

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Zorica S. Šarac

**UTVRĐIVANJE VARIJABILNOSTI I
DIFERENCIJACIJE PRIRODNIH
POPULACIJA *PINUS NIGRA* ARNOLD U
SRBIJI KORIŠĆENJEM
FITOHEMIJSKIH I MOLEKULARNIH
MARKERA**

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Zorica S. Šarac

**DETERMINATION OF VARIABILITY
AND DIFFERENTIATION OF NATIVE
POPULATIONS OF *PINUS NIGRA*
ARNOLD IN SERBIA USING
PHYTOCHEMICAL AND MOLECULAR
MARKERS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

KOMISIJA:

Prof. dr Petar D. Marin, redovni profesor,
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu,
Mentor

Dr Srđan Bojović, naučni savetnik,
IBI "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu,
Mentor

Dr Jelena M. Aleksić, naučni saradnik,
Institut za molekularnu genetiku i
genetičko inženjerstvo u Beogradu

Dr Biljana Nikolić, viši naučni saradnik,
Institut za šumarstvo u Beogradu

Prof. dr Peđa Janačković, vanredni profesor,
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu,

Datum odbrane:

Beograd, _____

Ova doktorska disertacija je urađena na:

*Katedri za morfologiju i sistematiku biljaka, Biološkog fakulteta u Beogradu,
Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković"*

*Katedri za organsku hemiju, Hemijskog fakulteta u Beogradu,
Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakultet u Nišu.*

*Doktorska disertacija je realizovana je u okviru tri projekta Ministarstva
prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. 173029, 173011 i 172053.*

*Izradom doktorske disertacije rukovodili su dr Petar D. Marin, redovni profesor
Biološkog fakulteta u Beogradu i dr Srđan Bojović, naučni savetnik IBI "Siniša
Stanković" u Beogradu, kojima dugujem najveću zahvalnost na nesebičnoj podršci i
pomoći u svim etapama izrade ove disertacije.*

*Posebnu zahvalnost dugujem i dr Jeleni Aleksić, naučnom saradniku na Institutu
za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu, na dragocenoj pomoći u
realizaciji molekularnih analiza i interpretaciji dobijenih rezultata. Takođe, zahvalnost
dugujem i ostalim članovima Komisije za ocenu doktorske disertacije dr Biljani Nikolić
sa Instituta za šumarstvo u Beogradu i prof. dr Peđi Janačkoviću sa Biološkog fakulteta
u Beogradu.*

*Od velikog značaja za izradu ove disertacije je i stručna pomoć prof. dr Veleta
Teševića i svih članova Laboratorije za instrumentalnu analizu Hemijskog fakulteta u
Beogradu, kojima se ovom prilikom od sveg srca zahvaljujem.*

*Zahvalnost želim da izrazim i kolegama sa Katedre za morfologiju i sistematiku
biljaka, Biološkog fakulteta u Beogradu, Tanji Dodoš i Nemanji Rajčeviću, na
dragocenoj pomoći i odvojenom vremenu za molekularne analize.*

*Zahvalnost dugujem i prof. dr Dmitru Lakušiću sa Biološkog fakulteta u
Beogradu na dragocenim sugestijama i pomoći u statističkoj obradi molekularnih
rezultata.*

*Najtoplije se zahvaljujem i prof. dr Vladimiru Randeloviću i docentu dr Bojanu
Zlatkoviću sa Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, koji su me uveli u svet botanike i
dali brojne praktične savete u izradi ovog rada.*

Hvala i svim kolegama sa Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu koji su na bilo koji način pomogli u izradi ove disertacije.

Beskrajnu zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima koji su me razumeli, bodrili i na sve načine pomagali da istrajem u ostvarenju svoga cilja.

Zorica Šarac

Utvrđivanje varijabilnosti i diferencijacije prirodnih populacija *Pinus nigra* Arnold u Srbiji korišćenjem fitohemijskih i molekularnih markera

REZIME

U ovom radu analizirana je fitohemijska i genetička varijabilnost i diferencijacija sedam autohtonih populacija *Pinus nigra* u Srbiji koje pripadaju različitim infraspecijskim taksonima (ssp. *nigra*, var. *gocensis*, ssp. *pallasiana* i var. *banatica*). U dvogodišnjim četinama 195 jedinki iz sedam populacija određen je sadržaj i varijabilnost *n*-alkana i terpena. Kutikularne voskove četina istraživanih populacija crnog bora odlikuje serija *n*-alkana od C₁₆ do C₃₃, osim u populacijama opisanim kao ssp. *nigra* u kojima je detektovana serija od C₁₈ do C₃₃. Najzastupljeniji su *n*-alkani sa neparnim brojem C atoma: C₂₃, C₂₅, C₂₇ i C₂₉ (prosečni sadržaj 10.3, 16.5, 15.1 i 10.7%, respektivno). U etarskim uljima četina utvrđeno je ukupno 75 komponenti, od koji je 58 identifikovano. Dominantne komponente su α -pinen (43.6%) i germakren D (29.8%), koje zajedno čine 73.4% mase ulja. Multivariacione statističke analize (PCA, CDA i HCA) korišćenih fitohemijskih markera su, generalno, pokazale tendenciju formiranja tri grupe populacija (*nigra*, *pallasiana* i *banatica*). Na osnovu varijabilnosti terpena, populacije Priboj i Goč (determinisane kao var. *gocensis*) pokazale su umerenu tendenciju odvajanja od prve grupe (ssp. *nigra*), dok je prema sastavu *n*-alkana populacija Priboj pokazala još veću tendenciju odvajanja. Pretpostavljeno je da takson *gocensis* predstavlja tranzicionu formu između taksona *nigra* na zapadu i *pallasiana* na jugoistoku Srbije.

U cilju određivanja genetičkog diverziteta i diferencijacije sedam istraživanih populacija *P. nigra* iz Srbije, testirano je 114 jedinki pomoću jedarnih (nuDNK), hloroplastnih (cpDNK) i mitohondrijalnih (mtDNK) markera koji imaju bi-parentalno, paternalno i maternalno nasleđivanje, respektivno, kao i različitu brzinu evolucije. Zbog nedostatka jedarnih mikrosatelita (nuSSRs) specijalno razvijenih za *P. nigra*, urađena je inter-specijska PCR amplifikacija tri EST-SSRs razvijenih za *P. taeda*. Iako su dva EST-SSR lokusa uspešno PCR-amplifikovana u našim uzorcima, utvrđeno je odsustvo varijabilnosti zbog čega su isključeni iz dalje analize. Od pet testiranih cpDNK SSRs, tri su uspešno PCR-amplifikovana u našim uzorcima, sa 22 detektovana alela koji formiraju 38 haplotipova. Kao što je i očekivano, s obzirom na intenzivan protok gena posredstvom

polena kod četinara, utvrđen je veoma visok nivo cpDNK diverziteta ($H_T = 0.949$) i mali stepen diferencijacije ($F_{st} = 0.017$, $p = 0.108$, $G_{st} = 0.024$, $R_{st} = 0.066$). Klaster analize koje se ne zasnivaju na genetičkim distancama već na Bayesian metodi (STRUCTURE i TESS) su, takođe, pokazale da sve ispitivane populacije *P. nigra* predstavljaju samo jednu genetičku grupu na osnovu varijabilnosti hloroplastnog genoma. Sa druge strane, PCA analize, zasnovane na frekvenci cpSSR alela i haplotipova, i NMDS analiza, zasnovana na vrednostima genetičke diferencijacije parova populacija, pokazale su da se populacije ssp. *nigra*, ssp. *pallasiana* i var. *banatica* mogu posmatrati kao tri zasebne grupe po tipu varijabilnosti. Osnovna razlika između PCA analize zasnovane na frekvenci haplotipova i NMDS analize, sa jedne strane, i PCA analize bazirane na frekvenci alela, sa druge strane, ogleda se u tome što prve dve analize ukazuju i na drugačiji tip varijabilnosti populacije Priboj (var. *gocensis*). Od tri testirana mtDNK lokusa samo jedan (*nad 7* intron 1) uspešno je PCR-amplifikovan u našim uzorcima, pri čemu su detektovana dva haplotipa što je rezultovalo u niskom mtDNK diverzitetu ($H_T = 0.357$), ali umerenoj genetičkoj diferencijaciji ($G_{st} = 0.359$), rezultat koji je saglasan sa asimetričnim protokom gena kod četinara. Takođe, na osnovu mtDNK genoma, bilo je moguće napraviti distinkciju između populacija ssp. *nigra* (Banjska stena, Omar i Zmajevački potok) i ostalih ispitivanih podvrsta i varijeteta ove vrste, ali nije bilo moguće međusobno razdvojiti ostale ispitivane podvrste i varijetete. Uočena distribucija mtDNK haplotipova u ispitivanim populacijama crnog bora omogućila je definisanje tri scenarija koji mogu objasniti sadašnju distribuciju mtDNK diverziteta kod crnog bora u Srbiji. Dobijeni rezultati su upoređeni sa dostupnim podacima o genetičkom diverzitetu i diferencijaciji *P. nigra* populacija.

Ključne reči: *Pinus nigra*, Pinaceae, *n*-alkani, terpeni, hemotaksonomija, jedarna DNK, hloroplastna DNK, mitohondrijalna DNK, genetički diverzitet, genetička diferencijacija, protok gena

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Morfologija, fitohemija i sistematika biljaka

UDK: [575.832+575.222/.224]:582.475(497.11)(043.3)

Determination of variability and differentiation of native populations of *Pinus nigra* Arnold in Serbia using phytochemical and molecular markers

ABSTRACT

In this work phytochemical and genetic variability and differentiation of seven native populations belonging to different infraspecific taxa of *Pinus nigra* (ssp. *nigra*, var. *gocensis*, ssp. *pallasiana* i var. *banatica*) in Serbia were analyzed. In the needles of 195 trees from seven populations, composition and variability of *n*-alkanes and terpenes were determined. The size of the *n*-alkanes found in the needle cuticular waxes of the black pine populations investigated ranged from C₁₆ to C₃₃, with the exception of that of the subspecies *nigra*, which ranged from C₁₈ to C₃₃. The most abundant *n*-alkanes were the four odd-numbered *n*-alkanes C₂₃, C₂₅, C₂₇, and C₂₉ (mean contents of 10.3, 16.5, 15.1, and 10.7%, respectively). In the needle essential oils a total of 58 individual components out of the 75 compounds detected could be identified. The major components of the oils were α -pinene (43.6%) i germakrene D (29.8%), comprising together in average 73.4% of the essential oil composition. Multivariate statistical analysis (PCA, CDA, and HCA) of used phytochemical markers showed, in general, a tendency to the formation of three populations groups (*nigra*, *pallasiana*, and *banatica*). Based on the terpene variability, populations Priboj and Goč, determined as var. *gocensis*, showed a moderate tendency of separation from the first group (ssp. *nigra*), while based on *n*-alkane composition, population Priboj showed even a greater tendency of separation. It was assumed that taxon *gocensis* might be a transitional form between taxa *nigra* occurring in the west and *pallasiana* growing in the southeast of Serbia.

We screened 114 trees from seven studied *P. nigra* populations from Serbia with nuclear (nrDNA), chloroplast (cpDNA) and mitochondrial (mtDNA) markers which have bi-parental, paternal and maternal inheritance, respectively, and different evolutionary rates to infer levels of genetic diversity and structuring within studied area. Due to the lack of nuclear microsatellites (nuSSRs) specifically developed for *P. nigra*, we employed three EST-SSRs developed for *P. taeda* for cross-species amplification in *P. nigra*. Although two EST-SSR loci were successfully PCR-amplified in our samples, they were

invariable and discarded from further analyses. Out of five tested cpDNA SSRs, three were successfully PCR-amplified in our samples, and 22 alleles were combined into 38 haplotypes. As expected, given the extensive pollen flow in conifers, the levels of cpDNA diversity were high ($H_T = 0.949$) and genetic differentiation was low ($F_{st} = 0.017$, $p = 0.108$, $G_{st} = 0.024$, $R_{st} = 0.066$). Cluster analyzes based on Bayesian method (STRUCTURE and TESS) instead of genetic distances, also showed that all studied *P. nigra* populations represent only one genetic group according to the chloroplast genome variability. On the other hand, PCA analysis based on a frequency cpSSR alleles and haplotypes, and NMDS analysis based on the values of genetic differentiation of population pairs showed that populations of ssp. *nigra*, ssp. *pallasiana*, and var. *banatica* can be considered as three separate groups according to the type of variability. The main difference between PCA analysis based on haplotype frequencies and NMDS analysis, on the one hand, and PCA analysis based on allele frequencies, on the other hand, is reflected in the fact that the first two analyzes indicate a different type of variation of population Priboj (var. *gocensis*). Out of three tested mtDNA loci, only one (*nad 7* intron 1) was successfully PCR-amplified in our samples, and two mtDNA haplotypes were found resulting in relatively low levels of mtDNA diversity ($H_T = 0.357$) but moderate genetic differentiation ($G_{st} = 0.359$), a finding concordant with asymmetrical gene flow in conifers. Also, on the base of the mtDNA genome, it was possible to distinguish between populations of ssp. *nigra* (Banjska stena, Omar, and Zmajevački potok) and the other studied subspecies and varieties of this species. However, it was not possible to separate the other investigated subspecies and varieties. The observed distribution of the mtDNA haplotypes in these populations of black pine has allowed definition of three scenarios that can explain the current distribution of mtDNA diversity in black pine in Serbia. We discuss our results in relation with available data on genetic diversity and differentiation in this species.

Key words: *Pinus nigra*, Pinaceae, *n*-alkanes, terpenes, chemotaxonomy, nuclear DNA, chloroplast DNA, mitochondrial DNA, genetic diversity, genetic differentiation, gene flow

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Morphology, phytochemistry and systematics of plants

UDK: [575.832+575.222/.224]:582.475(497.11)(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Distribucija i taksonomski pregled familije Pinaceae Lindley	1
1.2. Distribucija i taksonomski pregled roda <i>Pinus</i> L.	4
1.3. <i>Pinus nigra</i> J. F. Arnold	6
1.3.1. Sistematski položaj crnog bora	6
1.3.2. Poreklo i otkriće crnog bora.....	6
1.3.3. Morfologija, varijabilnost i taksonomija crnog bora	7
1.3.4. Horološke, ekološke i fitocenološke karakteristike crnog bora	16
1.3.5. Privredni i farmakološki značaj crnog bora	21
1.4. Alkani.....	25
1.4.1. Opšte karakteristike voskova	25
1.4.2. Opšte karakteristike alkana	29
1.4.3. Distribucija alkana	30
1.4.4. Biosinteza alkana	32
1.4.5. Genetska kontrola biosinteze alkana.....	35
1.4.6. Taksonomski značaj alkana	36
1.4.6.1. Niži nivoi klasifikacije	37
1.4.6.2. Viši nivoi klasifikacije	38
1.5. Terpeni.....	40
1.5.1. Definicija i opšte karakteristike etarskih ulja.....	40
1.5.2. Opšte karakteristike terpena.....	42
1.5.2.1. Monoterpeni	44
1.5.2.2. Seskviterpeni	47
1.5.3. Distribucija i uloga terpena u biljkama	48
1.5.4. Biosinteza terpenskih molekula	50
1.5.5. Genetska kontrola biosinteze terpena	54
1.5.6. Taksonomski značaj.....	56
1.5.6.1. Niži nivoi klasifikacije	56
1.5.6.2. Viši nivoi klasifikacije	58
1.6. Populaciono-genetička i filogeografska istraživanja kod biljaka	59
1.6.1. Parametri genetičkog diverziteta i genetičke diferencijacije (strukture) između više populacija	65

1.6.2. Osnovne karakteristike biljnih genoma i njihova primena u populaciono genetičkim i filogeografskim istraživanjima kod biljaka.....	68
1.6.2.1. Jedarni genom biljaka	70
1.6.2.2. Hloroplastni genom biljaka	72
1.6.2.3. Mitohondrijalni genom biljaka.....	76
1.6.3. Molekularni markeri u populaciono-genetičkim i filogeografskim istraživanjima.....	79
1.6.3.1. Mikrosateliti	82
2. CILJEVI RADA	87
3. MATERIJAL I METODE	88
3.1. Istraživane populacije crnog bora	88
3.1.1. Uzorkovanje i skladištenje četina	89
3.2. Hemijske analize	91
3.2.1. Ispitivanje alkana	91
3.2.2. Ispitivanje terpena	92
3.3. Statistička analiza.....	93
3.4. Molekularne analize	94
3.4.1. Izolacija i PCR amplifikacija odabranih regiona DNK	95
3.4.1.1. Inter-specijska PCR amplifikacija jedarnih EST-mikrosatelita	96
3.4.1.2. PCR amplifikacija hloroplastnih mikrosatelita	98
3.4.1.3. PCR amplifikacija mitohondrijalnog lokusa <i>nad7</i> intron 1	100
3.4.2. Genetička analiza	101
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	105
4.1. <i>n</i>-Alkani	105
4.1.1. Hemijski sastav <i>n</i> -alkana	105
4.1.2. Varijabilnost <i>n</i> -alkana.....	106
4.1.3. Varijabilnost ugljeničnog preferencijalnog indeksa (CPI) i srednje dužine niza ugljenikovih atoma (ACL).....	109
4.1.4. Statistička obrada rezultata ispitivanja <i>n</i> -alkana.....	111
4.1.5. Diskusija rezultata ispitivanja <i>n</i> -alkana	113
4.2. Terpeni.....	116
4.2.1. Hemijski sastav etarskih ulja	116
4.2.2. Varijabilnost etarskih ulja	123
4.2.3. Statistička obrada rezultata ispitivanja etarskih ulja.....	125

4.2.4. Diskusija rezultata ispitivanja etarskih ulja	130
4.3. Jedarni EST-mikrosateliti (EST-SSRs).....	134
4.3.1. Genetički diverzitet na nivou jedarnog genoma	134
4.3.2. Genetička diferencijacija populacija na nivou jedarnog genoma i analiza molekularne varijanse	137
4.3.3. Diskusija rezultata ispitivanja jedarnih EST-mikrosatelita.....	140
4.4. Hloroplastni mikrosateliti (cpSSRs)	142
4.4.1. Genetički diverzitet na nivou hloroplastnog genoma	142
4.3.2. Genetička diferencijacija populacija na nivou hloroplastnog genoma i analiza molekularne varijanse	148
4.4.3. Diskusija rezultata ispitivanja hloroplastnih mikrosatelita	157
4.5. Mitohondrijalna sekvenca <i>nad7</i> intron1	162
4.5.1. Karakteristike sekvence	162
4.5.2. Genetički diverzitet i diferencijacija populacija na nivou mitohondrijalnog genoma.....	164
4.5.3. Diskusija rezultata ispitivanja mtDNK sekvence <i>nad7</i> intron 1	167
5. OPŠTA DISKUSIJA	171
6. ZAKLJUČCI.....	178
7. LITERATURA	186
8. PRILOG	238

1. UVOD

1.1. Distribucija i taksonomski pregled familije Pinaceae

Lindley

Familija Pinaceae je najveća (više od 230 vrsta), ekonomski najznačajnija i filogenetski bazična familija četinara (Hart, 1987; Price et al., 1993; Chaw et al., 1995; 1997; Stefanovic et al., 1998; Gugerli et al., 2001a). Predstavnici familije su drvenaste biljke (2- do 100-m visine) sa igličastim, zimzelenim listovima, izuzev rodova *Larix* i *Pseudolarix*, koji su listopadni. Mnoge vrste imaju izuzetan ekonomski značaj zbog mekog drveta koje se koristi u građevinarstvu (*Abies*, *Cedrus*, *Larix*, *Picea* i *Pinus*), ali i u industriji papira, smole, drvenog uglja i hrane.

Predstavnici familije Pinaceae su često edifikatori borealnih, primorskih i brdskih šuma severne hemisfere (Farjon, 1990; Liston et al., 2003). Na primer, *Pinus*, najveći rod familije sa više od 110 vrsta, zauzima ogromna prostranstva Severne Amerike, severnog dela Azije i Evrope (Farjon, 1990). Većina rodova ima disjunktan areal, sa glavnim centrima diverziteta na planinama jugozapadne Kine, Meksika i Kalifornije (Farjon, 1990). Fosilni nalazi ukazuju da su se preci Pinaceae pojavili tokom kasnog Trijasa (~220-208 Ma; Miller, 1976) i široko rasprostranili u Aziji i Severnoj Americi. Međutim, u Evropi su obilni fosilni nalazi pronađeni samo u slojevima posle Krede (LePage and Basinger, 1995; Liu and Basinger, 2000; LePage, 2003).

Od pionirskog rada Van Tighem-a (1891) do danas, u familiji Pinaceae je opisano 12 rodova Pinaceae: *Abies*, *Cathaya*, *Cedrus*, *Hesperopeuce*, *Keteleeria*, *Larix*, *Nothotsuga*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudolarix*, *Pseudotsuga* i *Tsuga*. Zbog izrazite morfološke konvergencije unutar familije, reč je filogenetski kompleksnoj grupi (Hart, 1987; Farjon, 1990). Ipak, postoji nekoliko osobina koje snažno podržavaju njeno monofiletsko poreklo: P-tip plastida u sitastim cevima (tj. plastidi akumuliraju protein kao jedini produkt ili kao dodatak skrobu; Behnke, 1974), obrazac preembriogeneze (Dogra, 1980), nedostatak biflavonoida (Geiger and Quinn, 1975) i neobični indel (insercija/delecija) na poziciji 195 jedarnog gena za 18S rRNK (Chaw et al., 1997). Sve

ove osobine jedinstvene su za familiju Pinaceae u poređenju sa ostalim recentnim golosemenicama.

Do danas je predložen veći broj klasifikacionih šema Pinaceae (tabela 1-1), a glavne nesuglasice između pojedinih autora odnose se na položaj rodova *Cathaya*, *Cedrus*, *Psudolarix* i *Psudotsuga* kao i broj podfamilija. Van Tieghem (1891) je podelio familiju na dve "grupe" (ekvivalentne podfamilijama u današnjem sistemu) na osnovu broja i položaja smonih kanala u vaskularnom regionu primarnog korena. "Myeloceles" grupa (=subfamilia Abietoideae) uključuje rodove *Tsuga*, *Cedrus*, *Abies*, *Keteleeria* i *Pseudolarix* sa jednim centralnim smonim kanalom, dok "Epixyloceles" (=subfamilia Pinoideae) uključuje rodove *Pinus*, *Picea*, *Pseudotsuga* i *Larix* sa smonim kanalima pored svakog pola protoksilema. Ove dve grupe prihvatili su Jeffrey (1905), Doyle (1945) i Price i sar. (1987; *Cathaya* nije uključen) na osnovu anatomije drveta, morfologije polena i imunoloških reakcija proteina semena, respektivno. Sa druge strane, Vierhapper (1910) Pinaceae deli na dva tribusa i to na osnovu dimorfizma izdanaka. U tribus Pineae uključio je samo rod *Pinus*, koji se izdvaja po neobično kratkim izdancima, a u tribus Sapineae preostalih osam tada poznatih rodova. Sapineae je dalje podelio na dva podtribusa: Abietinae (*Abies*, *Keteleeria*, *Tsuga*, *Picea* i *Pseudotsuga*) sa isključivo dugim i Laricinae (*Larix*, *Pseudolarix* i *Cedrus*) sa dimorfnim izdancima. Međutim, Price (1989) ukazuje da je ovakva podela Pinaceae u potpunosti veštačka, s obzirom da se posmatra samo jedan morfološki karakter. Frankis (1988) i Farjon (1990) istakli su značaj reproduktivne morfologije (šišarki, semena, polena) i broja hromozoma i Pinaceae podelili na četiri podfamilije: Pinoideae, Piceoideae, Laricoideae i Abietoideae. Tokom protekle decenije publikovan je i značajan broj radova u kojima su korišćeni različiti molekularni markeri, kako bi se rasvetlili filogenetski odnosi unutar familije Pinaceae (tabela 1-1).

Tabela 1-1. Predložene klasifikacije familije Pinaceae.

Autori	Korišćeni karakteri	Klasifikacioni sistemi
Van Tieghem (1891) Jeffrey (1905) Doyle (1945) Price i sar. (1987)	Smoni kanali Anatomija drveta Palinologija Imunologija	I. Myelocetes (Abietoideae): <i>Abies</i> , <i>Cedrus</i> , <i>Keteleeria</i> , <i>Pseudolarix</i> , <i>Tsuga</i> II. Epixyloceles (Pinoideae): <i>Larix</i> , <i>Picea</i> , <i>Pinus</i> , <i>Psudotsuga</i>
Vierhapper (1910) Pilger (1926) Melchior i Werdermann (1954)	Dimorfizam izdanaka Listovi i katafili Listovi i katafili	I. Pineae: <i>Pinus</i> II. Sapineae: 1. Abietinae: <i>Abies</i> , <i>Keteleeria</i> , <i>Picea</i> , <i>Psudotsuga</i> , <i>Tsuga</i> 2. Laricinae: <i>Cedrus</i> , <i>Larix</i> , <i>Psudolarix</i>
Frankis (1988) Farjon (1990)	Reproduktivna morfologija	I. Pinoideae: <i>Pinus</i> II. Piceoideae: <i>Picea</i> III. Laricoideae: <i>Cathaya</i> , <i>Larix</i> , <i>Psudotsuga</i> IV. Abietoideae: <i>Abies</i> , <i>Cedrus</i> , <i>Psudolarix</i> , <i>Hesperopeuce</i> *, <i>Nothotsuga</i> , <i>Keteleeria</i> , <i>Tsuga</i>
Napp-Zinn i Hu (1989) Hu i sar. (1989)	Tipovi stominog aparata	I. Amphicyclic: <i>Abies</i> , <i>Cedrus</i> , <i>Keteleeria</i> , <i>Picea</i> , <i>Tsuga</i> II. Monocyclic: <i>Cathaya</i> , <i>Larix</i> , <i>Pinus</i> , <i>Psudolarix</i> , <i>Psudotsuga</i>
Li (1995)	Kariologija	I. Pinoideae: 1. Pineae: <i>Pinus</i> 2. Abietae: <i>Abies</i> , <i>Cathaya</i> , <i>Cedrus</i> , <i>Keteleeria</i> , <i>Picea</i> , <i>Tsuga</i> 3. Lariceae: <i>Psudotsuga</i> , <i>Larix</i> II. Pseudolaricoideae: 1. Psudolariceae: <i>Psudolarix</i>
Wang i sar. (2000)	Molekularni podaci <i>nad5</i> , <i>matK</i> i <i>4CL</i>	I. Pinoideae: <i>Cathaya</i> , <i>Larix</i> , <i>Picea</i> , <i>Pinus</i> , <i>Psudotsuga</i> II. Abietoideae: <i>Abies</i> , <i>Keteleeria</i> , <i>Nothotsuga</i> , <i>Psudolarix</i> , <i>Tsuga</i>
Liston i sar. (2003)	Molekularni podaci <i>5.8S</i> , <i>ITS-2</i> i <i>rbcL</i>	I. Pinoideae: <i>Cathaya</i> , <i>Larix</i> , <i>Picea</i> , <i>Pinus</i> , <i>Psudotsuga</i> II. Abietoideae: <i>Abies</i> , <i>Keteleeria</i> , <i>Psudolarix</i> , <i>Tsuga</i>
Gernandt i sar. (2008)	Morfološki, fosilni i molekularni podaci (<i>matK</i> i <i>rbcL</i>)	I. Pinoideae: <i>Cathaya</i> , <i>Larix</i> , <i>Picea</i> , <i>Pinus</i> , <i>Psudotsuga</i> II. Abietoideae: <i>Abies</i> , <i>Cedrus</i> , <i>Keteleeria</i> , <i>Nothotsuga</i> , <i>Psudolarix</i> , <i>Tsuga</i>
Lin i sar. (2010)	Molekularni podaci hloroplastna DNK	I. Abietoideae: <i>Cedrus</i> , <i>Keteleeria</i> , <i>Abies</i> II. Pinoideae: <i>Pinus</i> , <i>Cathaya</i> , <i>Picea</i> , <i>Psudotsuga</i> , <i>Larix</i> , ili I. Cedroideae: <i>Cedrus</i> II. Abietoideae: <i>Keteleeria</i> , <i>Abies</i> III. Laricoideae: <i>Larix</i> , <i>Psudotsuga</i> IV. Piceoideae: <i>Picea</i> V. Pinoideae: <i>Pinus</i> , <i>Cathaya</i>

**Hesperopeuce* je rod koji uključuje samo Frankis (1988).

1.2. Distribucija i taksonomski pregled roda *Pinus* L.

Rod *Pinus*, sa više od 110 opisanih vrsta, predstavlja najveći recentni rod četinarara. Prirodna distribucija roda ograničena je na severnu hemisferu, izuzev jedne populacije *P. merkusii* koja se nalazi južno od ekvatora na Sumatri (Mirov, 1967). Iako se borovi pretežno javljaju u srednjim geografskim širinama (30-55°), značajni centri diverziteta postoje i u visokim (> 55°) i u niskim geografskim širinama (< 30°). Obilno su zastupljeni u Severnoj i Centralnoj Americi, Evropi i Aziji, a nekoliko taksona se proteže i do severne Afrike. Javljaju se na raznovrsnim staništima, od nivoa mora do 3700 m nadmorske visine, a vrlo često su i edifikatori različitih zajednica. Po pravilu, borovi odsustvuju u toplim i vlažnim regionima tropskog pojasa, gde su slabi kompetitori sa ostalim taksonima (Mirov, 1967). U okviru tropskog pojasa javljaju se isključivo u planinskim ili semi-aridnim područjima.

Jedinstvene morfološke osobine (igličasti listovi grupisani u čuperke na kratkorastima i odrvenele plodne ljuspe sa specijalizovanim apikalnim regionom - umbo) u kombinaciji sa molekularnim podacima ukazuju da se pripadnici roda *Pinus* jasno razlikuju od srodnih rodova kao što je *Cathaya* i *Picea*. Usled velikog ekonomskog (Le Maitre, 1998) i ekološkog (Richardson and Rundel, 1998) značaja, rod *Pinus* se poslednjih godina našao u fokusu brojnih molekularno-evolutivnih istraživanja. Korišćeni su različiti tipovi podataka da bi se odredili filogenetski odnosi uključujući alozime (Karalamangala and Nickrent, 1989), RFLP (Strauss and Doerkse, 1990; Krupkin et al., 1996) kao i različite sekvence DNK iz sva tri biljna genoma (Liston et al., 1999; Wang et al., 1999; Gernandt et al., 2005). Međutim, i pored velikog broja dostupnih podataka, pitanje filogenetskih odnosa je i dalje ostalo nerešeno.

Najšire prihvaćenu klasifikaciju roda predložili su Little i Critchfield (1969), a u kasnijim revizijama izmenjen je broj vrsta i modifikovana taksonomska organizacija na nivou sekcija i podsekcija (Farjon and Styles, 1997; Price et al., 1998; Gernandt et al., 2003; 2005). Naime, rod *Pinus* se deli deli na dva podroda: *Pinus* (= *Diploxylon*) i *Strobus* (= *Haploxylon*). Subgenus *Pinus* odlikuju dva sudovna snopića u centru lista i trajni rukavac koji obavija četine u čuperku (osim kod vrsta *P. leiophylla* i *P. lumholtzii*). Plodne ljuspe su deblje i rigidnije u poređenju sa plodnim ljuspama *Strobus*.

Ostale karakteristike podroda, koje navodi Farjon (1984), su veoma polimorfne ili imaju malu dijagnostičku vrednost: broj iglica u čuperku varira od 2-8, položaj smonih kanala polimorfan (unutrašnji, spoljašnji, medijalni ili septalni), krilce spojeno ili sraslo sa semenom, zrele šišarke se otvaraju odmah ili nakon određenog vremena, subgenus je rasprostranjen širom severne hemisfere i na različitim tipovima staništa. Sa druge strane, subgenus *Strobis* odlikuje jedan sudovni snopić u centru lista i rukavci četina koji brzo opadaju (osim kod vrste *P. nelsonii*). Plodne ljuspe su tanje i fleksibilnije, broj iglica u čuperku varira od 1-5 (retko 6), smoni kanali su medijalni ili spoljašnji, krilca semena veoma polimorfna (odsutno, rudimentirano, spojeno ili sraslo), zrele šišarke se obično odmah otvaraju. *Strobis* je, takođe, rasprostranjen širom severne hemisfere, na različitim tipovima staništa, osim u subtropskim nizijama. Dalja podela na sekcije i podsekcije se razlikuje između pojedinih autora. Poređenjem morfologije, anatomije, citologije, sekundarnih metabolita, proteina i DNK, Price i sar. (1998) izdvajaju 111 vrsta u 2 podroda, 4 sekcije i 17 podsekcija, dok su Gernandt i sar. (2005) na osnovu analize hloroplastne DNK (*matK* i *rbcL*) smanjili broj podsekcija na 11 (tabela 1-2).

Tabela 1-2. Klasifikacija roda *Pinus* prema Gernandt-u i sar. (2005).

Podrod *Pinus* (*Diploxylon*)

Sekcija *Pinus*, Podsekcija *Pinus*: *P. densata, densiflora, hwangshanensis, kesiya, luchuensis, massoniana, merkusii, mugo**, *nigra**, *resinosa, sylvestris**, *tabuliformis, taiwanensis, thunbergii, tropicalis, uncinata, yunnanensis*; **Podsekcija *Pinaster*:** *P. brutia, canariensis, halepensis, heldreichii**, *pinaster, pinea, roxburghii*.

Sekcija *Trifoliae*, Podsekcija *Contortae*: *P. banksiana, clausa, contorta, virginiana*; **Podsekcija *Australes*:** *P. attenuata, caribaea, cubensis, echinata, elliottii, glabra, greggii, herrerae, jalscana, lawsonii, leiophylla, lumholtzii, muricata, occidentalis, oocarpa, palustris, patula, praetermissa, pringlei, pungens, radiata, rigida, serotina, taeda, tecunumanii, teocote*; **Podsekcija *Ponderosae*:** *P. cooperi, coulteri, donnell-smithii, devoniana, douglasiana, durangensis, engelmannii, hartwegii, jeffreyi, maximinoi, montezumae, nubicola, ponderosa, pseudostrobus, sabineana, torreyana, washoensis*.

Podrod *Strobis* (*Haploxylon*)

Sekcija *Parrya*, Podsekcija *Balfourianae*: *P. aristata, balfouriana, longaeva*; **Podsekcija *Cembroides*:** *P. cembroides, culminicola, discolor, edulis, johannis, maximartinezii, monophylla, pinceana, quadrifolia, remota, rzedowskii*; **Podsekcija *Nelsoniae*:** *P. nelsonii*

Sekcija *Quinquefoliae*, Podsekcija *Gerardianae*: *P. bungeana, gerardiana, squamata*; **Podsekcija *Krempfianae*:** *P. krempfii*; **Podsekcija *Strobis*:** *P. albicaulis, armandii, ayacahuite, bhutanica, cembra, chiapensis, dabeshanensis, dalatensis, fenzeliana, flexilis, koraiensis, lambertiana, monticola, morrisonicola, parviflora, peuce**, *pumila, sibirica, strobus, wallichiana, wangii*.

*Autohtone vrste u flori Srbije (Jovanović, 1992).

1.3. *Pinus nigra* J. F. Arnold

1.3.1. Sistematski položaj crnog bora

Pinus nigra J. F. Arnold (crni ili austrijski bor) taksonomski pripada razdelu četinarara (*Pinophyta*, *Coniferophyta* ili *Gymnospermae*), klasi *Pinopsida*, redu *Pinales*, familiji *Pinaceae* i podfamiliji *Pinoideae* (tabela 1-3).

Tabela 1-3. Sistematski položaj vrste *Pinus nigra* J. F. Arnold.

Razdeo (<i>divisio</i>):	<i>Pinophyta</i> (<i>Coniferophyta</i> , <i>Gymnospermae</i>)
Klasa (<i>classis</i>):	<i>Pinopsida</i>
Red (<i>ordo</i>):	<i>Pinales</i>
Familija (<i>familia</i>):	<i>Pinaceae</i>
Podfamilija (<i>subfamilia</i>):	<i>Pinoideae</i>
Rod (<i>genus</i>):	<i>Pinus</i>
Podrod (<i>subgenus</i>):	<i>Pinus</i> (<i>Diploxylon</i>)
Sekcija (<i>section</i>):	<i>Pinus</i> (Gernandt, 2005)
Podsekcija (<i>subsection</i>):	<i>Pinus</i> (Gernandt, 2005)

1.3.2. Poreklo i otkriće crnog bora

Pinus nigra je tercijerni relikat i jedan od najstarijih borova Evrope. Relativno malo se zna o njegovoj dugoj istoriji, iako je u Tercijeru bio šire rasprostranjen nego danas. Smatra se da je na Kavkazu, gde je danas zastupljena *P. nigra* ssp. *pallasiana*, bila mediteranska tercijerna flora. Izgleda da preci ovog i drugih borova koji se sada nalaze na Kavkazu, dolaze iz jugoistočne Azije (Vidaković, 1982). Fosilni nalazi *P. nigra* iz tercijara pronađeni su u centralnoj Nemačkoj (Studt, 1926) i južnoj Francuskoj (Stojanoff and Stefanoff, 1929). Mirov (1967) navodi da je za vreme pliocena *P. nigra* rastao na lokalitetima na kojima se pojavljuje i danas.

Crni bor je prvi opisao Arnold 1785. god. sa područja južne Austrije pod imenom *Pinus nigra*. Schwarz 1938. god. osporava prioritet toga imena i on crni bor naziva *Pinus maritima* Mill. Očigledno je, da je Arnoldov crni bor ustvari austrijski crni

bor, koga je 1825. god. opisao Höss kao *Pinus austriaca*, a Host 1826. god. kao *Pinus nigricans* (prema Vidaković, 1955).

1.3.3. Morfologija, varijabilnost i taksonomija crnog bora

Pinus nigra Arn. je drvenasta zimzelena vrsta koja raste u visinu do 30, ređe 40 (50) m (slika 1-1). Odlikuje se svetlo-sivom do tamno sivosmeđom korom koja je kod starijih stabala duboko uzdužno ispucala. Kora se u boji i debljini malo razlikuje u donjem i gornjem delu (razlika od belog bora). Krošnja mlađih stabala je širokokupasta, a kod starijih kišobranasta, naročito na plitkom zemljištu na stenovitoj podlozi. Vrhovi grana kod mlađih stabala malo povijeni prema gore, dok su kod starijih stabala samo grane pri vrhu krošnje imaju povijene vrhove (Vidaković, 1982). Jednogodišnji izbojci goli, sjajni, pokriveni sitnim rombičastim ljuspama. Pupoljci jajoliki do duguljastojajoliki, sivosmeđi, smolasti. Četine po dve, zelene do tamno zelene, prilično tvrde, duge 8-18 cm, široke 1.5-2.1 mm, pravo pružene ili blago povijene, traju obično 4-5 godina (Jovanović, 1992). Smoni kanali u četinama medijalno postavljeni; rukavac trajan, dug 10-12 mm, obavlja po dve četine.



Slika 1-1. *Pinus nigra* u kanjonu Mileševke, jugozapadna Srbija (foto: Zlatković, 2013)

Crni bor je jednodoma vrsta sa jednopolnim šišarkama. Muške šišarice (mikrostrobilusi) podsećaju na rese, žućkastozelene su boje, oko 2 cm duge, zbijene u grupama pri osnovi ovogodišnje grančice. Građene su od centralne osovine na kojoj su spiralno raspoređeni ljuspičasti mikrosporofili. Sa donje strane mikrosporofila nalaze se dve mikrosporangije (polenove kesice) u kojima se razvijaju mnogobrojne mikropore (polenova zrna). Ženske šišarke (megastrobilusi) su sedeće, formiraju se pri vrhu

ovogodišnjih izbojka, crvenkaste boje. Sastoje se iz glavne osovine na kojoj su spiralno raspoređene zaštitne ljuspe, u čijem pazuhu se nalaze plodne ljuspe (makrosporofili). Pri osnovi plodne ljuspe, sa gornje strane, nalaze se dva semena zametka okrenuta mikropilom nadole. Mlade šišarke sa polenom i šišarke sa semenim zamecima se pojavljuju u aprilu i maju. Zrele šišarke su jajasto-kupaste, duge 4-10 cm, široke oko 4 cm, žutosmeđe ili svetlosmeđe, sjajne. Izgrađene su od odrvenelih plodnih ljuspi, koje su spiralno rasporedjene, sa donje strane crnkastosmeđe. Štitić je izbočen, grbica tamnosmeđa, većinom se završava malim šiljkom. U pazuhu plodnih ljuspi se nalaze po dva semena sa mikropilom okrenutom na dole. Seme je sivo, 4-7 mm dugo sa oko 2 cm dugim krilcem. Seme sazri do jeseni druge godine (u septembru ili oktobru, 18 meseci nakon oprašivanja). Šišarke se otvaraju narednog proleća (u trećoj godini) kada se krilasta semena rasejavaju vetrom.

Crni bor je jedan od najšire rasprostranjenih i najpolimorfnijih četinara Evrope. Diskontinuirano je rasprostranjen oko severnog Mediterana, od istočne Španije i južne Francuske, preko Korzike i Kalabrije, Austrije i Balkanskog poluostrva do Male Azije i Krima. U saglasnosti sa geografskom, topografskom i ekološkom raznovršnošću areala, disjunktnom distribucijom i dugom istorijom, crni bor je vrsta izraženog morfološkog varijabiliteta. Različite geografske grupe su izolovane jedne od drugih prirodnim barijerama, nastalim kroz geološke pokrete, suprotstavljene različitim klimatskim i edafskim faktorima kao i delovanju čoveka. Izražena varijabilnost u morfološko-anatomskim karterima (Delevoy, 1949; Wright and Bull, 1962; Gellini, 1968; Lee, 1968; Arbez and Millier, 1971), ali i činjenica da su geografske grupe prostorno interfertilne (Vidaković 1982), predstavljaju prepreku za tradicionalne klasifikacije bazirane uglavnom na sintezi morfološko-anatomskih i fitogeografskih istraživanja ove veoma kompleksne vrste. Kao posledica toga, do danas su publikovane mnogobrojne klasifikacije crnog bora ali opšti konsenzus još uvek nije postignut.

Prva klasifikacija predložena je pre više od jednog veka od strane Nyman-a (1879), a tokom narednih decenija objavljen je veliki broj novih klasifikacija, baziranih uglavnom na fenotipskim i fitogeografskim podacima (Olzabal, 1915; 1916; Rubner, 1925; Svoboda, 1935; Rikli, 1943; Novak, 1953; Fukarek, 1958a; 1958b; Debazac, 1964; Arbez, 1987). Poslednjih 30-40 godina taksonomska istraživanja crnog bora su postala još intenzivnija pri čemu su uključeni različiti tipovi podataka: fenotipske

karakteristike (Rohrig, 1957; 1966; 1969; Vidaković, 1974), enzimi (Bonnet-Masimbert and Bikay-Bikay, 1978; Fineschi, 1983), terpeni (Arbez et al., 1974; Fineschi and Grossoni, 1981; Gerber et al., 1995; Rafii et al., 1996; Bojović et al., 2005), kariološki (Borzan, 1977; 1981; Kaya et al., 1985; Bogunić et al., 2007; 2011) i molekularni podaci (Liber et al., 2003; Naydenov et al., 2006; Afzal-Rafii and Dodd, 2007; Jaramillo-Correa et al., 2010; Soto et al., 2010; Rubio-Moraga et al., 2012). Međutim, intraspecijska klasifikacija i horologija crnog bora su i dalje ostale nerešene. Među mnogobrojnim mogućim uzrocima, Liber i sar. (2003) kao najvažnije izdvajaju:

- nijedno dosadašnje istraživanje ne pokriva ceo areal crnog bora;
- integracija dosadašnjih istraživanja pojedinih oblasti nije moguća zbog razlika u uzorcima i metodama;
- crni bor je ekstremno varijabilan u morfološkim i anatomskim karakteristikama koje su do sada najviše korišćene u intraspecijskoj klasifikaciji i horologiji.

Na osnovu pregleda literature jasno je da postoje velike razlike između pojedinih autora u percepciji vrste *P. nigra*. Naime, jedna grupa autora (Svoboda, 1953; Fukarek, 1958; Gaussen, 1960) smatra da je reč o nekoliko malih ili geografskih vrsta koje formiraju agregat (kolektivnu vrstu) (tabela 1-4), dok druga grupa (Schwarz, 1938; Blečić, 1967; Delevoy, 1949; Gaussen et al., 1993) crni bor posmatra kao jednu vrstu sa dve, tri ili više podvrsta i velikim brojem nižih infraspecijskih taksona (tabela 1-5). Gaussen i sar. (1993) u Flori Evrope crni bor tretiraju kao jednu vrstu koju dele na pet alopatričnih podvrsta (slika 1-6): *P. nigra* ssp. *nigra* (= *P. nigricans* Host) od Austrije do centralne Italije i Grčke, *P. nigra* ssp. *salzmannii* (Dun.) Franco (= *P. pyrenaica sensu* Willk. = *P. clusiana* Rojas (Clemente) = *P. salzmannii* Dun.), Ceven i Pirineji (Francuska), centralna i istočna Španija; *P. nigra* ssp. *dalmatica* (Vis.) Franco, priobalni region i ostrva Dalmacije (Hrvatska); *P. nigra* ssp. *pallasiana* (Lamb. Holmboe (= *P. pallasiana* Lamb.), Balkansko poluostrvo, južni Karpati i Krim *P. nigra* ssp. *laricio* (Poir.) Maire (= *P. laricio* Poir.), Kalabrija i Sicilija (Italija) i Korzika (Francuska). Takođe, severozapadne afričke populacije *P. nigra* opisane su kao posebna podvrsta: ssp. *mauretanica* (Maire and Peyreimh) Heywood (Greuter et al., 1984; Barbéro et al., 1998) (slika 1-6).

Tabela 1-4. Predložene klasifikacije crnog bora kao kolektivne vrste (agregata).

Autori	Klasifikacioni sistemi
Nyman i Gandoger (prema Fukarek, 1958) Ronniger (1924)	<i>Pinus laricio</i> i <i>P. nigricans</i>
Villar (1947) Svoboda (1953)	<i>Pinus clusiana</i> ili <i>P. laricio</i> (zapadna vrsta) i <i>P. nigricans</i> ili <i>P. eunigra</i> (istočna vrsta)
Fukarek (1958a, b)	<i>Pinus clusiana</i> , <i>P. laricio</i> , <i>P. nigricans</i> i <i>P. pallasiana</i>
Gaussen (1960)	<i>Pinus salzmanni</i> , <i>P. mauretanica</i> , <i>P. laricio</i> , i <i>P. nigra</i>

Tabela 1-5. Predložene klasifikacije crnog bora kao jedinstvene vrste.

Autori	Klasifikacioni sistemi
Schwarz (1938)	ssp. <i>pallasiana</i> , ssp. <i>fenzlii</i> , ssp. <i>nigra</i> , ssp. <i>dalmatica</i> , ssp. <i>laricio</i> i ssp. <i>salzmannii</i> .
Blečić (1967)	ssp. <i>nigra</i> (Austrija, Italija, Grčka, bivša Jugoslavija), ssp. <i>salzmannii</i> (Francuska, severni Pirineji, centralna i istočna Švajcarska), ssp. <i>laricio</i> (Korzika, Kalabrija, Sicilija), ssp. <i>dalmatica</i> (centralno priobalno područje bivše Jugoslavije, uključujući susedna ostrva) i ssp. <i>pallasiana</i> (Balkansko poluostrvo, južni delovi Karpata, Krim)
Delevoy (1949, prema Vidaković, 1982)	ssp. <i>occidentalis</i> : var. <i>salzmanni</i> (Ceven u Francuskoj), var. <i>pyrenaica</i> (Pirineji), var. <i>hispanica</i> (Španija), var. <i>marocana</i> (Maroko), var. <i>poiretiana</i> (Korzika), var. <i>mauritanica</i> (Alžir) i ssp. <i>orientalis</i> : var. <i>calabrica</i> (Kalabrija; Sicilija, Pantellaria?, de Koekelare, des Barres, Abruzzi?), var. <i>austriaca</i> (Austrija, Mađarska i Balkan?), var. <i>hornotica</i> (donja Austrija), var. <i>gocensis</i> (zapadna Srbija, ovde se možda podrazumeva i crni bor iz Kalabrije i Francuske), var. <i>dalmatica</i> (Dalmacija), var. <i>bosniaca</i> (Bosna), var. <i>banatica</i> (Rumunija, crni bor iz Cevena), var. <i>pallasiana</i> (Krim, Kipar?), var. <i>caramanica</i> (Karamanija), var. <i>fenzlii</i> (Mala Azija, Krim?)
Gaussen i sar. (1993)	ssp. <i>nigra</i> (Austrija, centralna Italija i Grčka), ssp. <i>salzmannii</i> (Ceven i Pirineji, centralna i istočna Španija), ssp. <i>dalmatica</i> (priobalni region i ostrva Dalmacije), ssp. <i>pallasiana</i> (Balkansko poluostrvo, južni Karpati) i ssp. <i>laricio</i> (Kalabrija, Sicilija i Korzika)

Na osnovu istraživanja crnog bora na teritoriji Srbije, opisano je nekoliko intraspecijskih taksona čiji odnosi još uvek nisu dovoljno razjašnjeni. Iako je teritorija Srbije, kao deo istočnog areala crnog bora, uključena u relativno veliki broj klasifikacija (npr. Schwartz, 1938, Vidaković, 1955; 1957; Fukarek, 1958a; Gaussen et al., 1964; 1993), do sada je sprovedeno svega nekoliko taksonomskih istraživanja na ovim prostorima. Vidaković (1955; 1957) je na osnovu anatomije iglica podelio crni bor sa prostora bivše Jugoslavije na sledeće sistematske jedinice: ssp. *austriaca* (Slovenija, zapadna Hrvatska), ssp. *dalmatica* (ostrva Dalmacije), ssp. *pallasiana* (Makedonija), ssp. *gocensis* (pl. Goč u Srbiji) i ssp. *gocensis* var. *illyrica* (Bosna, Crna Gora, Makedonija, Srbija, Hrvatska). U Flori Srbije, Jovanović (1992) razlikuje dve podvrste crnog bora koje su i geografski diferencirane. Generalno, u istočnim i južnim delovima Srbije je zastupljena ssp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe, u okviru koje autor izdvaja varijetet *banatica* (Endl.) Georg. et Jon., dok je u zapadnim i centralnim delovima rasprostranjena ssp. *nigra* (Arn.) Hay., u okviru koje razlikuje tri varijeteta: var. *nigra*, var. *zlatiborica* Adam. i var. *gocensis* Đorđević. Jovanović (1992) još navodi da je u "Flori Nacionalnog parka Tara" Gajić (1988) opisao posebnu podvrstu crnog bora (ssp. *drinana* Gaj.).

Palasov ili krimski crni bor (ssp. *pallasiana*) (slika 1-2) se od tipične podvrste (ssp. *nigra*) odvaja, pre svega, dužim lisnim rukavcima (18-26 mm) (Jovanović, 1992). Ovogodišnje grančice su žute do svetlosmeđe, sjajne. Ljuspe na grančicama svetložute, po dužini jednake rukavcima četina ili duže. Ljuspe su tri puta duže od svoje širine, sa paralelnim ivicama; na leđima imaju usko, istaknuto rebro i zašiljen, povijen vrh. Četine prave do malo savijene, krute, duge 8-12 (-18) cm i 1.6-2.1 mm široke, tamnozelene. Hipodermalne ćelije sa 2-5 slojeva. Smonih kanala u parenhimu obično manje od 11. Šišarice tamnosmeđe i sjajne, duge 5-10 cm, 2-4 cm široke sa tupim rebrom na zrakasto naboranim apofizama gornjih i srednjih ljuspi; grbice crvenkaste do sive.

Palasov crni bor je zabeležen jedino u jugoistočnoj Srbiji (Rajevski, 1950) na planini Crnook (Jarešnik) u okolini Bosilegrada (slika 1-7), na nadmorskoj visini oko 1300 m, na kristalastim škriljcima. Takson je zakonom zaštićen kao prirodna retkost na području Srbije (Sl. gl. R. Srbije br. 66/91, 83/92), dok je stanište na Crnooku proglašeno za strogi rezervat prirode.



Slika 1-2. *Pinus nigra* ssp. *pallasiana* na planini Crnook (Jarešnik), jugoistočna Srbija
(foto: Zlatković, 2013)

U okviru ssp. *pallasiana* Jovanović (1992) opisuje i **banatski crni bor (var. *banatica*)** (slike 1-3 i 1-4): jednogodišnje grančice različite boje, od tamnoljubičastocrvene do svetlozelenožute. Četine tamne (zelenocrnkaste), krute do vrlo krute, bodljikave, (5-) 9-10 (-13) cm duge, 1.5-2.5 mm široke. Smonih kanala 4-10. Šišarice jajolike, simetrične, (3-) 5-6 (-7) cm duge, dva puta uže nego što su duge, sa apofizama koje imaju slabo izražene radijalne brazde. Seme dugo 3-9 mm, krilca jednoboja ili prugasta. Banatski crni bor je prvi put opisan u Rumuniji u dolini Černe (Domogled), kraj Đerdapa, gde se javlja na nadmorskoj visini od 300 do 1100 m. Morfološki je vrlo varijabilan, a na osnovu anatomije četina opisano je čak 7 formi i 12 luzusa. U istočnoj Srbiji ovaj takson ima krajnje sužen areal, u vidu vrlo malih i veoma udaljenih enklava (klisura Lazareve reke, Sukovska klisura, Golaš na Suvoj planini; slika 1-7).

Kod **tipične podvrste (ssp. *nigra*)** ovogodišnje grančice su sivosmeđe, starije su crvenkastosmeđe. Ljuspe kraće od rukavaca četina. Četine krupne, tamnozelene, vrlo gusto stojeće, pri vrhovima grančica priklonjene grančici, 8-14 cm duge. Snopići hipodermalnih ćelija, na poprečnom preseku četina, polumesečasti, sa 2-3 slojeva ćelija. Smonih kanala u parenhimu obično oko 11. Šišarice duge 4-8 cm, svetlosmeđe; apofize na srednjim i gornjim ljuspama sa oštrim poprečnim rebrom.

Podvrsta je rasprostranjena širom zapadne, jugozapadne i centralne Srbije (slika 1-7) sa tri varijeteta: **var. *zlatiborica*** (četine u gornjoj trećini zlatnožute; poznato po jedno stablo na Murtenici i Zlatiboru), **var. *nigra*** (četine tamnozelene, kora odraslih stabala pretežno sa podužnim brazdama; tipičan široko rasprostranjeni oblik u arealu podvrste) (slika 1-1), **var. *gocensis*** (slika 1-5) (četine tamnozelene, kora odraslih stabala sa izraženim poprečnim i podužnim brazdama; opisan sa planine Goč).



Slika 1-3. *Pinus nigra* var. *banatica* u kanjonu reke Jerme (Sukovska klisura), istočna Srbija (foto: Zlatković, 2013)



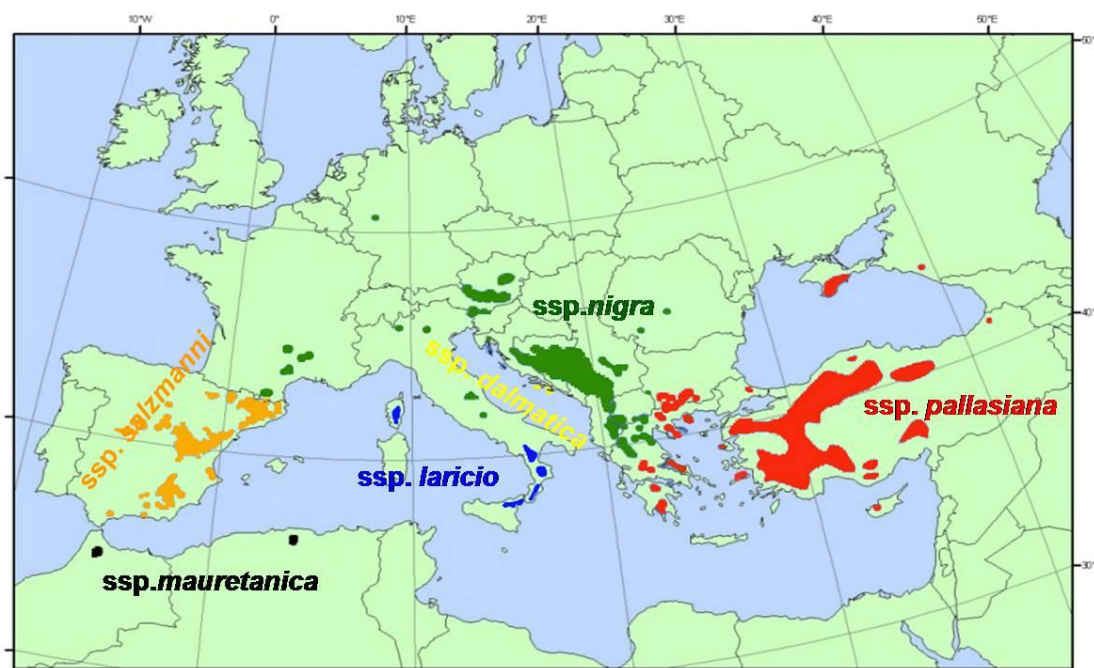
Slika 1-4. *Pinus nigra* var. *banatica* u kanjonu Lazareve reke (Zlotska klisura), severoistočna Srbija (foto: Zlatković, 2013)



Slika 1-5. *Pinus nigra* var. *gocensis* na planini Goč, centralna Srbija (foto: Zlatković, 2013)

1.3.4. Horološke, ekološke i fitocenološke karakteristike crnog bora

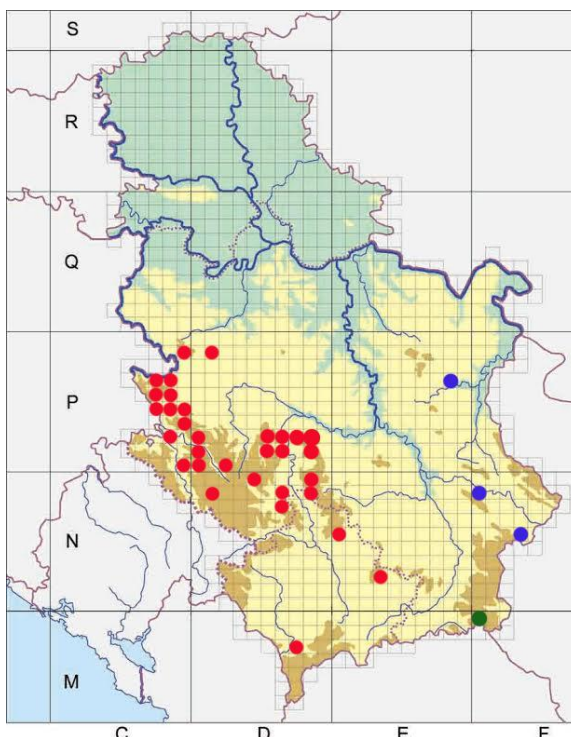
Prirodno rasprostranjenje crnog bora je južna Evropa, severozapadna Afrika i Mala Azija. Prostire se od 5° zapadne geografske dužine u Španiji i Maroku do 40° istočne geografske dužine u Turskoj; i od 35° južne geografske širine u Maroku i Kipru do 51° severne geografske širine u Nemačkoj i 45° na Krimu.



Slika 1-6. Diskontinuirani areal i distribucija šest podvrsta *Pinus nigra* (Quezel and Medail, 2003)

Crni bor ima izuzetno diskontinuiran areal (slika 1-6). U južnoj Evropi se prostire od istočnih delova Pirinejskog poluostrva, uključujući centralne i istočne Pirineje, odakle se dalje pruža prema južnoj Francuskoj sve do Cevena i ostrva Korzike i Sicilije. Na Apeninskom poluostrvu je rasprostranjen u Kalabriji i u Abruzzima. Iz jugoistočnih Alpa areal mu se pruža u Julijske Alpe. Jedan lokalitet je izvan tog područja, a nalazi se južno od Beča. Na Balkanskom poluostrvu se pruža od zapadne granice Slovenije preko Dinarida sve do Bugarske i Grčke. Iz Bugarske i Grčke se rasprostire u Malu Aziju (Turska), a preko Rumunije na Krim i Kavkaz. Opisani su njegovi lokaliteti i u severozapadnoj Africi (Alžir i Maroko) (Vidaković, 1982).

Glavna oblast prostiranja crnoborovih šuma u Srbiji nalazi se u njenom zapadnom i jugozapadnom delu, u srednjem toku reke Drine (Maljen, Tara, Zlatibor, Kremna, Šargan, Viogor), odakle se pružaju na jug u Polimlje (Priboj – Crni vrh, Zlatar, Ozren kod Sjenice). U centralnoj Srbiji crnoborove šume su rasprostranjenje po ograncima Golije, Zimovnika, Trnave, u Đakovu, Studenici i Bresniku, po Troglavu, na levoj strani Ibra, po Studenoj, Stolovima, Goču i Kopaoniku, na desnoj strani Ibra. Međutim, u istočnoj Srbiji crni bor ima krajnje sužen areal: Zlotska klisura, Sukovska klisura, Golaš na Suvoj planina i Jarešnik na planini Crnook kod Bosilegrada (slika 1-7; tabela 1-6). Obično se javlja na nadmorskoj visini od 500-1300 m, optimalno na visinama od 900-1200 m (Pavlović, 1964).



Slika 1-7. UTM 10x10 karta rasprostranjenja *Pinus nigra* u Srbiji: ● *P. nigra* ssp. *nigra*, ● *P. nigra* ssp. *pallasiana*, ● *P. nigra* var. *banatica*

Crni bor je izrazito heliofitna vrsta i kao takva u priličnoj meri slaba u konkurentskim odnosima sa drugim vrstama drveća, ali je biološki dosta otporna i prilagodljiva na različite, čak i nepovoljne ekološke uslove. Brojni autori (Gajić et al., 1954; 1992; Pavlović, 1951; 1964; Jovanović, 1959; 1972; 1980; Čolić, 1965; Tatić, 1967-1968; Tomić, 1992; 1993/1994; Mišić, 1981; Mišić and Panić, 1989; Matović, 1986; 1993; Cvjetićanin, 1999; Novaković 2008; Novaković and Cvjetićanin, 2010) su kroz istraživanja šumskih zajednica utvrdili širok ekološki dijapazon crnog bora u odnosu na pojedine ekološke činioce, naročito na klimu i geološku podlogu. Crnoborove šume se većinom razvijaju na staništima strmih nagiba i suvih i plitkih zemljišta, na kojima se iz ekoloških uzroka ne mogu razviti u prizemnom sloju izrazito šumske biljke, koje zahtevaju dublje zemljište i veću vlažnost. Zato je crni bor odličan primer pionirske vrste koja obrazuje zajednice na staništima najnepovoljnijim za razvitak šume (Pavlović, 1964).

Tabela 1-6. Distribucija *Pinus nigra* u Srbiji.

Region	Lokalitet
Severozapadna Srbija	Maljen - Crni vrh, Goleš, Rosića strana, Vučji mramor, Velika pleća, Zabalac, Golubovac, Pjejar, Bela kamenica (Gajić et al., 1954), Divčibare (Jovanović, 1992) Povlen (Jovanović, 1992)
Zapadna Srbija	Tara - Visoka glavica, Breza, Golubac, Kremanska kosa (Pavlović, 1964), iznad Perućca, Kozje stene, Kaluđerske bare, Bileške stene, Topla peć, Crni potok, Badanj, Njivica, Ljuti breg, Bilo, Crvene stene, Banjska stena, Omar, Zmajevački potok (Gajić et al., 1992) Zlatibor - Tornik I, Tornik II, Rajčevina I, Rajčevina II, Devojački breg, Crni vrh, Džamija I, Gradina, Trešnjica, Džamija II, Džamija III, klisura Rzava, Josova Kosa, Crni vrh II (Pavlović, 1951), Semegnjevka Gora, Čavlovac, Partizanske Vode, Čajetina (Jovanović, 1992) Kremna (Jovanović, 1992) Mokra Gora - Viogor (Pavlović, 1964), Vardište (Jovanović, 1992) Šargan (Jovanović, 1992)
Jugozapadna Srbija	Murtenica - Brijač (Pavlović, 1964) Nova Varoš (Jovanović, 1992) Priboj - Crni vrh (Pavlović, 1964; Jovanović, 1992; Novaković, 2008; Novaković and Cvjetičanin, 2010) Zlatar (Jovanović, 1992) Prijepolje - kanjon Mileševke, Duboki Do, Vranovina (Matović, 1986; 1993) Ozren kod Sjenice (Pavlović, 1964)
Centralna Srbija	Golija - Vilje Kolo (Pavlović, 1964) Raška - Belopolje Golica, Orlovac (Pavlović, 1964; Jovanović 1992) Zimovnik - Debelo brdo, Ravno borje, Vrbovac (Pavlović, 1964) Trnava - Crvena glavica (Pavlović, 1964) Đakovačka planina (Pavlović, 1964) klisura Studenice kod manastira (Mišić and Panić, 1988; Jovanović, 1992) Studenica - Golo Brdo, Strmac (Pavlović, 1964) Bresnik (Pavlović, 1964) Troglav - Borje (Pavlović, 1964; Jovanović 1992) Čemerno (Jovanović, 1992) Rajkovača - Želebić, Glava (Pavlović, 1964) Stolovi - Borovita kosa (Pavlović, 1964; Tatić, 1969; Jovanović 1992) Studena - Krčanik, Prčnjača (Jovanović, 1959; 1992; Pavlović, 1964; Tatić, 1969) Goč - Gvozdac, Velike Kobasice, Krš (Jovanović, 1959; 1992) Željini (Jovanović, 1992) Kopaonik - Rudnica (Jovanović, 1992), sliv Babinog potoka (Jovanović, 1972)
Kosovo i Metohija	Kopaonik - Oštro koplje (Jovanović, 1992) Banjska (Jovanović 1992) Peć - Rugovska klisura (Jovanović, 1992) Prizren - Duvška klisura (Jovanović, 1992)
Severoistočna Srbija	klisura Lazareve reke kod Zlota (Mišić, 1981; Jovanović 1992)
Istočna Srbija	Suva planina - "Borov Rid" ispod Golaša (Jovanović, 1980; 1992) klisura Sukovske reke (Jovanović, 1980; 1992) Jarešnik na planini Crnook kod Bosilegrada (Jovanović, 1992)

Prema fitocenološkoj sistematici, objavljenoj u monografiji "Vegetacija Srbije" iz 2006. godine (Tatić and Tomić, 2006), šume crnog bora pripadaju razredu *Erico-Pinetea* Ht. 1959, redu *Erico - Pinetalia* Oberdorfer 49 *emend.* Ht 1959 i svezama *Orno - Ericion* Ht 1958 i *Pinion nigrae* Lakušić 1972.

Sveza Orno - *Ericion* Ht 1958 obuhvata šume crnog i belog bora ilirskog (dinarskog) područja od Slovenije, Hrvatske i Bosne, preko Zapadne Srbije, Crne Gore i Metohije, do Albanije i Makedonije. Na osnovu geološke podloge na kojoj su rasprostranjene, dele se na dve podsveze: *dolomiticum* i *serpentinicum*. U Srbiji su uglavnom utvrđene šume crnog i belog bora na peridotitima, serpentinisanim peridotitima i serpentinitima iz podsveze *Erico-Pinenion gocensis* (Krause et Ludwig 57) Tomić 2004, dok podsveza *Orno-Ericenion dolomiticum* izostaje (Tatić and Tomić, 2006).

Borove šume na serpentinitu se nalaze u zapadnom i centralnom delu Srbije (Goč, Maljen, Zlatibor, Tara, Kopaonik, Studena planina, Stolovi, Troglav, Zlatar, Pešterska visoravan: Ozren, Priboj - Crni vrh i dr.). Mnogi autori ove šume smatraju reliktnim uglavnom zbog glavne edifikatorske uloge crnog bora (*P. nigra* ssp. *gocensis* Vid., prema Tatić and Tomić, 2006) koji je sa disjunktним arealima pojedinih podvrsta tipični tercijski relik. Mestimično u nepristupačnim područjima, naročito u zaklonjenim klisurama strmih strana, očuvane šume crnog bora pokazuju sve karakteristike primarnih zajednica u optimalnoj fazi razvoja: bogat floristički sastav, usporenu dinamiku i prisustvo endemoreliktnih vrsta. Međutim, najveći deo manje-više pristupačnih borovih šuma iz ove podsveze je vrlo degradiran, jako raskinutog sklopa ili sveden na planinske pašnjake sa pojedinačnim drvećem, uglavnom zbog ekstenzivnog pašarenja kroz vekove. Osim degradacionih oblika zapažaju se i progresivni tokovi sukcesije koji ukazuju na postojanje brojnih sekundarnih zajednica, tj. na ekspanziju borova kao pionorskih vrsta na staništima šuma balkanskog kitnjaka, bukve-jele, bukve-smrče, bukve-jele-smrče i drugih.

Crnoborove šume se nalaze na manjim nadmorskim visinama i toplijim i suvljim staništima, dok šume belog bora zauzimaju veće nadmorske visine ili hladnija i vlažnija staništa. Na graničnoj nadmorskoj visini rasprostranjenja ove dve vrste (oko 1100-1200 m), na većim površinama nalaze se mešovite zajednice crnog i belog bora. Teren se odlikuje veoma strmim padinama i dubokim uskim dolinama, što uz specifične fizičke i hemijske osobine supstrata čini staništa ekstremnim. Stene su podložne lakom mehaničkom raspadanju, zemljišta su plitka, topla i suva, jako podložna eroziji, siromašna jonima kalcijuma, nitratima i fosfatima, a sa visokim sadržajem za biljke štetnog magnezijuma. U okviru podsveze opisano je više zajednica crnog bora:

1. šuma gočkog crnog bora sa crnjušom - *Erico* - *Pinetum gocensis* Krause 1957
2. šuma gočkog crnog bora sa uskolisnom šašikom - *Seslerio rigidae* - *Pinetum gocensis* Gajić 1954
3. šuma gočkog crnog bora sa sedmoprsticom - *Potentillo heptaphyllae* - *Pinetum gocensis* B. Jovanović 1959
4. šuma belog i crnog bora - *Pinetum sylvestris* - *nigrae* Pavlović 1951
5. šuma gočkog crnog bora i balkanskog kitnjaka - *Quercus dalechampii* - *Pinetum gocensis* Pavlović 1964

Sveza *Pinion nigrae* Lakušić 1972 obuhvata primarne zajednice crnog bora razvijene u klisurama i na krečnjačkim liticama u brdsko-planinskom regionu. Uslovi staništa su takođe ekstremni: veliki nagibi toplih ekspozicija, inicijalna zemljišta i crnice na krečnjacima i dolomitskim krečnjacima koje se nalaze mozaično između masivnih blokova stena. Vrlo često, u klisurama i kanjonima, to su skoro vertikalno gole litice čistih krečnjaka sa retkim pojedinačnim stablima crnog bora. Na nekim mestima gde su uslovi staništa manje nepovoljni crni bor raste u normalnim sastojinama retkog sklopa, a progresivnom sukcesijom je sindinamski povezan sa zajednicama crnog graba, mečje leske, bukve i bukve-jele. Za razliku od sveze na serpentinitu, na krečnjacima se znatno ređe sreću sekundarno razvijene zajednice na bivšim požarištima i sečinama, na siparima i odronima, koluvijalnim nanosima i slično. U tom slučaju crni bor pokazuje izrazito pionirske osobine konkurirajući svim drugim četinarskim pa i velikom broju lišćarskih vrsta. Zbog uspešnog opstanka na ekstremno lošim staništima crni bor se masovno upotrebljava za pošumljavanje.

U zavisnosti od geografskih regiona u kojima se javljaju različite podvrste crnog bora sveza je diferencirana na tri podsveze: *Pinenion dalmaticae* Lakušić 1972 (u okviru areala dalmatinskog crnog bora), *Pinenion illyricae* Stefanović 1960 (kao podsveza ilirskog crnog bora) i *Fraxino orni* - *Pinenion pallasianae* Em 1978 (podsveza krimskog crnog bora).

Podsveza *Pinenion illyricae* Stefanović 1960 obuhvata zajednice ilirskog crnog bora, *P. nigra* ssp. *illyrica* Vidaković (Tatić and Tomić, 2006), rasprostranjene u južnim delovima unutrašnjih Dinarida (istočna i jugoistočna Bosna, zapadna i jugozapadna Srbija i Crna Gora). Primarna staništa su u klisurama i kanjonima na strmim

krečnjačkim blokovima i sa mozaično razvijenim zemljištem tipa krečnjačke crnice. U Srbiji je opisano nekoliko zajednica:

1. šuma ilirskog crnog bora - *Laserpitio sileri* - *Pinetum illyricae* Fukarek 1969
2. šuma crnog graba i crnog bora - *Ostryo carpinifoliae* - *Pinetum illyricae* Čolić 1965
3. šuma crnog bora i omorike - *Piceo omorikae* - *Pinetum illyricae* Čolić 1965

Podsveza *Fraxino orni* - *Pinenion pallasianae* Em 1978 obuhvata šume krimskog crnog bora, *P. nigra* ssp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe (slika 1-2), koje imaju disjunktan areal u Grčkoj, Makedoniji i jugoistočnoj Srbiji. Rastu na različitoj podlozi: od serpentinita i gabroidnih stena, dolomita, dolomitskih krečnjaka i mermera, do kristalastih škriljaca u okolini Bosilegrada. Međutim za krečnjačku podlogu u istočnoj i jugoistočnoj Srbiji navodi se *P. nigra* var. *banatica* (Endl.) Georg. et Jon. (banatski crni bor, slika 1-3) (Jovanović, 1992). Zajednice iz istočne i jugoistočne Srbije (Suva planina, Sukovska klisura, kanjon Lazareve reke), iako predstavljaju specifičnu biogeografsku i vegetacijsku formaciju, usled nerazjašnjene taksonomske pripadnosti crnog bora sa krečnjaka, Tatić i Tomić (2006) zadržavaju u podsvezi krimskog crnog bora. U istočnoj i jugoistočnoj Srbiji podsveza je zastupljena zajednicama:

1. šuma crnog bora sa šašom - *Carici humilis* - *Pinetum nigrae* B. Jovanović 1956
2. šuma crnog bora sa tisom - *Taxo* - *Pinetum nigrae* Mišić 1981

1.3.5. Privredni i farmakološki značaj crnog bora

Prema Vidakoviću (1982), crni bor je jedna od najvažnijih vrsta za pošumljavanje suvih i kamenitih terena submediteranskih područja. Otporan je na vetrove, sušu, a dobro podnosi i gradske uslove. Značajan je i kao dekorativna vrsta. Sadi se pojedinačno ili u manjim i većim grupama po parkovima, gotovo na svim staništima. Drvo mu je teško, meko i trajno (trajnije od onog kod belog bora), dobro se obrađuje. U upotrebi je kao građevinsko, rudničko i stolarsko drvo, prozori, vrata, brodarski pod, jarboli, pragovi i dr. Lukić i Gorunović (1989) navode da se od crnog bora koriste sledeći proizvodi:

1. Terpentin (*Terebinthina communis*, *Balsamum Pini* ili *B. terebinthinae*) je prirodana oleorezina (balzam u širem smislu), koga luče četinari. Predstavlja rastvor smole (*Colophonium*) u etarskom ulju (*Terebinthinae aetheroleum*). Dobija se naročitim postupkom (smolarenjem) u četinarskim šumama, pre svega u borovima. Stabla borova koja su stara preko 20 godina, specifično se zasecaju i tako se oslobodi terpentini nakupljen u šizogenim kanalima kore (fiziološko smolarenje). Posle nekoliko godina, zbog povrede, drvo počinje da luči velike količine oleorezine (patološko smolarenje). Godišnje se od jednog stabla može dobiti oko 2 kg sirovog terpentina, a stablo se može eksploatirati do 20 godina. Danas se terpentini dobija i drugačijim postupcima; ekstrakcijom iz kore četinara posle seče ili kondenzacijom para koje se stvaraju tokom kuvanja drvne mase u procesu proizvodnje smole. Najveći proizvođači terpentina su SAD i Francuska. U Srbiji terpentini se pretežno dobija od crnog bora, od manjeg značaja je beli bor, dok su smrča, ariš i jela sporedni u smolarenju. Terpentini se sastoje od smole (65-70%) i etarskog ulja (15-30%). Primena terpentina u farmaciji je ograničena. Eksterno se koristi kao rubefacijens, a interno kao ekspektorans. Oko 45% svetske proizvodnje terpentina se utroši u parfimerijskoj industriji i u industriji aroma. Koristi se i u industriji boja, lepila i deterdženata (Kovačević, 2004).

2. Sirovo terpentinsko ulje (*Terebinthinae aetheroleum crudum*) se dobija destilacijom pomoću vodene pare iz terpentina raznih vrsta borova. Terpentinsko ulje je bistra, svetložuta, lako pokretljiva tečnost, nagorkog i ljutog ukusa, specifičnog mirisa. Najvažniji sastojci terpentinskog ulja su monoterpenski ugljovodonici: α -, β -pineni, kamfen, felandren i Δ^3 -karen. Za farmaceutske potrebe terpentinsko ulje treba da sadrži što više pinena, zbog čega se prečišćava frakcionom destilacijom i dobija se tzv. prečišćeno terpentinsko ulje (*Terebinthinae aetheroleum rectificatum*). Na temperaturi između 155 i 165°C pod normalnim pritiskom predestilišu se α - i β -pinen kao glavni sastojci. Ovo etarsko ulje se koristi spolja kao iritans i rubefacijens (delovanje pinena i ostalih ugljovodonika). Utrljava se kod reumatičnih i drugih bolova površinskih nerava. Primjenjuje se i putem inhalacije kod upala i infekcija gornjih disajnih puteva; ulje ispoljava antimikrobnu aktivnost. Pored terapijske primene, terpentinsko ulje ima i tehničku primenu. Najveće količine se upotrebe u industriji boja i lakova.

3. Etarsko ulje (*Pini aetheroleum*) se najčešće dobija destilacijom vodenom parom iglica, mladih izdanaka i mladih šiškarki četinara iz rodova *Pinus*, *Abies*, *Picea* i *Larix*. Ova ulja se po sastavu razlikuju od onih dobijenih iz oleorezina istih biljnih vrsta

(detaljno u poglavlju 1.5.1.: "Definicija i opšte karakteristike etarskih ulja"). Najveće količine se utroše u prehrambenoj, kozmetičkoj i industriji alkoholnih pića.

4. Kolofonijum (*Colophonium* ili *Resina Terebinthinae*) je procedena i pretopljena smola zaostala posle destilacije terpentina od raznih vrsta borova. To su providni, staklasti, sjajni komadi, svetložute boje, bez ukusa, slabog mirisa. Preko 90% mase kolofonijuma predstavljaju diterpenske kiseline; zato ova smola ima visoku vrednost kiselinskog broja (150-180). Najvažnije su izomerne (+)- i (-)-pimarinska kiselina. (+)- izomer je stabilan, ali je (-)-pimarinska kiselina nestabilna i tokom destilacije terpentina prelazi u abijetinsku kiselinu. Tako, abijetinska kiselina predstavlja glavni sastojak komercijalne smole. Kolofonijum nema veći značaj za farmaciju. Koristi se za izradu lepljive mase flastera. Najveće količine kolofonijuma se iskoriste u industriji boja, lakova, papira, sapuna i plastičnih masa. Abijetinska kiselina je intenzivno proučavana poslednjih decenija. Potvrđena je njena antimikrobna, antiulkusna i kardiovaskularna aktivnost. Takođe, može se koristiti kao surfaktant i antifidno sredstvo protiv insekata (Kovačević, 2004).

5. Katran (*Pyroleum Pini*) se dobija suvom destilacijom drveta, kore i korenja raznih vrsta borova. Sastoji se iz smeše fenolnih derivata (gvajakola, krezola, kreozola itd.), aromatičnih ugljovodonika, organskih kiselina (naročito sirćetne), smolastih materija itd. Upotrebljava se kao antiseptik, u dermatologiji, naročito kod ekcema. Sastojak je lekovitih masti i pasta protiv šuge. Sapun sa katranom se upotrebljava i za suzbijanje peruti.

