

2

Genetske in genomske raziskave laškega smilja

Petra Gabrovšek

Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije, Univerza na Primorskem

Matjaž Hladnik

Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije, Univerza na Primorskem

Alenka Baruca Arbeiter

Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije, Univerza na Primorskem

Dunja Bandelj

Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije, Univerza na Primorskem



© 2025 Petra Gabrovšek, Alenka Baruca Arbeiter, Matjaž Hladnik in Dunja Bandelj
<https://doi.org/10.26493/978-961-293-525-2.2>

Uvod

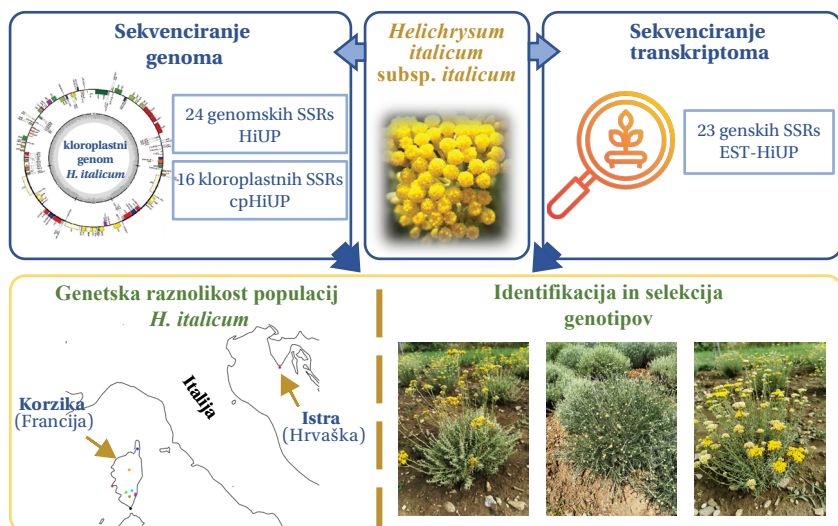
Preučevanje genskih virov je pomembno za ugotavljanje uporabnosti rastlin laškega smilja in omogoča izbor najprimernejših genotipov za pridelavo v kmetijskem prostoru. Za raziskave genskih virov so, poleg preizkušanja ter morfološkega in biokemijskega vrednotenja genskih virov v kolekcijskih nasadih, potrebna tudi učinkovita molekularna orodja. Razlikovanje genotipov laškega smilja na osnovi morfologije je zaradi njegove fenotipske raznolikosti in spontanega križanja med podvrstami na območjih, kjer se njihova rastišča prekrivajo, izjemno težavno (Galbany-Casals idr. 2006). Natančna karakterizacija in identifikacija laškega smilja na ravni genoma sta pomembni tudi v postopkih identifikacije za kontrolo identitete vrste, podvrste, za določanje geografskega izvora ter za zagotavljanje sledljivosti sadilnega materiala na trgu (Baruca Arbeiter idr. 2021).

Uporabnost mikrosatelitskih označevalcev

Označevalci DNA predstavljajo pomembno orodje v raziskavah raznolikosti genskih virov. Za namene razlikovanja posameznih rastlin znotraj

in med populacijami sorodnih vrst se razvija vrstno specifične, kodominantne mikrosatelitske označevalce. Mikrosateliti ali SSR (iz angl. *Simple Sequence Repeats*; ponovitve enostavnih zaporedij) so kratka zaporedja z osnovnim motivom dolžine od enega do šest nukleotidov (Gupta idr. 1996), ki se nahajajo v kodirajočih (angl. EST-SSR – *Expressed Sequence Tag derived SSR*; SSR, pridobljeni iz oznak izraženih zaporedij) in nekodirajočih regijah ter v kloroplastnem (Chung idr. 2006) in mitohondrijskem genomu (Rajendrakumar idr. 2007). Zaradi kodominantnega dedovanja omogočajo sledenje materinim in očetovim alelom na lokusu, ki jih pomnožimo v verižni reakciji s polimerazo (angl. *Polymerase Chain Reaction* – PCR). S pomočjo mikrosatelitov pridobimo profile DNA ali prstni odtis DNA (angl. *DNA fingerprinting*) posamezne rastline. Rastline med seboj ločimo na osnovi prisotnosti različnih, pomnoženih alelov na več lokusih. Mikrosateliti odlikuje izjemna variabilnost, zato se kot označevalski sistem uvrščajo v sam vrh glede uporabnosti v genetskih raziskavah. Pri rastlinah so se izkazali kot zelo primerno orodje za genotipizacijo ali identifikacijo osebkov oz. sorodnih taksonov, za karakterizacijo rastlinskih genskih virov, za preučevanje raznolikosti ter za filogenetske, populacijske in evolucijske raziskave. Poleg tega so nepogrešljivo orodje v programih žlahtnjenja rastlin (Varshney idr. 2005; Zalapa idr. 2012; Vieira idr. 2016; Taheri idr. 2018).

Za razvoj mikrosatelitskega označevalskega sistema je potrebno poznavanje zaporedja DNA tarčne vrste, in v primeru, če zaporedij ni na voljo, je potrebno predhodno sekvenciranje genoma ali transkriptoma preučevane vrste. Sledita identifikacija regij s prisotnimi mikrosatelitskimi motivi ter razvoj začetnih oligonukleotidov, ki se prilegajo na obrobno regijo mikrosatelita. Novorazvite začetne oligonukleotide je treba predhodno testirati glede uspešnosti pomnoževanja v PCR. Iz nabora večjega števila uspešno pomnoženih mikrosatelitov se nato za nadaljnje raziskave izbere le visoko informativne, polimorfne mikrosatelitske lokuse. Pridobljena nukleotidna zaporedja genoma in transkriptoma omogočajo še številne druge aplikacije. Mednje sodijo asociacijske raziskave celotnih genomov (angl. *Genome-Wide Association Studies* – GWAS), ki povezujejo genotip s fenotipom in vključujejo iskanje genetskih variacij po celotnem genomu ter njihovo povezovanje z določenimi lastnostmi (Guo idr. 2021). Prav tako omogočajo tudi identifikacijo genov, odgovornih za določene lastnosti (npr. za odpornost rastlin ali sintezo biološko aktivnih spojin), ter ekspresijske raziskave (Lovén idr. 2012).



