI

- Angioni A., Barra A., Arlorio M., Coisson J. D., Russo M. T., Pirisi F.M., Satta M., Cabras P., 2003. Chemical composition, plant genetic differences, and antifungal activity of the essential oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp *microphyllum* (Willd) Nym. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 1030–1034.
- Appendino G., Scafati-Tagliatela O., Minass A., Pollastro F., Ballero M., Maxia A., Sanna C. 2015. *Helichrysum italicum*: the sleeping giant of Mediterranean herbal medicine. *Herbalgram* 105: 34–45.
- Bandelj D. 2006. Mikrosatelitski markerji in njihova uporabnost v oljkarstvu. *Series Historia Naturalis* 16(2): 209–222.
- Bandelj D., Baruca A. A., Hladnik M., Kramberger K. 2020. (a) Spoznajmo laški smilj. Koper, Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije.
- Bandelj D., Baruca A. A., Hladnik M. 2020. (b) Tehnološke smernice za gojenje laškega smilja. Koper, Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije.
- Baruca Arbeiter A., Hladnik M., Jakše J., Bandelj D. 2021. First Set of Microsatellite Markers for Immortelle (*Helichrysum Italicum* (Roth) G. Don): A Step towards the Selection of the Most Promising Genotypes for Cultivation. *Industrial Crops and Products* 162: 113298.
- Bianchini A., Santoni F., Paolini J., Bernardini A. F., Mouillot D., Costa J. 2009. Partitioning the Relative Contributions of Inorganic Plant Composition and Soil Characteristics to the Quality of *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (Roth) G. Don fil. Essential Oil. *Chemistry & Biodiversity* 6: 1014–1033.
- Blažević N., Petričić J., Stanić G., Maleš Ž. 1995. Variations in yields and composition of immortelle (*Helichrysum italicum*, Roth Guss.) essential oil from different locations and vegetation periods along Adriatic coast. *Acta Pharmaceutica* 45: 517–522.
- Botstein D., White R. L., Skalnick M. H., Davies R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 32: 314–331.

- Cogoni D., Fenu G., Concas E., Bacchetta G. 2013. The effectiveness of plant conservation measures: the *Dianthus morisianus* reintroduction. *Fauna & Flora International* 47(2): 203–206.
- Dimitrova N. G., Nacheva, L. 2018. Micropropagation of *Helichrysum italicum* (ROTH) G. Don—a medicinal plant with ornamental value. *Journal of BioScience and Biotechnology* 7(2-3): 97–101.
- Dorner J. 2002. An introduction to using native plants in restoration projects. Plant Conservation Alliance Bureau of Land Management. US Department of Interior U.S. Environmental Protection Agency.
- El Asbahani A., Miladi K., Badri W., Sala M., Aït Addi E.H., Casabianca H., Ei Mousadik A., Hartmann D., Jilale A., Renaud F.N.R., Elaissairi A. 2015. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics* 483: 2020–2043.
- El-Bakatoushi R., Ahmed D.G.A., 2018. Evaluation of genetic diversity in wild populations of *Peganum harmala* L., a medicinal plant. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 16: 143–151.
- Garrido-Cardenas A. J., Mesa-Valle C., Manzano-Agugliaro F. 2018. Trends in plant research using molecular markers. *Planta* 247: 543–557.
- Galbany-Casals M., Saez, L., Benedi C., 2006. A taxonomic revision of *Helichrysum* sect. *Stoechadina* (Asteraceae, Gnaphalieae). *Canadian Journal of Botany* 84: 1203–1232.
- Galbany-Casals M., Blanco-Moreno J. M., Garcia-Jacas N., Breitwieser I., Smissen R.D. 2011. Genetic variation in Mediterranean *Helichrysum italicum* (Asteraceae; Gnaphalieae): do disjunct populations of subsp. *microphyllum* have a common origin? *Plant Biology* 13: 678–687.
- Godefroid S., Piazza C., Rossi G., Buord S., Stevens D. R., Aguraiuja R., Cowell C., Weekley W. C., Vogg G., Iriondo M. J., Johnson I., Dixon B., Gordon D., Magnanon S., Bertille V., Bjureke K., Koopman R., Vicens M., Virevaire M., Vanderborght T. 2011. How successful are plant species reintroductions? *Biological Conservation* 144: 672–682.
- Giuliani C., Lazzaro L., Calamassi R., Calamai L., Romoli R., Gelsomina F., Foggi B., Lippi M. M. 2016. A volatolomic approach for studying plant variability: the case of selected *Helichrysum* species (Asteraceae). *Phytochemistry* 130: 128–143.