6. Borovi pupoljci (*Pini turio* ili *gemmae*) sadrže smole, gorke materije, tanine, malo etarskog ulja, vitamin C itd. Upotrebljavaju se u obliku čaja kao diuretik i protiv kašlja.

Prema Petroviću (1883), pupoljci crnog bora (*turiones pini*) se upotrebljavaju kao dijaforetici, diuretici i sredstva koja se daju protiv hroničnog reumatizma, hronične upale pluća, upale materice i bešike, protiv strume (gušavosti), skorbuta itd. Inhalacija sa upaljenim pupoljcima se upotrebljava kao lek protiv hronične kijavice, uvobolje itd. Gostuški (1979) preporučuje četinarske pupoljke (bora i jele) kod hroničnog bronhitisa u obliku čaja ili sirupa. Tucakov (1971) navodi, kao i njegovi prethodnici, raznovrsnu upotrebu mladih pupoljaka bora, borovih iglica, etarskog ulja, kore, semena i na kraju dodaje: "Borovi se sade svuda gde čovek živi i radi, jer isparljivi sastojci (etarsko ulje) ne samo da prijatno mirišu, osvežavaju i povoljno deluju na čovekovu psihu, nego ti

sastojci imaju i antimikrobna, antiseptična svojstva. Zato treba svuda saditi borove i kao ukras i kao sanitarnu meru širokog zdravstvenog značaja pogotovo danas kada je zagađenost vazduha sve veća, pa samim tim i bolesti u velikim industrijskim centrima i gradovima."

1.4. Alkani

1.4.1. Opšte karakteristike voskova

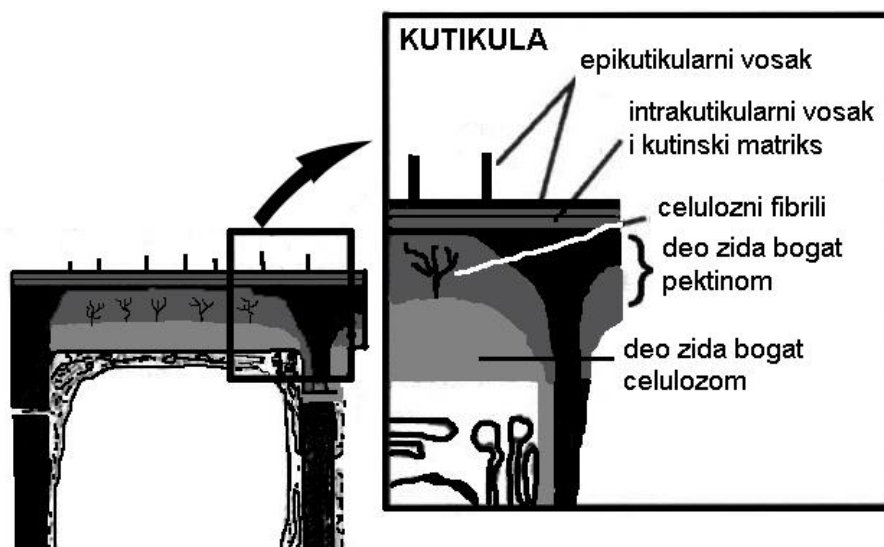
Kopnene biljke su neprekidno izložene raznovrsnim, nepovoljnim uticajima spoljašnje sredine kao što su visok nivo ultravioletnog zračenja, suva atmosfera, obilne padavine, štetene koncentracije zagađujućih materija iz vazduha, površinska kontaminacija česticama prašine i napad patogena i herbivora. Ovakvi abiotički i biotički faktori prvenstveno utiču na površinska biljna tkiva, zbog čega je neophodno postojanje efikasnih mehanizama zaštite u spoljašnjim slojevima "kože" (u prenesenom značenju). Na površini nadzemnih zeljastih delova biljaka ovakvu zaštitnu funkciju obavlja lipidni sloj označen kao kutikula.

Biljna kutikula je lipofilna struktura nataložena na spoljašnjim zidovima epidermalnih ćelija. Na osnovu rastvorljivosti u organskim rastvaračima razlikuju se dva osnovna tipa komponenti biljne kutikule: lipofilna jedinjenja koje se oslobađaju ekstrakcijom u organskim rastvaračima kolektivno su označena kao "kutikularni vosak", dok je lipofilna komponenta koja se ne može ekstrahovati zbog polimerne strukture označena kao "kutin". Kutin je poliestar hidroksilovanih masnih kiselina (sa 16 i 18 C atoma) i glicerola, a ponekad i dikarboksilovane kiseline mogu imati značajno učešće (Walton, 1990; Nawrath, 2006; Pollard et al., 2008). Sa druge strane, kutikularni vosak predstavlja kompleksnu smešu većeg broja jedinjenja sa raznovrsnom strukturom. Najčešća i najzastupljenija grupa jedinjenja u kutikularnim voskovima su alifatični, aciklični, negranati, zasićeni ugljovodonici, koji sadrže najmanje 20 ugljenikovih atoma. Ovakva "dugolančana jedinjenja" nastaju elongacijom masnih kiselina sa više od 18 ugljenikovih atoma i daljom modifikacijom u odgovarajuće alkane, aldehide, ketone, primarne i sekundarne alkohole, kao i estre koji se formiraju između masnih kiselina i alkohola. (Samuels et al., 2008). Manje zastupljena grupa jedinjenja u kutikularnim voskovima mnogih biljnih vrsta su pentaciklični triterpenoidi. Ovakva aliciklična jedinjenja takođe imaju zasićenu alifatičnu strukuru, ali umesto ugljovodoničnog lanca sadrže kondenzovani prsten (Jetter et al., 2007). U kutikularnom vosku pojedinih biljnih vrsta mogu se naći i aromatična jedinjenja, ali u manjim količinama (Jetter et al., 2007).

Prirodni voskovi su čvrste, amorfne mase, blagog i specifičnog mirisa, koje su nerastvorne u vodi, ali se rastvaraju u nepolarnim rastvaračima. Vosak biljne kutikule proizvode epidermalne ćelije lišća, mladih izdanaka i svih drugih biljnih organa u dodiru sa vazduhom, koji ne sadrže periderm (Kolattukudy, 1996). Prema Kunst-u i Samuels-u (2003) termin "biljni voskovi" se odnosi na lipidne komponente kutikule koja pokriva spoljašnju površinu nadzemnih biljnih tkiva. Takođe, vosak je povezan sa suberinским matriksom u podzemnim ili oštećenim tkivom (von Wettstein-Knowles, 1995, prema Kunst and Samuels, 2003) kao i sa lipidima polenskog i semenog omotača (Bianchi et al., 1990; Reiter et al., 1990; Preuss et al., 1993; Liu et al., 1996; Isbell et al., 1996, prema Kunst and Samuels, 2003). Postoji nekoliko definicija voska. U ranim morfološkim radovima (Martin and Juniper, 1970; Baker, 1982, prema Kunst and Samuels, 2003), celokupni omotač od voska nazivan je kutikularnom membranom, koja se sastoji od voštanog filma na površini, same kutikule i kutikularnog sloja povezanog sa ćelijskim zidom epidermalnih ćelija. U poslednje vreme preovlađuje definicija po kojoj je kutikula poliestarska smesa hidroksi- i hidroksi epoksi masnih kiselina C₁₆ i C₁₈, koju prožima i prekriva kutikularni vosak. Prema molekulske genetičkoj analizi gena odgovornih za vosak, on je definisan kao "lipidi koji se uklanjaju sa površine biljaka kratkim ispiranjem u organskom (nepolarnom) rastvaraču" (Post-Beittenmiller, 1998, prema Kunst and Samuels, 2003). Fenotipski se pod voskom podrazumevaju plavičaste ili beličaste sjajne dlačice na izbojcima biljaka, koji su zapravo kristaloidi epikutikularnog voska koji imaju sposobnost prelamanja svetlosti (Koornneef et al., 1989, prema Kunst and Samuels, 2003).

Vosak prožima kutikulu celom debljinom, pri čemu je jedan deo voska ugrađen u kutinski polimerni matriks (intrakutikularni vosak), a drugi nataložen na spoljašnjoj površini kutina (epikutikularni vosak) (Jeffree, 1996). Intrakutikularni vosak je amorfna smeša lipida uronjenih u kutin, koja povezuje kutikulu sa ćelijskim zidom, dok se epikutikularnim voskom smatraju površinski lipidi (u kontaktu sa atmosferom) raspoređeni u vidu tankog filma iznad kutikule. Međutim, u mnogim radovima je termin "epikutikularni" vosak pogrešno upotrebljen i odnosi se na ukupni kutikularni vosak koji se oslobodi ekstrakcijom u organskim rastvaračima (Buschhaus and Jetter, 2011). Novija istraživanja su pokazala da organski rastvarači jako brzo prodiru u dublje slojeve kutikule, tako da na ovaj način dobijeni ekstrakt zapravo predstavlja smešu epi- i intrakutikularnih voskova (Jetter et al., 2000). Pored ova dva voštana sloja unutar

kutikule mnogih biljnih vrsta uočene su još dve nano-strukture. Transmissionom elektronskom mikroskopijom (TEM) otkrivene su lamele unutar intrakutikularnog voska, čiji hemijski sastav i način formiranja još uvek nisu poznati (Jeffree, 2006), a pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) su uočeni kristaloidi koji iz epikutikularnog voska štrče u atmosferu (slika 1-8) (Barthlott et al., 1998).



Slika 1-8. Komponente kutikule i domeni ćelijskog zida

Voštani kristaloidi su izuzetno varijabilni kod različitih biljnih vrsta. Baker (1982) i Jeffree (2006) su poređenjem kristaloida različitih biljnih vrsta pokazali da postoji korelacija između oblika kristaloida i ukupnog hemijskog sastava voska, na osnovu čega su izveli zaključak da se određeni tipovi kristaloida formiraju od specifičnih komponenti. Ensikat i sar. (2006) navode da se kod visokog sadržaja nonakozanola i α -diketona u vosku formiraju cevčice, kod visokog sadržaja primarnih alkohola sa 26 i 28 C atoma ljuspice, kod visokog sadržaja ketona i alkana štapići, a kod visokog sadržaja masnih kiselina i primarnih alkohola sa 22, 24 i 26 C atoma voštani film. Međutim, Buschhaus i Jetter (2011) ukazuju da je ovakav zaključak indirektan, s obzirom da je izveden na osnovu hemijskog sastava ukupnog kutikularnog voska. Da bi se odredio doprinos specifičnih komponenti u izgradnji voštanih kristaloida i njihov tačan hemijski sastav, neophodne su metode koje bi omogućile izolovanje i analizu samih kristaloida. Epi- i intrakutikularni voskovi se razlikuju prema hemijskom sastavu

(Jetter et al., 2000; Jetter and Schäffer, 2001; Buschhaus and Jetter, 2011), ali mehanizmi razdvajanja ova dva sloja nisu do kraja razjašnjeni. Tokom protekle decenije, razvijene su nove metode koje su omogućile selektivno uklanjanje epikutikularnog voska. Na taj način postala je moguća direktna kvalitativna i kvantitativna analiza sastava spoljašnjeg voštanog sloja. Međutim, još uvek je nepoznato da li ove metode uklanjaju epikutikularni materijal u potpunosti. Ukoliko bi se to moglo dokazati, onda bi i preostali intrakutikularni vosak mogao biti posebno istražen (Buschhaus and Jetter, 2011).

U velikom broju radova o voskovima je ispitivan njihov ukupan hemijski sastav (Herbin and Robins, 1969; Tulloch and Hoffmann, 1976; Baker, 1982; Mongrad et al., 2001, itd.). Neka istraživanja su usmerena samo na pojedine komponente voskova: alkane (detaljno u poglavlju 2.4.3.: "Distribucija alkana"), ω -hidroksimasne i druge kiseline (Herbin and Robins, 1968; Herbin and Sharma, 1969; Hunnemann and Eglington, 1972; Corrigan et al., 1978; Kitić et al., 1999; Stojanović et al., 2003), estre (Franich et al., 1985; Tulloch, 1987; Jetter et al., 2002), sekundarne alkohole (Holloway et al., 1976; Franich et al., 1979), fenole (Liakopoulos et al., 2001), triterpene (Hemmers and Gülz, 1989a; 1989b, prema Oros et al., 1999) i druge komponente (Jetter, 2000).

Fizičke i hemijske osobine kutikularnih voskova određuju neke od vitalnih funkcija biljaka. Pre svega, vosak značajno redukuje nestomatarnu transpiraciju, a veza između kserofitnog karaktera pojedinih biljaka i količine lisnih kutikularnih voskova je potvrđena u velikom broju radova. Npr. Daly (1964) navodi da su populacije vrste *Poa colensoi* iz humidnih područja uniformno zelene, dok su populacije iz aridnih i semiaridnih oblasti zeleno-plave. Autor ukazuje da postoji visoka negativna korelacija između količine lisnih kutikularnih voskova *Poa colensoi* i količine padavina i blaga pozitivna korelacija između količine voskova i srednje temperature.

Vosak, takođe, štiti biljku od raznih spoljašnjih uticaja: vetra, snega, mraza i ultravioletnog zračenja (Reicosky and Hanover, 1978; Barnes et al., 1996); redukuje zadržavanje vode na površini biljaka, smanjuje apsorpciju prašine, polena i ostalih zagađujućih materija iz vazduha (Kerstiens, 1996; Barthlott and Neinhäus, 1997) pri čemu pokazuje osobinu "samopročišćavanja" (lotus efekat – Barthlott and Neinhäus, 1997). Takođe, pokazano je da kutikularni vosak ima značajnu ulogu u zaštiti biljaka od

mnogih bakterijskih i fungalnih infekcija (Jenks et al., 1994) i da učestvuje u različitim interakcijama između biljaka i insekata (Eigenbrode and Espelie, 1995).

1.4.2. Opšte karakteristike alkana

Alkani su zasićeni ugljovodonici, poznati još i pod nazivom parafini. Sastoje se od samo dva elementa: ugljenika (C) i vodonika (H), povezanih prostim vezama. Veličinu alkana određuje broj međusobno vezanih C atoma. Alkani sa više od tri C atoma mogu formirati različite strukturne izomere. Na taj način možemo razlikovati linearne, normalne alkane (*n*-alkane), sa ugljenikovim skeletom cik-cak strukture i opštom formulom: C_nH_{2n+2} i račvaste (*iso*-alkane) sa opštom formulom C_nH_{2n+2} , $n > 3$. Ciklični alkani (cikloalkani), sa opštom formulom C_nH_{2n} , $n > 2$, prema strukturi nisu pravi alkani (Nikolić, 2008).

Atomi u molekulu alkana su vezani kovalentnim vezama. Oni su slabo polarni, jer se vodonik i ugljenik vrlo malo razlikuju po elektronegativnosti, a ostale veze su između ugljenika i ugljenika, gde polarnosti nema. Osim toga veze su vrlo simetrično raspoređene, pa se i te slabe sile polarnosti međusobno poništavaju. Molekuli alkana su prema tome nepolarni ili vrlo slabo polarni. Sa porastom broja ugljenikovih atoma u molekulu alkana rastu i tačke ključanja i mržnjenja. Izuzev prva četiri alkana, tačka ključanja raste za 20 do 30 stepeni pri povećanju molekula alkana za jedan ugljenikov atom. Povećanje tačke mržnjenja nije tako pravilno, jer međumolekularne sile u kristalu ne zavise samo od veličine molekula, već i od slaganja kristalnih rešetki. Prva četiri *n*-alkana (metan, etan, propan i butan) su gasovi, sledećih 13 (C_5 - C_{17}), zbog povećanja lanca odnosno tačke ključanja i mržnjenja su tečnosti, a oni sa 18 i više ugljenikovih atoma se nalaze u čvrstom agregatnom stanju. Razlike u tačkama ključanja između alkana koji imaju isti broj ugljenikovih atoma, a različitu strukturu, su manje. Ipak, izomer sa linearnim lancem uvek ima veću tačku ključanja od izomera sa račvastom strukturom. Tačka ključanja je utoliko niža što je molekul razgranatiji. Tako npr. tačka ključanja *n*-butana je 0°C, a izobutana -12°C, *n*-pentana 36°C, izopentana sa jednom granom 28°C, a neopentana sa dve grane 9.5°C. Uticaj razgranatosti na tačku ključanja se može uočiti i kod svih ostalih grupa organskih jedinjenja. To je i očekivano, jer račvanjem molekul dobija oblik sličniji obliku lopte, čime se spoljašnja površina

smanjuje, pa tako i međumolekularne sile postaju slabije i mogu biti savladane nižom temperaturom.

U skladu sa pravilom da se slično rastvara u sličnom, alkani su rastvorljivi u nepolarnim rastvaračima kao što su benzen, etar i hloroform, a nerastvorljivi u vodi i drugim polarnijim rastvaračima. Takođe, tečni alkani su dobri rastvarači za slabo polarna jedinjenja, dok polarna jedinjenja ne rastvaraju. Gustina alkana se povećava sa veličinom alkana i teži ka vrednosti od 0.8 g/cm^3 , tako da svi alkani imaju manju gustinu od vode. Generalno, većina organskih jedinjenja ima manju gustinu od vode, jer se, kao i alkani, pretežno sastoje od ugljenika i vodonika (Morrison and Boyd, 1979).

U poređenju sa drugim organskim jedinjenjima alkani su slabo reaktivna jedinjenja; na sobnoj temperaturi i atmosferskom pritisku alkani ne reaguju sa jakim kiselinama (sulfatna i hloridna kiselina), jakim bazama (natrijum- i kalijum-hidroksid) i oksidacionim sredstvima (kalijum-permanganat ili kalijum-dihromat). Nereaktivnost alkana potiče otuda što su oni izgrađeni od sigma C-C i C-H veza. Da bi alkan stupio u reakciju, potrebno je da se ove veze raskinu, a to zahteva znatnu količinu energije. Zato alkani reaguju samo pod posebnim uslovima, tj. na visokoj temperaturi i pod uticajem radijacija (sunčeve svetlosti).

1.4.3. Distribucija alkana

Alkani sa neparnim brojem C atoma su jedna od najzastupljenijih komponenti biljne kutikule. Zbog svoje velike nepolarosti, oni znatno doprinose hidrofobnim osobinama voskova, smanjujući nestomatarni gubitak vode sa površine listova i drugih delova biljke. Kod većine biljaka najzastupljeniji su alkani *n*-C₂₉ (*n*-nonakozan) i *n*-C₃₁ (*n*-hentriakontan) (tabela 1-7), koji ponekad čine i do 90% ukupnog sastava voska (Morice and Shorland, 1973; Franich et al., 1978; Jenks et al., 1995; Barnes et al., 1996, prema Nikolić, 2008). Terestrične biljke karakteriše jaka dominacija neparnih *n*-alkana u opsegu C₂₅-C₃₅, akvatične obilnost *n*-alkana C₂₃ (*n*-trikozan) i C₂₅ (*n*-pentakozan), dok je dominacija alkana relativno kratkih nizova ugljenikovih atoma: C₁₅ (*n*-pentadekan), C₁₇ (*n*-heptadekan) i C₁₉ (*n*-nonadekan) utvrđena kod algi i cijanobakterija (Chikaraishi and Naraoka, 2003). Dominacija alkana sa parnim brojem ugljenikovih atoma je utvrđena kod nekoliko vrsta iz familije Fabaceae (Lamarque et al., 1998). Pored *n*-

alkana, značajno prisusto *iso*-alkana je utvrđeno kod familja Lamiaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae (Maffei, 1994) i Poaceae (Maffei, 1996a); rodova *Micromeria* (Reddy et al., 2000) i *Nicotiana* (Stojanović et al., 2003); vrste *Ludwigia adscendens* (Barik et al., 2004) itd.

Tabela 1-7. Neki česti alkani u biljnim voskovima.

Naziv	Broj C-atoma
<i>n</i> -heneikozan	C ₂₁
<i>n</i> -dokozan	C ₂₂
<i>n</i> -trikozan	C ₂₃
<i>n</i> -tetrakozan	C ₂₄
<i>n</i> -pentakozan	C ₂₅
<i>n</i> -heksakozan	C ₂₆
<i>n</i> -heptakozan	C ₂₇
<i>n</i> -oktakozan	C ₂₈
<i>n</i> -nonakozan	C ₂₉
<i>n</i> -triakonatan	C ₃₀
<i>n</i> -hentriakontan	C ₃₁
<i>n</i> -dotriakontan	C ₃₂
<i>n</i> -tritriakonatan	C ₃₃
<i>n</i> -teratriakonatan	C ₃₄
<i>n</i> -pentatriakontan	C ₃₅
<i>n</i> -heksatriakontan	C ₃₆

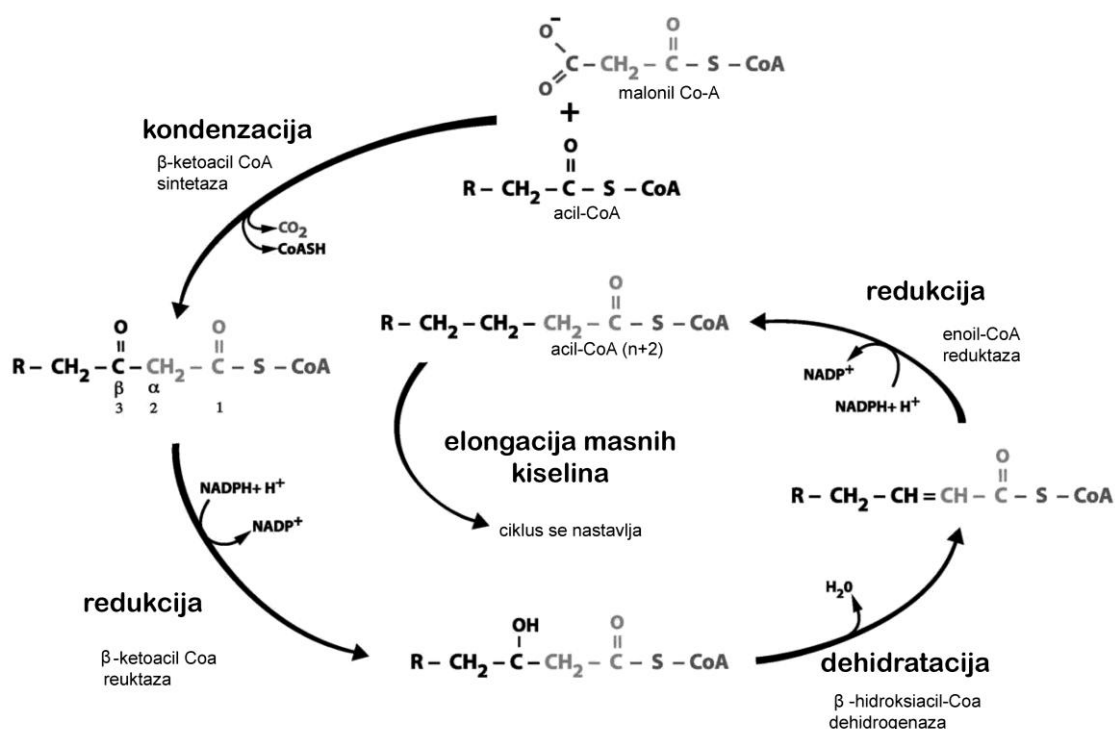
Prema Oros-u i sar. (1999), u voskovima četinara dominiraju polarni lipidi (preko 90%), dok su nepolarni, naročito *n*-alkani, slabo zastupljeni (u tragovima kod *Abies procera*, od 0.1% kod nekih vrsta roda *Pseudotsuga* do 3.5% kod *Tsuga mertensiana* i 4.4% kod *Sequoia sempervirens*). Ipak, postoje i četinari kod kojih je utvrđen visok sadržaj *n*-alkana kao što je *Wollemia nobilis* (12-22%) iz familije Araucariaceae (Dragota and Riederer, 2007). Kod velikog broja vrsta je pokazano značajno variranje u sastavu i obilnosti pojedinih alkana, čak i kod različitih vrsta istih rodova. Na primer, u oleorezinama *Pinus sabiniana* i *P. jeffrey* (Savage et al., 1996), preovlađuju alkani sa kraćim nizovima ugljenikovih atoma, što nije slučaj sa drugim vrstama borova. U kutikularnim voskovima iglica četinara najčešće dominira *n*-alkan C₃₁, ređe C₂₉ ili C₃₃ (Maffei et al., 2004), a kod pojedinih vrsta čak C₂₅ ili C₂₇ (Oros et al., 1999). C₂₅ i C₂₇ češće dominiraju kod listopadnih drvenastih vrsta, npr. C₂₇ kod nekih hibrida rodova *Salix* (Teece et al., 2008) i *Populus* (Cameron et al., 2000). Maffei i sar. (2004) navode da red Pinales sadrži prosečno 6.18 µg *n*-alkana po 1 g suve mase iglica. Rodovi *Pinus* i *Picea* se prema količini alkana uklapaju u ovaj prosek (5.5 i 5.9 µg), dok neke vrste (iz familija Araucariaceae, Cupressaceae, Pinaceae i Taxaceae)

imaju dvostruko, pa čak i trostruko (Cephalotaxaceae) veći sadržaj *n*-alkana od proseka (preko 20 µg).

Mnoge skrivenosemenice imaju značajan sadržaj *n*-alkana na površini listova (*Coffea arabica* 22-35%, Stocker and Wanner, 1975; *Fagus sylvatica* 17.9%, Reynhardt and Riederer, 1994; jedan klon *Salix dasyclados* 25%, Teece et al., 2008, prema Nikolić, 2008) ili plodova (*Prunus avium* 13%, Peschel et al., 2007, prema Nikolić, 2008). Neke vrste iz familije Papaveraceae imaju visok sadržaj *n*-alkana i u listovima i u plodovima (do 20%, Jetter and Riederer, 1996). Alkani su obilni i kod nekih vrsta roda *Eucaliptus* (Li et al., 1997), naročito kod onih koje odlikuje voštana prevlaka srebrne boje (*E. gunnii* 12.7%, Wirthensohn et al., 1999). Kod nekih vrsta alkani su najobilnija komponenta samo na naličju lista (*Pisum sativum* 73%, Gniwotta et al., 2005; *Wollemia nobilis*, Dragota and Riederer, 2007).

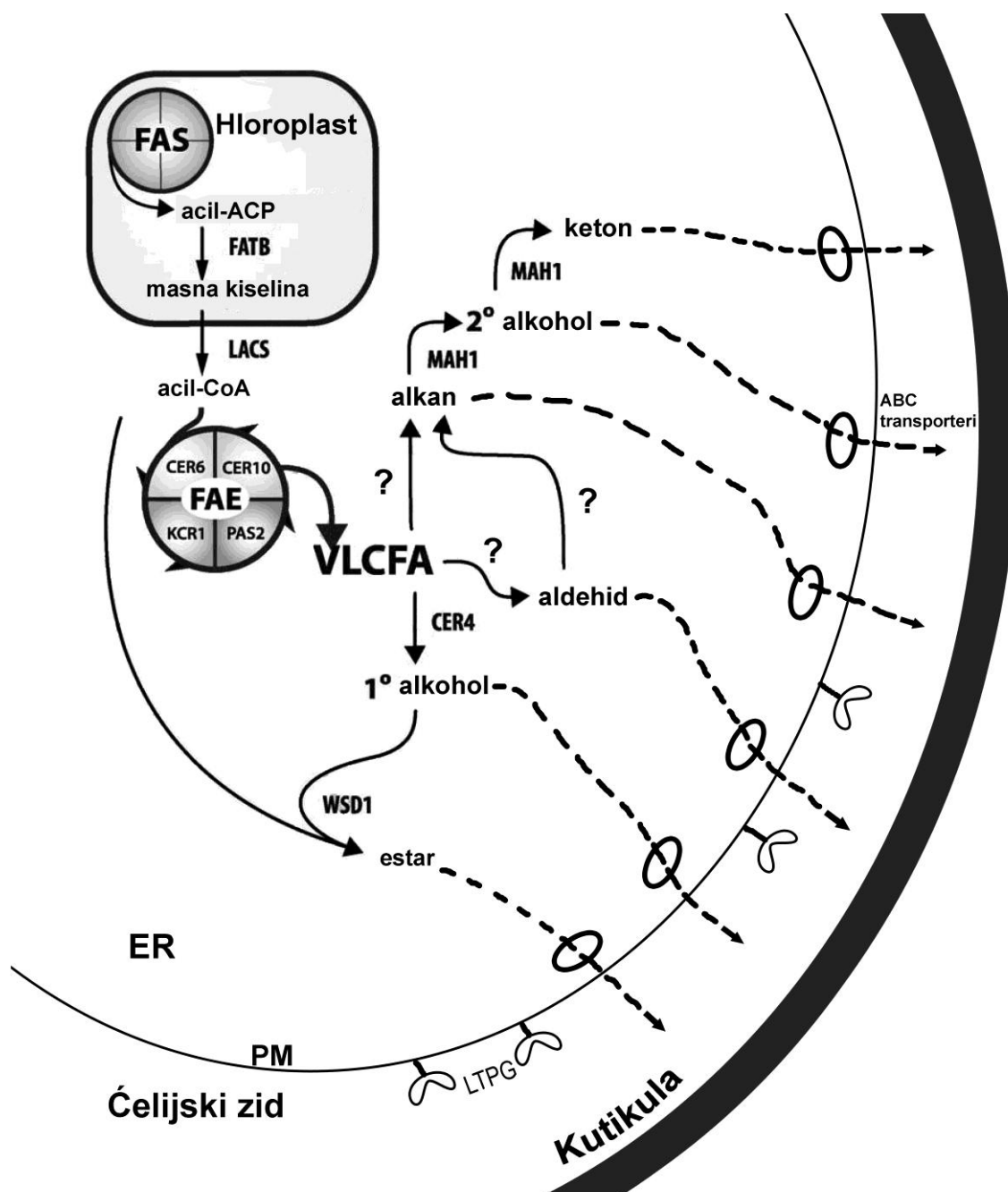
1.4.4. Biosinteza alkana

Alifatične komponente kutikularnih voskova sintetišu se u epidermalnim ćelijama od zasićenih masnih kiselina veoma dugačkog lanca (*very long chain fatty acid* – VLCFA). Međutim, samo formiranje VLCFA je kompleksan proces koji se odigrava u dva stadijuma u različitim ćelijskim organelama. Prvi stadijum je *de novo* sinteza C₁₆ i C₁₈ masnih kiselina koja se odvija u stromi hloroplasta pomoću solubilnih enzima, pri čemu se formira kompleks sinteze masnih kiselina (*fatty acid synthase complex* - FAS). Drugi stadijum je elongacija, odnosno produžavanje lanaca sintetisanih C₁₆ i C₁₈ masnih kiselina, i odigrava se u dodiru sa membranom endoplazmatičnog retikuluma pomoću multienzimskog kompleksa elongacije masnih kiselina (*fatty acid elongase* - FAE). FAE kompleks izvodi ponavljajući ciklus od četiri reakcije katalizovane od strane β-ketoacil-CoA sintetaze (KCS), β-ketoacil-CoA reduktaze (KCR), β-hidroksiacil-CoA dehidrataze (HCD) i enoil-CoA reduktaze (ECR), kako bi od C₁₆ ili C₁₈ masnih kiselina i manoil-koenzima A (manoil-CoA) nastale zasićene masne kiseline veoma dugačkog lanca (24-36 C atoma) (slika 1-9).



Slika 1-9. Multienzimski kompleks za elongaciju masnih kiselina (FAE) sintetiše masne kiseline veoma dugačkog lanca (C_{20} i duže) u ponavljajućim ciklusima adicije dva ugljenika. U jednom ciklusu, četiri enzima FAE kompleksa sekvencijalno produžuju lanac acil-CoA (akceptor ugljenika) za dva ugljenika od malonil-CoA (donor ugljenika), zatim se odvijaju procesi redukcije i dehidratacije, i još jedna redukciona reakcija pri čemu nastaje zasićeni acil-CoA (Kunst and Samuels, 2009)

I pored činjenice da postoji velika varijabilnost u pogledu hemijskog sastava kutikularnog voska kod različitih biljnih vrsta, organa ili u različitim razvojnim stadijumima, alifatični derivati masnih kiselina veoma dugačkog lanca su univerzalne komponente biljnih voskova. Međutim, postoje dva puta transformacije masnih kiselina veoma dugačkog lanca u odgovarajuće alifatične komponente kutikularnih voskova: redukcionu put kojim nastaju primarni alkoholi i estri i put dekarboksilacije koji daje aldehide, alkane, sekundarne alkohole i ketone (slika 1-10).



Slika 1-10. Biosinteza i transport voštanih komponenti do kutikule. Enzimi redukcionog puta, acil-CoA reduktaza (CER4) i voštana sintetaza (WSD1) stvaraju primarne alkohole i estre, respektivno. Enzimi i koraci koji su uključeni u pretvaranje masnih kiselina veoma dugačkog lanca u alkane još uvek nisu identifikovani (na slici su predstavljeni znakom pitanja). Formiranje sekundarnih alkohola i ketona katalizuje alkanska hidroksilaza (MAH1). Mehanizam kojim se mobilisu voštane komponente od endoplazmatskog retikuluma (ER) do plazma membrane (PM) još uvek nije poznat. Nakon ovog procesa voštane komponente se eksportuju iz ćelije procesom koji zahteva ABC transportere (Kunst and Samuels, 2009)

1.4.5. Genetska kontrola biosinteze alkana

Mićović (2006) sumirao je dosadašnja ispitivanja genetske kontrole biosinteze voskova i alkana:

Biosinteza alkana je genetski kontrolisana. Genetske promene rezultiraju smanjenom produkcijom voskova ili smanjenjem udela neke od komponenti, čak se može promeniti i kristalasta strukutra voska. Kod *eceriferum* mutanta vrste *Arabidopsis thaliana* efekti mutacija na sastav voska su dobro poznati (Hannoufa et al., 1993; McNevin et al., 1993; Jenks et al., 1995). Oni su poslužili za izolaciju bar 21 gena koji učestvuju u biosintezi voskova. Kada se mutacijom blokira neki od koraka u biosintezi, ne dolazi uvek do akumulacije prekursora, već se oni obično preusmeravaju na druge reakcije (Mc Nevin et al., 1993). Ponekad poremećaj biosinteze dovodi do lučenja prekursora epikutikularnog voska preko epidermalnih ćelija (Jenks et al., 1996). Hemijska kontrola sastava voskova se obično ne dešava, ali je bitno vreme za koje agensi, npr. pesticidi, prolaze kroz vosak i počinju da deluju na biljku (Schonherr et al., 1993).

Na biosintezu voskova utiču i spoljašnji faktori, među kojima su najvažniji visoka temperatura i mala vlažnost, koji povećavaju proizvodnju voska, čime se biljka brani od prekomerne isparljivosti. Skraćivanjem lanaca ugljenikovih atoma *n*-alkana, biljke reaguju na globalne klimatske promene, npr. povećanu vlažnost vazduha, koja može biti uzrok propadanja šumskih zajednica (Oros et al., 1999), dok produžavanjem lanaca biljke reaguju na opasnost od isušivanja visokim temperaturama u letnjem periodu, odnosno mrazovima u zimskom (Dodd and Poveda, 2003). Prema Ensikat-u i sar. (2006), dužina molekula alkana određuje debljinu sloja voska. Sintaza alkana i kiselina dugačkog niza ne zavise od fotosinteze, ali svetlost ipak deluje posredno na sintezu voskova, kroz povećanu proizvodnju kraćih masnih kiselina ili indukovanjem određenih enzimskih sistema. Na ovaj način se može objasniti razlika u hemijskom sastavu svetle i tamne strane listova (Labrana and Araus, 1991).

Starost biljaka takođe utiče na sastav voskova, smanjenjem aktivnosti enzima na biosintetskom putu, što dovodi do promene strukture voska, pucanja voštanog sloja ili

njegovog istanjivanja i smanjenja zaštitne funkcije voska (Kolattukudy, 1970; 1984, prema Mićović, 2006).

1.4.6. Taksonomski značaj alkana

Istraživanja alkana sa taksonomskog aspekta su počela još šezdesetih godina dvadesetog veka. Naime, Eglinton i sar. (1962) su proćavajući voskove nekih biljaka (familija Crassulaceae), ukazali na mogućnost korišćenja hemijskih komponenti koje ulaze u sastav kutikule u taksonomskim proućavanjima, pre svega zahvaljujući univerzalnom prisustvu voštanog omotaća u biljnom svetu, varijabilnosti u sastavu voskova kod razlićitih vrsta, jednostavnosti uzorkovanja i pristupaćnosti brzih analitićkih tehnika. Posle ovog rada i rezultata, koji su bili zanimljivi i botanićarima i hemićarima, došlo je do publikovanja sve većeg broja radova u kojima je potvrđen taksonomski znaćaj alkana na razlićitim nivoima klasifikacije (Marin, 2003).

Dva parametra koja se najćešće koriste za opisivanje profila alkana u kutikularnim voskovima su: ugljenićni preferencićjalni indeks (CPI - "carbon preference index"), koji se kod materijala biljnog porekla kreće od 1.4 do 6.6 (Sache et al., 2004) i srednja vrednost ukupne dućine ugljovodonićnog niza (ACL - "average chain lenght"). CPI i ACL se mogu koristiti kao hemotaksonomski markeri na nivou roda (Herbin and Robins, 1969; Palić et al., 1994; Palić et al., 1999; Kitić et al., 1999). Takode, ovi parametri se koriste i u paleoloćkim istraćivanjima (Lockheart et al., 1998), ispitivanjima zagaćenosti spoljašnje sredine (Percy et al., 1993), sastava ishrane (Bianchi et al., 1990) itd.

I pored neosporne ćinjenice da su sastav i produkcija alkana u kutikularnim voskovima genetićki determinisani, kod alkana (kao i kod drugih sekundarnih metabolita biljaka) uoćava se odrećena varijabilnost, kao posledica uticaja razlićitih ekoloćkih faktora (detaljno u poglavlju 1.4.5.: "Genetska kontrola biosinteze alkana"). Zbog toga je pre analize taksonomskog znaćaja neophodno istraćiti intra- i interpopulacionu varijabilnost alkana odrećenog taksona. Takode, pravilno uzorkovanje i doslednost u postupcima branja, skladišćenja i izolacije alkana su preduslovi validne interpretacije dobijenih rezultata.

1.4.6.1. Niži nivoi klasifikacije

Postoji veliki broj radova u kojima je ispitivan hemotaksonomski značaj alkana na nivou rodova (Herbin and Robins, 1968b; Guo et al., 2014), podrodova (Li et al., 2012), vrsta (Mimura et al., 1998; Merino et al., 1999), infraspecijskih taksona (Hill and Mattick, 1966), sorti (Stojanović et al., 2003), kao i u detekciji biljnih hibrida (Caramiello et al., 2000; Cameron et al., 2000; Teece et al., 2008). Međutim, kod četinara je inter- i/ili intrapsecijski varijabilitet ove grupe sekundarnih metabolita proučavan uglavnom kod predstavnika sledećih rodova:

- *Pinus* (*P. engelmannii*, *P. montezumae* i *P. ponderosa*, Oros et al., 1999; *P. heldreichii* i *P. peuce*, Nikolić et al., 2010; 2012a; 2012b; 2013b)
- *Picea* (28 vrsta, Corrigan, 1978; *P. brewerana* i *P. abies* Oros et al., 1999; *P. omorica*, Nikolić et al., 2013a; 2013b)
- *Abies* (*A. amabilis* i *A. procera*, Oros et al., 1999), *Tsuga* (*T. mertensiana*, Oros et al., 1999)
- *Pseudotsuga* (*P. macrocarpa* i *P. menziesii*, Oros et al., 1999)
- *Juniperus* (*J. occidentalis*, Oros et al., 1999; *J. communis*, Dodd and Poveda, 2003).
- poznat je i primer uspešne upotrebe *n*-alkana u proučavanju i detekciji hibrida tise (*Taxus x hunnewelliana* i *T. x media*, Dempsey et al., 2003).

Nikolić i sar. (2013b) su analizirali hemotaksonomski značaj *n*-alkana lisnih kutikularnih voskova tri vrste iz rodova *Picea* i *Pinus*: omorike (*Picea omorika*), munike (*Pinus heldreichii*) i molike (*Pinus peuce*). Kod omorike je detektovan širi opseg *n*-alkana (C₁₈-C₃₅), u poređenju sa munikom i molikom (C₁₈-C₃₃). Utvrđeno je da su dominantni *n*-alkani u kutikularnim voskovima ispitivanih četinara: C₂₉ kod omorike, C₂₃, C₂₇ i C₂₅ kod munike i C₂₉, C₂₅, C₂₇ i C₂₃ kod molike. Takođe, pokazano je da voskove omorike odlikuje veći sadržaj *n*-alkana C₂₉, C₃₁ i C₃₃, dok voskovi munike i molike sadrže veći procenat *n*-alkana C₂₁, C₂₂, C₂₃, C₂₄ i C₂₆. Analiza glavnih komponenti (PCA) ukazala je na jasno odvajanje populacija omorike od populacija ispitivanih borova koje su se delimično preklapile. Do separacije vrsta došlo je usled

visokog sadržaja *n*-alkana C₂₉ i C₃₁ (omorika), C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃ i C₂₄ (munika) i C₂₈ (molika). Klaster analiza potvrdila je odvajanje populacija omorike sa jedne strane i populacija munike i molike sa druge strane. Ovakvi rezultati ukazali su da *n*-alkani iz lisnih kutikularnih voskova četinara mogu da predstavljaju dobre hemotaksonomske markere na nivou roda. Takođe, *n*-alkani su se pokazali i kao dobri markeri u proceni geografske varijabilnosti *Picea omorika* (Nikolić et al., 2013a) i *Pinus peuce* (Nikolić et al., 2012b), kao i u proučavanju i identifikaciji infraspecijskih taksona *P. heldreichii* var. *leucodermis* i var. *pančići* (Nikolić et al., 2012a).

U literaturi postoji samo jedan rad u kome se navode podaci o alkanima iz lisnih kutikularnih voskova *Pinus nigra* (Maffei et al., 2004), u kome je ispitivan hemotaksonomski značaj alkana u okviru reda Pinales (na nivou familija, detaljno u poglavlju 1.4.6.2.: "Viši nivoi klasifikacije"). U svakom slučaju, kada su alkani u pitanju, kao i kod drugih sekundarnih metabolita, potrebno je pravilno i široko uzorkovanje materijala i preliminarno ispitivanje koje se odnosi na intra- i interpopulacionu varijabilnost, zbog činjenice da alkani mogu da budu manje ili više podložni uticaju različitih ekoloških faktora (Marin, 2003).

1.4.6.2. Viši nivoi klasifikacije

Tokom protekle dve decenije, Massimo Maffei je u seriji radova publikovao ogromnu količinu rezultata istraživanja koja se bave taksonomskim značajem alkana iz kutikularnih voskova različitih familija. Istraživanjem taksonomskog značaja kod familije Asteraceae (Maffei, 1996a, prema Marin, 2003), pokazao je da se na osnovu sastava i sadržaja alkana, jasno razlikuju tribusi unutar podfamilija Asteroideae i Cichorioideae, ali da se podfamilije ne mogu jasno razgraničiti. Takođe, uporedio je alkane lisnih voskova Asteraceae sa predstavnicima rodova iz nekoliko srodnih i udaljenih familija, kako bi utvrdio da li se alkani mogu koristiti na nivou familija. Generalno, sve familije je odlikovalo prisustvo alkana normalnog niza i razgranatih alkana u širokom opsegu C₂₁-C₃₆. Apiaceae i Fabaceae su imale najveće procenat *n*-alkana kratkog niza (C₂₁-C₂₅). Sa druge strane, familija Poaceae, jedina analizirana familija monokotila, imala je najveći procenat *n*-alkana dugog niza (C₃₄-C₃₆). Solanaceae i Boraginaceae su imale najveći procenat alkana C₂₉. Lamiaceae i

Verbenaceae su imale posebno visok sadržaj C_{31} i C_{33} . Asteraceae je bila najbliža familijama Solanaceae i Scrophulariaceae.

Još jedan primer je analiza alkana iz lisnih voskova kod Brassicaceae, Apiaceae i Fabaceae (Maffei, 1996b). Sve tri familije je odlikovalo prisustvo alkana C_{29} i C_{31} . Međutim, kod Brassicaceae ova dva alkana su bila zastupljena u istoj količini, kod Apiaceae je bilo više C_{29} , a kod Fabaceae C_{31} . Taksonomski značaj alkana na nivou familija i podfamilija, Maffei (1994) je pokazao i u uporednoj analizi Lamiaceae, Boraginaceae, Verbenaceae, Solanaceae i Scrophulariaceae, kao i na nivou podfamilija i tribusa kod Poaceae (Maffei, 1996c) i Cactaceae (Maffei et al., 1997).

Jedan od novijih radova pomenutog autora se odnosi se na hemotaksonomski značaj *n*-alkana u okviru reda Pinales. Naime, Maffei i sar. (2004) su na osnovu sastava *n*-alkana kod 112 vrsta i kultivara iz reda Pinales razdvojili familije Cupressaceae, Pinaceae i Taxaceae od familija Podocarpaceae, Araucariaceae, Cephalotaxaceae i Sciadopityaceae. Generalno, unutar Pinales pokazano je prisustvo *n*-alkana u širokom opsegu C_{18} - C_{34} ; najzastupljeniji je bio C_{31} , a zatim C_{27} , C_{29} i C_{25} . Familija Araucariaceae se izdvojila po relativno niskom sadržaju C_{31} , a Cephalotaxaceae po visokom sadržaju C_{29} i C_{27} . Kod familije Cupressaceae C_{31} i C_{33} su imali srednju zastupljenost, dok je kod Pinaceae C_{31} bio glavni *n*-alkan. Podocarpaceae je imala umerenu zastupljenost za C_{29} , C_{31} , C_{27} i C_{33} , dok je Taxaceae imala visok sadržaj C_{31} . Klaster analiza alkana istraživanih familija je pokazala postojanje dve osnovne grupe. Prvu grupu čine familije sa većim sadržajem C_{31} , a manjim sadržajem C_{27} i C_{29} (Taxaceae, Pinaceae i Cupressaceae) u poređenju sa familijama iz druge grupe (Sciadopityaceae, Araucariaceae, Podocarpaceae i Cephalotaxaceae). Unutar druge grupe, Cephalotaxaceae se odvojila od preostalih familija zbog većeg sadržaja C_{27} , C_{28} i C_{29} .

Taksonomski značaj alkana na višim nivoima klasifikacije istraživali su i drugi autori: Herbin i Robins (1968) kod Pinaceae i Cupressaceae, Tulloch (1981) kod Poaceae, Salatino i sar. (1989) kod Velloziaceae, Zygadlo i sar. (1994) kod Solanaceae, Lamarque i sar. (1998) kod Fabaceae, Rocini i sar. (2006) kod Lythraceae itd.

1.5. Terpeni

1.5.1. Definicija i opšte karakteristike etarskih ulja

Etarska ulja su mirisne smese isparljivih, lipofilnih sastojaka (sekundarnih biljnih metabolita), koje se sintetišu i lokalizuju u specijalnim sekretornim strukturama biljaka i mogu predestilovati vodenom parom (Petrović et al., 2009).

Etarska ulja su uglavnom lako pokretljive, mirisne tečnosti; pojedina su na sobnoj temperaturi viskozna ili čvrste konzistencije. Glavni sastojci etarskih ulja su monoterpeni, seskviterpeni i u manjoj meri derivati fenilpropana. To su različiti ugljovodonici (zasićeni ili nezasićeni), alkoholi, fenoli, estri, aldehidi, ketoni, epoksidi ili karboksilne kiseline. Etarska ulja su smese oko 20-200 sastojaka. Ovi sastojci su, na osnovu koncentracije u etarskom ulju, podeljeni na: glavne (20-95%), sporedne (1-20%) i zastupljene u tragovima (ispod 1%). Etarska ulja najčešće sadrže svega nekoliko glavnih komponenti (npr. karvakrol (30%) i timol (27%) u etarskom ulju *Origanum compactum*, a mentol (59%) i menton (19%) u ulju *Mentha x piperita*), a nekada je to samo jedan sastojak (npr. 1,8-cineol (50%) u etarskom ulju *Cinnamomum camphora* ili linalol (68%) u ulju *Coriandrum sativum*). Generalno, glavne komponente određuju biološke osobine etarskih ulja (Bakkali et al., 2008). Etarska ulja se klasifikuju prema njihovim glavnim sastojcima. To mogu biti ugljovodonici: pineni (*Aeth. Terebinthinae*) ili limonen (*Aeth. Citri*), alokoholi: geraniol i citronelol (*Aeth. Rosae*, *Aeth. Geranii*), linalol (*Aeth. Aurantii floris* ili *Aeth. Neroli*, *Aeth. Bergamottae*, *Lavandulae*, *Coriandri*); mentol (*Aeth. Menthae*), aldehidi: citral (*Aeth. Citri*, *Aeth. Melissae*); ketoni: tujon (*Aeth. Absinthii*, *Salviae*, *Thuyae*); cineol (*Aeth. Eucalypti*, *Niaouli*); anetol (*Aeth. Anisi*, *Anisi stellati*); timol (*Aeth. Thymi*) itd. (Gorunović and Lukić, 2001).

Miris etarskih ulja potiče od sastojaka sa kiseoničnim funkcionalnim grupama. On je intenzivan čak i kada su ovi sastojci zastupljeni u niskom procentu (etarsko ulje limuna). U koncentrovanom obliku etarska ulja uglavnom imaju oštar, nadražujući ukus, koji pali. Razblaživanjem ukus uglavnom postaje prijatan. Izuzeci su npr. etarsko ulje anisa i morača koja su slatkog ukusa. Hlađenjem nekih etarskih ulja izdvajaju se

čvrsti sastojci - stearopteni ili biljni kamfori (npr. kamfor, mentol, timol). Preostali tečni deo etarskog ulja naziva se eleopten.

Etarska ulja su lipofilna: rastvaraju se u nepolarnim organskim rastvaračima (petroletru, etru, heksanu, ksilenu, metilenhloridu i dr.), koncentrovanom etanolu i masnim uljima. Rastvorljivost u razblaženom etanolu zavisi od koncentracije etanola i vrste etarskog ulja. U vodi se rastvaraju samo sastojci sa kiseoničnim funkcionalnim grupama, prvenstveno alkoholi i kiseline (to su oni sastojci etarskih ulja koji se nalaze u infuzu aromatičnih droga). Vodeni rastvori hidrosolubilnih sastojaka etarskih ulja koji se dobijaju kao sporedni produkti prilikom izolovanja etarskih ulja destilacijom vodenom parom ili izmućkavanjem etarskih ulja vodom, nazivaju se aromatične vode.

Etarska ulja su uglavnom bezbojne, žute ili žutozelene tečnosti; pojedina su specifično obojena (npr. etarsko ulje cimeta i karanfilića smeđecrveno). Droge sa proazulenima daju destilacijom vodenom parom plavo ili zeleno obojena etarska ulja (npr. plava etarska ulja daju *Matricariae flos*, *Absinthii herba* i *Millefolii herba*). Proazuleni su neisparljivi, bezbojni, gorki seskviterpenski laktoni. Tokom destilacije vodenom parom prelaze u obojene isparljive azulene.

Pod uticajem kiseonika, svetlosti i povišene temperature etarska ulja se lako oksidišu i usmoljavaju. Zato se čuvaju u malim, tamnim, do vrha napunjenim bocama, na hladnom mestu. Posebno veliku tendenciju ka autooksidativnom usmoljavanju imaju etarska ulja sa visokim sadržajem nezasićenih terpenskih ugljovodonika (npr. etarsko ulje limuna). Ovakva etarska ulja se najčešće rektifikuju frakcionom destilacijom, tako što se uklanja deo ugljovodonične frakcije. Deterpenizovana etarska ulja imaju povećanu stabilnost, i istovremeno intenzivniji miris.

Fizičke konstante koje se određuju za etarska ulja su: relativna gustina, indeks refrakcije i ugao optičke rotacije. Za pojedina etarska ulja određuju se i temperatura očvršćavanja i apsorbancija. Određivanje fizičkih konstanti danas nema toliki značaj za identifikaciju etarskih ulja, već prvenstveno služi za procenu stepena čistoće, odnosno kvaliteta. Farmakopeje propisuju referentne vrednosti ovih konstanti u monografijama pojedinačnih etarskih ulja. Relativna gustina etarskih ulja nalazi se u intervalu od 0.690 do 1.118. Etarska ulja su uglavnom manje relativne gustine od vode (relativna gustina <1). Ona veće relativne gustine od vode (relativna gustina >1) imaju visok sadržaj

fenilpropanskih jedinjenja (npr. etarsko ulje karanfilića, cimeta, peršuna). Etarska ulja imaju visok indeks refrakcije (nalazi se u intervalu od 1.450 do 1.590). Optički su aktivna jer sadrže optički aktivne supstance, kao što su npr. (+)-limonen, (+)-karvon, (-)-mentol, (-)-menton itd. Ugao optičke rotacije često ne predstavlja konstantu u pravom smislu te reči, već farmakopeje propisuju očekivani opseg u kome vrednost ovog parametra mora da se nalazi: npr. za etarsko ulje pitome nane (*Menthae piperitae aetheroleum*) nalazi se u intervalu od -10° do -30° . Variranje ugla optičke rotacije je posledica prirodnog variranja sastava etarskog ulja (uslovljenog faktorima spoljašnje sredine).

U cilju ispitivanja stepena čistoće nekih etarskih ulja, farmakopeje propisuju određivanje hemijskih konstanti, npr. kiselinskog ili estarskog broja (Petrović et al., 2009).

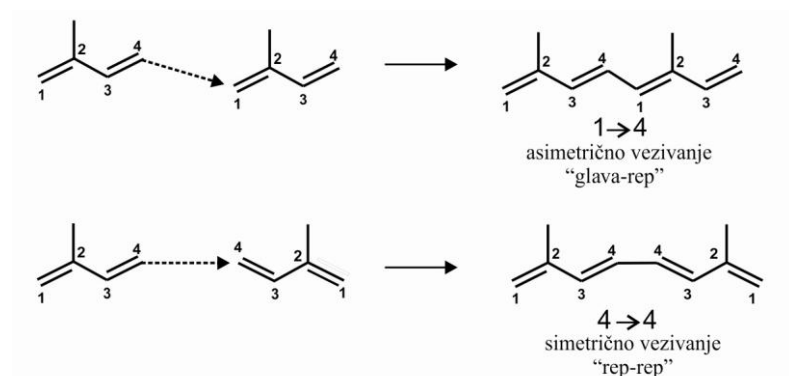
1.5.2. Opšte karakteristike terpena

Funkcionalna raznovrsnost jedinjenja izolovanih iz biljaka najbolje je ilustrovana na primeru terpena. Ono što čini ove molekule tako jedinstvenim je raznovrsnost strukture koja nastaje usled velikog broja kombinacija prekursora. Izolovano je na desetine hiljada prirodnih proizvoda, a gruba procena ja da blizu $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ izolata čine terpeni.

Najmanje 30,000 jedinjenja terpenoidne strukture izvedena su uglavnom iz tri biosintetska prekursora (geranil-pirofosfat, farnezil-pirofosfat i geranil-geranil-pirofosfat), koji predstavljaju polimere sastavljene iz dve, tri ili četiri izoprenske jedinice (molekul 2-metil-1,3-butadiena). Naime, čitava grupa ovih jedinjenja nastala je kondenzacijom C_5 izoprenskih jedinica povezanih na način glava-rep (asimetrično povezivanje) (slika 1-11). Treba reći da postoje i izuzeci od ovog načina vezivanja (skvalen C_{30} i fitoen C_{40} iako formirani u potpunosti iz izoprenskih jedinica, u centralnom delu molekula pokazuju vezivanje rep-rep modus).

Termin terpen (prvi ga je upotrebio Kekulé) nekada je korišćen da bi se definisali ugljovodonični izomeri opšte formule $C_{10}H_{16}$ iz terpentinskog ulja (Kekulé, 1966). Još u početku je primećeno da izopren (metilbutadien) nastaje pirolizom

terpentina (primarnih pinena), a da zagrevanjem izoprena nastaje dipentan (racemski limonen), što je navelo Wallach-a (Wallach, 1914) da predloži tzv. "izoprensko pravilo" kao vid klasifikacije čitave grupe prirodnih proizvoda - terpenoida (koja nastaju povezivanjem izoprenskih jedinica u maniru glava-rep). Ali, pošto su bila poznata i jedinjenja koja se nisu pokoravala ovom pravilu, npr. eremofilon, bilo je neophodno objasniti biogenezu iregularnih terpena što je i učinio Ružička postulirajući opštiju verziju, tzv. "biogenetičko izoprensko pravilo" (Ružička et al., 1953). Ono glasi: "terpeni su jedinjenja nastala kombinacijom izoprenskih jedinica do alifatičnih jedinjenja poput geraniola, farnezola, geranilgeraniola, skvalena i drugih njima sličnih jedinjenja, i koji se mogu izvesti iz ovih alifatičnih prekursora ciklizacijom, a u nekim slučajevima i mehanizmima koji podrazumevaju preuređenje molekula". Oba ova pravila su isključivo empirijska, ali su bila od velikog značaja u tumačenju biosintetskog porekla sekundarnih metabolita (Mihajilov-Krstev, 2009).



Slika 1-11. Načini vezivanja C₅ izoprenskih jedinica u terpenskim molekulima

Uzevši sve ove definice u obzir Barton (1957) je istakao da bi najbolja definicija bila ona koja terpene opisuje kao jedinjenja čiji su ugljovodonični skeleti ili a) teoretski konstruisani iz izoprenskih jedinica ili b) su u nekoj od faza biogeneze bili konstruisani iz izoprenskih jedinica.

Kod terpena je izvršena klasifikacija prema broju C₅ jedinica na monoterpene- C₁₀, seskviterpene- C₁₅, diterpene- C₂₀, sesterpene- C₂₅, triterpene- C₃₀ i tetraterpene- C₄₀. Politerpeni su jedinjenja molekulске mase preko 100,000, koja nastaju povezivanjem veoma velikog broja C₅ izoprenskih jedinica, a najvažniji primeri su

gutaperka i kaučuk. Gutaperka predstavlja mlečni sok biljaka iz rodova *Palaquium* i *Payena*, čiji se hloroformski ekstrakt koristi kao sredstvo za flastere. Komercijalni kaučuk se dobija iz kaučukovog drveta *Hevea brasiliensis*, a nastaje povezivanjem 1,500-60,000 izoprenskih jedinica u linearne lance; koristi se za dobijanje tehničke gume, procesom vulkanizacije (Kovačević, 2004).

S obzirom da izopren predstavlja gradivni blok u terpenskim jedinjenjima termin *izopreni* predstavlja sinonim za terpene. Takođe, terpeni koji sadrže kiseonik se označavaju kao terpenoidi ili izoprenoidi (Bakkali et al., 2008). Sam molekul izoprena je proizvod koji nastaje razgradnjom cikličnih ugljovodonika koji se javljaju u prirodi. Osim što nastaje razgradnjom, izopren predstavlja prirodni lako iparljiv proizvod koji emituju mnoge drvenaste biljke (Sharkey et al., 2001). Funkcija izoprena je kontraverzna. Ovo jedinjenje učestvuje u povećanju tolerancije biljaka na visoke temperature pri fotosintezi, stabilizovanjem tilakoidne membrane (Sharkey et al., 2001) ili u nekim slučajevima pokazuje antioksidativnu aktivnost (Loreto and Velikova, 2001). Međutim, iako nastaje prirodnim putem, izopren nije direktno uključen u sintezu terpena, a biohemijski aktivne izoprenske jedinice identifikovane su kao difosfatni (pirofosfati) estri: izopentil-difosfat (IPP) i dimetilalil-difosfat (DMAPP) (detaljno u poglavlju 1.5.4.: "Biosinteza terpenskih molekula").

1.5.2.1. Monoterpeni

Najveći broj monoterpena nastaje iz geranil-pirofosfata (GPP) i ima osnovni skelet od deset ugljenikovih atoma (dve izoprenske jedinice). Na osnovu građe ugljeničnog skeleta mogu se podeliti na aciklične, monociklične i biciklične (slika 1-12).

Regularni, isparljivi monoterpeni su glavni sastojci etarskih ulja velikog broja familija golosemenica i nekih skrivenosemenica u kojima se njihov udeo kreće i do 90%. Nekada su ovi sastojci etarskog ulja povezani sa šećerima (kod matičnjaka i izopa). Drugu grupu regularnih monoterpenskih derivata predstavljaju neisparljivi iridoidi (biciklični sistemi) koji se u biljnim tkivima najčešće nalaze vezani za šećere kao glikozidi (Kovačević, 2004).

Na osnovu tipa funkcionalne grupe na osnovnom skeletu, monoterpeni se mogu podeliti u nekoliko grupa (Bakkali et al., 2008):

Ugljeni hidrati:

Aciklični: mircen, ocimen itd.

Monociklični: terpinen, p-cimen, felandren itd.

Biciklični: pineni, δ -3-karen, kamfen, sabinen itd.

Alkoholi:

Aciklični: geraniol, linalol, citronelol, lavandulol, nerol itd.

Monociklični: mentol, α -terpineol, karveol itd.

Biciklični: borneol, fenhol, hrizantenol, tujan-3-ol itd.

Aldehidi:

Aciklični: geranial, neral, citronelal itd.

Ketoni:

Aciklični: tegeton itd.

Monociklični: mentoni, karvon, pulegon, piperiton itd.

Biciklični: kamfor, fenhon, tujon, ombelulon, pinokamfon, pinokarvon itd.

Estri:

Aciklični: linalil-acetat ili propionat, citronelil acetat itd.

Monociklični: mentil ili α -terpinil acetat itd.

Biciklični: izobornil-acetat itd.

Etri:

1,8-cineol, mentofuran itd.

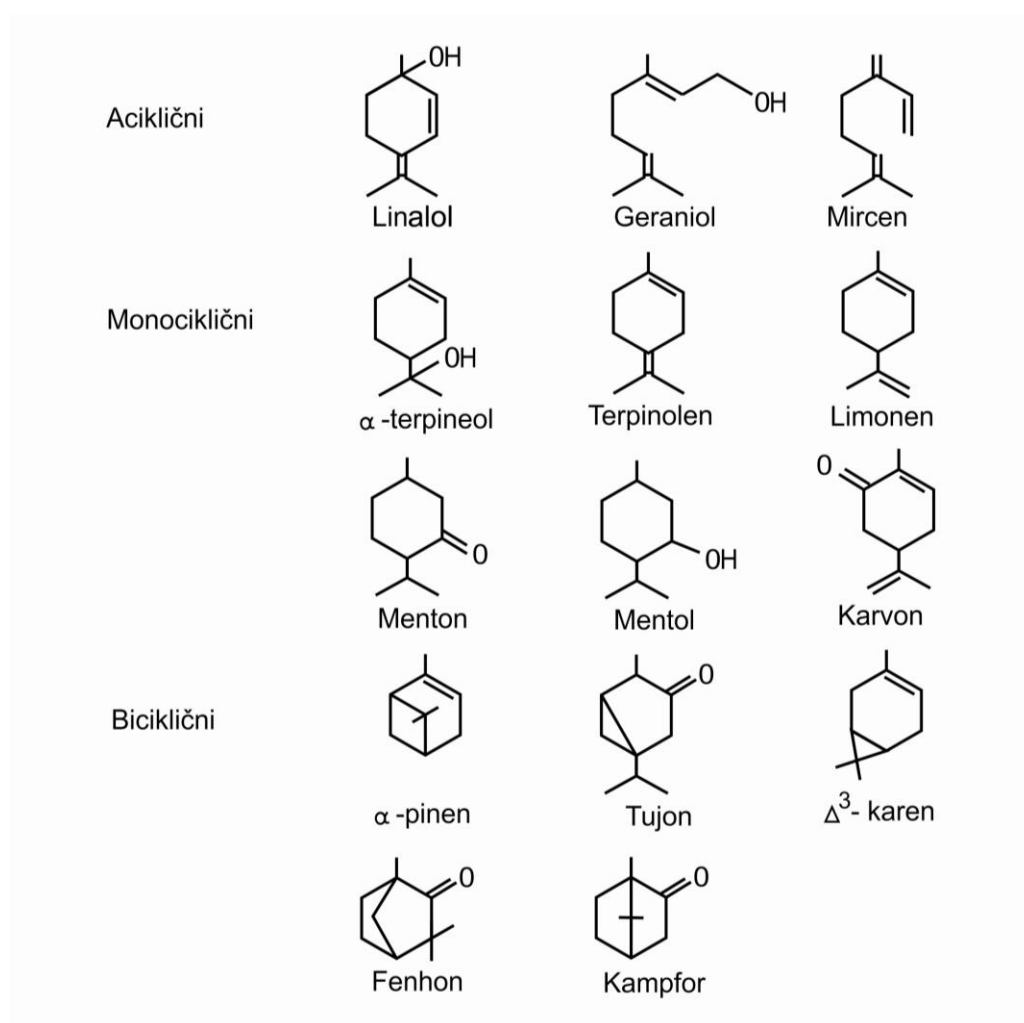
Peroksidi: askaridol itd.

Fenoli: timol, karvakrol itd.

Većina monoterpena su optički aktivna jedinjenja, međutim enantiomeri su vrlo često zastupljeni u uljima različitih biljnih vrsta: (+)- α -pinen kod *Pinus palustris*, a (–)- β -pinen kod *Pinus caribaea* i *Pinus pinaster*; (+)-linalol u ulju kamfora (*Cinnamomum camphora*), a (–)-linalol u ulju korijandera (*Coriandrum sativum*); (+)-citronelal kod eukaliptusa (*Eucalyptus citriodora*) i (–)-citronelal kod ružinog i geranijumovog ulja;

(+)-kamfor iz žalfije, a (–)-kamfor iz povratića (*Tanacetum vulgare*); (+)-karvon u kimu (*Carum carvi*) i (–)-karvon iz nane (*Mentha spicata*) itd.

Takođe, postoje i primeri gde su enantiomerni molekuli izolovani iz iste biljke: (+)- i (–)- α -pinen iz nekih vrsta borova (*Pinus* spp.) ili (+)- i (–)-limonen iz nane (*Mentha x piperita*). Poznato je da enantiomeri daju različite biološke reakcije, što se pre svega odnosi na receptore čula mirisa: karakterističan miris kima potiče od (+)-karvona, dok (–)-karvon ima miris sperminta; (+)-limonen miriše na narandžu, dok (–)-limonen podseća na limun. Kada ista biljka proizvodi oba enantiomera, postoje dva različita enzimska sistema; svaki katalizuje nastanak jednog enantiomera. Sa druge strane, dešava se da iz jednog enzimskog sistema nastane više proizvoda (limonen, mircen, α - i β -pinen) zastupljenih u različitom procentualnom odnosu.



Slika 1-12. Formule nekih čestih acikličnih, monocikličnih i bicikličnih monoterpena

1.5.2.2. Seskviterpeni

Prvi seskviterpeni su izolovani još u XIX veku (kadinen i kariofilen), a 1913. god. je određena struktura farnezola. Od tada pa do danas, utvrđen je veliki broj različitih tipova skeleta ove grupe terpena. Svi oni nastaju iz farnezipirofosfata (FPP) i se sastoje iz tri izoprenske jedinice (ili $1\frac{1}{2}$ monoterpene; *sesqui* na latinskom znači $1\frac{1}{2}$), odnosno njihov ugljenični skelet sadrži 15 ugljenikovih atoma (C_{15}). Međutim, intramolekularne ciklizacije, reorganizacije i oksidacije stvaraju veliki broj raznovrsnih struktura. Na osnovu građe molekula, kao i monoterpene, dele se na aciklične, monociklične i biciklične (slika 1-13). Zanimljivo je broj mogućih ciklizacija i sekundarnih modifikacija među seskviterpenskim molekulima. Utvrđeno je da postoji nešto više od 200 skeletnih tipova unutar ove grupe: dodatnih pet C atoma i dvostruka veza uslovljavaju fleksibilniji sistem. Isparljivi seskviterpeni su najčešće satojci etarskih ulja, dok drugu grupu predstavljaju neisparljivi seskviterpeni koji u svom molekulu sadrže γ -laktonski prsten (seskviterpensi laktoni) (Kovačević, 2004).

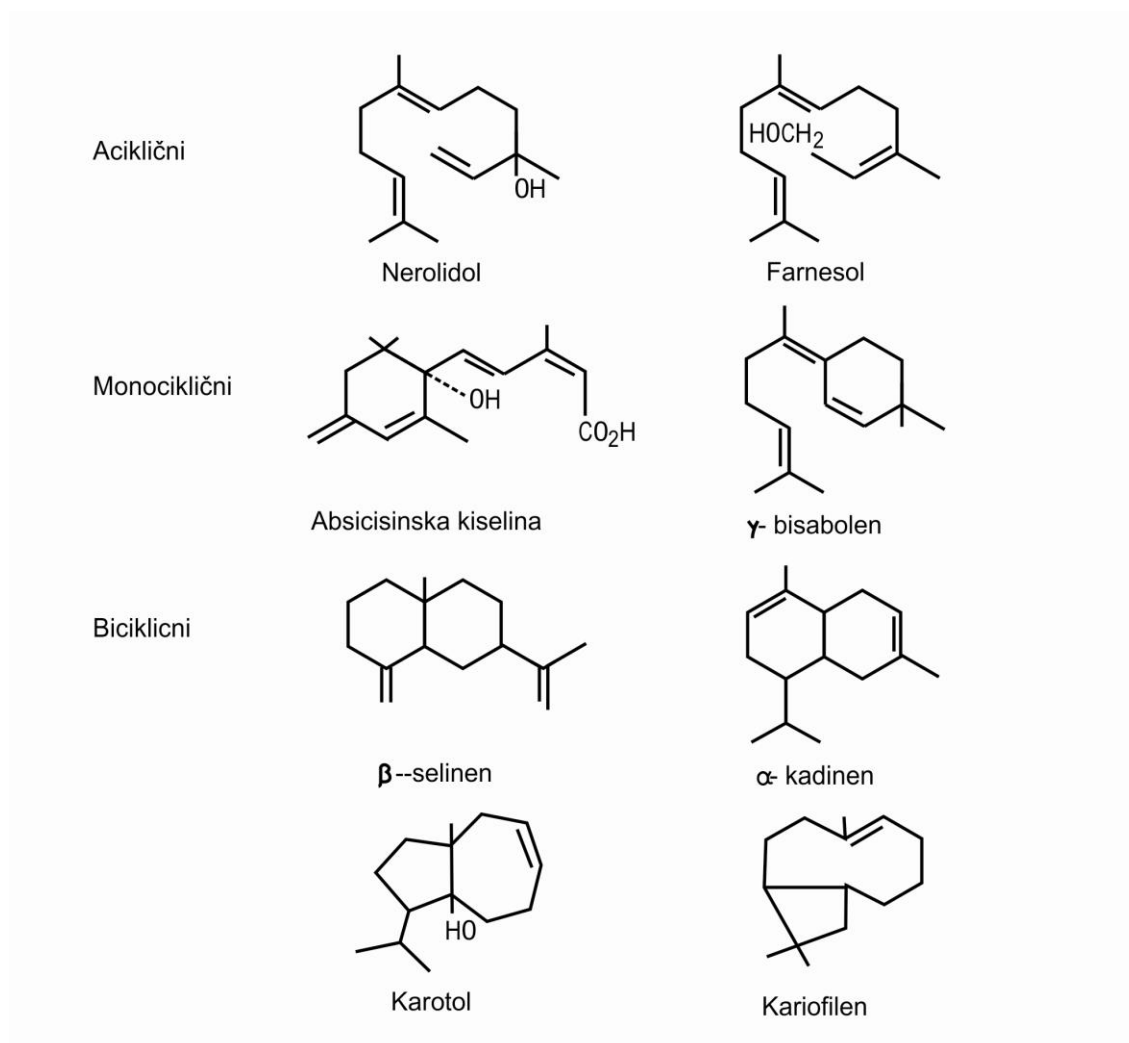
Kao i monoterpene, i seskviterpeni su grupisani u nekoliko tipova jedinjenja (Bakkali et al., 2008):

Ugljeni hidrati: azulen, β -bisabolen, kadinen, β -kariofilen, longifolen, kurkumeni, elemeni, farnezeni, zingibereni itd.

Alkoholi: bisabol, kedrol, β -nerolidol, farnezol, karotol, β -santalol, patulol, viridiflorol itd.

Ketoni: germakron, nootkaton, cis-longipinan-2,7-dion, β -vetinon, turmeroni itd.

Epoksidi: kariofilen-oksid, humulen epoksidi itd.



Slika 1-13. Formule nekih čestih acikličnih, monocikličnih i bicikličnih seskviterpena

1.5.3. Distribucija i uloga terpena u biljkama

Terpeni su veoma raširena grupa sekundarnih metabolita u biljnom carstvu. Njihov sadržaj je naročito veliki kod takozvanih aromatičnih biljaka. Neke biljne familije su posebno bogate etarskim uljima, kao što su Lamiaceae, Asteraceae, Lauraceae, Zingiberaceae, Myrtaceae, Rutaceae, Apiaceae i Pinaceae. Etarska ulja se mogu naći u svim delovima biljke (korenu, rizomu, stablu, kori, semenu, listovima, cvetovima i plodovima), ravnomerno raspoređena u svim biljnim organima ili samo u određenom biljnom organu - najčešće i u najvećem procentu su zastupljena u listu i cvetu. Prinosi etarskih ulja se obično kreću između 0.2 i 2.0%, mada postoje znatna

odstupanja. U zavisnosti od sadržaja etarskog ulja koji može da varira (prinos izuzetno cenjenog ružinog ulja često ne prelazi 0.03%, dok prinos nekih drugih ulja može dostizati i do 20%, npr. etarsko ulje karanfilića) biljke su podeljene u red bogatih ili siromašnih uljem (Gašić, 1985).

Etarska ulja se najčešće nalaze u slobodnom stanju i to egzogeno: u žlezdama, žlezdanim ljuspama i žlezdanim dlakama, i endogeno: u sekretornim ćelijama, interceluloznim šizogenim šupljinama i intercelularnim šizogenim i lizogenim rezervoarima. Postoje izuzeci kada su ulja vezana u obliku heterozida (seme crne slačice, seme gorkog badema). U vezanom obliku ulja su bez mirisa, a pod uticajem specifičnih enzima i u prisustvu vode, nastaju isparljivi mirisni sastojci (aglikoni).

Biosinteza etarskih ulja se odvija u sekretornim ćelijama sa gustom citoplazmom i većim brojem plastida, mitohondrija i diktiozoma (Simić, 2000). U posebnim delovima biljaka dolazi do akumulacije ulja, najčešće u neposrednoj blizini ili na samim mestima gde i nastaju. Postoji više vrsta sekretornih struktura, u zavisnosti od samih biljaka, i to:

1. modifikovane parenhimske ćelije - ulje se sakuplja na mestu nastanka u ćeliji (idioblasti). Ovo je slučaj kod biljaka familija Lauraceae, Piperaceae, Zingiberaceae, Araceae itd.
2. međućelijski sekretorni prostori - okrugle šupljine ili cilindrični kanalići koji se prema postanku dele na šizogene (Myrtaceae), lizigene (u plodovima *Citrus* voća) i šizolizigene (kod Rutaceae).
3. žlezdane dlake i žlezdane ljuspe - različito raspoređene sekretorne ćelije na kratkoj dršci u kojima se etarska ulja izlučuju ispod mehurasto podignutog dela ćelijskog zida pokrivenog debelim slojem kutikule. Anatomska građa ovakve žlezde je karakteristična, i može služiti kao obeležje cele familije, npr. žlezdane dlake kod familije Asteraceae, žlezdane ljuspe familije Lamiaceae.

U biljnom svetu se najbolje može sagledati uloga molekula terpenske strukture u metabolizmu. Biljke koriste molekule terpena za brojne procese koji se dešavaju u ćeliji (u tome se ogleda univerzalna fiziološka, metabolička i gradivna uloga). Naime, terpeni igraju važnu ulogu u održavanju fluidnosti ćelijske membrane (fitosteroli), učestvuju u elektronskom transportu (ubihinoni, menahinoni i plastohinoni), glikozilaciji proteina

(dolihol) i regulaciji ćelijskog ciklusa (hormoni i regulacioni proteini sa terpenoidnom strukturom). Pored osnovne uloge koju imaju u rastu i razvoju normalne ćelije, biljke proizvode molekule terpenske strukture koji mogu imati specijalizovanu ulogu (Harborne, 1991, prema Mihajilov-Krstev, 2009).

1. jedinjenja koja imaju zaštitnu ulogu i koja se u velikom broju sintetišu u blizini obolelih ćelija, tzv. odbrambeni toksini (seskviterpenski i diterpenski fitoaleksini),

2. upozoravajući signali koje biljke emituju u slučajevima kada je njihov opstanak doveden u pitanje (monoterpeni i seskviterpeni),

3. atraktanti emitovani iz cvetnih organa (monoterpeni),

4. fotoprotektori (izopren i karotenoidi, antocijani, bočni niz hlorofila).

1.5.4. Biosinteza terpenskih molekula

Sva terpenska jedinjenja su sintetisana iz samo dva prekursora C₅: izopentenil-difosfata (IPP) i dimetilalil-pirofosfata (DMAPP) (slika 1-14).

Dugo je smatrano da se biosinteza univerzalnih terpenskih prekursora vrši isključivo preko mevalonske kiseline, proizvoda metabolizma acetata, odnosno preko tzv. aceto-mevalonatnog puta ili MVA (Amdur et al., 1957; Crotenau et al., 2000). Međutim, kada se nastavilo sa istraživanjima utvrđeno je postojanje još jednog tzv. nemevalonatnog puta (deoksiksilulozo-fosfatni, poznat još i kao metileritroil-fosfatni put) koji preovladava u sekundarnom metabolizmu (Dewick, 2002).

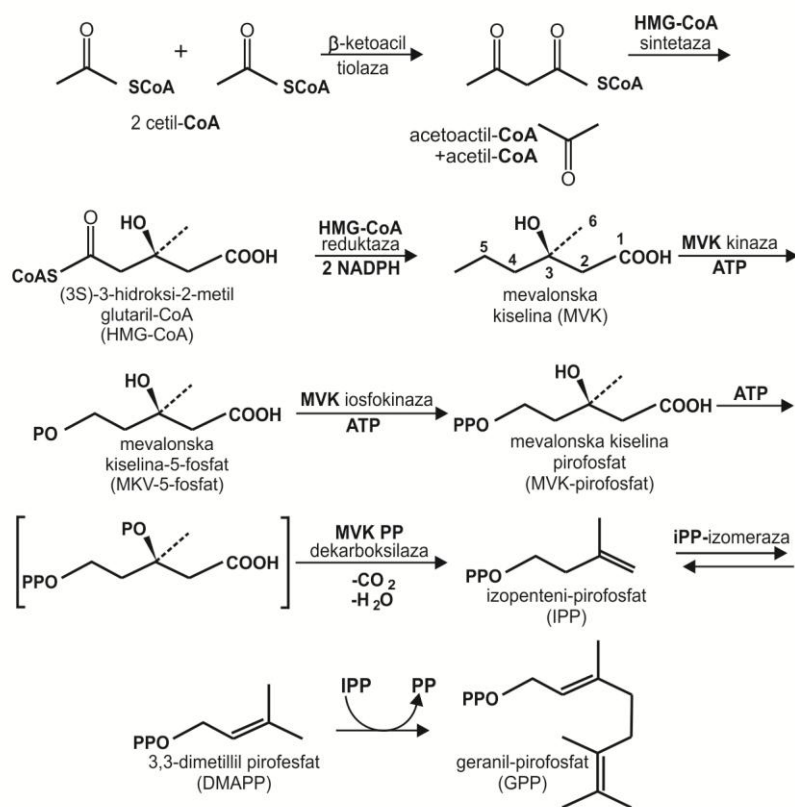
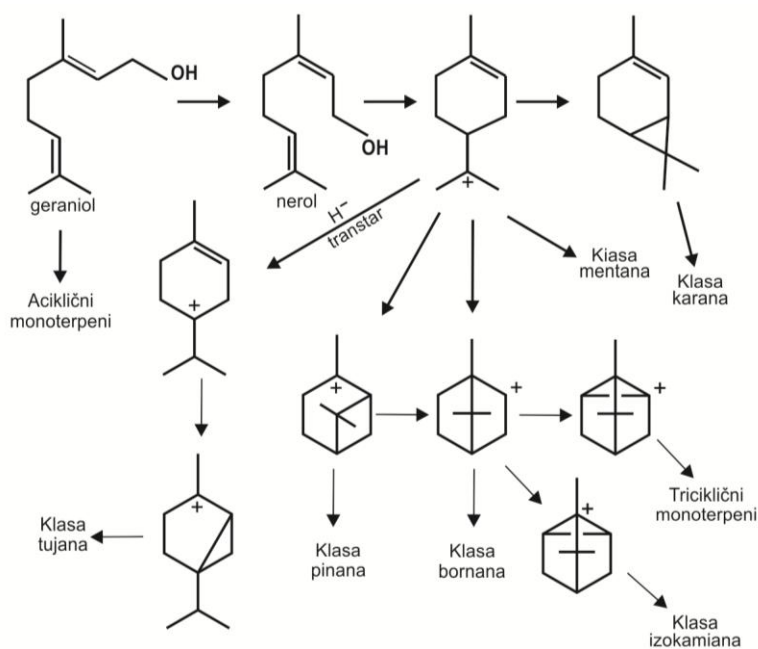
Tabela 1-8. Zastupljenost mevalonatnog i deoksiksilulozofosfatnog puta u biosintezi terpenskih molekula kod različitih grupa organizama (Rohmer, 1999).