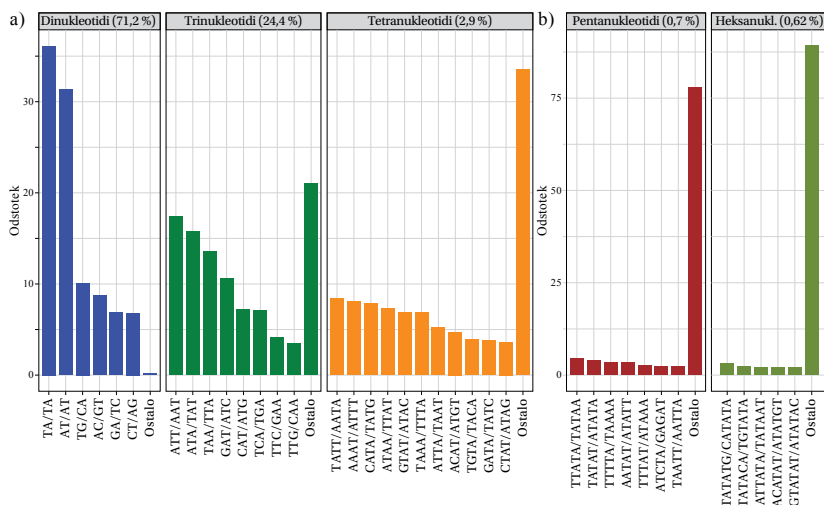
Slika 1 Genetske raziskave laškega smilja na UP FAMNIT: razvoj genoma in transkriptoma ter treh nizov mikrosatelitskih označevalcev (HiUP, cpHiUP, EST-HiUP)

Mikrosateliti laškega smilja in njihova uporabnost v genetskih raziskavah

Raziskovalci Univerze na Primorskem, Fakultete za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije (UP FAMNIT) smo prvi v svetovnem merilu razvili mikrosatelitske označevalce laškega smilja. K odločitvi za razvoj je prispeval pregled genetskih raziskav in podatkovnih zbirk nukleotidnih zaporedij za laški smilj v letu 2020, s katerim smo ugotovili, da so informacije zanj izjemno skromne in omejene ter da ni razpoložljivih vrstno specifičnih molekularskih označevalcev. Mikrosateliti smo razvili iz zaporedij, ki smo jih pridobili s sekvenciranjem genoma (DNA) in transkriptoma (RNA) ter jih uspešno uporabili za identifikacijo genotipov in preučevanje genetske raznolikosti naravnih populacij laškega smilja (slika 1).

Sekvenciranje genomske DNA smo opravili s tehnologijo Ion Torrent. Iz pridobljenih 17.025.076 kakovostnih zaporedij s povprečno dolžino 245 baznih parov (bp) smo pridobili 450.590 daljših zaporedij ali kontigov v skupni dolžini 258,6 Mbp, kar predstavlja 15,9 % predvidene celotne velikosti genoma laškega smilja (Baruca Arbeiter idr. 2021).

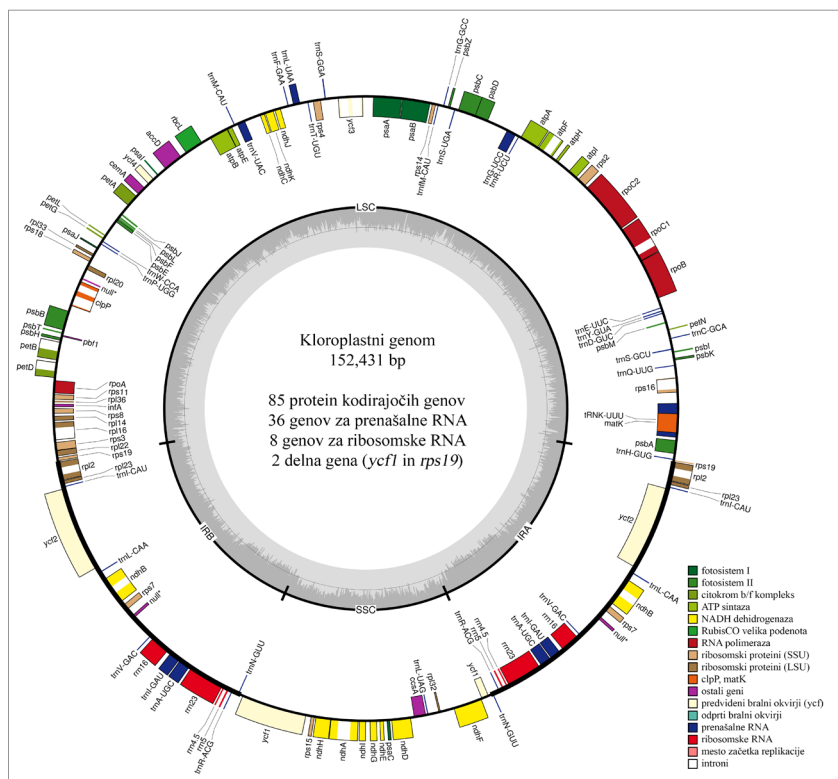
Zložena nukleotidna zaporedja smo uporabili za razvoj mikrosatelitskih označevalcev. Mikrosatelitske motive je vsebovalo 8,19 % kontigov (36.882), med katerimi so prevladovali dinukleotidni motivi (71,2 %;