- Guerrant O. E., Kaye N.T. 2007. Reintroduction of rare and endangered plants: common factors, questions and approaches. *Australian Journal of Botany* 55: 362–370.
- Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan P. D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Electronica* 4 (1): 1-9.
- Hellivan P.J. 2009. Immortelle's sustainable resurgence. *Perfumer & Flavorist* 34: 34–40.
- Herrando-Moraira S., Blanco-Moreno J. M., Sáez L., Galbany-Casals M. 2016. Re-evaluation of the *helichrysum italicum* complex (Compositae: Gnaphalieae): A new species from majorca (Balearic Islands). *Collectanea Botanica* 35.
- Hladnik M., Arbeiter A. B., Knap T., Jakse J., Bandelj D., 2019. The complete chloroplast genome of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don (Asteraceae). *Mitochondrial DNA B Resources* 4: 1036–1037.
- Kalia R. K., Rai M. K., Singh R., Kaila S., Dhawan A. K. 2010. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177:309–334.
- Kočevar Glavač N. 2018. Pridobivanje in vrednotenje rastlinskih izvlečkov. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo.
- Kramberger K., Maganja B. D., Bandelj D., Baruca A. A., Peeters K., Višnjevec M.A., Pražnikar J. Z. 2020. Determination of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity Comparison of the Hydroalcoholic and Water Extracts from Two *Helichrysum italicum* Species. *Metabolites* 10: 403.
- Kramberger K. Kenig S. Pražnikar Z. J. Glavač N. K. Maganja B. D. 2021. A Review and Evaluation of the Data Supporting Internal Use of *Helichrysum italicum*. *Plants* 10: 1738.
- Kozjek K. 2016. Objektivna opredelitev podnebnih regij Slovenije. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani.
- Kump B., Svetek S., Javornik B. 1992. Izolacija visokomolekularne DNK iz rastlinskih tkiv. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. *Kmetijstvo* 59: 63–66.
- Maksimović S., Tadić V., Skala D., Zizović I. 2017. Separation of phytochemicals from *Helichrysum italicum*: An analysis of different isolation techniques and biological activity of prepared extracts. *Phytochemistry* 138: 9–28.
- Marshall E. 2011. Health and wealth from Medicinal Aromatic Plants. *Rural Infrastructure*

and Agro-Industries Division Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- Martin A., Puech S. 2001. Interannual and interpopulation variation in *Helichrysum stoechas* (Asteraceae), a species of disturbed habitats in the Mediterranean region. *Plant Species Biology* 16(1): 29–37.
- Mišić M. D., Ghalawenji A. N., Grubišić V. D., Konjević M. R. 2005. Micropropagation and Reintroduction of *Nepeta rtanjensis*, an Endemic and Critically Endangered Perennial of Serbia. *Phyton; Annales Rei Botanicae* 45(1): 9-20.
- Nagojski protokol o dostopu do genskih virov ter poštenu in pravični delitvi koristi, ki izhajajo iz njihove uporabe, h Konvenciji o biološki raznovrstnosti (UL L 150, 20.5.2014, str. 234–249).
- Ninčević T., Grdiša M., Šatović Z., Jug-Dujaković M. 2019. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Taxonomy, biological activity, biochemical and genetic diversity. *Industrial Crops and Products* 138.
- Parkin M. 2005. Reintroducing native plants into the wild. Position paper for the New England Plant Conservation Program (NEPCoP). U.S. Fish and Wildlife Service.
- Peakall R., Smouse P. E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28(19): 2537–2539.
- Pohajda I., Dragun G., Visković P. L. 2015. Smilje ljekovito i aromatično bilje. Savjetodavna služba, Zagreb.
- Rajić M., Bilić M., Aladić K., Šimunović D., Pavković T., Jokić S. 2015. Od tradicionalne uporabe do znanstvenog značaja: Cvijet smilja. *Glasnik zaštite bilja* 6/2015.
- Selkoe A. K., Toonen J.R. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615–629.
- Uredba o zavarovanih prostoživećih rastlinskih vrstah. 2004. Ur. L. RS, št. 46/04, 110/04, 115/07, 36/09 in 15/14.
- Viegas D. A., Palmeira de Oliveira, A. Salgueiro L., Martinez de Oliveira J., Palmeira de Oliveira R. 2013. *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data. *Journal of Ethnopharmacology* 151: 54-65.
- Wagner H.W., Sefc K.M. 1999. IDENTITY 1.0 Centre for Applied Genetics. University of Agricultural Sciences, Vienna.
- Zakon o ohranjanju narave. 1999. Ur. l. RS, št. 96/04.

PRILOGE

PRILOGA A *Rezultati statistične analize števila koškov*

Linear mixed model fit by REML. t-tests use Satterthwaite's method ['lmerModLmerTest']

Formula: STEVILO_CVETOV ~ Lokacija + (1 | VRSTA_GRMICEK)

Data: table

REML criterion at convergence: 1192.2

Scaled residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.34993	-0.61044	-0.04184	0.45166	3.14347

Random effects:

Groups	Name	Variance	Std.Dev.
VRSTA_GRMICEK	(Intercept)	149.4	12.22
	Residual	167.7	12.95

Number of obs: 145, groups: VRSTA_GRMICEK, 29

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	df	t value	Pr(> t)
(Intercept)	31.467	5.522	27.000	5.698	4.7e-06 ***
LokacijaKamenjak	17.142	6.201	27.000	2.765	0.0101 *

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Correlation of Fixed Effects:

	(Intr)
LokacijKmnjk	-0.891

PRILOGA B *Rezultati statistične analize povprečne dolžine listov*

Linear mixed model fit by REML. t-tests use Satterthwaite's method [*lmerModLmerTest*]

Formula: POVPRECNA_DOLZINA_LISTOV ~ 1 + Lokacija + (1 | VRSTA_GRMICEK)

Data: table

REML criterion at convergence: 781.8

Scaled residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.6621	-0.5573	-0.0757	0.4838	3.3159

Random effects:

Groups	Name	Variance	Std.Dev.
VRSTA_GRMICEK	(Intercept)	9.745	3.122
	Residual	9.259	3.043

Number of obs: 145, groups: VRSTA_GRMICEK, 29

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	df	t value	Pr(> t)
(Intercept)	14.087	1.390	27.000	10.133	1.07e-10 ***
LokacijaKamenjak	6.106	1.561	27.000	3.911	0.000559 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Correlation of Fixed Effects:

	(Intr)
LokacijKmnjk	-0.891