	Mevalonatni put		Deoksiksilulozofosfatni put
Bakterije	+	ili	+
Archea	+		
Gljive	+		
Alge	+	i/ili	+
Više biljke			+
Plastidi			+
Citoplazma i mitohondrije	+		
Protozoe	+		+
Životinje	+		

Ispitivanjima je utvrđeno da se biosinteza terpena kod Archaea, nekih Eubacteria, plesni, gljiva, pojedinih protozoa i životinja vrši preko mevalonatnog puta, dok mnoge patogene bakterije, alge i parazit malarije *Plasmodium falciparum* terpene sintetiziraju preko nemevalonatnog puta. Streptomicete, neke alge, jetrenjače, prave mahovine i više biljke za biosintezu terpena koriste oba puta (tabela 1-8).

Mevalonatnim putem biosinteza terpenskih prekursora započinje iz dva molekula acetil-CoA, koji u prisustvu ketoacil-CoA sintetaze daju acetoacetyl-CoA (slika 1-14). U prisustvu još jednog molekula acetyl-CoA, pod uticajem HMG-CoA-sintetaze (hidroksi-metil-glutaril-CoA-sintetaze), nastaje (3S)-3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), koji odvajanjem CoA-ostatka i redukcijom pomoću NADPH daje mevalonsku kiselinu (MVK). Mevalonska kiselina se pomoću ATP u prisustvu MVK kinaze prevodi u monofosfat, a pomoću još jednog molekula ATP i MVK-fosfokinaze u pirofosfat. Tercijarna OH-grupa se zatim fosforiliše u prisustvu još jednog molekula ATP-a. Eliminacijom fosforne kiseline i ugljen dioksida pod uticajem MVKPP-dekarboksilaze nastaje izopentenil-pirofosfat (IPP), koji je u prisustvu IPP-izomeraze u ravnoteži sa 3-dimetilalil-pirofosfatom (DMAPP). IPP i DMAPP predstavljaju biogenetske izoprenske jedinice svih terpena. Kondenzacijom IPP i DMAPP (glava-rep vezivanjem) nastaje geranil-pirofosfat (GPP) sa 10 C atoma, koji je direktan prekursor svih monoterpena i ima ključnu ulogu u biosintezi svih viših terpena (Gorunović and Lukić, 2001).

U biosintezi monoterpena, geranilpirofosfat (GPP) se najpre prevodi u *cis*-izomer nerol, koji lako podleže ciklizaciji uz formiranje karbokationa. Reakcijama preuređenja i oksidacije iz njega nastaje niz drugih monoterpena (slika 1-15).

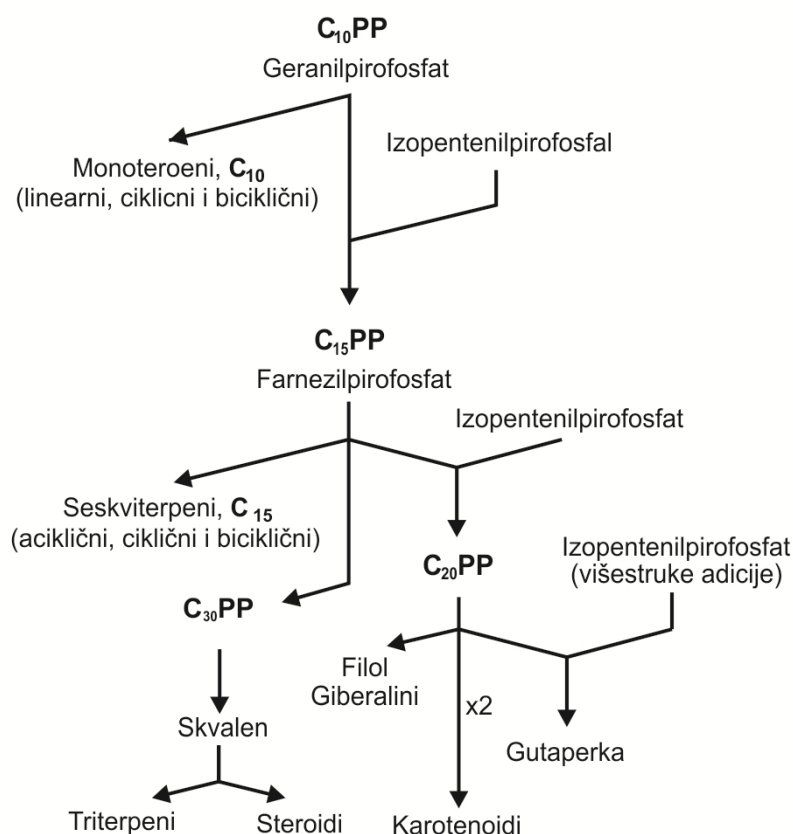
Slika 1-14. Formiranje aktiviranih C₅ jedinica (Gorunović and Lukić, 2001)

Slika 1-15. Formiranje glavnih strukturnih tipova monoterpena (Gorunović and Lukić, 2001)

Kondenzacijom geranilpirofosfata (GPP) sa još jednim molekulom izopentenilpirofosfata (IPP) nastaje farnezil-pirofosfat (FPP) sa 15 C atoma, koji je prekursor svih seskviterpena (slika 1-16).

Diterpeni su derivati geranil-geranil-pirofosfata (GGPP) sa 20 C atoma, koji nastaje adicijom IPP na farnezil-pirofosfat (FPP) ili kondenzacijom dva molekula geranil-pirofosfata (slika 1-16).

Dimerizacijom farnezil-pirofosfata (FPP) nastaje skvalen (C_{30}), neposredni prekursor za biosintezu svih triterpena, dok dimerizacijom geranil-geranil-pirofosfata (GGPP) nastaje fitoen (C_{40}) iz koga se formiraju tetraterpeni (slika 1-16). Formiranje skeleta tri- i tetraterpena ne prati u potpunosti pravilnost Ružičkinog povezivanja; subjedinice se mogu povezati i rep-rep modusom (simetrično) (slika 1-12).



Slika 1-16. Biogeneza različitih klasa terpena (Kovačević, 2004)

1.5.5. Genetska kontrola biosinteze terpena

Genetska kontrola biosinteze terpena je dosta istraživana kod vrsta iz roda *Mentha*. S obzirom da je reč o vrstama koje se odlikuju velikom inter- i intraspecijskom varijabilnošću kvalitativnog i kvantitativnog sastava etarskih ulja, poslužile su kao model za biogenetsku šemu terpenskih komponenti (Reitsem, 1958; Fujito, 1960, prema Mimica–Dukić, 1995). Kroz seriju ispitivanja biosinteze kod različitih vrsta i hibrida menti, koje su sproveli Murray i Hefendehl između 1968. i 1976. god. (prema Mimica–Dukić, 1995), potvrđena je pretpostavka njihovih prethodnika da se biosinteza terpena odvija u sekvencama i da je svaka pojedinačna transformacija kontrolisana posebnim genom odgovornim za biosintezu enzima koji datu transformaciju katalizuje. Ukoliko iz genetskih razloga enzim nije aktivan, biogeneza će se zaustaviti u određenoj tački, što će rezultirati u akumulaciji poslednje sintetizovane komponente.

Prema Bojoviću (1995; 1997), genetska kontrola biosinteze terpena kod četinarara je izuzetno složena, s obzirom da način nasleđivanja varira od monogenetskog sa dominantnim i recesivnim alelom do poligenetskog. Hanover (1966a; 1966b; 1966c) je ispitivanjem monoterpena kod *Pinus monticola* utvrdio da su pojedine komponente (α - i β -pinen, mircen, δ -3-karen i limonen) pod strogom genetičkom kontrolom. Takođe, Squillace i Fisher (1966) su ukazali na genetsku kontrolu biosinteze glavnih monoterpena kod *Pinus eliotti* (α - i β -pinen, mircen i β -felandren). Testovi bazirani na *full* potomstvu potvrđuju monogenetsko nasleđivanje za δ -3-karen kod *Pinus sylvestris* (Hiltunen et al., 1975) i *Picea abies* (Esteban et al., 1976); δ -3-karen, mircen, limonen, longifolen i kariofilen kod *Pinus pinaster* (Baradat et al., 1972; Baradat and Pastuszka, 1992; Marpeau et al., 1975; 1983); δ -3-karen, β -felandren, β -pinen, mircen i limonen kod *Pinus sylvestris* (Yazdani et al., 1982a; 1982b; 1985; Pohjola et al., 1989); limonen, mircen, β -pinen i β -felandren kod *Pinus taeda* (Squillace et al., 1980). Monogenetski tip nasleđivanja potvrdila je i trimodalna raspodela: β -pinena kod crnog bora (Bojović et al., 2005); α -pinena kod munike (Nikolić et al., 2007); β -pinena, α -kopaena, β -elemena, δ -kadinena, α -kadinena, kaur-15-ena i 13-epi-dolabradiena kod moliike (Nikolić et al., 2008); α -kadinola, mircena, santena i *trans*-2-heksenala kod omorike (Nikolić et al., 2009). Sa druge strane, razdvajanje provenijencija munike iz Bugarske na severne i južne prema terpenskom sastavu, Naydenov i sar. (2005a) objašnjavaju poligenetskom

kontrolom pojedinih komponenti. Prema Müller-Starck-u i sar. (1992), plejotropija gena koji kontrolišu terpene je česta zahvaljujući zajedničkim prekursorima u biosintetskim putevima.

Kao što je slučaj i sa drugim sekundarnim metabolitima, količina i sastav etarskih ulja mogu da variraju (do nekih granica) u zavisnosti od različitih endogenih i egzogenih faktora (Kovačević, 2004):

1. faze ontogenetskog razvoja biljke (pupoljak cveta karanfilića najviše ulja sadrži pred otvaranje, a list matičnjaka neposredno pred cvetanje biljke). Proučavanjem ovakvih uticaja, određuje se optimalno vreme prikupljanja biljnog materijala.

2. vrste tkiva ili organa. Ako neka vrsta sadrži etarska ulja u više organa, analize pokazuju da sastav tih ulja može biti jako sličan (cejlonsko cimetno šibljje) ili različit, kako kvantitativno (cvet, list i stabljika nekih *Origanum* vrsta razlikuju se i sadrže: 8.5 i 0.08% ulja) tako i kvalitativno (cimet i karanfilić). Zbog toga se iz nekih biljaka može izolovati veći broj različitih ulja, koja se nalaze pod različitim komercijalnim nazivima (nerolijevo ulje iz cveta, petigrenovo ulje iz nezrelih plodova, pomorandžino iz perikarpa zrelih plodova i ulje iz lista pomorandže).

3. ekoloških faktora (temperatura, vlažnost i aeracija zemljišta, mineralne soli u podlozi, nadmorska visina, dužina izloženosti svetlu, kvalitet svetlosti, vlažnost vazduha i vazдушna strujanja). Ispitivanje uticaja ovakvih faktora na aromatične sirovine interesantno je sa dva aspekta. Kod samoniklih biljaka mogu biti definisana geografska područja i regioni iz kojih se može dobiti najkvalitetnija sirovina ("droga definisanog geografskog porekla"). U odnosu na gajene vrste, proučavanjem uticaja ovih faktora, mogu biti definisani optimalni uslovi gajenja, koji obezbeđuju količinu i kvalitet biljne mase.

4. načina obrade biljne sirovine i načina izolacije etarskog ulja. Svaka obrada aromatične sirovine (sušenje, usitnjavanje, ekstrakcija) uslovljava delimičan gubitak etarskog ulja i promene njegovog sastava. Procesom industrijske ekstrakcije uvek se dobija oko 20% manje ulja nego u laboratorijskim uslovima. Što se tiče sastava, mnogo više se zna o uljima izolovanim iz biljnog tkiva, nego o nativnom ulju koje se nalazi u sekretornim strukturama biljke. Za njihova ispitivanja se koriste mikrotehnike (uzimanje uzorka iz žlezda kapilarom) i za sada se retko izvode.

1.5.6. Taksonomski značaj

Upotreba terpena u sistematici biljaka ima veoma dugu tradiciju, a zasniva se na činjenici da je sastav terpena pod genetičkom kontrolom i u velikoj meri nezavisan od uticaja faktora spoljašnje sredine. Kod mnogih vrsta sastav terpena je povezan sa poreklom biljnog materijala, tako da terpeni mogu biti korišćeni kao markeri u istraživanju genetičkog variranja na geografskom ili ekološkom nivou (Nikolić et al., 2007; 2008; 2009) kao i u verifikaciji materijala nepoznatog porekla (Cenard et al., 1997). Hanover (1992) je istakao da su terpeni odlični markeri za istraživanje biodiverziteta, geografske varijabilnosti, evolucije i sistematike, naročito kod četinara. Do danas je objavljen veliki broj radova o terpenima kod četinara i ostalih vaskularnih biljaka, a među njima ima najviše onih koji se bave proučavanjem sastava terpena i njihovim geografskim varijabilitetom. Takođe, dosta je urađeno u oblasti taksonomije, biosinteze terpena i ispitivanja uticaja terpena na otpornost biljaka prema bolestima, štetočinama i spoljašnjim faktorima.

I pored neosporne činjenice da su sastav i produkcija terpena pod genetičkom kontrolom, kod terpena (kao i kod drugih sekundarnih metabolita biljaka) uočava se određena varijabilnost, kao posledica uticaja različitih ekoloških faktora (detaljno u poglavlju 1.5.5.: "Genetska kontrola biosinteze terpena"). Zbog toga je pre analize taksonomskog značaja neophodno istražiti intra- i interpopulacionu varijabilnost terpena određenog taksona. Takođe, pravilno uzorkovanje i doslednost u postupcima branja, skladištenja i izolacije etarskih ulja su preduslovi validne interpretacije dobijenih rezultata.

1.5.6.1. Niži nivoi klasifikacije

Iako je hemotaksonomski značaj terpena kod četinara potvrđen na nivou rodova (*Picea* i *Pinus*, Nikolić et al., 2011) i sekcija (*Juniperus* i *Sabina*, Adams, 1991; *Tsuga* i *Hesperopeuce*, Lagalante and Montgomery, 2003), u najvećem broju radova terpeni su uspešno korišćeni:

1. kao hemotaksonomski markeri na nivou vrsta:
 - *Pinus halepensis*, *P. brutia*, *P. nigra*, *P. pinea* i *P. canariensis* (Roussis et al., 1995),

- *Pinus attenuata*, *P. heldreichii*, *P. peuce*, *P. pinaster* i *P. radiata*, (Petrakis et al., 2001),
- *P. pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* i *P. nigra* (Macchioni et al., 2003), itd.

2. u identifikaciji infraspecijskih taksona i proceni geografske varijabilnosti vrsta iz rodova:

- *Pinus* (*P. nigra*, Arbez et al., 1974; Kubeczka and Schultze, 1987; Gerber et al., 1995; Bojović, 1995; Chalchat and Gorunovic, 1995a; 1995b; Vidrich et al., 1996; Rafii et al., 1996; Rezzi et al., 2001; Bojovic et al., 2005; Sezik et al., 2010; *P. sylvestris*, Manninen et al., 2002; Naydenov et al., 2002; 2005b; Semiz et al., 2007; *P. heldreichii*, Nikolić et al., 2007; *P. peuce*, Nikolić et al., 2008; *P. contorta* var. *latifolia*, Pauly and von Rudloff, 1971; *P. pinea*, De Simón et al., 2001; *P. pinaster*, Arrabal et al., 2005; itd.),
- *Picea* (*P. glauca*, von Rudloff, 1972; *P. abies*, Persson et al., 1996; *P. omorica*, Nikolić et al., 2009; itd.),
- *Abies* (*A. lasiocarpa*, Zavarin et al., 1970; *A. alba*, Zeneli et al., 2001; *A. nephrolepsis*, Li et al., 2005; itd.),
- *Pseudotsuga* (*P. taxifolia* var. *menziesii* i var. *glauca*, von Rudloff, 1973)
- *Thuja* (*T. plicata*, von Rudloff et al., 1988),
- *Juniperus* (*J. squamata* var. *fargesii*, Adams et al., 1996; *J. communis*, Mastelić et al., 2000; *J. oxycedrus*, Medini et al., 2010; *J. deltoides*, Rajčević et al., 2013; itd.)

2. u proučavanju i detekciji hibrida: *Picea glauca* x *P. engelmannii* (Schaefer and Hanover, 1986), *Pinus brutia* x *P. halepensis* (Gallis and Panetsos, 1977), *Pinus nigra* x *P. sylvestris* i *P. densiflora* x *P. thunbergiana* (Idžojtić et al., 2005) itd.

3. u proučavanju prelaznih oblika: između *Pinus discolor* i *P. johannis* (Zavarin and Snajberk, 1986), *Pinus discolor* i *P. cembroides* (Bailey et al., 1982).

1.5.6.2. Viši nivoi klasifikacije

Obimni literaturni podaci ukazuju da je korišćenje terpena u sistematici biljaka, pre svega korisno na nižim nivoima klasifikacije (najviše do nivoa roda). Njihov značaj na suprageneričnim nivoima se smanjuje povećavanjem taksonomskog nivoa, što je očekivano s obzirom na njihovu funkciju u biljci, njihovu biosintezu i na strukturne karakteristike (Marin, 2003).

Jedan od interesantnih primera značaja terpena na višim nivoima klasifikacije se odnosi na familiju Lamiaceae. Naime, po nekim starijim klasifikacijama, Lamiaceae se dele na dve podfamilije: Lamioideae i Nepetoideae. Nepetoideae su, generalno, bogate etarskim uljima, za razliku od Lamioideae. Sa druge strane, kod Lamioideae se javljaju iridoidni glukozidi koji su, po pravilu, odsutni kod predstavnika Nepetoideae. Postoji još nekoliko hemijskih parametara koji diferenciraju ove dve velike grupe unutar familije Lamiaceae.

1.6. Populaciono-genetička i filogeografska istraživanja kod biljaka

Populaciona genetika je naučna disciplina koja se bavi proučavanjem procesa nasleđivanja i varijabilnosti svojstava na nivou populacija jedne vrste. Ona omogućava sticanje uvida u nivoe genetičkog diverziteta u populacijama jedne vrste i vrste u celini kao i stepena genetičke diferencijacije populacija rasprostranjenih u određenom regionu ili u okviru celog areala rasprostranjenja vrste. Nivoi genetičkog diverziteta i genetičke diferencijacije populacija su najpre utvrđivani na osnovu učestalosti i prostorne distribucije različitih promena na nivou hromozoma (npr. inverzije ili translokacije). Sa daljim razvojem molekularnih metoda otpočinje se sa korišćenjem alelnog polimorfizma biohemijskih markera (alozima) koji se i danas široko primenjuju, a zatim i sa korišćenjem učestalosti genetičkih varijanti (alela) odabranih selektivno neutralnih markera na nivou molekula DNK. Poslednjih decenija započinje se i sa korišćenjem varijabilnosti adaptivnih markera koji su pod uticajem prirodne selekcije i koji vrlo često pokazuju klinalnu distribuciju (Sork et al., 2013), kao i sa korišćenjem varijabilnosti celih genoma što je omogućeno ubrzanim razvojem i sve pristupačnijim komercijalnim metodama sekvenciranja genoma.

Populaciono-genetička istraživanja imaju veliku primenu u utvrđivanju evolutivnog potencijala vrste i proceni mogućnosti opstanka date vrste u uslovima promenljivih uslova sredine, u definisanju strategija za dugoročnu konzervaciju vrste, u utvrđivanju tzv. centara diverziteta koji mogu ukazivati na postojanje lokalnih refugiuma date vrste, kao i u detektovanju reliktnih i ancestralnih (predačkih) populacija i kriptičnih vrsta. Stoga u širem smislu, populaciono-genetička istraživanja mogu imati primenu i u rešavanju određenih taksonomskih pitanja.

Smatra se da su osnovni izvori genetičke varijabilnosti mutacije (u širem smislu), rekombinacije i molekularni drajv. Dosadašnja istraživanja su pokazala da su nivoi genetičkog diverziteta i genetička diferencijacije populacija jedne vrste u velikoj meri determinisani tzv. elementarnim životnim i ekološkim svojstvima (*life history and ecological traits*) vrste kao što su taksonomski status, distribucija i veličina areala usko povezana sa efektivnom veličinom populacija (N_e), dužina životnog ciklusa,

reproduktivna strategija koja obuhvata i mehanizme rasejavanja polena i semena, broj hromozoma i nivo ploidije, stadijum sukcesije, a kao dve najznačajnije karakteristike izdvojili su se protok gena (mehanizmi rasejavanja polena i semena) i fekunditet (Hamrick et al., 1979). Višegodišnje, stranooplodne vrste koje se oprašuju i rasejavaju putem vetra, sa velikim fekunditetom, brojem hromozoma, arealom i karakteristične za kasne stadijume sukcesije fitocenoza se, generalno, odlikuju i visokim nivoom genetičkog variabiliteta. Takođe, važno je napomenuti da je navedena kombinacija elementarnih životnih i ekoloških svojstava prisutna uglavnom kod drvenastih biljnih vrsta i to pre svega kod četinarara. Četinari se, generalno, odlikuju izuzetno visokim stepenom genetičkog diverziteta u populacijama i vrstama u celini, kao i niskim stepenom genetičke diferencijacije populacija usled efektivnog protoka gena putem rasejavanja semena i polena i visoke konektivnosti populacija. Međutim, uočeno je da su neki široko rasprostranjeni četinari, kod kojih se očekuje visok nivo genetičkog diverziteta, genetički monomorfni ili slabo varijabilni. Najpoznatiji primeri su: kameni bor *Pinus pinea* koji je distribuiran duž čitavog Mediterana, a odlikuje se gotovo potpunim odsustvom genetičkog diverziteta na nivou jedarnih ($He^1 = 0.11$; Pinzauti et al., 2012), hloroplastnih mikrosatelita ($He = 0.019$; Vendramin et al., 2008) i alozima ($He = 0.011$; Fallour et al., 1997); i severnoamerički crveni bor *P. resinosa* koji takođe ima široku distribuciju, a izuzetno nizak nivo genetičkog diverziteta detektovan na nivou hloroplastnih mikrosatelita ($He = 0.152$; Walter and Epperson, 2005) i alozima ($He = 0.007$; Allendorf et al., 1982). Smatra se da su tokom klimatskih fluktuacija u periodu Kvartara ovi kserotermni četinari preživeli izuzetno snažan efekat "uskog grla" (*bottleneck effect*) odnosno rapidno smanjenje brojnosti, s obzirom da su tokom poslednje glacijacije mogli da opstanu isključivo u najjužnijim tačkama refugijuma u kojima su postojali povoljni ekološki uslovi za njihov opstanak. Ovo je za posledicu imalo drastično smanjenje brojnosti i efektivne veličine populacija kao i gubitak genetičkog diverziteta. S obzirom da se genetička varijabilnost smatra preduslovom uspešne adaptacije neke vrste na nove uslove životne sredine, posebno je interesantna činjenica da su *P. pinea* i *P. resinosa* zadržali toliko nizak nivo genetičkog diverziteta tokom ekspanzije svojih arela i osvajanja vrlo raznovrsnih i fragmentiranih regiona tokom poslednje interglacijalne faze. U slučaju *P. pinea*, kao moguća objašnjenja

¹ prosečna očekivana heterozigotnost

Vendramin i sar. (2008) navode: 1. ekspaniziju koja je otpočela relativno skoro, odnosno najmanje pre 3000 godina kada su ljudi započeli intenzivnu kultivaciju; 2. vrsta je poslednje ledeno doba preživela u najmanje dva odvojena refugijuma (južna Španija i jugoistočna Francuska); 3. tokom faze rapidnog smanjenja brojnosti (*bottleneck* faze) došlo je do masovnog izumiranja specifičnih parazita i izazivača različitih bolesti; 4. uspešna adaptacija na nove uslove životne sredine prvenstveno zavisi od varijabilnosti fenotipskih osobina, a ne diverziteta genetičkih markera. Poznato je da se *P. pinea* odlikuje visokim nivoom fenotipske plastičnosti, koja je najverovatnije omogućila uspešnu kolonizaciju novih staništa uprkos redukovanom genetičkom diverzitetu. Sa druge strane, pokazano je da četinari sa izuzetno malim sadašnjim arealom rasprostranjenja, kao što je *Picea omorika*, mogu pokazivati ne samo izuzetno visok nivo genetičkog diverziteta nego i visoku genetičku diferencijaciju populacija (Aleksić and Geburek, 2014). Ovakav genetički profil vrste je objašnjen dugotrajnim opstankom ove vrste u lokalizovanom refugijumu na Balkanu.

Navedeni primeri ukazuju na izuzetno veliki značaj istorijskih faktora u modelovanju nivoa genetičkog diverziteta i genetičke diferencijacije vrsta, kao i na to da je sadašnji genetički profil svake vrste rezultat sadejstva elementarnih svojstava vrste i istorijskih faktora. Značaj i uticaj istorijskih faktora u determinisanju genetičkog profila vrsta je naročito izražen na Balkanu i drugim regionima koji su služili kao glacijalni refugijumi velikog broja biljnih i životinjskih vrsta tokom poslednjih 2,8 miliona godina.

Balkansko poluostrvo zauzima površinu od 520,000 km² i odlikuje se specifičnom i prilično dinamičnom paleogeografskom istorijom u odnosu na ostatak Evrope (Utescher et al., 2007; Savić, 2008). Specifičan geografski položaj na raskršću nekoliko flora (Stevanović and Vasić, 1995) sa izuzetnim bogatstvom različitih fiziografskih i klimatskih uslova (Stanković, 1960) čini region Balkana jednim od najbogatijih florističkih delova Evrope (7500 biljnih vrsta; Turill, 1929) sa brojnim endemičnim taksonima (oko 2500; Stevanović, 1996). Na osnovu podataka do kojih se došlo analizama polena kao i fosilnih ostataka životinja, pretpostavljeno je da su se populacije većine grupa biljaka i životinja koje danas naseljavaju područje Evrope, u periodu poslednje glacijacije (Last Glacial Maximum, LGM) povlačile pred klimatskim promenama i našle "pribežišta" tj. refugijume na jugu kontinenta, pretežno na

Iberijskom, Apeninskom i Balkanskom poluostrvu. Razmatrajući efekte Ledenog doba na Balkanu, Turrill (1929) ističe da je Balkansko poluostrvo bilo znatno udaljenije od ivica velike ledene kalote, nego što su to bili Iberijsko i Apeninsko poluostrvo, kao i da Balkan nije bio "odsečen" od ostatka centralne Evrope velikim planinskim masivima (Alpima i Pirinejima) koji imaju pravac pružanja istok-zapad, što je upravo slučaj sa ova druga dva južnoevropska poluostrva. To ide u prilog konstataciji da je Balkansko poluostrvo predstavljalo refugijalni centar za srednje-evropske pa čak i za neke istočno-alpske vrste (koje su se "povlačile" preko zapadnih Dinarida), koje su se tokom perioda glacijacije, "povlačile" na teritoriju ovog otvorenog i južno pozicioniranog poluostrva, dok su se u periodima znatno humidnijih perioda interglacijacije "vraćale" na područje centralne Evrope (tzv. proces rekolonizacije). Iako su dosadašnja biogeografska istraživanja odavno ukazala da su u okviru Balkanskog poluostrva kao velikog refugijalnog regiona, postojali brojni lokalizivani manji refugijumi i to uglavnom koncentrisani na kanjone i klisure (Stevanović and Vasić, 1995), filogeografski podaci koji potvrđuju ove nalaze pojavili su se relativno skoro (Ursenbacher et al., 2008; Previšić et al., 2009; Surina et al., 2011).

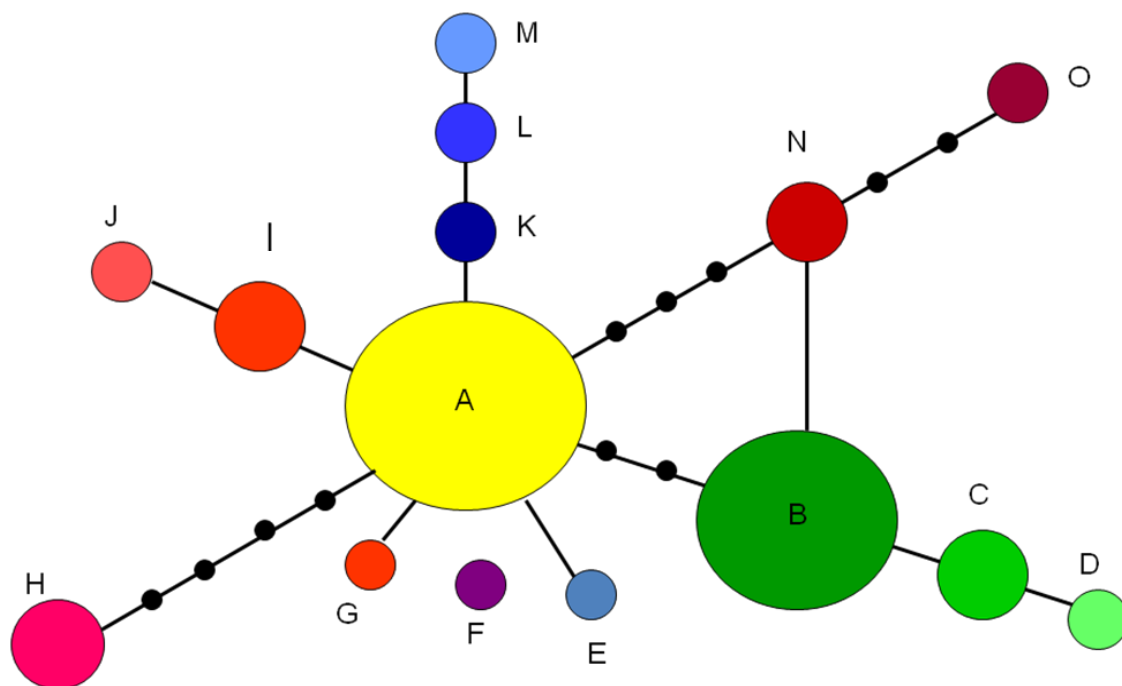
Tokom poslednje dve decenije došlo je do naglog razvoja nove naučne discipline, filogeografije, koja može da raščlani i odvoji uticaj sadašnjih genetičkih, demografskih i drugih faktora od uticaja istorijskih faktora na genetički profil i prostornu distribuciju genealoški povezanih linija uočenih u populacijama u okviru areala rasprostranjenja vrsta. Sa razvojem molekularnih metoda, postalo je jasno da se zaključci o istorijskim procesima koji su doveli do sadašnje distribucije biljnih vrsta, spektra i nivoa genetičke varijabilnosti u populacijama, kao i diferencijacije (struktuiranja) populacija, mogu izvoditi na osnovu analize sadašnjeg genetičkog diverziteta gena i diferencijacije (struktuiranja) populacija za te gene. Ova oblast istraživanja označena je kao molekularna filogeografija čiji je osnovni cilj utvrđivanje evolucione istorije gena, odnosno, utvrđivanje genealoške strukture genetičke varijabilnosti u prostoru. Osnivačem filogeografije, koja u suštini predstavlja vezu između populacione genetike i filogenije, smatra se John Avise koji je prvi uočio vezu između genealoških odnosa alela i njihove prostorne distribucije. Istraživanje je počeo sa mitohondrijalnom DNK miševa (rod *Peromyscus*) (Avise, 1987) i ubrzo nakon pojave ovog rada, filogeografija postaje izuzetno atraktivno polje istraživanja.

Poslednjih 20-25 godina, filogeografska istraživanja su postala vrlo zastupljena kod animalnih vrsta. Međutim, u početku, filogeografska istraživanja nisu bila tako česta kod biljnih vrsta. Smatralo se da je nedostatak takvih studija kod biljaka u ranim fazama razvoja filogeografije bio posledica nepostojanja adekvante genetičke varijabilnosti, odnosno, molekularnih markera koji se mogu iskoristiti za takve studije (Schaal et al., 1998), što se kasnije, naravno, ispostavilo kao netačno.

Da bi se uradila jedna filogeografska studija, potrebno je dobro poznavati ekološke uslove i geološku istoriju regiona u kojem se vrsta javlja, ali i biologiju same vrste. Na postojanje filogeografske strukture u uzorku populacija može ukazati poređenje populaciono-genetičkih parametara: G_{st} (stepen genetičke diferencijacije na osnovu tzv. *non-ordered alleles*) i N_{st} vrednosti (stepen genetičke diferencijacije na osnovu tzv. *ordered alleles*; detaljno u poglavlju 1.6.1.: "Parametri genetičkog diverziteta i genetičke diferencijacije (strukture) između više populacija"). Ukoliko je N_{st} statistički značajno veći od G_{st} , znači da u uzorku postoji filogeografska struktura (Pons and Petit, 1996). Međutim, na ovaj način dobijamo samo informaciju o postojanju filogeografske strukture u uzorku populacija, ali ne i o samoj strukturi koja postoji u određenom prostoru. Kakva filogeografska struktura postoji kod neke vrste u određenom regionu utvrđuje se filogeografskom analizom.

Filogeografija se bavi genealogijom gena, koja se najčešće prikazuje u vidu mreže označene kao: haplotip stablo ili mreža (*haplotype tree or network*), gensko stablo ili mreža (*gene tree or network*) ili *minimum spanning tree* (slika 1-17). Haplotip stablo je evoluciona rekonstrukcija genealoške istorije genetičke varijacije koja je detektovana u uzorku homologih gena ili DNK regiona koji nisu bili izloženi rekombinaciji ili su bili izloženi rekombinacijama u malom stepenu. Haplotip stablo predstavlja osnovu za izvođenje zaključaka o istorijskim procesima koji su delovali u populacijama tokom vremena. U filogeografskim istraživanjima se, najčešće, koriste DNK sekvence, pri čemu se može ispitivati jedan ili više lokusa, ali genetičke varijante na svakom lokusu moraju biti homologe. Dakle, u uzorku homologih gena ili DNK regiona koji nisu bili izloženi rekombinaciji ili su bili izloženi rekombinacijama u malom stepenu potrebno je detektovati sve genetičke varijante (haplotipove, mitotipove ili hlorotipove). Primenom različitih metoda (npr. statistička parsimonija), koje su implementirane u programe kao što su: TCS (Clement et al., 2000), Network (Bandelt,

Forster, Röhl, Fluxus Technology Ltd.), Arlequin (Excoffier et al., 2005) i HapStar (Teacher and Griffith, 2011), može se konstruisati haplotip stablo koje pokazuje kojim redosledom su nastajali i na koji način su se tokom vremena akumulirale sve genetičke varijante (haplotipovi) koje su detektovane u uzorku. Na ovaj način možemo utvrditi genealošku strukturu ispitivanih haplotipova.



Slika 1-17. Primer haplotip stabla ili mreže (*haplotype tree or network*) sa 15 detektovanih haplotipova

Na haplotip stablu (slika 1-17) razlikujemo izvorne (u centru haplotip stabla) i izvedene haplotipove (vršni), pri čemu je veličina krugova proporcionalna učestalosti haplotipova, a svaka linija predstavlja jednu (ili više) mutacija. Mali crni krugovi predstavljaju hipotetičke haplotipove koji nisu detektovani u uzorku, ali se njihovo postojanje mora pretpostaviti da bi se objasnio postanak nekih haplotipova. Takođe, postoje i slučajevi kada se postanak jednog haplotipa može objasniti preko 2 alternativna puta (tzv. retikularne mreže koje nisu moguće u filogeniji). Nakon konstrukcije, haplotip stablo se upoređuje sa geografskom distribucijom tih haplotipova i utvrđuje se da li se genealoška struktura (mreža) haplotipova poklapa sa geografskom

distribucijom tih haplotipova. Poklapanje genealoške strukture (mreže) haplotipova i geografske distribucije se javlja kada su blisko srodni haplotipovi grupisani zajedno u prostoru, odnosno, jedan blizu drugog, i prostorno izolovani od drugih manje srodnih haplotipova. Takav obrazac odslikava dugotrajnu istoriju koja se karakteriše vrlo limitiranim protokom gena. U slučaju da populacija ima stabilnu dinamiku i da nije panmiksična, nova mutacija ostaje lokalizovana u prostoru. Ako postoji neslaganje između genealoške strukture (mreže) haplotipova i geografske distribucije haplotipova, potencijalni uzroci takve pojave mogu biti: sadašnji interpopulacijski protok gena i perzistencija ancestralnih polimorfizama koji su diferencijalno sortirani tokom divergencije populacija. Da bi utvrdili o kojem od ova dva procesa se radi potrebno je posmatrati poziciju geografski inkongruentnih haplotipova u haplotip stablu: ako se taj haplotip javlja u haplotip stablu bliže ancestralnom haplotipu tj. nastao je pre divergencije populacija, onda se verovatno radi o perzistenciji ancestralnih polimorfizama, a ne o sadašnjem protoku gena. Međutim, ako je geografski inkongruentni haplotip vršni haplotip u haplotip stablu, onda je sadašnji protok gena verovatnije objašnjenje za njegovu sadašnju distribuciju. Protok gena je jedan od najvažnijih faktora od kojeg zavisi postojanje filogeografske strukture u uzorku populacija: samo u slučaju da postoji ograničen protok gena između populacija neke vrste, može doći do nastanka filogeografske strukture.

1.6.1. Parametri genetičkog diverziteta i genetičke diferencijacije (strukture) između više populacija

Parametri genetičkog diverziteta se mogu izraziti:

1. na osnovu broja genetičkih varijanti: stepen polimorfizma lokusa, proporcija polimorfnih lokusa, ukupan broj alela (A), prosečan broj alela po lokusu, *allelic richness* (ARs).
2. na osnovu frekvence genetičkih varijanti (alela): efektivni broj alela (A_e), dobijena heterozigotnost (H_o) i očekivana heterozigotnost (H_e), H_S i H_T , koeficijent inbreedinga (Fis).

Efektivni broj alela (Ae) predstavlja onaj broj podjednako frekventnih alela koji je neophodan da bi se dostigao nivo očekivane heterozigotnosti (H_e) koji je izračunat na osnovu frekvenci alela uzorka. Ae praktično ne uzima u obzir malo frekventne alele i na njegovu vrednost utiče veličina uzorka te je stoga Ae uvek manji od ukupnog broja alela (A).

$$Ae = 1/(1-H_{exp})$$

Ako imamo 2 populacije koje imaju isti broj alela (A), ali jedna populacija ima ujednačene frekvence alela druga populacija ima nekoliko vrlo frekventnih alela i puno retkih i/ili privatnih alela, one će imati različite Ae: prva populacija će imati viši Ae, a druga populacija će imati niži Ae. Pored toga, one će imati različite nivoe heterozigotnosti H_e : prva populacija će imati višu očekivanu heterozigotnost (H_e), a druga populacija će imati nižu očekivanu heterozigotnost (H_e).

Allelic richness (AR_s) je mera genetičkog diverziteta koja uzima u obzir retke alele i efektivnu veličinu populacija (N_e) (Petit et al., 1998). Vrednosti R_s su uvek niže od Ae i bliže su vrednostima A (obično nije potrebno predstavljati i A i R_s već samo jedan od ova 2 parametra naročito ako su veličine uzoraka po populaciji iste).

Dobijena heterozigotnost (H_o) (*observed heterozygosity*) se izračunava na osnovu broja detektovanih heterozigota u populaciji (ili celoj vrsti). H_o = broj heterozigota na lokusu/ukupan broj individua. Vrednost ovog parametra se kreće od 0 do 1: nula znači da u populaciji nema heterozigota, jedan znači da su sve individue u populaciji heterozigoti, a to se dešava u slučaju kada u populaciji postoji veliki broj podjednako frekventnih alela.

Očekivana heterozigotnost (H_e) (*expected heterozygosity* ili *genetic diversity*) je procenjen broj svih individua koje bi bile heterozigotne na bilo kom slučajno odabranom lokusu. H_e se razlikuje od H_o po tome što se vrednost H_e dobija na osnovu dobijenih frekvenci alela u uzorku. Odstupanja H_o od H_e govore o tome da li je populacija u HWE. Vrednost ovog parametra se takođe kreće od 0 do 1.

Srednja očekivana heterozigotnost pojedinačnih populacija (H_s) (nepriistrasni prosečni diverzitet gena – *unbiased average gene diversity*; Nei, 1978) se računa na osnovu frekvenci alela u populaciji koje su korigovane veličinom populacije.

Hs se može izračunati i za haploidne genome i ona predstavlja ekvivalent očekivanoj heterozigotnosti (H_e) kod diploidnih genoma (Weir, 1996).

Totalna heterozigotnost svih populacija (H_t) (nepistrasni prosečni totalni diverzitet gena – *unbiased total gene diversity*; Nei, 1978) se računa tako što se heterozigotnost populacija koriguje veličinom datih populacija: $F_{st} = (H_t - H_s)/H_t$.

H_t se može izračunati i za haploidne genome.

Parametar koji opisuje veličinu odstupanja dobijenih učestalosti heterozigota (H_o) od onih koje bi se očekivale u slučaju da je ta populacija u HWE (H_e) je **koeficijent inbreedinga (F_{is})**.

$F_{is} = 1 - H_o/H_e$, ima vrednosti od -1 do +1.

Ako je $F_{is} = 0$, znači da populacija je u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži (*Hardy-Weinberg equilibrium*, HWE). F_{is} može biti manji od nule – *negativan* - ako je $H_o > H_e$ to znači da u datoj populaciji postoji veći broj heterozigota nego što bi se očekivalo u slučaju da je populacija u HWE. F_{is} može bit veći od nule – *pozitivan* - ako je $H_o < H_e$ to znači da u datoj populaciji postoji manji broj heterozigota nego što bi se očekivačo u slučaju da je populacija u HWE. Do odstupanja od HWE dolazi usled: greške tokom analize alela, mutacija ili migracija, inbreedinga ili genetičkog drifta, selekcije, struktuiranja populacije (Wahlund-ov efekat).

Parametri genetičke diferencijacije (strukture) između više populacija koji se zasnivaju na heterozigotnosti su: Wright-ova F statistika (F_{st}), analogni parametri diferencijacije (G_{st} , R_{st} i N_{st}), AMOVA i klaster analize – Principal Component Analysis (PCA), Principal Coordinates Analysis (PCoA), Factorial Correspondence Analysis (FCA).

Wright-ova F statistika opisuje hijerarhijsku organizaciju (struktuiranje) genetičke varijabilnosti u prostoru koja nastaje usled ograničenog protoka gena između populacija. Usled ograničenog protoka semena i polena između populacija dolazi do toga da se jedinke koje su prostorno bliže češće ukrštaju, a one koje su prostorno udaljene ređe ukrštaju. Posledica toga je da su prostorno bliske jedinke i genetički sličnije, a prostorno udaljene individue genetički manje slične.

Gst je parametar koji je vrlo sličan **Fst** parametru diferencijacije populacija ali ima nešto drugačija statistička svojstva (Pons and Petit, 1996). **Fst** i **Gst** ne uzimaju u obzir sličnost odnosno genetičke distance između alela - oni pokazuju genetičku diferencijaciju na osnovu tzv. *unordered alleles*.

Nst je analog **Fst** parametra koji uzima u obzir sličnost odnosno genetičke distance između alela, i stoga pokazuje genetičku diferencijaciju na osnovu tzv. *ordered alleles* (Pons and Petit, 1996).

Rst je parametar je specijalno dizajniran za mikrosatelite (SSRs) jer podrazumeva SMM model (*stepwise mutation model*) (detaljno u poglavlju 1.6.3.1.: "Mikrosateliti").

AMOVA je metod za ispitivanje molekularne varijabilnosti u okviru vrste. Primenom AMOVA se utvrđuje koji deo ukupne molekularne varijabilnosti otpada na razlike između grupa, a koji na razlike unutar grupa.

Diferencijacija (struktuiranje) populacija (Fst**) i protok gena (**Nm**)** su neraskidivo povezani. Ako je protok gena ograničen, dolaziće do struktuiranja populacija koje čine jednu vrstu, ali i do struktuiranja u okviru same populacije. Smatra se da $Nm \geq 1$ po generaciji dovoljno da spreči divergenciju populacija usled genetičkog drifta.

- efektivni protok polena po generaciji (diploidni genom): $Nm = (1 - Fst)/(4Fst)$ (Slatkin and Barton, 1989)
- efektivni protok semena po generaciji (haploidni genom koji se nasleđuje preko majke): $Nm = \frac{1}{2} (1/Fst - 1)$ (Slatkin, 1993).

1.6.2. Osnovne karakteristike biljnih genoma i njihova primena u populaciono genetičkim i filogeografskim istraživanjima kod biljaka

Za razliku od životinja, koje pored jedarnog ili nukleranog genoma (nuDNK) imaju samo jedan citoplazmatski ili organelarni genom (mitohondrijalni genom, mtDNK), biljke se odlikuju prisustvom dva organelarna genoma – mtDNK i hloroplastni (cpDNK) genom. Citoplazmatski genomi kod životinja (mtDNK) i biljaka (mtDNK i cpDNK) su endosimbiotskog porekla i razlikuju se od jedarnog genoma u

više aspekata kao što su opšta organizacija genoma (uglavnom cirkularni molekuli, detaljnije objašnjeno u poglavlju 1.6.2.3. Mitohondrijalni genom biljaka), ne-Mendelovski način nasleđivanja (Hutchinson et al., 1974; Mogensen, 1996) i klonalni način reprodukcije koji rezultira u postojanju populacija molekula u biljnim ćelijama (Falkenberg et al., 2007; Woloszyńska, 2010).

Pored toga, haploidini citoplazmatski genomi životinja i biljaka, koji se uglavnom nasleđuju uniparentalno, razlikuju se u više aspekata. Naime, mtDNK genom životinja je kompaktan i malo varijabilan u pogledu veličine. On sadrži određeni broj gena koji malo varira kod različitih vrsta. Zatim, geni mtDNA genoma životinja ne sadrže introne, a primarna sekvenca nukleotida mtDNK evoluirala nekoliko puta brže u odnosu na nuDNK. MtDNK kod cvetnica, sa druge strane, odlikuje se izuzetno varijabilnom veličinom i organizacijom što je posledica čestih insercija, delecija i intramolekulskih rekombinacija između direktnih i invertovanih regiona (Laroche et al., 1997). Navedene strukturne promene dovode do čestih rearanžmana gena što za posledicu ima veliku varijabilnost u sastavu i rasporedu gena kod mtDNK biljaka. Takođe, stopa evolucije primarne sekvence nukleotida mtDNK kod viših biljaka je niža ne samo od stope evolucije nuDNK genoma već i cpDNK genoma, koji se odlikuje manje varijabilnom veličinom i organizacijom u odnosu na mtDNK genom.

Imajući u vidu različita svojstva tri biljna genoma, koja su detaljnije objašnjena u poglavljima 1.6.2.1: "Jedarni genom biljaka", 1.6.2.2.: "Hloroplastni genom biljaka" i 1.6.2.3.: "Mitohondrijalni genom biljaka", za očekivati je da se nivoi genetičkog diverziteta i genetička diferencijacija populacija jedne vrste dobijeni na osnovu ispitivanja alelnog polimorfizma svakog od ova tri biljna genoma mogu razlikovati, kao i zaključci o evolutivnoj istoriji vrste. Stoga je poslednjih decenija postalo uobičajeno da se u cilju rešavanja pitanja vezanih za genetički diverzitet i diferencijaciju populacija određene vrste, kao i sticanja boljeg uvida u istorijske i evolutivne procese koji su doveli do sadašnjeg rasprostiranja i evolutivnih odnosa vrsta koristi polimorfizam odabranih lokusa sva tri biljna genoma.

1.6.2.1. Jedarni genom biljaka

Jedarni genomi biljaka su izuzetno varijabilni u pogledu veličine i strukture. Broj hromozoma, stepen grupisanja gena, kao i sama veličina hromozoma mogu se u potpunosti razlikovati čak i kod blisko srodnih vrsta. Pojedine promene strukture jedarnih genoma biljaka nastaju toliko brzo da se dve verzije alela na istom segmentu hromozoma mogu razlikovati u sadržaju i aranžmanu gena čak i kod jedinke iste vrste, kao što je detektovano kod kukuruza (Fu and Dooner, 2002). Stoga se smatra da su molekularni markeri jedarnih genoma dovoljno varijabilni da mogu poslužiti za utvrđivanje genetičke diferencijacije na nivou vrste. Neke od promena jedarnog genoma karakteristika su određenih grupa biljaka sa semenom (Spermatophyta), kao što su velike inverzije i translokacije pronađene u okviru nekoliko klada Poaceae (Gale and Devos, 1998). Ostale promene, tipa poliploidije i duplikacija/delecija gena su toliko česte, da se dešavaju u potpunosti nezavisno kod različitih taksonomskih grupa (Kellogg and Bennetzen, 2004).

Sve Magnoliophyta odlikuju relativno kompleksni jedarni genomi, sa genima rasutim duž multiplih hromozoma. Jedarni genomi ostalih predstavnika biljnog carstva, iako manje istraživani, su takođe veliki i podjednako složeni. Čak i u najmanjim genomima skrivenosemenica, kao što je to slučaj kod *Arabidopsis* (oko 140 Mb), više od 20% DNK čine različiti repetitivni elementi tipa transpozona kao i različiti tipovi jednostavnih tandemskih ponovaka, kao što su satelitska DNK i mikrosateliti (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Kod većine skrivenosemenica, transpozoni i to naročito LTR retrotranspozoni predstavljaju najveći deo repetitivne DNK (Kellogg and Bennetzen, 2004). Broj hromozoma je izuzetno varijabilan kod skrivenosemenica i interesantno je da, često, nije proporcionalan veličini genoma (tzv. C paradox). Na primer, ~440 Mb haploidni genom pirinča je organizovan u 12 hromozoma, dok je ~4900Mb haploidni genom ječma organizovanu samo 7 hromozoma. Prema tome, prosečni hromozom ječma je skoro dva puta veći od celokupnog genoma pirinča. U jedarnim genomima biljaka često su prisutni i dodatni, tzv. B hromozomi, koji su visoko kondenzovani i najčešće ne sadrže funkcionalne gene. Kod kukuruza je utvrđeno da polenova zrna koja nose B hromosome imaju veći uspeh u fertilizaciji i time povećavaju šansu opstanka ovih "sebičnih" hromozoma u narednim generacijama. U okviru iste

vrste, različite jedinke mogu imati od nula do nekoliko B hromozoma, a samim tim i različit broj hromozoma i veličinu genoma (Kellogg and Bennetzen, 2004).

Dosadašnja istraživanja su pokazala da četinari imaju izuzetno velike jedarne genome (10,000 – 40,000 Mbp u poređenju sa 114.5 Mbp kod *Arabidopsis thaliana*) koji sadrže veliku količinu repetitivne DNK (Guevara et al., 2005; Ralph et al., 2006). Predstavnici roda *Pinus* se uklapaju u navedene nalaze što je pokazano tokom protekle decenije kada su intenzivno sprovedena istraživanja veličina jedarnog genoma kod predstavnika ovog roda (Ohri and Khoshoo, 1986; Wakamyia et al., 1993; 1996; Valkonen et al., 1994; O'Brien et al., 1996; Murray, 1998; Hall et al., 2000; Joyner et al., 2001; Bogunic et al., 2003; 2007; Grotkopp et al., 2004). Interspecijske razlike bazirane na veličini genoma utvrđene su kod ~75% vrsta borova i mnogi biološki atributi vrste su indirektno korelisani sa veličinom genoma (Grotkopp et al., 2004). Uprkos dugoj evolucionoj istoriji, diverzifikacija roda se odvijala isključivo kroz homoploidne procese (Wang, 1992). Prema tome, izrazito uniforman i konzerviran kariotip ($2n = 24$), koji odlikuje sve vrste borova, čini ovaj rod odličnim modelom za analize intraspecijskog varijabiliteta veličine genoma. I pored činjenice da bi veličina genoma trebalo da bude konstantna na nivou vrste, postoji veliki broj radova u kojima je pokazana intraspecijska varijabilnost kod različitih biljnih vrsta, uključujući i nekoliko vrsta iz roda *Pinus* (Valkonen et al., 1994; Hall et al., 2000; Bogunic et al., 2003). Bogunic i sar. (2007) su testirali moguću varijabilnost veličine jedarnog genoma kod pet podvrsta crnog bora (ssp. *nigra*, *salzmanni*, *dalmatica*, *pallasiana* i *mauretanica*). Pokazali su da je veličina genoma stabilna u okviru vrste, što znači da je do diverzifikacije populacija *P. nigra* u morfološkim, biohemijskim i ekološkim karakteristikama došlo bez značajnih promena u veličini jedarnog genoma. Iako nisu utvrdili prisustvo konzistentnih razlika u veličini genoma između podvrsta, ukazali su klinalni način distribucije variranja što je u skladu sa hipotezom širenja crnog bora iz jugozapadne Azije prema evropskim staništima.

Tokom protekle dve decenije, sekvencioniranje jedarne DNK kod biljaka napredovalo je od studija pojedinačnih izolovanih gena do detaljnih studija većih hromozomskih regiona, uključujući i cele genome. Uprkos velikom ekološkom i ekonomskom značaju, sekvencioniranje kompletnog jedarnog genoma kao i razvoj odgovarajućih molekularnih markera kod roda *Pinus* dosta zaostaje za ostalim grupama

biljaka. Jedarne sekvence su, generalno, dosta korišćene u dosadašnjim filogenetskim istraživanjima. Na višim taksonomskim nivoima najviše su korišćeni rDNK geni zbog male brzine evolucije (Soltis et al., 1997; Kuzoff et al., 1998), dok su na nižim taksonomskim nivoima češće korišćeni interni i eksterni intergenski spejseri rDNK (Baldwin et al., 1995; Alvarez and Wendel 2003; Bailey et al., 2003).

U populaciono-genetičkim studijama borova diverzitet jedarnog genoma najviše je istraživao na nivou:

1. alozima: *Pinus nigra* (He = 0.180 – 0.257, Scaltsoyiannes et al., 1994; He = 0.03 – 0.28, He = 0.279 – 0.438, Tsaksira et al., 1998; He = 0.249, Scaltsoyiannes et al., 2009), *P. sylvestris* (He = 0.271, Wang et al., 1991; He = 0.26, Lewandowski et al., 2000; He = 0.244; Scaltsoyiannes et al., 2008; $Ho^2 = 0.310$ i 0.306 , He = 0.302 i 0.329 , Sannikov et al., 2011), *P. mugo* (He = 0.22, Lewandowski et al., 2000; $Ho = 0.160$ i He = 0.212, Slavov and Zhelev, 2004; $Ho = 0.187$ i 0.310 , He = 0.197 i 0.305 , Sannikov et al., 2011), *P. unicata* i *P. uliginosa* (He = 0.26 i 0.28, respektivno; Lewandowski et al., 2000), *P. pinaster* (He = 0.095, González Martínez et al., 2005), *P. strobus* ($Ho = 0.07$ i He = 0.08; Myers et al., 2007) itd.

2. mikrosatelita (nuSSRs): *Pinus strobus* ($Ho = 0.515$, Echt et al., 1996), *P. sylvestris* (He = 0.538 - 0.927, Soranzo et al., 1998), *P. radiata* (He = 0.73 - 0.94, Fisher et al., 1998), *P. taeda* ($Ho = 0.520$ i He = 0.679, Al-Rabab'ah and Williams, 2002), *P. pinaster* ($Ho = 0.608 - 0.792$ i He = 0.710 - 0.826, Derory et al., 2002; He = 0.403, Naydenov et al., 2014), *P. resinosa* ($Ho = 0.185$ i He = 0.508, Boys et al., 2005), *P. pinea* (He = 0.11, Pinzauti et al., 2012) itd.

1.6.2.2. Hloroplastni genom biljaka

Genom hloroplasta je, generalno, konzervativne prirode u pogledu veličine, strukture, sadržaja i redosleda gena kod kopnenih biljaka. Stabilna struktura hloroplastnog genoma tokom evolucione istorije pokazana je uporednim mapiranjem i sekvenciranjem cpDNK i do danas je publikovan veliki broj radova u kojima je potvrđena konzervativna priroda cpDNK molekula u pogledu sadržaja i redosleda gena, naročito kada je reč o blisko srodnim vrstama (Small et al., 2004). Kako se evoluciona

² prosečna dobijena heterozigotnost

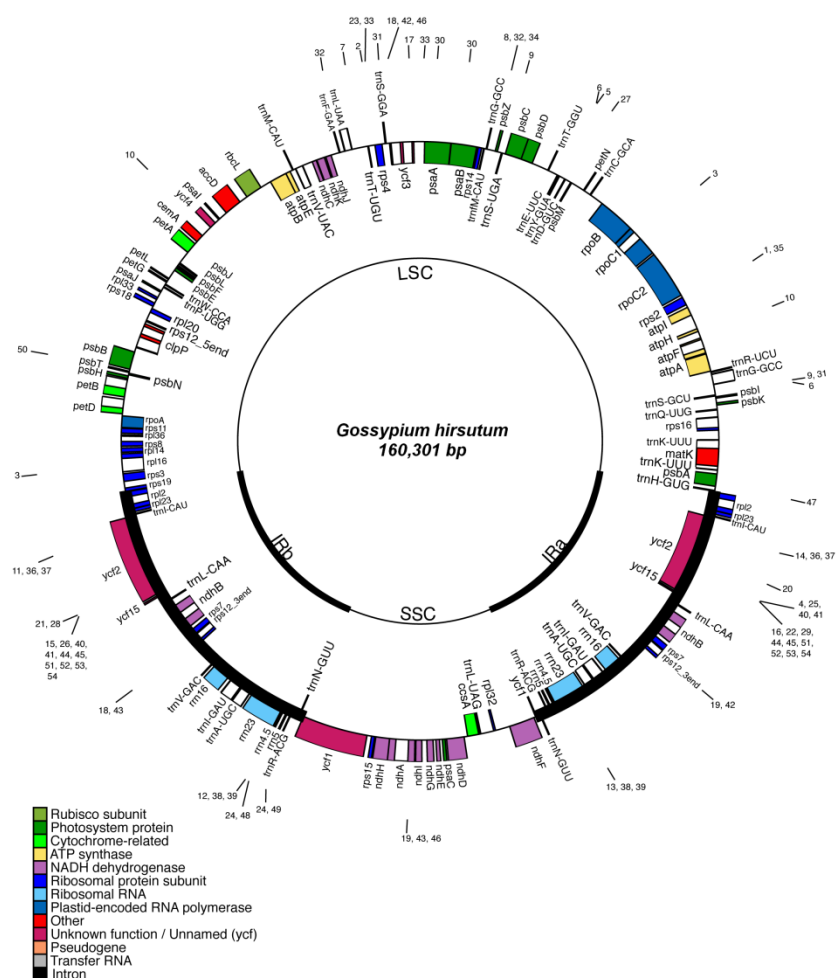
divergencija povećava, strukturne mutacije (inverzije, indeli, ekspanzija/redukcija invertovanih ponovaka) postaju sve izraženije, ali ukupni sadržaj i redosled gena ostaju i dalje isti.

Prve četiri vrste kopnenih biljaka kod kojih je izvršena kompletna identifikacija sekvenci hloroplastne DNK (cpDNK) su *Nicotiana tabacum* (Shinozaki et al., 1986), *Marchantia polymorpha* (Ohya et al., 1986), *Oryza sativa* (Hiratsuka et al., 1989) i *Epifagus viriginiana* (Wolfe et al., 1992), a do danas je hloroplastni genom determinisan kod više od 50 biljnih vrsta. Duvan, *Nicotiana tabacum*, poseduje tipičan hloroplastni genom za skrivenosemenice, sa ukupno 113 različitih gena, uključujući 4 rRNK gena, 30 tRNK gena i 79 gena koji kodiraju proteine. Promene u sadržaju i redosledu gena cpDNK su retke i obično nastaju usled inverzije dela genoma ili gubitka gena (Olmstead et al., 1994). Na primer, razlike u redosledu i sadržaju gena između *Marchantia* (nevaskularne kopnene biljke) i *Nicotiana* (skrivenosemenice) ogledaju se u jednoj 30-kbp inverziji i odsustvu pet gena (u jednom ili drugom genomu) koji kodiraju proteine i jednog tRNK gena (Wolfe and Sharp, 1988). Slično, razlike između cpDNK *Oryza* (monokotila) i *Nicotiana* (dikotila) ogledaju se u tri inverzije, odsustvu tri gena koji kodiraju proteine, nekoliko duplikacija gena i rearanžmana (Sugiura, 1989). Sve navedene razlike predstavljaju izvedene promene u hloroplastnom genomu *Oryza*.

U većini slučajeva, hloroplastni genom viših biljaka sadrži dva invertovana ponovljena segmenta (IRa i IRb), dužine oko 25 kbp, koji razdvajaju ostatak molekula na mali (SSC) i veliki (LSC) unikatni (single-copy) region (slika 1-18). Međutim, poznato je i nekoliko hloroplastnih genoma u kojima nedostaje jedan invertovani ponovak: grupa biljaka iz Fabaceae (Palmer and Thompson, 1982), neki četinari (Raubeson and Jansen, 1992) i parazitska biljka *Epifagus* (Orobanchaceae) u čijem je hloroplastnom genomu došlo do masivnih delecija, uključujući gubitak velikog broja gena (dePamphilis and Palmer, 1990). Veći hloroplastni genom (čak 217 kb) opisan je kod *Pelargonium* (Geraniaceae), pri čemu je do povećanja veličine genoma došlo usled širenja jednog invertovanog ponovka (Palmer et al., 1987).

Karakteristike hloroplastnog genoma, kao što su relativno stabilna strukutra, haploidna priroda, odsustvo rekombinacija i uniparentalno nasleđivanje, su doprinele velikoj primeni ovog genoma u različitim istraživanjima kod biljaka. Usled relativno

stabilne strukture i zanemarljivih promena u redosledu gena, moguće je dizajnirati tzv. "univerzalne" PCR prajmere koji se mogu koristiti za PCR amplifikaciju odabranih regiona kod velikog broja više ili manje srodnih biljnih vrsta. Takođe, zahvaljujući stabilnoj strukturi cpDNK možemo očekivati da su odabrane DNK sekvence koje se analiziraju kod većeg broja vrsta ortologne. Još jedna prednost korišćenja cpDNK proizilazi iz činjenice da je kod haploidnih genoma kraće vreme koalescencije i vreme potrebno za fiksiranje cpDNK haplotipova unutar populacije, s obzirom na manju efektivnu veličinu populacije haploidnih genoma u odnosu na diploidne genome (1/4 kod dvodomih i 1/2 kod jednodomih biljaka) (Small et al., 2004).



Slika 1-18. Genom hloroplasta kod *Gossypium hirsutum* (Lee et al., 2006)

Sa druge strane, uočeni su i određeni fenomeni koji mogu predstavljati prepreke za široko korišćenje cpDNK genoma u različitim istraživanjima. Naime, kod biljaka je uočena sklonost ka interspecijskoj hibridizaciji. Ukoliko se kod biljaka hibridnog ili poliploidnog porekla analizira samo cpDNK, koja je haploidna i uniparentalno se nasleđuje, identifikacija može biti pogrešna jer će ukazivati samo na jednog roditelja, bez pravilnog otkrivanja kompletne istorije hibrida. Veliki problem predstavlja i tzv. "curenje hloroplasta", kada se hloroplasti prenose u narednu generaciju i preko drugog roditelja, kao i heteroplazmija, kada u jednom organizmu postoje dva ili više tipova hloroplasta.

Do danas je cpDNK intenzivno korišćena u filogenetskim istraživanjima na različitim taksonomskim nivoima. Iako je genom hloroplasta, generalno, konzervativne prirode pokazano je da različiti regioni evoluiraju različitom brzinom (imaju različitu brzinu supstitucije nukleotida), što znači da se mogu koristiti za filogenetske analize na različitim taksonomskim nivoima. Kodirajući regioni, generalno, evoluiraju sporije u odnosu na nekodirajuće regione (introne i intergenske spejsere) cpDNK, što je u potpunosti i očekivano, s obzirom na ograničenja prirodne selekcije. Od svih hloroplastnih gena najviše pažnje je posvećeno uporednoj analizi *rbcL* gena za veliku subjedinicu fotosintetičkog enzima ribulozo-1,5-bifosfat karboksilaze/oksidaze (RUBISCO - glavni akceptor ugljen dioksida svih fotosintetički aktivnih eukariota i cianobakterija). *rbcL* je visoko konzervativan genetički marker podesan za upoređivanje filogenetski udaljenih grupa i sa najvećim uspehom je korišćen na nivou familija (Zurawski et al., 1984; Soltis et al., 1990; Wilson et al., 1990; Jansen et al., 1992; Bousquet et al., 1992a; Michaels et al., 1993; Morgan and Soltis, 1993) i višim taksonomskim nivoima (Bousquet et al., 1992b; Gaut et al., 1992). Ostali geni hloroplastnog genoma koji su često korišćeni u filogenetskim istraživanjima na višim taksonomskim nivoima su *rpoB*, *atpB*, *matK*, 16S rRNK, 23S rRNK, *psbA*, *rps2*, itd. (Marin, 2003).

Na specijskom nivou korišćene su, najčešće, nekodirajuće sekvence hloroplastnog genoma kao što su introni (npr. *trnL*, *trnK*, *rpL16*, *rpoC1*, *rpS16*) i intergenski spejseri (npr. *trnT-trnL*, *trnL-trnF*, *atpB-rbcL*, *psbA-trnH*). Kod četinara, *trnL* lokus se pokazao kao izuzetno dobar DNK identifikacioni marker: Ganopoulos i sar. (2013) su varijabilnost *trnL* regiona uspešno iskoristili za identifikaciju (*barcoding*)

osam vrsta mediteranskih borova (*P. brutia*, *P. eldarica*, *P. halepensis*, *P. heldreichii*, *P. nigra*, *P. peuce*, *P. pinea* i *P. sylvestris*). Međutim, na intraspecijskom nivou mala varijabilnost intergenskih spejsera utvrđena je kod *Abies alba* (*trnS-psbC* i *trnT-trnF*, Ziegenhagen et al., 1995), a potpuno odsustvo varijabilnosti kod *Pinus leucodermis* (*trnT-trnL* i *trnL-trnF*, Boscherini et al., 1994).

Najveći nivo polimorfizma cpDNK pokazale su analize hloroplastnih mikrosatelita (cpSSRs), usled visoke stope mutacija ovih regiona (detaljno u poglavlju 1.6.2.1.: "Mikrosateliti"). U većini populaciono-genetičkih studija borova korišćeni su cpSSRs koje su objavili Vendramin i sar. (1996): *P. nigra* ($He^3 = 0.939 - 1.00$, Afzal-Rafii and Dodd, 2007; $He = 0.951$, Jaramillo-Correa et al., 2010), *P. sylvestris* ($He = 0.977$, Robledo-Arnuncio et al., 2004; $He = 0.922$, Heuertz et al., 2009), *P. mugo sensu lato* ($He = 0.956$, Heuertz et al., 2009), *P. unicata* ($He = 0.97$, Dzialuk et al., 2009), *P. pinaster* ($Hs = 0.908$ i $Ht = 0.944$; Ribeiro et al., 2002; $He = 0.936$, Jaramillo-Correa et al., 2010), *P. cembra* ssp. *cembra* ($He = 0.917$, Höhn et al., 2005), *P. albicaulis* ($He = 0.907$, Richardson et al., 2002), *P. brutia*, *P. eldarica* i *P. halepensis* ($He = 0.297$, 0.272 i 0.222 , respektivno, Bucci et al., 1998; *P. halepensis* $He = 0.217$, Jaramillo-Correa et al., 2010) itd. Navedeni rezultati govore da borovi imaju izuzetno visok nivo genetičkog diverziteta u populacijama i vrstama u celini, i malu genetičku diferencijaciju populacija što se vidi iz izuzetno niskih vrednosti parametara genetičke diferencijacije dobijenih u gore navedenim studijama (koji se kreću u opsegu od $Gst = 0.036$ kod *P. nigra*, Jaramillo-Correa et al., 2010 do $Gst = 0.308$ kod *P. halepensis*, Bucci et al., 1998).

1.6.2.3. Mitohondrijalni genom biljaka

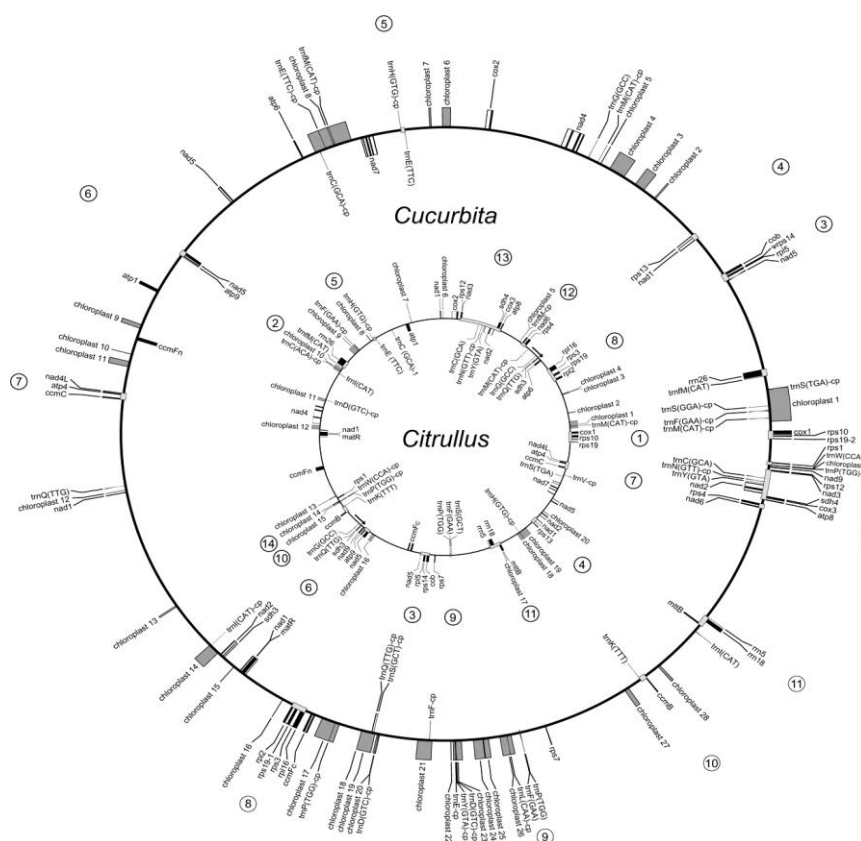
Najveće mitohondrijalne genome u živom svetu, dokumentovano do sada, poseduju kopnene biljke (200-2900 kbp). Na osnovu istraživanja mitohondrijalnog genoma biljaka i ostalih organizama, većina autora (Knoop, 2004; Gray et al., 2004; Terasawa et al., 2007 itd.) smatra da se i pored gubitka određenog broja gena nakon kolonizacije kopna mitohondrijalni genom biljaka uvećao tokom ovog evolucionog perioda. Prema tome, evolucioni trend mitohondrijalnog genoma biljaka je u potpunosti suprotan od mitohondrijalnog genoma sisara, koji je tokom evolucije postao manji i

³ prosečni diverzitet haplotipova

kompaktniji. Najbolji primer izuzetne varijabilnost veličine mtDNK genoma kod srodnih grupa biljaka nalazimo u okviru familije Cucurbitaceae kod koje se veličina mitohondrijalnog genoma kreće od 390 do 2900 kb (slika 1-19) (Alverson et al., 2010).

Tradicionalno shvatanje da mitohondrijalni (kao i hloroplastni) genom većine organizama, uključujući i biljke, ima cirkularnu formu bazira se na sledećim dokazima: 1) mitohondrije su nastale od prokariotskih predaka sa cirkularnim genomom (Gray et al., 1999), 2) mtDNK životinja je pronađena u cirkularnoj formi veličine genoma (Borst and Kroon, 1969) i 3) restrikciono mapiranje mtDNK kod većine organizama saglasno je sa cirkularnim genomom (Lonsdale, 1984). Neki organizmi zaista imaju cirkularni mitohondrijalni genom. Sa druge strane, linearna mtDNK je pronađena kod vrsta roda *Tetrahymena* (Suyamaand Miura, 1968), *Chlamydomonas reinhardtii* (Vahrenholz et al., 1993) i nekih vrsta kvasaca (Nosek et al., 1998). Kod kopnenih biljaka, uprkos tradicionalnom verovanju, pronađeno je veoma malo cirkularne mtDNK (Oldenburgand Bendich, 2001). Naime, većina mtDNK su pronađene kao linearni molekuli, manji ili veći od veličine genoma (Bendich et al., 1993). Jedini izuzetak je jetrenjača, *Marchantia polymorpha*, kod koje su dobijeni cirkularni molekuli veličine genoma (Oldenburgand Bendich, 1998). U većini slučajeva cirkularne forme čine veoma malu frakciju (<5%) ukupne mtDNK. Najveći deo čine genomski i multigenomski linearni molekuli i složene, razgranate strukture multigenomske veličine (Bendich et al., 1993).

Osim velike varijabilnosti mtDNK genoma viših biljaka u pogledu veličine, ovaj genom se karakteriše i velikom varijabilnošću u pogledu organizacije. Naime, insercije, delecije, intramolekulske rekombinacije i rearanžmani gena se toliko često dešavaju, da čak i jedinke iste vrste ili grupe srodnih vrsta nemaju isti redosled gena u mtDNK. Pored toga, mtDNK genom viših biljaka se odlikuje najnižom stopom evolucije primarne sekvence nukleotida koja je nekoliko puta niža od stope evolucije cpDNK genoma i oko 10-20 puta niža od stope evolucije jedarnog genoma (Wolfe et al., 1987). Međutim, kao i u slučaju cpDNK genoma, geni u mtDNK genomu sadrže introne i intergenske spejsere koji evoluiraju brže od kodirajućih mtDNK regiona i utvrđeno je da mtDNK može pokazivati ne samo interspecijsku već i intraspecijsku varijabilnost naročito na nivou nekodirajućih regiona.



Slika 1-19. Mitohondrijalni genom kod *Citrullus* (unutrašnji krug) i *Cucurbita* (spoljašnji krug), prikazani proporcijalno veličini genoma (Alverson et al., 2010)

U poređenju sa jedarnim i hloroplastnim genomom, mtDNK genom se najmanje koristi u različitim istraživanjima kod viših biljaka. Osnovni razlozi su navedena velika varijabilnost u pogledu veličine i organizacije samog genoma, česte insercije, delecije, rearanžmani gena i intramolekulske rekombinacije, heteroplazmija, kao i veoma niska stopa evolucije primarne sekvence nukleotida mtDNK. Ipak, tokom protekle decenije publikovan je značajan broj radova u kojima su mitohondrijalni markeri uspešno korišćeni kod četinara u rešavanju filogenetskih odnosa (Mitton et al., 2000; Gugerli et al., 2001b) kao i u cilju otkrivanju genetičke strukture prirodnih populacija (Sperison et al., 2001; Naydenov et al., 2007; Aleksić and Geburek, 2010; Jaramillo-Correa et al., 2010). Primena mtDNK genoma u filogeografskim istraživanjima, međutim, još uvek nije velika i pored toga što se, kao i hloroplastni genomi, haploidni mtDNK genomi biljaka nasleđuju uglavnom uniparentalno (Mogensen, 1996). Kao osnovni razlog za

malu primenu mtDNA genoma u filogeografskim istraživanjima kod biljaka je navođena izuzetno mala brzina evolucije mtDNK kod biljaka zbog čega se ranije smatralo da mtDNK nema dovoljnu rezoluciju za ovakva istraživanja od biljaka, što se kasnije pokazalo kao netačno (Jaramillo-Correa et al., 2010).

Veliki značaj za veću primenu varijabilnosti mtDNK genoma u različitim oblastima istraživanja kod viših biljaka ima sekvenciranje mtDNK genoma biljnih vrsta. S obzirom na početne tehničke teškoće u sekvencioniranju kompleksnih i složenih mtDNK molekula, kompletna nukleotidna sekvenca mitohondrijalnog genoma skrivenosemenica nije bila poznata do 1997. god., kada je "Brennick" grupa objavila 366.924 nukleotida vrste *Arabidopsis thaliana* (Unsold et al., 1997). Nakon toga, vrlo brzo su određene kompletne nukleotidne sekvence još 15 mitohondrijalnih genoma 7 vrsta skrivenosemenica (Kubo et al., 2000; Notsu et al., 2002; Handa, 2003; Satoh et al., 2004; Clifton et al., 2004; Sugiyama et al., 2005; Ogihara et al., 2005; Tian et al., 2006; Allen et al., 2007).

1.6.3. Molekularni markeri u populaciono-genetičkim i filogeografskim istraživanjima

U okviru populaciono-genetičkih i filogeografskih studija, u kojima se koristi alelni polimorfizam odabranih lokusa detektovan u populacijama jedne vrste u cilju rešavanja različitih pitanja, koriste se ne samo različiti pristupi i metode već i tipovi molekularnih markera. Naime, u populaciono-genetičkim istraživanjima, u kojima se analizira alelni polimorfizam jednog ili više lokusa kod većeg broja individua po populaciji (oko 30), potrebno je koristiti lokuse koji se odlikuju visokom stopom mutacija. To je zbog toga što samo visoko mutabilni lokusi koji imaju veliki broj alela po lokusu omogućavaju dovoljnu rezoluciju za izvođenje zaključaka o nivou genetičkog diverziteta u populacijama i vrsti kao celini kao i o genetičkoj diferencijaciji populacija. Lokusi koji nisu varijabilni ili imaju mali broj alela na nivou vrste mogu navesti na zaključak da se ispitivana vrsta odlikuje niskim nivoom genetičkog diverziteta i da ne pokazuje genetičku diferencijaciju populacija. Međutim, primena alternativnih lokusa koji se odlikuju višom stopom mutacija može pokazati da se data vrsta zapravo odlikuje visokim genetičkim diverzitetom i diferenciranim populacijama. Sa druge strane, mali

broj alela na odabranim visoko mutabilnim lokusima u populacijama jedne vrste nesporno ukazuje na genetičku monomorfnost i odsustvo genetičke diferencijacije između populacija.

Tokom proteklih nekoliko decenija razvijen je veliki broj molekularnih markera koji pokazuju relativno visok stepen intraspecijskog polimorfizma koji je pogodan za populaciono-genetička istraživanja.

Na nivou jedarnog genoma, najčešće korišćeni markeri su RFLP_s (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD_s (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP_s (Amplified Fragment Length Polymorphism), TRAP_s (Target Region Amplification Polymorphism), STS_s (Sequence Tagged Site), itd.. Međutim, najčešći tip molekularnih markera koji se tokom poslednje decenije široko primenjuje u populaciono-genetičkim istraživanjima ne samo kod životinja nego i kod biljaka su mikrosateliti. Oni se odlikuju nizom svojstava, kao što je hipervarijabilnost, kodominantna priroda, specifičnost, jednostavna primena, itd. (detaljnje objašnjeno u poglavlju 1.6.3.1.: "Mikrosateliti"), koji su doveli do njihove veoma velike primene u istraživanjima kod različitih organizama.