Slika 2 Pogostost dinukleotidov, trinukleotidov in tetranukleotidov (a) ter pentanukleotidov in heksanukleotidov (b) v genomu laškega smilja

30.673), sledili so trinukleotidi (24,4 %; 10.519) in tetranukleotidi (2,9 %; 1.243), penta- in heksanukleotidi pa so skupno predstavljali najmanjši delež (1,4 %) v genomu laškega smilja. Najpogostejši dinukleotidni motivi so bili TA/AT (36,1 %), AT/AT (31,3 %), TG/CA (10,1 %) in AC/GT (8,8 %), medtem ko so bili najpogostejši trinukleotidni motivi ATT/AAT (17,4 %), ATA/TAT (15,7 %) in TAA/TTA (13,5 %) (slika 2). V nadaljevanju smo pregledali zložena nukleotidna zaporedja z mikrosatelitskimi motivi po izbranih kriterijih in izbrali 60 zaporedij, primernih za razvoj začetnih oligonukleotidov. Od 60 regij z razvitimi začetnimi oligonukleotidi sta bila dva uspešno pomnožena lokusa monomorfna (0,9 %), preostalih 24 (41,8 %) pa polimorfni. Končni niz vključuje 24 genomske mikrosatelitske označevalce z oznako HiUP, katerih podatki so prosto dostopni v podatkovni bazi GenBank (Baruca Arbeiter idr. 2021).

Mikrosatelitske označevalce smo uporabili v preliminarni raziskavi za preučevanje genetske raznolikosti 27 rastlin laškega smilja z vzhodne jadranske obale in rastlin, ki smo jih vzgojili iz kupljenega certificiranega semena laškega smilja na trgu. Na lokusu HiUP-21 smo odkrili le dva alela, največ alelov (15) pa smo odkrili na lokusu HiUP-23. V povprečju smo z nizom HiUP 24 označevalcev pomnožili 8,5 alela na mikrosatelitski lokus. Na podlagi analize nekaterih parametrov variabilnosti (število učinkovitih alelov, opažena in pričakovana heterozigotnost, informacijska vrednost polimorfizma, verjetnost enakosti genotipov) smo izbrali deset



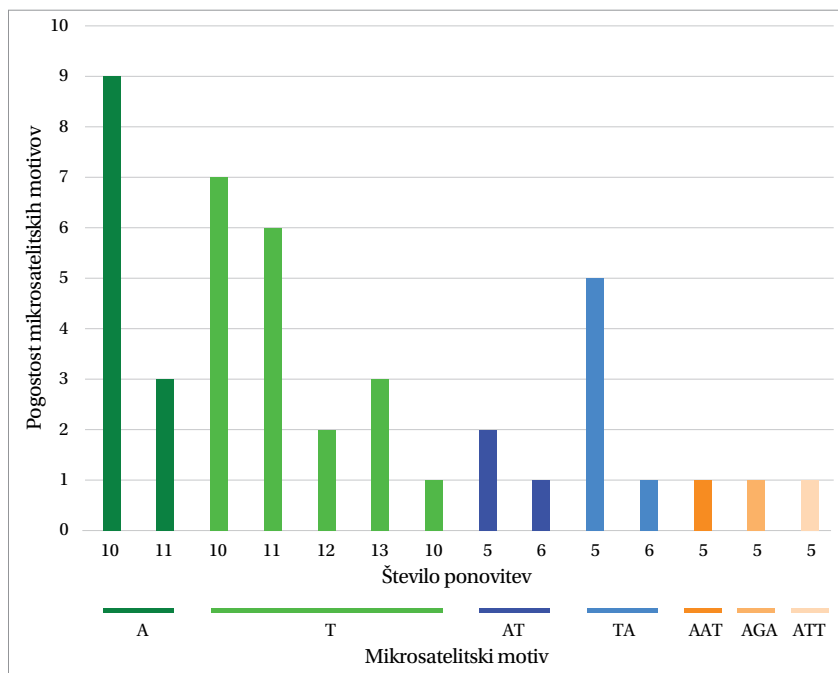
Slika 3 Kloroplastni genom laškega smilja

mikrosatelitskih označevalcev (HiUP-04, HiUP-05, HiUP-07, HiUP-13, HiUP-14, HiUP-18, HiUP-19, HiUP-20, HiUP-22, HiUP-24), ki so se izkazali kot zelo informativni in primerni za preučevanje genetske strukture ter raznolikosti laškega smilja. Omogočili so tudi razlikovanje med populacijami laškega smilja s severnega in z južnega dela vzhodnojadrske regije. Genotipizacija z mikrosateliti je razkrila tudi napačno identifikacijo vrste na deklaraciji certificiranega semena. Z genetskimi profili, podprtimi z edinstvenimi aleli, smo potrdili, da certificiran sadilni material ne pripada vrsti *Helichrysum italicum*, kar smo podprli še z morfološki meritvami, temveč gre za vrsto *Helichrysum angustifolium* (Lam.) DC (Baruca Arbeiter idr. 2021) oz. po novem predlogu poimenovanja za vrsto *Helichrysum litoreum* Guss (Aghababayan idr. 2009; Baruca Arbeiter idr. 2021; Hladnik idr. 2023). Pomnoževanje z novimi označevalci je bilo uspešno tudi pri vrsti peščeni smilj (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench) (Kramberger idr. 2021; Van Rossum idr. 2024). Prvi niz mikrosatelitskih

označevalcev laškega smilja predstavlja dragoceno orodje za nadaljnje selekcijske programe, karakterizacijo genskih virov in zaradi prenosljivosti omogoča tudi raziskave sorodnih vrst laškega smilja.