U populacionoj genetici se dosta koriste sekvence odabranih regiona hloroplastnih i mitohondrijalnih genoma. One se odlikuju nižom stopom mutacija u odnosu na mikrosatelite, ali predstavljaju veoma moćno oruđe za detekciju diferencijacije populacija s obzirom da su haploidni genomi osetljiviji na efekte genetičkog drifta u poređenju sa jedarnim genomom. Osnovni razlog je manja efektivna veličina populacije haploidnih genoma organela u odnosu na markere jedarnog genoma (McCauley, 1994). Kod biljaka sa dvopolnim cvetovima, hloroplasti i mitohondrije se najčešće prenose zajedno preko gameta istog pola tj. preko semena kod većine skrivenosemenica (Mogensen, 1996; Dumolin-Lapègue et al., 1999) odnosno polena kod nekih golosemenica (Taxodiaceae, Cupressaceae i Cephalotaxaceae, Chesnoy, 1987). Međutim, poznati su i primeri biljaka koje odlikuje alternativni vid nasleđivanja ove dve organele. Na primer, kod predstavnika familije Pinaceae, kao i kivija (*Actinidia*, Actinidiaceae), hloroplasti se nasleđuju paternalno, a mitohondrije maternalno (Wagner et al., 1987), dok je situacija obrnuta kod banane (*Musa acuminata*, Musaceae) i roda *Cucumis* (Cucurbitaceae) (Havey et al. 1998). Ovakvi primeri diferencijalnog

nasleđivanja haploidnih genoma pružaju mogućnost za uporednu analizu uticaja protoka gena posredstvom semena i polena na nivou genetičke strukture, što podseća (mada nije u potpunosti uporedivo) na studije mitohondrijalnog genoma i Y hromozoma kod životinja. S obzirom na suprotan način nasleđivanja haploidnih genoma kod Pinaceae i činjenicu da, na primer kod smrča (*Picea*), rasejavanje semena, a samim tim i mitohondrijalnog genoma, može biti i do 70 puta manje od rasejavanja polena i hloroplastnog genoma (Ennos, 1994; Gamache et al., 2003), veću genetičku diferencijaciju populacija možemo očekivati na nivou mitohondrijalnog u odnosu na hloroplastni genom. Takođe, s obzirom da se brzina evolucije primarne nukleotidne sekvence hloroplastne DNK (cpDNK) i mitohondrijalne DNK (mtDNK) razlikuje (genaralno je veoma mala u oba slučaja, ali mtDNK evoluirala tri do četiri puta sporije od cpDNK, Laroche et al., 1997), verovatno će se razlikovati i nivoi diverziteta koji se mogu očekivati na osnovu istraživanja oba genoma (Burban and Petit, 2003). Pored toga, kod kompleksa pet vrsta roda *Picea* pokazano je da su hloroplastni markeri u velikoj meri specifični za svaku od ispitivanih vrsta te se u određenoj meri mogu smatrati informativnim za utvrđivanje genetičkih granica između vrsta dok su mitohondrijalni markeri pokazivali geografsku diferencijaciju zbog toga što su identični mitohondrijalni tipovi uočeni kod geografski bliskih vrsta (Du et al., 2009).

Najveće probleme kod primene haploidnih genoma u različitim istraživanjima predstavljaju: a) rearanžmani gena, duplikacije i delecije regiona, b) alternativne strukture molekula i intramolekulske rekombinacije između direktnih i invertovanih regiona – naročito česte kod mitohondrijalnog genoma, c) heteroplazmija, d) drugi fenomeni kao što su tzv. "curenje hloroplasta i mitohondrija" i introgresija hloroplasta i mitohondrija drugih vrsta (horizontalni transfer).

Sa druge strane, u filogeografskim studijama, u kojima se analizira manji broj individua po populaciji (oko 10), hipervarijabilni lokusi sa izuzetno velikim brojem alela su od male koristi jer je teško utvrditi korektne genealoške odnose između alela te je stoga pojava retikulacija u haplotip stablima vrlo verovatna. U filogeografskim studijama se koriste lokusi koji imaju manju stopu mutacija u odnosu na mikrosatelite, i na kojima se stoga detektuje manji broj alela po lokusu. Iako se u filogeografskim studijama mogu koristiti regioni sva tri biljna genoma, nekodirajući regioni hloroplastnog i mitohondrijalnog regiona koji se nasleđuju materinski su se pokazali

kao izuzetno pogodni regioni za filogeografske studije kod velikog broja biljnih vrsta. S obzirom da se kod *Pinus*-a cpDNK nasleđuje preko oca a mtDNK preko majke, mtDNK genom je idealan za filogeografske studije kod crnog bora.

1.6.3.1. Mikrosateliti

Molekularni markeri poznati kao mikrosateliti se često označavaju i kao kratki tandemski ponovci (Short Tandem Repeats - STRs), jednostavne ponavljajuće sekvence (Simple Sequence Repeats – SSRs) ili varijabilni u broju tandemski ponovci (Variable Number Tandem Repeats, VNTR). Mikrosateliti se sastoje od tzv. repetitivnog motiva kojeg čini jedan do šest nukleotida i koji se ponavlja uzastopno određen broj puta, i tzv. bočnih (*flanking*) regiona koji su vrlo konzervativni i retko podležu mutacijama (Beckmann and Soller, 1990). Tako, na primer, mikrosatelit koji ima motiv od jednog nukleotida (T) koji se ponavlja deset puta ima nukleotidni niz TTTTTTTTTT i predstavlja se kao (T)₁₀ a mikrosatelit koji ima motiv od tri nukleotida (CGT) koje se ponavljaju šest puta ima nukleotidni niz CGTCGTCGTCGTCGTCGT i predstavlja se kao (CGT)₆. Stoga se na osnovu broja nukleotida u repetitivnom motivu mikrosateliti mogu podeliti na mono-, di-, tri-, tetra-, penta- i heksanukleotidne mikrosatelite, a prema konstituciji repetitivnog motiva na tri tipa: perfektni ili čisti (AT)₁₀, prekinuti (AT)₁₀CTGT(AT)₁₅, kod kojih je repetitivni motiv prekinut insercijom od nekoliko nukleotida, i kombinovani (AT)₁₀(GTT)₁₅, kod kojih postoje dva različita repetitivna motiva koji nezavisno mutiraju. Tandemski ponovci koji imaju repetitivne motive sa većim brojem nukleotida (oko 15) su minisateliti a u slučaju kada su motivi jako dugački, radi se o satelitskoj DNK.

Mikrosateliti se, najčešće, nalaze u nekodirajućim regionima genoma (intergenskim sekvencama i intronima), ali su ponekad prisutni i u kodirajućim sekvencama DNK. U genomu čoveka 90% poznatih mikrosatelita se nalazi u nekodirajućim regionima (Pržulj and Petrović, 2005). Najčešće korišćeni mikrosateliti su upravo oni koji se nalaze u nekodirajućim regionima. Oni se nazivaju genomski mikrosateliti (gSSR) i smatra se da nisu pod uticajem selekcije, odnosno, da njihova frekvencija i distribucija reflektuju isključivo mutacione procese. Međutim, mikrosateliti se mogu nalaziti i u kodirajućim regionima. U kodirajućoj DNK, selekcija protiv frejmšift mutacija onemogućava ekspanziju svega osim trinukleotidnih ponovaka,

pri čemu i za njih postoje dalja ograničenja dužine u zavisnosti od funkcije proteina. Trinukleotidni ponovci koji su povezani sa humanim bolestima predstavljaju posebnu klasu mikrosatelita u kodirajućoj DNK (Ellegren, 2004). Pored toga, postoje i tzv. *Expressed Sequence Tagged* ili EST-mikrosateliti koji se nalaze u delu genoma koji se transkribuje ali ne podleže translaciji (tzv. UTR regioni, i to 5'-UTR i 3'-UTR). Smatra se da su genomski mikrosateliti više polimorfni ali poseduju veći broj nultih alela, dok su EST-mikrosateliti manje polimorfni ali imaju manje nultih alela i pokazuju visok stepen transferabilnosti između srodnih vrsta. Nulti aleli se javljaju u slučaju kada ne dolazi do amplifikacije određenog mikrosatelita iz različitih razloga, kao što su delecija regiona koji sadrži dati mikrosatelit, mutacije u mestu vezivanja prajmera, itd., i mogu predstavljati problem kod primene mikrosatelita u različitim istraživanjima (Brookfield 1996; Ellegren 2004; Varshney et al. 2005; Selkoe and Toonen 2006).

Mikrosateliti su visoko polimorfni markeri, a polimorfnost je posledica variranja broja ponovaka. U populaciji jedne biljne vrste može da postoji veliki broj alela na nekom lokusu koji imaju isti ponovak, ali se razlikuju u dužini, odnosno broju ponovaka. Upravo je broj ponovaka motiva na nekom mikrosatelitnom lokusu informativan i frekvencija i distribucija alela sa određenim brojem ponovaka repetitivnog motiva se koristi za izvođenje zaključaka o nivoima genetičkog diverziteta i genetičkoj diferencijaciji populacija. Što je varijabilniji broj ponovaka kod nekog mikrosatelita, to će mikrosatelit imati veći broj alela (genetičkih varijanti) različite dužine i biće polimorfniji tj. informativniji. Broj ponovaka motiva na jednom mikrosatelitnom lokusu se obično kreće u opsegu od 5 do 40, ali u nekim slučajevima može biti i preko 180 (kod laste, Primmer et al., 1998). Kod organizama koji su homozigotni za neki mikrosatelitni lokus nalazi se isti broj ponovaka na oba hromozoma kod diploidnih organizama, dok heterozigoti imaju različit broj ponovaka na hromozomima. S obzirom da omogućavaju razlikovanje homo- i heterozigotnih jedinki, mikrosateliti spadaju u kodominantne molekularne markere.

Visoka varijabilnost SSR lokusa je posledica visoke stope mutacija ovih lokusa koja dovodi do nastanka velikog broja alela po lokusu koji sadrže različit broj ponovaka repetitivnog motiva. Stopa mutacije mikrosatelita se kreće u opsegu od 10^{-2} do 10^{-4} po lokusu po generaciji (Schlötterer, 2004). Postavljene su dve hipoteze koje objašnjavaju na koji način dolazi do generisanja alela sa različitim brojem ponovaka na

mikrosatelitnim lokusima. To su: 1) proklizavanje tokom replikacije DNK (*strand-slippage replication*) i 2) nejednak crossing-over tokom mejoze (Li et al., 2002). Smatra se da prvi tip mutacija nastaje tokom replikacije DNK, kada polimeraza izostavlja, tj. ne replicira sve ponovke ili replicira neke ponovke više puta, pa kao rezultat nastaje novi lanac DNK koji ima veći ili manji broj ponovaka repetitivnog motiva u odnosu na roditeljski lanac. Drastičnije promene u broju ponovaka mikrosatelita su posledica nejednakog crossing-overa, u kojem jedan hromozom dobija veći broj ponovaka, a drugi manji broj ponovaka. Navedene mutacije koje dovode do promena u broju ponovaka su uglavnom neutralne i nemaju fenotipsku ekspresiju. Međutim, kada se mutacije u broju ponovaka dešavaju kod mikrosatelita koji se nalaze u kodirajućim regionima DNK, može doći do pojave određenih bolesti (Pržulj and Petrović, 2005).

Određivanje stope mutacija na SSR lokusima je od ogromnog značaja, s obzirom da od brzine mutacionih procesa direktno zavisi nivo intra- i interpopulacione varijabilnosti. Kao najvažniji faktor koji utiče na stopu mutacija, Ellegren (2004) navodi dužinu mikrosatelita – stopa mutacija se povećava sa povećanjem broja tandemskih ponovaka. Što je veći broj ponovaka postoji i više mogućnosti za proklizavanje DNK polimeraze. Pozitivna korelacija između veličine alela i stope mutacija SSRs pokazana je kod mnogih organizama (Brinkmann et al., 1998; Primmer et al., 1998; Harr and Schlötterer, 2000; Brohede et al., 2002, prema Ellegren, 2004). U tabeli 1-10 sumirane su publikovane vrednosti za stope mutacija u jedarnom genomu i genomima organela biljaka i životinja. Manju brzinu supstitucije nukleotida cpDNK u poredjenju sa jedarnim genomom objavili su Wolfe i sar. (1987), dok su Provan i sar. (1999) pokazali da se mutacioni procesi na SSR lokusima u hloroplastnom genomu dešavaju ređe nego u jedarnom (tabela 1-9).

Do danas je predložen veliki broj modela evolucije mikrosatelita koji objašnjavaju kako se povećava i smanjuje broj ponovaka na mikrosatelitnim lokusima, a tri najšire prihvaćena su:

a) *Infinite Allele Model* (IAM) - od alela sa određenim brojem ponovaka može nastati alel sa bilo kojim brojem ponovaka

b) *Stepwise Mutation Model* (SMM) - od alela sa određenim brojem ponovaka može nastati samo alel koji sadrži +/- 1 broj ponovaka

c) *Two-Phase Mutation Model* (TPM) - novi aleli nastaju uglavnom putem SMM, ali mogu povremeno nastati i putem IAM; ovaj model najrealnije prikazuje evoluciju mikrosatelita.

Tabela 1-9. Stope mutacija u jedarnom genomu i genomima organela biljaka i životinja (Provan et al., 1999).

Carstvo	Genom	Tip mutacija	Stopa mutacija	Referenca
Animalia	Jedro	Supstitucija	$9 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-8}$	Wolfe i sar. (1987)
		SSR polimorfizam	$10^{-5} - 10^{-2}$	Jarne i Lagoda (1996)
			1×10^{-3}	Wiessenbach i sar. (1992)
			6×10^{-4}	Weber i Wong (1993)
	Mitohondrija	Supstitucija	$2 \times 10^{-8} - 5 \times 10^{-8}$	Wolfe i sar. (1987)
Plantae	Jedro	Supstitucija	$3 \times 10^{-9} - 5 \times 10^{-8}$	Wolfe i sar. (1987)
	Mitohondrija	Supstitucija	$2 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-9}$	Wolfe i sar. (1987)
	Hloroplast	Supstitucija	$1 \times 10^{-9} - 3 \times 10^{-9}$	Wolfe i sar. (1987)
		SSR polimorfizam	$3.2 - 7.9 \times 10^{-5}$	Provan i sar. (1999)

Mikrosateliti su prisutni u sva tri biljna genoma. Jedarni mikrosateliti su prvo otkriveni kod sisara, a njihovo prisustvo kod biljaka su prvi publikovali Condit i Hubbel 1991. god. Narednih godina utvrđeno je da se mikrosateliti nalaze u velikoj frekvenciji pored genoma životinja i u genomu biljaka (Jarne and Lagoda, 1996). Iako su mikrosateliti univerzalni elementi genoma eukariota, postoje značajne razlike u frekvenciji motiva mikrosatelitnih sekvenci između biljaka i kičmenjaka: procenjuje se da humani genom sadrži u proseku 10 puta više mikrosatelita nego biljni jedarni genomi (Powell et al., 1996). Kod biljaka, najčešći su jedarni mikrosateliti sa dinukleotidnim motivom (AT)_n i (AG)_n, dok su kod životinja najčešći mikrosateliti sa dinukleotidnim motivom (AC)_n. Takođe, kod životinja je gustina mikrosatelita pozitivno korelisana sa veličinom genoma i najveća je u genomu sisara. Međutim, kod biljaka postoji negativna korelacija između gustine jedarnih mikrosatelita i veličine genoma. Ovo se objašnjava činjenicom da su mikrosateliti slabije zastupljeni u repetitivnim delovima koji su uključeni u ekspanziju biljnog jedarnog genoma, kao što su LTR retrotranspozoni (Ellegren, 2004). U hloroplastnom i mitohondrijalnom genomu biljaka preovlađuju mikrosateliti sa mononukleotidnim motivom.

S obzirom na univerzalnu prisutnost u genomima eukariota, hipervarijabilnost, kodominantnu prirodu i jednostavnu primenu, mikrosateliti su postali najčešće korišćeni molekularni markeri u populaciono-genetičkim istraživanjima biljaka i životinja. Međutim, njihova primena u filogenetskim istraživanjima je vrlo ograničena zbog potencijalne homoplazije, odnosno, mogućnosti postojanja alela sa identičnim brojem ponovaka repetitivnog motiva koji nisu identični po poreklu (Robinson and Harris, 1999; Schlötterer, 2004). Homoplazija predstavlja prepreku i kod korišćenja mikrosatelita u filogeografskim studijama.

Iako se jedarni genomski i EST-mikrosateliti dosta koriste u populaciono-genetičkim istraživanjima kod četinara (npr. *Pinus strobus*, Echt et al., 1996; *P. radiata*, Fisher et al., 1998; *P. sylvestris*, Soranzo et al., 1998; *P. taeda*, Al-Rabab'ah and Williams, 2002; *P. pinaster*, Derory et al., 2002, Naydenov et al., 2014; *P. resinosa*, Boys et al., 2005; *P. pinea*, Pinzauti et al., 2012; *Picea glauca*, Rajora et al., 2001; *P. abies*, Tollefsrud et al., 2009; *P. jezoensis*, Aizawa et al., 2009; *Juniperus excelsa*, Douaihy et al., 2011; *J. oxycedrus* ssp. *oxycedrus*, *J. oxycedrus* ssp. *badia*, *J. brevifolia*, *J. cedrus*, *J. deltoides*, *J. macrocarpa*, *J. navicularis*, Boratyński et al., 2014; *Thuja occidentalis*, Pandey and Rajora, 2012; *Taxus baccata*, González-Martínez et al., 2010; *T. contorta*, Poudel et al., 2014 itd.), ovi molekularni markeri do danas nisu razvijeni za *P. nigra* niti primenjivani kod ove vrste. Sa druge strane, hloroplastni mikrosateliti, koji se mogu PCR amplifikovati primenom tzv. univerzalnih prajmera kod velikog broja biljnih vrsta, su do danas primenjivani kod mnogih predstavnika roda *Pinus* (*P. sylvestris*, Robledo-Arnuncio et al. 2004, Heuertz et al., 2009, Soto et al., 2010; *P. mugo* sensu lato, Heuertz et al., 2009; *P. pinaster*, Ribeiro et al., 2002, Jaramillo-Correa et al., 2010, Soto et al., 2010; *P. unicata*, Dzialuk et al., 2009; Soto et al., 2010; *P. pinea*, Soto et al., 2010; *P. halepensis*, Bucci et al., 1998, Jaramillo-Correa et al., 2010, Soto et al., 2010; *P. cembra* ssp. *cembra*, Höhn et al., 2005; *P. cembra*, *P. sibirica*, *P. pumila*; Gugerli et al., 2001c; *P. albicaulis*, Richardson et al., 2002; *P. brutia*, *P. eldarica*, Bucci et al., 1998; *P. contorta*, Marshall et al., 2002) uključujući i *P. nigra* (Naydenov et al., 2006; Afzal-Rafii and Dodd, 2007; Jaramillo-Correa et al., 2010; Soto et al., 2010).

2. CILJEVI RADA

Crni bor je vrsta širokog i vrlo isprekidanog areala. Reč je o kolektivnoj vrsti (agregatu) čiji su taksoni prilagođeni različitim staništima. Različite geografske grupe su izolovane jedne od drugih prirodnim barijerama, nastalim kroz geološke pokrete, suprotstavljene različitim klimatskim i edafskim faktorima, kao i delovanju čoveka. Izražena varijabilnost u morfološko-anatomskim karakteristikama, ali i činjenica da su geografske grupe prostorno inter-fertilne, opteretile su sistematiku ove vrste mnogobrojnim klasifikacijama baziranim uglavnom na sintezi fitocenoloških, fitogeografskih i morfološko-anatomskih istraživanja, koja su brojna. Prostor Srbije geografski pripada istočnom delu areala crnog bora, koji je sa biohemijskog i genetičkog aspekta nedovoljno istražen.

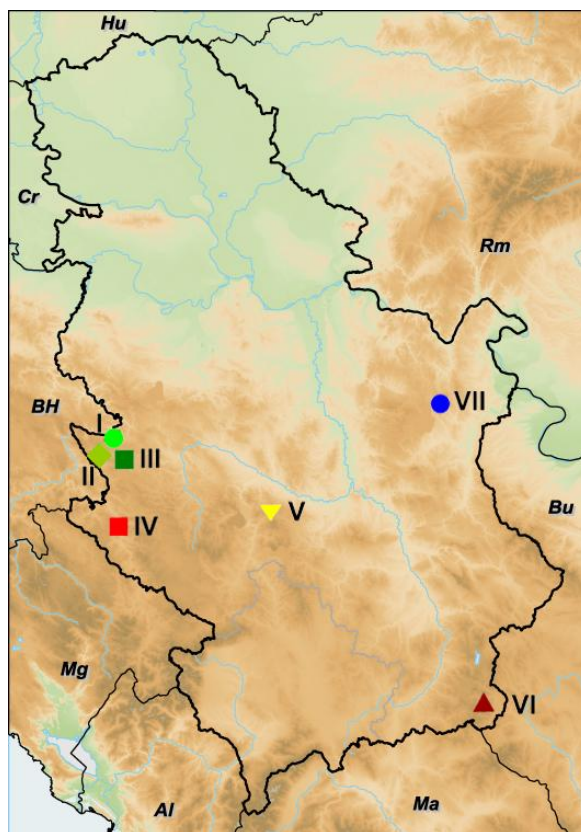
Osnovni naučni ciljevi ovog istraživanja se mogu predstaviti u nekoliko teza:

1. Upoznavanje sastava, sadržaja i varijabilnosti *n*-alkana u kutikularnim voskovima četina *Pinus nigra*
2. Upoznavanje sastava, sadržaja i varijabilnosti terpena u četinama *P. nigra*
3. Utvrđivanje hemotaksonomskog značaja *n*-alkana i terpena
4. Utvrđivanje genetičkog diverziteta i genetičke diferencijacije populacija *P. nigra* u Srbiji na nivou diploidnog jedarnog genoma i haploidinih genoma (hloroplastnog i mitohondrijalnog), koji se odlikuju alternativnim vidovima nasleđivanja i disperzije.
5. Utvrđivanje da li i u kojoj meri postoji podudarnost između fitohemijske i genetičke diferencijacije populacija *P. nigra* u Srbiji
6. Utvrđivanje potencijalne filogeografske strukture *P. nigra*

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Istraživane populacije crnog bora

Pri odabiru populacija crnog bora vodili smo računa da budu obuhvaćeni svi infraspecijski taksoni koji su zastupljeni na teritoriji SR Srbije. Takođe, težilo se da populacije u okviru istog infraspecijskog taksona budu sa što raznovrsnijih staništa. Prilikom odabira pojedinačnih stabala, nismo se rukovali superiornim proizvodnim ili morfološkim karakteristikama (npr. visinski i debljinski prirast, dužina četina i šišarica, oblik krune), već smo težili prostornom pokrivanju celokupne populacije, odabirajući stabla na što većoj horizontalnoj i vertikalnoj razdaljini, u zavisnosti od veličine odabrane populacije. Odabirom populacija crnog bora, sprovedenim u avgustu 2009. godine, obuhvaćeno je 7 populacija na teritoriji Srbije: I - Banjska stena, II - Omar, III - Zmajevački potok (*P. nigra* subsp. *nigra*), IV - Priboj–Crni vrh, V - Goč-Gvozdac (*P. nigra* var. *gocensis*), VI - Jarešnik (*P. nigra* subsp. *pallasiana*) i VII - Lazareva reka (*P. nigra* var. *banatica*). U svim populacijama izdvojeno je po 30 stabala, osim u populaciji u kanjonu Lazareve reke, koja je prema broju jedinki i površini izuzetno mala, pa je odabrano svega 15 stabala.



Slika 3-1. Geografski položaj odabranih populacija *Pinis nigra* u Srbiji: populacija I: ● (Banjska stena), populacija II: ◆ (Omar), populacija III: ■ (Zmajevački potok), populacija IV: ■ (Priboj–Crni vrh), populacija V: ▼ (Goč-Gvozdac), populacija VI: ▲ (Jarešnik) i populacija VII: ● (Lazareva reka)

Najvažnije stanišne karakteristike odabranih lokaliteta crnog bora dobijene su na osnovu terenskih istraživanja (određivanje nadmorske visine i koordinata GPS tehnologijom i Google Earth), kartografske i ostale dokumentacije iz Nacionalnog parka

Tara i JP Srbijašume kao i na osnovu literaturnih podataka o vrsti (tabela 3-1.). Prostorni raspored odabranih populacija prikazan je na slici 3-1.

3.1.1. Uzorkovanje i skladištenje četina

U svakoj od odabranih populacija crnog bora, u toku avgusta 2009. godine, izvršeno je sakupljanje grančica sa dvogodišnjim četinama sa 30 odraslih stabala, osim u populaciji u kanjonu Lazareve reke koju reprezentuje samo 15 stabala. Grančice su brane po celokupnom obimu donje trećine krune. Uzorci svakog pojedinačnog stabla stavljeni su u zasebnu polietilensku kesu, zajedno sa oznakom lokaliteta, datumom sakupljanja i rednim brojem stabla, kako ne bi došlo do mešanja uzoraka.

U ručnom frižideru ili u specijalnim kesama sa ledom uzorci su sa mesta sakupljanja prenošeni do zamrzivača (- 20°C) na skladištenje do momenta upotrebe.

Tabela 3-1. Geografski položaj i stanišne karakteristike odabranih populacija *Pinus nigra*.

Takson	subsp. <i>nigra</i>			var. <i>gocensis</i>		subsp. <i>pallasiana</i>	var. <i>banatica</i>
Lokalitet	Banjska stena	Omar	Zmajevački potok	Priboj-Crvi vrh	Goč-Gvozdac	Jarešnik	Lazareva reka
Populacija	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>VI</i>	<i>VII</i>
Broj analiziranih jedinki (n)	30	30	30	30	30	30	15
Geografska širina (N)	43°57'04"	43°54'02"	43°51'45"	43°34'56"	43°33'32"	42°22'32"	44°01'02"
Geografska dužina (E)	19°24'04"	19°23'18"	19°25'05"	19°35'06"	20°40'56"	22°24'10"	21°55'39"
Nadmorska visina [m]	1040	950	830	1100	790	1300	750
Ekspozicija	NW	SW	W	N, NW	S, SW	S, SW	N, NW
Nagib terenana [°]	<20°-80°	40°	30°	<40°	<30°	<30°	20°-90°
Geološka podloga	krečnjaci	krečnjaci	serpentiniti	serpentiniti	serpentiniti	kristalasti škriljci	krečnjaci

3.2. Hemijske analize

3.2.1. Isptivanje alkana

Ekstrakcija i izolacija kutikularnih voskova iz četina crnog bora urađena je u Laboratoriji za biohemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu. Analiza sadržaja alkana izvršena je u Laboratoriji za instrumentalnu analizu pri Katedri za organsku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Ekstrakcija i izolacija kutikularnih voskova. Kutikularni voskovi ekstrahovani su potapanjem 5 g iglica u 10 ml n-heksana u trajanju od 60 sekundi. Nakon toga ekstrakti su filtrirani i upareni do suvog stanja. Koncentrovani ekstrakti su frakcionisani na mini koloni korišćenjem Paster pipete napunjene florisilom (60–100 mesh). Voskovi su dobijeni eluiranjem sa 5 ml n-heksana, nakon čega su upareni do suvog, ponovo rastvoreni u 1.2 ml n-heksana i čuvani na -20°C do dalje analize. Ekstrakcija voskova izvršena je posebno za svako stablo (195 uzoraka).

GC-FID i GC-MS analiza kutikularnih voskova. Analitički sistem koji je korišćen za GC-FID i GC-MS analizu je gasni hromatograf Agilent 7890A sa 5975C XL EI/CI MS detektorom i plamenim jonizacionim detektorom (FID), opremljen split/splitless injektorom. Razdvajanje je vršeno na kapilarnoj koloni HP-5 MS (30 m x 0.25 mm, debljina filma 0.25 µm). Temperatura kolone je bila linearno programirana u rasponu 60-300°C, sa povećanjem od 3°C/min. Protok nosećeg gasa, helijuma (He), bio je 1 ml/min pri pritisku od 16.255 psi (konstantan pritisak). Korišćen je auto-injektor (Agilent 7683B Series Injector) za injektovanje 1 µL uzorka. Uzorak je analiziran u splitless modu. Temperatura injektora je bila 250°C, detektora 300°C, izvora 230°C, a kvadrupola 150°C. Maseni spektri (EI-MS, 70 eV) su snimani u opsegu m/z 30-550.

Identifikacija komponenti. Identifikacija komponenti je vršena poređenjem njihovih masenih spektara sa spektrima iz baze (NIST, version 2005; Wiley, version 1996). Retencioni indeksi (RI) su određeni u relaciji sa serijom *n*-alkana (C8-C20, Supelco, United Kingdom).

Izračunavanje CPI i ACL vrednosti. Ugljenični preferencijalni indeks (CPI - "carbon preference index") za ukupne parne i neparne LNAs ("long-chain *n*-alkanes")

(CPI_{total}) je izračunat korišćenjem formule koju navode Mazurek i Simoneit (1997). Srednja vrednost dužine ugljovodoničnog niza (ACL - "average chain length") za ukupne parne i neparne LNAs (ACL_{total}) je izračunata korišćenjem formule Poynter-a i Eglington-a (1990). Da bi uporedili dobijene rezultate sa postojećim literaturnim podacima, CPI₂₅₋₃₃, CPI₂₀₋₃₆, CPI₁₅₋₂₁ i CPI₂₅₋₃₁ su izračunati prema formuli koju navode Bray i Evans (1961), a ACL₂₃₋₃₅ prema formuli koju navode Poynter i Eglington (1990). Relativni odnosi *n*-alkana kratkog, srednjeg i dugog niza su izračunati prema Kuhn-u i sar. (2010).

3.2.2. Isptivanje terpena

Ekstrakcija i izolacija etarskog ulja iz četina crnog bora urađena je u Laboratoriji za biohemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu. Analiza sadržaja terpena izvršena je u Laboratoriji za instrumentalnu analizu pri Katedri za organsku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Izolacija etarskih ulja. Etarsko ulje iz četina dobijeno je postupkom ekstrakcije u *n*-pentanu (5 g četina usitnjeno je na dužinu od 2–3 mm i uronjeno je u 5 ml pentana, tokom 24 h, u zatvorenim epruvetama, na temperaturi od 4-6°C, nakon čega je ekstrakt filtriran). Ekstarkcija ulja izvršena je posebno za svako stablo (195 uzoraka).

GC-FID i GC-MS analiza etarskih ulja. Analitički sistem koji je korišćen za GC-FID i GC-MS analizu je gasni hromatograf Agilent 7890A sa 5975C XL EI/CI MS detektorom i plamenim jonizacionim detektorom (FID), opremljen split/splitless injektorom. Razdvajanje je vršeno na kapilarnoj koloni HP-5 MS (30 m x 0.25 mm, debljina filma 0.25 µm). Temperatura kolone je bila linearno programirana u rasponu 60-300°C, sa povećanjem od 3°C/min. Protok nosećeg gasa, helijuma (He), bio je 1 ml/min pri pritisku od 16.255 psi (konstantan pritisak). Korišćen je auto-injektor (Agilent 7683B Series Injector) za injektovanje 1 µL uzorka. Uzorak je analiziran u split modu (odnos 300:1). Temperatura injektora je bila 250°C, detektora 300°C, izvora 230°C, a kvadrupola 150°C. Maseni spektri (EI-MS, 70 eV) su snimani u opsegu *m/z* 40-550.

Identifikacija komponenti. Identifikacija komponenti je vršena poređenjem njihovih masenih spektara sa spektrima iz baze (NIST, version 2005; Wiley, version 1996) kao i na osnovu metode zaključavanja retencionog vremena (retention time locking, RTL) i RTL Adams biblioteke.

3.3. Statistička analiza

Statistička analiza podataka uključila je skup od više hiljada numeričkih podataka. Za svako svojstvo date populacije provereni su osnovni statistički parametri: srednja vrednost ($\bar{X}$), srednja greška srednje vrednosti (S_x) i standardna devijacija (S). Za ispitivanje razlika između srednjih vrednosti grupa (populacija) za pojedino svojstvo korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA). Pretpostavka za primenu ovog testa je da svojstva imaju normalnu ili normalnoj blisku raspodelu. Normalnost raspodele pojedinog svojstva za određenu populaciju proveravana je pregledom histograma, ocenjivanjem osnovnih statističkih parametara i Hi-kvadrat testom (χ^2). Kada je rezultat ANOVA bio statistički značajan ($P < 0.05$) razlike među srednjim vrednostima grupa (populacija) određivane su LSD testom. Da bi se otkrile i opisale razlike i sličnosti između elemenata (individua), populacija i svojstava korišćene su multivarijacione statističke analize – Analiza glavnih komponenti (*Principal Component Analysis* - PCA), Diskriminantna kanonijska analiza (*Canonical Discriminant Analysis* - CDA) i Klaster analiza (*Cluster Analyses* - CA). Testirano je više klaster metoda (Single linkage, Complete linkage, Optimal clustering) sa indeksima heterogenosti (Euclidian distance, Manhattan distance). Za statističku obradu podataka korišćeni su programi Statgraphics Plus 5.0 (Statistical Graphics Corporation, USA) i Statistica 5.1 (StatSoft, 1997).

3.4. Molekularne analize

U cilju utvrđivanja varijabilnosti, diferencijacije, srodnosti i genealoških odnosa populacija *P. nigra* na molekularnom nivou korišćeni su odgovarajući regioni (markeri) sva tri biljna genoma:

1. Jedarni EST-mikrosateliti. Ovi molekularni markeri kao i genomski mikrosateliti do sada nisu dizajnirani niti testirani kod *Pinus nigra*. S obzirom da literaturni podaci pokazuju da se jedarni EST-mikrosateliti karakterišu visokim stepenom transferabilnosti kao i varijabilnosti u srodnim vrstama (Chagne et al., 2004; Liewlaksaneeyanawin et al., 2004; Echt et al., 2011; Lesser et al., 2012), urađena je tzv. *cross-specific* (među-specijska) PCR amplifikacija EST-mikrosatelita dizajniranih za druge vrste borova kod *Pinus nigra*. Za među-specijsku PCR amplifikaciju kod *Pinus nigra* je testirano devet EST-mikrosatelita: SsrPt_ctg7444, SsrPt_ctg7731, SsrPt_ctg865 (razvijeni za *Pinus taeda* i testirani kod *P. pinaster*, *P. radiata*, *P. sylvestris*, *P. halepensis*, *P. pinea*, *P. canariensis*; Chagne et al., 2004), Lop2, Lop11 (razvijeni za *P. taeda* i testirani kod *P. contorta* ssp. *latifolia*, *P. ponderosa* i *P. sylvestris*; Liewlaksaneeyanawin et al., 2004), Pico_19, Pico_46, PtSIFG_6015, PtSIFG_6044 (razvijeni za *P. taeda*; Echt et al., 2011), Pico_60, Pico_81 i Pico_182 (razvijeni za *P. contorta* i testirani kod *P. banksiana*, *P. ponderosa*, *P. palustris*, *P. elliotii*, *P. halepensis*, *P. longaeva*, *P. edulis*, *P. flexilis*; Lesser et al., 2012). Kriterijumi za odabir EST-mikrosatelita su obuhvatali: da su dobijeni PCR produkti kod svih testiranih vrsta borova, da imaju AT motiv (najčešći kod biljaka), da se nalaze u 5' - UTR ili 3' - UTR regionu i da su pokazali broj ponovaka veći od deset kod svih ispitivanih vrsta. Od devet testiranih EST-mikrosatelita kod sedam jedinki *P. nigra* iz različitih populacija, odabrana su tri: SsrPt_ctg7444, SsrPt_ctg7731 i SsrPt_ctg865 (Chagne et al., 2004), kod kojih su dobijeni PCR produkti kod svih sedam testiranih jedinki i kod kojih je uočena varijabilnost u dužini PCR produkata na agaroznom gelu.

2. Hloroplastni mikrosateliti. Preliminarno je testirano devet hloroplastnih mikrosatelita (cpSSRs) (Pt1254, Pt26081, Pt36480, Pt45002, Pt71936, Pt79951, Pt15169, Pt30204 i Pt87268), koji su dizajnirani na osnovu hloroplastnog genoma *Pinus thunbergii* (Vendramin et al., 1996), a uspešno su korišćeni u većini populaciono-genetičkih studija borova, uključujući i *P. nigra* (Naydenov et al., 2006; Afzal-Rafii and

Dodd, 2007; Jaramillo-Correa et al., 2010; Soto et al., 2010). Od devet cpSSRs testiranih kod sedam jedinki *P. nigra* iz različitih populacija odabrana su tri: Pt15169, Pt30204 i Pt87268 kod kojih su dobijeni PCR produkti kod svih testiranih jedinki i kod kojih je uočena varijabilnost u dužini PCR produkata na agaroznom gelu.

3. Primarne sekvence nukleotida introna u subjedinicama gena za NADH dehidrogenazu u okviru mitohondrijalnog genoma. Testirana su tri nekodirajuća regiona (introna) iz tri gena: drugi intron prvog gena (subjedinice) NADH dehidrogenaze - *nad1* intron 2, četvrti intron petog gena - *nad5* intron 4 i prvi intron sedmog gena - *nad7* intron 1 kod sedam jedinki *P. nigra* iz različitih populacija. Za PCR amplifikaciju prvog introna korišćeni su prajmeri objavljeni od strane Demesure i sar. (1995), za PCR amplifikaciju drugog introna su korišćeni prajmeri objavljeni od strane Dumolin-Lapegue i sar. (1997), a za amplifikaciju trećeg introna je korišćeno nekoliko kombinacija prajmera objavljenih od strane Jaramillo-Correa i sar. (2004) i Tian i sar. (2010). PCR produkti kod svih sedam individua *P. nigra* su dobijeni samo na lokusu *nad7* intron 1 amplifikovanom korišćenjem sledećih prajmera: forward (F) prajmera dizajniranog za *Pinus kwantungensis* (Tian et al., 2010) i reverse (R) prajmera dizajniranog za *Picea mariana* (Jaramillo-Correa et al., 2004).

3.4.1. Izolacija i PCR amplifikacija odabranih regiona DNK

Izolacija totalne genomske DNK i PCR amplifikacija odabranih regiona DNK iz sva tri biljna genoma urađene su u Laboratoriji za molekularnu analizu Instituta za Botaniku i Botaničke bašte "Jevremovac" Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Izolacija totalne genomske DNK svakog individualnog uzorka izvršena je prema protokolu Aleksić i sar. (2012) koji predstavlja modifikaciju protokola Doyle i Doyle (1987) koji je jedan od najčešće korišćenih protokola za izolaciju totalne genomske DNK iz biljnih tkiva.

3.4.1.1. Inter-specijska PCR amplifikacija jedarnih EST-mikrosatelita

Prajmeri za među-specijsku PCR amplifikaciju tri jedarna EST-mikrosatelita, koji su dizajnirani na osnovu genoma *Pinus taeda* (Chagne et al., 2004) ali su uspešno amplifikovani kod *P. nigra* i pokazali su varijabilnost u dužini PCR produkata na agaroznom gelu, SsrPt_ctg7444, SsrPt_ctg7731 i SsrPt_ctg865, korišćeni su za dalju među-specijsku PCR amplifikaciju kod 104 individa *P. nigra* iz sedam populacija (tabela 3-2).

Forward (F) prajmeri svakog od tri jedarna EST-mikrosatelita su komercijalno obeleženi standardnim fluorescentnim bojama Applied Biosystem-ovog standardnog seta boja DS-33 za primenu u genotipizaciji: za fluorescentno obeležavanje F prajmera za PCR amplifikaciju lokusa SsrPt_ctg7444 je korišćena plava boja (6-FAM); za lokus SsrPt_ctg7731 žuta (NED), a za lokus SsrPt_ctg865 crvena boja (PET).

Za PCR amplifikaciju je kao kao matrica (template) korišćena totalna genomska DNK u koncentraciji od 25 ng po reakciji, a reakcije su izvođene u totalnoj zapremini od 25 µl po reakciji. Za PCR smešu su korišćene sledeće komponente: 1 x *Taq* pufera sa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania), 2 mM MgCl_2 (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania), 0.2 mM dNTPs, 1 µM forward i reverse prajmera, 0.5 U *Taq* DNK polimeraze (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania). PCR amplifikacija je urađena korišćenjem peqStar 96 Universal thermal cycler-a (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) prema sledećem protokolu: 1. inicijalna denaturacija na 94°C u trajanju od 5 min; 2. denaturacija na 94°C u trajanju od 30 s; 3. Annealing prajmera na temperaturama specifičnim za pojedinačne lokuse (58°C za lokus SP444, 51°C za lokus SP731 i 45°C za lokus SP865) u trajanju od 30 s; 4. ekstenzija na 72°C u trajanju od 1 min; 5. finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 10 min, pri čemu su koraci 2., 3. i 4. ponovljeni 30 puta.

Uspešnost PCR amplifikacije tri jedarna EST-mikrosatelita je proverena agaroznom elektroforezom. Po 5 µl PCR produkta svakog uzorka je pušteno na 2% agarozni gel obojen midory green-om (NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Dueren, Germany) koji omogućava vizualizaciju PCR produkata pod UV transiluminatorom (Vilber Lourmat ECX-F20.M transilluminator - Cedex 1, France).

Tabela 3-2. Karakteristike 3 EST-SSR markera dizajnirana na osnovu genoma *Pinus taeda* (Chagné et al., 2004) i sekvence prajmera koji su korišćeni za inter-specijsku PCR amplifikaciju kod *P. nigra*.

R. br.	1	2	3
Pun naziv lokusa	SsrPt_ctg7444	SsrPt_ctg7431	SsrPt_ctg865
Naš naziv lokusa	SP444	SP731	SP865
Motiv	AT	AT	AT
Broj ponovaka	10	12	15
Forward prajmer	5'-TCTTCACCATCGGTTTCTCC-3'	5'-AGTGGTGAAGGGTCCATCTG-3'	5'-TTTCAGAAGCTCCCGATTTG-3'
Reverse prajmer	5'-TGGATCTGTCACCTCCTCATC-3'	5'-GCATAACACAAAAGCCAGCA-3'	5'-CTTGTGGACATGGTTAATGAAG-3'
Annealing temperatura	58	51	45
Očekivana dužina	285	217	232
Amplifikacija:			
<i>Pinus pinaster</i>	+	+	+
<i>P. taeda</i>	+	+	+
<i>P. radiata</i>	+	+	+
<i>P. sylvestris</i>	+	+	+
<i>P. halepensis</i>	+	+	+
<i>P. pinea</i>	+	+	+
<i>P. canariensis</i>	+	+	+

Kapilarna elektroforeza (fragment analiza) PCR produkata je urađena komercijalno od strane Macrogen, Korea (Geumchen-gu, Seoul, Korea, <http://dna.macrogen.com/eng/>) korišćenjem 96-kapilarnog 3730xl DNK automatskog kapilarnog sekvencera (Applied Biosystems, Inc. USA). Analiza elektroferograma i utvrđivanje dužina PCR produkata su urađene primenom programa GeneMapper (Applied Biosystems, Inc., USA).

3.4.1.2. PCR amplifikacija hloroplastnih mikrosatelita

Univerzalni prajmeri za PCR amplifikaciju hloroplastnih mikrosatelita dizajnirani na osnovu hloroplastnog genoma *Pinus thunbergii* (Vendramin et al., 1996) korišćeni su za PCR amplifikaciju tri hloroplastna mikrosatelita (Pt15169, Pt30204, Pt87268; kodovi prema Vendramin et al., 1996) kod *P. nigra* (tabela 3-3).

Forward (F) prajmeri svakog od tri hloroplastna mikrosatelita su komercijalno obeleženi standardnim fluorescentnim bojama Applied Biosystem-ovog standardnog seta boja DS-33 za primenu u genotipizaciji: za fluorescentno obeležavanje F prajmera za PCR amplifikaciju lokusa Pt151696 je korišćena plava boja (6-FAM); za lokus Pt30204 zelena (VIC), a za lokus Pt87268 crvena (PET).

Za PCR amplifikaciju je kao matrica (template) korišćena totalna genomska DNK svakog pojedinačnog uzorka u koncentraciji od 25 ng po reakciji, a PCR reakcije su izvedene u ukupnoj zapremini od 25 µl po reakciji. Za PCR amplifikaciju su korišćene sledeće komponente u PCR smeši: 1 x *Taq* pufer sa (NH₄)₂SO₄ (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania), 2.5 mM MgCl₂ (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania), 0.2 mM dNTPs, 0.1 µM forward i reverse prajmera, 0.80% BSA (Bovine Serum Albumin, Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania) i 0.025 U *Taq* DNK polimeraze (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania). PCR amplifikacija je urađena korišćenjem peqStar 96 Universal thermal cycler-a (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) prema sledećem protokolu: 1. inicijalna denaturacija na 94°C u trajanju od 10 min; 2. denaturacija na 94°C u trajanju od 1 min; 3. annealing prajmera na 55°C u trajanju od 1 min; 4. ekstenzija na 72°C u trajanju od 1 min; 5. finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 10 min, pri čemu su koraci 2., 3. i 4. ponovljeni 30 puta.

Tabela 3-3. Oligonukleotidne sekvence prajmera za PCR amplifikaciju tri hloroplastna mikrosatelita (cpSSRs) dizajnirane na osnovu hloroplastnog genoma *Pinus thunbergii* (Vendramin et al., 1996).

R. br. cpSSR	1	2	3
Kod	Pt15169	Pt30204	Pt87268
Broj ponovaka	(C) ₈ (T) ₈ A(T) ₈	(A) ₁₂ (G) ₁₀	(T) ₁₄
Forward prajmer	5'–CTTGGATGGAATAGCAGCC–3'	5'–TCATAGCGGAAGATCCTCTTT–3'	5'–GCCAGGGAAAATCGTAGG–3'
Reverse prajmer	5'–GGAAGGGCATTAAAGGTCATTA–3'	5'–CGGATTGATCCTAACCATAACC–3'	5' – AGACGATTAGACATCCAACCC–3'
Annealing temperatura	55°C	55°C	55°C
Očekivana dužina PCR produkta	118	145	165

Tabela 3-4. Oligonukleotidne sekvence prajmera za PCR amplifikaciju mitohondrijalnog lokusa *nad7* intron 1: forward (F) prajmer dizajniran za *Pinus kwantungensis* (Tian et al., 2010) i reverse (R) prajmer dizajniran za *Picea mariana* (Jaramillo-Correa et al., 2004)

mtDNK lokus	<i>nad7</i> intron 1
Forward prajmer	5'– GGCCTCGTTATCCACACTGT –3'
Reverse prajmer	5'–GTTGTACCGTAAACCTGCTC–3'
Annealing temperatura	u prvih 11 ciklusa annealing temperatura je smanjivana iz ciklusa u ciklus za 0.5°C u opsegu od 68°C do 63°C, nakon toga je izvedeno još 26 ciklusa na 56°C

Uspešnost PCR amplifikacije tri hloroplastna mikrosatelita je proverena agaroznom elektroforezom. Po 5 µl PCR produkta svakog uzorka je pušteno na 2% agarozni gel obojen midory green-om (NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Dueren, Germany) koji omogućava vizualizaciju PCR produkata pod UV transiluminatorom (Vilber Lourmat ECX-F20.M transilluminator - Cedex 1, France).

Kapilarna elektroforeza (fragment analiza) PCR produkata je urađena komercijalno od strane Macrogen, Korea (Geumchen-gu, Seoul, Korea, <http://dna.macrogen.com/eng/>) korišćenjem 96-kapilarnog 3730xl DNK automatskog kapilarnog sekvencera (Applied Biosystems, Inc. USA). Analiza elektroferograma i utvrđivanje dužina PCR produkata su urađene primenom programa GeneMapper (Applied Biosystems).

3.4.1.3. PCR amplifikacija mitohondrijalnog lokusa *nad7* intron 1

Mitohondrijalni intron 1 gena 7 NADH dehidrogenaze (*nad7* intron 1) je PCR amplifikovan korišćenjem forward (F) prajmera dizajniranog za *Pinus kwantungensis* (Tian et al., 2010) i reverse (R) prajmera dizajniranog za *Picea mariana* (Jaramillo-Correa et al., 2004) (tabela 3-4).

Za PCR amplifikaciju je kao matrica (template) korišćena totalna genomska DNK u koncentraciji od 25 ng po reakciji, a reakcije su izvođene u totalnoj zapremini od 25 µl po reakciji. Za PCR smešu su korišćene sledeće komponente: 1 x *Taq* pufer sa (NH₄)₂SO₄ (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania), 2.5 mM MgCl₂ (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania), 0.2 mM dNTPs, 0.1 µM forward i reverse prajmera, 0.80% BSA (Bovine Serum Albumin, Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania) i 0.025 U *Taq* DNK polimeraze (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania). PCR amplifikacija je urađena korišćenjem peqStar 96 Universal thermal cycler-a (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) prema sledećem touchdown protokolu: 1. inicijalna denaturacija na 94°C u trajanju od 4 min; 2. denaturacija na 94°C u trajanju od 1 min; 3. annealing prajmera na 68°C u trajanju od 45 s; 4. ekstenzija na 72°C u trajanju od 2 min; koraci 2., 3. i 4. su ponovljeni 11 puta, pri čemu je annealing temperatura smanjivana iz ciklusa u ciklus za 0.5°C u opsegu od 68°C do 63°C; 5. denaturacija na 94°C u trajanju od 1 min; 6. annealing prajmera na 56°C u trajanju od 45 s; 7. ekstenzija na 72°C u trajanju od 2

min, pri čemu su koraci 5., 6. i 7. ponovljeni 26 puta; 8. finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 10 min.

Uspešnost PCR amplifikacije mitohondrijalnog lokusa kod svih individua je proverena agaroznom elektroforezom. Po 5 µl PCR produkta svakog uzorka je pušteno na 2% agarozni gel obojen midory green-om (NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Dueren, Germany) koji omogućava vizualizaciju PCR produkata pod UV transiluminatorom (Vilber Lourmat ECX-F20.M transilluminator - Cedex 1, France).

Sekvenciranje PCR produkata po Sanger metodi je urađeno komercijalno od strane MacroGen Europe (Amsterdam, The Netherlands, <http://dna.macrogen.com/eng/>) korišćenjem 96-kapilarnog 3730xl DNK automatskog kapilarnog sekvencera (Applied Biosystems, Inc. USA). Sanger sekvenciranje mitohondrijalnog lokusa za 67 individua urađeno je samo u jednom smeru, primenom F prajmera, dok je kod 37 individua urađeno sekvencioniranje u oba smera, primenom F i R prajmera. Dobijene sekvence su proverene i editovane manuelno primenom programa MUSCLE (Edgar, 2004) implementiranog u program MEGA 5.04 (Tamura et al., 2011), a konsenzus sekvence introna 1 *nad 7* gena kod 37 individua dobijene su kombinovanjem sekvenci dobijenih u reakcijama sekvenciranja sa F i R prajmerom za datu individuu.

3.4.2. Genetička analiza

Parametri genetičkog diverziteta

1. na nivou diploidnog genoma - za svaki jedarni mikrosatelit i populaciju utvrđen je ukupan broj alela (A), ukupan broj genotipova (g), dobijena heterozigotnost (Ho), očekivana heterozigotnost (He) i koeficijent inbreedinga (Fis) primenom programa ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier et al., 2010) i GENEPOP 4.0 (Rousset, 2008).

2. na nivou haploidnih genoma - za svaki hloroplastni mikrosatelit i mitohondrijalnu sekvencu *nad7* intron 1 izračunat je ukupni broj alela (A), ukupni broj haplotipova (h), nepristrasni prosečni diverzitet gena (Hs) (*unbiased average gene diversity*; Nei, 1978 – ekvivalent očekivanoj heterozigotnosti (He) kod diploidnih genoma; Weir, 1996) i nepristrasni totalni diverzitet gena (Ht) (*unbiased total gene diversity*; Nei, 1978) upotrebom programa CONTRIB 1.02 (Petit et al., 1998).

Genetička diferencijacija i analiza molekularne varijanse

Parametri genetičke diferencijacije između ispitivanih populacija izračunati su na nivou oba haploidna genoma. Na nivou hloroplastnog genoma utvrđene su vrednosti globalnih *Gst* i *Rst* parametara u programu CONTRIB 1.02 (Petit et al., 1998), kao i globalna *Fst* i *Fst* između parova populacija u programu ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier et al., 2010). Na nivou mitohondrijalnog *nad7* intron 1 lokusa, izračunata je vrednost globalnog *Gst* parametra u programu CONTRIB 1.02.

Za dalje ispitivanje potencijalne genetičke diferencijacije populacija na nivou hloroplastnog genoma urađene su sledeće analize. Najpre je na osnovu frekvencije detektovanih alela i haplotipova urađena multivarijaciona statistička analiza – PCA (*Principal Component Analysis*) u programu PAST (PAleontologicalSTatistics, ver. 1.89, Hammer et al., 2009) za koju su korišćeni transformisani podaci prema uputstvu Vendramin-a i sar. (1999).

Potencijalan genetička diferencijacija populacija testirana je i u programu STRUCTURE 2.2 (Pritchard et al., 2000). U okviru ovog programa se broj nezavisnih genetičkih grupa *K* utvrđuje primenom Monte Carlo Markov Chain (MCMC) simulacija i Bayesian metode (BM). BM se ne zasniva na koeficijentima genetičke sličnosti već na različitim modelima srodnosti individua i modelima frekvenci alela te se stoga ovakva klaster analiza naziva model-based clustering i predstavlja kvalitativno drugačiji metod u poređenju sa metodama koje su korišćene u prethodnim analizama za utvrđivanje genetičke diferencijacije populacija.

Za svaku MCMC simulaciju zadata je dužina "zagrevanja lanaca" (burn-in) i dužina lanaca (run length) od po 100 000 iteracija i rađeno je po pet nezavisnih run-ova za svaki zadati *K* koji se kretao u opsegu od 1 do 4. U svim simulacijama je korišćen *no admixture* model srodnosti individua u populacijama po kojem se pretpostavlja da je svaka populacija sastavljena od individua koje su nezavisnog porekla u odnosu na individue drugih populacija. Za analizu je korišćen *correlated allele frequencies* model koji dozvoljava da frekvence alela u različitim populacijama budu međusobno zavisne u određenom stepenu i stoga donekle slične. Primena ovog modela je preporučena od strane autora programa u slučajevima kada se ispituju populacije jedne vrste zbog toga što njegova primena omogućava bolje grupisanje blisko srodnih populacija. Parametar

prior population information nije korišćen, tako da program u svakoj simulaciji za svaku individuu izračunava prosečnu pripadnost zadatim genskim pool-ovima (q_i) i na osnovu toga ih svrstava u odgovarajuće genetičke grupe isključivo na osnovu njihovog genetičkog profila.

Utvrđivanje optimalnog broja genetičkih grupa K je urađeno na način koji je naveden od strane autora programa STRUCTURE. Naime, kao što je već navedeno, svaka simulacija za određeni K je ponovljena 5 puta, i za svaku simulaciju su dobijene *log-likelihood* vrednosti koje su iskorišćene za izračunavanje srednjih *log-likelihood* vrednosti za svaku vrednost K . Srednje *log-likelihood* vrednosti za svaku vrednost K su iskorišćene za izračunavanje posteriornih verovatnoća za svako K . K sa najvišom posteriornom verovatnoćom je tretiran kao optimalni broj genetičkih grupa u ispitivanom uzorku.

U cilju utvrđivanja potencijalne genetičke diferencijacije populacija na nivou hloroplastnog genoma, urađena je i analiza u programu TESS 1.2. (Francois et al., 2006; Chen et al., 2007). TESS za razliku od STRUCTURE analize uzima u obzir i prostornu distribuciju individua i veličinu populacija. Stoga je za izvođenje ove analize bilo neophodno generisati prostorne koordinate individua na osnovu koordinata populacija i njihove veličine. Za analizu je korišćen *no admixture* model i parametar iteracije od 0.6, a rađeno je po 100 runova za svaki od zadatih K koji se kretao u opsegu od 1 do 4. Zadate su vrednosti od 50.000 izmena i 10.000 koraka za zagrevanje lanaca (burn-in). Za svaki od zadatih K , 20 runova sa najnižim vrednostima tzv. *deviance information criterion* (DIC) su korišćeni za izračunavanje prosečnih vrednosti DIC. Nakon utvrđivanja prosečnih vrednosti DIC za sve K i njihovog predstavljanja u koordinatnom sistemu, kao optimalni K je odabran onaj na kojem DIC vrednost dostiže plato, kao što je sugerisano od strane autora Durand i sar. (2009).

Matriks Euklidenovih distanci između parova populacija za jedarni i hloroplastni set podataka utvrđen je primenom programa ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier et al., 2010) i iskorišćen je za Analizu molekularne varijanse (Analysis of Molecular Variance, AMOVA, Excoffier et al. 1992) primenom istog programa. AMOVA je postala nezamenljiva metoda za utvrđivanje raspodele varijabilnosti na unutarpopulacionu i međupopulacionu komponentu. Prilikom primene AMOVA-e korišćena su dva pristupa.

Najpre su sve populacije tretirane kao jedna grupa i izračunata je raspodela ukupne molekularne varijabilnosti na međupopulacionu i unutarpopulacionu komponentu. Nakon toga, urađena je hijerarhijska AMOVA u kojoj su populacije I (Banjska stena), II (Omar), III (Zmajevački potok), IV (Priboj) i V (Goč) (ssp. *nigra*) svrstane u jednu, a populacije VI (Jarešnik) i VII (Lazareva reka) (ssp. *pallasiana*) u drugu grupu i izračunata je raspodela ukupne molekularne varijabilnosti na međugrupnu, međupopulacionu u okviru grupe i unutarpopulacionu komponentu.

Genetička diferencijacija populacija je ispitivana i putem poređenja *pairwise population* Fst vrednosti koje su iskorišćene za NMDS analizu u programu PAST i vizuelizovane konstrukcijom dvo-dimenzinalnog grafika u kojem je svaka populacija zauzimala određeni položaj.

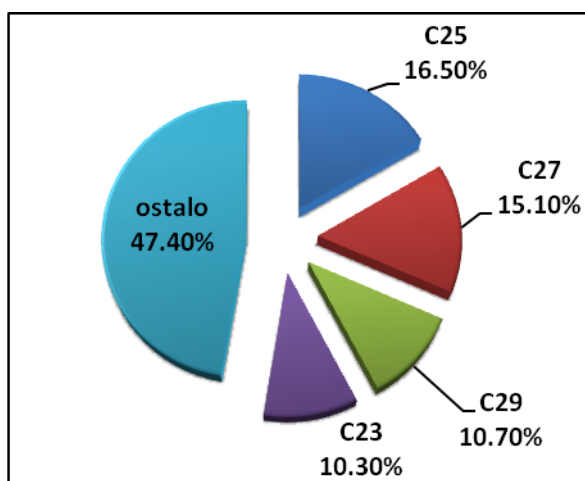
Za konstrukciju *Median-Joining* haplotip stabla na osnovu varijabilnosti mtDNK lokusa korišćen je program NETWORK 4.6.1.2. (Bandelt et al., 1999). Za ovu analizu su korišćene i sve sekvence *nad7* intron 1 *P. nigra* dostupne u Banci Gena (GenBank), kojih je bilo četiri (accessions HQ185288, HQ185287, HQ185286, HQ185289, Jaramillo-Correa et al., 2010), kao i jedna sekvenca *P. sylvestris* (EU072473, Pyhajarvi et al., 2008) koja je korišćena kao outgrupa. Parametar ϵ je održavan na nuli, a svim karakterima je dodeljena jednaka težina od 10. Informativni indeli su prevedni u indele od jedne baze i uključeni u analizu kao peti karakter.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. *n*-Alkani

4.1.1. Hemijski sastav *n*-alkana

U kutikularnom vosku četina *Pinus nigra* utvrđen je relativni sardžaj *n*-alkana, njihov ugljenični preferencijalni indeks (CPI), srednja dužina niza ugljenikovih atoma (ACL) kao i relativni odnosi *n*-alkana kratkog, srednjeg i dugog niza.



Slika 4-1. Prosečni sadržaj (%) dominantnih *n*-alkana u kutikularnom vosku četina *Pinus nigra*

U kutikularnom vosku četina crnog bora zastupljeni su *n*-alkani u seriji od C₁₆ do C₃₃, osim kod populacija I (Banjska stena), II (Omar) i III (Zmajevački potok) (*P. nigra* ssp. *nigra*), koje odlikuje serija od C₁₈ do C₃₃. Najobilniji *n*-alkan (C_{max}) je C₂₅ (16.5%), a zatim prema obilnosti slede C₂₇ (15.1%), C₂₉ (10.7%) i C₂₃ (10.3%)

(slika 4-1; tabela 4-1).

Srednja vrednost CPI ukupnih *n*-alkana (CPI_{total}) u kutikularnom vosku četina crnog bora je 2.3, što znači da je procentualni odnos parnih i neparnih *n*-alkana nešto veći od 1 : 2 (tabela 4-2).

Srednja vrednost ACL ukupnih *n*-alkana (ACL_{total}) je 25.6, odnosno 26.6 za ACL₂₃₋₃₅ (tabela 4-2).

Srednji relativni odnosi *n*-alkana kratkog, srednjeg i dugog niza u kutikularnom vosku četina crnog bora pokazuju dominaciju *n*-alkana dugog niza (n -C₂₅₋₃₃ = 67.5%) u odnosu na *n*-alkane srednjeg (n -C₂₁₋₂₄ = 21.4%) i kratkog niza (n -C₁₆₋₂₀ = 15.2%) (tabela 4-2).

4.1.2. Varijabilnost *n*-alkana

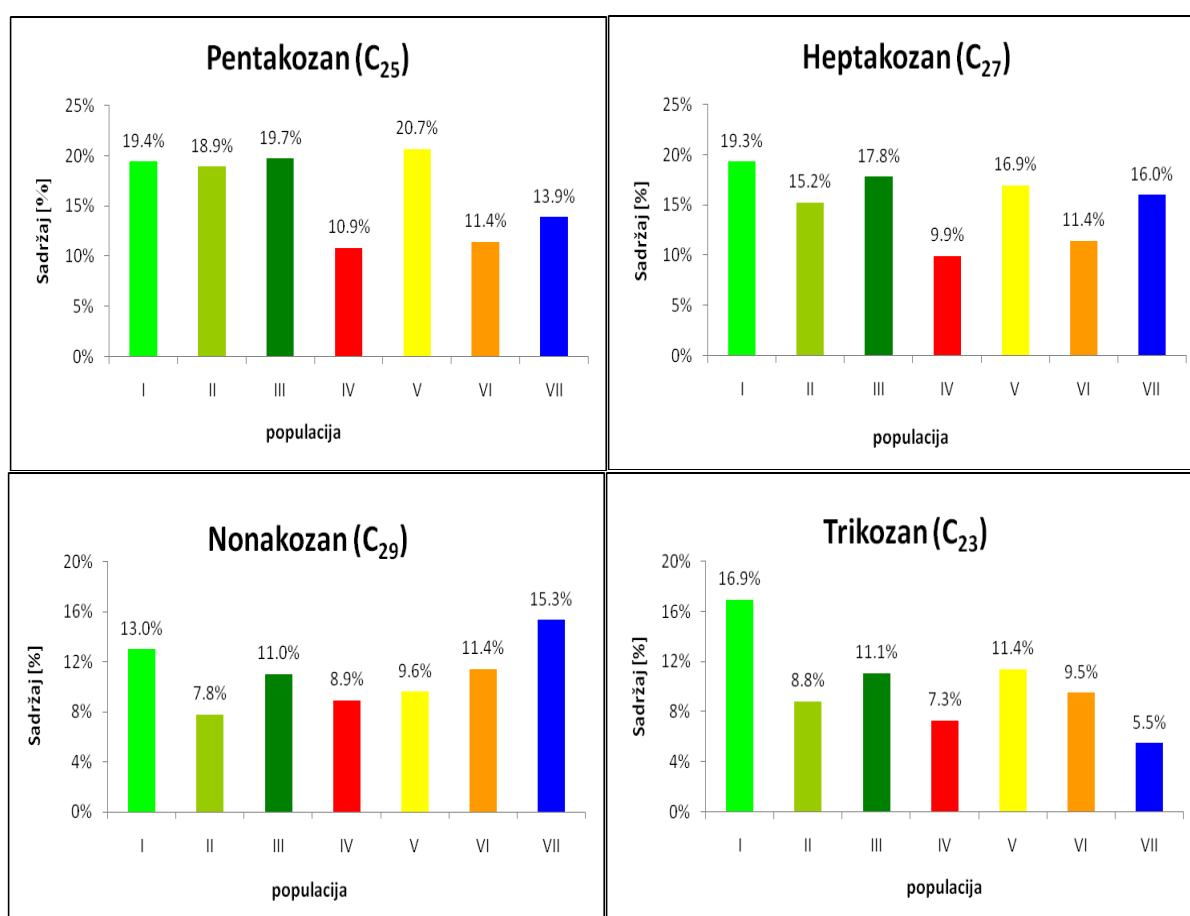
Varijabilnost sastava i sadržaja *n*-alkana u kutikularnom vosku četina *Pinus nigra* prikazana je u tabeli 4-1 i slici 4-2.

Najobilniji *n*-alkan, C_{25} , varira od 10.9% u populaciji IV (var. *gocensis*) do 20.7% u populaciji V (var. *gocensis*) (slika 4-2). Najveće individualno variranje je kod populacije III (ssp. *nigra*) ($SD = 5.80$).

n-Alkan C_{27} varira od 9.9% u populaciji IV (var. *gocensis*) do 19.3% u populaciji I (ssp. *nigra*). Najveće individualno variranje je kod populacije III (ssp. *nigra*) ($SD = 5.76$).

n-Alkan C_{29} varira od 7.8% u populaciji II (ssp. *nigra*) do 15.3% u populaciji VII (var. *banatica*). Najveće individualno variranje je kod populacije I (ssp. *nigra*) ($SD = 5.45$).

n-Alkan C_{23} varira od 5.5% u populaciji VII (var. *banatica*) do 16.9% u populaciji I (ssp. *nigra*). Najveće individualno variranje je kod populacije I (ssp. *nigra*) ($SD = 8.60$).



Slika 4-2. Varijabilnost dominantnih *n*-alkana (>5%) u istraživanim populacijama *Pinus nigra*

Populacije I-III (ssp. *nigra*) kao i populaciju V (var. *gocensis*) odlikuje isti relativni redosled dominantnih *n*-alkana u kutikularnom vosku četina (C_{25} , C_{27} , C_{29} i C_{23} ; tabela 4-1), dok je kod populacije VI (ssp. *pallasiana*) utvrđen nešto drugačiji redosled. Interesantno je da se kod populacija IV (var. *gocensis*) i VII (var. *banatica*) u grupi od 4 najobilnija *n*-alkana nalazi *n*-alkan sa parnim brojem C atoma (C_{26}).

U literaturi postoji samo jedan rad u kome se navode podaci o alkanima iz kutikularnih voskova četina *P. nigra* (Maffei et al., 2004), prema kome se *n*-alkani nalaze u seriji C_{21} - C_{33} , a dominiraju C_{31} , C_{23} , C_{25} i C_{24} (23.7%, 9.9%, 6.4%, 6.0%, respektivno). Uzorkovanje je vršeno tokom leta, izvan autohtonih populacija u rasadnicima severozapadne Italije (Turinska regija), a hemijska analiza je sprovedena na jako malom broju uzoraka (do tri). U radu su prikazani profili kutikularnih alkana još dvadeset vrsta iz roda *Pinus*, pri čemu je dominacija četiri najobilnija *n*-alkana iz naših populacija utvrđena kod *Pinus cembra*, *P. mugo* i *P. pinea* (Maffei et al., 2004). Takođe, Nikolić i sar. (2012b) su pokazali dominaciju *n*-alkana C_{29} , C_{25} , C_{27} i C_{23} u kutikularnom vosku četina molike (*P. peuce*).

Sastav alkana u kutikularnim voskovima borova ispitan je i u korelaciji sa proučavanjem kvaliteta vazduha i njegovog zagađenja, npr. kod *P. sylvestris* (Cape and Fowler, 1981; Hellqvist et al., 1992), *P. cembra* (Günthardt-Goerg, 1985), *P. cembra* i *P. sylvestris* (Günthardt-Goerg, 1986). Međutim, dva najveća istraživanja intraspecijske varijabilnosti *n*-alkana u kutikularnim voskovima borova odnose se na muniku (*Pinus heldreichii*) (Nikolić, 2012a) i moliku (*P. peuce*) (Nikolić, 2012b).

Tabela 4-1. Hemijski sastav *n*-alkana u kutikularnom vosku četina *Pinus nigra*.

R. br.	<i>n</i> -Alkani	Sadržaj [%] ^{a)}							Prosečni sadržaj [%] ^{b)}		
		I ^{c)}	II	III	IV	V	VI	VII	I-VII	I-III i V	IV i VI
1	Heksadekan (C ₁₆)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	1.62 (1.44)	2.99 (1.67)	0.99 (0.49)	0.24 (0.42)	0.91 (1.41)	0.79 (1.57)	1.30 (1.11)
2	Heptadekan (C ₁₇)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	1.74 (1.66)	3.28 (1.64)	0.25 (0.13)	0.31 (0.64)	0.86 (1.53)	0.86 (1.67)	0.99 (1.39)
3	Oktadekan (C ₁₈)	2.90 (2.76)	3.93 (2.05)	2.81 (2.59)	3.60 (1.60)	5.77 (3.72)	3.26 (0.92)	0.85 (0.73)	3.49 (2.63)	3.87 (3.08)	3.43 (1.31)
4	Nonadekan (C ₁₉)	1.52 (1.37)	1.47 (0.67)	0.49 (0.83)	0.50 (0.27)	3.54 (3.79)	1.09 (0.94)	0.71 (0.95)	1.38 (1.98)	1.77 (2.39)	0.79 (0.75)
5	Eikozan (C ₂₀)	4.79 (4.64)	5.21 (2.04)	3.28 (2.56)	6.03 (1.84)	6.66 (3.83)	5.14 (1.64)	1.37 (1.76)	4.89 (3.18)	4.98 (3.59)	5.59 (1.78)
6	Heneikozan (C ₂₁)	1.75 (1.26)	2.96 (2.71)	1.07 (0.83)	2.17 (1.28)	1.19 (0.89)	2.45 (1.28)	1.66 (1.49)	1.90 (1.60)	1.71 (1.73)	2.31 (1.28)
7	Dokozan (C ₂₂)	1.53 (0.85)	5.58 (2.18)	3.16 (2.18)	5.68 (0.98)	1.77 (0.93)	5.82 (1.22)	2.44 (1.23)	3.82 (2.32)	2.98 (2.28)	5.75 (1.09)
8	Trikozan (C₂₃)	16.93 (8.60)	8.79 (8.38)	11.06 (8.35)	7.34 (4.38)	11.35 (8.46)	9.52 (5.43)	5.52 (0.92)	10.34 (7.72)	11.99 (8.83)	8.43 (5.02)
9	Tetrakozan (C ₂₄)	3.26 (1.07)	7.13 (2.21)	4.49 (1.89)	8.15 (0.99)	2.93 (0.84)	7.84 (1.24)	6.53 (0.56)	5.72 (2.50)	4.41 (2.27)	7.99 (1.12)
10	Pentakozan (C₂₅)	19.40 (3.57)	18.92 (4.58)	19.71 (5.80)	10.85 (2.67)	20.70 (5.36)	11.39 (4.50)	13.91 (1.89)	16.52 (5.92)	19.71 (4.92)	11.12 (3.68)
11	Heksakozan (C ₂₆)	4.11 (1.31)	7.30 (1.92)	5.40 (1.66)	9.10 (0.98)	3.67 (0.86)	9.11 (1.53)	10.28 (0.87)	6.78 (2.73)	5.09 (2.02)	9.10 (1.27)
12	Heptakozan (C₂₇)	19.30 (3.76)	15.21 (4.91)	17.82 (5.76)	9.94 (2.40)	16.90 (4.98)	11.38 (2.31)	15.99 (2.20)	15.10 (5.20)	17.31 (5.08)	10.66 (2.45)
13	Oktakozan (C ₂₈)	3.33 (1.15)	5.76 (1.63)	4.71 (1.43)	7.62(1.05)	2.91 (0.73)	7.70 (1.35)	8.72 (1.05)	5.63 (2.38)	4.15 (1.69)	7.66 (1.20)
14	Nonakozan (C₂₉)	12.97 (5.45)	7.83 (2.18)	11.04 (4.48)	8.91 (2.52)	9.62 (2.59)	11.44 (2.41)	15.33 (2.14)	10.70 (3.94)	10.36 (4.27)	10.17 (2.76)
15	Triakontan (C ₃₀)	1.99 (0.85)	3.76 (2.07)	3.37 (1.47)	6.20 (2.00)	1.89 (0.61)	4.97(1.02)	4.96 (0.96)	3.82 (2.06)	2.75 (1.58)	5.58 (1.69)
16	Untriakontan (C ₃₁)	3.93 (2.16)	2.81 (1.00)	8.10 (4.43)	3.62 (1.03)	3.02 (1.31)	3.74 (0.58)	6.58 (1.07)	4.42 (2.79)	4.53 (3.40)	3.68 (0.83)
17	Dotriakontan (C ₃₂)	1.08(0.60)	2.23 (0.81)	2.23 (1.21)	5.55 (1.66)	0.93 (0.41)	2.60 (0.59)	2.22 (0.42)	2.44 (1.76)	1.61 (1.02)	4.08 (1.93)
18	Tritriakontan (C ₃₃)	1.22 (0.36)	1.11 (0.55)	1.24 (0.49)	1.40 (0.41)	0.89 (0.29)	1.28 (0.23)	2.33 (0.42)	1.28 (0.53)	1.11 (0.45)	1.34 (0.34)

^{a)} Sadržaji su dati u procentima (aritmetička sredina ± SD) u odnosu na ukupni sadržaj *n*-alkana.^{b)} Prosečni sadržaji u svim populacijama.^{c)} Geografski položaj i stanišne karakteristike populacija se nalaze u tabeli 3-1.

4.1.3. Varijabilnost ugljeničnog preferencijalnog indeksa (CPI) i srednje dužine niza ugljenikovih atoma (ACL)

Vrednosti CPI *n*-alkana su generalno najveće kod *P. nigra* ssp. *nigra* (populacije I-III) i jedne populacije *P. nigra* var. *gocensis* (populacija V), a najmanje kod *P. nigra* ssp. *pallasiana* (populacija VI) i druge populacije *P. nigra* var. *gocensis* (populacija IV) (tabela 4-2). Interesantno je da srednja vrednost CPI *n*-alkana kratkog niza (CPI₁₅₋₂₁) svih ispitivanih populacija (populacije I-VII) iznosi 0.4 (varira od 0.0 do 3.6) što ukazuje na dominaciju alkana sa parnim brojem ugljenikovih atoma iz ovog opsega ("even/odd predominance" – EOP; CPI<1 ukazuje na EOP, dok CPI>1 ukazuje na OEP) (Kuhn et al., 2010).

ACL ukupnih *n*-alkana (ACL_{total}) varira od 22.8 do 30.1 (srednja vrednost 25.6), dok ACL₂₃₋₃₅ varira od 25.1 do 28.2 (srednja vrednost 26.6; tabela 4-2). ACL_{total} je nešto veća kod *P. nigra* var. *banatica* (populacija VII) u poređenju sa ostalim taksonima. Srednji relativni odnosi *n*-alkana kratkog, srednjeg i dugog niza svih ispitivanih populacija (I-VII) pokazuju dominaciju *n*-alkana dugog niza ($n\text{-C}_{25-33} = 67.5\%$) u odnosu na *n*-alkane srednjeg ($n\text{-C}_{21-24} = 21.4\%$) i kratkog niza ($n\text{-C}_{16-20} = 15.2\%$). Najveći procenat *n*-alkana dugog niza sadrže kutikularni voskovi *P. nigra* var. *banatica* (populacija VII) (80.1%); najveći procenat *n*-alkana srednjeg niza sadrže voskovi *P. nigra* ssp. *pallasiana* (populacija VI) (25.6%); dok voskovi *P. nigra* var. *gocensis* (populacije IV i V) sadrže najveći procenat *n*-alkana kratkog niza (13.5% i 22.2%, respektivno; tabela 4-2).

Tabela 4-2. Varijabilnost ugljeničnog preferencijalnog indeksa (CPI), srednje dužine niza ugljenikovih atoma (ACL) i relativnih odnosa n -alkana kratkog, srednjeg i dugačkog niza u u kutikularnim voskovima četina *Pinus nigra*.

Populacija ^{a)}		C _{opseg}	C _{max}	CPI _{total} ^{b)}	CPI ₂₅₋₃₃ ^{c)}	CPI ₂₀₋₃₆ ^{d)}	CPI ₁₅₋₂₁ ^{e)}	CPI ₂₅₋₃₁ ^{f)}	ACL _{total} ^{g)}	ACL ₂₃₋₃₅ ^{h)}	n -C ₁₆₋₂₀ ⁱ⁾	n -C ₂₁₋₂₄ ^{j)}	n -C ₂₅₋₃₃ ^{k)}
I	Opseg	18–33	27, 23	1.2–8.3	2.2–9.6	1.8–9.5	0.1–2.3	2.3–9.7	24.1–27.2	25.3–27.8	1.9–22.1	5.9–43.2	49.7–88.7
	Srednja vrednost		25	4.2	5.3	5.1	0.7	5.4	25.5	26.2	9.2	23.5	67.3
II	Opseg	18–33	27	0.7–7.2	1.0–8.2	0.8–7.4	0.1–3.6	1.0–8.3	24.6–26.4	25.1–27.0	0.5–16.5	10.2–42.4	52.0–89.3
	Srednja vrednost		25	1.8	2.4	2.1	0.6	2.5	25.3	26.4	10.6	24.5	64.9
III	Opseg	18–33	27, 23, 29	0.5–11.0	0.8–11.8	0.7–11.8	0.0–2.2	0.9–12.0	24.8–27.6	25.5–28.2	0.4–18.0	8.4–41.5	50.9–91.2
	Srednja vrednost		25	3.3	4.0	3.7	0.5	4.1	26.1	26.7	6.6	19.8	73.6
IV	Opseg	16–33	27, 26, 24	0.6–1.4	0.6–1.7	0.6–1.5	0.1–0.4	0.7–1.8	24.3–26.9	25.5–27.5	4.8–24.7	16.7–35.6	49.1–78.0
	Srednja vrednost		25	0.9	1.1	1.0	0.2	1.1	25.6	26.8	13.5	23.3	63.2
V	Opseg	16–33	27, 23, 29	0.9–6.5	2.6–10.1	1.7–9.2	0.1–1.2	2.6–10.3	22.8–30.1	25.1–27.1	3.5–42.0	6.4–35.4	40.9–79.2
	Srednja vrednost		25	2.8	5.2	4.2	0.3	5.2	24.6	26.2	22.2	17.2	60.5
VI	Opseg	16–33	25, 27, 23, 25	0.6–2.4	0.8–3.2	0.7–2.8	0.0–0.6	0.8–3.3	24.8–26.2	25.6–27.5	3.7–19.9	17.2–38.2	53.8–77.0
	Srednja vrednost		29	1.2	1.5	1.3	0.3	1.5	25.6	26.8	10.7	25.6	63.6
VII	Opseg	16–33	29, 25	1.1–2.1	1.2–2.4	1.2–2.2	0.5–1.1	1.2–2.3	25.1–27.2	26.8–27.7	1.4–14.3	13.0–27.3	58.3–85.5
	Srednja vrednost		27	1.7	1.9	1.7	0.7	1.8	26.7	27.3	3.7	16.2	80.1
I-VII	Opseg	16–33	27, 23, 29	0.5–11.0	0.6–11.8	0.6–11.8	0.0–3.6	0.7–12.0	22.8–30.1	25.1–28.2	0.4–42.0	5.9–42.4	40.9–91.2
	Srednja vrednost		25	2.3	3.1	2.7	0.4	3.1	25.6	26.6	15.2	21.4	67.5

^{a)} Geografski položaj i stanišne karakteristike populacija se nalaze u tabeli 3-1.

^{b)} $CPI_{total} = \sum neparan C_n / \sum paran C_n$ (Mazurek and Simoneit, 1984), C_n je koncentracija n -alkana koji sadrži n ugljenikovih atoma.

^{c)} $CPI_{25-33} = [\sum (C_{25} - C_{33})neparan / \sum (C_{24} - C_{32})paran + \sum (C_{25} - C_{33})neparan / \sum (C_{26} - C_{34})paran] / 2$ (Bray and Evans, 1961).

^{d)} $CPI_{20-36} = [\sum (C_{20} - C_{36})neparan / \sum (C_{19} - C_{35})paran + \sum (C_{20} - C_{36})neparan / \sum (C_{21} - C_{37})paran] / 2$ (Bray and Evans, 1961).

^{e)} $CPI_{15-21} = [\sum (C_{15} - C_{21})neparan / \sum (C_{14} - C_{20})paran + \sum (C_{15} - C_{21})neparan / \sum (C_{16} - C_{22})paran] / 2$ (Bray and Evans, 1961).

^{f)} $CPI_{25-31} = [\sum (C_{25} - C_{31})neparan / \sum (C_{24} - C_{30})paran + \sum (C_{25} - C_{31})neparan / \sum (C_{26} - C_{32})paran] / 2$ (Bray and Evans, 1961).

^{g)} $ACL_{total} = (\sum C_n \times n) / \sum C_n$ (Poynter and Eglington, 1990).

^{h)} $ACL_{23-35} = (23 \times C_{23} + 25 \times C_{25} + 27 \times C_{27} + 29 \times C_{29} + 31 \times C_{31} + 33 \times C_{33} + 35 \times C_{35}) / (C_{23} + C_{25} + C_{27} + C_{29} + C_{31} + C_{33} + C_{35})$ (Poynter and Eglington, 1990).

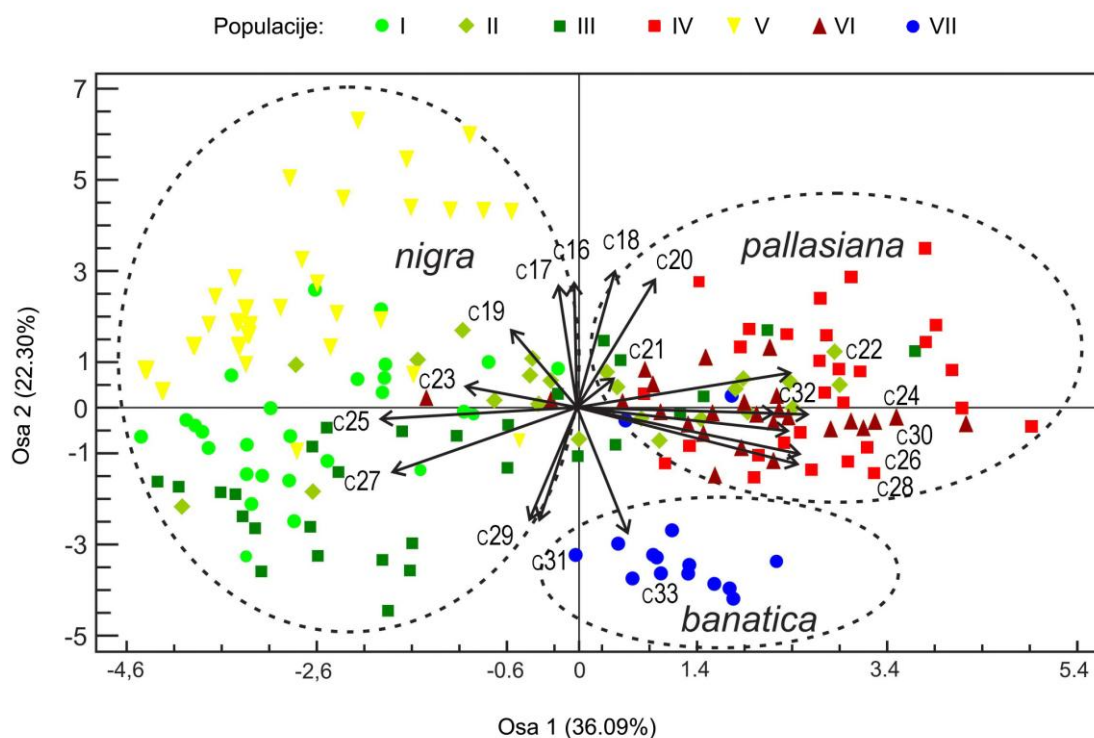
ⁱ⁾ n -C₁₆₋₂₀, ^{j)} n -C₂₁₋₂₄ i ^{k)} n -C₂₅₋₃₃: Relativni odnosi [%] n -alkana kratkog, srednjeg i dugog niza, respektivno (Kuhn et al., 2010).

4.1.4. Statistička obrada rezultata ispitivanja *n*-alkana

Za multivariacione statističke analize (PCA i HCA) korišćeno je svih 18 detektovanih *n*-alkana crnog bora (C_{16} - C_{33}). PCA (*Principal Component Analysis*) vizualizuje intra- i interpopulacionu varijabilnost *Pinus nigra* u Srbiji, kao i međusobno preklapanje populacija odnosno njihovu sličnost (slika 4-3). Prve dve ose objašnjavaju 58.4% ukupne varijanse (osa 1, 36.1%; osa 2, 22.3%). Na dijagramu rasipanja (*scatter plot*) uočava se tendencija formiranja tri grupe populacija (slika 4-3). Prva grupa (*nigra*), koju čine populacije I, II, III i V, pokazuje negativne vrednosti za PC1 (*principal component 1*). Drugu grupu (*pallasiana*), sa pozitivnim vrednostima za PC1, čine populacije IV i VI, dok treća grupa (*banatica*), koju čini samo populacija VII, ima negativne vrednosti za PC2 (*principal component 2*). Ove tri grupe se mogu označiti i kao različiti hemotipovi crnog bora. Još 1953. god. Penford i Willis su hemotipove opisali kao "biljke u prirodnim populacijama koje se ne mogu razdvojiti na osnovu morfoloških karakteristika, ali koje se lako razlikuju na osnovu značajnih razlika u hemijskom sastavu". Različiti hemotipovi su već opisani kod *Juniperus oxycedrus* (Medini et al., 2010), *Thymus vulgaris* (Thompson et al., 2003), *Hypericum triquetrifolium* (Rouis et al., 2012) i *Melaleuca alternifolia* (Butcher et al., 1994).

Prva grupa (*nigra*) okarakterisana je kao hemotip 1, čiji voskovi sadrže veći procenat *n*-alkana C_{23} , C_{25} i C_{27} (12.0%, 19.7% i 17.3%, respektivno; $F_{2,186} = 7.91 - 78.21$, $P < 0.05$), a manji procenat C_{24} , C_{26} , C_{28} i C_{30} (4.4%, 5.1%, 4.2% i 2.8%, respektivno; $F_{2,186} = 67.88 - 140.79$, $P < 0.05$) u poređenju sa ostalim grupama (tabela 4-1). Na osnovu ovakvih rezultata, hemotip 1 može biti pripisan *P. nigra* ssp. *nigra* (tabela 4-3). Dijagram rasipanja vizualizuje opisana svojstva prve grupe na sledeći način (slika 4-2): jedinice sa većim procentom *n*-alkana C_{23} , C_{25} i C_{27} (jedinke usmerene levo u odnosu na koordinantni početak) pozicionirane su u istom smeru sa vektorima C_{23} , C_{25} i C_{27} i obrnuto; levo usmerene jedinice imaju manji procenat *n*-alkana C_{24} , C_{26} , C_{28} i C_{30} , s obzirom da su pozicionirane u suprotnom smeru od vektora C_{24} , C_{26} , C_{28} i C_{30} . Iako je unutar prve grupe (*nigra*) očigledno odvajanje populacije V, ova tendencija po osi 2 slabija je u poređenju sa glavnim tendencijama PCA.

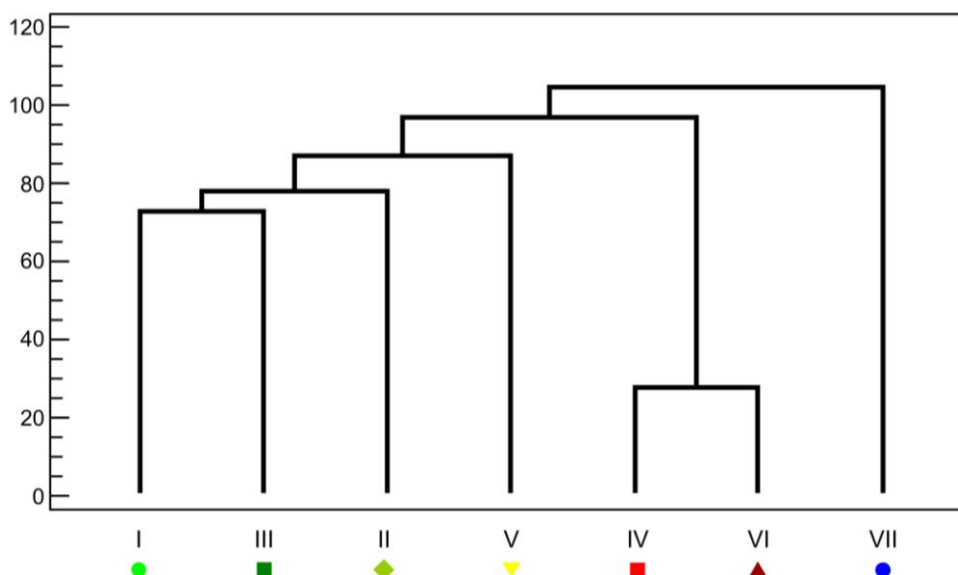
Druga grupa (*pallasiana*) je okarakterisana kao hemotip 2, čiji voskovi sadrže veći procenat *n*-alkana C₂₂, C₂₄, C₃₀ i C₃₂ (5.7%, 8.0%, 5.6% i 4.1%, respektivno; $F_{2,186} = 45.33 - 67.88$, $P < 0.05$), a manji procenat C₂₅ i C₂₇ (11.1 i 10.7%, respektivno; $F_{2,186} = 48.95 - 78.21$, $P < 0.05$) u poređenju sa ostalim grupama. Prema ovim rezultatima hemotip 2 može biti pripisan *P. nigra* ssp. *pallasiana* (tabela 4-3). Dijagram rasipanja vizualizuje opisana svojstva druge grupe na sledeći način (slika 4-3): jedinke sa većim procentom *n*-alkana C₂₂, C₂₄, C₃₀ i C₃₂ (jedinke usmerene desno u odnosu na koordinantni početak) pozicionirane su u istom smeru sa vektorima C₂₂, C₂₄, C₃₀ i C₃₂ i obrnuto; desno usmerene jedinke imaju manji procenat *n*-alkana C₂₅ i C₃₀, s obzirom da su pozicionirane u suprotnom smeru od vektora C₂₅ i C₃₀.



Slika 4-3. PCA analiza na osnovu 18 *n*-alkana *Pinus nigra*: heksadekan C₁₆ (1), heptadekan C₁₇ (2), oktadekan C₁₈ (3), nonadekan C₁₉ (4), eikozan C₂₀ (5), heneikozan C₂₁ (6), dokoza C₂₂ (7), trikoza C₂₃ (8), tetrakoza C₂₄ (9), pentakoza C₂₅ (10), heksakoza C₂₆ (11), heptakoza C₂₇ (12), oktakoza C₂₈ (13), nonakoza C₂₉ (14), triakontan C₃₀ (15), untriakontan C₃₁ (16), dotriakontan C₃₂ (17) i tritriakontan C₃₃ (18). Geografski položaj i stanišne karakteristike populacije se nalaze u tabeli 3-1

Treća grupa (*banatica*), koju čini samo jedna populacija (populacija VII), okarakterisana je kao hemotip 3 čiji voskovi sadrže veći procenat *n*-alkana C₂₉, C₃₁, i C₃₃ (15.3%, 6.6%, i 2.3%, respektivno; $F_{2,186} = 7.07 - 58.05$, $P < 0.05$) u poređenju sa ostalim grupama. Na ovaj način, hemotip 3 može biti pripisan *P. nigra* var. *banatica* (tabela 4-3).

Pored PCA analize, hemijska varijabilnost *n*-alkana testirana je i pomoću hijerarhijske klaster analize (HCA; slika 4-4). Dendrogram, prikazan na slici 4-4, takođe pokazuje tendenciju formiranja tri grupe populacija: prvu grupu čine populacije I, II, III i V; drugu grupu populacije IV i VI, a treću grupu samo populacija VII.



Slika 4-4. Dendrogram na osnovu "nearest-neighbor method (squared Euclidean distance)" 18 *n*-alkana iz sedam populacija *Pinus nigra*. Geografski položaj i stanišne karakteristike populacija se nalaze u tabeli 3-1

4.1.5. Diskusija rezultata ispitivanja *n*-alkana

Iako je prirodna distribucija crnog bora ograničena na Evropu, severozapadnu Afriku i Malu Aziju, areal ove vrste je izuzetno diskontinuiran, a tokom duge istorije Mediteranskog regiona došlo je do značajnih promena. Kao posledica istorijskih, ekoloških, geografskih, genetičkih i drugih faktora, ova vrsta je danas diferencirana na više infraspecijskih taksona različitog ranga. Zato je opisivanje taksona i njihove trenutne distribucije jedan od najinteresantnijih izazova za naučnike, pre svega

sistematičare i evolucioniste. Naime, intraspecijska klasifikacija *Pinus nigra* je još uvek daleko od rešenja.

Populacije iz zapadne Srbije (populacije I, II i III), determinisane kao ssp. *nigra*, slične su na osnovu sastava i sadržaja *n*-alkana. Međutim, populacije IV i V, koje su na osnovu dosadašnjih fitocenoloških i morfo-anatomskih istraživanja opisane kao *P. nigra* var. *gocensis*, značajno se razlikuju jedna od druge. Naime, na osnovu sastava *n*-alkana u kutikularnim voskovima, populacija IV sličnija je populaciji VI iz jugoistočne Srbije (*P. nigra* ssp. *pallasiana*), dok je populacija V sličnija populacijama I, II i III iz zapadne Srbije (*P. nigra* ssp. *nigra*) (tabela 4-3 i slike 4-3 i 4-4). Na ovaj način, moguće je da var. *gocensis* predstavlja tranzicionu formu između centralnih (ssp. *nigra*) i istočnih (ssp. *pallasiana*) balkanskih populacija crnog bora, čije morfološke, fitohemijske i molekularne karakteristike, a samim tim i status, treba proveriti u budućim istraživanjima. Slično zapažanje konstatovano je i za populaciju *P. nigra* sa ostrva Pelješac u Dalmaciji (Liber et al., 2003), koja pokazuje osobine tranzicione forme između *P. nigra* ssp. *dalmatica* i *P. nigra* ssp. *illyrica*.

Interesantno je da je od svih ispitivanih populacija, na osnovu varijabilnosti *n*-alkana, najudaljenija populacija VII determinisana kao var. *banatica* Georg. et Ion. unutar ssp. *pallasiana* (Jovanović, 1992). Ovaj takson je prethodno opisan u Rumuniji (Domogled – dolina Černe) i prema literaturnim podacima populacije crnog bora iz severozapadne Rumunije imaju veoma kontraverzan taksonomski položaj (Boşcaiu and Boşcaiu, 1999). U drugom izdanju Flore Evrope, Gaussen i sar. (1993) tretiraju crni bor iz severozapadne Rumunije kao posebnu vrstu tj. *P. banatica*. Varijabilnost *n*-alkana u populacijama crnog bora iz Srbije poržava stav da var. *banatica* zasluži status nezavisne podvrste ili čak vrste (tabela 4-3). U istočnoj Srbiji ovaj takson ima krajnje sužen areal, u vidu malih i veoma udaljenih enklava (Suva planina, Sukovska klisura i Zlotska klisura). Staništa su ekstremna, gotovo vertikalne gole litice čistih krečnjaka sa retkim pojedinačnim stablima crnog bora. Ova staništa Jovanović (1955), zbog njihove nepristupačnosti, smatra najznačajnijim prirodnim refugijumima crnog bora u našoj zemlji.

Tabela 4-3. Karakteristike taksona *Pinus nigra* na osnovu sastava *n*-alkana.

Populacija ^{a)}	Taksoni prema postojećim istraživanjima ^{b)}	Mogući taksoni na osnovu sastava <i>n</i> -alkana	Hemotip ^{c)}
I	<i>P. nigra</i> ssp. <i>illyrica</i>	<i>P. nigra</i> ssp. <i>nigra</i>	Hemotip 1: veći sadržaj <i>n</i> -alkana C ₂₃ , C ₂₅ i C ₂₇ i manji sadržaj C ₂₄ , C ₂₆ , C ₂₈ i C ₃₀ u poređenju sa ostalim taksonima
II	<i>P. nigra</i> ssp. <i>illyrica</i>	<i>P. nigra</i> ssp. <i>nigra</i>	Hemotip 1
III	<i>P. nigra</i> ssp. <i>illyrica</i>	<i>P. nigra</i> ssp. <i>nigra</i>	Hemotip 1
IV	<i>P. nigra</i> var. <i>gocensis</i>	<i>P. nigra</i> ssp. <i>pallasiana</i>	Hemotip 2: veći sadržaj <i>n</i> -alkana C ₂₂ , C ₂₄ , C ₃₀ i C ₃₂ i manji sadržaj C ₂₅ i C ₃₀ u poređenju sa ostalim taksonima
V	<i>P. nigra</i> var. <i>gocensis</i>	<i>P. nigra</i> ssp. <i>nigra</i>	Hemotip 1
VI	<i>P. nigra</i> ssp. <i>pallasiana</i>	<i>P. nigra</i> ssp. <i>pallasiana</i>	Hemotip 2
VII	<i>P. nigra</i> var. <i>banatica</i>	<i>P. nigra</i> ssp. <i>banatica</i> ili <i>P. banatica</i>	Hemotip 3: veći procenat <i>n</i> -alkana C ₂₉ , C ₃₁ , i C ₃₃ u poređenju sa ostalim taksonima

^{a)} Geografski položaj i stanišne karakteristike populacija se nalaze u tabeli 3-1.
^{b)} Opisani taksoni na osnovu dosadašnjih morfo-anatomske i fitocenološke istraživanja (Vidaković, 1982; Tatić and Tomić, 2006).
^{c)} Relativni sadržaji *n*-alkana koji određuju hemotipove nalaze se u tabeli 4-1.

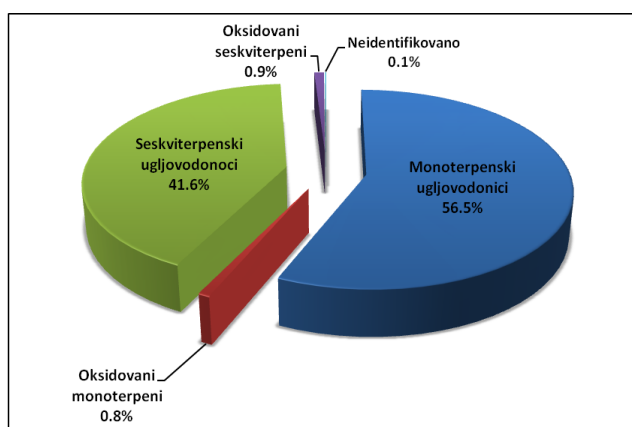
Detektovana varijabilnost sastava i sadržaja *n*-alkana u istraživanim populacijama *P. nigra* jasno pokazuje da je crni bor u centralnom delu Balkanskog poluostrva zastupljen sa nekoliko taksona različitog nivoa, čiji odnosi još uvek nisu dovoljno razjašnjeni. Ako prihvatimo klasifikaciju koju predlaže Delevoy (1949), prema kojoj se crni bor deli na dve podvrste (ssp. *occidentalis* i ssp. *orientalis*), sve istraživane populacije u Srbiji pripadaju istočnoj grupi populacija crnog bora (ssp. *orientalis*). Međutim, čak i u tom slučaju, očigledno je da postoji značajna diverzifikacija i diferencijacija populacija i da ove populacije pripadaju različitim intraspecijskim taksonima. Takođe, naši rezultati potvrđuju značaj *n*-alkana kao hemotaksonomskih markera na infraspecijskom nivou.

4.2. Terpeni

4.2.1. Hemijski sastav etarskih ulja

Hemijski sastav terpena u četinama *Pinus nigra* prikazan je u tabeli 4-5. U etarskom ulju četina 195 jedinki crnog bora iz sedam autohtonih populacija u Srbiji utvrđeno je ukupno 75 komponenti, od koji je 58 identifikovano.

Mono- i seskviterpeni zajedno čine oko 99.9% etarskog ulja. Monoterpeni dominiraju (57.4%), dok su seskviterpeni slabije zastupljeni (42.5%) (slika 4-5; tabela 4-4). U okviru monoterpeneske frakcije identifikovano je 14 ugljovodonika, 3 alkohola, 8 estara i 1 etarski monoterpeni derivat, dok se seskviterpenska grupa sastoji od 23 ugljovodonika i 7 oksidovanih seskviterpena (4 alkohola, 1 aldehid, 1 keton i 1 oksid).



Slika 4-5. Prosečni sadržaj (%) različitih klasa terpena u etarskom ulju četina *Pinus nigra*

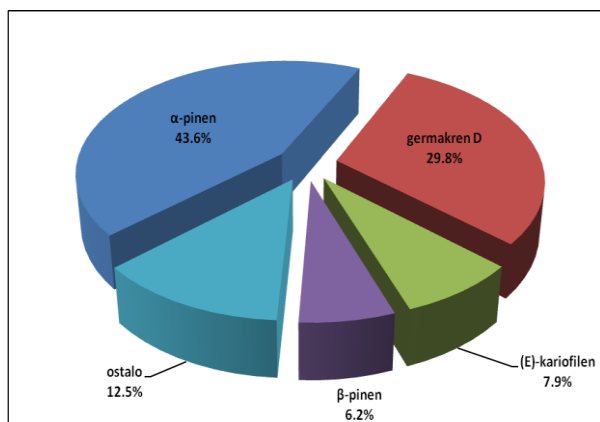
Dve dominantne komponente u etarskom ulju četina crnog bora čine zajedno 73.4% mase ulja: monoterpeni ugljovodonik, α -pinen (3)⁴ (prosečna obilnost 43.6%) i seskviterpenski ugljovodonik, germakren D (46) (prosečna obilnost 29.8%) (slika 4-6 i tabela 4-5).

Srednje visok sadržaj od 0.5 do 10.0% (von Rudloff, 1975; Lieutier et al., 1991) ima još 12 komponenti (**Bold** komponente u tabeli 4-5): (*E*)-kariofilen (38), β -pinen (6), limonen (11), α -humulen (41), kamfen (4), δ -kadinen (57), mircen (7), germakren D-4-ol (61), (*E*)- β -ocimen (12), terpinolen (14), α -tujen (2), γ -murolen (45).

Komponente u tragovima čine svega 3.1% etarskog ulja.

⁴ *Italic* brojevi se odnose na redne brojeve u tabeli 4-5.

Prosečan hemijski profil glavnih terpenskih komponenti (preko 5%) u etarskom ulju četina sedam populacija crnog bora u Srbiji je sledeći (slika 4-6):



α -pinen >> germakren D >>> (E)-kariofilen > β -pinen.

(gde > označava razliku 1.1-5.0%, >> razliku 5.1-15.0%, >>> razliku veću od 15.1%) (Petrakis et al., 2001).

Slika 4-6. Prosečni sadržaj (%) dominantnih terpenskih komponenti (preko 5%) u etarskom ulju četina *Pinus nigra*

Tabela 4-4. Sadržaj [%] različitih klasa terpena u etarskom ulju četina *Pinus niga*.

Klasa jedinjenja	Populacija ^{a)}							Sve populacije I-VII
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
Monoterpenski ugljovodonici	56.06	56.97	59.17	53.94	54.44	55.13	63.77	56.53
Oksidovani monoterpeni	0.68	0.71	1.23	0.36	0.79	0.83	1.67	0.84
Ukupni monoterpeni	56.74	57.68	60.40	54.30	55.23	55.96	65.44	57.37
Seskviterpenski ugljovodonici	41.57	41.56	38.70	45.12	44.08	41.80	34.45	41.57
Oksidovani seskviterpeni	1.37	0.71	0.73	0.40	0.49	2.19	0.03	0.91
Ukupni seskviterpeni	42.94	42.27	39.43	45.52	44.57	43.99	34.48	42.48
Ostalo ^{b)}	0.09	0.00	0.12	0.00	0.01	0.00	0.00	0.03
Neidentifikovano	0.23	0.05	0.05	0.18	0.19	0.05	0.08	0.12
Ukupno	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

^{a)} Geografski položaj i stanišne karakteristike populacija se nalaze u tabeli 3-1.
^{b)} Fenilpropanoid i estar.

Tabela 4-5. Hemijski sastav terpena u etarskom ulju četina *Pinus nigra*.

R. br.	Komponente	Sadržaj [%] ^{a)}							Prosečni sadržaj [%] ^{b)}
		I ^{c)}	II	III	IV	V	VI	VII	I-VII
1	trciklen	0.13 (0.06)	0.12 (0.05)	0.16 (0.07)	0.11 (0.04)	0.12 (0.05)	0.40 (0.61)	0.18 (0.06)	0.17 (0.27)
2	α-tujen	0.62 (0.59)	0.58 (0.36)	0.41 (0.30)	0.66 (0.32)	0.59 (0.25)	0.41 (0.40)	0.79 (0.34)	0.56 (0.39)
3	α-pinen	42.25 (11.52)	43.92 (7.55)	45.93 (10.46)	40.36 (7.12)	43.17 (8.19)	42.33 (8.59)	50.83 (7.39)	43.58 (9.14)
4	kamfen	0.73 (0.22)	0.73 (0.20)	0.95 (0.29)	0.63 (0.19)	0.75 (0.24)	1.95 (2.64)	0.92 (0.36)	0.96 (1.15)
5	sabinen	0.33 (0.25)	0.31 (0.18)	0.31 (0.18)	0.31 (0.16)	0.35 (0.14)	0.26 (0.18)	0.33 (0.05)	0.31 (0.18)
6	β-pinene	6.41 (7.59)	6.81 (5.04)	6.90 (7.04)	7.64 (7.03)	5.90 (6.91)	5.15 (5.90)	3.10 (2.31)	6.22 (6.42)
7	mircen	1.03 (0.48)	0.85 (0.27)	0.88 (0.21)	0.88 (0.27)	0.69 (0.30)	0.45 (0.32)	1.21 (0.26)	0.82 (0.37)
8	α -felandren	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.02 (0.03)	0.00 (0.00)	0.01 (0.03)	0.00 (0.00)	0.00 (0.02)
9	Δ^3 -karen	0.02 (0.04)	0.02 (0.05)	0.03 (0.12)	0.02 (0.03)	0.02 (0.05)	0.70 (2.65)	0.09 (0.31)	0.14 (1.08)
10	α -terpinen	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.03 (0.03)	0.00 (0.01)	0.00 (0.02)	0.01 (0.02)	0.01 (0.02)
11	limonen	2.78 (1.93)	2.15 (0.92)	2.16 (1.98)	1.84 (1.16)	1.99 (1.65)	3.08 (5.61)	5.04 (2.82)	2.53 (2.83)
12	(E)-β-ocimen	0.89 (0.59)	0.87 (0.62)	0.86 (0.47)	0.62 (0.43)	0.37 (0.31)	0.27 (0.42)	0.51 (0.38)	0.63 (0.53)
13	γ -terpinen	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.02 (0.03)	0.00 (0.01)	0.00 (0.02)	0.01 (0.02)	0.00 (0.02)
14	terpinolen	0.92 (0.87)	0.60 (0.39)	0.57 (0.41)	0.81 (0.43)	0.49 (0.31)	0.20 (0.22)	0.75 (0.30)	0.61 (0.51)
15	n. k. 1 ^{d)}	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.01)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.01)
16	<i>trans</i> -verbenol	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.02)	0.00 (0.00)	0.01 (0.03)	0.00 (0.00)	0.00 (0.02)
17	n. k. 2	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.03)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.01)
18	α -terpineol	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.01)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.05 (0.07)	0.00 (0.02)
19	mirtenol	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.02)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.01)
20	timol metil etar	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.02)	0.01 (0.03)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.02)

21	linalol acetat	0.03 (0.07)	0.05 (0.12)	0.05 (0.13)	0.09 (0.32)	0.07 (0.25)	0.04 (0.11)	0.12 (0.08)	0.06 (0.18)
22	bornil acetat	0.26 (0.26)	0.19 (0.18)	0.63 (0.52)	0.17 (0.16)	0.19 (0.32)	0.62 (1.17)	0.57 (0.61)	0.37 (0.60)
23	<i>trans</i> -verbenil acetat	0.03 (0.06)	0.02 (0.05)	0.03 (0.07)	0.01 (0.04)	0.01 (0.03)	0.01 (0.03)	0.00 (0.00)	0.02 (0.05)
24	<i>trans</i> -pinokarvil acetat	0.01 (0.03)	0.01 (0.03)	0.01 (0.03)	0.01 (0.03)	0.01 (0.02)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.02)
25	mirtenil acetat	0.02 (0.04)	0.06 (0.13)	0.03 (0.10)	0.03 (0.04)	0.01 (0.02)	0.00 (0.02)	0.09 (0.09)	0.03 (0.08)
26	verbanol acetat	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.01)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.01)
27	n. k. 3	0.02 (0.05)	0.00 (0.01)	0.01 (0.05)	0.01 (0.03)	0.00 (0.02)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.03)
28	δ -elemen	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.02 (0.07)	0.00 (0.00)	0.00 (0.03)
29	α -terpinil acetat	0.35 (0.29)	0.38 (0.36)	0.48 (0.95)	0.00 (0.00)	0.49 (0.61)	0.14 (0.27)	0.83 (0.36)	0.34 (0.55)
30	α -kubeben	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.62 (0.46)	0.00 (0.00)	0.01 (0.04)	0.00 (0.00)	0.10 (0.29)
31	α -ilangen	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.03)	0.01 (0.02)	0.00 (0.00)	0.01 (0.03)	0.00 (0.02)
32	α -kopaen	0.09 (0.10)	0.03 (0.06)	0.02 (0.05)	0.07 (0.06)	0.05 (0.06)	0.03 (0.04)	0.07 (0.07)	0.05 (0.07)
33	geranil acetat	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.02 (0.09)	0.00 (0.00)	0.00 (0.03)
34	β -burbonen	0.06 (0.07)	0.03 (0.06)	0.02 (0.06)	0.05 (0.06)	0.01 (0.03)	0.04 (0.05)	0.08 (0.09)	0.04 (0.06)
35	β -kubeben	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.07 (0.07)	0.05 (0.07)	0.04 (0.06)	0.05 (0.06)	0.03 (0.06)
36	β -elemen	0.05 (0.06)	0.02 (0.06)	0.03 (0.11)	0.00 (0.01)	0.01 (0.05)	0.01 (0.03)	0.00 (0.00)	0.02 (0.06)
37	metil eugenol	0.01 (0.04)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.01)
38	(E)-kariofilen	7.75 (2.07)	8.14 (3.12)	8.13 (3.47)	7.78 (2.04)	8.60 (2.27)	7.43 (2.70)	7.31 (0.66)	7.92 (2.57)
39	β -kopaen	0.04 (0.06)	0.06 (0.07)	0.02 (0.07)	0.07 (0.08)	0.07 (0.21)	0.10 (0.18)	0.06 (0.07)	0.06 (0.12)
40	6,9-guaiadien	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.02 (0.07)	0.00 (0.00)	0.00 (0.03)
41	α-humulen	1.22 (0.39)	1.25 (0.50)	1.24 (0.52)	1.17 (0.30)	1.26 (0.46)	1.07 (0.41)	1.09 (0.11)	1.19 (0.42)
42	(E)- β -farnezen	0.04 (0.05)	0.00 (0.02)	0.01 (0.04)	0.03 (0.05)	0.00 (0.01)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.04)
43	n. k. 4	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.02 (0.04)	0.00 (0.00)	0.00 (0.02)
44	n. k. 5	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.07)	0.00 (0.00)	0.00 (0.03)

45	γ -murolen	0.56 (0.42)	0.63 (0.40)	0.34 (0.38)	0.56 (0.50)	0.53 (0.46)	0.37 (0.34)	0.60 (0.45)	0.53 (0.44)
46	germakren D	29.86 (11.63)	29.65 (9.27)	27.50 (5.89)	32.60 (7.44)	31.80 (8.02)	30.59 (11.15)	23.69 (7.29)	29.84 (9.12)
47	β -selinen	0.02 (0.07)	0.01 (0.03)	0.01 (0.03)	0.03 (0.07)	0.02 (0.05)	0.02 (0.08)	0.00 (0.00)	0.02 (0.06)
48	feniletil 3-metilbutanoat	0.07 (0.17)	0.00 (0.00)	0.12 (0.60)	0.00 (0.00)	0.01 (0.04)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.03 (0.25)
49	γ -amorfen	0.15 (0.14)	0.12 (0.12)	0.15 (0.26)	0.16 (0.16)	0.11 (0.13)	0.00 (0.00)	0.15 (0.14)	0.11 (0.16)
50	biciklogermakren	0.13 (0.51)	0.09 (0.20)	0.19 (0.88)	0.08 (0.18)	0.19 (0.70)	0.62 (1.41)	0.00 (0.00)	0.20 (0.77)
51	n. k. 6	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.02 (0.07)	0.00 (0.00)	0.00 (0.03)
52	α - murolen	0.17 (0.09)	0.15 (0.09)	0.08 (0.11)	0.17 (0.11)	0.12 (0.11)	0.22 (0.35)	0.14 (0.12)	0.15 (0.17)
53	n. k. 7	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.02 (0.06)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.08 (0.08)	0.01 (0.04)
54	germakren A	0.13 (0.24)	0.06 (0.10)	0.09 (0.33)	0.08 (0.09)	0.07 (0.24)	0.05 (0.18)	0.00 (0.00)	0.07 (0.21)
55	n. k. 8	0.03 (0.07)	0.03 (0.06)	0.01 (0.04)	0.00 (0.00)	0.05 (0.08)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.02 (0.05)
56	γ -kadinen	0.38 (0.29)	0.37 (0.21)	0.25 (0.32)	0.43 (0.32)	0.32 (0.33)	0.37 (0.44)	0.35 (0.30)	0.35 (0.33)
57	δ -kadinen	0.94 (0.65)	0.94 (0.48)	0.61 (0.52)	1.12 (0.76)	0.87 (0.71)	0.69 (0.55)	0.84 (0.59)	0.86 (0.63)
58	<i>trans</i> -kadina-1,4-dien	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.02)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.02)	0.00 (0.01)
59	α -kadinen	0.01 (0.03)	0.01 (0.02)	0.00 (0.01)	0.02 (0.04)	0.01 (0.02)	0.00 (0.00)	0.01 (0.02)	0.01 (0.02)
60	n. k. 9	0.00 (0.00)	0.01 (0.03)	0.01 (0.04)	0.01 (0.02)	0.01 (0.03)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.03)
61	germakren D-4-ol	1.05 (2.66)	0.44 (0.59)	0.57 (1.44)	0.21 (0.35)	0.31 (0.61)	1.93 (4.77)	0.01 (0.03)	0.70 (2.31)
62	kariofilen oksid	0.06 (0.06)	0.07 (0.10)	0.08 (0.33)	0.05 (0.07)	0.03 (0.05)	0.04 (0.07)	0.02 (0.04)	0.05 (0.15)
63	n. k. 10	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.03 (0.07)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.03)
64	n. k. 11	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.02)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.01)
65	1,7-diepi- α -kedrenal	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.06 (0.13)	0.00 (0.00)	0.01 (0.05)
66	n. k. 12	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.02 (0.06)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.02)
67	T-kadinol	0.09 (0.14)	0.01 (0.02)	0.03 (0.11)	0.04 (0.06)	0.03 (0.06)	0.01 (0.06)	0.00 (0.00)	0.03 (0.08)
68	α -kadinol	0.10 (0.12)	0.06 (0.08)	0.03 (0.13)	0.08 (0.09)	0.03 (0.06)	0.02 (0.07)	0.00 (0.00)	0.05 (0.10)

69	germakra-4(15),5,10(14)- trien-1-alfa-ol	0.01 (0.03)	0.14 (0.20)	0.00 (0.01)	0.02 (0.04)	0.09 (0.15)	0.13 (0.22)	0.00 (0.00)	0.06 (0.14)
70	oplopanon	0.06 (0.26)	0.00 (0.00)	0.02 (0.09)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.11)
71	n. k. 13	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.03)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.01)
72	n. k. 14	0.05 (0.07)	0.00 (0.01)	0.00 (0.00)	0.04 (0.06)	0.02 (0.03)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.02 (0.04)
73	n. k. 15	0.02 (0.04)	0.00 (0.00)	0.02 (0.06)	0.00 (0.00)	0.01 (0.03)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.03)
74	n. k. 16	0.07 (0.09)	0.01 (0.04)	0.01 (0.02)	0.02 (0.03)	0.04 (0.07)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.02 (0.05)
75	n. k. 17	0.05 (0.07)	0.00 (0.02)	0.00 (0.00)	0.05 (0.06)	0.01 (0.04)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.02 (0.04)
Ukupno [%]		100	100	100	100	100	100	100	100

^{a)} Sadržaji su dati u procentima (aritmetička sredina $\pm$ SD) u odnosu na ukupni sadržaj terpena.

^{b)} Prosečni sadržaj u svim populacijama.

^{c)} Geografski položaj i stanišne karakteristike populacija se nalaze u tabeli 3-1.

^{d)} Neidentifikovana komponenta

4.2.2. Varijabilnost etarskih ulja

Varijabilnost sastava i sadržaja terpena u četinama *Pinus nigra* prikazana je u tabeli 4-5. Kod sedam ispitivanih populacija crnog bora utvrđeno je ukupno 75 komponenti etarskog ulja, od koji je 58 identifikovano. Kod populacije IV determinisan je najveći broj odnosno 50 komponenti, a zatim slede populacije V, VI, I, III, II i VII sa 46, 45, 42, 41, 39 i 35 identifikovanih jedinjenja, respektivno.

Monoterpeni u četinama crnog bora variraju od 54.3% (populacija IV; var. *gocensis*) do 65.4% (populacija VII; var. *banatica*), dok seskviterpeni variraju od 34.5% (populacija VII; var. *banatica*) do 45.5% (populacija IV; var. *gocensis*) (tabela 4-4).

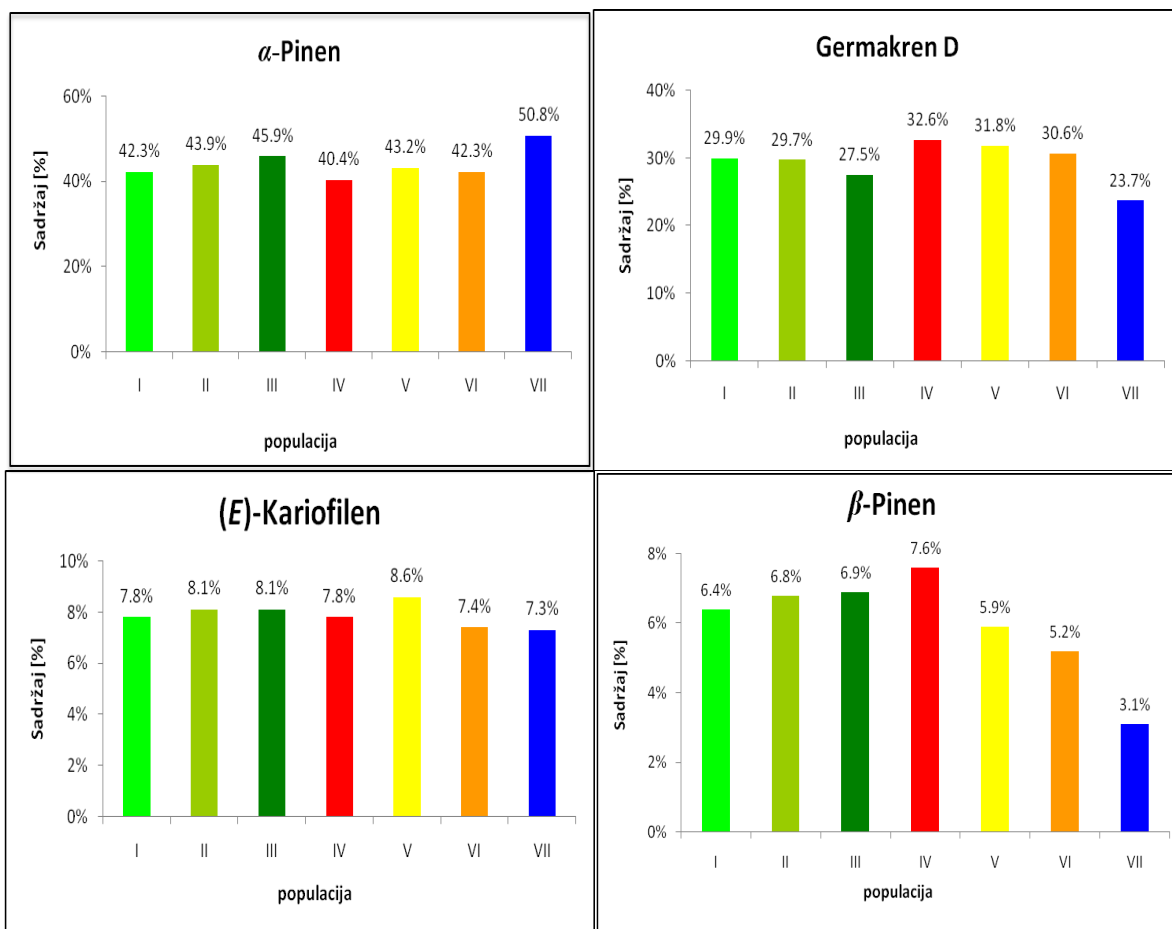
Kod svih sedam istraživanih populacija *P. nigra* utvrđen je isti relativni redosled dominantnih terpena u etarskom ulju četina (α -pinen, germakren D, (*E*)-kariofilen i β -pinen; tabela 4-5), pri čemu se jedino populacija IV (var. *gocensis*) odlikuje približno istim sadržajem treće i četvrte dominantne komponente tj. (*E*)-kariofilena i β -pinena (razlika < 0.5%).

Obilnost prve dominantne komponente, α -pinena, najveća je kod populacije VII (var. *banatica*) (50.8%), a najmanja kod populacije IV (var. *gocensis*) (40.4%; slika 4-7). Najveće individualno variranje u pogledu obilnosti α -pinena je kod populacije I (ssp. *nigra*) ($SD = 11.52$).

Obilnost druge dominantne komponente, germakrena D, najveća je kod populacije IV (var. *gocensis*) (32.6%), a najmanja kod populacije VII (var. *banatica*) (23.7%). U populaciji I (ssp. *nigra*) je ustanovljeno najveće individualno variranje u pogledu obilnosti germakrena D ($SD = 11.63$).

Obilnost treće komponente, (*E*)-kariofilena, najveća je kod populacije V (var. *gocensis*) (8.6%), a najmanja kod populacije VII (var. *banatica*) (7.3%). Populacije II i III (ssp. *nigra*) najviše su varirale prema sadržaju ovog seskviterpena ($SD = 3.12$ i $SD = 3.47$, respektivno).

Obilnost četvrte dominantne komponente, β -pinena, najveća je kod populacije IV (var. *gocensis*) (7.6%), a najmanja kod populacije VII (var. *banatica*) (3.1%). Individualna varijabilnost u ovom svojstvu je najveća kod populacije I (ssp. *nigra*) ($SD = 7.59$).

Slika 4-7. Varijabilnost dominantnih terpena (>5%) u istraživanim populacijama *Pinus nigra*

Populacije I-III (ssp. *nigra*) imaju najviše vrednosti (*E*)- β -ocimena (12), dok populacija V (var. *gocensis*) ima najvišu vrednost (*E*)-kariofilena (38). Populacija IV (var. *gocensis*) se ističe najvećim sadržajem ukupnih seskviterpena, posebno germakrena D (46) i δ -kadinena (57), a najmanjim sadržajem ukupnih monoterpena, posebno α -pinena (3), limonena (11) i kamfena (4). Sa druge strane, populacija VII (var. *banatica*) ima najveći sadržaj ukupnih monoterpena, naročito α -pinena (3), limonena (11), mircena (7) i α -tujena (2), a najmanji sadržaj ukupnih seskviterpena, naročito germakrena D (46), (*E*)-kariofilena (38) i germakrena D-4-ol (61). Populacija VI (ssp. *pallasiana*) ima više kamfena (4) i germakrena D-4-ol (61), ali manje mircena (7), (*E*)- β -ocimena (12) i terpinolena (14), u poređenju sa ostalim populacijama.

Međutim, statistički značajno ($P \leq 0.05$, LSD test) su se izdvojile samo tri populacije: populacija IV po najvećem sadržaju α -kubebena (30), populacija VI po najvećem sadržaju kamfena (4) i biciklogermakrena (50) odnosno najmanjem sadržaju mircena (7) i terpinolena (14) i populacija VII po najvećem sadržaju limonena (11) i α -terpinil acetata (29).

4.2.3. Statistička obrada rezultata ispitivanja etarskih ulja

Za multivariacione statističke analize (PCA, CDA i CA) od 75 terpenskih komponenti crnog bora izdvojeno je 14: α -tujen, α -pinen, kamfen, β -pinen, mircen, limonen, (*E*)- β -ocimen, terpinolen, (*E*)-kariofilen, α -humulen, γ -murolen, germakren D, δ -kadinen i germakren D-4-ol. Komponente koje su pronađene u tragovima ($x < 0,5\%$) (von Rudloff, 1975; Lieutier et al., 1991) isključene su iz dalje analize. Analiza glavnih komponenti (PCA) predstavljena je kao korelaciona mreža 195×14 (uzorci $\times$ varijable), pri čemu je svaka individualna komponenta iskazana u procentima od totalne frakcije monoterpena ili seskviterpena (Gerber et al., 1995). Međutim, analiza je pokazala preklapanje svih populacija zbog čega nije prikazana.

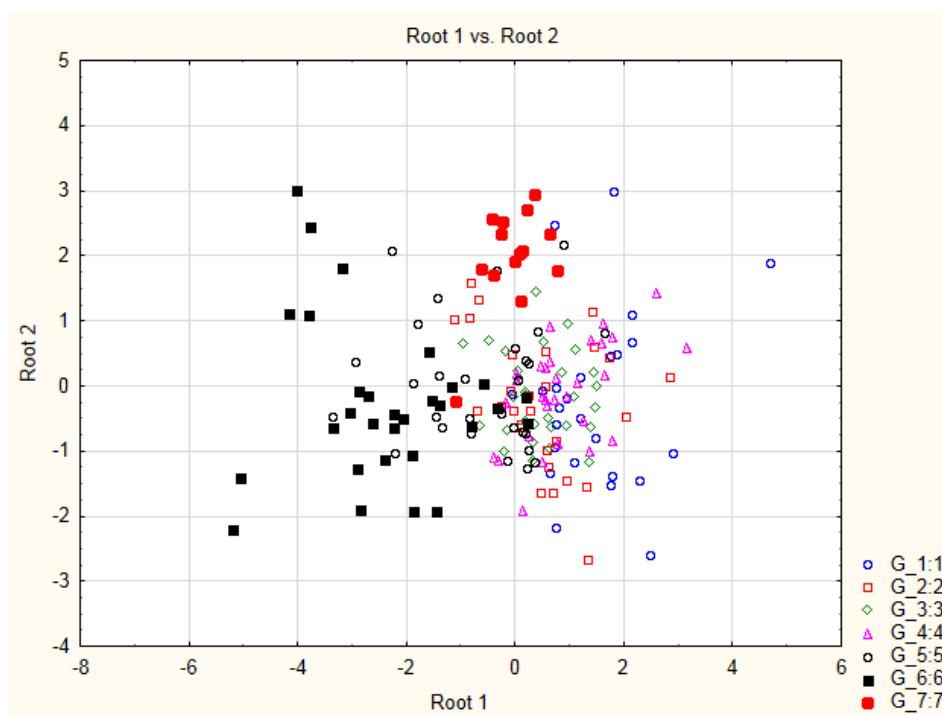
Diskriminantna kanonijska analiza (CDA) na osnovu individua iz sedam populacija *P. nigra* pokazala je da prve dve diskriminantne funkcije učestvuju u 79.6% ukupne diskriminacije, od čega prva funkcija sa 64.7%. (tabela 4-6). Prva diskriminantna funkcija približno je jednako određena sadržajem terpinolena, α -tujena, (*E*)-kariofilena, α -pinena i germakrena D. Druga funkcija najviše je određena sadržajem germakrena D, α -pinena i β -pinen (tabela 4-6). Prva diskriminantna funkcija najviše izdvaja populaciju VI, a druga populaciju VII od ostalih populacija (tabela 4-7, slika 4-8). CDA sa 7 populacija u proseku je korektno klasifikovala svega 53% individua (vrednosti klasifikacione matrice, podaci iz programa). Međutim njeni rezultati su dovoljni da pretpostave postojanje tri grupe individua: (1) populacije I, II, III, IV i V koje možemo označiti kao ssp. *nigra*, (2) populaciju VI koju možemo označiti kao ssp. *pallasiana* i (3) populaciju VII koju možemo označiti kao var. *banatica*. Sugestija diferencijacije dobijene sa sedam populacija bila je povod za izvođenje nove CDA sa tri *a priori* definisane grupe.

Tabela 4-6. Standardizovani koeficijenti za prve dve kanonijske ose (CA) varijabilnosti terpena na osnovu diskriminantne funkcionalne analize sa 7 *a priori* grupa.

Varijable	CA1	CA2
α -tujen	-1.087	0.404
α -pinen	1.017	-1.823
kamfen	-0.408	-0.482
β -pinen	0.829	-1.618
mircen	0.683	0.643
limonen	-0.086	-0.408
(E)- β -ocimen	0.498	-0.494
terpinolen	1.260	-0.758
(E)-kariofilen	1.053	-0.140
α -humulen	-0.880	-0.840
γ -murolen	0.016	-0.051
germakren D	1.010	-2.305
δ -kadinen	0.729	-0.230
germakren D-4-ol	0.432	-0.959
eigen-vrednosti	1.493	0.344
% objašnjene varijabilnosti	64.7	79.6

Tabela 4-7. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli.

Populacija	CA1	CA2
I	1.414	-0.241
II	0.481	-0.247
III	0.468	-0.149
IV	0.881	-0.106
V	-0.654	0.041
VI	-2.366	-0.273
VII	-0.053	1.988



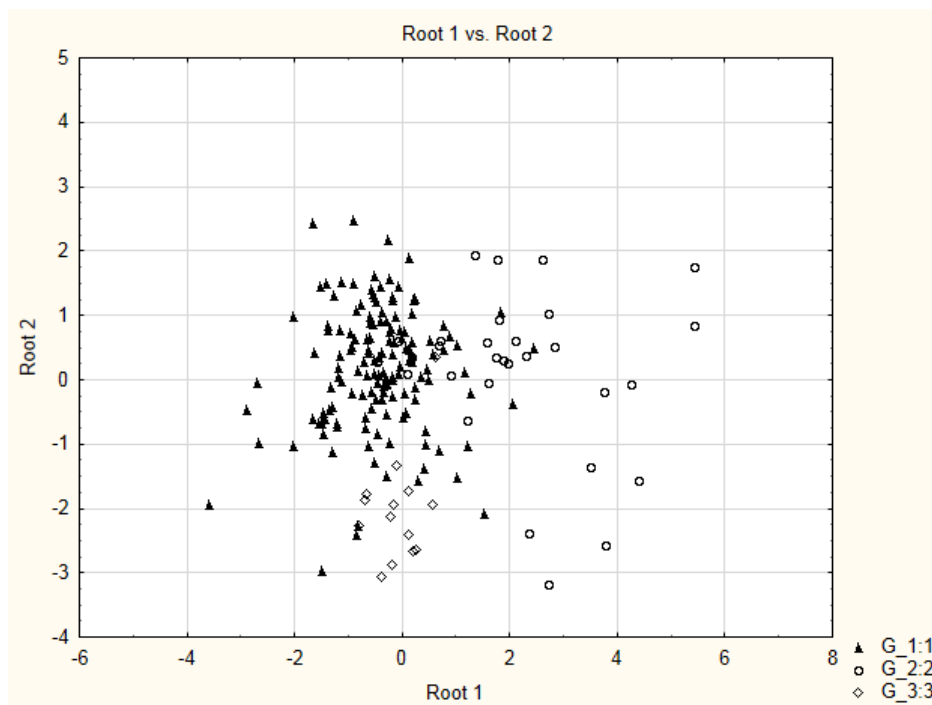
Slika 4-8. CDA na osnovu sadržaja 14 terpena izolovanih iz 195 jedinki *Pinus nigra* iz sedam populacija. Geografski položaj i stanišne karakteristike populacija se nalaze u tabeli 3-1

CDA na osnovu individua iz tri *a priori* gupe (taksona) pokazala je da prva diskriminantna funkcija objašnjava 73.3%, a druga 26.7% diskriminacije (tabela 4-8). Prva funkcija najviše je određena sadržajem (*E*)-kariofilena, α -humulena i terpinolena (tabela 4-8). Druga funkcija najviše je određena sadržajem germakrena D, α -pinena i mircena. Prva diskriminantna funkcija najviše razdvaja grupu *nigra* od grupe *pallasiana*, a druga grupu *banatica* od ostalih grupa (slika 4-9). Individue grupe *pallasiana* imaju manji sadržaj (*E*)-kariofilena i terpinolena, a veći sadržaj α -humulena (obzirom da se većina individua nalazi na desnoj strani slike). Individue grupe *nigra* imaju veći sadržaj (*E*)-kariofilena i terpinolena, a manji sadržaj α -humulena (obzirom da se većina individua nalazi na levoj strani slike). Individue grupe *banatica* imaju veći sadržaj α -pinena i mircena. CDA sa 3 *a priori* definisane grupe u proseku je korektno klasifikovala 88% individua (vrednosti klasifikacione matrice, podaci iz programa).

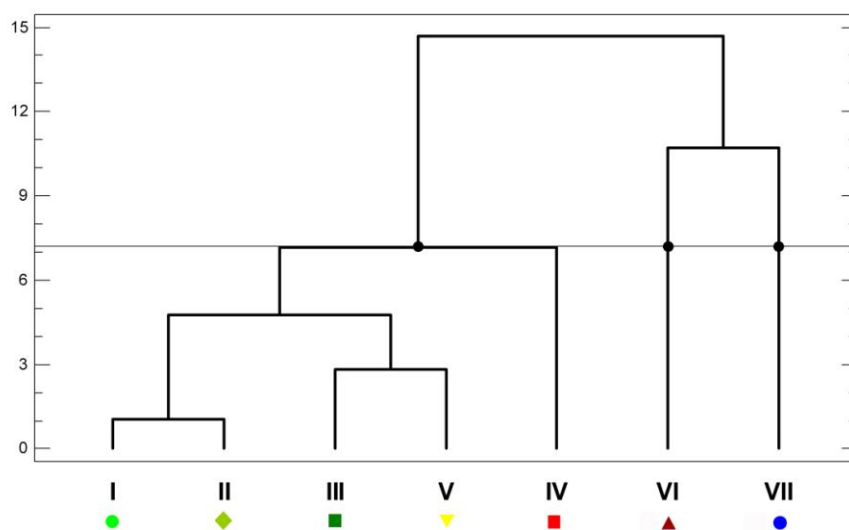
Takođe, testirano je više metoda klaster analize (CA) i sve su pokazale slične rezultate. Izdvojena su 2 dendograma (slike 4-10 i 4-11) kao najreprezentativnija (Nearest Neighbor Method i Ward's Method, respektivno). Oba dendograma pokazuju tendenciju formiranja tri grupe (hemotipa) populacija, koje su slične grupama dobijenim na osnovu CDA.

Tabela 4-8. Standardizovani koeficijenti za prve dve kanonijske ose (CA) varijabilnosti terpena na osnovu diskriminantne funkcionalne analize sa 3 *a priori* grupe.

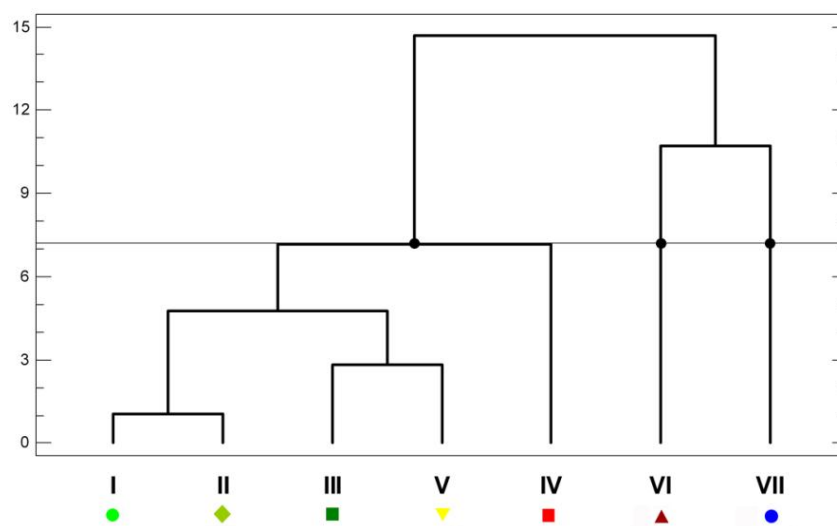
Varijable	CA1	CA2
α -tujen	0,741	-0,436
α -pinen	-0,548	1,682
kamfen	0,496	0,411
β -pinen	-0,464	1,523
mircen	-0,739	-0,621
limonen	0,329	0,281
(E)- β -ocimen	-0,348	0,464
terpinolen	-0,781	0,785
(E)-kariofilen	-1,069	0,294
α -humulen	0,942	0,670
γ -murolen	0,177	-0,102
germakren D	-0,477	2,169
δ -kadinen	-0,719	0,345
germakren D-4-ol	-0,128	0,832
eigen-vrednosti	0,922	0,336
% objašnjene varijabilnosti	0,733	1,00



Slika 4-9. CDA na osnovu sadržaja 14 terpena izolovanih iz 195 jedinki *Pinus nigra* sa tri *a priori* grupe (ssp. *nigra*, ssp. *pallasiana* and var. *banatica*)



Slika 4-10. Dendrogram na osnovu "nearest-neighbor method (squared Euclidean distance)" 14 terpenskih komponenti iz sedam populacija *Pinus nigra*. Geografski položaj i stanišne karakteristike populacija se nalaze u tabeli 3-1



Slika 4-11. Dendrogram na osnovu "Ward's method (Euclidean distance)" 14 terpenskih komponenti iz sedam populacija *Pinus nigra*. Geografski položaj i stanišne karakteristike populacija se nalaze u tabeli 3-1

4.2.4. Diskusija rezultata ispitivanja etarskih ulja

Sastav etarskih ulja u četinama, mladim izdancima ili šišarkama crnog bora ispitivao je veliki broj autora. Pojedini autori su utvrdili sastav terpena u *n*-pentanskim ekstraktima mladih izbojaka (Arbez et al., 1974; Gerber et al., 1995) ili četina (Rafii et al., 1996; Bojovic et al., 2005) crnog bora iz različitih delova areala. U svim slučajevima, pokazalo se da je α -pinen glavna komponenta. Takođe, postoji veliki broj radova o etarskim uljima crnog bora dobijenih hidrodestilacijom četina (Kubeczka and Schultze, 1987; Chalchat and Gorunovic, 1995a; 1995b; Roussis et al., 1995; Vidrich et al., 1996; Bader et al., 2000; Macchioni et al., 2003; Sezic et al., 2010; Politeo et al., 2011), grana (Vidrich et al., 1996; Bader et al., 2000; Macchioni et al., 2003) ili šišarki (Bader et al., 2000; Macchioni et al., 2003). Sve navedene radove odlikuje dominacija α -pinena, koji je generalno više zastupljen u granama i šišarkama (47-89%) (Vidrich et al., 1996; Bader et al., 2000; Macchioni et al., 2003), nego u četinama (12-53%) (Kubeczka and Schultze, 1987; Roussis et al., 1995; Vidrich et al., 1996; Bader et al., 2000; Macchioni et al., 2003). Ipak, u literaturi se može naći i nekoliko radova u kojima je utvrđena dominacija neke druge komponente: epiciklo-seskvifelandrena (Roussis et al., 2001), β -pinena (Koukos et al., 2001) ili manoil oksida (diterpen) (Rezzi et al., 2001). *Headspace* analiza grančica (Paci et al., 1989) i terpentina dobijenog parnom destilacijom oleorezina iz različitih organa crnog bora (Williams and Bannister, 1962; Iconomou and Valkanas, 1966) su pokazale dominaciju α -pinena (više od 90%).

Prosečan hemijski profil glavnih terpenskih komponenti ($x > 5\%$) u etarskom ulju četina sedam autohtonih populacija crnog bora u Srbiji je: α -pinen $>>$ germakren D $>>>$ (*E*)-kariofilen $>$ β -pinen (gde $>$ označava razliku 1.1-5.0%, $>>$ razliku 5.1-15.0%, $>>>$ razliku veću od 15.1%) (Petrakis et al., 2001) (slika 4-6). Na osnovu hemijskog profila glavnih terpena, istraživane populacije crnog bora iz Srbije su najsličnije populaciji iz centralne Italije (ssp. *nigra*) (Macchioni et al., 2003). Takođe, Roussis i sar. (1995) su objavili α -pinen, germakren D i (*E*)-kariofilen kao glavne komponente u etarskom ulju četina populacije crnog bora iz centralne Grčke (ssp. *pallasiana*). Četiri dominantne komponente u našim populacijama su, takođe, prisutne u etarskom ulju četina populacija iz Turske (ssp. *pallasiana*) (Sezic et al., 2010) i sa dalmatinskih ostrva (ssp. *dalmatica*), ali u različitom relativnom redosledu: α -pinen, β -pinen, germakren D i (*E*)-

kariofilen. Ako uporedimo istraživane populacije crnog bora sa Balkanskog poluostrva, naši rezultati se najviše razlikuju od rezultata publikovanih za populacije iz Bosne i Hercegovine (ssp. *nigra*) (α -pinen >>> limonen = β -pinen > (*E*)-kariofilen) u kojima je germakren D prisutan samo u tragovima (Chalchat and Gorunovic, 1995a). Veoma interesantan hemijski profil objavljen je za etarsko ulje četina *P. nigra* ssp. *laricio* sa Korzike, koje odlikuje velika hemijska varijabilnost sa dva različita profila glavnih terpenskih komponenti (α -pinen >>> germakren D = mircen > (*E*)-kariofilen = limonen i manoil oksid (diterpen) = α -pinen > germakren D >> (*E*)-kariofilen). Na osnovu istraživanja terpena četina 41 populacije crnog bora iz zapadne Evrope, Rafii i sar. (1996) su, takođe, pokazali jedinstvenost populacija sa Korzike i predložili ssp. *laricio* kao predačku formu *Pinus nigra* koja je sačuvala sličnost sa fosilnim nalazima iz Miocena.

Statistička obrada rezultata ispitivanja etarskog ulja četina iz sedam autohtonih populacija *P. nigra* iz Srbije pokazala je tendenciju formiranja tri grupe populacija (slike od 4-8 do 4-11). Generalno možemo reći da su populacije iz zapadne (I-III), jugozapadne (IV) i centralne Srbije (V) međusobno slične na osnovu sastava terpena i mogu biti pripisane ssp. *nigra* (tabela 4-9). Populacije determinisane kao var. *gocensis* ispoljile su umerenu tendenciju odvajanja od ssp. *nigra* (populacija IV u CA i populacija V u CDA). Na osnovu varijabilnosti *n*-alkana, populacija IV (opisana kao var. *gocensis*) pokazala je još jaču tendenciju odvajanja od ssp. *nigra* odnosno sličnija je populaciji VI iz jugoistočne Srbije (ssp. *pallasiana*) koja je okarakterisana kao hemotip 2 (detaljno u poglavlju 4.1.3.: "Statistička obrada rezultata ispitivanja *n*-alkana"). Na ovaj način, moguće je da varijetet *gocensis* predstavlja tranzicionu formu između podvrste *nigra* na zapadu i podvrste *pallasiana* na jugoistoku Srbije. Liber i sar. (2003) objavili su slično zapažanje za populaciju crnog bora sa poluostrva Pelješac, koja pokazuje karakteristike tranzicione populacije između ssp. *illyrica* i ssp. *dalmatica*.

Na osnovu varijabilnosti oba biohemijska karaktera (*n*-alkana i terpena), od svih istraživanih populacija najudaljenija je populacija VII (određena kao var. *banatica*). U Flori Evrope, crni bor iz severozapadne Rumunije tretiran je kao posebna vrsta tj. *Pinus banatica* (Gaussen et al., 1993). Naši hemijski rezultati podržavaju stav da bi var. *banatica* trebalo tretirati kao nezavisnu podvrstu ili čak vrstu (tabela 4-9). U svakom

slučaju, ovaj intrigantni takson bi trebalo detaljnije istražiti sa više aspekata, posebno molekularnog, u cilju razjašnjenja veza sa ostalim taksonima crnog bora.

Tabela 4-9. Pregled mogućih taksona *Pinus nigra* u Srbiji na osnovu varijabilnosti terpena u etarskom ulju četina.

Populacija ^{a)}	Taksoni prema postojećim istraživanjima ^{b)}	Mogući taksoni na osnovu sastava terpena
I	<i>P. nigra</i> ssp. <i>illyrica</i>	<i>P. nigra</i> ssp. <i>nigra</i>
II	<i>P. nigra</i> ssp. <i>illyrica</i>	<i>P. nigra</i> ssp. <i>nigra</i>
III	<i>P. nigra</i> ssp. <i>illyrica</i>	<i>P. nigra</i> ssp. <i>nigra</i>
IV	<i>P. nigra</i> var. <i>gocensis</i>	<i>P. nigra</i> ssp. <i>nigra</i>
V	<i>P. nigra</i> var. <i>gocensis</i>	<i>P. nigra</i> ssp. <i>nigra</i>
VI	<i>P. nigra</i> ssp. <i>pallasiana</i>	<i>P. nigra</i> ssp. <i>pallasiana</i>
VII	<i>P. nigra</i> var. <i>banatica</i>	<i>P. nigra</i> ssp. <i>banatica</i> ili <i>P. banatica</i>

^{a)} Geografski položaj i stanišne karakteristike populacija se nalaze u tabeli 3-1.
^{b)} Taksoni prema dosadašnjim morfo-anatomskim i fitocenološkim istraživanjima (Vidaković, 1982; Tatić and Tomić, 2006).

Ako pretpostavimo da tri osnovne grupe populacija u ovom istraživanju predstavljaju posebne podvrste, onda je moguće razlikovati tri podvrste *P. nigra* na teritoriji Srbije (ssp. *nigra*, ssp. *pallasiana* i ssp. *banatica*) (tabela 4-9). Ovaj zaključak ukazuje na suštinsku sličnost rezultata istraživanja terpena i *n*-alkana, s obzirom da smo u oba slučaja dobili tri grupe populacija crnog bora iz Srbije (*nigra*, *pallasiana* i *banatica*). Ipak, za dve populacije (IV i V), koje su opisane kao *P. nigra* var. *gocensis*, možemo reći da imaju "nesiguran položaj". Naime, prema sastavu *n*-alkana u kutikularnim voskovima, populacija IV sličnija je populaciji VI iz jugoistočne Srbije (ssp. *pallasiana*), dok je populacija V sličnija populacijama I, II i III iz zapadne Srbije (ssp. *nigra*). Na osnovu sastava terpena, očigledno je da su obe populacije (IV i V), determinisane kao var. *gocensis*, bliže populacijama I, II i III iz zapadne Srbije (ssp. *nigra*), ali i da su međusobno relativno udaljene (slike 4-10 i 4-11). S obzirom na ovakve rezultate, pretpostavljeno je da var. *gocensis* predstavlja tranzicionu formu između centralnih i istočnih balkanskih populacija crnog bora.

Rezultati istraživanja sastava i varijabilnosti terpena u sedam autohtonih populacija crnog bora u Srbiji jasno ukazuju da postoji značajna diverzifikacija i

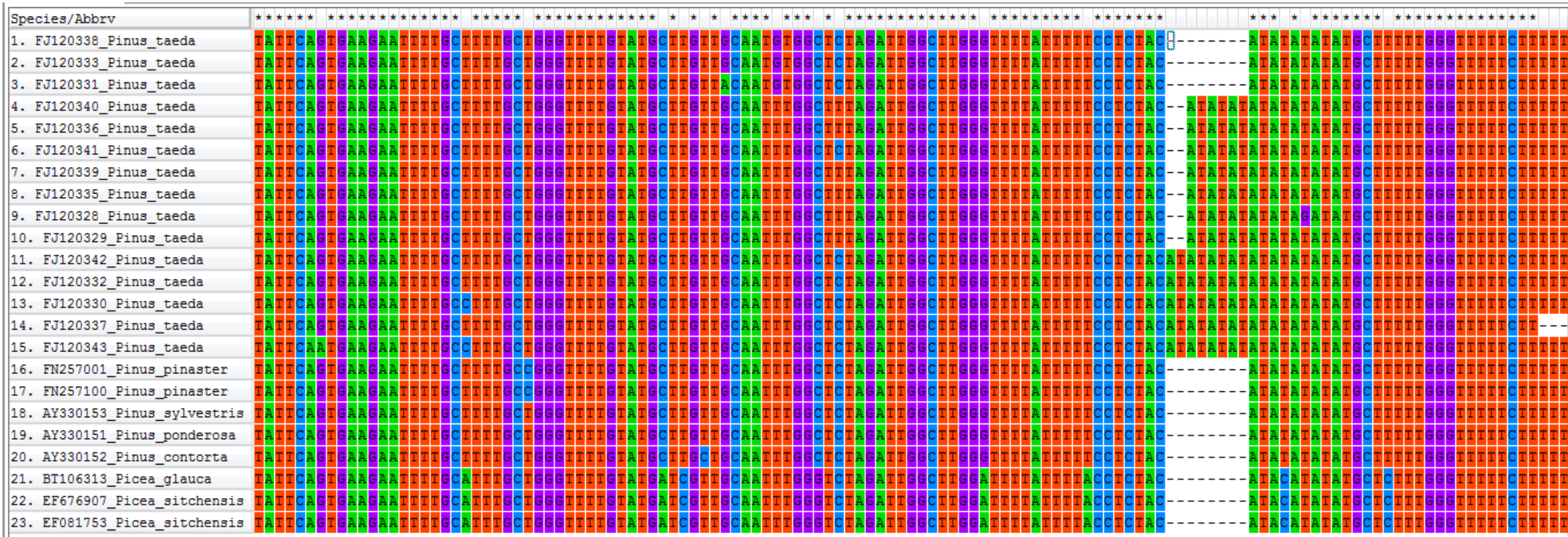
diferencijacija populacija i da ove populacije pripadaju različitim infraspecijskim taksonima. Takođe, naši rezultati potvrđuju značaj terpena kao hemotaksonomskih markera na infraspecijskom nivou.

4.3. Jedarni EST-mikrosateliti (EST-SSRs)

Kod 104 jedinke iz sedam autohtonih populacija *P. nigra* iz Srbije urađena je inter-specijska PCR amplifikacija tri jedarna EST-mikrosatelita (SsrPt_ctg7444, SsrPt_ctg7731 i SsrPt_ctg865) korišćenjem prajmera koji su dizajnirani na osnovu jedarnog genoma *Pinus taeda* i uspešno testirani kod *P. pinaster*, *P. radiata*, *P. sylvestris*, *P. halepensis*, *P. pinea* i *P. canariensis* (Chagne et al., 2004). Nakon analize dobijenih elektroferograma, uspešna determinacija dužine produkata PCR amplifikacije je bila moguća na lokusu SsrPt_ctg7444 kod 52 inidivude crnog bora, na lokusu SsrPt_ctg7731 kod 77 individua, dok je na lokusu SsrPt_ctg865 determinacija dužine produkata PCR amplifikacije bila neuspešna, što je objašnjeno u daljem tekstu (slike 7-25 do 7-29).

4.3.1. Genetički diverzitet na nivou jedarnog genoma

EST-mikrosatelit SsrPt_ctg7444 se odlikuje potpunim odsustvom varijabilnosti kod crnog bora, odnosno detektovan je samo jedan alel (275 bp) kod 52 individue *P. nigra* iz sedam različitih populacija (slika 7-25). Do 07.03.2014. god., sekvence EST-mikrosatelitnog lokusa SsrPt_ctg7444 su deponovane u Banci gena (GenBank) za ukupno 23 individue, i to za 15 jedinki *Pinus taeda*, dve jedinke *P. pinaster*, jednu jedinku *P. sylvestris*, *P. ponderosa*, *P. contorta*, *Picea glauca* i dve jedinke *P. sitchensis* (slika 4-12). Nakon poravnanja deponovanih sekvenci i analize varijabilnog regiona sa mikrosatelitom, može se uočiti da je ovaj EST-mikrosatelit veoma varijabilan u okviru vrste *P. taeda*: prikazana su četiri različita alela (AT)₅, (AT)₈, (AT)₅AG(AT)₂ i (AT)₉ kod svega 15 jedinki. Kod ostalih borova, za koje je u Banci gena deponovana samo po jedna ili dve sekvence datog lokusa, utvrđeno je prisustvo samo jednog alela datog mikrosatelita (sa pet ponovaka dinukleotidnog motiva AT), te se dati lokus kod predstavnika drugih vrsta borova, a na osnovu analiziranog uzorka od 5 individua, ne može smatrati varijabilnim. Kod predstavnika roda *Picea*, sa druge strane, iako je amplifikacija datog lokusa bila moguća, broj ponovaka dinukleotidnog motiva AT je bio svega 3, tako da se na osnovu ispitivanog uzorka od 3 individue smrča, ovaj lokus ne može smatrati mikrosatelitom.



Slika 4-12. Prikaz dela poravnania sekvenci EST-mikrosatelita SsrPt_ctg7444 deponovanih u Banci gena (GenBank) do 07.03.2014. god.



Slika 4-13. Prikaz dela poravnanja sekvenci EST-mikrosatelita SsrPt_ctg7731 deponovanih u Banci gena (GenBank) do 07.03.2014. god.

Na EST-mikrosatelitnom lokusu SsrPt_ctg7731 detektovana su četiri alela (dužina 208, 210, 218 i 220 bp, slike 7-26 i 7-27), koji formiraju jedan homozigotni (genotip 1: 210/210) i tri heterozigotna genotipa (genotip 2: 208/218, genotip 3: 210/218, i genotip 4: 210/220) (tabela 4-10). U populaciji II detekovan je najmanji broj različitih alela i genotipova, odnosno, kod svih jedinki uočen je jedan alel i fiksiran je homozigotni genotip 1, dok su u populaciji III detektovana sva četiri genotipa. Dobijena heterozigotnost (H_o) varira od 0.000 u populaciji II do 0.250 u populaciji V, sa prosekom od 0.176, a očekivana heterozigotnost (H_e) od 0.000 u populaciji II do 0.289 u populaciji III. Prosečna H_e za svih sedam ispitivanih populacija iznosi 0.183. U populacijama I, V, VI i VII koeficijent inbreedinga (F_{is}) je negativan ($H_o > H_e$, postoji veći broj heterozigota nego što bi se očekivalo u slučaju da je populacija u Hardy-Vajbergovoj ravnoteži, HWE), u populaciji IV $F_{is} = 0$ (populacija u HWE) i jedino je u populaciji III F_{is} pozitivan ($H_o < H_e$, postoji manji broj heterozigota nego što bi se očekivalo u slučaju da je populacija u HWE).

Tabela 4-10. Broj detektovanih alela (A), broj detektovanih genotipova (ng), dobijena i očekivana heterozigotnost (H_o i H_e) i koeficijent inbreedinga (F_{is}) na nivou EST-mikrosatelitnog lokusa SsrPt_ctg7731 u sedam populacija *P. nigra*.

Populacija ^{a)}	A	ng	H_o	H_e	F_{is}
<i>I</i>	2	2	0.200	0.189	-0.059
<i>II</i>	1	1	0.000	0.000	-
<i>III</i>	4	4	0.231	0.289	0.200
<i>IV</i>	2	2	0.125	0.125	0.000
<i>V</i>	3	3	0.250	0.235	-0.065
<i>VI</i>	2	2	0.231	0.212	-0.091
<i>VII</i>	2	2	0.200	0.189	-0.059
<i>I-VII</i>	4	4	0.176	0.183	0.007

^{a)} Geografski položaj i stanišne karakteristike populacija se nalaze u tabeli 3-1.

Sekvenca EST-mikrosatelitnog lokusa SsrPt_ctg7731 je do 07.03.2014. god. deponovana u Banci gena (GenBank) za jednu jedinku *Pinus taeda* i jednu jedinku *Picea sitchensis* (slika 4-13). Kod *Pinus taeda* dinukleotidni motiv AT se ponavlja 15 puta, dok u genomu *Picea sitchensis* ovaj mikrosatelitni lokus u potpunosti nedostaje.

Na elektroferogramima EST-mikrosatelita SsrPt_ctg865 kod svih ispitivanih individua crnog bora primećen je neobično veliki broj pikova (slike 7-28 i 7-29) što ukazuje na multilokus PCR amplifikaciju. Kada su iz Banke gena (GenBank) preuzete deponovane sekvence ovog lokusa kod 7 jedinki *P. taeda* utvrđeno je:

1. da su mesta u genomu *P. taeda* koja su poslužila za dizajniranje prajmera varijabilna, i da se u okviru mesta vezivanja F i R prajmera nalaze brojne tačkaste mutacije, što ukazuje na to da prajmeri za amplifikaciju ovog lokusa nisu pouzdani. Kod 7 individua, u okviru mesta vezivanja F prajmera uočene su dve tačkaste mutacije (prvih 20 nukleotida u poravnanju na slici 4-14 A), a u okviru mesta vezivanja R prajmera 16 tačkastih mutacija (poslednjih 20 nukleotida u poravnanju na slici 4-14 D).

2. da postoje višestruka mesta vezivanja F i R prajmera u okviru genoma *P. taeda* te se njihovom primenom ne amplifikuje samo jedan region koji sadrži mikrosatelit, nego više ne-homologih lokusa. Naime, kod sekvence AC241312 individue *P. taeda*, uočena su po dva mesta vezivanja F i R prajmera i dva ne-homologa produkta PCR amplifikacije (lokus 1 i lokus 2 na slici 4-14). Prajmeri čijom primenom dolazi do multilokus PCR amplifikacije ne bi trebalo da se koriste za dalji rad.

4.3.2. Genetička diferencijacija populacija na nivou jedarnog genoma i analiza molekularne varijanse

S obzirom da se SsrPt_ctg7444 lokus pokazao kao monomorfan, a da se SsrPt_ctg865 ne može koristiti usled multilokus PCR amplifikacije, dalje analize su rađene samo na nivou lokusa SsrPt_ctg7731. Analizom molekularne varijanse dobijena je negativna vrednost parametra genetičke diferencijacije populacija, *F_{st}* (tabela 4-11), koja nije statistički značajna ($p = 0.822$), što ukazuje na to da ne postoji genetička diferencijacija ispitivanih populacija crnog bora, i da ukupna detektovana molekularna varijabilnost otpada isključivo na varijabilnost unutar populacija (ne postoji interpopulaciona komponenta molekularne varijabilnosti). Takođe, negativna vrednost *F_{st}* može da ukazuje i da su pojedine individue iz različitih populacija genetski sličnije nego individue u populaciji. Poređenje vrednosti parametra genetičke diferencijacije između parova populacija *P. nigra* (*population pairwise F_{st}*) na nivou SsrPt_ctg7731 lokusa takođe je pokazalo da ne postoji njihova genetička diferencijacija (tabela 4-12).