Nukleotidno zaporedje genoma laškega smilja smo uporabili tudi za sestavo celotne kloroplastne DNA (angl. *Chloroplast DNA* – cpDNA) (Hladnik idr. 2019). Velikost kloroplastnega genoma laškega smilja je 152.431 bp in vsebuje 131 genov, od tega 85 protein kodirajočih genov, 36 genov za prenašalno RNA (angl. *Transfer RNA* – tRNA), osem genov za ribosomsko RNA (angl. *Ribosomal RNA* – rRNA) in dva delna gena (*ycf1*, *rps19*) (slika 3). Dolžina regije LSC (angl. *Large Single Copy*; večja enojna kopija) znaša 84.445 bp, regije IR (angl. *Inverted Repeats*; inverzni oz. nasprotno orientirani ponovitvi) 24.773 bp in regije SSC (angl. *Small Single Copy*, manjša enojna kopija) 18.440 bp. V kloroplastu adenin predstavlja 31,3 %, citozin 18,3 %, gvanin 18,8 % in timin 31,5 %.

Sestavljen kloroplastni genom nam je omogočil identifikacijo in razvoj kloroplastnih mikrosatelitskih označevalcev (angl. *Chloroplast Simple Sequence Repeats* – cpSSRs) (Hladnik idr. 2024). V cpDNA smo identificirali 43 regij z mikrosatelitskimi ponovitvami. Največ je bilo mononukleotidnih mikrosatelitov (31; 72,1 %), sledili so dinukleotidni (9; 21,0 %) in trinukleotidni (3; 6,9 %) (slika 4). 34 mikrosatelitov (79,1 %) smo odkrili v regiji LSC, sedem (16,3 %) v regiji SSC, dva mikrosatelita pa smo identificirali v regijah IRA in IRB. Za vse najdene mikrosatelite smo dizajnirali pare začetnih oligonukleotidov in preizkusili uspešnost njihovega pomnoževanja. Izbrani niz 16 polimorfni kloroplastnih mikrosatelitskih označevalcev (cpHiUP) smo uporabili za genotipizacijo desetih populacij laškega smilja s Korzike (Francija) in z rta Kamenjak (Hrvaška). Populacijsko analizo smo izvedli le z desetimi najboljšimi označevalci (cpHiUP-01, cpHiUP-05, cpHiUP-06, cpHiUP-7, cpHiUP-08, cpHiUP-12, cpHiUP-13, cpHiUP-14, cpHiUP-15, cpHiUP-15) in odkrili kar 38 haplotipov (specifična kombinacija alelov na več kloroplastnih mikrosatelitskih lokusih), od tega 32 geografsko specifičnih ter deset privatnih alelov, značilnih za sedem populacij. Z vsemi desetimi kloroplastnimi mikrosatelitskimi označevalci je bilo pomnoževanje uspešno tudi na vzorcih *H. litoreum* in *H. arenarium*, s čimer smo potrdili 100-odstotno prenosljivost na sorodne vrste. Skupno smo detektirali 56 alelov, od tega sedem unikatnih za *H. litoreum*, šest za *H. arenarium* in 26 za *H. italicum*, medtem ko je bil le en alel skupen vsem trem vrstam.



Slika 4 Pogostost posameznih mikrosatelitskih motivov v kloroplastnem genomu laškega smilja

Novorazviti genomski in kloroplastni mikrosatelitski označevalci predstavljajo nepogrešljivo orodje za razlikovanje vrst, ki je pomembno v taksonomskih in filogenetskih raziskavah, zato so uporabni tudi na področju varstvene biologije. V sodelovanju s skupino Fabienne Van Rossum idr. (2024) smo raziskovalci UP FAMNIT genomske mikrosatelitske označevalce laškega smilja uporabili za analizo genetske raznolikosti upadajočih populacij vrste peščenega smilja z namenom ohranitve edine naravne populacije v Belgiji. Pristopili smo z idejo, da bi potencialne, genetsko raznolike in neklonsko razmnožene rastline iz populacij v Nemčiji uporabili kot vir rastlinskega materiala za izboljšanje genskega pretoka zadnje populacije na jugu Belgije. Prenosljivost 12 genomskih mikrosatelitskih označevalcev smo testirali na vzorcih peščenega smilja treh nemških populacij ter potrdili uspešno pomnoževanje pri osmih lokusih (HiUP-01, HiUP-02, HiUP-05, HiUP-08, HiUP-13, HiUP-16, HiUP-18 in HiUP-19). Na podlagi parametrov variabilnosti smo za nemške populacije ugotovili visoko genetsko raznolikost in nizek koeficient samoopraševanja, kljub dejstvu, da je vrsta znana kot samooplodna,

medtem ko smo v belgijski populaciji ugotovili nizko genetsko raznolikost in klonalnost. V raziskavi smo potrdili domnevo, da so nemške populacije primerne za translokacijo rastlin v belgijsko populacijo, s čimer bi omogočili povečanje genetske raznolikosti in evolucijske odpornosti populacij peščenega smilja v Belgiji.