Slika 4-14. Prikaz poravnanja sekvenci EST-mikrosatelita SsrPt_ctg865 kod 7 jedinki *Pinus taeda* deponovanih u Banci gena (GenBank) do 07.03.2014. god.

Tabela 4-11. Analiza molekularne varijanse (AMOVA) na nivou EST-SSR SsrPt_ctg7731 u sedam autohtonih populacija *Pinus nigra*.

Izvor variranja	d.f.	Zbir kvadrata	Komponente varijanse	Procenat variranja
Između populacija	6	0.309	-0.00183 Va	-2.04
Unutar populacija	147	13.477	0.09168 Vb	102.04
Ukupno	153	13.786	0.08984	
Fst = -0.020, p = 0.822				

Tabela 4-12. Poređenje parova populacija *P. nigra* (population pairwise Fst) na nivou EST-SSR SsrPt_ctg7731 (Fst vrednosti su date ispod, a p vrednosti iznad dijagonale).

Fst	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>VI</i>	<i>VII</i>
<i>I</i>	0.000	0.198	0.820	0.991	0.991	0.991	0.991
<i>II</i>	0.060	0.000	0.171	0.505	0.162	0.216	0.171
<i>III</i>	-0.032	0.059	0.000	0.694	0.991	0.991	0.766
<i>IV</i>	-0.050	0.021	-0.026	0.000	0.991	0.658	0.991
<i>V</i>	-0.041	0.052	-0.037	-0.038	0.000	0.991	0.991
<i>VI</i>	-0.045	0.068	-0.027	-0.036	-0.035	0.000	0.991
<i>VII</i>	-0.053	0.060	-0.032	-0.050	-0.041	-0.045	0.000

Takođe, utvrđen je i intenzivan protok gena između svih istraživanih populacija *P. nigra* ($N_m \gg 1$, tabela 4-13), pri čemu treba imati u vidu da N_m vrednost izračunata na osnovu Fst parametra odslikava istorijski a ne savremeni protok gena.

Tabela 4-13. Broj imigranata (protok gena – N_m) između istraživanih populacija *P. nigra*.

Nm	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>VI</i>	<i>VII</i>
<i>I</i>							
<i>II</i>	7.89						
<i>III</i>	inf	7.98					
<i>IV</i>	inf	23.78	inf				
<i>V</i>	inf	9.06	inf	inf			
<i>VI</i>	inf	6.81	inf	inf	inf		
<i>VII</i>	inf	7.89	inf	inf	inf	inf	

4.3.3. Diskusija rezultata ispitivanja jedarnih EST-mikrosatelita

Varijabilnost nuDNK borova neuporedivo je manje istraživana u odnosu na cpDNK i mtDNK. Kod *P. nigra* diverzitet jedarnog genoma analiziran je isključivo na nivou alozima ($H_e = 0.180 - 0.257$, 5 populacija, Scaltsoyiannes et al., 1994; $H_e = 0.03 - 0.28$, $H_s = 0.219$ i $H_t = 0.287$, 5 populacija, Aguinagalde et al., 1997; $H_e = 0.279 - 0.438$, 9 populacija, Tsaktsira et al., 1998; $H_e = 0.249$, 13 populacija; Scaltsoyiannes et al., 2009), dok jedarni EST- i genomski mikrosateliti do sada nisu ni testirani kod ove vrste. Međutim, u populaciono-genetičkim studijama drugih vrsta roda *Pinus*, nuSSRs su pokazali visok nivo genetičkog diverziteta, što je i u saglasnosti sa elementarnim životnim i ekološkim svojstvima četinara. Prema literaturnim podacima, H_e borova, na nivou nuSSRs, varira od 0.940 kod *P. radiata* (1 populacija, Fisher et al., 1998) do 0.403 kod *P. pinaster* (27 populacija, Naydenov et al., 2014). U ovoj studiji jedan testirani jedarni ESR-SSR lokus se pokazao kao monomorfan, a na nivou drugog utvrđen je izuzetno nizak prosečni genetički diverzitet ($H_e = 0.183$). Ovako nizak nivo nuSSR genetičkog diverziteta borova poznat je samo još kod kamenog bora *P. pinea*, vrste kod koje je utvrđeno gotovo potpuno odsustvo genetičkog diverziteta ne samo na nivou nuSSR (0.11 kod *P. pinea*, 33 populacije, Pinzauti et al., 2012) već i na nivou alozima ($H_e = 0.011$; Fallour et al., 1997) kao i hloroplastnih mikrosatelita ($H_e = 0.019$; Vendramin et al., 2008). Smatra se da je tokom klimatskih fluktuacija u periodu Kvartara ova kserotermna vrsta preživela izuzetno snažan efekat "uskog grla" (*bottleneck effect*) odnosno rapidno smanjenje brojnosti, s obzirom da je tokom poslednje glacijacije mogla da opstane isključivo u najjužnijim tačkama refugijuma u kojima su postojali povoljni ekološki uslovi za njen opstanak. Ovo je za posledicu imalo drastično smanjenje brojnosti i efektivne veličine populacija kao i gubitak genetičkog diverziteta. Sa druge strane, visok nivo genetičkog diverziteta crnog bora je već utvrđen na nivou alozima (Scaltsoyiannes et al., 1994; 2008; Aguinagalde et al., 1997; Tsaktsira et al., 1998) i hloroplastnih mikrosatelita (Naydenov et al., 2006; Afzal-Rafii and Dodd, 2007; Jaramillo-Correa et al., 2010; Soto et al., 2010) za koje je poznato da imaju nižu stopu mutacija od jedarnih mikrosatelita (Angioi et al., 2009; Ismail, 2010). Stoga se može pretpostaviti da se u odsustvu genetičkog drifta praćenog izolacijom i lokalnom adaptacijom, vezanosti mikrosatelitnih lokusa za lokuse koji su pod delovanjem purifikujuće selekcije i drugih procesa koji bi mogli dovesti do toga da kod ispitivanih

populacija postoji nizak nivo genetičkog diverziteta na nivou jedarnih EST-mikrosatelita i visok nivo genetičkog diverziteta na nivou hloroplastnih mikrosatelita, uočeni nizak nivo genetičkog diverziteta na jednom jedarnom EST-mikrosatelitnom lokusu zapravo ne oslikava realan nivo genetičkog diverziteta crnog bora na nivou jedarne DNK već da ispitivani mikrosatelitni lokus nije reprezentativan. U prilog tome ide i činjenica da je kod borova na osnovu njihovih elementarnih životnih i ekoloških svojstava, očekivan visok nivo heterozigotnosti i genetičkog diverziteta na nivou jedarnog genoma. Takođe, navedeni lokus je dizajniran za druge vrste a ne za *P. nigra*, i analizom sekvenci drugih vrsta borova dostupnih u banci gena, on je i kod njih monomorfan.

Na osnovu jedinog polimorfnog EST-SSR lokusa (SsrPt_ctg7731), nije utvrđena diferencijacija između ispitivanih populacija *P. nigra* ($F_{st} = -0.020$, $p = 0.822$). S obzirom da niža F_{st} vrednost ukazuje na veći protok gena, može se pretpostaviti izuzetno visoka genetička razmena između populacija, koja bi bila beskonačna ukoliko bi se negativna F_{st} vrednost prevela u nulu i iskoristila za izračunavanje efektivnog protoka gena po generaciji korišćenjem formule $F_{st} = (H_t - H_s)/H_t$. Međutim, treba napomenuti da vrednosti N_m izračunate na osnovu F_{st} parametra odslikavaju istorijski a ne savremeni protok gena (Bossart and Prowell, 1998; Sork et al., 1999), te se zaključci o savremenom protoku gena ne mogu izvoditi. Takođe, upitno je korišćenje samo jednog i to ne-reprezentativnog mikrosatelitnog lokusa za izračunavanje protoka gena.

4.4. Hloroplastni mikrosateliti (cpSSRs)

Varijabilnost, diferencijacija i srodnost istraživanih populacija *Pinus nigra* na nivou hloroplastnog genoma utvrđena je analizom tri hloroplastna mikrosatelita (cpSSRs): Pt15169, Pt30204 i Pt87268 (kodovi prema Vendramin et al., 1996).

4.4.1. Genetički diverzitet na nivou hloroplastnog genoma

Kod 104 istraživane jedinke *P. nigra* iz sedam autohtonih populacija identifikovano između 5 i 9 alela na svakom mikrosatelitnom lokusu (tabela 4-14 i slika 4-15). Najveći broj alela na sva 3 lokusa detektovan je u populaciji VI (16 alela), a zatim slede populacije IV (14), I, V, VII (12), II i III (11). Prosečan broj alela po lokusu po populaciji je 4.2 (tabela 4-14). Ukupno je detektovano 22 alela na sva tri cpSSRs, od kojih 7 ima malu učestalost (<1%). Prisustvo "privatnih" alela (alel koji je prisutan samo u jednoj populaciji i nigde više u ispitivanom uzorku) utvrđeno je u svim ispitivanim populacijama *P. nigra* (osim populacije III) (tabela 4-14).

Na lokusu Pt15169 identifikovano je pet alela, a najzastupljeniji su alel 116 bp (87.5%), detektovan u svim ispitivanim populacijama, i alel 117 bp (9.6%) koji izostaje u populaciji II (tabela 4-13 i slika 4-15). Učestalost najzastupljenijeg alela (116 bp) varira od 93.3% u populacijama I, II i IV do 78.6% u populaciji VII. Preostala tri alela predstavljaju "privatne" alele sa malom učestalošću (<1%) i to: alel 115 bp je privatni alel za populaciju II, alel 125 bp za populaciju VII i alel 127 bp za populaciju VI.

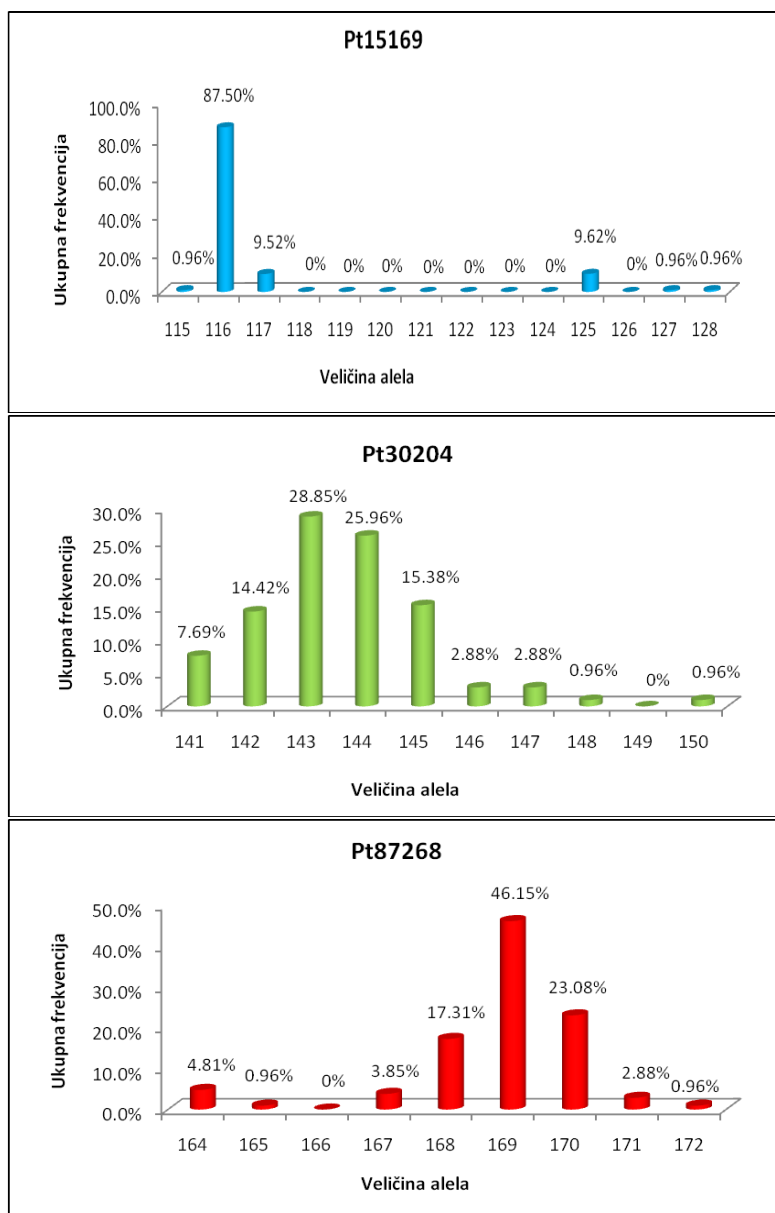
Na lokusu Pt30204 identifikovano je 9 alela, pri čemu su najzastupljeniji alel 143 bp (28.9%) i alel 144 bp (26.0%), oba detektovana u svih sedam populacija. Učestalost najzastupljenijeg alela (143 bp) najveća je u populaciji V (46.7%), a najmanja u populaciji IV (6.7%). Takođe, utvrđena su dva privatna alela: alel 148 bp u populaciji I i alel 150 bp u populaciji V.

Na lokusu Pt87268 identifikovano je 8 alela, a najzastupljeniji su alel 169 bp (46.2%) i alel 170 bp (23.1%), oba prisutna u svih sedam populacija. Učestalost najzastupljenijeg alela (169 bp) varira od 60.0% u populaciji II do 20.0% u populaciji I. Detektovana su dva privatna alela: alel 165 bp u populaciji VI i alel 172 bp u populaciji IV.

Tabela 4-14. Učestalost (%) alela istraživanih cpSSRs u autohtonim populacijama *Pinus nigra* u Srbiji.

Lokus	Alel	Populacija ^{a)}							
		<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>VI</i>	<i>VII</i>	<i>I-VII</i>
Pt15169	115	-	6.67	-	-	-	-	-	0.96
	116	93.33	93.33	86.67	93.33	80.00	86.67	78.57	87.50
	117	6.67	-	13.33	6.67	20.00	6.67	14.29	9.62
	125	-	-	-	-	-	-	7.14	0.96
	127	-	-	-	-	-	6.67	-	0.96
Pt30204	141	6.67	-	20.00	13.33	6.67	6.67	-	7.69
	142	6.67	6.67	-	13.33	6.67	26.67	42.86	14.42
	143	33.33	20.00	33.33	6.67	46.67	33.33	28.57	28.85
	144	33.33	33.33	20.00	46.67	20.00	6.67	21.43	25.96
	145	13.33	33.33	20.00	6.67	13.33	20.00	-	15.38
	146	-	-	6.67	6.67	-	-	7.14	2.88
	147	-	6.67	-	6.67	-	6.67	-	2.88
	148	6.67	-	-	-	-	-	-	0.96
	150	-	-	-	-	6.67	-	-	0.96
Pt87268	164	-	-	-	-	6.67	6.67	21.43	4.81
	165	-	-	-	-	-	6.67	-	0.96
	167	6.67	6.67	-	-	-	6.67	7.14	3.85
	168	40.00	13.33	6.67	6.67	40.00	6.67	7.14	17.31
	169	20.00	60.00	53.33	53.33	46.67	46.67	42.86	46.15
	170	33.33	20.00	33.33	26.67	6.67	20.00	21.43	23.08
	171	-	-	6.67	6.67	-	6.67	-	2.88
	172	-	-	-	6.67	-	-	-	0.96

^{a)} Geografski položaj i stanišne karakteristike populacija se nalaze u tabeli 3-1.



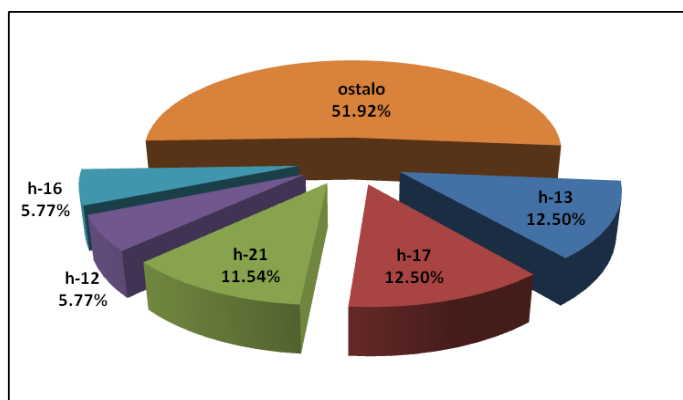
Slika 4-15. Učestalost (%) alela istraživanih cpSSRs (Pt15169, Pt30204, Pt87268) *Pinus nigra* u Srbiji

Detektovani aleli formiraju 38 različitih haplotipova, čija je zastupljenost (%) u istraživanim populacijama *P. nigra* prikazana u tabeli 4-15. Najveći broj haplotipova detektovan je u populacijama I i VI (12 haplotipova), a zatim slede populacije III (11), IV (10), V, VII (9) i II (8). Prosečan broj haplotipova po populaciji je 10.1 (tabela 4-16).

Za 22 haplotipa možemo reći da su "privatni", s obzirom da su detektovani samo u jednoj od ispitivanih populacija, i njihova zastupljenost je mala (<1%). Privatni haplotipovi su utvrđeni u svih sedam populacija. Najveći broj odnosno po 4 privatna haplotipa

detektovano je u populacijama I, IV, VI i VII, dok su u populacijama II, III i V utvrđena po 2 privatna haplotipa.

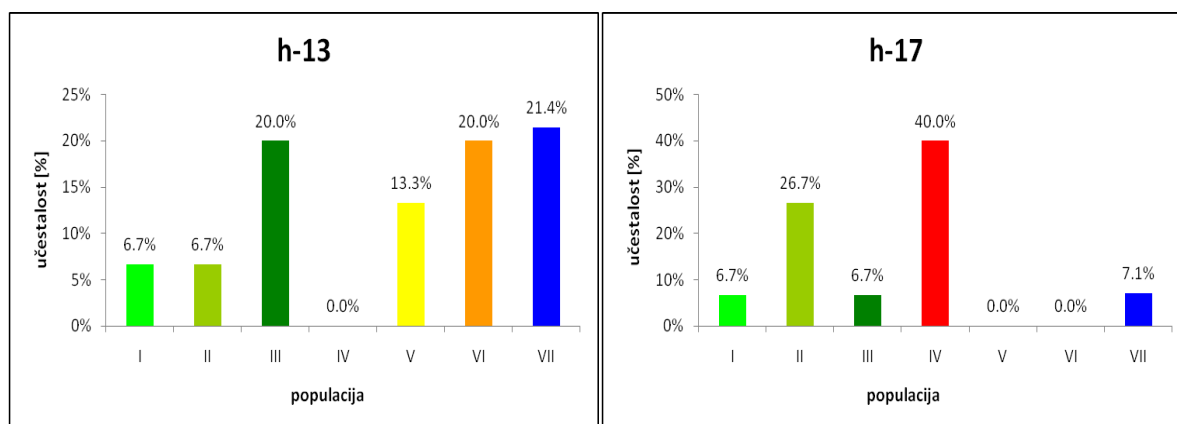
Pet najučestalijih haplotipova (zastupljenost >5%) zajedno čini 48.08% genetičkog diverziteta istraživanih populacija (tabela 4-15, slika 4-16). Najzastupljeniji haplotipovi u ispitivanim populacijama *P. nigra* su h-13, koji se javlja u 6 i h-17 u 5 populacija, a zatim h-21 (6), h-12 (3) i h16 (3).



Slika 4-16. Učestalost (%) najzastupljenijih haplotipova (preko 5%) *Pinus nigra* u Srbiji

Učestalost najčešćeg haplotipa, h-13, varira od 21.4% u populaciji VII (var. *banatica*) do 6.7% u populacijama I i II (ssp. *nigra*). Populaciju IV (var. *gocensis*) odlikuje izuzeno visoka zastupljenost (40.0%) drugog najčešćeg haplotipa, h-17 (slika 4-17).

Zastupljenost haplotipa h-21 najveća je u populaciji II (ssp. *nigra*; 26.7%), dok u populaciji VII (var. *banatica*) ovaj haplotip nije detektovan. Haplotip h-12 ima istu zastupljenost (13.3%) u sve tri populacije u kojima se javlja (I, II-ssp. *nigra* i V–var. *gocensis*), dok je učestalost h-16 veća u populaciji V (var. *gocensis*; 20.00%), nego u populacijama I (ssp. *nigra* 13.3%) i III (ssp. *nigra*; 6.7%) (tabela 4-15).



Slika 4-17. Učestalost (%) dva najzastupljenija haplotipa u sedam populacija *Pinus nigra*

Tabela 4-15. Učestalost (%) detektovanih haplotipova u autohtonim populacijama *Pinus nigra* u Srbiji.

Haplotip	Kod	Populacija ^{a)}							Sve populacije
		<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>VI</i>	<i>VII</i>	
115/142/170	h-1	-	6.67	-	-	-	-	-	0.96
116/141/168	h-2	-	-	-	6.67	6.67	-	-	1.92
116/141/169	h-3	-	-	6.67	-	-	6.67	-	1.92
116/141/170	h-4	6.67	-	13.33	-	-	-	-	3.85
116/141/171	h-5	-	-	-	6.67	-	-	-	0.96
116/142/164	h-6	-	-	-	-	-	6.67	21.43	3.85
116/142/167	h-7	-	-	-	-	-	6.67	-	0.96
116/142/168	h-8	6.67	-	-	-	-	-	-	0.96
116/142/169	h-9	-	-	-	-	6.67	-	7.14	1.92
116/142/170	h-10	-	-	-	6.67	-	6.67	-	1.92
116/143/165	h-11	-	-	-	-	-	6.67	-	0.96
116/143/168	h-12	13.33	13.33	-	-	13.33	-	-	5.77
116/143/169	h-13	6.67	6.67	20.00	-	13.33	20.00	21.43	12.50
116/143/170	h-14	13.33	-	6.67	6.67	-	-	-	3.85
116/144/167	h-15	6.67	-	-	-	-	-	-	0.96
116/144/168	h-16	13.33	-	6.67	-	20.00	-	-	5.77
116/144/169	h-17	6.67	26.67	6.67	40.00	-	-	7.14	12.50
116/144/170	h-18	6.67	6.67	-	-	-	6.67	14.29	4.81

116/144/172	h-19	-	-	-	6.67	-	-	-	0.96
116/145/168	h-20	6.67	-	-	-	-	-	-	0.96
116/145/169	h-21	6.67	26.67	13.33	6.67	13.33	13.33	-	11.54
116/145/170	h-22	-	6.67	-	-	-	6.67	-	1.92
116/145/171	h-23	-	-	6.67	-	-	-	-	0.96
116/146/169	h-24	-	-	-	-	-	-	7.14	0.96
116/146/170	h-25	-	-	6.67	6.67	-	-	-	1.92
116/147/167	h-26	-	6.67	-	-	-	-	-	0.96
116/147/170	h-27	-	-	-	6.67	-	-	-	0.96
116/147/171	h-28	-	-	-	-	-	6.67	-	0.96
116/150/164	h-29	-	-	-	-	6.67	-	-	0.96
117/142/169	h-30	-	-	-	6.67	-	-	-	0.96
117/142/170	h-31	-	-	-	-	-	-	7.14	0.96
117/143/168	h-32	-	-	-	-	-	-	7.14	0.96
117/143/169	h-33	-	-	6.67	-	13.33	6.67	-	3.85
117/143/170	h-34	-	-	-	-	6.67	-	-	0.96
117/144/170	h-35	-	-	6.67	-	-	-	-	0.96
117/148/170	h-36	6.67	-	-	-	-	-	-	0.96
125/142/167	h-37	-	-	-	-	-	-	7.14	0.96
127/142/168	h-38	-	-	-	-	-	6.67	-	0.96

^{a)} Geografski položaj i stanišne karakteristike populacija se nalaze u tabeli 3-1.

Detektovan je izuzetno visok prosečni i totalni diverzitet haplotipova: $H_s = 0.926$ i $H_t = 0.949$. Najveći H_s (ekvivalent H_e kod diploidnih genoma; Weir, 1996) detektovan je u populacijama I (ssp. *nigra*) i VI (ssp. *pallsiana*) ($H_s = 0.978$ i 0.962 , respektivno), a najmanji u populaciji IV (var. *gocensis*) ($H_s = 0.857$) (tabela 4-16).

Tabela 4-16. Broj detektovanih alela (A), prosečan broj alela po lokusu (b.a./l.), broj detektovanih haplotiva (nh), nepristrasni prosečni i totalni diverzitet haplotipova (H_s i H_t ; Nei, 1978), i globalni parametri genetičke diferencijacije (G_{st} i R_{st}) između istraživanih populacija *Pinus nigra*.

Populacija ^{a)}	N ^{b)}	A	b.a./l.	nh	H_s	H_t	G_{st}/R_{st}
I	15	12	4	12	0.978		
II	15	11	3.67	8	0.876		
III	15	11	3.67	11	0.952		
IV	15	14	4.67	10	0.857		
V	15	12	4	9	0.933		
VI	15	16	5.33	12	0.962		
VII	14	12	4	9	0.923		
I-VII	104	22	4.24	38	0.926	0.949	0.024/0.066

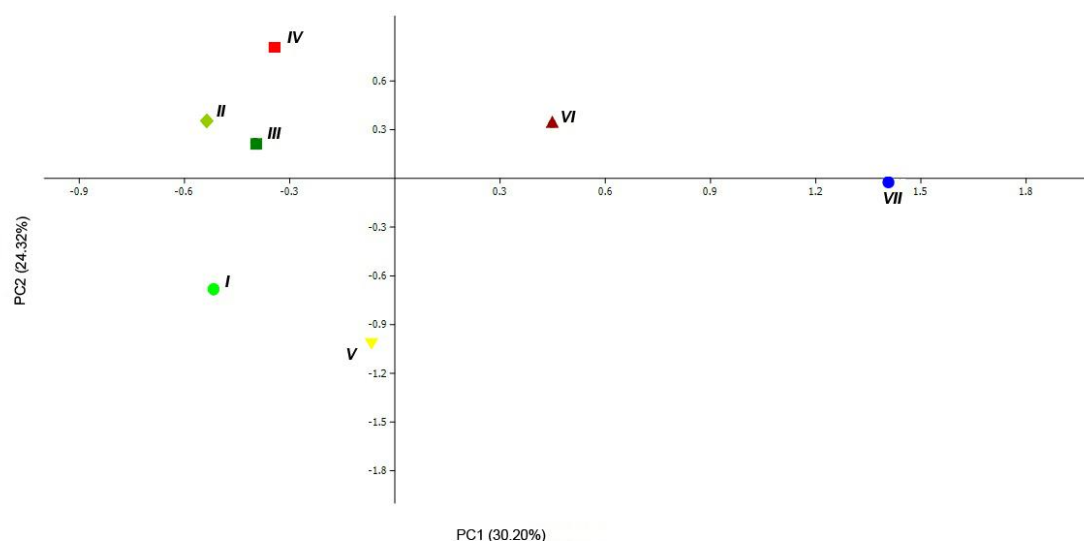
^{a)} Geografski položaj i stanišne karakteristike populacija se nalaze u tabeli 3-1.
^{b)} Broj analiziranih jedinki

4.3.2. Genetička diferencijacija populacija na nivou hloroplastnog genoma i analiza molekularne varijanse

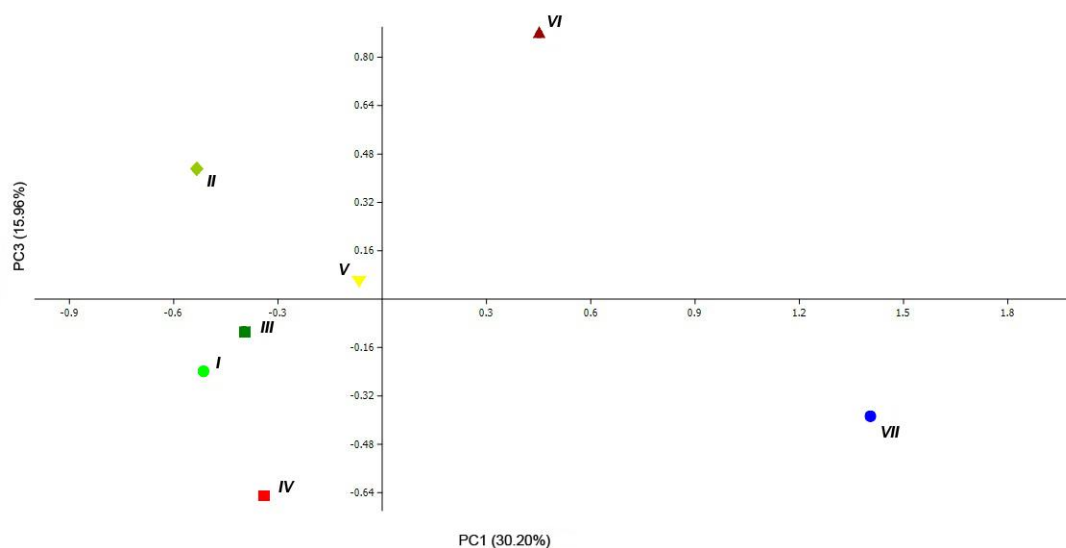
Na nivou hloroplastnog genoma, utvrđen je nizak stepen genetičke diferencijacije između istraživanih populacija *P. nigra* ($G_{st} = 0.024$ i $R_{st} = 0.066$; tabela 4-16).

Mulivarijaciona statistička analiza PCA (Principal Component Analysis) urađena je na osnovu transformisanih frekvencija detektovanih alela. Prve tri PC ose objašnjavaju 70.48% ukupne varijanse (osa 1: 30.20%; osa 2: 24.32%; osa 3: 15.96%). Kada se posmatra rasipanje skorova populacija u prostoru definisanom osama PC1 i PC2 (slika 4-18), jasno se uočava tendencija formiranja tri grupe populacija: prva grupa, koju čine populacije I-V (Banjska stena, Omar, Zmjevački potok, Priboj i Goč),

pokazuje negativne vrednosti za PC1, dok se u pozitivnom delu PC1 nalazi druga grupa, koja se sastoji od populacije VI (Jarešnik), i treća grupa, koju čini populacija VII (Lazareva reka). Međutim, u okviru prve grupe, populacije II, III i IV su jasno odvojene po PC2 od populacija I i V (populacije II, III i IV sa pozitivnim a populacije I i V sa negativnim vrednostima za PC2). Na ovaj način se na osnovu sličnosti tipa varijabilnosti frekvenci alela mogu izdvojiti tri grupe populacija u istraživanom uzorku: 1. populacije I-V distribuirane su u zapadnoj i centralnoj Srbiji (ssp. *nigra* i var. *gocensis*); 2. populacija VI iz jugoistočne Srbije (ssp. *pallasiana*); i 3. populacija VII iz severoistočne Srbije (var. *banatica*); pri čemu su u okviru prve grupe populacija skorovi populacija II, III i IV grupisani zajedno, dok je skorovi populacija I i V donkele udaljeniji od ove grupe ali ipak relativno blizu. Kada se posmatra rasipanje skorova populacija u prostoru definisanom osama PC1 i PC3 (slika 4-19), uočava se identično razdvajanje populacija kao i u slučaju raspianja po osama PC1 i PC2, odnosno, u negativnom delu PC1 se nalazi prva grupa (populacije I-V), dok se u pozitivnom delu PC1 nalazi druga (VI) i treća grupa (VII), ali se sada u okviru prve grupe po pozitivnim vrednostima za PC3 odvajaju populacije II i V, a po negativnim vrednostima za PC3 populacije I, III i IV. Skorovi populacija VI i VII su jasno odvojeni od prve dve grupe, ali i između sebe: skor populacije VI se nalazi u pozitivnom delu, a skor populacije VII u negativnom delu PC3 ose.



Slika 4-18. Relativna pozicija skorova populacija na osnovu frekvence cpSSR alela u projekciji prve i druge PC ose

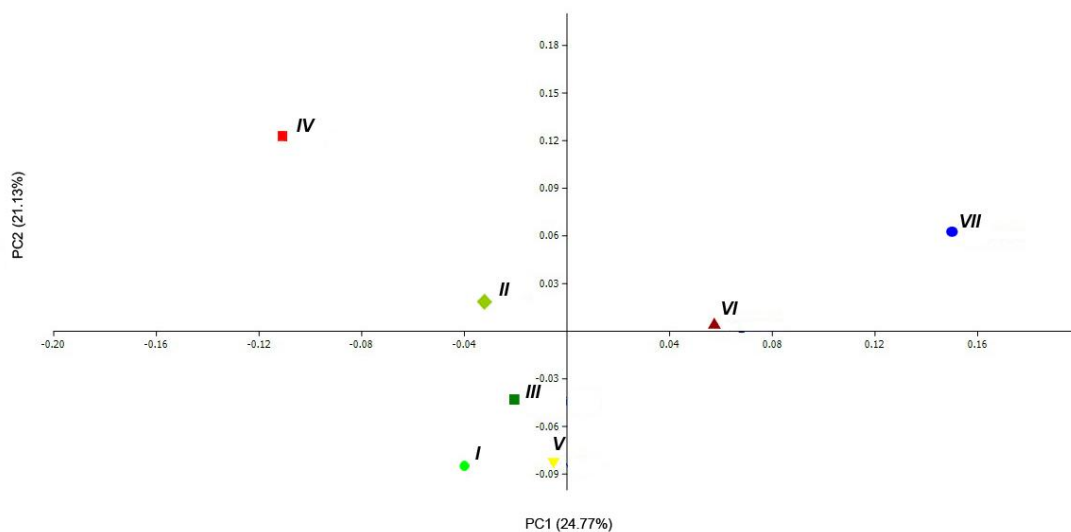


Slika 4-19. Relativna pozicija skorova populacija na osnovu frekvence cpSSR alela u projekciji prve i treće PC ose

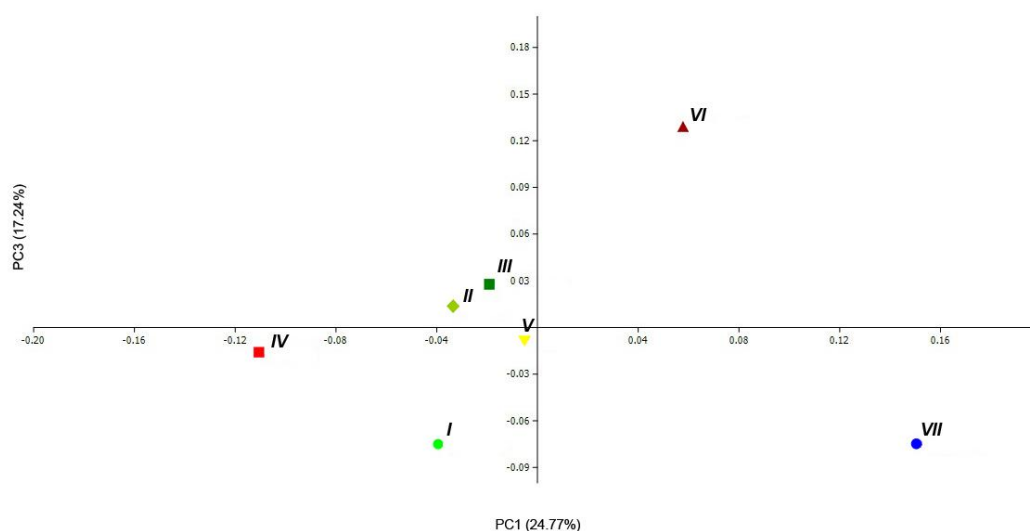
Mulivarijaciona statistička analiza PCA (Principal Component Analysis)

urađena je i na osnovu transformisanih frekvencija detektovanih haplotipova. Prve tri PC ose objašnjavaju 63.14% ukupne varijanse (osa 1: 24.77%; osa 2: 21.13%; osa 3: 17.24%). Kada se posmatra rasipanje skorova populacija u prostoru definisanom osama PC1 i PC2 (slika 4-20), uočava se tendencija formiranja četiri grupe populacija. U negativnom delu PC1 ose se nalazi prva grupa, koja se sastoji od populacije IV (Priboj), i druga grupa, koju čine populacije I-III i V (Banjska stena, Omar, Zmajevčki potok i Goč), dok se u pozitivnom delu PC2 nalazi treća grupa koju čini populacija VI (Jarešnik) i četvrta grupa koja se, takođe, sastoji od jedne populacije VII (Lazareva reka). Takođe, u okviru druge grupe, populacija II je odvojena po PC2 od populacija I, III i V (populacije II sa pozitivnom a populacije I, III i V sa negativnim vrednostima za PC2). Na ovaj način se na osnovu sličnosti tipa varijabilnosti frekvenci haplotipova mogu izdvojiti četiri grupe populacija u istraživanom uzorku: 1. populacija IV (var. *gocensis*) iz jugozapadne Srbije; 2. populacije I-III (ssp. *nigra*) distribuirane u zapadnoj i populacija V (var. *gocensis*) iz centralne Srbije; 3. populacije VI (ssp. *pallasiana*) i jugoistočne Srbije; i 4. populacija VII (var. *banatica*) iz severoistočne Srbije. Kada se posmatra rasipanje skorova populacija u prostoru definisanom osama PC1 i PC3 (slika 4-21), uočava se identično razdvajanje populacija kao i u slučaju raspianja po osama PC1 i PC2, odnosno, u negativnom delu PC1 se nalazi prva (IV) i druga grupa (I-III i

V), dok se u pozitivnom delu PC1 nalazi treća (VI) i četvrta grupa (VII), ali se sada u okviru druge grupe po pozitivnim vrednostima za PC3 odvajaju populacije II i III, a po negativnim vrednostima za PC3 populacije I i V. Ipak, skorovi populacija II, III i V su veoma blizu i zauzimaju središnji prostor u dvodimenzionalnom prostoru, od njih su nešto udaljeniji skor populacije I iz iste grupe, a još udaljeniji skor populacije IV iz prve grupe. Skorovi populacija VI i VII su jasno odvojeni od prve dve grupe, ali i između sebe: skor populacije VI se nalazi u pozitivnom delu, a skor populacije VII u negativnom delu PC3 ose.

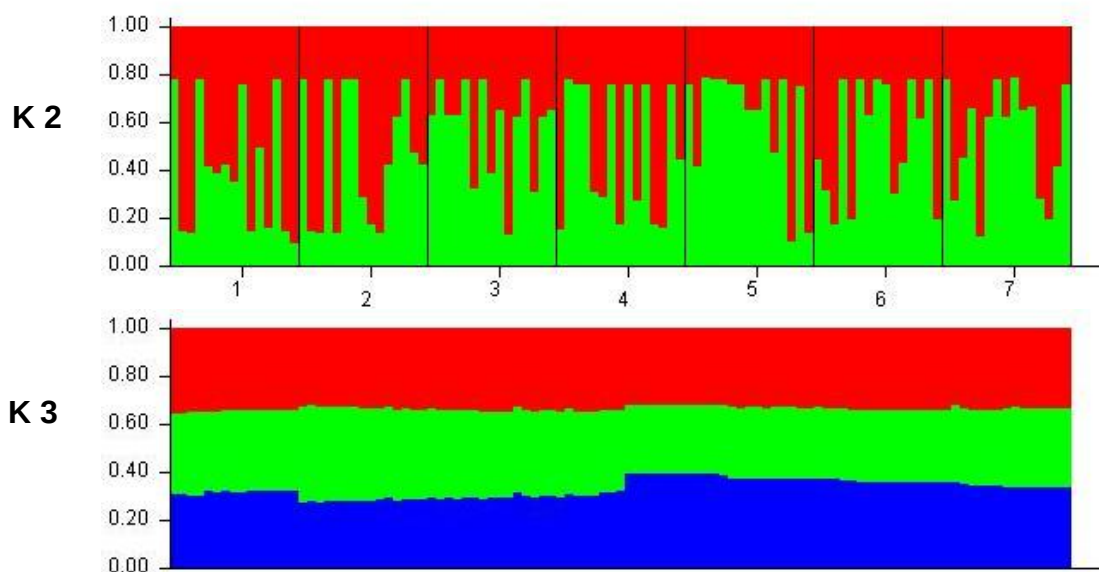


Slika 4-20. Relativna pozicija skorova populacija na osnovu frekvencije hloroplastnih haplotipova u projekciji prve i druge PC ose

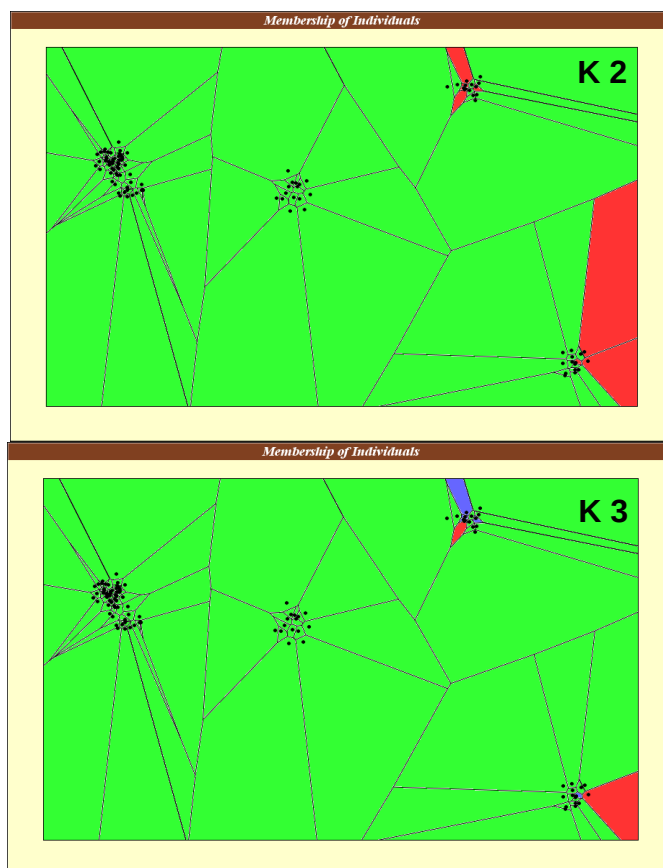


Slika 4-21. Relativna pozicija skorova populacija na osnovu frekvencije hloroplastnih haplotipova u projekciji prve i treće PC ose

Model-based clustering (STRUCTURE analiza) urađena je na nivou vrste *Pinus nigra* sa ciljem utvrđivanja optimalnog broja genetičkih grupa, K , pri čemu je testirano $K = 1 - 4$ genetičkih grupa. Međutim, STRUCTURE analiza je pokazala da sve ispitivane populacije crnog bora predstavljaju jednu genetičku grupu na nivou hloroplastnog genoma, pošto je grupisanje populacija čak i na $K = 2$ izostalo (slika 4-22). Naime, na $K = 2$, sve ispitivane individue crnog bora su svrstane u jedan od dva genska pool-a, ali je svaka individua sadržavala u većem ili manjem procentu i drugi genski pool. Na $K = 3$, sve individue su u manje-više podjednakom procentu sadržavale svaki od 3 genska pool-a. TESS analiza, koja za razliku od STRUCTURE analize uzima u obzir i geografske distance između populacija, takođe je pokazala da sve ispitivane populacije crnog bora predstavljaju jednu genetičku grupu (slika 4-23). Na $K = 2$, najveći broj individua iz svih populacija je pripadao jednom genskom pool-u, dok je svega nekoliko individua iz populacija VI i VII pripadalo drugom genskom pool-u. Na $K = 3$, svega nekoliko individua iz populacije VII je pripadalo trećem genskom pool-u.



Slika 4-22. Utvrđivanje optimalnog broja genetičkih grupa K u sedam populacija *P. nigra* na osnovu STRUCTURE analize



Slika 4-23. Utvrđivanje optimalnog broja genetičkih grupa K u sedam populacija *P. nigra* na osnovu TESS analize

Analiza molekularne varijanse (AMOVA) pokazala je visok stepen intrapopulacionog molekularnog varijabiliteta (tabela 4-17): 98.28% varijanse otpada na intrapopulacione razlike, a svega svega 1.72% na razlike između istraživanih populacija *P. nigra* ($F_{st} = 0.017$), pri čemu ni tako niska genetička diferenciranost populacija nije bila statistički podržana ($p = 0.108$). Na osnovu F_{st} vrednosti između parova populacija *P. nigra* (*population pairwise* F_{st}), možemo reći da je najveća F_{st} vrednost utvrđena između populacija IV i V (var. *gocensis*) ($F_{st} = 0.066$, $p = 0.072$) i populacije VII (var. *banatica*) u odnosu na populacije I i II (*ssp. nigra*) ($F_{st} = 0.050$, $p = 0.135$ i 0.047 , $p = 0.153$, respektivno). Međutim nijedna od F_{st} vrednosti prikazanih u tabeli 4-18 nije statistički značajna ($p > 0.05$).

Tabela 4-17. Analiza molekularne varijanse (AMOVA) na nivou cpSSRS u sedam autohtonih populacija *Pinus nigra*.

Izvor variranja	d.f.	Zbir kvadrata	Komponente varijanse	Procenat variranja
Između populacija	6	6.471	0.01499 Va	1.72
Unutar populacija	97	83.019	0.85587 Vb	98.28
Ukupno	103	89.490	0.87086	
Fst = 0.017, p = 0.108				

Tabela 4-18. Poređenje parova populacija *P. nigra* (population pairwise Fst) na nivou cpSSRs. (Fst vrednosti su date ispod, a p vrednosti iznad dijagonale).

Fst	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>VI</i>	<i>VII</i>
<i>I</i>	0.000	0.234	0.198	0.162	0.459	0.171	0.135
<i>II</i>	0.035	0.000	0.757	0.694	0.198	0.559	0.153
<i>III</i>	0.019	-0.015	0.000	0.514	0.414	0.766	0.180
<i>IV</i>	0.041	-0.013	-0.005	0.000	0.072	0.180	0.207
<i>V</i>	0.000	0.030	0.008	0.066	0.000	0.324	0.153
<i>VI</i>	0.031	-0.006	-0.022	0.023	0.005	0.000	0.811
<i>VII</i>	0.050	0.047	0.030	0.026	0.029	-0.027	0.000

U hijerarhijskoj AMOVA-i, u kojoj su definisane dve regionalne grupe (populacije I-V (ssp. *nigra*) svrstane se u jednu, a populacije VI i VII (ssp. *pallasiana*) u drugu grupu) izračunata je raspodela ukupne molekularne varijabilnosti na međugrupnu, međupopulacionu u okviru grupa i unutarpopulacionu komponentu (tabela 4-19): 2.06% varijanse otpada na razlike između grupa, 0.73% na razlike između populaciju u okviru grupa, a 97.20% na intrapopulacione razlike. Međutim, ni jedna od vrednosti parametara genetičke diferencijacije nije statistički značajna ($p \geq 0.05$).

Tabela 4-19. Hijerarhijska analiza molekularne varijanse (AMOVA) sa na nivou cpSSRs sa dve *a priori* grupe u istraživanim populacijama *P. nigra*.

Izvor variranja	d.f.	Zbir kvadrata	Komponente varijanse	Procenat variranja
Između grupa	1	1.711	0.01817 Va	2.06
Između populacija unutar grupa	5	4.761	0.00646 Vb	0.73
Unutar populacija	97	83.019	0.085587 Vc	97.20
Ukupno	103	89.490	0.87086	
Fsc = 0.007, p = 0.29; Fst = 0.028, p = 0.11; Fct = 0.021, p = 0.09				

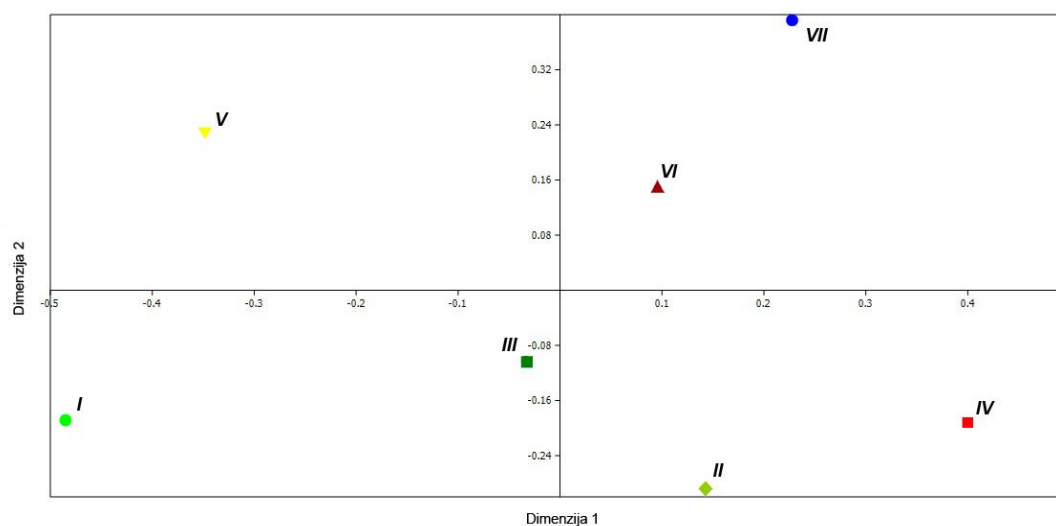
Takođe, utvrđen je i intenzivan protok gena između svih istraživanih populacija *P. nigra* ($Nm \gg 1$, tabela 4-20), pri čemu treba imati u vidu da, kao što je već navedeno za jedarne EST-mikrosatelite, Nm vrednost izračunata na osnovu F_{st} parametra oslikava istorijski a ne savremeni protok gena.

Tabela 4-20. Broj imigranata (protok gena – Nm) između istraživanih populacija *P. nigra*.

Nm	I	II	III	IV	V	VI	VII
I							
II	13.85						
III	24.58	inf					
IV	11.77	inf	inf				
V	675.00	16.42	65.00	7.02			
VI	15.64	inf	inf	20.99	105.28		
VII	9.48	10.10	16.19	18.79	16.50	inf	

Multivarijaciona statistička analiza - NMDS (Non-metric Multidimensional Scaling) urađena je na osnovu vrednosti parametara genetičkih distanci između parova populacija (*pairwise population* F_{st} vrednosti) predstavljenih u Tabeli 4-18. Dobijena *stress* vrednost je iznosila 0.136, a na dijagramu definisanom sa dve dimenzije uočeno je odvajanje populacija II, IV, VI i VII po pozitivnim vrednostima Dimenzije 1, i populacija I, III i V po negativnim vrednostima ove dimenzije (slika 4-24). Po Dimenziji 2, po pozitivnim vrednostima su odvojene populacije V, VI i VII, a po negativnim vrednostima populacije I, II, III i IV. Na dijagramu se može uočiti

tendencija grupisanja skorova populacija I, II i III (*P. nigra* ssp. *nigra*) iako su oni dosta rasuti po Dimenziji 1, kao i tendencija grupisanja populacija IV i V (var. *gocensis*) sa ovom grupom. Međutim, skorovi populacija IV i V nisu grupisani zajedno već, naprotiv, izuzetno su udaljeni međusobno. Na dijagramu se, takođe, uočava tendencija grupisanja skorova populacija VI i VII (ssp. *pallasiana*) koji su i u PCA analizama, koje se zasnivaju na frekvencama alela i haplotipova a ne na genetičkim distancama između parova populacija, okarakterisani kao posebna grupa po tipu varijabilnosti. Takođe, zanimljivo je i to što se i u NMDS analizi i u PCA analizi koja se zasniva na frekvenci haplotipova (slike 4-20 i 4-21) određena distinktnost populacije IV u odnosu na sve ostale populacije osim, u određenoj meri, populacije II.



Slika 4-24. NMDS analiza na osnovu vrednosti parametara genetičkih distanci između parova populacija (*pairwise population* Fst vrednosti)

4.4.3. Diskusija rezultata ispitivanja hloroplastnih mikrosatelita

Iako se najveće prirodne populacije *P. nigra* nalaze na Balkanu i u Turskoj, genetički diverzitet ove vrste na nivou hloroplastnog genoma do sada je ispitivan samo u zapadnom delu njenog arela odnosno zapadno od Balkanskog poluostrva i Julijskih Alpa gde su, kontradiktorno, prirodne šume crnog bora relativno male i fragmentirane. I pored toga, izuzetno visok cpSSR diverzitet utvrđen je u svim istraživanim populacijama *P. nigra* širom zapadnog Mediterana ($H_e = 0.952-1.00$, 17 populacija, Afzal-Rafii and Dodd, 2007; $H_e = 0.903-0.959$, 7 populacija; Jaramillo-Correa et al., 2010), koji je u potpunosti uporediv sa detektovanim nivoom diverziteta u populacijama *P. nigra* iz Srbije (tabela 4-12). Poznato je da Balkansko, Apeninsko i Pirinejsko poluostrvo predstavljaju tzv. vruće tačke diverziteta četinara u Evropi, prvenstveno zbog uloge refugijuma tokom poslednje Pleistocenske glacijacije (Last Glacial Maximum, LGM). Kao rezultat neprekidnog prisustva, borovi imaju veći genetički diverzitet na ovim poluostrvima nego u ostalim delovima Evrope koje su rekolonizovani posle LGM (Naydenov, 2006). Ipak, na osnovu pregleda objavljenih rezultata cpSSR diverziteta evroazijskih borova, očigledno je da postoji ogromna varijabilnost: termofilni mediteranski borovi kao što su *P. brutia*, *P. eldarica*, *P. halepensis* i *P. pinea* pokazuju izuzetno niske nivoe ili čak odsustvo genetičkog diverziteta; *P. pinaster* ima intermedijarni položaj; dok se frigorofilni borovi, *P. sylvestris*, *P. nigra* i *P. uncinata* odlikuju najvećim stepenom genetičkog diverziteta (Bucci et al., 1998; Robledo-Arnuncio et al., 2005; Afzal-Rafii and Dodd, 2007; Vendramin et al., 2008; Jaramillo-Correa et al., 2010; Soto et al., 2010). Smatra se da su tokom klimatskih fluktuacija u periodu Kvartara kserotermni borovi preživeli izuzetno snažan efekat "uskog grla" (*bottleneck effect*) odnosno rapidno smanjenje brojnosti, s obzirom da su tokom poslednje glacijacije mogli da opstanu isključivo u najjužnijim tačkama refugijuma u kojima su postojali povoljni ekološki uslovi za njihov opstanak. Ovo je za posledicu imalo drastično smanjenje brojnosti i efektivne veličine populacija kao i gubitak genetičkog diverziteta. S obzirom na bolju adaptiranost na hladnije uslove, frigorofilni borovi su, verovatno, mogli da održe veće efektivne veličine populacija i genetičku varijabilnost, naročito u humidnijim regionima. Na primer, za *Pinus sylvestris* je objavljeno da je preživeo sve glacijalne faze u kontinentalnim visoravnima severne

Španije (Franco-Múgica et al., 2001), gde je utvrđen i visok nivo diverziteta cpSSR haplotipova (Robledo-Arnuncio et al., 2005), sličan nivou koji je detektovan i kod *P. nigra* u ovom i prethodnim istraživanjima. Robledo-Arnuncio i sar. (2005) ukazuju na mogućnost da je *P. sylvestris* uspeo da održi demografsku stabilnost tokom uzastopnih klimatskih ciklusa u severnoj Španiji i da je ovo verovatno slučaj i sa *P. nigra* i *P. unicata*. Detektovani nivo cpSSR diverziteta u populacijama *P. nigra* iz Srbije, takođe, ide u prilog konstataciji da su istraživane populacije verovatno preživele *in situ* LGM, a ne da su rekolonizovale ove prostore u postglacijalnom periodu, kao i da su tokom vremena u manjoj meri bile izložene rapidnim fluktuacijama brojnosti populacija.

Kao što se i očekivalo, s obzirom na intenzivno rasejavanje polena, a samim tim i hloroplastnog genoma kod četinara, utvrđen je nizak nivo cpSSR diferencijacije između istraživanih populacija *P. nigra* ($F_{st} = 0.017$, $p = 0.108$, $G_{st} = 0.024$, $R_{st} = 0.064$). Čak i u hijerarhijskoj AMOVA-i, u kojoj su definisane dve regionalne grupe (zapadna i istočna Srbija – ssp. *nigra* i *pallasiana*), svega 2.06% molekularne varijabilnosti otpada na razlike između grupa ($F_{ct} = 0.021$, $p = 0.09$). Najveći stepen cpSSR regionalne diferencijacije za *P. nigra* objavili su Afzal-Rafii i Dodd (2007) u analizi 17 populacija iz zapadnog Mediterana. Hijerarhijska AMOVA sa tri *a priori* grupe (Alpi, južna Španija, svi ostali regioni) pokazala je maksimalnu regionalnu diferencijaciju ($F_{st} = 0.43$), a druga najveća diferencijacija ($F_{st} = 0.35$) dobijena sa šest regionalnih grupa (Alpi, južna Španija, južna Italija, Korzika, Pirineji i južna Francuska). Ove vrednosti cpSSR diferencijacije su među najvišim publikovanim za borove (Viard et al., 2001) i čak blizu stepena diferencijacije između vrsta *Pinus eldarica* i *P. brutia* (Bucci et al., 1998), što ukazuje na veoma duboku divergenciju u okviru *P. nigra* u okviru areala. Sa druge strane, mali stepen cpSSR diferencijacije utvrđen je između populacija *P. nigra* iz južne Španije i Maroka ($G_{st} = 0.036$, $R_{st} = 0.057$; Jaramillo-Correa et al., 2010), što pokazuje da protok gena posredstvom polena može biti veoma intezivan i između populacija koje razdvaja značajna biogeografska barijera kao što je Gibraltarski moreuz i koje pripadaju različitim podvrstama (ssp. *salzmannii* i ssp. *mauretanica*).

Klaster analize koje se ne zasnivaju na genetičkim distancama već na Bayesian metodi, a koje ne uzimaju u obzir geografsku distribuciju populacija (STRUCTURE analiza) ili uzimaju u obzir i genetičke profile populacija i njihovu prostornu

distribuciju (TESS analiza) su, takođe, pokazale da sve ispitivane populacije *P. nigra* predstavljaju samo jednu genetičku grupu, što je u skladu sa rezultatima dobijenim ispitivanjem diferencijacije populacija na osnovu njihovih genetičkih distanci (F_{st} , G_{st} i R_{st}) i AMOVA analize. Za izračunavanje parametara diferencijacije populacija, F_{st} , G_{st} i R_{st} korišćene su frekvence alela. Međutim, globalne vrednosti ovih parametara i vrednosti parametara genetičke diferencijacije parova populacija (*pairwise population* F_{st}) su bile niske i statistički nepodržane, što ukazuje na nepostojanje genetičke strukture ispitivanih populacija. Kao što je već navedeno, takvi rezultati su u skladu i sa samom biologijom vrste i načinom disperzije gena. Međutim, kada su frekvence alela i haplotipova iskorišćene za PCA analizu a *pairwise population* F_{st} vrednosti za NMDS analizu, uočeni su određeni slični tipovi varijabilnosti u grupama populacija koji se donekle poklapaju sa rezultatima dobijenim na osnovu fitohemijskih analiza. Naime, i PCA analiza, zasnovana na frekvenci alela i haplotipova, i NMDS analiza, zasnovana na vrednostima genetičke diferencijacije parova populacija, su pokazale da se populacije *P. nigra* ssp. *nigra*, *P. nigra* ssp. *pallasiana* i *P. nigra* var. *banatica* mogu posmatrati kao zasebne grupe po tipu varijabilnosti. Osnovna razlika između PCA analize zasnovane na frekvenci haplotipova i NMDS analize, sa jedne strane, i PCA analize bazirane na frekvenci alela, sa druge strane, ogleda se u tome što prve dve analize ukazuju i na drugačiji tip varijabilnosti populacije Priboj (var. *gocensis*). Dobijena grupisanja populacija po tipu varijabilnosti su u određenoj meri u skladu i sa rezultatima dobijenim na osnovu fitohemijskih markera (*n*-alkana i terpena), koji, takođe, ukazuju na postojanje tri grupe populacija (*nigra*, *pallasiana*, i *banatica*). Međutim, iako oba kvalitativno različita tipa analiza podržavaju to da su dve populacije var. *gocensis* različite, fitohemijske analize na osnovu *n*-alkana ukazuju na sličnost populacija Priboj – Jarešnik i Goč – populacije iz zapadne Srbije (ssp. *nigra*) dok genetičke analize podržavaju samo sličnost tipa varijabilnosti populacija Goč – populacije iz zapadne Srbije (ssp. *nigra*), ali ne i Priboj – Jarešnik pošto je na osnovu genetičkih analiza uočen distinktan tip varijabilnosti populacije Priboj. Navedene razlike se mogu pripisati većem uticaju ekoloških faktora na varijabilnost sekundarnih biljnih metabolita, a sa druge strane, potencijalnoj intraspecijskoj i interspecijskoj hibridizaciji i introgresiji koje mogu dovesti do povećanja genetičkih razlika, odnosno, razlika u tipu varijabilnosti između populacija.

Uočene razlike u tipu varijabilnosti ispitivanih populacija crnog bora mogu biti posledica prisustva velikog broja privatnih alela i haplotipova u svim populacijama (22 alela na tri lokusa, 38 haplotipova detektovan kod svega 104 ispitivane individue, od kojih je 7 privatnih alela i 22 privatna haplotipa). Neki od tih alela i haplotipova mogu biti prisutni u ispitivanim populacijama crnog bora usled efekta intra- i interspecijske hibridizacije i introgresije. Naime, poznato je da je crni bor vrsta koja se intenzivno koristi za pošumljavanje, a prilikom pošumljavanja, poreklo individua može biti nepoznato (cf. Vedramin et al., 2000). To ukazuje na činjenicu da populacije crnog bora koje nisu prirodne, a koje se nalaze na većim ili manjim geografskim distancama od ispitivanih populacija, mogu sadržavati genetičke varijante koje su egzotične za Balkan, odnosno, mogu sadržavati genetičke varijante karakteristične za druge delove areala ove vrste. Imajući u vidu veliku moć ekspanzije polena crnog bora, uticaj ovakvog potencijalnog egzotičnog genskog pool-a ne može biti isključen. Sa druge strane, postoje podaci o interspecijskoj hibridizaciji između crnog i belog bora (von Wettstein, 1951; Vidaković, 1958; 1977; Moulalis and Mitsopoulos, 1975), a beli bor je na Balkanu često prisutan na istim lokalitetima kao i crni bor. To znači da se ni mogućnost interspecijske hibridizacije i introgresije barem u zapadnom delu Srbije gde se ove dve vrste sreću, ne može isključiti. Oba navedena procesa mogu u određenoj meri dovesti do diferencijalne pojave egzotičnih alela u ispitivanim populacijama crnog bora, a koji se prenose putem polena. Kolika je moć disperzije polena četinara najbolje se vidi iz primera *Abies alba* kod koje je detektovana genetička razmena između refugijuma na mediteranskim poluostrvima (Liepelt et al., 2010).

Sa druge strane, Afzal-Rafii i Dodd (2007) su u analizi 10 hloroplastnih mikrosatelita kod 311 individua crnog bora iz zapadnog Mediterana (17 populacija, 8 do 31 individua po populaciji) detektovali 68 alela (2-10 alela po lokusu) i 238 haplotipova. A kod *Picea abies*, kod 1105 individua iz celog areala na tri hloroplastna lokusa je detektovano svega 41 haplotip (Vendramin et al., 2000). Navedeni podaci mogu ukazivati i na to da u ovoj studiji možda nije detektovana ukupna varijabilnost prisutna kod crnog bora na ispitivanim hloroplastnim lokusima, i da je vrlo verovatno da bi se sa povećanjem broja analiziranih individua po populaciji najverovatnije detektovali i novi aleli i haplotipovi. Sa druge strane, moguće je da bi sa povećanjem broja analiziranih individua po populaciji neki privatni bili detektovani i u drugim

populacijama, te se više ne bi mogli smatrati privatnim. Stoga se privatni aleli moraju tretirati sa velikom pažnjom.

Iako prisustvo privatnih alela u populacijama može ukazivati na veliku genetičku diferencijaciju populacija i/ili dugotrajnu izolovanost populacija koja bi omogućila generisanje određenog broja razlilitih alela u različitim populacijama tokom vremena (Aleksić and Geburek, 2014), ovakve interpretacije velikog broja privatnih alela u svim ispitivanim populacijama crnog bora, dakle, moraju biti uzete sa rezervom. A kao što je već navedeno, ni jedan parametar genetičke diferencijacije populacija nije bio statistički značajan, i AMOVA i analize zasnovane na Bayesian metodi su, takođe, ukazale na to da sve ispitivane populacije predstavljaju samo jedan genski pool.

4.5. Mitohondrijalna sekvenca *nad7* intron1

4.5.1. Karakteristike sekvence

Sekvencioniranje mtDNK lokusa *nad7* intron 1 uspelo je kod 99 jedinki *Pinus nigra* od ukupno 104 sekvencionirana uzorka. Za 37 individua urađeno je sekvencioniranje u oba smera (primenom F i R prajmera), a dužina svih dobijenih sekvenci bila je 984 bp. Za 62 individue urađeno je sekvenciranje samo u jednom smeru (primenom F prajmera), pri čemu je dužina dobijenih sekvenci bila od 331 bp kod jedinke P10 do 984 bp kod jedinki Z14, P6, P12, P15, G3, G4, G9, G11, J3, J9, J11, J15, L1, L4, L5, L11 i L13. Sekvenciranje sa drugim prajmerom nije urađeno kod svih jedinki zbog male varijabilnosti ovog regiona. Za sekvence koje su sekvencirane sa oba prajmera rađeno je sklapanje u cilju dobijanja kompletne sekvence za date individue.

U poravnanje sekvenci *nad7* intron 1 uključeno je 99 jedinki iz sedam populacija *P. nigra* iz ovog istraživanja, tri jedinke iz Španije i jedna jedinka iz Maroka (GeneBank accessions HQ185288, HQ185287, HQ185286, HQ185289, Jaramillo-Correa et al., 2010) i jedna jedinka *P. sylvestris* (EU072473, Pyhajarvi et al., 2008) koja je korišćena kao outgroup-a (slika 7-38).

Dužina poravnatih sekvenci *nad7* introna 1 bila je 991 bp. U okviru sekvenci ovog introna kod crnog bora iz Srbije je uočeno 5 pozicija na kojima su u elektroferogramima bili prisutni dvostruki pikovi koji ukazuju na prisustvo dva tipa sekvenci od kojih jedne sadrže jedan nukleotid a druge drugi nukleotid. Na takvim pozicijama su uvedene oznake za multiple nukleotide u skladu sa IUPAC kodom (*International Union of Pure and Applied Chemistry*):

- na poziciji 763 multipli nukleotid Y (C ili T) kod jedinki O6, O11, O13, Z5, Z13 i G15
- na poziciji 767 multipli nukleotid K (G ili T) kod jedinki B1, B2, B3, O7, Z13, G6 i G15
- na poziciji 773 multipli nukleotid K (G ili T) kod jedinki B1 i G15
- na poziciji 779 multipli nukleotid S (G ili C) kod jedinki Z2, Z3, Z6, Z7, Z8, Z10, Z12, G1, G8, G11 i J3

- na poziciji 844 multipli nukleotid S (G ili C) kod jedinki B1-B4, O3, O4, O6, O7, O8, O11, O12, Z1, Z5, Z9, Z13, P1, P4, P5, P7, P8, P9, P14, G6, G7, G10, G13-G15, J1, J7, J8, L2, L3, L6, L7 i L15

Iako navedeni fenomen ukazuje na prisustvo heterogene populacije mitohondrija u okviru iste individue, činjenica da su multipli nukleotidi uočeni samo u okviru jednog kratkog regiona introna 1 *nad7* gena, odnosno od pozicije 763 do pozicije 844, koja se nalazi upravo na mestu na kojem je vršeno preklapanje sekvenci dobijenih putem sekvenciranja sa F i R prajmerom u cilju dobijanja kompletnih sekvenci ovog introna, i da je kvalitet sekvenci dobijenih sa F i R prajmerom na 3' kraju bio nešto slabiji, govori u prilog tome da oni predstavljaju artefakt usled slabijeg kvaliteta sekvenci. Stoga, navedene pozicije nisu korišćene u daljim analizama.

Na osnovu kompletnih sekvenci introna 1 *nad7* gena kod 62 individua crnog bora iz Srbije kao i parcijalnih sekvenci kod 37 individua, uočeno je samo jedno varijabilno mesto kod jedinki *P. nigra* iz Srbije. Naime, na poziciji 328 detektovana je supstitucija tipa transverzije G→T u okviru poli(T) regiona koji se može smatrati slabo varijabilnim mikrosatelitom pošto kod 77 individua ovaj mikrosatelit sadrži 9 timina, a kod 22 individue 10 timina. Na osnovu mutacije na poziciji 328 utvrđena su dva mitohondrijalna haplotipa u istraživanim populacijama *P. nigra* iz Srbije: A – koji na poziciji 328 sadrži timin, označen kao **SRA**, i B – koji na datoj poziciji sadrži guanin, označen kao **SRB** (slika 7-38 i tabela 4-21). Kod jedinki *P. nigra* iz Španije i Maroka, varijabilan je isti region sekvence *nad7* intron 1 pri čemu su identifikovana četiri haplotipa: **ES1** – koji na poziciji 317 sadrži C, na poziciji 318 -, i na poziciji 328 T, **ES2** – koji na poziciji 317 sadrži A, na poziciji 318 -, i na poziciji 328 T, **ES3** – koji na poziciji 317 sadrži A, na poziciji 318 -, i na poziciji 328 G (španski haplotipovi) i **MA4** – koji na poziciji 317 sadrži A, na poziciji 318 T, i na poziciji 328 G (marokanski haplotip). Iako na osnovu varijabilnog mesta na poziciji 328, španski haplotipovi ES2 i ES3 odgovaraju srpskim SRA i SRB, sve individue *P. nigra* iz Srbije razlikuju se od španskih i marokanskih u čak tri mutacije: na poziciji 435 je uočena transverzija C→G, pri čemu srpski imaju C, a ostali imaju G, na poziciji 472 je uočen indel, pri čemu srpski imaju C, a ostali imaju -, i na poziciji 520 je uočena transverzija C→A, pri čemu srpski imaju C, a ostali imaju A (tabela 4-21). Sekvenca *nad7* intron 1 kod *P. sylvestris* razlikuje se od *P. nigra* na osnovu pet indela različite dužine (od 6 do 64 bp, na

pozicijama 396, 445, 565, 775 i 931) i tri supstitucije tipa transverzije, na pozicijama 334, 337 i 889.

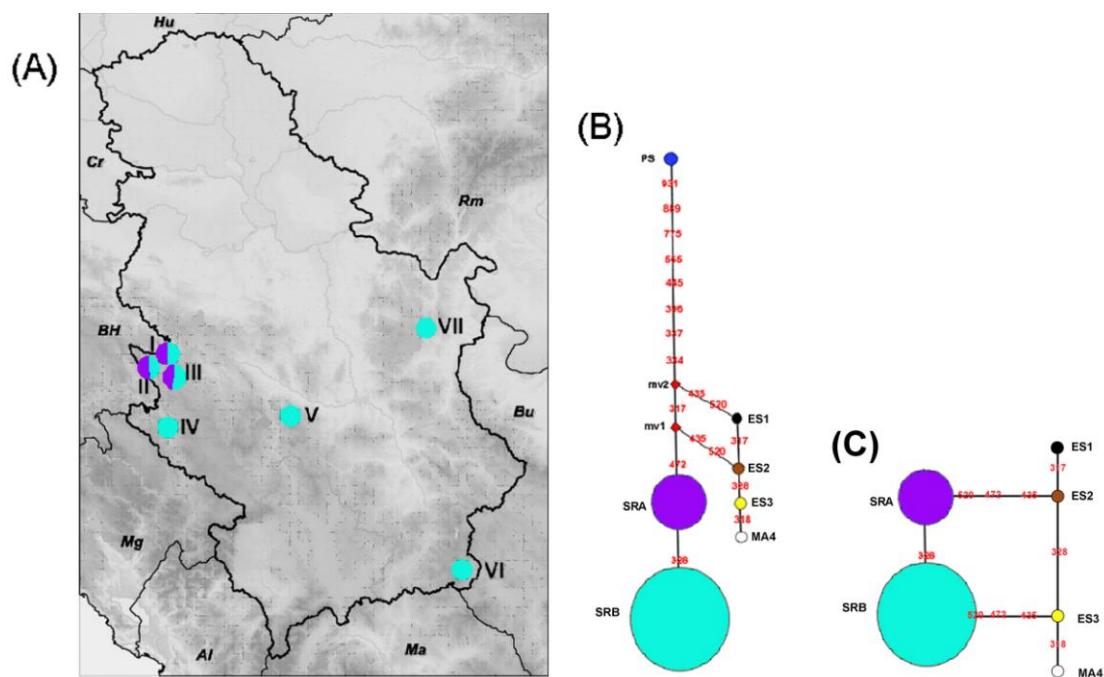
4.5.2. Genetički diverzitet i diferencijacija populacija na nivou mitohondrijalnog genoma

Na osnovu varijabilnosti *nad7* intron 1 kod 99 jedinki iz sedam populacija *P. nigra* iz Srbije utvrđena su samo dva mitohondrijalna haplotipa, pri čemu veću zastupljenost ima haplotip SRB (77.8%) u poređenju sa haplotipom SRA (22.2%) (tabela 4-22 i slika 4-22). Haplotip SRB je fiksiran kod svih jedinki iz populacija IV, V (var. *gocensis*), VI (ssp. *pallasiana*) i VII (var. *banatica*), dok je njegova zastupljenost u populacijama I-III (ssp. *nigra*) ~50%. Prema tome, drugi detektovani haplotip (SRA) utvrđen je samo u populacijama I-III (Tara), koje su determinisane kao tipični var. *nigra* u okviru ssp. *nigra*.

Distribucija haplotipova, haplotip stablo za čiju je konstrukciju korišćena outgroup-a (*P. sylvestris*) i haplotip stablo bez outgroup-e prikazani su na slici 4-25. Na haplotip stablu za čiju je konstrukciju korišćena outgroup-a jasno se mogu uočiti dve linije (slika 4-25B): prva se sastoji od dva srpska haplotipa (SRA i SRB) koje odvaja jedna mutacija, a druga od tri španska i jednog marokanskog (ES1, ES2, ES3 i MA4). Ove dve linije razdvajaju tri osnovne mutacije detektovane na pozicijama 435, 472 i 520. Interesantno je da haplotip SRB, koji je trenutno učestaliji u prirodnom populacija *P. nigra* iz Srbije, predstavlja izvedeni haplotip, na šta ukazuje njegova periferna pozicija u odnosu na centar stabla, dok je u španskoj kladi najmlađi marokanski haplotip. Takođe, na stablu se mogu uočiti i dva ancestralna hipotetička haplotipa mv1 i mv2 koji se razlikuju u jednoj mutaciji, i od kojih nastaju retikulacije ka španskim haplotipovima, tako da se postanak haplotipa ES2 može objasniti putem dve mutacije od mv1, ili putem jedne mutacije od haplotipa ES1, kojeg odvajaju dve mutacije od mv2. Očekivano, *P. sylvestris*, koji je korišćen kao outgroup-a, formira zasebnu liniju koja se razlikuje od hipotetičkog haplotipa mv2 u 8 mutacija, a od mv1 u 9 mutacija.

Tabela 4-21. Pozicije varijabilnih mesta u mtDNK sekvenci *nad7* intron1 kod dva haplotipa *P. nigra* iz Srbije (SRA i SRB), četiri iz južne Španije i Maroka (ES1, ES2, ES3 i MA4) i jednog haplotipa *P. sylvestris* (outgroup).

	Pozicija													
	317	318	328	334	337	396-427	435	445-508	472	520	565-614	775-805	889	931-936
Haplotipovi	A	1 b indel (T)	T	A	T	32 bp insercija	C	64 bp insercija	1 b indel (C)	C	50 bp insercija	31 bp insercija	G	6 bp insercija
SRA	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-
SRB	.	-	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-
ES1	C	-	.	.	.	.	G	.	-	A	.	.	.	-
ES2	.	-	.	.	.	.	G	.	-	A	.	.	.	-
ES3	.	-	G	.	.	.	G	.	-	A	.	.	.	-
MA4	.	.	G	.	.	.	G	.	-	A	.	.	.	-
<i>P. sylvestris</i>	C	-	.	T	G	-	.	-	-	.	-	-	T	.



Slika 4-25. (A) Geografska distribucija dva mtDNK haplotipa *Pinus nigra* u Srbiji (B) Haplotip stablo *P. nigra* na osnovu dva srpska mtDNK haplotipa (SRA i SRB, veličina krugova proporcijalna je učestalosti) za čiju je konstrukciju korišćena outgroup-a PS (*P. sylvestris*) (C) Haplotip stablo *P. nigra* za čiju konstrukciju nije korišćena outgroup-a. Prikazana su i tri haplotipa *P. nigra* iz Španije (ES1, ES2 i ES3) i jedan iz Maroka (MA4) kao i haplotip outgroup-e PS (*P. sylvestris*)

Na haplotip stablu za čiju konstrukciju nije korišćena outgroup-a, takođe se mogu uočiti dve linije (slika 4-25C): prva koja se sastoji od srpskih haplotipa SRA i SRB odvojenih jednom mutacijom i druga koja se sastoji od tri španska i jednog marokanskog (ES1, ES2, ES3 i MA4). Međutim, na ovom stablu je očigleno da individue crnog bora sa Balkanskog i Iberijskog poluostrva dele varijabilnost na poziciji 328, koja se u ovom slučaju može smatrati ancestralnom, a razlikuju se u mutacijama na tri pozicije (435, 472 i 520) koje su se desile tokom evolutivne istorije.

Utvrđen je mali prosečni i totalni diverzitet mtDNK haplotipova: $H_s = 0.229$ i $H_t = 0.357$. Populacije IV-VII odlikuju se potpunim odsustvom diverziteta ($H_s = 0,000$), s obzirom da je kod svih jedinki fiksiran haplotip SRB. Sa druge strane, približno ista frekventnost SRA i SRB u populacijama I-III, uticala je na relativno visok mtDNK diverzitet u ovim populacijama ($H_s = 0.533-0.538$). Vrednost parametra $G_{st} = 0.358$ ukazuje na umerenu genetičku diferencijaciju između istraživanih populacija *P. nigra* na nivou mitohondrijalnog genoma (tabela 4-22).

Tabela 4-22. Ukupan broj detektovanih haplotiva (nh), frekvencija haplotipova [%], nepristrasni prosečni i totalni diverzitet haplotipova (Hs i Ht; Nei, 1978) i Gst parametar genetičke diferencijacije između istraživanih populacija *Pinus nigra*.