Za genetske raziskave rastlin so, poleg genomskih in kloroplastnih mikrosatelitskih označevalcev, uporabni tudi genski mikrosateliti ali EST-SSRs. Primerni so za odkrivanje raznolikosti v izraženih regijah genoma in so označevalci tarčnih genov (Andersen in Lübberstedt 2003). Tako kot genomski mikrosateliti so tudi genski običajno uporabni za sorodne vrste (Wöhrmann in Weising 2011). Razvoj označevalcev EST-SSRs je odvisen od razpoložljivosti zbirk EST, zato smo na UP FAMNIT z uporabo enake tehnologije, omenjene pri sekvenciranju genomske DNA, razvili transkriptom laškega smilja in prve genske mikrosatelitske označevalce (EST-SSRs) laškega smilja (Gabrovšek idr. 2024). Pridobili smo 21.568.881 kakovostnih zaporedij, združenih v 24.806 kontigov s povprečno dolžino 1.832 bp, kar po oceni, pridobljeni z analizo z orodjem BUSCO, znaša 48,6 % popolnega transkriptoma. Nato smo izvedli funkcijsko anotacijo kontigov, s poudarkom na agronomsko zanimivih lastnostih, kot so različni presnovki in biosintezne poti za terpenoide, poliketide, glikane ter druge sekundarne presnovke, odpornost na bolezni in škodljivce ipd. V anotiranih transkriptih smo identificirali 1.999 popolnih mikrosatelitov. Najpogostejši so bili trinukleotidni motivi (70,03 %, 1.397), sledili so dinukleotidni (24,26 %, 484), tetranukleotidni (2,76 %, 55), heksanukleotidni (2,01 %, 40) ter pentanukleotidni (0,95 %, 19) mikrosatelitski motivi. Iz nabora anotiranih transkriptov z mikrosatelitskimi regijami smo, upoštevajoč domnevno funkcijo, izbrali 79 lokusov za razvoj začetnih oligonukleotidov (Gabrovšek idr. 2024). Po končani optimizaciji protokola pomnoževanja smo pri 31 (39,2 %) EST-SSRs pridobili kakovostne pomnožke, medtem ko pri ostalih 48 (60,8 %) označevalcih EST-SSRs pomnoževanje ni bilo uspešno ali pa so se pomnožili nespecifični produkti. V nizu 31 EST-SSRs je bilo osem lokusov monomorfnih, preostalih 23 pa polimorfni, zato so potencialno uporabni za genetske raziskave.

Raziskave laškega smilja z uporabo drugih označevalcev DNA

Pred razvojem vrstno specifičnih mikrosatelitskih označevalcev so bili genski viri rodu *Helichrysum* na območju sredozemskega bazena preučevani z različnimi označevalskimi sistemi. Mercè Galbany-Casals idr.

(2004) so želeli ugotoviti, ali je rod *Helichrysum* monofiletski, kar pomeni, da vse vrste v tem rodu izvirajo iz enega skupnega prednika. Med prvimi so preučili vrste rodu *Helichrysum* z območja Sredozemlja ter nekaj predstavnikov afriškega izvora z analizo nukleotidnega zaporedja regije ITS (iz angl. *Internal Transcribed Spacer*; notranji prepisni vmesnik). Uporabili so regiji ITS1 in ITS2, ki se nahajata med geni za rRNA, ki se jih uporablja za filogenetske in taksonomske analize zaradi njihove variabilnosti med vrstami ter znotraj vrst (Mäder idr. 2010). Kot zunanjo skupino so vključili vrste iz plemena Gnaphalieae (družina Asteraceae). Rezultati raziskave so pokazali, da naj bi bil rod *Helichrysum* polifiletski. Pleme Gnaphalieae najverjetneje izvira iz Afrike, od koder se je širilo v Evrazijo, Avstralijo in Ameriko. Za potrditev te hipoteze so potrebne dodatne raziskave. Filogenetska raziskava je vrsto *H. italicum* uvrstila v osrednji predel sredozemskega bazena. Rezultati so podprli domnevo, da je rod *Helichrysum* v Sredozemlju monofiletski. Izjemi sta vrsti *H. frigidum* in *H. montelinasanum*, ki naj bi se razvili iz afriških vrst. Razmerja podobnosti znotraj vrst iz Sredozemlja ostajajo nerazjasnjena, kar je posledica nedavnih dogodkov speciacije znotraj rodu ter spontanega križanja in genskega pretoka.

Z namenom izboljšanja razlikovanja med zelo sorodnimi vrstami so Mercè Galbany-Casals idr. (2009) raziskavo razširili in označevalce ITS nadgradili z analizo nukleotidnih zaporedij regije ETS (iz angl. *External Transcribed Spacer*; zunanji prepisni vmesnik). Tudi regija ETS je del gena za rRNA in se pogosto uporablja za filogenetske in evolucijske raziskave. Analizirali so 36 vrst rodu *Helichrysum* iz Sredozemlja in Azije, 47 predstavnikov afriških vrst *Helichrysum* ter dve vrsti iz Irana in Jemna. V filogenetskem drevesu ETS so imeli vzorci podvrste *H. italicum* subsp. *italicum* skupno vozlišče s *H. italicum* subsp. *siculum* in *H. italicum* subsp. *microphyllum*. Podatki nakazujejo, da prednik predstavnikov rodu *Helichrysum* izvira iz Sredozemlja, od koder se je razširil v azijsko regijo. Tudi Nie idr. (2013) so z analizo regije ITS nakazali sorodnost med sredozemskimi in azijskimi predstavniki iz rodu *Helichrysum*.

Raziskovalci UP FAMNIT (Hladnik idr. 2023) smo regije ITS uporabili za analizo genetske raznolikosti naravnih populacij laškega smilja z vzhodne jadranske obale (Hrvaška, Črna gora) ter okrasnih rastlin iz Slovenije z namenom ločevanja rastlin različnega geografskega porekla na podlagi unikatnih nukleotidnih zaporedij regije ITS. Z raziskavo smo pokazali, da prihaja do velikega prekrivanja v nukleotidnih zaporedjih regije ITS,

kar zmanjšuje možnost uporabe označevalcev za razlikovanje med podvrstami in za ugotavljanje geografskega izvora rastlin.

Wilma Sabetta idr. (2006) pa so za preučevanje genetske raznolikosti laškega smilja z območja Sredozemlja uporabili označevalce AFLP (iz angl. *Amplified Fragment Length Polymorphism*; polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov), ki omogočajo odkrivanje polimorfizmov v naključnih regijah genoma. V raziskavo so vključili rastline laškega smilja iz Francije (Korzika) in Italije (Apulija, Sicilija, Sardinija, Bazilikata, Kalabrija, Toskana in Ligurija). Vzorci so se glede na sorodnost razporedili v tri skupine. V prvi skupini so prevladovali vzorci s Korzike, v drugi z območij Apulije in Bazilikate ter nekaj klonov s Korzike, tretjo skupino pa so zastopali vzorci z otoka Elba, iz Toskane in Ligurije.

Označevalce AFLP so uporabili tudi Rosaria Perrini idr. (2009) za raziskavo vpliva tehnik rastlinskih tkivnih kultur na genetsko variabilnost ekotipa *H. italicum* subsp. *microphyllum* (po novejši klasifikaciji subsp. *tyrhenicum*) s Korzike. Rezultati analize so pokazali, da je rastlinski material pri gojenju *in vitro* genetsko stabilen, saj so rastline ohranile 99,3 % podobnosti. Variabilnost na določenih lokusih bi bila lahko tudi posledica *in vitro* induciranih DNA-metilacijskih sprememb, na katere so lahko občutljivi restrikcijski encimi, ki so del protokola AFLP.

Irene Morone-Fortunato idr. (2010) so s pomočjo označevalcev AFLP in analize eteričnega olja ugotavljali genetsko in kemijsko variabilnosti 20 genotipov *H. italicum* subsp. *italicum* z območja Italije in Francije (Korzika). Genotipi so se razvrstili v dve skupini, ki sta odražali tudi kemijsko raznolikost.

Na območju Sardinije (Italija) so Sara Melito idr. (2013) preučevali genetsko in kemijsko raznolikost laškega smilja. V analizo AFLP je bilo vključenih 50 populacij. Razvrščanje v sorodnostne skupine je pokazalo dve gruč, ki sta se ujemale z geografsko razširjenostjo in okoljskimi razmerami Sardinije. Predpostavljajo, da je genetska struktura nastala pod vplivom prilagoditve okolju, kar se odraža v genetski in kemijski raznolikosti vrste.

Na območju vzhodne jadranske obale so Tonka Ninčević idr. (2021) sistematično vzorčili 18 naravno rastočih populacij laškega smilja in jih analizirali z označevalci AFLP. Želeli so preučiti genetsko raznolikost in strukturo ter identificirati lokuse, ki so potencialno odgovorni za razvoj lastnosti, pomembnih za prilagajanje rastlin okolju. Vzorci so se razvrstili v dve sorodnostni skupini glede na geografsko območje (severni in južni Jadran). Identificirali so štiri lokuse, ki so bili povezani z okoljskimi

lastnostmi (temperatura in padavine), kar nakazuje, da je na nastanek genetske raznolikosti vplivalo tudi lokalno podnebje.

V nekatere raziskave genskih virov rodu *Helichrysum* je bilo vključenih več različnih označevalskih sistemov. Mercè Galbany-Casals idr. (2011) so z označevalci AFLP, s kloroplastnimi označevalci (regija *psbA-trnH*) ter z morfološkim vrednotenjem raziskovali podvrsti *H. italicum* subsp. *microphyllum* in *H. italicum* subsp. *italicum* v sredozemskem bazenu. Ugotovili so, da se vrsta *H. italicum* deli na vzhodno in zahodno sredozemsko skupino, delitev pa se ni ujemala glede na podvrsto (subsp. *microphyllum* in subsp. *italicum*). Genetska raznolikost je bila skladna z morfološko raznolikostjo, kar so pripisali lokalni selekciji lokusov, ki so povezani s kvantitativnimi lastnostmi. Precejšen polimorfizem v nukleotidnih zaporedjih kloroplastne DNA so odkrili v zahodnosredozemski skupini, tako med populacijami kot tudi znotraj njih. Primerjava nukleotidnih zaporedij cpDNA *H. italicum* in drugih vrst rodu *Helichrysum* pa je pokazala, da so nekateri haplotipi skupni vsem vrstam.

Mercè Galbany-Casals idr. (2014) so za filogenetsko analizo rodu *Helichrysum* uporabili kombinacijo označevalcev ITS in regije *rpl32-trnL* v kloroplastu. V analizo so bile vključene številne vrste iz rodu *Helichrysum*, med drugim tudi *H. italicum* subsp. *italicum* in subsp. *microphyllum*, ter vrste iz rodov *Achyrocline*, *Anaphalis*, *Pseudognaphalium* in *Humeocline*. Filogenetsko drevo z označevalci ITS se je nekoliko razlikovalo od filogenetskega drevesa s kloroplastnimi označevalci, kar je najverjetneje posledica kompleksnih evlucijskih procesov, kot so spontano križanje, alopoliploidija (pogost mehanizem za razvoj vrst pri rastlinah, do katerega pride, ko se križata dve različni vrsti in ima potomec garnituri kromosomov obeh staršev, kromosomi pa niso homologni) in hitra radiacija, kar pomeni hiter razvoj velikega števila vrst iz skupnega prednika v kratkem evlucijskem času (Galbany-Casals idr. 2014). Raziskava je potrdila, da je rod *Helichrysum* filogenetsko zelo kompleksen in široko razpršen znotraj plemena Gnaphalieae. Izviral naj bi iz južne Afrike, kjer je tudi središče njegove diverzifikacije. Avtorji so poudarili, da bi bilo za pravilno razumevanje razmerij znotraj rodu *Helichrysum* in sorodnih vrst ključnega pomena povezovanje molekularnih, morfoloških ter biogeografskih podatkov.

Genetsko in morfološko raznolikost 12 populacij rodu *Helichrysum* iz Toskane so nedavno raziskali tudi Marini idr. (2023) ter uporabili označevalski sistem medmikrosatelitne regije (angl. *Inter Simple Sequence*

Repeats – ISSR; regije med ponovitvami enostavnih zaporedij) in 27 morfoloških znakov. Raziskava je potrdila visoko genetsko in morfološko raznolikost, ki je bila izrazitejša znotraj populacij kot med populacijami. Za večino toskanskih vzorcev so potrdili, da pripadajo vrsti *H. italicum*, pri nekaterih pa so zaznali potencialno hibridizacijo z vrsto *H. litoreum*.