Populacija ^{a)}	N ^{b)}	nh	frekvencija haplotipova [%]		Hs	Ht	Gst
			SRA	SRB			
<i>I</i>	14	2	50.0	50.0	0.538		
<i>II</i>	15	2	46.7	53.3	0.533		
<i>III</i>	15	2	53.3	46.7	0.533		
<i>IV</i>	15	1	0.0	100.0	0.000		
<i>V</i>	15	1	0.0	100.0	0.000		
<i>VI</i>	15	1	0.0	100.0	0.000		
<i>VII</i>	11	1	0.0	100.0	0.000		
<i>I-VII</i>	99	2	77.8	22.2	0.229	0.357	0.358

^{a)} Geografski položaj i stanišne karakteristike populacija se nalaze u tabeli 3-1.
^{b)} Broj analiziranih jedinki

4.5.3. Diskusija rezultata ispitivanja mtDNK sekvence *nad7* intron 1

Kao što je i očekivano, s obzirom na manju brzinu evolucije primarne sekvence nukleotida mtDNK u poređenju sa cpDNK (mtDNK evoluirala tri do četiri puta sporije od cpDNK, Laroche et al., 1997) i činjenicu da je na nivou mitohondrijalnog genoma ispitivana varijabilnost primarne sekvence nukleotida koje se generalno se odlikuju nižom stopom mutacija u odnosu na mikrosatelite, nivo diverziteta mtDNK haplotipova ($H_e = 0.30$) značajno je niži u odnosu na detektovani cpSSR diverzitet ($H_e = 0.93$). Identifikovana je samo jedna supstitucija kod predstavnika crnog bora iz Srbije na lokusu *nad7* intron 1 na osnovu koje su definisana 2 mitohondrijalna haplotipa. U okviru ove sekvence nisu uočeni visoko informativni minisatelitni motivi koji su detektovani u pojedinim mtDNK regionima nekih smrča (Sperisen et al., 2001; Bastein et al., 2003) i borova (Godbout et al., 2005). Iako je sličan nivo diverziteta *nad7* intron 1 utvrđen i u zapadnom delu areala *P. nigra* (četiri haplotipa u 7 populacija, $H_e = 0.12$, Jaramillo-Correa et al., 2010), polimorfizam ove sekvence znatno varira kod različitih vrsta borova. Lokus je monomorfan kod 3 populacije *P. halepensis* ($H_e = 0.00$, Jaramillo-Correa et al., 2010); dva haplotipa su detektovana u 9 populacija *P. pinaster*

($H_e = 0.00$, Jaramillo-Correa et al., 2010); tri haplotipa su utvrđena u 54 populacije široko rasprostranjenog *P. sylvestris* na osnovu varijabilnosti *nad7* intron 1 i dva haplotipa na osnovu *nad 1* intron B/C ($H_e = 0.14$, Naydenov et al., 2007); 9 haplotipova u 17 populacija *P. kvangtungensis* na osnovu *nad7* intron 1 i dva haplotipa na osnovu *cox-1-2* ($H_t = 0.85$, Tian et al., 2010); i čak 14 haplotipova je detektovano u 35 populacija *P. banksiana* na osnovu varijabilnosti *nad7* intron 1 ($H_e = 0.33$, Godbout et al., 2005). Prema ovakvim podacima očigledno je da se u okviru roda *Pinus* najveći nivo polimorfizma mtDNK uočava kod vrsta koje imaju najširu trenutnu distribuciju i za koje se pretpostavlja da nisu preživele ozbiljnije redukcije veličine populacija tokom glacijacija u Kvartaru, kao što je slučaj sa azijskim borom *P. kvangtungensis* i severnoameričkim *P. banksiana*. To je i u skladu sa činjenicom da su haploidni genomi osetljiviji na efekat genetičkog drifta i uskog grla u poređenju sa diploidnim jedarnim genomom (McCauley, 1994). U slučaju evroazijskih borova, veći mtDNK polimorfizam utvrđen je kod frigorofilnih borova *P. nigra* i *P. sylvestris*, koji imaju i širu trenutnu distribuciju, u odnosu na termofilniji *P. pinaster* i naročito *P. halepensis* (slična situacija je i sa cpSSR diverzitetom). U saglasnosti sa asimetričnim protokom gena kod Pinaceae i činjenicu da, na primer kod smrča (*Picea*), rasejavanje semena, a samim tim i mitohondrijalnog genoma, može biti i do 70 puta manje od rasejavanja polena i hloroplastnog genoma (Ennos, 1994; Gamache et al., 2003), veća genetička diferencijacija populacija *P. nigra* je očekivana i dobijena je na nivou mtDNK ($G_{st} = 0.358$) u odnosu na cpDNK ($G_{st} = 0.024$). Još veći stepen genetičke diferencijacije na nivou mtDNK objavili su Jaramillo-Correa i sar. (2010) za populacije *P. nigra* iz južne Španije i Maroka ($G_{st} = 0.828$), a tako visoka vrednost je i očekivana kod populacija jedne vrste koje su distribuirane u mnogo većem regionu nego ispitivane populacije crnog bora iz Srbije. Ove vrednosti su, generalno, u skladu sa prosecima objavljenim za markere koji se nasleđuju maternalno kod golosemenica i skrivenosemenica, i kod vrsta sa sličnom distribucijom (Petit et al., 2005).

S obzirom da je kod svih 99 jedinki crnog bora iz Srbije potvrđeno prisustvo tri mutacije (nukleotid C na poziciji 435, nukleotid C na poziciji 472 i nukleotid C na poziciji 520) koje ih odvajaju od jedinki iz zapadnog Mediterana, očigledno je da ove mutacije mogu da se koriste kao molekularni dijagnostički markeri za diskriminaciju jedinki crnog bora sa Pirinejskog i Balkanskog poluostrva. To ukazuje na veoma dugu

izolaciju *P. nigra* populacija iz ova dva evropska refugijuma. Na ovaj način, varijabilnost *nad7* intron 1 pruža mogućnost za diskriminaciju *P. nigra* jedinki sa Iberijskog i Balkanskog poluostrva, ali da bi se formirala kompletna slika potrebno je utvrditi varijabilnost sekvence introna 1 *nad7* gena i kod jedinki sa Apeninskog poluostrva kao i u Maloj Aziji. Takođe, istraživano područje u Srbiji predstavlja samo jedan deo arela crnog bora na Balkanu.

Interesantno je da i Balkanski i Španski crni borovi u okviru introna 1 *nad7* gena na poziciji 328 imaju G ili T, odnosno, da je G→T transverzija prisutna kod individua sa oba poluostrva. Haplotip sa G na poziciji 328 (haplotip SRB u Srbiji i ES3 u Španiji) je najučestaliji na oba poluostrva, dok je haplotip sa T na datoj poziciji (haplotip SRA u Srbiji i ES2 u Španiji) drugi po učestalosti u Španiji (Jaramillo-Correa et al., 2010), a prisutan samo kod individua *P. nigra* ssp. *nigra* u Srbiji. Ovakve učestalosti i geografsku distribuciju haplotipova na Balkanskom i Iberijskom poluostrvu je moguće objasniti na tri načina. S obzirom da je na poziciji 328 kod *P. sylvestris*, koji je korišćen kao outgroup-a, detektovan T, na haplotip stablu za čiju konstrukciju je korišćena ova outgroup-a (slika 4-22B) se uočava da su haplotipovi koji na datoj poziciji sadrže timin bliži centru stabla, odnosno, da su ancestralni, a da su haplotipovi koji sadrže guanin izvedeni, odnosno da su nastali kasnije. U tom slučaju, može se pretpostaviti da je ancestralni genski pool koji je u davnoj prošlosti kolonizovao Mediteran iz pravca Male Azije sadržavao individue koje su na poziciji 328 imale T, a da je nakon širenja takvog genskog poola po Balkanskom i Iberijskom poluostrvu došlo do nastanka haplotipa koji na datoj poziciji sadrži G, i da je taj haplotip tokom vremena postao prevalentan u oba područja. Međutim, u tom slučaju se mora pretpostaviti da se ista mutacija (T→G) na poziciji 328 desila nezavisno dva puta tokom evolutivne istorije, jednom u ancestralnom genskom poolu na Balkanskom poluostrvu od kojeg su nastali crni borovi koji danas naseljavaju ovo područje, drugi put u ancestralnom genskom poolu na Iberijskom poluostrvu od kojeg su nastali crni borovi koji naseljavaju to područje. Međutim, verovatnoća da se ista mutacija desila nezavisno dva puta tokom evolutivne istorije bilo koje vrste je jako mala.

Sa druge strane, moguće je da je ancestralni genski pool koji je kolonizovao Mediteran sadržavao samo haplotipove koji su imali T na poziciji 328, kao što je pokazano na haplotip stablu za čiju konstrukciju je korišćena ougrupa, a da je haplotip

koji na datoj poziciji sadrži G nastao u prošlosti ili na Balkanskom ili na Iberijskom poluostrvu, i da je tokom vremena putem genetičke razmene dospeo na Iberijsko odnosno Balkansko poluostrvo. Genetička razmena između refugijuma na mediteranskim poluostrvima je detektovana kod *Abies alba* (Liepelt et al., 2010), ali se smatra da je takav fenomen relativno redak, i do danas nije opisan kod drugih vrsta. Međutim, potrebno je naglasiti da je kao outgroup-a korišćena samo jedna individua *P. sylvestris* koja je na poziciji 328 imala T, tako da nije poznato da li postoje druge individue ove vrste na datoj poziciji imaju G, odnosno, nije poznato da li i kod *P. sylvestris* postoji varijabilnost na datoj poziciji. Stoga se korišćenje *P. sylvestris* kao outgroup-e mora uzeti sa rezervom.

Najverovatnije objasnjenje za sadašnje učestalosti i geografsku distribuciju haplotipova na Balkanskom i Iberijskom poluostrvu je da je ancestralni genski pool koji je kolonizovao Mediteran u prošlosti sadržavao obe genetičke varijante, odnosno oba haplotipa, kao što je dobijeno kod haplotip stabla za čiju konstrukciju nije korišćena outgroup-a (slika 4-22C). U tom slučaju, nakon kolonizacije Balkanskog i Iberijskog poluostrva i njihove duge izolacije, dolazi do diferencijacije u okviru svakog od poluostrva, tako da danas individue crnog bora na ovim poluostrvima dele varijabilnost na poziciji 328, koja se u tom slučaju može smatrati ancestralnom, a razlikuju se u mutacijama na tri pozicije (435, 472 i 520) koje su se desile tokom evolutivne istorije. Na osnovu ovakvog scenarija, može se pretpostaviti da se ancestralni polimorfizam zadržao samo kod *P. nigra* ssp. *nigra* u Srbiji, dok je u ostalim populacijama ove vrste koje predstavljaju podvrste i varijetete, došlo do gubitka haplotipa koji sadrži T i do fiksacije haplotipa koji sadrži G na poziciji 328, najverovatnije putem genetičkog drifta, uskih grla ili efekta osnivača. Vrlo je interesantno da je i kod haplotipa MA4, koji je ekskluzivan i fiksiran u populaciji iz Maroka takođe na poziciji 328 detektovan G (Jaramillo-Correa et al., 2010). Na osnovu sadašnje distribucije haplotipova na Iberijskom poluostrvu i u Maroku, Jaramillo-Correa i sar. (2010) smatraju da su španske populacije *P. nigra* kolonizovale severnu Afriku šireći se preko Gibraltarskog moreuza i to u periodu mnogo pre Pleistocenskih glacijacija.

5. OPŠTA DISKUSIJA

U ovom radu analizirana je fitohemijska i genetička varijabilnost i diferencijacija sedam autohtonih populacija *Pinus nigra* u Srbiji koje pripadaju različitim infraspecijskim taksonima (ssp. *nigra*, var. *gocensis*, ssp. *pallasiana* i var. *banatica*). Multivariacione statističke analize (PCA, CDA i HCA) *n*-alkana i terpena su, generalno, pokazale tendenciju formiranja tri grupe populacija (*nigra*, *pallasiana* i *banatica*). Populacije iz zapadne (Banjska stena, Omar i Zmajevački potok), jugozapadne (Priboj) i centralne Srbije (Goč) međusobno su slične na osnovu sastava terpena i mogu biti pripisane ssp. *nigra*. Ipak, dve populacije koje su na osnovu prethodnih morfo-anatomskih i fitocenoloških studija determinisane kao var. *gocensis* u okviru ssp. *nigra* ispoljile su umerenu tendenciju odvajanja od prve grupe (populacija Priboj u CA i populacija Goč u CDA). Na osnovu varijabilnosti *n*-alkana, populacija Priboj pokazala je još jaču tendenciju odvajanja od ssp. *nigra* odnosno sličnija je populaciji Jarešnik iz jugoistočne Srbije (ssp. *pallasiana*). Na ovaj način, moguće je da varijetet *gocensis* predstavlja tranzicionu formu između podvrste *nigra* na zapadu i podvrste *pallasiana* na jugoistoku Srbije. Liber i sar. (2003) objavili su slično zapažanje za populaciju crnog bora sa poluostrva Pelješac, koja pokazuje karakteristike tranzicione populacije između ssp. *illyrica* i ssp. *dalmatica*.

Ipak, taksonomski položaj var. *gocensis* u okviru *P. nigra* kompleksa još uvek nije u potpunosti jasan. Đorđević (1931) je prvi put opisao ovaj varijetet sa padina planine Goč u centralnoj Srbiji. Kasnije je Vidaković (1955) utvrdio širu distribuciju ovog varijeteta u jugozapadnoj Srbiji i na osnovu anatomske građe četina podigao ga na nivo podvrste (ssp. *gocensis* Vid.). U poređenju sa tipičnim var. *nigra*, razlikuje se u nekim elementima građe drveta, listova kao i spoljne morfologije (kora odraslih stabala ima izražene poprečne i uzdužne brazde - liči na koru *Pinus heldreichii* H. Christ). Međutim, na osnovu detektovanog fitohemijskog diverziteta ne postoji tako jasno odvajanje var. *gocensis* od tipičnog var. *nigra*.

Druga fitohemijska grupa sastoji se od jedne populacije iz jugoistočne Srbije koja je opisana kao ssp. *pallasiana*. Prisustvo krimskog crnog bora u Srbiji prvi put je spomenuo Adamović (1909), ali bez preciznih podataka o njegovoj distribuciji.

Rajevski (1950) je prvi objavio tačan lokalitet ove populacije na teritoriji Srbije: usamljena enklava krimskog crnog bora nalazi se na planini Crnook (Jarešnik) u okolini Bosilegrada na kristalastim škriljcima. Na osnovu varijabilnosti oba fitohemijska karaktera (*n*-alkana i terpena), ova populacija se jasno odvaja kao posebna grupa (takson i hemotip) od ssp. *nigra*.

Interesantno je da je od svih ispitivanih populacija, na osnovu varijabilnosti *n*-alkana i terpena, najudaljenija populacija iz kanjona Lazareve reke, determinisana kao var. *banatica* unutar ssp. *pallasiana* (Jovanović, 1992). Banatski crni bor je prvi put opisan u Rumuniji u dolini Černe (Domogled), kraj Đerdapa, gde se javlja na nadmorskoj visini od 300 do 1100 m. Morfološki je vrlo varijabilan, a na osnovu anatomske građe četina opisano je čak 7 formi i 12 luzusa. Takođe, na osnovu pregleda literature očigledno je da populacije crnog bora iz Rumunije imaju veoma kontroverzan taksonomski položaj (Boşcaiu and Boşcaiu, 1999). U Flori Rumunije, Beldie (1952) podiže ovaj takson na nivo podvrste, pod imenom *P. nigra* ssp. *banatica* (Endl. ex Borb.) Novák. Prema Georgescu-u (1936), ove populacije treba tretirati kao nezavisnu vrstu, koju on naziva *Pinus banatica* (Georg. & Ion.) Georg. & Ion. U drugom izdanju Flore Evrope, Gaussen i sar. (1993), takođe, tretiraju crni bor iz severozapadne Rumunije kao posebnu vrstu tj. *P. banatica*. Analize fitohemijskog diverziteta crnog bora iz Srbije ukazale su na značajno odvajanje populacije determinisane kao var. *banatica* u odnosu na sve ostale istraživane populacije, što ide u prilog konstataciji da ovaj takson treba podići na nivo podvrste ili čak vrste.

Međutim, potrebno je spomenuti da je u ovoj studiji fitohemijski obrađena samo po jedna populacija taksona *pallasiana* i *banatica*, tako da je za izvođenje pouzdanih zaključaka o njihovom taksonomskom statusu potrebno obraditi i druge populacije iz areala rasprostranjenja. Takođe, ssp. *pallasiana* je široko rasprostranjena na Krimu, Maloj Aziji, južnom i jugoistočnom delu Balkanskog poluostrva, a var. *banatica* u severozapadnoj Rumuniji, tako da ispitivane populacije predstavljaju periferne populacije ovih taksona, a poznato je da su periferne populacije pod drugačijim režimom prirodne selekcije i drugih faktora u poređenju sa centralnim populacijama (Lesica and Allendorf 1995; Lenormand 2002).

Sa druge strane, molekularne analize sva tri biljna genoma kod crnog bora u Srbiji pokazale nešto drugačije genetičke profile i odnose. U skladu sa očekivanjima, vrlo visok nivo genetičkog diverziteta i odsustvo genetičke diferencijacije populacija crnog bora iz Srbije je dobijeno na nivou hloroplastnih mikrosatelita, dok je znatno niži genetički diverzitet i umerena genetička diferencijacija dobijena na nivou jedne nekodirajuće mtDNK sekvence, što je u skladu sa asimetričnim protokom gena kod četinara. Međutim, potrebno je naglasiti da je i u slučaju asimetričnog protoka gena, diferencijacija na nivou mitohondrijalnog genoma kod četinara očekivana između populacija distribuiranih na mnogo većem prostoru (Jaramillo-Correa et al., 2004; Godbout et al., 2005; Pyhajarvi et al., 2008; Naydenov et al., 2008; Tian et al., 2010). Stoga, genetička diferencijacija dobijena između populacija crnog bora iz Srbije, što za četinare koji se generalno odlikuju velikim arealima predstavlja malo područje, može ukazivati na određene istorijske i druge procese koji su delovali u ispitivanim populacijama, što je objašnjeno u daljem tekstu.

Kao što je već napomenuto, sve ispitivane populacije crnog bora se odlikuju izuzetno visokim nivoom genetičkog diverziteta na nivou hloroplastnog genoma koji je uporediv sa nivoom diverziteta drugih borova (npr. *P. sylvestris*, Robledo-Arnuncio et al., 2004; Heuertz et al., 2009; *P. mugo sensu lato*, Heuertz et al., 2009; *P. unicata*, Dzialuk et al., 2009; *P. pinaster*, Ribeiro et al., 2002, Jaramillo-Correa et al., 2010). Ako posmatramo distribuciju frekvenci dobijenih alela i haplotipova, uočava se prisustvo malog broja visoko frekventnih alela i haplotipova, i veliki broj malo frekventnih alela i haplotipova koji se mogu okarakterisati kao privatni jer su prisutni samo u jednoj od sedam ispitivanih populacija. Slična distribucija frekvenci haplotipova je uočena i kod populacija smrče iz celog areala rasprostranjenja (41 haplotip od kojih je 21 haplotip imao frekvencu ispod 0.01; Vendramin et al., 2000). Iako privatni aleli i haplotipovi mogu ukazivati na visoku genetičku diferencijaciju populacija i njihovu dugotrajnu izolovanost koja bi omogućila generisanje određenog broja razlilitih alela u različitim populacijama tokom vremena (Aleksić and Geburek, 2014), oni moraju biti tretirani sa velikim oprezom zbog toga što neki od detektovanih privatnih alela mogu biti poreklom iz okolnih populacija crnog bora kao i iz drugih vrsta, jer se efekat intra- i interspecijske hibridizacije ne može isključiti. Takođe, s obzirom na izuzetno veliki broj detektovanih alela kod svega 104 individue, moguće je da bi sa povećanjem broja

analiziranih individua po populaciji neki privatni bili detektovani i u drugim populacijama, te se više ne bi mogli smatrati privatnim. Stoga se privatni aleli moraju tretirati sa velikom pažnjom.

Na to ukazuju i ispitivanja genetičke diferencijacije populacija koja su pokazala da i pored velikog broja privatnih alela i haplotipova, ispitivane populacije crnog bora nisu genetički diferencirane, i da sve populacije predstavljaju jednu genetičku grupu na nivou hloroplastnog genoma. To su pokazale analize na osnovu genetičkih distanci (Fst, Gst i Rst), AMOVA analize i klaster analize koje se ne zasnivaju na genetičkim distancama već na Bayesian metodi a koje ne uzimaju u obzir geografsku distribuciju populacija (STRUCTURE analiza) ili uzimaju u obzir i genetičke profile populacija i njihovu prostornu distribuciju (TESS analiza).

Međutim, kada su frekvence alela i haplotipova iskorišćene za PCA analizu a *pairwise population* Fst vrednosti za NMDS analizu, uočeni su određeni slični tipovi varijabilnosti u grupama populacija koji se donekle poklapaju sa rezultatima dobijenim na osnovu fitohemijskih analiza. Naime, i PCA i NMDS analize pokazale su da se populacije *P. nigra* ssp. *nigra*, *P. nigra* ssp. *pallasiana* i *P. nigra* var. *banatica* mogu posmatrati kao tri zasebne grupe po tipu varijabilnosti. Osnovna razlika između PCA analize zasnovane na frekvenci haplotipova i NMDS analize sa jedne strane i PCA analize bazirane na frekvenci alela sa druge strane, ogleda se u tome što prve dve analize ukazuju i na drugačiji tip varijabilnosti populacije Priboj (var. *gocensis*). Dobijena grupisanja populacija po tipu varijabilnosti su u određenoj meri u skladu i sa rezultatima dobijenim na osnovu fitohemijskih markera (*n*-alkana i terpena), koji, takođe, ukazuju na postojanje tri grupe populacija (*nigra*, *pallasiana*, i *banatica*). Međutim, iako oba kvalitativno različita tipa analiza podržavaju to da su dve populacije var. *gocensis* različite, fitohemijske analize ukazuju na sličnost populacija Priboj – Jarešnik i Goč – populacije iz zapadne Srbije (ssp. *nigra*) dok genetičke analize podržavaju samo sličnost tipa varijabilnosti populacija Goč – populacije iz zapadne Srbije (ssp. *nigra*) ali ne i Priboj – Jarešnik pošto je na osnovu genetičkih analiza uočen distinktan tip varijabilnosti populacije Priboj. Navedene razlike se mogu pripisati većem uticaju ekoloških faktora na varijabilnost sekundarnih biljnih metabolita, a sa druge strane, potencijalnoj intraspecijskoj i interspecijskoj hibridizaciji i introgresiji koje

mogu dovesti do povećanja genetičkih razlika, odnosno, razlika u tipu varijabilnosti između populacija.

Takođe, važno je i napomenuti da se istraživane populacije ssp. *pallasiana* (Jarešnik) i var. *banatica* (Lazereva reka), zapravo nalaze na periferiji areala ovih taksona, gde su vrlo često suboptimalni ekološki uslovi za dati takson. Populacije sa periferije areala se po kompoziciji i učestalosti alela i haplotipova mogu razlikovati od populacija iz centra areala (Ellstrand and Elam 1993; Scalfi et al. 2009 i reference u ovom radu), jer su one po drugačijim režimom prirodne selekcije i drugih faktora u poređenju sa centralnim populacijama (Lesica and Allendorf 1995; Lenormand 2002). Stoga se u rešavanje problema vezanih za njihov taksonomski status moraju uključiti i populacije iz centra areala.

Sa druge strane, na osnovu mtDNK genoma, bilo je moguće napraviti distinkciju između populacija *P. nigra* ssp. *nigra* i ostalih ispitivanih podvrsta i varijeteta ove vrste, ali nije bilo moguće međusobno razdvojiti ostale ispitivane podvrste i varijetete. Međutim, prisustvo dva mtDNK haplotipa samo u populacijama *P. nigra* ssp. *nigra* sa područja Tare može zapravo ukazivati na to da je ovo područje refugijum crnog bora u kojem je ova vrsta opstala tokom poslednjeg (ili i prethodnih) ledenih doba, te je na tom području tokom vremena opstao veći genetički diverzitet nego u ostalim ispitivanim populacijama koje se ne nalaze u refugijumima i koje su tokom evolutivne istorije bile izložene procesima koji dovode do smanjenja nivoa genetičkog diverziteta, kao što su genetički drift, efekat uskog grla i/ili efekat osnivača. Nedavna istraživanja su pokazala da je područje Tare služilo kao refugijum i za endemičnu vrstu *Picea omorika* (Aleksić and Geburek, 2014).

Takođe, uočena distribucija mtDNK haplotipova u ispitivanim populacijama crnog bora, a u poređenju sa spektrom i distribucijom mtDNK haplotipova detektovanih na Iberijskom poluostrvu i u Maroku (Jaramillo-Correa et al., 2010), omogućila je definisanje tri scenarija koji mogu objasniti sadašnju distribuciju mtDNK diverziteta kod crnog bora u Srbiji. U prvom slučaju, može se pretpostaviti da je ancestralni genski pool koji je u davnoj prošlosti kolonizovao Mediteran iz pravca Male Azije sadržavao individue koje su na poziciji 328 imale T, a da je nakon širenja takvog genskog poola po Balkanskom i Iberijskom poluostrvu došlo do nastanka haplotipa koji na datoj poziciji

sadrži G, i da je taj haplotip tokom vremena postao prevalentan u oba područja. Međutim, u tom slučaju se mora pretpostaviti da se ista mutacija (T→G) na poziciji 328 desila nezavisno dva puta tokom evolutivne istorije, jednom u ancestralnom genskom poolu na Balkanskom poluostrvu od kojeg su nastali crni borovi koji danas naseljavaju ovo područje, drugi put u ancestralnom genskom poolu na Iberijskom poluostrvu od kojeg su nastali crni borovi koji naseljavaju to područje. Međutim, verovatnoća da se ista mutacija desila nezavisno dva puta tokom evolutivne istorije bilo koje vrste je jako mala. Sa druge strane, moguće je da je ancestralni genski pool koji je kolonizovao Mediteran sadržavao samo haplotipove koji su imali T na poziciji 328, kao što je pokazano na haplotip stablu za čiju konstrukciju je korišćena ougrupa (slika 4-22B), a da je haplotip koji na datoj poziciji sadrži G nastao u prošlosti ili na Balkanskom ili na Iberijskom poluostrvu, i da je tokom vremena putem genetičke razmene dospeo na Iberijsko odnosno Balkansko poluostrvo. Genetička razmena između refugijuma na mediteranskim poluostrvima je detektovana kod *Abies alba* (Liepelt et al., 2010), ali se smatra da je takav fenomen relativno redak, i do danas nije opisan kod drugih vrsta. Međutim, potrebno je naglasiti da je kao outgroup-a korišćena samo jedna individua *P. sylvestris* koja je na poziciji 328 imala T, tako da nije poznato da li postoje druge individue ove vrste na datoj poziciji imaju G, odnosno, nije poznato da li i kod *P. sylvestris* postoji varijabilnost na datoj poziciji. Stoga se korišćenje *P. sylvestris* kao outgroup-e mora uzeti sa rezervom. Najverovatnije objašnjenje za sadašnje učestalosti i geografsku distribuciju haplotipova na Balkanskom i Iberijskom poluostrvu je da je ancestralni genski pool koji je kolonizovao Mediteran u prošlosti sadržavao obe genetičke varijante, odnosno oba haplotipa, kao što je dobijeno kod haplotip stabla za čiju konstrukciju nije korišćena outgroup-a (slika 4-22C). U tom slučaju, nakon kolonizacije Balkanskog i Iberijskog poluostrva i njihove duge izolacije, dolazi do diferencijacije u okviru svakog od poluostrva, tako da danas individue crnog bora na ovim poluostrvima dele varijabilnost na poziciji 328, koja se u tom slučaju može smatrati ancestralnom, a razlikuju se u mutacijama na tri pozicije (435, 472 i 520) koje su se desile tokom evolutivne istorije. Na osnovu ovakvog scenarija, može se pretpostaviti da se ancestralni polimorfizam zadržao samo kod *P. nigra* ssp. *nigra* u Srbiji, dok je u ostalim populacijama ove vrste koje predstavljaju podvrste i varijetete,

došlo do gubitka haplotipa koji sadrži T i do fiksacije haplotipa koji sadrži G na poziciji 328, najverovatnije putem genetičkog drifta, uskih grla ili efekta osnivača.

Međutim, kao što je već naglašeno, u ovim istraživanjima je korišćen mali broj populacija crnog bora sa veoma malog područja, kao i samo jedan mtDNK region, tako da se bolji uvid genetičku diferencijaciju, evolutivne odnose i evolutivnu istoriju ove vrste može steći daljim analizama koje bi obuhvatile više populacija iz celog areala rasprostranjenja, veći broj mtDNK markera i pouzdane outgroup-e. S obzirom da su prethodna istraživanja pokazala da se hloropastni markeri kod roda *Picea* u velikoj meri specifični za svaku od pet ispitivanih vrsta te su u određenoj meri mogu smatrati informativnim za utvrđivanje genetičkih granica između vrsta, a da su mitohondrijalni markeri pokazivali geografsku diferencijaciju zbog toga što su identični mitohondrijalni tipovi uočeni kod geografski bliskih vrsta (Du et al., 2009), dalja istraživanja sa većim uzorkom populacija predstavnika infraspecijskih grupa iz areala rasprostranjenja crnog bora bi trebalo da obuhvate i veći broj hloroplastnih markera.

Bolji uvid u demografske, genetičke, evolutivne i druge procese u populacijama crnog bora bi bio upotpunjen i korišćenjem molekularnih markera visoke rezolucije kao što su jedarni mikrosateliti. Ova studija je pokazala da je u nedostatku jedarnih mikrosatelita koji bi bili specifično razvijeni za vrstu *P. nigra*, primena inter-specijske amplifikacije EST-mikrosatelita razvijenih za druge predstavnike ovog roda kod crnog bora vrlo ograničenog uspeha. Naime, u skladu sa očekivanom visokom transferabilnošću EST-mikrosatelita u srodnim vrstama, dva od tri testirana EST-mikrosatelita su uspešno amplifikovana kod crnog bora iz Srbije, ali se pokazalo da su takvi mikrosateliti neinformativni. To ukazuje na potrebu razvijanja jedarnih markera visoke rezolucije na nivou jedarnog genoma koji bi bili specifični za crni bor, kao što su mikrosateliti ili SNP-ovi koji se takođe sve češće koriste u populaciono genetičkim studijama, a ne treba zanemariti ni ostale molekularne markere kao što su AFLP markeri, koji su primenljivi kod velikog broja vrsta, čak i bez poznavanja primarne sekvence nukleotida koje se koriste za vezivanje prajmera.

6. ZAKLJUČCI

1. U kutikularnom vosku četina istraživanih populacija crnog bora zastupljeni su *n*-alkani u seriji od C₁₆ do C₃₃, osim kod populacija Banjska stena, Omar i Zmajevački potok (*P. nigra* ssp. *nigra*) koje odlikuje serija od C₁₈ do C₃₃. Najzastupljeniji *n*-alkan je C₂₅ (16.5%), a zatim prema obilnosti slede C₂₇ (15.1%), C₂₉ (10.7%) i C₂₃ (10.3%). Srednja vrednost CPI ukupnih *n*-alkana (CPI_{total}) u kutikularnom vosku četina crnog bora je 2.3, što znači da je procentualni odnos parnih i neparnih *n*-alkana nešto veći od 1 : 2. Srednja vrednost ACL ukupnih *n*-alkana (ACL_{total}) je 25.6, odnosno 26.6 za ACL₂₃₋₃₅. Srednji relativni odnosi *n*-alkana kratkog, srednjeg i dugog niza pokazuju dominaciju *n*-alkana dugog niza (*n*-C₂₅₋₃₃ = 67.5%) u odnosu na *n*-alkane srednjeg (*n*-C₂₁₋₂₄ = 21.4%) i kratkog niza (*n*-C₁₆₋₂₀ = 15.2%).
2. Prosečni profil dominantnih *n*-alkana populacije Lazareva reka (*P. nigra* var. *banatica*): C₂₇, C₂₉, C₂₅ i C₂₆ (16.0%, 15.3%, 13.9%, 10.3%, respektivno), najviše se razlikuje od prosečnog profila *n*-alkana za sve populacije. Najveći procenat *n*-alkana dugog niza sadrže kutikularni voskovi *P. nigra* var. *banatica* (populacija Lazareva reka, 80.1%); najveći procenat *n*-alkana srednjeg niza sadrže voskovi *P. nigra* ssp. *pallasiana* (populacija Jarešnik, 25.6%); dok voskovi *P. nigra* var. *gocensis* (populacije Priboj i Goč) sadrže najveći procenat *n*-alkana kratkog niza (13.5% odnosno 22.2%).
3. Multivariacione statističke analize (PCA i HCA), na osnovu 18 *n*-alkana *P. nigra*, pokazale su tendenciju formiranja tri grupe populacija: prva grupa, koja se sastoji od populacija iz zapadne (Banjska stena, Omar i Zmajevački potok) i centralne Srbije (Goč), može biti pripisana ssp. *nigra*; drugu grupu čine populacije iz jugozapadne (Priboj) i jugoistočne Srbije (Jarešnik) koje mogu biti pripisane ssp. *pallasiana*; treću grupu čini samo populacija iz severoistočne Srbije (Lazareva reka), opisana kao var. *banatica*. Dakle, populacije iz zapadne Srbije, prethodno određene kao tipični var. *nigra* u okviru ssp. *nigra*, slične su i na osnovu varijabilnosti *n*-alkana. Međutim, populacije koje su prethodno opisane kao var. *gocensis* (Priboj i Goč), u okviru ssp. *nigra* značajno se

razlikuju jedna od druge. Populacija Priboj sličnija je populaciji Jarešnik iz jugoistočne Srbije (ssp. *pallasiana*), dok je populacija sa Goča sličnija populacijama iz zapadne Srbije (ssp. *nigra*). Moguće je da varijetet *gocensis* predstavlja tranzicionu formu između podvrste *nigra* na zapadu i podvrste *pallasiana* na jugoistoku Srbije. Od svih ispitivanih populacija, na osnovu *n*-alkana, najudaljenija je populacija Lazareva reka opisana kao var. *banatica*.

4. U etarskom ulju četina crnog bora identifikovano je 58 komponenti, koje čine 99.9% mase ulja. Odnos mono- i seskviterpena je oko 1.35 : 1. Dominantne komponente su α -pinen (43.6%) i germakren D (29.8%), koje zajedno čine 73.4% mase ulja. Prosečan hemijski profil glavnih terpenskih komponenti (preko 5%) u etarskom ulju četina sedam populacija crnog bora u Srbiji je: α -pinen >> germakren D >>> (*E*)-kariofilen > β -pinen. Na osnovu hemijskog profila glavnih terpena, istraživane populacije crnog bora iz Srbije su najbližije populacijama iz centralne Italije i Grčke.
5. Statistička obrada rezultata ispitivanja etarskog ulja četina iz sedam autohtonih populacija *P. nigra* iz Srbije pokazala je tendenciju formiranja tri grupe populacija. Prva grupa se sastoji od populacija koje su na osnovu postojećih morfo-anatomskih i fitocenoloških studija opisane kao var. *nigra* (Banjska stena, Omar i Zmajevački potok) i var. *gocensis* (Priboj i Goč) u okviru ssp. *nigra*, pri čemu su populacije Priboj i Goč pokazale određeni stepen odvajanja od prve grupe. Drugu grupu čini populacija Jarešnik, determinisana kao ssp. *pallasiana*, a treću grupu populacija Lazareva reka, opisana kao var. *banatica*. Ako pretpostavimo da tri osnovne grupe populacija u ovom istraživanju predstavljaju posebne podvrste, onda je moguće razlikovati tri podvrste crnog bora na teritoriji Srbije (ssp. *nigra*, ssp. *pallasiana* i ssp. *banatica*). Ovaj zaključak ukazuje na osnovnu sličnost rezultata istraživanja terpena i *n*-alkana, jer smo u oba slučaja dobili tri grupe populacija crnog bora iz Srbije (*nigra*, *pallasiana* i *banatica*). Ipak, na osnovu sastava terpena obe populacije, prethodno opisane kao var. *gocensis* (Priboj i Goč), bliže su populacijama iz zapadne Srbije (ssp. *nigra*). Varijabilnost terpena potvrdila je najudaljeniji položaj populacije Lazareva reka, određene kao var. *banatica*. Zato predlažemo podizanje ovog taksona na nivo podvrste ili vrste.

6. Molekularne analize, koje su urađene na nivou sva tri genoma, su pokazale nešto drugačije genetičke profile i odnose ispitivanih populacija koji su, sa druge strane, u skladu sa očekivanjima koja proističu iz bioloških i ekoloških svojstava crnog bora, ostalih borova i četinara, kao i sa publikovanim podacima vezanim za nivoe genetičkog diverziteta i genetičku diferencijaciju drugih borova i ostalih četinara na nivou hloroplastnog i mitohondrijalnog genoma. Zaključke izvedene na osnovu jedarnog genoma, međutim, treba uzeti sa rezervom, s obzirom da su se molekularni markeri koji su korišćeni na nivou jedarnog genoma pokazali kao slabo informativni kod crnog bora.
7. U skladu sa očekivanom visokom transferabilnošću jedarnih EST-mikrosatelita u srodnim vrstama, dva od tri testirana EST-mikrosatelita razvijenih za *P. taeda* su uspešno amplifikovana kod crnog bora iz Srbije: SsrPt_ctg7444 i SsrPt_ctg7731. EST-mikrosatelit SsrPt_ctg7444 se odlikuje potpunim odsustvom varijabilnosti odnosno detektovan je samo jedan alel u istraživanim populacijama *P. nigra*, dok su na lokusu SsrPt_ctg7731 detektovana četiri alela koji formiraju jedan homozigotni i tri heterozigotna genotipa, što je rezultiralo u veoma niskom nivou nuSSR diverziteta ($H_e = 0.183$). Pretpostavljeno je da uočeni nizak nivo genetičkog diverziteta zapravo ne oslikava realan nivo genetičkog diverziteta crnog bora na nivou jedarne DNK već da ispitivani mikrosatelitni lokus nije reprezentativan.
8. Na osnovu analize jedinog i slabo polimorfnog jedarnog EST-SSR lokusa (SsrPt_ctg7731), ne postoji diferencijacija između ispitivanih populacija *P. nigra* ($F_{st} = -0.020$, $p = 0.822$). S obzirom da niža F_{st} vrednost ukazuje na veći protok gena, može se pretpostaviti izuzetno visoka genetička razmene između populacija, koja bi bila beskonačna ukoliko bi se negativna F_{st} vrednost prevela u nulu i iskoristila za izračunavanje efektivnog protoka gena po generaciji. Međutim, treba napomenuti da vrednosti N_m izračunate na osnovu F_{st} parametra oslikavaju istorijski a ne savremeni protok gena, te se zaključci o savremenom protoku gena ne mogu izvoditi. Takođe, upitno je korišćenje samo jednog i to ne-reprezentativnog mikrosatelitnog lokusa za procenu genetičke diferencijacije i protoka gena.

9. U nedostatku jedarnih mikrosatelita koji bi bili specifično razvijeni za vrstu *P. nigra*, inter-specijska amplifikacija EST-mikrosatelita razvijenih za druge predstavnike ovog roda kod crnog bora je vrlo ograničenog uspeha. To ukazuje na potrebu razvijanja jedarnih markera visoke rezolucije na nivou jedarnog genoma koji bi bili specifični za crni bor, kao što su mikrosateliti ili SNP-ovi koji se takođe sve češće koriste u populaciono genetičkim studijama, a ne treba zanemariti ni ostale molekularne markere kao što su AFLP markeri, koji su primenljivi kod velikog broja vrsta i bez poznavanja primarne sekvence nukleotida u mestima vezivanja prajmera.
10. Od pet testiranih cpSSRs, tri su uspešno PCR-amplifikovana u našim uzorcima. Detektovano je 22 alela koji formiraju 38 haplotipova. U skladu sa očekivanjima, vrlo visok nivo genetičkog diverziteta ($H_t = 0.949$) populacija crnog bora iz Srbije dobijen je na nivou hloroplastnih mikrosatelita, koji je u potpunosti uporediv sa objavljenim nivoom cpSSR diverziteta u populacijama *P. nigra* iz zapadnog Mediterana. Utvrđeni nivo genetičkog diverziteta ide u prilog konstataciji da su istraživane populacije crnog bora verovatno preživele *in situ* LGM, pre nego da su rekolonizovale ove prostore u postglacijalnom periodu.
11. U saglasnosti sa intenzivnim rasejavanjem polena, a samim tim i hloroplastnog genoma kod četinara, detektovan je nizak nivo cpSSR diferencijacije između istraživanih populacija *P. nigra* ($F_{st} = 0.017$, $p = 0.108$, $G_{st} = 0.024$, $R_{st} = 0.064$). Takođe, u hijerarhijskoj AMOVA-i u kojoj su definisane dve regionalne grupe (zapadna i istočna Srbija – ssp. *nigra* i *pallasiana*) svega 2.06% molekularne varijabilnosti otpada na razlike između grupa ($F_{ct} = 0.021$, $p = 0.09$). Stoga se na osnovu analiza koje se zasnivaju na genetičkim distancama može zaključiti da ispitivane populacije crnog bora nisu genetički diferencirane.
12. Klaster analize koje se ne zasnivaju na genetičkim distancama već na Bayesian metodi - STRUCTURE analiza (ne uzima u obzir geografsku distribuciju populacija) i TESS analiza (uzima u obzir i genetičke profile populacija i njihovu prostornu distribuciju) su, takođe, pokazale da sve ispitivane populacije *P. nigra* predstavljaju samo jednu genetičku grupu na osnovu varijabilnosti hloroplastnog genoma, što je u skladu sa rezultatima dobijenim ispitivanjem

diferencijace populacija na osnovu njihovih genetičkih distanci (Fst, Gst i Rst) i AMOVA analize.

13. PCA analize, zasnovane na frekvenci cpSSR alela i haplotipova, i NMDS analiza, zasnovana na vrednostima genetičke diferencijacije parova populacija, su pokazale da se populacije *P. nigra* ssp. *nigra*, *P. nigra* ssp. *pallasiana* i *P. nigra* var. *banatica* mogu posmatrati kao tri zasebne grupe po tipu varijabilnosti. Osnovna razlika između PCA analize zasnovane na frekvenci haplotipova i NMDS analize, sa jedne strane, i PCA analize bazirane na frekvenci alela, sa druge strane, ogleda se u tome što prve dve analize ukazuju i na drugačiji tip varijabilnosti populacije Priboj (var. *gocensis*). Dobijena grupisanja populacija po tipu varijabilnosti su, u određenoj meri, u skladu i sa rezultatima dobijenim na osnovu fitohemijskih markera (*n*-alkana i terpena), koji, takođe, ukazuju na postojanje tri grupe populacija (*nigra*, *pallasiana*, i *banatica*).
14. Iako oba kvalitativno različita tipa analiza (fitohemijske i genetičke) podržavaju to da su dve populacije var. *gocensis* različite, fitohemijske analize na osnovu *n*-alkana ukazuju na sličnost populacija Priboj - Jarešnik i Goč - populacije iz zapadne Srbije (ssp. *nigra*), dok genetičke analize podržavaju samo sličnost tipa varijabilnosti populacija Goč – populacije iz zapadne Srbije (ssp. *nigra*), ali ne i Priboj – Jarešnik, pošto je na osnovu genetičkih analiza uočen distinktan tip varijabilnosti populacije Priboj. Navedene razlike bi se mogle pripisati većem uticaju ekoloških faktora na varijabilnost sekundarnih biljnih metabolita, a sa druge strane, potencijalnoj intra- i interspecijskoj hibridizaciji i introgresiji koje mogu dovesti do povećanja genetičkih razlika, odnosno, razlika u tipu varijabilnosti između populacija.
15. Uočene razlike u tipu varijabilnosti ispitivanih populacija crnog bora mogu biti posledica prisustva velikog broja privatnih cpSSR alela i haplotipova u svim populacijama. Neki od tih alela i haplotipova mogu biti prisutni u ispitivanim populacijama crnog bora usled efekta intra- i interspecijske hibridizacije i introgresije. Takođe, postoji mogućnost da u ovoj studiji nije detektovana ukupna varijabilnost prisutna kod crnog bora na ispitivanim hloroplastnim lokusima i da je vrlo verovatno da bi se sa povećanjem broja analiziranih

individua po populaciji detektovali i novi aleli i haplotipovi. Sa druge strane, moguće je da bi sa povećanjem broja analiziranih individua po populaciji neki privatni bili detektovani i u drugim populacijama, te se više ne bi mogli smatrati privatnim. Stoga se privatni aleli moraju tretirati sa velikom pažnjom.

16. Od tri testirana mtDNK lokusa samo jedan (*nad* 7 intron 1) je uspešno PCR-amplifikovan u našim uzorcima. S obzirom na manju brzinu evolucije primarne sekvence nukleotida mtDNK u poređenju sa cpDNK i činjenicu da je na nivou mitohondrijalnog genoma ispitivana varijabilnost primarne sekvence nukleotida koje se generalno se odlikuju nižom stopom mutacija u odnosu na mikrosatelite, nivo diverziteta mtDNK haplotipova ($H_e = 0.30$) značajno je niži u odnosu na detektovani cpSSR diverzitet ($H_e = 0.93$).
17. Identifikovana je samo jedna supstitucija kod predstavnika crnog bora iz Srbije na mtDNK lokusu *nad7* intron 1 na osnovu koje su definisana 2 mitohondrijalna haplotipa: SRA – koji na poziciji 328 sadrži timin i SRB – koji na datoj poziciji sadrži guanin. Haplotip SRB je fiksiran kod svih jedinki iz populacija Priboj, Goč (var. *gocensis*), Jarešnik (ssp. *pallasiana*) i Lazareva reka (var. *banatica*), dok je njegova zastupljenost u populacijama Banjska stena, Omar i Zmajevački potok (ssp. *nigra*) ~50%. Prema tome, drugi detektovani haplotip (SRA) utvrđen je samo u populacijama Banjska stena, Omar i Zmajevački potok (Tara), koje su determinisane kao tipični var. *nigra* u okviru ssp. *nigra*.
18. U saglasnosti sa asimetričnim protokom gena kod Pinaceae, veća genetička diferencijacija populacija *P. nigra* je očekivana i dobijena je na nivou mtDNK ($G_{st} = 0.358$) u odnosu na cpDNK ($G_{st} = 0.024$). Takođe, na osnovu mtDNK genoma, bilo je moguće napraviti distinkciju između populacija *P. nigra* ssp. *nigra* (Banjska stena, Omar i Zmajevački potok) i ostalih ispitivanih podvrsta i varijeteta ove vrste, ali nije bilo moguće međusobno razdvojiti ostale ispitivane podvrste i varijetete. Međutim, dobijen nivo genetičke diferencijacije unutar mitohondrijalnog genoma, čak i u slučaju asimetričnog protoka gena, je neobičajeno visok, jer su takve vrednosti očekivane kod populacija distribuiranih na mnogo većem prostoru. Stoga, ovakav rezultat najverovatnije

ukazuje na određene istorijske i druge procese koji su delovali u ispitivanim populacijama.

19. Prisustvo dva mtDNK haplotipa samo u populacijama *P. nigra* ssp. *nigra* sa područja Tare može zapravo ukazivati na to da je ovo područje refugijum crnog bora u kojem je ova vrsta opstala tokom poslednjeg (ili i prethodnih) ledenih doba, te je na tom području tokom vremena opstao veći genetički diverzitet nego u ostalim ispitivanim populacijama koje se ne nalaze u refugijumima i koje su tokom evolutivne istorije bile izložene procesima koji dovode do smanjenja nivoa genetičkog diverziteta, kao što su genetički drift, efekat uskog grla i/ili efekat osnivača.
20. Uočena distribucija mtDNK haplotipova u ispitivanim populacijama crnog bora omogućila je definisanje tri scenarija koji mogu objasniti sadašnju distribuciju mtDNK diverziteta kod crnog bora u Srbiji. U prvom slučaju, može se pretpostaviti da je ancestralni genski pool koji je u davnoj prošlosti kolonizovao Mediteran iz pravca Male Azije sadržavao individue koje su na poziciji 328 imale T, a da je nakon širenja takvog genskog poola po Balkanskom i Iberijskom poluostrvu došlo do nastanka haplotipa koji na datoj poziciji sadrži G, i da je taj haplotip tokom vremena postao prevalentan u oba područja. Sa druge strane, moguće je da je ancestralni genski pool koji je kolonizovao Mediteran sadržavao samo haplotipove koji su imali T na poziciji 328, a da je haplotip koji na datoj poziciji sadrži G nastao u prošlosti ili na Balkanskom ili na Iberijskom poluostrvu, i da je tokom vremena putem genetičke razmene dospeo na Iberijsko odnosno Balkansko poluostrvo. Međutim, najverovatnije objašnjenje je da je ancestralni genski pool koji je kolonizovao Mediteran u prošlosti sadržavao obe genetičke varijante, odnosno oba haplotipa. U tom slučaju, nakon kolonizacije Balkanskog i Iberijskog poluostrva i njihove duge izolacije, dolazi do diferencijacije u okviru svakog od poluostrva, tako da danas individue crnog bora na ovim poluostrvima dele varijabilnost na poziciji 328, koja se u tom slučaju može smatrati ancestralnom, a razlikuju se u mutacijama na tri pozicije (435, 472 i 520) koje su se desile tokom evolutivne istorije. Dalje analize, koje će obuhvatiti više populacija crnog bora sa oba poluostrva kao i veći broj individua *P. sylvestris* koje se koriste kao outgroup-e, će omogućiti utvrđivanje

filogeografskog scenarija koji je doveo do sadašnje distribucije mtDNK varijabilnosti crnog bora na Balkanu.

21. Kod svih istraživanih jedinki crnog bora iz Srbije potvrđeno je prisustvo tri mutacije na lokusu *nad7* intron 1 koje ih odvajaju od jedinki iz zapadnog Mediterana. Prema tome, detektovane mutacije mogu da se koriste kao molekularni dijagnostički markeri za diskriminaciju jedinki crnog bora sa Iberijskog i Balkanskog poluostrva. Na ovaj način, varijabilnost *nad7* intron 1 pruža mogućnost za diskriminaciju *P. nigra* jedinki sa Iberijskog i Balkanskog poluostrva, ali da bi se formirala kompletna slika potrebno je utvrditi varijabilnost sekvence introna 1 *nad7* gena i kod jedinki sa Apeninskog poluostrva kao i u Maloj Aziji. Takođe, istraživano područje u Srbiji predstavljalo samo jedan deo arela crnog bora na Balkanu.
22. Za sticanje boljeg uvida u taksonomske, demografske, genetičke, evolutivne i druge procese u populacijama crnog bora potrebno je uključiti u analize populacije iz celog areala rasprostranjenja, kao i veći broj molekularnih markera na nivou sva tri genoma. Kao što je pokazano u ovoj studiji, varijabilnost hloroplastnih mikrosatelita i mitohondrijalnih nekodirajućih regiona se može iskoristiti za izvođenje određenih zaključaka, dok je za izvođenje zaključaka na osnovu varijabilnosti jedarnog genoma potrebno koristiti alternativne molekularne markere a ne EST-mikrosatelite koji su ranije razvijeni za *P. taeda*.

7. LITERATURA

- Adamović L. 1909. Die Vegetationsverhältnisse der Balkanländer, Leipzig, 258-262.
- Adams R. P. 1991. Analysis of juniper and other forest tree oils. In: Linskins H. F., Jackson J. F., editors. Modern methods of plant analysis. Springer, Berlin, pp. 131-157.
- Adams R. P. 2000. Systematics of *Juniperus* section *Juniperus* based on leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). Biochem. Syst. Ecol. 28, 515-528.
- Adams R. P., Yhang S. Z., Chu G. L. 1996. Essential oils of *Juniperus squamata* D. Don var. *fargesii* Redh. and Wils. leaves from China. J. Essent. Oil Res. 8, 53-56.
- Afzal-Rafii Z., Dodd R. S. 2007. Chloroplast DNA supports a hypothesis of glacial refugia over postglacial recolonization in disjunct populations of black pine (*Pinus nigra*) in western Europe. Mol. Ecol. 16, 723-736.
- Aguinagalde I., Llorente F., Benito C. 1997. Relationships among five populations of European black pine (*Pinus nigra* ARN.) using morphometric and isozyme markers. Silvae Genet. 46, 1-5.
- Aizawa M., Yoshimaru H., Saito H., Katsuki T., Kawahara T., Kitamura K., Shi F., Sabirov R., Kaji M. 2009. Range-wide genetic structure in a north-east Asian spruce (*Picea jezoensis*) determined using nuclear microsatellite markers. J. Biogeogr. 36, 996-1007.
- Aleksić J. M., Geburek T. 2010. Mitochondrial DNA reveals complex genetic structuring in a stenoendemic conifer *Picea omorika* [(Panč.) Purk.] caused by its long persistence within the refugial Balkan region. Plant Syst. Evol. 285, 1-11.
- Aleksić J. M., Geburek T. 2014. Quaternary population dynamics of an endemic conifer, *Picea omorika*, and their conservation implications. Conserv. Genet. 15, 87-107.

- Aleksić J. M., Stojanović D., Banović B., Jančić R. 2012. A simple and efficient DNA isolation method for *Salvia officinalis*. *Biochem. Genet.* 50, 881-892.
- Allen J. O., Fauron C. M., Minx P., Roark L., Oddiraju S., Lin G. N., Meyer L., Sun H., Kim K., Wang C., Du F., Xu D., Gibson M., Cifrese J., Clifton S.W., Newton K.J. 2007. Comparisons among two fertile and three male-sterile mitochondrial genomes of maize. *Genetics* 117, 1173-1192.
- Allendorf F. W., Knudsen K. L., Blake G. M. 1982. Frequencies of null alleles at enzyme loci in natural populations of ponderosa and red pine. *Genetics* 100, 497-504.
- Al-Rabab'ah M. A., Williams C. G. 2002. Population dynamics of *Pinus taeda* L. based on nuclear microsatellites. *Forest Ecol. Manag.* 163, 263-271.
- Álvarez I., Wendel, J. F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29, 417-434.
- Alverson A. J., Wei X., Rice D. W., Stern D. B., Barry K., Palmer J. D. 2010. Insights into the evolution of mitochondrial genome size from complete sequences of *Citrullus lanatus* and *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Mol. Biol. Evol.* 27, 1436-1448.
- Amdur B. H., Rilling H., Bloch K. 1957. The Enzymatic Conversion of Mevalonic Acid to Squalene. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 2646-2647.
- Angioi S. A., Rau D., Rodriguez M., Logozzo G., Desiderio F., Papa R., Attene G. 2009. Nuclear and chloroplast microsatellite diversity in *Phaseolus vulgaris* L. from Sardinia (Italy). *Mol. Breeding* 23, 413-29.
- Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.
- Arbez M. 1987. Les ressources génétiques forestières en France. Les Conifères. Vol. 1. INRA, France.
- Arbez M., Bernard-Dagan C., Fillon C. 1974. Variabilité intraspécifique des monoterpènes de *Pinus nigra* (Arn.). Bilan des premiers résultats. *Ann. Sci. For.* 31, 57-70.

- Arbez M., Bernard-Dagan C., Fillon C. 1974. Variabilité intraspécifique des mono terpènes de *Pinus nigra* Arn. Bilan des premiers résultats. Ann. Sci. For. 31, 57-70.
- Arbez M., Millier C. 1971. Contribution à l'étude de la variabilité géographique de *Pinus nigra* Arn. Ann. Sci. For. 28, 23-49.
- Arrabal C., Cortijo M., de Simón B. F., Vallejo M. C. G., Cadahía E. 2005. Differentiation among five Spanish *Pinus pinaster* provenances based on its oleoresin terpenic composition. Biochem. Syst. Ecol. 33, 1007–1016.
- Avice J. C., Arnold J., Ball R. M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J. E., Saunders N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst., 18, 489-522.
- Bader A., Flamini G., Cioni P. L., Morelli I. 2000. Composition of the essential oils from leaves, branches and cones of *Pinus laricio* Poiret collected in Sicily, Italy. J. Essent. Oil Res. 12, 672-674.
- Bailey C. D., Carr T. G., Harris S. A., Hughes C. E. 2003. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. Mol. Phylogenet. Evol. 29, 435-455.
- Bailey D. K., Snajberk K., Zavarin E. 1982. On the question of natural hybridization between *Pinus discolor* and *Pinus cembroides*. Biochem. Syst. Ecol. 10, 111-119.
- Baker E. A. 1982. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: Cutler D. J., Alvin K. L., Price C. E., editors. The plant cuticle. Academic Press, London, pp. 139-165.
- Baker E. A. 1982. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: Cutler D. F., Alvin K. L., Price C. E., editors. The plant cuticle. Linnean Society Symposium Series. Vol. 10. Academic Press, London, pp. 139–165.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils - a review. Food Chem. Toxicol. 46, 446-475.

- Baldwin B. G., Sanderson M. J., Porter J. M., Wojciechowski M. F., Campbell C. S., Donoghue M. J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82, 247-277.
- Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37-48.
- Baradat P., Bernard-Dagan C., Fillon C., Marpeau A., Pauly G. 1972. Les terpènes du Pin maritime: aspects biologiques et génétiques. II. Hérité de la teneur en monoterpènes. *Ann. Sci. For.* 29, 307-334.
- Baradat P., Pastuszka P. 1992. Le pin maritime. In: Gallais A., Bannetot H., editors. *Amélioration Végétale des Espèces Cultivées*. INRA, Paris, pp. 695-709.
- Barik A., Bhattacharya B., Laskar S., Banerjee T. C. 2004. The determination of *n*-alkanes in the cuticular wax of leaves of *Ludwigia adscendes* L. *Phytochem. Anal.* 15, 109-111.
- Barnes J. D., Percy K. E., Paul N. D., Jones P., McLaughlin C. K., Mullineaux P. M., Creissen G., Wellburn A. R. 1996. The influence of UV-B radiation on the physicochemical nature of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaf surfaces. *J. Exp. Bot.* 47, 99-109.
- Barthlott W., Neinhuis C. 1997. Purity of the sacred lotus or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* 202, 1-8.
- Barthlott W., Neinhuis C., Cutler D., Ditsch F., Meusel I., Theisen I., Wilhelmi H. 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Bot. J. Linn. Soc.* 126, 237-260.
- Barton P. M. 1957. Recent Advances in Sesquiterpenoid Chemistry. *Quarterly Review*, 11, 189.
- Bastien D., Favre J. M., Collignon A. M., Sperisen C., Jeandroz S. 2003. Characterization of a mosaic minisatellite locus in the mitochondrial DNA of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Theor. Appl. Genet.* 107, 574-580.

- Beckmann J. S., Solter M. 1990. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Biotechnology* 8, 930-932.
- Behnke H. D. 1974. Sieve element plastids of Gymnospermae: Their ultrastructure in relation to systematics. *Plant Syst. Evol.* 123, 1-12.
- Beldie A. 1952. Genul *Pinus* L.. In: Săvulescu T., editor. *Flora Republicii Române* 1. Academiei R. P. R., București, pp. 168-176.
- Bendich A. J., Loretz C., Monnat R. J. Jr. 1993. The structure of the plant mitochondrial genome. In: Brennicke A., Kück, U., editors. *Plant Mitochondria*. VCH, Weinheim, Germany, pp. 171-180.
- Bianchi G., Murelli C., Ottaviano E. 1990. Maize pollen lipids. *Phytochemistry* 29, 739-744.
- Blečić V. 1967. Gymnospermae. *Catalogus Florae Jugoslaviae*, Ljubljana 1-2, 8-9.
- Bogunic F., Muratovic E., Ballian D., Siljak-Yakovlev S., Brown S. C. 2007. Genome size stability of five subspecies of *Pinus nigra* Arnold s.l. *Environ. Exp. Bot.* 59, 354-360.
- Bogunic F., Muratovic E., Brown S. C., Siljak-Yakovlev S. 2003. Genome size of five *Pinus* from Balkan region. *Plant Cell Rep.* 22, 59-63.
- Bogunić F., Siljak-Yakovlev S., Muratović E., Ballian D. 2011. Different karyotype patterns among allopatric *Pinus nigra* (Pinaceae) populations revealed by molecular cytogenetics. *Plant Biol.* 13, 194-200.
- Bojović S. 1995. Biodiversité du pin noir (*Pinus nigra* Arn.) en région méditerranéenne. Thèse doctorale. Université d'Aix-Marseille III. France.
- Bojović S. 1997. Crni bor i terpeni. Monografija. Zadužbina Andrejević, Beograd.
- Bojovic S., Jurc M., Drazic D., Pavlovic P., Mitrovic M., Djurdjevic L., Dodd R. S., Afzal-Raffi Z. A., Barbero M. 2005. Origin identification of *Pinus nigra* populations in southwestern Europe using terpene composition variations. *Trees* 19, 531-538.

- Bonnet-Masimbert M., Bikay-Bikay V. 1978. Variabilité intraspécifique des isozymes de la glutamate-oxaloacétate transaminase chez *Pinus nigra* (Arn.). Intérêt pour la taxonomie des sous-espèces. *Silvae Genet.* 27, 71-78.
- Boratyński A., Wachowiak W., Dering M., Boratyńska K., Sękiewicz K., Sobierajska K., Jasińska A. K., Klimko M., Montserrat J. M., Romo A., Ok T., Didukh Y. 2014. The biogeography and genetic relationships of *Juniperus oxycedrus* and related taxa from the Mediterranean and Macaronesian regions. *Bot. J. Linn. Soc.* DOI:10.1111/boj.12147.
- Borst P., Kroon A. M. 1969. Mitochondrial DNA: physiochemical properties, replication and genetic function. *Int. Rev. Cytol.* 26, 107-190.
- Borzan Z. 1977. Contribution to the karyotype analysis of the European Black pine (*Pinus nigra* Arn.). *Ann. For.* 8, 29-50.
- Borzan Z. 1981. Karyotype analysis from endosperm of European Black pine and Scots pine. *Ann. For.* 10, 1-42.
- Boşcaiu N., Boşcaiu M. 1999. On the presence of *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* in Romania. *Wiss. Mitt. Niederösterr. Landesmuseum* 12, 21-24.
- Boscherini G., Morgante M., Rossi P., Vendramin G. G. 1994. Allozyme and chloroplast DNA variation in Italian and Greek populations of *Pinus leucodermis*. *Heredity* 73, 284-290.
- Bossart J. L., Prowell D. P. 1998. Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. *Trends Ecol. Evol.* 13, 202-206.
- Bousquet J., Strauss S. H., Doerksen A. H., Price R. A. 1992b. Extensive variation in evolutionary rate of *rbcL* gene sequences among seed plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7844-7848.
- Bousquet J., Strauss S. H., Li P. 1992a. Complete congruence between morphological and *rbcL*-based molecular phylogenies in birches and related species (family Betulaceae). *Mol. Biol. Evol.* 9, 1076-1088.

- Boys J., Cherry M., Dayanandan S. 2005. Microsatellite analysis reveals genetically distinct populations of red pine (*Pinus resinosa*, Pinaceae). *Am. J. Bot.* 92, 833-841.
- Bray E. E., Evans E. D. 1961. Distribution of *n*-paraffins as a clue to recognition of source beds. *Geochim. Cosmochim. Acta* 22, 2-15.
- Brookfield J. F. Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol. Ecol.* 5, 453-455.
- Bucci G., Anzidei M., Madaghiele A., Vendramin G.G. 1998. Detection of haplotypic variation and natural hybridization in *halepensis*-complex pine species using chloroplast simple sequence repeat (SSR) markers. *Mol. Ecol.* 7, 1633-1643.
- Burban C., Petit R. J. 2003. Phylogeography of maritime pine inferred with organelle markers having contrasted inheritance. *Mol. Ecol.* 12, 1487-1495.
- Buschhaus C., Jetter R. 2011. Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: How do plants seal their epidermal surfaces? *J. Exp. Bot.* 62, 841-853.
- Butcher P. A., Doran J. C., Snee M. U. 1994. Intraspecific variation in leaf oils of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 22, 419-430.
- Cameron K. D., Teece M. A., Bevilacqua E., Lawrence B. 2000. Diversity of cuticular wax among *Salix* species and *Populus* species hybrids. *Phytochemistry* 60, 715-725.
- Canard D., Perru O., Tauzin V., Devillard C., Bonhoure J. P. 1997. Terpene composition variations in diverse provenances of *Cedrus libani* (A.) Rich. and *Cedrus atlantica* Manet. *Trees* 11, 504-510.
- Cape J. N., Fowler D. 1981. Changes in epicuticular wax of *Pinus sylvestris* exposed to polluted air. *Silva Fenn.* 15, 457-458.
- Caramiello R., Maffei M., Miaja M. L., Me G. 2000. Pollen surface alkane composition of *Corylus avellana* x *C. maxima* hybrids. *ISHS Acta Hort.* 556: V International Congress on Hazelnut (abstrakt).

- Chagné D., Chaumeil P., Ramboer A., Collada C., Guevara A., Cervera M. T., Vendramin G. G., Garcia V., Frigerio J. M., Echt C., Richardson T., Plomion C. 2004. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theor. Appl. Genet.* 109, 1204-1214.
- Chalchat, J. C., Gorunović, M. S. 1995a. Chemotaxonomy of pines native to the Balkans. Part 2: Illyrian black pine *Pinus nigra* Arnold ssp. *nigra* (Arn., Hayek), Pinaceae according to location, plant part and age of specimens. *Pharmazie* 50, 281-283.
- Chalchat, J. C., Gorunović, M. S. 1995b. Chemotaxonomy of pines native to the Balkans. Part 3: Variations in the composition of essential oils of the *Pinus nigra* Arnold ssp. *dalmatica* according to age of specimens. *Pharmazie* 50, 575-576.
- Chaw S. M., Sung H. M., Long H., Zharkikh A., Li W. H. 1995. The phylogenetic positions of the conifer genera *Amentotaxus*, *Phyllocladus*, and *Nageia* inferred from 18S rRNA sequences. *J. Mol. Evol.* 41, 224-230.
- Chaw S. M., Zharkikh A., Sung H. M., Leu T. C., Li W. H. 1997. Molecular phylogeny of extant gymnosperms and seed plant evolution: analysis of nuclear 18S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 14, 56-68.
- Chen C., Durand E., Forbes F., Francois O. 2007. Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. *Mol. Ecol. Notes* 7, 747-756.
- Chesnoy L. 1987. L'origine des organites du cytoplasme embryonnaire chez les Gymnospermes. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 134, 51-56.
- Chikaraishi Y., Naraoka H. 2003. Compound-specific δD - $\delta^{13}C$ analyses of *n*-alkanes extracted from terrestrial and aquatic plants. *Phytochemistry* 63, 361-371.
- Clement M., Posada D. C. K. A., Crandall K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9, 1657-1659.
- Clifton S. W., Minx P., Fauron C. M., Gibson M., Allen J. O., Sun H., Thompson M., Barbazuk W. B., Kanuganti S., Tayloe C., Meyer L., Wilson R. K., Newton K. J.

2004. Sequence and comparative analysis of the maize NB mitochondrial genome. *Plant Physiol.* 136, 3486-3503.
- Čolić D. 1965. Poreklo i sukcesija šumskih zajednica sa pančićeovom omorikom (*Picea omorika* Panč.) na planini Tari. *Zaštita prirode*, Beograd 29-30, 65-90.
- Condit R., Hubbel S. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34, 66-71.
- Corrigan D., Timoney R. F., Donnelly D. M. X. 1978. *n*-Alkanes and ω -hydroxyalkanoic acids from the needles of twenty – eight *Picea* species. *Phytochemistry* 17, 907-910.
- Crichfield W. B. 1963. The Austrian x Red pine hybrid. *Silvae Genet.* 12, 187-192.
- Croteau R., Kutchan T. M., Lewis N. G. 2000. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan B., Gruissem W., Jones R., editors. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp. 1250–1268.
- Cvjetičanin R. 1999. Taksonomija i cenoekologija balkanskog kitnjaka (*Quercus dalechampii* Ten.) na serpentinitima centralne i zapadne Srbije. Doktorska disertacija. Šumarski fakultet, Beograd.
- Daly G. T. 1964. Leaf-surface wax in *Poa colensoi*. *J. Exp. Bot.* 15, 160-165.
- De Simón B. F., Vallejo M. C. G., Cadahía E., Miguel C. A., Martínez M. C. 2001. Analysis of lipophilic compounds in needles of *Pinus pinea* L. *Ann. Forest Sci.* 58, 449-454.
- Debazac E. 1964. Manuel des conifères. École National des Eaux et Forêts, Nancy (France).
- Delevoy G. 1949. A propos de la systématique de *Pinus nigra* Arnold. *Stn. Rech. Groenendal Trav. Ser. B*, 12-41.
- Demesure B., Sodji N., Petit R. J. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol. Ecol.* 4, 129-131.

- Dempsey D., O'Flaherty C., Hook I. 2003. *Taxus* species - morphological and chemical variations in needles and seeds. IV International Conifer Conference, ISHS Acta Hort. 615, 223-231.
- dePamphilis C. W., Palmer J. D. 1990. Loss of photosynthetic and chlororespiratory genes from the plastid genome of a parasitic flowering plant. *Nature* 348, 337-339.
- Derory J., Mariette S., González-Martínez S. C., Chagné D., Madur D., Gerber S., Brach J., Persyn F., Ribeiro M. M., Plomion C. 2002. What can nuclear microsatellites tell us about maritime pine genetic resources conservation and provenance certification strategies? *Ann. For. Sci.* 59, 699-708.
- Dewick P. M. 2002. Medicinal natural products: A biosynthetic approach. 2nd edition, John Wiley & Sons, New York.
- Dodd R. S., Poveda M. M. 2003. Environmental gradients and population divergence contribute to variation in cuticular wax composition in *Juniperus communis*. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 1257-1270.
- Dogra P. D. 1980. Embryogeny of gymnosperms and taxonomy – an assessment. In: Nair P. K. K., editor. Glimpses in plant research. Vol. 5. Vikas Publishing House, New Delhi (India), pp. 114-128.
- Dorđević P. 1931. *Pinus nigra* Arn. var. *gočensis*, n. var. Izdanje Ministarstva Šuma i Rudnika, Beograd.
- Douaihy B., Vendramin G. G., Boratyński A., Machon N., Dagher-Kharrat M. B. 2011. High genetic diversity with moderate differentiation in *Juniperus excelsa* from Lebanon and the eastern Mediterranean region. *AOB Plants* plr003.
- Doyle J. J. 1945. Developmental lines in pollination mechanisms in the Coniferales. *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.* 24, 43-62.
- Doyle J. J., Doyle J. L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11-15.
- Dragota S., Riederer M. 2007. Epicuticular wax crystals of *Wollemia nobilis*: Morphology and chemical composition. *Ann. Bot.* 100, 225-231.

- Du F. K., Petit R. J., Liu J. Q. 2009. More introgression with less gene flow: chloroplast vs. mitochondrial DNA in the *Picea asperata* complex in China, and comparison with other Conifers. *Mol. Ecol.* 18, 1396-1407.
- Dumolin-Lapègue S., Demesure B., Fineschi S., Le Corre V., Petit R. J. 1997. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* 146, 1475-1487.
- Dumolin-Lapègue S., Kremer A., Petit R. J. 1999. Are chloroplast and mitochondrial DNA variation species-independent in oaks? *Evolution* 53, 1406-1413.
- Dzialuk A., Muchewicz E., Boratyński A., Montserrat J. M., Boratyńska K., Burczyk J. 2009. Genetic variation of *Pinus uncinata* (Pinaceae) in the Pyrenees determined with cpSSR markers. *Plant Syst. Evol.* 277, 197-205.
- Echt C. S., May-Marquardt P., Hsieh M., Zahorchak R. 1996. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome* 39, 1102-1108.
- Echt C. S., Saha S., Deemer D. L., Nelson C. D. 2011. Microsatellite DNA in genomic survey sequences and UniGenes of loblolly pine. *Tree Genet. Genomes* 7, 773-780.
- ecologically divergent species (*Edraianthus serpyllifolius* and *E. tenuifolius*, Campanulaceae) within the Balkan refugium. *J. Biogeogr.* 38, 1381-1393.
- Edgar R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792-1797.
- Eglinton G., Gonzalez A. G., Hamilton R. J., Raphael R. A. 1962. Hydrocarbon constituents of the wax coatings of plant leaves: a taxonomic survey. *Phytochemistry* 1, 89-102.
- Eigenbrode S. D., Espelie K. E. 1995. Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores. *Annu. Rev. Entomol.* 40, 171-194.
- Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat. Rev. Genet.* 5, 435-445.
- Ellstrand N. C., Elam D. R. 1993. Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24, 217-242.

- Ennos R. A. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* 72, 250-259.
- Ensikat H. J., Boese M., Mader W., Barthlott W., Koch K. 2006. Crystallinity of plant epicuticular waxes: electron and X-ray diffraction studies. *Chem. Phys. Lipids* 144, 45-59.
- Esteban I., Bergmann F., Gregorius H. R., Huhtinen O. 1976. Composition and genetics of monoterpenes from cortical oleoresin of Norway spruce and their significance for clone identification. *Silvae Genet.* 25, 59-66.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1, 47–50.
- Falkenberg M., Larsson N. G., Gustafsson C. M. 2007. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 679-699.
- Fallour, D., Fady B., Lefèvre F. 1997. Study on isozyme variation in *Pinus pinea* L.: Evidence of low polymorphism. *Silvae Genet.* 46, 201- 207.
- Farjon A. 1984. Pines: drawings and descriptions of the genus *Pinus*. Brill E. J., Backhuys W., Leiden (The Netherlands).
- Farjon A. 1990. Pinaceae. Koeltz Scientific Books, Königstein (Germany).
- Farjon A., Styles B. T. 1997. *Pinus* (Pinaceae). Flora Neotropica Monograph 75. The New York Botanical Garden, New York.
- Fineschi S. 1983. Variabilità intraspecifica in *Pinus nigra* (Arn.). Risultati di analisi su alcuni sistemi isoenzimatici. *Italia Forestale e Montana* 38, 200-213.
- Fineschi S., Grossoni P. 1981. Contenuto in monoterpeni di oleoresine xilematiche in provenienze diverse di pino laricio. *Italia Forestale e Montana* 36, 232-239.
- Fisher P. J., Richardson T. E., Gardner R. C. 1998. Characteristics of single- and multi-copy microsatellites from *Pinus radiata*. *Theor. Appl. Genet.* 96, 969-979.
- Francois O., Ancelet S., Guillot G. 2006. Bayesian clustering using hidden Markov random fields in spatial population genetics. *Genetics* 174, 805-816.

- Franco-Múgica F., García-Antón M., Maldonado-Ruiz J., Morla-Juriasti C., Dainz-Ollero H. 2001. The Holocene history of *Pinus* forests in the Spanish Northern Meseta. *The Holocene* 11, 343–358.
- Franich R. A., Goodin S. J., Volkman J. K. 1985. Alkyl esters from *Pinus radiata* foliage epicuticular wax. *Phytochemistry* 24, 2949-2952.
- Franich R. A., Gowar A. P., Volkman J. K. 1979. Secondary diols of *Pinus radiata* needles. *Phytochemistry* 18, 1563-1564.
- Franich R. A., Wells L. G., Holland P. T. 1978. Epicuticular wax of *Pinus radiata* needles. *Phytochemistry* 17, 1617-1623.
- Frankis M. P. 1988. Generic inter-relationships in Pinaceae. *Notes R. Bot. Gard. Edinb.* 45, 527-548.
- Fu H., Dooner H. K. 2002. Intraspecific violation of genetic colinearity and its implications in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 9573–9578.
- Fukarek P. 1958a. Prilog poznavanju crnog bora. Poljoprivredno-šumarski fakultet, Sarajevo 3, 3-92.
- Fukarek P. 1958b. Die Standortsrassen der Schwarzföhre (*Pinus nigra* Arn.). *Cbl. f. d. Ges. Forstwesen* 75, 203-207.
- Fukarek P., Vidaković M. 1965. Nalaz prelazne ili hibridne svojte borova na planini Prenju u Hercegovini. *Nučno društvo Bosne i Hercegovine, Radovi*, 28, 68-87.
- Gajić M., Kojić M., Ivanović M. 1954. Pregled šumskih fitocenoza Maljena. *Glasnik Šumarskog fakulteta, Beograd* 7, 255-276.
- Gajić M., Kojić M., Karadžić D., Vasiljević M., Stanić M. 1992. Vegetacija Nacionalnog parka Tara. Šumarski fakultet, Beograd, Nacionalni park Tara, Bajina Bašta.
- Gallis A. T., Panetsos K. P. 1997. Use of cortical terpenes to discriminate *Pinus brutia* (Ten.), *Pinus halepensis* (Mill.) and their hybrids. *Silvale Genet.* 46, 82-88.
- Gamache I., Jaramillo-Correa J. P., Payette S., Bousquet J. 2003. Diverging patterns of mitochondrial and nuclear DNA diversity in subarctic black spruce: imprint of a founder effect associated with postglacial colonization. *Mol. Ecol.* 12, 891-901.

- Ganopoulos I., Aravanopoulos F., Madesis P., Pasentsis K., Bosmali I., Ouzounis C., Tsaftaris A. 2013. Taxonomic identification of mediterranean pines and their hybrids based on the high resolution melting (HRM) and *trnL* approaches: from cytoplasmic inheritance to timber tracing. PLoS One 8, e60945.
- Gašić M. J. 1985. Etarska ulja. IHTM, Beograd.
- Gaussen H., Heywood V. H., Charter A. O. 1964. Pinus L.. In: Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Valentine D. H., Walters S. M., Webb B. A., editors. Flora Europea. Vol. 1, 1st edn. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 33-34.
- Gaussen H., Heywood V. H., Charter A. O. 1993. Pinus L.. In: Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Valentine D. H., Walters S. M., Webb B. A., editors. Flora Europea. Vol. 1, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 40-44.
- Gaut B. S., Muse S. V., Clark W. D., Clegg M. T. 1992. Relative rates of nucleotide substitution at the *rbcL* locus in monocotyledonous plants. J. Mol. Evol. 35, 292-303.
- Geiger H., Quinn C. 1975. Biflavonoids. In: Harborne J. B., editor. The flavonoids. Chapman and Hall, London (England), pp. 692-742.
- Gele M. D., Devos K. M. 1998. Plant comparative genetics after 10 years. Science 282, 656-659.
- Gellini R. 1968. Posizione sistematica del pino nero di Villetta Barrea in base ai caratteri anatomici degli agi. Ann. Acc. Ital. Sci. Forst. 17, 101-122.
- Georgescu C. C. 1936. Neue Beiträge zur Systematik der Schwarzföhre. Feddes Repert 41, 181-188.
- Gerber S., Baradat P., Marpeau A., Arbez M. 1995. Geographic variation in terpene composition of *Pinus nigra* Arn. For. Genet. 2, 1-10.
- Gerber S., Baradat P., Marpeau A., Arbez M. 1995. Geographic variation in terpene composition of *Pinus nigra* Arn. For. Genet. 2, 1-10.
- Gernandt D. S., Geada López G., Ortiz García S., Liston A. 2005. Phylogeny and classification of *Pinus*. Taxon 54, 29-42.

- Gernandt D. S., Liston A., Pinero D. 2003. Phylogenetics of *Pinus* subsections *Cembroides* and *Nelsoniae* inferred from cpDNA sequences. *Syst. Bot.* 28, 657-673.
- Gernandt D. S., Magallón S., Lopez G. G., Flores O. Z., Willyard A., Liston A. 2008. Use of simultaneous analyses to guide fossil-based calibrations of Pinaceae phylogeny. *Int. J. Plant Sci.* 169, 1086-1099.
- Gniwotta F., Vogg G., Gartmann V., Carver T. L. W., Riederer M., Jetter R. 2005. What do microbes encounter at the plant surface? *Plant Physiol.* 139, 519-530.
- Godbout J., Jaramillo-Correa J. P., Beaulieu J., Bousquet J. 2005. A mitochondrial DNA minisatellite reveals the postglacial history of jack pine (*Pinus banksiana*), a broad-range North American conifer. *Mol. Ecol.* 14, 3497-3512.
- González-Martínez S. C., Dubreuil M., Riba M., Vendramin G. G., Sebastiani F., Mayol M. Spatial genetic structure of *Taxus baccata* L. in the western Mediterranean Basin: past and present limits to gene movement over a broad geographic scale. *Mol. Phylogenet. Evol.* 55, 805-815.
- González-Martínez S. C., Gil L., Alía R. 2005. Genetic diversity estimates of *Pinus pinaster* in the Iberian Peninsula: a comparison of allozymes and quantitative traits. *Invest. Agr.: Sist. Recur. For.* 14, 3-12.
- Gorunović M. S., Lukić P. B. 2001. Farmakognozija. Farmaceutski fakultet, Beograd.
- Gostuški R. 1979. Lečenje lekovitim biljem. Narodna knjiga, Beograd.
- Gray M. W., Burger G., Lang, B. F. 1999. Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-1481.
- Gray M. W., Lang B. F., Burger G. 2004. Mitochondria of protists. *Annu. Rev. Genet.* 38, 477-524.
- Grotkopp E., Rejmanek M., Sanderson M. J., Rost T. L. 2004. Evolution of genome size in pines (*Pinus*) and its life-history correlates: supertree analyses. *Evolution* 58, 1705-1729.