Zaključek

Raziskave laškega smilja in njegovih podvrst z različnimi molekulskimi označevalci potrjujejo, da je taksonomija zelo kompleksna in še vedno ne povsem pojasnjena, predvsem zaradi izjemne fenotipske raznolikosti, ki je posledica razlik v genotipih in okolju. Zaradi tega je še posebej pomemben razvoj označevalcev EST-SSRs, ki kažejo na splošno nižji polimorfizem v primerjavi z genomskimi SSR (Gupta idr. 2003) in bi bili zato učinkovitejši pri razlikovanju podvrst laškega smilja ter geografsko ločenih populacij. Nedvoumna identifikacija zdravilnih rastlin je ključnega pomena za zagotavljanje avtentičnosti in sledljivosti sadilnega materiala ter s tem varne uporabe rastlin. Z nizom novih označevalcev EST-SSRs nismo povečali le razpoložljivosti označevalcev laškega smilja, temveč bodo ti tudi v pomoč pri identifikaciji lokalnih genotipov (za zaščito pristnosti lokalnih proizvodov in geografskega porekla) in razvoju novih sort visoke kakovosti. Kljub številnim aplikacijam, ki jih omogočajo genomske in transkriptomske raziskave, je razpoložljivost kodirajočih in nekodirajočih nukleotidnih zaporedij pri laškem smilju omejena. Poleg tega prevladujejo raziskave, ki so osredotočene samo na kemijsko analizo eteričnega olja in drugih izvlečkov laškega smilja, medtem ko ostaja genetsko ozadje raznolikosti kemotipov nepojasnjeno.

Zato je izjemno pomembno, da si nenehno prizadevamo za razvoj visokokakovostnih nukleotidnih zaporedij genoma in transkriptoma ter visokoinformativnih molekulskih označevalcev, s čimer pomembno prispevamo k boljšemu razumevanju genetskega ozadja kompleksnih presnovnih poti in raznolikih kemotipov laškega smilja. To je namreč osnova za napredek v žlahtniteljskih programih, ki lahko hitreje privedejo do razvoja prvih dragocenih sort laškega smilja za ciljno uporabo v medicini in farmaciji.

Viri

Aghababyan, M., W. Greuter, P. Mazzola in F. M. Raimondo. 2009. »On the Taxonomy and Nomenclature of *Gnaphalium angustifolium* Lam. and *Helichrysum litoreum* Guss. (*Compositae*).« *Bocconea* 23:157–163.

- Andersen, J. R., in T. Lübberstedt. 2003. »Functional Markers in Plants.« *Trends in Plant Science* 8 (11): 554–560.
- Baruca Arbeiter, A., M. Hladnik, J. Jakše in D. Bandelj. 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 (10): 113298.
- Chung, A. M., J. E. Staub in J. F. Chen. 2006. »Molecular Phylogeny of Cucumis Species as Revealed by Consensus Chloroplast SSR Marker Length and Sequence Variation.« *Genome* 49 (3): 219–229.
- Gabrovšek, P., A. Baruca Arbeiter, M. Hladnik in D. Bandelj. 2024. »Development of EST-SSR from *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don (Asteraceae) de novo Assembled Transcriptome.« *V Genetika 2024: Book of Abstracts: 10th Congress of the Genetic Society of Slovenia and [10th] Meeting of the Slovenian Society for Human Genetics*, uredili S. Kranjc Brezar, M. Čemažar in B. Markelc. Genetic Society of Slovenia.
- Galbany-Casals, M., L. Saez in C. Benedi. 2006. »A Taxonomic Revision of *Helichrysum* sect. *Stoechadina* (Asteraceae, Gnaphalieae).« *Canadian Journal of Botany* 84 (4): 1203–1232.
- Galbany-Casals, M., M. Blanco-Moreno, N. Garcia-Jancas, I. Breitwieser in R. D. Smissen. 2011. »Genetic Variation in Mediterranean *Helichrysum italicum* (Asteraceae; Gnaphalieae): Do Disjunct Populations of subsp. *microphyllum* Have a Common Origin?« *Plant Biology* 13 (4): 678–687.
- Galbany-Casals, M., N. Garcia-Jacas, L. Saez, C. Benedi in A. Susanna. 2009. »Phylogeny, Biogeography, and Character Evolution in Mediterranean, Asiatic, and Macaronesian *Helichrysum* (Asteraceae, Gnaphalieae) Inferred from Nuclear Phylogenetic Analyses.« *International Journal of Plant Sciences* 170 (3): 365–380.
- Galbany-Casals, M., N. Garcia-Jacas, A. Susanna, L. Saez in C. Benedi. 2004. »Phylogenetic Relationships in the Mediterranean *Helichrysum* (Asteraceae, Gnaphalieae) Based on Nuclear rDNA ITS Sequence Data.« *Australian Systematic Botany* 17 (3): 241–253.
- Galbany-Casals, M., M. Unwin, N. Garcia-Jacas, R. D. Smissen, A. Susanna in R. J. Bayer. 2014. »Phylogenetic Relationships in *Helichrysum* (Compositae: Gnaphalieae) and Related Genera: Incongruence Between Nuclear and Plastid Phylogenies, Biogeographic and Morphological Patterns, and Implications for Generic Delimitation.« *Taxon* 63 (3): 608–624.
- Guo, X., Y. Song, S. Liu, M. Gao, Y. Qi in X. Shang. 2021. »Linking Genotype to Phenotype in Multi-Omics Data of Small Sample.« *BMC Genomics* 22 (1): 537.

- Gupta, P. K., H. S. Balyan, P. C. Sharma in B. Ramesh. 1996. »Microsatellites in Plants: A New Class of Molecular Markers.« *Current Science* 70 (1): 45–54.
- Gupta, P. K., S. Rustgi, S. Sharma, R. Singh, N. Kumar in H. S. Balyan. 2003. »Transferable EST-SSR Markers for the Study of Polymorphism and Genetic Diversity in Bread Wheat.« *Molecular Genetics and Genomics* 270 (4): 315–323.
- Hladnik, M., A. Baruca Arbeiter in D. Bandelj. 2023. »Sequence Characterization of ITS Regions of Immortelle *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don from the East Adriatic Coast.« *Genes* 14 (2): 480.
- Hladnik, M., A. Baruca Arbeiter, T. Knap, J. Jakše in D. Bandelj. 2019. »The Complete Chloroplast Genome of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don (Asteraceae).« *Mitochondrial DNA Part B* 4 (1): 1036–1037.
- Hladnik, M., A. Baruca Arbeiter, P. Gabrovšek idr. 2024. »New Chloroplast Microsatellites in *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Their Characterization and Application for the Evaluation of Genetic Resources.« *Plants* 13 (9): 2740.
- Kramberger, K., Z. Jenko Pražnikar, A. Baruca Arbeiter, A. Petelin, D. Bandelj in S. Kenig. 2021. »A Comparative Study of the Antioxidative Effects of *Helichrysum italicum* and *Helichrysum arenarium* Infusions.« *Antioxidants* 10 (3): 380.
- Lovén, J., D. A. Orlando, A. A. Sigova idr. 2012. »Revisiting Global Gene Expression Analysis.« *Cell* 151 (3): 476–482.
- Mäder, G., P. M. Zamberlan, N. J. R. Fagundes idr. 2010. »The Use and Limits of ITS Data in the Analysis of Intraspecific Variation in *Passiflora* L. (Passifloraceae).« *Genetics and Molecular Biology* 33 (1): 99–108.
- Marini, L., L. Bini, M. Gori idr. 2023. »Genetic and Morphological Assessment of *Helichrysum* Mill. from Tuscan Archipelago (Italy).« *Scientia Horticulturae* 321:112360.
- Melito, S., A. Sias, G. L. Petretto, M. Chessa, G. Pintore in A. Porceddu. 2013. »Genetic and Metabolite Diversity of Sardinian Populations of *Helichrysum italicum*.« *PLOS One* 8 (11): e79043.
- Morone-Fortunato, I., C. Montemurro, C. Ruta idr. 2010. »Essential Oils, Genetic Relationships and in vitro Establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don spp. italicum from Wild Mediterranean Germplasm.« *Industrial Crops and Products* 32 (3): 639–649.
- Nie, Z., V. Funk, H. Sun, T. Deng, Y. Meng in J. Ween. 2013. »Molecular Phylogeny of *Anaphalis* (Asteraceae, Gnaphalieae) with Biogeographic Implications in the Northern Hemisphere.« *Journal of Plant Research* 126 (1): 17–32.

- Ninčević, T., M. Jug-Dujaković, M. Grdiš idr. 2021. »Population Structure and Adaptive Variation of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Along Eastern Adriatic Temperature and Precipitation Gradient.« *Scientific Reports* 11:24333.
- Perrini, R., V. Alba, C. Ruta, I. Morone-Fortunato, A. Blanco in C. Montemurro. 2009. »An Evaluation of a New Approach to the Regeneration of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don, and the Molecular Characterization of the Variation Among Sets of Differently Derived Regenerants.« *Cellular and Molecular Biology Letters* 14 (3): 377–394.
- Rajendrakumar, P., A. K. Biswal, S. M. Balachandran, K. Srinivasarao in R. M. Sundaram. 2007. »Simple Sequence Repeats in Organellar Genomes of Rice: Frequency and Distribution in Genic and Intergenic Regions.« *Bioinformatics* 23 (1). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl547>.
- Sabetta, W., C. Montemurro, R. Perrini, I. Morone-Fortunato in A. Blanco. 2006. »Genetic Diversity Assessment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Mediterranean Germplasm by AFLP Markers.« V *Proceedings of the 50th Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress*. Società Italiana di Genetica Agraria.
- Taheri, S., T. L. Abdulah, M. R. Yusop idr. 2018. »Mining and Development of Novel SSR Markers Using Next Generation Sequencing (NGS) Data in Plants.« *Molecules* 23 (2): 399.
- Van Rossum, F., C. Godé, A. Baruca Arbeiter idr. 2024. »Genetic Diversity Assessment of *Helichrysum arenarium* (Asteraceae) for the Genetic Restoration of Declining Populations.« *Ecology and Evolution* 14 (2): e10953.
- Varshney, R. K., A. Graner in M. E. Sorrells. 2005. »Genic Microsatellite Markers in Plants: Features and Applications.« *Trends in Biotechnology* 23 (1): 48–55.
- Vieira, M. L. C., L. Santini, A. L. Diniz in C. F. Munhoz. 2016. »Microsatellite Markers: What They Mean and Why They Are so Useful.« *Genetics and Molecular Biology* 39 (3): 312–328.
- Wöhrmann, T., in K. Weising. 2011. »In Silico Mining for Simple Sequence Repeat Loci in a Pineapple Expressed Sequence Tag Database and Cross-Species Amplification of EST-SSR Markers Across Bromeliaceae.« *Theoretical and Applied Genetics* 123 (4): 635–647.
- Zalapa, J. E., H. Cuevas, H. Zhu idr. 2012. »Using Next-Generation Sequencing Approaches to Isolate Simple Sequence Repeat (SSR) Loci in the Plant Sciences.« *American Journal of Botany* 99 (2): 193–208.