- Guevara M. A., Soto A., Collada C., Plomion C., Savolainen O., Neale D. B., González-Martínez S. C., Cervera M. T. 2005. Genomics applied to the study of adaptation in pine species. *Invest. Agr.: Sist. Recur. For.* **14**, 292-306.
- Gugerli F., Senn J., Anzidei M., Madaghiele A., Büchler U., Sperisen C., Vendramin G. G. 2001c. Chloroplast microsatellites and mitochondrial *nad1* intron 2 sequences indicate congruent phylogenetic relationships among Swiss stone pine (*Pinus cembra*), Siberian stone pine (*P. sibirica*), and Siberian dwarf pine (*P. pumila*). *Mol. Ecol.* **10**, 1489-1497.
- Gugerli F., Sperisen C., Buchler U., Brunner I., Brodbeck S., Palmer J. D., Qiu Y. L. 2001a. The evolutionary split of Pinaceae from other conifers: evidence from an intron loss and a multigene phylogeny. *Mol. Phylogenet. Evol.* **21**, 167-175.
- Gugerli F., Sperisen C., Büchler U., Magni F., Geburek T., Jeandroz S., Senn J. 2001b. Haplotype variation in a mitochondrial tandem repeat of Norway spruce (*Picea abies*) populations suggests a serious founder effect during postglacial recolonization of the western Alps. *Mol. Ecol.* **10**, 1255-1263.
- Günthardt-Goerg M. S. 1985. Stomata and epicuticular wax formation on needles of *Pinus cembra* and *Picea abies*. *Bot. Helv.* **95**, 5-12.
- Günthardt-Goerg M. S. 1986. Epicuticular wax of needles of *Pinus cembra*, *Pinus sylvestris* and *Picea abies*. *Bot. Helv.* **95**, 5-12. *Eur. J. Forest Pathol.* **16**, 400-408.
- Guo N., Gao J., Yuji H., Zhang Z., Guo Y. 2014. Variations in leaf epicuticular *n*-alkanes in some *Broussonetia*, *Ficus* and *Humulus* species. *Biochem. Syst. Ecol.* **54**, 150-156.
- Gupta P. K., Balyan I. S., Sharma P. C., Ramesh B. 1996. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. *Curr. Sci.* **70**, 45-54.
- Hall D. M., Jones R. L. 1961. Physiological significance of surface wax on leaves. *Nature* **191**, 95-96.
- Hall S. E., Dvorak J. S., Johnston J. S., Price J. H., Williams C. G. 2000. Flow cytometric analysis of DNA content for tropical and temperate New World pines. *Ann. Bot.* **86**, 1081-1086.

- Hammer O., Harper D. A. T., Ryan P. D. 2009. PAST – palaeontological statistics, ver. 1.89. Available at <http://folk.uio.no/ohammer/past>
- Hamrick J. L., Mitton J. B., Linhart Y.B. Levels of Genetic Variation in Trees: Influence of life history characteristics. 1979. Presented at the Symposium on Isozymes of North American Forest Trees and Forest Insects, Berkeley, Calif.
- Handa H. 2003. The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana*. Nucleic Acids Res. 31, 5907-5916.
- Hannoufa A., McNevin J. P., Lemieux B. 1993. Epicuticular waxes of *eceriferum* mutants of *Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry 3, 851–855.
- Hanover J. W. 1966a. Inheritance of 3-carene concentration in *Pinus monticola*. Forest Sci. 12, 447–450.
- Hanover J. W. 1966b. Environmental variation in the monoterpenes of *Pinus monticola* Dougl. Phytochemistry 5, 713-717.
- Hanover J. W. 1966c. Genetics of terpenes. I. Gene control of monoterpene levels in *Pinus monticola* Dougl. Heredity 21, 73-84.
- Hanover J. W. 1992. Applications of terpene analysis in forest genetics. New Forest. 6, 159-178.
- Harborne J. B. 1991. Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids. In: Harborne J. B., Tomas-Barberan F. A., editors. Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids. Clarendon Press, Oxford, pp. 399-426.
- Hart J. A. 1987. A cladistical analysis of conifers: preliminary results. A. Arn. Arb. 68, 269-307.
- Havey M. J., McCreight J. D., Rhodes B., Taurick G. 1998. Differential transmission of the *Cucumis* organellar genomes. Theor. Appl. Genet. 97, 122–128.
- Hellqvist S., Nyman B., Stadenberg I. 1992. Epicuticular waxes, peroxidase activity and contents of chlorophyll, phaeophytin and carotenoids of needles from *Pinus*

- sylvestris* and *Picea abies* as indicators of air pollution in the region of Stockholm. Scand. J. Forest Res. 7, 39-51.
- Hemmers H., Gülz P. G. 1989a. Pentacyclic triterpenoids in epicuticular waxes from *Euphorbia lathyris* L., Euphorbiaceae. Z. Naturforsch. 44c, 193-201.
- Hemmers H., Gülz P. G. 1989b. Tetra- and pentacyclic triterpenoids from epicuticular wax of *Euphorbia cyparissias* L., Euphorbiaceae. Z. Naturforsch. 44c, 563-567.
- Herbin G. A., Robins P. A. 1968a. Studies on plant cuticular waxes - III. The leaf wax alkanes and ω -hydroxy acids of some members of the *Cupressaceae* and *Pinaceae*. Phytochemistry 7, 1325-1337.
- Herbin G. A., Robins P. A. 1968b. Studies on plant cuticular waxes - II. Alkanes from members of the genus *Agave* (Agavaceae), the genera *Kalanchoe*, *Echeveria*, *Crassula*, and *Sedum* (Crassulaceae) and the genus *Eucalyptus* (Myrtaceae) with an examination of Hutchinson's sub-division of the *Angiosperms* into *Herbaceae* and *Lignosae*. Phytochemistry 7, 267-268.
- Herbin G. A., Robins P. A. 1969. Patterns of variation and development in leaf wax alkanes. Phytochemistry 8, 1985-1998.
- Herbin G. A., Sharma K. 1969. Studies on plant cuticular waxes - V. The wax coatings of pine needles: A taxonomic survey. Phytochemistry 8, 151-160.
- Heuertz M., Teufel J., González-Martínez S. C., Soto A., Fady B., Alía R., Vendramin G. G. 2009. Geography determines genetic relationships between species of mountain pine (*Pinus mugo* complex) in Western Europe. J. Biogeogr. 37, 541-556.
- Hewitt G. M. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. Biol. J. Linn. Soc. 68, 87-112.
- Hill A. S., Mattick L. R. 1966. The n-alkanes of cabbage (var. *Copenhagen*) and sauerkraut. Phytochemistry 5, 693-697.
- Hiltunen R., Tigerstedt P. M. A., Juvonen S., Pohjola J. 1975. Inheritance of 3-carene quantity in *Pinus sylvestris* L. Farmaseuttinen Aikakauslehti 84, 69-72.

- Hiratsuka J., Shimada H., Whittier R., Ishibashi T., Sakamoto M., Mori M., Kondo C., Honji Y., Sun C. R., Meng B. Y., Li Y. Q., Kanno A., Nishizawa Y., Hirai A., Shinozaki K., Sugiura M. 1989. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.* 217, 185-194.
- Höhn M., Ábrán P., Vendramin G.G. 2005. Genetic analysis of Swiss stone pine populations (*Pinus cembra* L. subsp. *cembra*) from the Carpathians using chloroplast microsatellites. *Acta Silv. Lign. Hung.* 1, 39-47.
- Holloway, P. J., Jeffree C. E., Baker E. A. 1976. Structural determination of secondary alcohols from plant epicuticular waxes. *Phytochemistry* 15, 1769-1770.
- Hu Y. S., Napp-Zinn K., Winne D. 1989. Comparative anatomy of seed-scales of female cones of Pinaceae. *Bot. Jahrb. Syst.* 111, 63-85.
- Hunnemann D. H. 1972. The constituent acids of gymnosperm cutins. *Phytochemistry* 11, 1982-2001.
- Iconomou N., Valkanas G. 1966. On the composition of balsam resin of several pine species of Greece. *Pharm. Acta Helv.* 41, 59-63.
- Idžojić M., Kajba D., Franjić J. 2005. Differentiation of F₁ hybrids *Pinus nigra* J. F. Arnold x *P. sylvestris* L., *P. nigra* J. F. Arnold x *P. densiflora* Siebold et Zucc., *P. nigra* J. F. Arnold x *P. thunbergiana* Franco and their parental species by needle volatile composition. *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 427-439.
- Isbell T. A., Carlson K. D., Abbott T. P., Phillips B. S., Erhan S. M., Kleiman R. 1996. Isolation and characterization of wax esters in meadowfoam oil. *Ind. Crop. Prod.* 5, 239-243.
- Ismail M. 2010. Molecular genetic diversity among natural populations of *Populus*. PhD thesis. University of British Columbia, Faculty of Forestry, Vancouver.
- Jansen R. K., Michaels H. J., Wallace R. S., Kim K.-J., Keeley S. C., Watson L. E., Palmer J.D. 1992. Chloroplast DNA variation in the Asteraceae: phylogenetic and evolutionary implications. In: Soltis P. S., Soltis D. E., Doyle J. J., editors. *Molecular Systematics of Plants*. Chapman and Hall, New York.

- Jaramillo-Correa J. P., Beaulieu J., Bousquet J. 2004. Variation in mitochondrial DNA reveals multiple distant glacial refugia in black spruce (*Picea mariana*), a transcontinental North American conifer. *Mol. Ecol.* 13, 2735-2747.
- Jaramillo-Correa J. P., Grivet D., Terrab A., Kurt Y., De-Lucas A. I., Wahid N., Vendramin G. G., González-Martínez S. C. 2010. The Strait of Gibraltar as a major biogeographic barrier in Mediterranean conifers: a comparative phylogeographic survey. *Mol. Ecol.* 19, 5452-5468.
- Jarne P., Lagoda P. J. L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11, 424-430.
- Jarne P., Lagoda P. J. L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11, 424-429.
- Jeffree C. E. 1996. Structure and ontogeny of plant cuticles. In: Kerstiens G., editor. *Plant cuticles. An integrated approach*. BIOS Scientific, Oxford, pp. 33–82.
- Jeffree C. E. 2006. The fine structure of the plant cuticle. In: Riederer M., Müller C., editors. *Biology of the plant cuticle*. Vol. 23. Blackwell, Oxford, pp. 11–144.
- Jeffrey E. C. 1905. The comparative anatomy and phylogeny of the Coniferales. Part 2. The Abietineae. *Mem. Boston Soc. Nat. Hist.* 6, 1-37.
- Jenks M. A., Joly R. J., Peters P. J., Rich P. J., Axtell J. D., Ashworth E. N. 1994. Chemically induced cuticle mutation affecting epidermal conductance to water vapor and disease susceptibility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant Physiol.* 105, 1239–1245.
- Jenks M. A., Tuttle H. A., Eigenbrode S. D., Feldmann K. A. 1995. Leaf epicuticular waxes of the *eceriferum* mutants in *Arabidopsis* during development. *Plant Physiol.* 108, 369-377.
- Jenks M. A., Tuttle H. A., Feldmann K. A. 1996. Changes in epicuticular waxes on wildtype and *eceriferum* mutants in *Arabidopsis* during development. *Phytochemistry* 42, 29–34.
- Jetter R. 2000. Long – chain alkanediols from *Myricaria germanica* leaf cuticular waxes. *Phytochemistry* 55, 169-176.

- Jetter R., Klinger A., Schäffer S. 2002. Vary long – chain phenylpropyl and phenylbutyl esters from *Taxus baccata* needle cuticular waxes. *Phytochemistry* 61, 589-587.
- Jetter R., Kunst L., Samuels A. L. 2007. Composition of plant cuticular waxes. In: Rieder M., Müller C., editors. *Biology of the plant cuticle*. Vol. 23. Blackwell, Oxford, pp. 145-181.
- Jetter R., Riederer M. 1996. Cuticular waxes from the leaves and fruit capsules of eight Papaveraceae species. *Can. J. Bot.* 74, 419-430.
- Jetter R., Schäffer S. 2001. Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. *Plant Physiol.* 126, 1725–1737.
- Jetter R., Schäffer S., Riederer M. 2000. Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant Cell Environ.* 23, 619–628.
- Jovanović B. 1955. Šumske fitocenoze i staništa Suve Planine. *Glasnik Šumarskog fakulteta, Beograd* 9, 3-101.
- Jovanović B. 1959. Prilog poznavanju šumskih fitocenoza Goča. *Glasnik Šumarskog fakulteta, Beograd* 12, 91-131.
- Jovanović B. 1972. Fitocenoze crnog bora (*Pinus nigra* Arn.) na Kopaoniku. *Glasnik Prirodnjačkog muzeja u Beogradu* B27, 11-29.
- Jovanović B. 1980. Šumske fitocenoze i staništa Suve planine. *Glasnik Šumarskog fakulteta, Beograd*, A55.
- Jovanović B. 1992. *P. nigra* Arn. In: Sarić M, editor. *Flora Srbije* 1. Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd, pp. 200-202.
- Joyner K. L., Wang X. R., Johnston J. S., Price J. H., Williams C. G. 2001. DNA content for Asian pines parallels NewWorld relatives. *Can. J. Bot.* 79, 192–196.
- Karalamangala R. R., Nickrent D.L. 1989. An electrophoretic study of representatives of subgenus *Diploxylon* of *Pinus*. *Can. J. Bot.* 67, 1750-1759.
- Kaya Z., Ching K., Stafford S. 1985. A statistical analysis of karyotypes of European Black pine (*Pinus nigra* Arn.) from different sources. *Silvae Genet.* 34, 148-156.

- Kekulé A. 1866. Lehrbuch der Organischen Chemie. Verlag Ferdinand Enke, Erlangen.
- Kellogg E. A., Bennetzen J. L. 2004. The evolution of nuclear genome structure in seed plants. *Am. J. Bot.* 91, 1709-1725.
- Kerstiens G. 1996. Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure – function relationships. *Trends Plant Sci.* 1, 125–129.
- Kitić D., Palić R., Ristić N., Stojanović G. 1999. The fatty acids and alkanes of *Satureja adamovicii* Šilić and *Satureja fukarekii* Šilić. *J. Serb. Chem. Soc.* 64, 389-392.
- Kitić D., Palić R., Ristić N., Stojanović G., 1999. The fatty acids and alkanes of *Satureja adamovicii* Šilić and *Satureja fukarekii* Šilić. *J. Serb. Chem. Soc.* 64, 389-392.
- Knight T. G., Wallwork M. A. B., Sedgley M. 2004. Leaf epicuticular wax and cuticle ultrastructure of four *Eucalyptus* species and their hybrids. *Int. J. Plant Sci.* 165, 27-36.
- Knoop V. 2004. The mitochondrial DNA of land plants: peculiarities in phylogenetic perspective. *Curr. Genet.* 46, 123-139.
- Kolattukudy P. E. 1970. Reduction of fatty acids to alcohols by cell-free preparations of *Euglena gracilis*. *Biochemistry* 9, 1095-1102.
- Kolattukudy P. E. 1984. Natural waxes on fruits. *Post Harvest Pomology Newsletter* 2, 1-4.
- Kolattukudy P. E. 1996. Biosynthetic pathways of cutin and waxes and their sensitivity to environmental stresses. The Society for Experimental Biology Annual Meeting, University of Lancaster 25-29.
- Koornneef M., Hanhart C. J., Thiel F. 1989. A genetic and phenotypic description of *eceriferum* (cer) mutants in *Arabidopsis thaliana*. *J. Hered.* 80, 118–122.
- Koukos P. K., Papadopoulou K. I., Papagiannopoulos A. D. 2001. Essential oils of the twigs of some conifers grown in Greece. *Holz Roh Werkst.* 58, 437-438.
- Kovačević N. 2004. Osnovi farmakognoziije. Treće izdanje. Srpaska školska knjiga, Beograd.

- Krupkin A. B., Liston A., Strauss S.H. 1996. Phylogenetic analysis of the hard pines (*Pinus* subgenus *Pinus*, Pinaceae) from chloroplast DNA restriction site analysis. *Am. J. Bot.* 83, 489-498.
- Kubeczka K. H., Schultze W. 1987. Biology and chemistry of conifer oils. *Flavour Fragr. J.* 2, 137-148.
- Kubo T., Nishizawa S., Sugawara A., Itchoda N., Estiati A., Mikami T. 2000. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA^{Cys}(GCA). *Nucleic Acids Res.* 28, 2571-2576.
- Kuhn T. K., Krull E. S., Bowater A., Grice K., Gleixner G. 2010. The occurrence of short chain *n*-alkanes with an even over odd predominance in higher plants and soils. *Org. Geochem.* 41, 88-95.
- Kunst L., Samuels A. L. 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog. Lipid Res.* 42, 51-80.
- Kunst L., Samuels L. 2009. Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 12, 721-727.
- Kuzoff R. K., Sweere J. A., Soltis D. E., Soltis P. S., Zimmer E. A. 1998. The phylogenetic potential of entire 26S rDNA sequences in plants. *Mol. Biol. Evol.* 15, 251-263.
- Labrana X., Araus J. L. 1991. Effect of foliar applications of silver nitrate and ear removal on carbon dioxide assimilation in wheat flag leaves. *Field Crops Res.* 28, 149-162.
- Lagalante A. F., Montgomery M. E. 2003. Analysis of terpenoids from Hemlock (*Tsuga*) species by solid-phase microextraction/gas chromatography/ion-trap mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2115-2120.
- Lamarque A. L., Fortunato R. H., Guzman C. A. 1998. Seed oil alkanes from Leguminosae species: even-carbon number preference. *Phytochemistry* 49, 731-736.

- Laroche J., Li P., Maggia L., Bousquet J. 1997. Molecular evolution of angiosperm mitochondrial introns and exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5722–5727.
- Le Maitre D. C. 1998. Pines in cultivation: a global view. In: Richardson DM, editor. *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 407-431.
- Lee C. 1968. Geographic variation in European Black Pine. *Silvae Genet.* 5-6, 165-172.
- Lee S. B., Kaittanis C., Jansen R. K., Hostetler J. B., Tallon L. J., Town C. D., Daniell H. 2006. The complete chloroplast genome sequence of *Gossypium hirsutum*: organization and phylogenetic relationships to other angiosperms. *BMC Genomics* 7, 61.
- Lenormand T. 2002. Gene flow and the limits to natural selection. *Trends Ecol. Evol.* 17, 183-189.
- LePage B. A. , Basinger J. F. 1995. Evolutionary history of the genus *Pseudolarix* Gordon (Pinaceae). *Int. J. Plant Sci.* 156, 910-950.
- LePage B. A. 2003. The evolution, biogeography and palaeoecology of the Pinaceae based on fossil and extant representatives. *Acta Hort.* 615, 29-52.
- Lesica P., Allendorf F. W. 1995. When peripheral populations valuable for conservation? *Conserv. Biol.* 9, 753-760.
- Lesser M. R., Parchman T. L., Buerkle C. A. 2012. Cross-species transferability of SSR loci developed from transcriptome sequencing in lodgepole pine. *Mol. Ecol. Resour.* 12, 448-455.
- Lewandowski A., Boratyński A., Mejnartowicz L. 2000. Allozyme investigations on the genetic differentiation between closely related pines - *Pinus sylvestris*, *P. mugo*, *P. uncinata*, and *P. uliginosa* (Pinaceae). *Plant Syst. Evol.* 221, 15-24.
- Li H., Madden J. L., Potts B. M. 1997. Variation in leaf waxes of the Tasmanian *Eucalyptus* species – I. Subgenus *Symphyomyrtus*. *Biochem. Syst. Ecol.* 25, 631-657.
- Li L. C. 1995. Studies on the karyotype and phylogeny on the Pinaceae. *J. Syst. Evol.* 33, 417-432.

- Li R., Jiang Z. T., Yu J. C. 2005. Essential oil composition of the needles of *Abies nephrolepsis* Maxim from China. *Flavour Fragr. J.* 20, 534-536.
- Li R., Luo G., Meyers P. A., Gu Y., Wang H., Xie S. 2012. Leaf wax *n*-alkane chemotaxonomy of bamboo from a tropical rain forest in Southwest China. *Plant Syst. Evol.* 298, 731-738.
- Li Y-C., Korol A. B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 11, 2453-2465.
- Liakopoulos G., Stavrianakou S., Karabourniotis G. 2001. Analysis of epicuticular phenolics of *Prunus persica* and *Olea europaea* leaves: Evidence from the chemical origin of the UV – induced blue florescence of stomata. *Ann. Bot.* 87, 641-648.
- Liber Z., Nikolic T., Mitic B., Satovic Z. 2003. RAPD markers and black pine (*Pinus nigra* Arnold) intraspecies taxonomy: Evidence from the study of nine populations. *Acta Soc. Bot. Pol.* 72, 249-257.
- Liber Z., Nikolić T., Mitić B., Šatović Z. 2003. RAPD markers and black pine (*Pinis nigra* Arnold) intraspecies taxonomy – evidence from the study of nine populations. *Acta Soc. Bot. Pol.* 72, 249-257.
- Liepelt S., Mayland-Quellhorst E., Lahme M., Ziegenhagen B. 2010. Contrasting geographical patterns of ancient and modern genetic lineages in Mediterranean *Abies* species. *Plant Syst. Evol.* 284, 141-151.
- Lieutier F., Berryman A. A., Millstein J. A. 1991. Preliminary study of the monoterpene response of three pines to *Ophiostoma clavigerum* (Ascomycetes: Ophiostomatales) and two chemical elicitors. *Ann. Sci. For.* 48, 377-388.
- Liewlaksaneeyanawin C., Ritland C. E., El-Kassaby Y. A., Ritland K. 2004. Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs. *Theor. Appl. Genet.* 109, 361-369.
- Lin C. P., Huang J. P., Wu C. S., Hsu C. Y., Chaw S. M. 2010. Comparative chloroplast genomics reveals the evolution of Pinaceae genera and subfamilies. *Genome Biol. Evol.* 2, 504-517.

- Liston A., Germandt D. S., Vining T. F., Campbell C. S., Pinero D. 2003. Molecular phylogeny of Pinaceae and *Pinus*. *Acta Hortic.* 615, 107-114.
- Liston A., Robinson W. A., Piñero D., Alvarez-Buylla E. R. 1999. Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 11, 95-109.
- Little E. L., Critchfield W. B. 1969. Subdivisions of the genus *Pinus* (Pines). USDA Miscellaneous Publication 1144, Washington, DC.
- Liu H., Przybylski R., Dawson K., Eskin N. A. M., Biliaderis C. G. 1996. Comparison of the composition and properties of canola and sunflower sediments with canola seed hull lipids. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 73, 493-498.
- Liu Y. S., Basinger J. F. 2000. Fossil *Cathaya* (Pinaceae) pollen from the Canadian high arctic. *Int. J. Plant Sci.* 161, 829-847.
- Lockheart M. J., Poole I., Van Bergen P. F., Evershed R. P. 1998. Leaf carbon isotope compositions and stomatal characters: important considerations for palaeoclimate reconstructions. *Org. Geochem.* 29, 1003-1008.
- Lonsdale D. M. 1984. A review of the structure and organization of the mitochondrial genome of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 3, 201-206.
- Loreto M., Velikova V. 2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiol.* 127, 1781-1787.
- Lučić A., Mladenović-Drinić S., Stavretović N., Isajev V., Lavadinović V., Rakonjac Lj., Novaković M. 2010. Genetic diversity of Austrian pine (*Pinus nigra* Arnold) populations in Serbia revealed by RAPD. *Arch. Biol. Sci., Belgrade* 62, 329-336.
- Lukić I., Gorunović M. 1989. *Pinus nigra* Arn. In: Sarić M. R., editor. *Lekovite biljke SR Srbije*. Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd.
- Macchioni F., Cioni P. L., Flamini G., Morelli I., Maccioni S., Ansaldi M. 2003. Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of

- Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy. Flavour Fragr. J. 18, 139-143.
- Maffei M. 1994. Discriminant analysis of leaf wax alkanes in the Lamiaceae and four other plant families. Biochem. Syst. Ecol. 22, 711-728.
- Maffei M. 1996a. Chemotaxonomic significance of leaf wax alkanes in the Compositae. In: Hind D. J. N., Beentje H. J., editors. Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference. Vol. 1. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 141-158.
- Maffei M. 1996b. Chemotaxonomic significance of leaf wax *n*-alkanes in the Umbelliferae, Cruciferae and Leguminosae (Subf. Papilionoideae). Biochem. Syst. Ecol. 24, 531-545.
- Maffei M. 1996c. Chemotaxonomic significance of leaf wax alkanes in the Gramineae. Biochem. Syst. Ecol. 24, 53-64.
- Maffei M., Badino S., Rossi S. 2004. Chemotaxonomic significance of leaf wax *n*-alkanes in the Pinales (Coniferales). J. Biol. Res. 1, 3-19.
- Maffei M., Meregalli M., Scannerini S. 1997. Chemotaxonomic significance of surface wax *n*-alkanes in the Cactaceae. Biochem. Syst. Ecol. 25, 241-253.
- Manninen A. M., Tarhanen S., Vuorinen M., Kainulaine P. 2002. Comparing the variation of needle and wood terpenoids in Scots pine provenances. J. Chem. Ecol. 28, 211-228.
- Marin P. D. 2003. Biohemijska i molekularna sistematika biljaka. NNK international, Beograd.
- Marpeau A., Baradat P., Bernard-Dagan C. 1975. Les terpènes du Pin maritime: aspects biologiques et génétiques. IV. Hérité de la teneur en deux sesquiterpènes: le longifolène et le caryophyllène. Ann. Sci. For. 32, 185-203.
- Marpeau-Bezard A., Baradat P., Bernard-Dagan C. 1983. Les terpènes du Pin maritime: aspects biologiques et génétiques. V. Hérité de la teneur en limonène. Ann. Sci. For. 40, 197-216.

- Marshall H. D., Newton C., Ritland K. 2002. Chloroplast phylogeography and evolution of highly polymorphic microsatellites in lodgepole pine (*Pinus contorta*). Theor. Appl. Genet. 104, 367–378.
- Marshall H. D., Newton C., Ritland K. 2002. Chloroplast phylogeography and the evolution of highly polymorphic microsatellites in Lodgepole pine (*Pinus contorta*). Theor. Appl. Genet. 104, 367-378.
- Martin J. T., Juniper B. E. 1970. The cuticles of plants. Edward Arnold, London.
- Mastelić J., Miloš M., Kuštrak D., Radonić A. 2000. Essential oil and glycosidically bound volatile compounds from the needles of Common Juniper (*Juniperus communis* L.). Croat. Chem. Acta 73, 585-593.
- Matović M. 1986. Monografija o biljnom pokrivaču okoline Prijepolja. Glas Polimlja, Prijepolje.
- Matović M. 1993. Reliktna vegetacija Srednjeg Polimlja. Prirodno-matematički fakultet, Institut za biološke nauke, Kragujevac.
- McCauley D. E. 1994. Contrasting the distribution of chloroplast DNA and allozyme polymorphism among local populations of *Silene alba*: implications for studies of gene flow in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 8127-8131.
- McNevin J. P., Woodward W., Hannoura A., Feldmann K. A., Lemieux B. 1993. Isolation and characterization of *eceriferum* (CER) mutants induced by T-DNA insertions in *Arabidopsis thaliana*. Genome 36, 610–618.
- Medini H., Elaissi A., Khouja M. L., Chraief I., Farhat F., Hammami M., Chemli R., Harzallah-Skhiri F. 2010. Leaf essential oil of *Juniperus oxycedrus* L. (Cupressaceae) harvested in northern Tunisia: composition and intra-specific variability. Chem. Biodiversity 7, 1254-1266.
- Melchior H., Werdermann E. 1954. A. Englers Syllabus der Pflanzenfamilienl. Allg Teil Bakterien bis Gymnospermen. Berlin (Germany).
- Merino E. F., Maestri D. M., Planchuelo A. M. 1999. Chemotaxonomic evaluation of leaf alkanes in species of *Lupinus* (Leguminosae). Biochem. Syst. Ecol. 27, 297-301.

- Michaels H. J., Scott K. M., Olmstead R. G., Szaro T., Jansen R. K., Palmer J. D. 1993. Interfamilial relationships of the Asteraceae: Insights from *rbcL* sequence variation. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 80, 742-751.
- Mićović V. 2006. Određivanje sadržaja površinskih voskova lista pančičeve omorike (*Picea omorica*) sa različitih staništa. Specijalistički rad. Hemijski fakultet, Beograd.
- Mihajilov–Krstev T. 2009. Hemijski sastav i antimikrobna aktivnost etarskih ulja biljnih vrsta roda *Satureja* L.. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.
- Millar I. 1993. Impact of the Eocene on the evolution of *Pinus* L. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 80, 471-498.
- Miller C. N. 1976. Early evolution in the Pinaceae. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 21, 101-117.
- Mimica-Dukić N. 1995. Metabolizam etarskih ulja. In: Jančić R., Stošić D., Mimica-Dukić N., Lakušić B. 1995. Aromatične biljke Srbije. Dečje novine, Gornji Milanovac. pp. 67-87.
- Mimura M. R. M., Salatino M. L. F., Salatino A., Baumgratz J. F. A. 1998. Alkanes from foliar epicuticular waxes of *Huberia* species: Taxonomic implications. *Biochem. Syst. Ecol.* 26, 581-588.
- Mirov N. T. 1967. The Genus *Pinus*. The Ronald Press, New York.
- Mišić V. 1981. Šumska vegetacija klisura i kanjona istočne Srbije. Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković, Beograd.
- Mišić V., Panić I. 1989. Šumska vegetacija doline Studenice. *Zaštita prirode*, Beograd 41-42, 33-52.
- Mitton J. B., Kreiser B. R., Rehfeldt G. E. 2000. Primers designed to amplify a mitochondrial nad1 intron in ponderosa pine, *Pinus ponderosa*, limber pine, *P. flexilis*, and Scots pine, *P. sylvestris*. *Theor. Appl. Genet.* 101, 1269-1272.
- Mogensen H. L. 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *Am. J. Bot.* 83, 383-404.

- Mongrand S., Badoc A., Patouille B., Lacomblez C., Chavent M., Cassagne C., Bessoule J. J. 2001. Taxonomy of Gymnospermae: multivariate analyses of leaf fatty acid composition. *Phytochemistry* 58, 101-115.
- Morgan D., Soltis D. E. 1993. Phylogenetic relationships among members of Saxifragaceae sensu lato based on *rbcL* sequence data. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 80, 631-660.
- Morice I. M., Shorland F. B. 1973. Composition of the surface waxes of apple fruits and changes during storage. *J. Sci. Food Agric.* 24, 1331-1339.
- Morrison R. T., Boyd R. N. 1979. Organska kemija. Prijevod pripremio: Kolbah, D. Svučilišna naklada Liber, Zagreb.
- Moulallis D., Mitsopoulos D. 1957. Artificial hybrids among certain pine species in Greece. *Sci. Ann. of Forestry Fac. IH*, 57-96.
- Müller-Stark G., Baradat P., Bergamann F. 1992. Genetic variation within European tree species. *New Forest.* 6, 23-47.
- Murray B. G. 1998. Nuclear DNA amount in gymnosperms. *Ann. Bot.* 82 (Suppl. A), 3-15.
- Myers E. R., Chung M. Y., Chung M. G. 2007. Genetic diversity and spatial genetic structure of *Pinus strobus* (Pinaceae) across an island landscape inferred from allozyme and cpDNA markers. *Plant Syst. Evol.* 264, 15-30.
- Napp-Zinn K., Hu Y. S. 1989. Anatomical studies on the bracts in pinaceous female cones. III. Comparative study of (mostly Chinese) representatives of all genera. *Bot. Jahrb. Syst.* 110, 461-477.
- Nawrath C. 2006. Unraveling the complex network of cuticular structure and function. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 9, 281-287.
- Naydenov K. D., Alexandrov A. H., Tremblay F. M. 2002. Terpene composition of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in the eastern part of the Balkan Peninsula. 1. Provenance tests. *Biotechnol. Biotec. Eq.* 16, 99-108.
- Naydenov K. D., Alexandrov A., Matevski V., Vasilevski K., Naydenov M. K., Gyuleva V., Carcaillet C., Wahid N., Kamary S. 2014. Range-wide genetic

- structure of maritime pine predates the last glacial maximum: evidence from nuclear DNA. *Hereditas* 151, 1-13.
- Naydenov K. D., Tremblay F. M., Alexandrov A. H., Fenton N. J. 2005a. Dissimilar patterns of *Pinus heldreichii* Christ. populations in Bulgaria revealed by chloroplast microsatellites and terpenes analysis. *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 133–148.
- Naydenov K. D., Tremblay F. M., Alexandrov A., Fenton N. J. 2005b. Structure of *Pinus sylvestris* L. populations in Bulgaria revealed by chloroplast microsatellites and terpenes analysis: Provenance tests. *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 1226-1245.
- Naydenov K. D., Tremblay F. M., Fenton N. J., Alexandrov A. 2006. Structure of *Pinus nigra* Arn. populations in Bulgaria revealed by chloroplast microsatellites and terpene analysis: Provenance tests. *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 562-574.
- Naydenov K., Senneville S., Beaulieu J., Tremblay F., Bousquet J. 2007. Glacial vicariance in Eurasia: mitochondrial DNA evidence from Scots pine for a complex heritage involving genetically distinct refugia at mid-northern latitudes and in Asia Minor. *BMC Evol. Biol.* 7, 233-244.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance for small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590.
- Nikolić B. 2008. Varijabilnost sastava terpena i alkana u četinama omorike (*Picea omorica*/Panč./Purkyně), munike (*Pinus heldreichii* Christ.) i molike (*Pinus peuce* Griseb.). Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Beograd.
- Nikolić B., Ristić M., Bojović S., Marin P. D. 2007. Variability of the needle essential oils of *Pinus heldreichii* from different populations in Montenegro and Serbia. *Chem. Biodiversity* 4, 905-916.
- Nikolić B., Ristić M., Bojović S., Marin P. D. 2008. Variability of the needle essential oils of *Pinus peuce* from different populations in Montenegro and Serbia. *Chem. Biodiversity* 5, 1377-1388.

- Nikolić B., Ristić M., Tešević V., Marin P. D., Bojović S. 2011. Terpene chemodiversity of relict conifers *Picea omorika*, *Pinus heldreichii*, and *Pinus peuce*, endemic to Balkan. *Chem. Biodiversity* 8, 2247-2260.
- Nikolić B., Tešević V., Bojović S., Marin P. D. 2013b. Chemotaxonomic implications of the *n*-alkane composition and the nonacosan-10-ol content in *Picea omorika*, *Pinus heldreichii*, and *Pinus peuce*. *Chem. Biodiversity* 10, 677-686.
- Nikolić B., Tešević V., Đorđević I., Jadranin M., Todosijević M., Bojović S., Marin P. D. 2010. *n*-Alkanes in the needle waxes of *Pinus heldreichii* var. *pančići*. *J. Serb. Chem. Soc.* 75, 1337-1346.
- Nikolić B., Tešević V., Đorđević I., Marin P. D., Bojović S. 2009. Essential oil variability in natural populations of *Picea omorika*, a rare European conifer. *Chem. Biodiversity* 6, 193-203.
- Nikolić B., Tešević V., Đorđević I., Todosijević M., Jadranin M., Bojović S., Marin P. D. 2012a. Chemodiversity of nonacosan-10-ol and *n*-alkanes in the needle wax of *Pinus heldreichii*. *Chem. Biodiversity* 9, 80-90.
- Nikolić B., Tešević V., Đorđević I., Todosijević M., Jadranin M., Bojović S., Marin P. D. 2012b. Population variability of nonacosan-10-ol and *n*-alkanes in needle cuticular waxes of Macedonian pine (*Pinus peuce* Griseb.). *Chem. Biodiversity* 9, 1155-1165.
- Nikolić B., Tešević V., Đorđević I., Todosijević M., Jadranin M., Bojović S., Marin P. D. 2013a. Variability of *n*-alkanes and nonacosan-10-ol in natural populations of *Picea omorika*. *Chem. Biodiversity* 10, 473-483.
- Nosek J., Tomaska L., Fukuhara H., Suyama Y., Kovac L. 1998. Linear mitochondrial genomes: 30 years down the line. *Trends Genet.* 14, 184-188.
- Notsu Y., Masood S., Nishikawa T., Kubo N., Akiduki G., Nakazono M., Hirai A., Kadowaki K. 2002. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Mol. Genet. Genomics* 268, 434-445.

- Novák F. A. 1953. Borovice neboli Sosna. *Pinus* Linne. In: Klika J., Šíman K., Novák F. A., Kavka B. (editors). Jehličnaté. Českosl. Akadem. Ved., Sekce Biologická (Czech Republic) 2, pp. 217-225.
- Novaković M. 2008. Šumska vegetacija Crnog vrha kod Priboja. Magistarski rad. Šumarski fakultet, Beograd.
- Novaković M., Cvjetićanin R. 2010. Zajednica crnog bora i balkanskog kitnjaka (*Quercus dalechampii*-*Pinetum nigrae* Pavlović 1964) na Crnom vrhu kod Priboja. Šumarstvo, Beograd 1-2, 37-45.
- Nyman C. F. 1879. Conspectus Florae Europae. Vol. 2. Örebro Sueciae, Berlin (Germany).
- O'Brien I., Smith D., Gardner R., Murray B. 1996. Flow cytometric determination of genome size in *Pinus*. Plant Sci. 115, 91–99.
- Ogihara Y., Yamazaki Y., Murai K., Kanno A., Terachi T., Shiina T., Miyashita N., Nasuda S., Nakamura C., Mori N., Takumi S., Murata M., Futo S., Tsunewaki K. 2005. Structural dynamics of cereal mitochondrial genomes as revealed by complete nucleotide sequencing of the wheat mitochondrial genome. Nucleic Acids Res. 33, 6235-6250.
- Ohri D., Khoshoo T. N. 1986. Genome size in gymnosperms. Plant Syst. Evol. 153, 119–132.
- Ohyama K., Fukuzawa H., Kohchi T., Shirai H., Sano T., Sano S., Umesono K., Smki Y., Takeuchi M., Chang Z., Aota S., Inokuchi H., Ozeki H. 1986. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. Nature 322, 572-574.
- Oldenberg D. J., Bendich A. J. 2001. Mitochondrial DNA from the liverwort *Marchantia polymorpha*: circularly permuted linear molecules, head-to-tail concatemers, and a 5' protein. J. Mol. Biol. 310, 549-562.
- Oldenburg D. J., Bendich A. J. 1998. The structure of mitochondrial DNA from the liverwort, *Marchantia polymorpha*. J. Mol. Biol. 276, 745-758.

- Olmstead R. G., Palmer J. D. 1994. Chloroplast DNA systematics: A review of methods and data analysis. *Am. J. Bot.* **81**, 1205-1224.
- Olzabal S. 1915/1916. El pino laricio. *Esp. For.* **I**, 1-18.
- Oros D. R., Standley L. J., Chen X., Simoneit B. R. T. 1999. Epicuticular wax compositions of predominant conifers of western north America. *Z. Naturforsch.* **54**, 117-124.
- Paci M., Michelozzi M., Vidrich V. 1989. Contenuto in monoterpeni di oleoresine corticali in provenienze diverse di *Pinus nigra* Am. *Ann. Acc. Ital. Sci. For.* **38**, 223-231.
- Palić R., Eglington T. I., Benitez-Nelson B. C., Eglington J., Veljković J., Stojanović G. 1999. Alkanes from plants of the genus *Achillea*. *J. Serb. Chem. Soc.* **64**, 443-446.
- Palić R., Savić D., Simić N., Andjelković S. 1994. The alkanes from some plants of *Satureja* genus. *Facta Universitatis, Niš* **1**, 91-94.
- Palmer J. D., Nugent J. M., Herbon L. A. 1987. Unusual structure of geranium chloroplast DNA: a triple-sized inverted repeat, extensive gene duplications, multiple inversions, and two repeat families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 769-773.
- Palmer J. D., Thompson W. F. 1982. Chloroplast DNA rearrangements are more frequent when a large inverted repeated sequence is lost. *Cell* **29**, 537-550.
- Pandey M., Rajora O. P. 2012. Higher fine-scale genetic structure in peripheral than core populations of a long-lived and mixed-mating conifer - eastern white cedar (*Thuja occidentalis* L.). *BMC Evol. Biol.* **12**, 48.
- Paolini J., Costa J., Bernardini A. F. 2005. Analysis of the essential oil from aerial parts of *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* (L.) by gas chromatography with electron impact and chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1076**, 170-178.
- Pauly G., von Rudloff E. 1971. Chemosystematic studies in the genus *Pinus*: the leaf oil of *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Can. J. Bot.* **49**, 1201-1210.

- Pavlović Z. 1951. Vegetacija planine Zlatibora. Srpska akademija nauka, Institut za ekologiju i biogeografiju, Beograd 11-2, 115-182.
- Pavlović Z. 1964. Borove šume na serpentinitima u Srbiji. Glasnik prirodjačkog muzeja u Beogradu B19, 25-65.
- Penfold A. R., Willis J. L. 1953. Physiological forms of *Eucalyptus citriodora* Hooker. Nature 171, 883-884.
- Percy K. E., Jagels R., Marden S., McLaughlin C. K., Carlisle J. 1993. Quantity, chemistry and wettability of epicuticular waxes on needles of red spruce along a fog-acidity gradient. Can. J. Forest Res. 23, 1472-1479.
- Persson M., Sjödin K., Borg-Karlson A. K., Norin T., Ekberg I. 1996. Relative amounts and enantiomeric compositions of monoterpene hydrocarbons in xylem and needles of *Picea abies*. Phytochemistry 42, 1289-1297.
- Peschel S., Franke R., Schreiber L., Knoche M. 2007. Composition of the cuticle of developing sweet cherry fruit. Phytochemistry 68, 1017-1025.
- Petit R. J., Duminil J., Fineschi S., Hampe A., Salvini D., Vendramin G. G. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. Mol. Ecol. 14, 689-701.
- Petit R. J., El Mousadik A., Pons O. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. Conserv. Biol. 12, 844-855.
- Petrakis P. V., Tsitsimpikou C., Tzakou O., Couladis M., Vagias C., Roussis V. 2001. Needle volatiles from five *Pinus* species growing in Greece. Flavour Fragr. J. 16, 249-252.
- Petrović S. 1883. Lekovito bilje u Srbiji. Srpski arhiv za celokupno lekarstvo XVI, Kraljevsko – srpska državna štamparija, Beograd.
- Petrović S., Maksimović Z., Kundaković T. 2009. Analiza sastojaka biljnih droga. Priručnik za teorijsku i praktičnu nastavu iz predmeta Farmakognozija. Farmaceutski fakultet, Beograd.
- Pilger R. 1926. Coniferae. In: Engler A, Prantl K, editors. Die natürlichen Pflanzenfamilien. Vol. 13. Engelmann, Leipzig (Germany), pp. 121-166.

- Pinzauti F., Sebastiani F., Budde K. B., Fady B., González-Martínez S. C., Vendramin G. G. 2012. Nuclear microsatellites for *Pinus pinea* (Pinaceae), a genetically depauperate tree, and their transferability to *P. halepensis*. *Am. J. Bot.* e362–e365.
- Pohjola J., Hiltunen R., Schantz M. V. 1989. Variation and inheritance of terpenes in Scots pine. *Flavour Fragr. J.* 4, 121-124.
- Politeo O., Skocibusic M., Maravic A., Ruscic M., Milos M. 2001. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of endemic Dalmatian black pine (*Pinus nigra* ssp. *dalmatica*). *Chem. Biodiversity* 8, 540-547.
- Pollard M., Beisson F., Li Y., Ohlrogge J. 2008. Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant. Sci.* 13, 236-246.
- Pons O., Petit R. J. 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* 144, 1237-1245.
- Post-Beittenmiller D. 1996. Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 405–430.
- Poudel R. C., Möller M., Li D.-Z., Shah A., Gao L.-M. 2014. Genetic diversity, demographical history and conservation aspects of the endangered yew tree *Taxus contorta* (syn. *Taxus fuana*) in Pakistan. *Tree Genet. Genomes* DOI: 10.1007/s11295-014-0711-7.
- Powell W., Machray G., Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1, 215–222.
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. 1996. The utility of RFLP, RAPD, AFLP and SSRP (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2, 225–238.
- Poynter J., Eglington G. 1990. Molecular composition of three sediments from hole 717C: the Bengal fan. In: Cochran J. R., Stow D. A. V., editors. *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results Distal Bengal Fan*. Vol. 116. College Station, A & M University, Texas, pp. 155–161.

- Preuss D., Lemieux B., Yen G., Davis R. W. 1993. A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev.* 7, 974–985.
- Previšić A., Walton C., Kučinić M., Mitrikeski P. T., Kerovec M. 2009. Pleistocene divergence of Dinaric *Drusus* endemics (Trichoptera, Limnephilidae) in multiple micro-refugia within the Balkan Peninsula. *Mol. Ecol.* 18, 634-647.
- Price R. A. 1989. The genera of Pinaceae in the southeastern United States. *J. Arnold Arbor. Harv. Univ.* 70, 247-305.
- Price R. A., Liston A., Strauss S. H. 1998. Phylogeny and systematics of *Pinus*. In: Richardson D. M., editor. *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 49-68.
- Price R. A., Olsen-Stojkovich J., Lowenstein J. M. 1987. Relationships among the genera of Pinaceae: an immunological comparison. *Syst. Bot.* 12, 91-97.
- Price R. A., Thomas J., Strauss S. H., Gadek, P. A., Quinn C. J., Palmer J. D. 1993. Familial relationships of the conifers from *rbcL* sequence data. *Am. J. Bot.* 80, 172.
- Primmer C. R., Saino N., Moller A. P., Ellegren H. 1998. Unraveling the process of microsatellite evolution through analysis of germ line mutations in barn swallows *Hirundo rustica*. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1047-1054.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Provan J., Soranzo N., Wilson N. J., Goldstein D. B., Powell W. 1999. A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics* 153, 943-947.
- Pržulj N., Petrović D. 2005. Molekularni markeri II. Mikrosateliti. Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad. Zbornik radova 41, 299-312.
- Pyhäjärvi T., Salmela M. J., Savolainen O. 2008. Colonization routes of *Pinus sylvestris* inferred from distribution of mitochondrial DNA variation. *Tree Genet. Genomes* 4, 247-254.

- Quézel P., Médail F. 2003. *Ecologie et biogéographie du bassin méditerranéen*. Elsevier, Paris, France.
- Rafii Z. A., Dodd R. S., Zavarin E. 1996. Genetic diversity in foliar terpenoids among natural populations of European black pine. *Biochem. Syst. Ecol.* 24, 325-339.
- Rajčević N., Janačković P., Bojović S., Tešević V., Marin P. D. 2013. Variability of the needle essential oils of *Juniperus deltoides* R.P.Adams from different populations in Serbia and Croatia. *Chem. Biodiversity* 10, 144-156.
- Rajevski L. 1950: Nalazište *Pinus nigra* Arn. var. *pallasiana* (Lamb.) u okolini Bosilegrada. Zbornik radova Instituta za ekologiju i biogeografiju, Srpska Akademija Nauka i Umetnosti, Beograd.
- Rajora O. P., Rahman M. H., Dayanandan S., Mosseler A. 2001. Isolation, characterization, inheritance and linkage of microsatellite DNA markers in white spruce (*Picea glauca*) and their usefulness in other spruce species. *Mol. Gen. Genet.* 264, 871-882.
- Ralph S. G., Yueh H., Friedmann M., Aeschliman D., Zeznik J. A., Nelson C. C., Butterfield Y. S., Kirkpatrick R., Liu J., Jones S. J., Marra M. A., Douglas C. J., Ritland K., Bohlmann J. 2006. Conifer defence against insects: microarray gene expression profiling of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) induced by mechanical wounding or feeding by spruce budworms (*Choristoneura occidentalis*) or white pine weevils (*Pissodes strobi*) reveals large-scale changes of the host transcriptome. *Plant Cell Environ.* 29, 1545-1570.
- Raubeson L. A., Jansen R. K. 1992. A rare chloroplast-DNA mutation is shared by all conifers. *Biochem. Syst. Ecol.* 20, 17-24.
- Reddy C. M., Eglinton T. I., Palić R., Benitez-Nelson B. C., Stojanović G., Palić I., Djordjević S., Eglinton G. 2000. Even carbon number predominance of plant wax *n*-alkanes: a correction. *Org. Geochem.* 31, 331-336.
- Reicosky D. A., Hanover J. W. 1978. Physiological effects of surface waxes. Light reflectance for glaucous and nonglaucous *Picea pungens*. *Plant Physiol.* 62, 101-104.

- Reiter B., Lechner M., Lorbeer E., Aichholz R. 1990. Isolation and characterization of wax esters in fennel and caraway seed oils by SPE-GC. *J. High Res. Chromatogr.* 22, 514–520.
- Reynhardt E. C., Riederer M. 1994. Structures and molecular dynamics of plant waxes. II. Cuticular waxes from leaves of *Fagus sylvatica* L. and *Hordeum vulgare* L. *Eur. Biophys. J.* 23, 59-70.
- Rezzi S., Bighelli A., Mouillot D., Casanova J. 2001. Composition and chemical variability of the needle essential oil of *Pinus nigra* subsp. *laricio* from corsica. *Flavour Fragr. J.* 16, 379-383.
- Ribeiro M. M., Mariette S., Vendramin G. G., Szmidt A. E., Plomion C., Kremer A. 2002. Comparison of genetic diversity estimates within and among populations of maritime pine using chloroplast simple-sequence repeat and amplified fragment length polymorphism data. *Mol. Ecol.* 11, 869-877.
- Richardson B. A., Brunsfeld S. J., Klopfenstein N. B. 2002. DNA from bird-dispersed seed and wind-disseminated pollen provides insights into postglacial colonization and population genetic structure of whitebark pine (*Pinus albicaulis*). *Mol. Ecol.* 11, 215-227.
- Richardson B. A., Brunsfeld S. J., Klopfenstein N. B. 2002. DNA from bird-dispersed seed and wind-disseminated pollen provides insights into postglacial colonization and population genetic structure of whitebark pine (*Pinus albicaulis*). *Mol. Ecol.* 11, 215-227.
- Richardson D. M., Rundel P. W. 1998. Ecology and biogeography of *Pinus*: an introduction. In: Richardson D. M., editor. *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 3-46.
- Rikli M. 1943. Das Pflanzenkleid der Mittelmeerländer. Bd. I, Bern (Switzerland), *Lifer.* IV, 382-388.
- Robinson J. P., Harris S. A. 1999. Amplified Fragment Length Polymorphisms and Microsatellites: A phylogenetic perspective. In: Gillet E. M. (editor). *Development, optimization and validation of molecular tools for assessment of*

- biodiversity in forest trees in the European Union DGX11 Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity.
- Robledo-Arnuncio J. J., Alia R., Gil L. 2004. High levels of genetic diversity in a long-term European glacial refugium of *Pinus sylvestris* L. *For. Genet.* 11, 239-248.
- Robledo-Arnuncio J. J., Collada C., Alía R., Gil L. 2005. Genetic structure of montane isolates of *Pinus sylvestris* L. in a Mediterranean refugial area. *J. Biogeogr.* 32, 595-605.
- Rocini C., Cursino dos Santos D. Y. A., Graham S. 2006. *n*-Alkane distribution patterns in species of Lythraceae sensu lato (Myrtales). *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 273-274.
- Rohmer M. 1999. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat. Prod. Rep.* 16, 565-574.
- Rohrig E. 1957. Über die Schwarzkiefer (*Pinus nigra* Arn.) und ihre Formen. I. Teil: Die natürlichen Standorte. *Silvae Genet.* 6, 39-53.
- Rohrig E. 1966. Die Schwarzkiefer (*Pinus nigra* Arn.) und ihre Formen. II. Teil: Erste Ergebnisse von Provenienzversuchen. *Silvae Genet.* 15, 21-26.
- Rohrig E. 1969. Die Schwarzkiefer (*Pinus nigra* Arn.) und ihre Formen. III. Teil: Untersuchungen an Samlingen verschiedener Herkunft. *Silvae Genet.* 18, 92-94.
- Ronniger K. 1924. Über der Formenkreis von *Pinus nigra* Arnold. *Verh. zool. Bot. Ges. Wien LXXIII*, 127-130.
- Rouis Z., Elaissi A., Abid N. B., Lassoued M. A., Cioni P. L., Flamini G., Aouni M. 2012. Chemical composition and intraspecific variability of the essential oils of five populations of *Hypericum triquetrifolium* Turra growing in North Tunisia. *Chem. Biodiversity* 9, 806-816.
- Rousset F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 103-106.

- Roussis V., Papadogianni K., Vagias C., Harvala C., Petrakis P., Ortiz A. 2001. Volatile constituents of three *Pinus* species grown in Greece. J. Essent. Oil Res. 13, 118-121.
- Roussis V., Petrakis P. V., Ortiz A., Mazomenoe B. E. 1995. Volatile constituents of needles of five *Pinus* species grown in Greece. Phytochemistry 39, 357-361.
- Rubio-Moraga A., Candel-Perez D., Lucas-Borja M. E., Tiscar P. A., Viñegla B., Linares J. C., Gómez-Gómez L., Ahrazem O. 2012. Genetic Diversity of *Pinus nigra* Arn. Populations in Southern Spain and Northern Morocco Revealed By Inter-Simple Sequence Repeat Profiles. Int. J. Mol. Sci. 13, 5645-5658.
- Rubner K. 1925. Die pflanzengeographischen Grundlagen des Waldbaus. Neudamm, Berlin (Germany).
- Ruzicka L., Eschenmoser A., Heusser H. 1953. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. Experientia 9, 357-396.
- Salatino M. L. F., Salatino A., Menezes N. L., Mello-Silva R. 1989. Alkanes of foliar epicuticular waxes of Velloziaceae. Phytochemistry 28, 1105-1114.
- Samuels A. L., Kunst L., Jetter R. 2008. Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. Annu. Rev. Plant Biol. 59, 683-707.
- Sannikov S. N., Petrova I. V., Schweingruber F., Egorov E. V., Parpan T. V. 2011. Genetic differentiation of *Pinus mugo* Turra and *P. sylvestris* L. populations in the Ukrainian Carpathians and the Swiss Alps. Russ. J. Ecol. 42, 270-276.
- Satoh M., Kubo T., Nishizawa S., Estiati A., Itchoda N., Mikami T. 2004. The cytoplasmic male-sterile type and normal type mitochondrial genomes of sugar beet share the same complement of genes of known function but differ in the content of expressed ORFs. Mol. Genet. Genomics 272, 247-256.
- Savage T. J., Hamilton B. S., Croteau R. 1996. Biochemistry of short-chain alkanes: tissue-specific biosynthesis of *n*-heptane in *Pinus jeffrey*. Plant Physiol. 110, 179-186.
- Savić I. R. 2008. Diversification of the Balkan fauna: its origin, historical development and present status. In: Makarov S. E., Dimitrijević R. N., editors. Advances in

- arachnology and developmental biology. Papers dedicated to prof. dr. Božidar Ćurčić. Inst. Zool., Belgrade; BAS, Sofia; Fac. Life Sci., Vienna; SASA, Belgrade & UNESCO MAB Serbia. Vienna-Belgrade-Sofia, Monographs, 12, pp. 57-78.
- Scalfi M., Piotti A., Rossi M., Piovani P. 2009. Genetic variability of Italian southern Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations: the rear edge of the range. Eur. J. Forest Res. 128, 377-386.
- Scaltsoyiannes A., Rohr R., Panetsos K., Tsaktsira M. 1994. Allozyme frequency distributions in five European populations of black pine (*Pinus nigra* ARNOLD). Silvae Genet. 43, 20-30.
- Scaltsoyiannes A., Tsaktsira M., Pasagianni G., Tsoulpha P., Zhelev P., Iliev I., Rohr R. 2008. Allozyme variation of the European Black (*Pinus nigra* Arn.) and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations and the implications on their evolution: a comparative study. Muzeul Olteniei Craiova. Oltenia. Studii și comunicări. Științele Naturii, Tom XXIV.
- Scaltsoyiannes A., Tsaktsira M., Pasagiannis G., Tsoulpha P., Zhelev P., Iliev I., Rohr R. 2009. Allozyme variation of European Black (*Pinus nigra* Arnold) and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations and implications on their evolution: a comparative study. J. Biol. Res.-Thessalon. 11, 95-106.
- Schaal B. A., Hayworth D. A., Olsen K. M., Rauscher J. T., Smith W. A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. Mol. Ecol. 7, 465–474.
- Schaefer P. R., Hanover J. W. 1986. Taxonomic implications of monoterpene compounds of blue and Engelmann spruces. For. Sci. 32, 725-734.
- Schlötterer C. 2004. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? Nat. Rev. Genet. 5, 63-69.
- Schwarz O. 1938. Über die Systematic und Nomenklatur der europäischen Schwarzkiefern. Notizbl. Bot. Gart. Berlin-Dahlem XIII, 117, 226-243.
- Selkoe K. A., Toonen R. J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecol. Lett. 9, 615-629.

- Semiz G., Heijari J., Isik K., Holopainen J. K. 2007. Variation in needle terpenoids among *Pinus sylvestris* L. (Pinaceae) provenances from Turkey. *Biochem. Syst. Ecol.* 35, 652-661.
- Sezik E., Üstün O., Demirci B., Başer K. H. C. 2010. Composition of the essential oils of *Pinus nigra* Arnold from Turkey. *Turk. J. Chem.* 34, 313-325.
- Sharkey S., Chen X. Y., Yeh S. S. 2001. Isoprene inceases thermotolerance of fosmidomycin-fed leaves. *Plant Physiol.* 125, 2001-2006.
- Simić N. 2000. Hemijsko i mikrobiološko ispitivanje domaćih vrsta roda *Achillea* L.. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Niš.
- Slatkin M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution* 47, 264-279.
- Slatkin M., Barton N. H. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43, 1349-1368.
- Slavov G. T., Zhelev P. 2004. Allozyme variation, differentiation, and inbreeding in populations of *Pinus mugo* in Bulgaria. *Can. J. For. Res.* 34, 2611-2617.
- Small R. L., Cronn R. C., Wendel J. F. 2004. L.A.S. Johnson Review No. 2. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. *Aust. Syst. Bot.* 17, 145-170.
- Soltis D. E., Soltis P. S., Nickrent D. L., Johnson L. A., Hahn W. J., Hoot S. B., Sweere J. A., Kuzoff R. K., Kron K. A., Chase M. W., Swensen S. M., Zimmer E. A., Chaw S.-M., Gillespie L. J., Kress W. J., Sytsma K. J. 1997. Angiosperm phylogeny inferred from 18S ribosomal DNA sequences. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 84, 1-49.
- Soltis D. E., Soltis P. S., Clegg M. T., Durbin M. 1990. *rbcL* sequence divergence and phylogenetic relationships in Saxifragaceae sensu lato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4640-4644.
- Soranzo N., Alia R., Provan J., Powell W. 2000. Patterns of variation at a mitochondrial sequence-tagged-site locus provides new insights into the postglacial history of European *Pinus sylvestris* populations. *Mol. Ecol.* 9, 1205-1211.

- Soranzo N., Provan J., Powell W. 1998. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Mol. Ecol.* 7, 1260-1261.
- Sork V. L., Aitken S. N., Dyer R. J., Eckert A. J., Legendre P., Neale D. B. 2013. Putting the landscape into the genomics of trees: approaches for understanding local adaptation and population responses to changing climate. *Tree Genet. Genomes* 9, 901-911.
- Sork V. L., Nason J., Campbell D. R., Fernandez J. F. 1999. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends Ecol. Evol.* 14, 219-224.
- Soto A., Robledo-Arnuncio J. J., González-Martínez S. C., Smouse P. E., Alía R. 2010. Climatic niche and neutral genetic diversity of the six Iberian pine species: a retrospective and prospective view. *Mol. Ecol.* 19, 1396-1409.
- Sperisen C., Büchler U., Gugerli F., Mátyás G., Geburek T., Vendramin G. G. 2001. Tandem repeats in plant mitochondrial genomes: application to the analysis of population differentiation in the conifer Norway spruce. *Mol. Ecol.* 10, 257-263.
- Squillace A. E., Wells O. O., Rockwood D. L. 1980. Inheritance of monoterpene composition in cortical oleoresin of loblolly pine. *Silv. Genet.* 29, 141-152.
- Squillace A. E., Fisher G. S. 1966. Evidences of the inheritance of turpentine composition in slash pine. *USDA For. Serv. Res. Pap. NC-6*, 53-60.
- Stanković S. 1960. The Balkan lake Ohrid and its living world. *Monographiae Biologicae* 9, 1-357.
- StatSoft. 1997. Statistica for Windows, version 5.1. StatSoft Inc., Tulsa.
- Stefanovic S., Jager M., Deutsch J., Broutin J., Masselot M. 1998. Phylogenetic relationships of conifers inferred from partial 28S rRNA gene sequences. *Am. J. Bot.* 85, 688-697.
- Stevanović V. 1996. Analysis of the central European and Mediterranean orophytic element on the mountains of the west and central Balkan Peninsula, with special reference to endemics. *Bocconea* 5, 77-97.
- Stevanović V., Vasić V. 1995. Biodiverzitet Jugoslavije sa pregledom vrsta od međunarodnog značaja. *Biološki fakultet i Ecolibri*, Beograd.

- Stocker H., Wanner H. 1975. Changes in the composition of coffee leaf wax with development. *Phytochemistry* 9, 1919-1920.
- Stojanoff N., Stefanoff B. 1929. Beitrag zur Kenntnis der Pliozänflora der Ebene von Sofia. *Ztschr. Bulg. Geol. Ges.* 1, 3-115.
- Stojanović G., Hughley S., Reddy C. M., Palić R., Alagić S., Mišić M. 2003. A comparative analysis of the alkanes of *Yaka*, *Prilep* and *Otlja tobaccos*. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 1215-1218.
- Stojanović G., Palić R., Tarr C. H., Reddy C. M., Marinković O. 2003. *n*-Alkanes and fatty acids of *Hypericum perforatum*, *Hypericum maculatum* and *Hypericum olympicum*. *Biochem. Syst. Eco.* 31, 223-226.
- Strauss S. H., Doerksen A. H. 1990. Restriction fragment analysis of pine phylogeny. *Evolution* 44, 1081-1096.
- Studt W. 1926. Die heutige und frühere Verbreitung der Koniferen und die Geschichte ihren Arealgestaltung. *Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg* 6, 167-308.
- Sugiura M. 1989. The chloroplast chromosomes in land plants. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 51-70.
- Sugiyama Y., Watase Y., Nagase M., Makita N., Yagura S., Hirai A., Sugiura M. 2005. The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants. *Mol. Genet. Genomics* 272, 603-615.
- Surina B., Schönswetter P., Schneeweiss G. M. 2011. Quaternary range dynamics of
- Suyama Y., Miura K. 1968. Size and structural variations of mitochondrial DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 60, 235-242.
- Svoboda P. 1935. Lesní dřeviny a jejich porosty. Cast I, Praha (Czech Republic).
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.

- Tatić B. 1967-1968. Flora i vegetacija Studene planine kod Kraljeva. Glasnik Botaničkog zavoda i bašte Univerziteta u Beogradu 4, 27-72.
- Tatić B., Tomić Z. 2006. Šume crnog i belog bora. In: Škorić DM, Vasić O, editors. Vegetacija Srbije II, Šumske zajednice 2. Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd, pp. 127-154.
- Teece M. A., Zengeya T., Volk T. A., Smart L. B. 2008. Cuticular wax composition of *Salix* varieties in relation to biomass productivity. *Phytochemistry* 69, 396-402.
- Terasawa K., Odahara M., Kabeya Y., Kikugawa T., Sekine Y., Fujiwara M., Sato N. 2007. The mitochondrial genome of the moss *Physcomitrella patens* sheds new light on mitochondrial evolution in land plants. *Mol. Biol. Evol.* 24, 699-709.
- Thompson J. D., Chalchat J.-C., Michet A., Linhart Y. B., Ehlers B. 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene cooccurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *J. Chem. Ecol.* 29, 859-880.
- Tian S., López-Pujol J., Wang H.-W., Ge S., Zhang Z.-Y. 2010. Molecular evidence for glacial expansion and interglacial retreat during Quaternary climatic changes in a montane temperate pine (*Pinus kwangtungensis* Chun ex Tsiang) in southern China. *Plant Syst. Evol.* 284, 219-229.
- Tian X., Zheng J., Hu S., Yu J. 2006. The rice mitochondrial genomes and their variations. *Plant Physiol.* 140, 401-410.
- Tollefsrud M. M., Sønstebo J. H., Brochmann C., Johnsen Ø., Skrøppa T., Vendramin G. G. 2009. Combined analysis of nuclear and mitochondrial markers provide new insight into the genetic structure of North European *Picea abies*. *Heredity* 102, 549-562.
- Tomić Z. 1992. Šumske fitocenoze Srbije. Šumarski fakultet, Beograd.
- Tomić Z. 1993/1994. Zajednica crnog bora i crnog graba - *Ostryo-Pinetum nigrae* Čolić 1965. - na Tari. Glasnik šumarskog fakulteta, Beograd 75-76, 75-82.
- Tsaktsira M., Scaltsoyiannes A., Athanassiadis, N. 1997. Allozyme variation in nine (9) balkan black pine (*Pinus nigra* ARNOLD) populations. First Balkan Botanical Congress, September 19-22, Thessaloniki (Proceedings, 573-576).

- Tucakov J. 1971. Lečenje biljem - fitoterapija. Kultura, Beograd.
- Tulloch A. P. 1981. Composition of epicuticular waxes from 28 genera of Gramineae: differences between subfamilies. *Can. J. Bot.* 59, 1213-1221.
- Tulloch A. P. 1987. Epicuticular waxes of *Abies balsamea* and *Picea glauca*: Occurrence of long – chain methyl esters. *Phytochemistry* 26, 1041-1043.
- Tulloch A. P., Hoffman L. L. 1976. Epicuticular wax of *Agropyron intermedium*. *Phytochemistry* 15, 1145-1151.
- Turrill W. B. 1929. The plant-life of the Balkan peninsula: A phytogeographical study. Clarendon Press, Oxford.
- Unsold M., Marienfeld J. R., Brandt P., Brennicke A. 1997. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat. Genet.* 15, 57-61.
- Ursenbacher S., Schweiger S., Tomović L., Crnobrnja-Isailović J., Fumagalli L., Mayer W. 2008. Molecular phylogeography of the nose-horned viper (*Vipera ammodytes*, Linnaeus (1758)): evidence for high genetic diversity and multiple refugia in the Balkan peninsula. *Mol. Phylogenet. Evol.* 46, 1116-1128.
- Utescher T., Djordjevic-Milutinovic D., Bruch A., Mosbrugger V. 2007. Palaeoclimate and vegetation change in Serbia during the last 30 Ma. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 253, 141-152.
- Vahrenholz C., Riemen G., Pratje E., Dujon B., Michaelis G. 1993. Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests a mechanism for DNA replication. *Curr. Genet.* 24, 241-247.
- Valkonen J. P. T., Nygren M., Ylönen A., Mannonen L. 1994. Nuclear DNA content of *Pinus sylvestris* L. as determined by laser flowcytometry. *Genetica* 92, 203–207.
- Van den Dool H., Kratz P. D. 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gasliquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A*, 11, 463-471.
- Van Tieghem P. 1891. Structure et affinités des *Abies* et des genres les plus voisins. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 38, 406-415.

- Varshney R. K., Graner A., Sorrells M. E. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol.* 23, 48-55.
- Vendramin G. G., Anzidei M., Madaghiele A., Sperisen C., Bucci G. 1999. Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome* 43, 68-78.
- Vendramin G. G., Degen B., Petit R. J., Anzidei M., Madaghiele A., Ziegenhagen B. 1999. High level of variation at *Abies alba* chloroplast microsatellites loci in Europe. *Mol. Ecol.* 8, 1117–1126.
- Vendramin G. G., Fady B., González-Martínez S. C., Hu F. S., Scotti I., Sebastiani F., Soto A., Petit R. J. 2008. Genetically depauperate but widespread: the case of an emblematic Mediterranean pine. *Evolution* 62, 680-688.
- Vendramin G. G., Lelli L., Rossi P., Morgante M. 1996. A set of primers for the 414 amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Mol. Ecol.* 5, 595-598.
- Viard F., El-Kassaby Y. A., Ritland K. 2001. Diversity and genetic structure in populations of *Pseudotsuga menziesii* (Pinaceae) at chloroplast microsatellite loci. *Genome* 44, 336-344.
- Vidaković M. 1955. Značenje anatomske građe iglica kod svojta crnog bora u Jugoslaviji. *Šumarski list, Zagreb* 79, 244-253.
- Vidaković M. 1957. Oblici crnog bora u Jugoslaviji na temelju anatomije iglica. *Glasn. za šumske pokuse, Zagreb* 13, 111-248.
- Vidaković M. 1958. Investigations on the intermediate type between the Austrian and the Scots pine. *Silvae Genet.* 7, 12-19.
- Vidaković M. 1963. Interspecific hybridization of several pine species from the Subgenus *Diploxylon* Koehne. *Proceedings of the World Consultation on Forest Genetics and Tree Improvement, FAO/FORGEN* 63. Vol. 1, 2b, p. 5.
- Vidaković M. 1974. Genetics of European black pine (*Pinus nigra* Arn.). *Ann. For.* 6, 57-86.

- Vidaković M. 1977. Some morphological characteristics of *Pinus x nigrosylvis* (*P. nigra* x *P. sylvestris*). Ann. Forest. 8, 15-27.
- Vidaković M. 1982. Četinjače. Morfologija i varijabilnost. JAZU i Sveučilišna naklada Liber, Zagreb.
- Vidrich V., Fusi P., Michelozzi M., Franci M. 1996. Analysis of essential oils from leaves and branches of different Italian provenances of *Pinus nigra* Arn. J. Essent. Oil Res. 8, 377-381.
- Vierhapper F. 1910. Entwurf eines neuen Systemes der Coniferen. Abh. K. K. Zool.-Bot. Ges. Wien 5, 1-56.
- Villar E. H. 1947. Quel est le nom valable du *Pinus laricio* Poir. Bericht der Schweiz. Botan. Gesellsch. LVII, 152.
- von Rudloff E. 1972. Seasonal variation in the composition of the volatile oils of the leaves, buds and twigs of white spruce (*Picea glauca*). Can. J. Bot. 45, 1595-1603.
- von Rudloff E. 1973. Geographical variation in the terpene composition of the leaf of douglas fir. Pure Appl. Chem. 34, 401-410.
- von Rudloff E. 1975. Volatile leaf oil analysis in chemosystematic studies of North America conifers. Biochem. Syst. Ecol. 2, 131-167.
- von Rudloff E., Lapp M. S., Francis C. Y. 1988. Chemosystematic study of *Thuja plicata*: Multivariate analysis of leaf oil terpene composition. Biochem. Syst. Ecol. 16, 119-125.
- von Wettstein W. 1951. Über Bastarde *Pinus nigra* var. *austriaca* x *sylvestris*. Z. Pflanzenzücht. 30, 473-477.
- von Wettstein-Knowles P. 1995. Biosynthesis and genetics of waxes. In: Hamilton R. J., editor. Waxes: chemistry, molecular biology and functions. Oily Press, Dundee, pp. 91-129.
- Wagner D. B., Furnier G. R., Saghai-Maroo M. A., Williams S. M., Dancik B. P. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2097-2100.

- Wakamyia I., Newton R., Johnston J. S., Price H. J. 1993. Genome size and environmental factors in the genus *Pinus*. *Am. J. Bot.* 80, 1235–1241.
- Wakamyia I., Price H. J., Messina M. G., Newton R. 1996. Pine genome diversity and water relations. *Physiol. Plant.* 96, 13–20.
- Wallach O. 1914. Terpene und Campher: Zusammenfassung eigener Untersuchungen auf den Gebiet der alicyclischen Kohlenstoffverbindungen. Veit and Co, Leipzig.
- Walter R., Epperson B. K. 2005. Geographic pattern of genetic diversity in *Pinus resinosa*: contact zone between descendants of glacial refugia. *Am. J. Bot.* 92, 92-100.
- Walton T. J. 1990. Waxes, cutin and suberin. In: Harwood J. L., Boyer J., editors. *Methods in plant biochemistry*. Vol. 4. Academic Press, London, pp. 106-158.
- Wang X. Q., Tang D. C., Sang T. 2000. Phylogeny and divergence times in Pinaceae: evidence from three genomes. *Mol. Biol. Evol.* 17, 773-781.
- Wang X. R. 1992. Genetic diversity and evolution of Eurasian pines. PhD Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Forestry, Department of Forest Genetics and Physiology, ISBN 91-576-4641-4.
- Wang X. R., Szmidt A. E., Lindgren D. 1991. Allozyme differentiation among populations of *Pinus sylvestris* (L.) from Sweden and China. *Hereditas* 114, 219-226.
- Wang X. R., Tsumura Y., Yoshimaru H., Nagasaka K., Szmidt A. E. 1999. Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast *rbcL*, *matK*, *rpl20-rps18* spacer, and *trnV* intron sequences. *Am. J. Bot.* 86, 1742-1753.
- Weir B. S. 1996. *Genetic data analysis II*, 2nd edn. Sinauer, Sunderland.
- Williams A. L., Bannister M. H. 1962. Composition of gum turpentine from 22 species of pines grown in New Zealand. *J. Pharm. Sci.* 51, 970-975.
- Wilson M. A., Gaut B., Clegg M. T. 1990. Chloroplast DNA evolves slowly in the palm family (Arecaceae). *Mol. Biol. Evol.* 7, 303–314.

- Wirthensohn M. G., Collins G., Jones G. P., Sedgley M. 1999. Variability in waxiness of *Eucalyptus gunnii* foliage for floriculture. *Scientia Hort.* 82, 279-288.
- Wolfe K. H., Li W. H., Sharp P. M. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9054-9058.
- Wolfe K. H., Morden C. W., Palmer J. D. 1992. Function and evolution of a minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10648-10652.
- Wolfe K. H., Sharp P. M. 1988. Identification of functional open reading frames in chloroplast genomes. *Gene* 66, 215-222.
- Woloszynska M. 2010. Heteroplasmy and stoichiometric complexity of plant mitochondrial genomes-though this be madness, yet there's method in't. *J. Exp. Bot.* 61, 657-671.
- Wright J. W., Bull W. I. 1962. Geographic variation in European black pine-two year results. *For. Sci.* 8, 32-42.
- Wright W. J., Gabriel W. J. 1958. Species hybridization in the hard pines, series *Sylvestres*. *Silvae Genet.* 7, 109-115.
- Yazdani R., Nilsson J. E., Ericsson T. 1985. Geographical variation in the relative proportion of monoterpenes in cortical oleoresin of *Pinus sylvestris* in Sweden. *Silvae Genet.* 34, 201-208.
- Yazdani R., Rudin R., Aldén T., Lindgren L., Harbom B., Ljung K. 1982a. Inheritance pattern of five monoterpenes in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Hereditas* 97, 261-272.
- Yazdani R., Rudin R., Aldén T., Lindgren L., Harbom B., Ljung K. 1982b. Inheritance of monoterpene composition in cortical oleoresin of slash pine. *For. Sci.* 17, 381-387.
- Zavarin E., Snajberk K. 1986. Monoterpenoid differentiation in relation to the morphology of *Pinus discolor* and *Pinus johannis*. *Biochem. Syst. Ecol.* 14, 1-11.

- Zavarin E., Snajberk, K., Reicher T., Tsien E. 1970. On the geographic variability of the monoterpenes from the cortical blister oleoresin of *Abies lasiocarpa*. *Phytochemistry* 9, 377-395.
- Zeneli G., Tsitsimpikou C., Petrakis P. V., Naxakis G., Habili D., Roussis V. 2001. Foliar and cortex oleoresin variability of silver fir (*Abies alba* Mill.) in Albania. *Z. Naturforsch.* 56, 531-539.
- Ziegenhagen B., Kormutak A., Shauerte M., Scholz F. 1995. Restriction site polymorphism in chloroplast DNA of silver fir (*Abies alba* Mill.). *For. Genet.* 2, 99-107.
- Zurawski G., Clegg M. T., Brown A. H. D. 1984. The nature of nucleotide sequence divergence between barley and maize chloroplast DNA. *Genetics* 106, 735-749.
- Zygadlo J. A., Maestri D. M., Grosso N. R. 1994. Alkane distribution in epicuticular wax of some *Solanaceae* species. *Biochem. Syst. Ecol.* 22, 203-209.

8. PRILOG

LISTA PRILOGA:

PRILOG I – FID hromatogrami kutikularnog voska četina *Pinus nigra*

PRILOG II – FID hromatogrami etarskog ulja četina *P. nigra*

PRILOG III – PCR produkti jedarnih EST-mikrosatelita (EST-SSRs) *P. nigra*

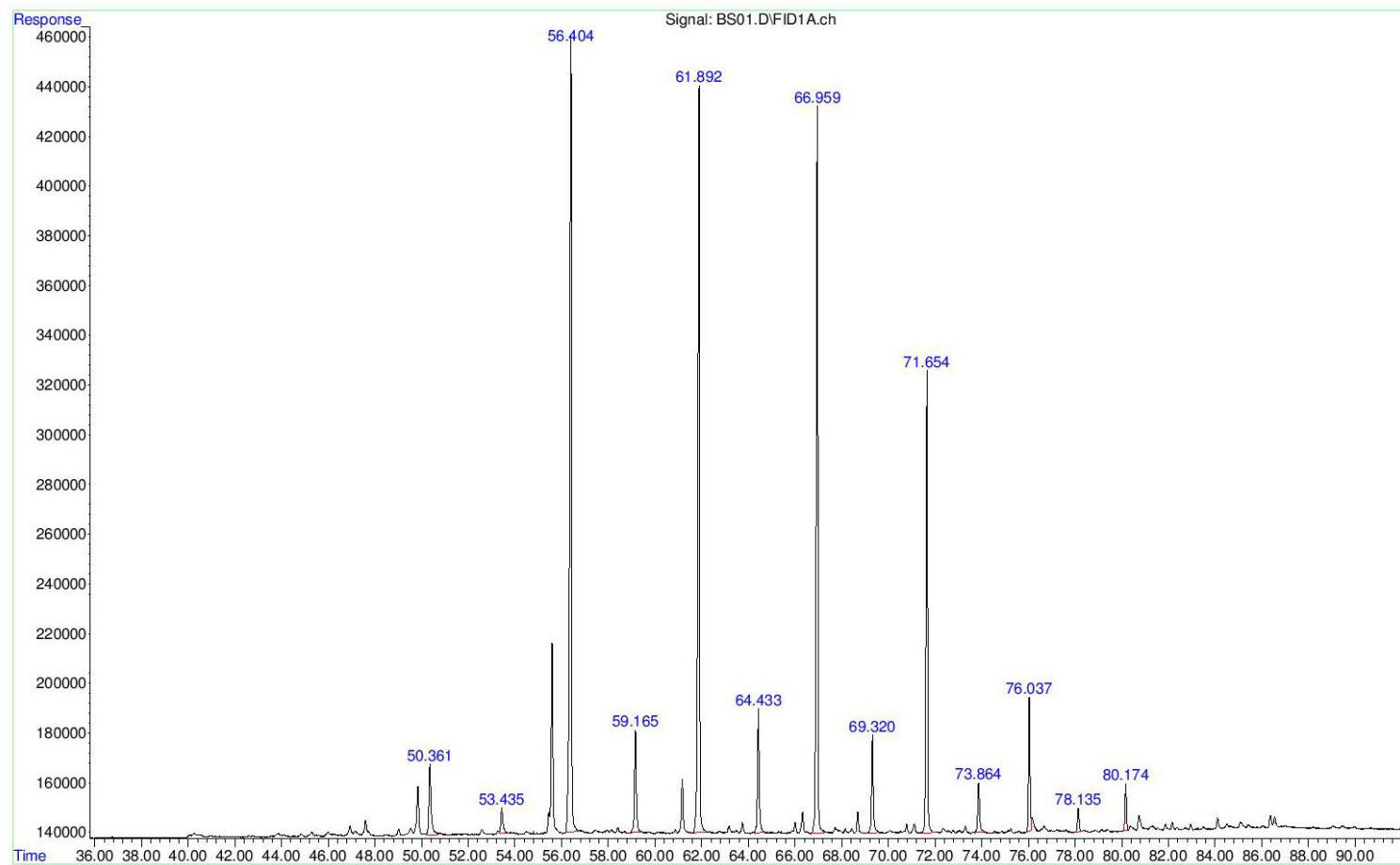
PRILOG IV – PCR produkti hloroplastnih mikrosatelita (cpSSRs) *P. nigra*

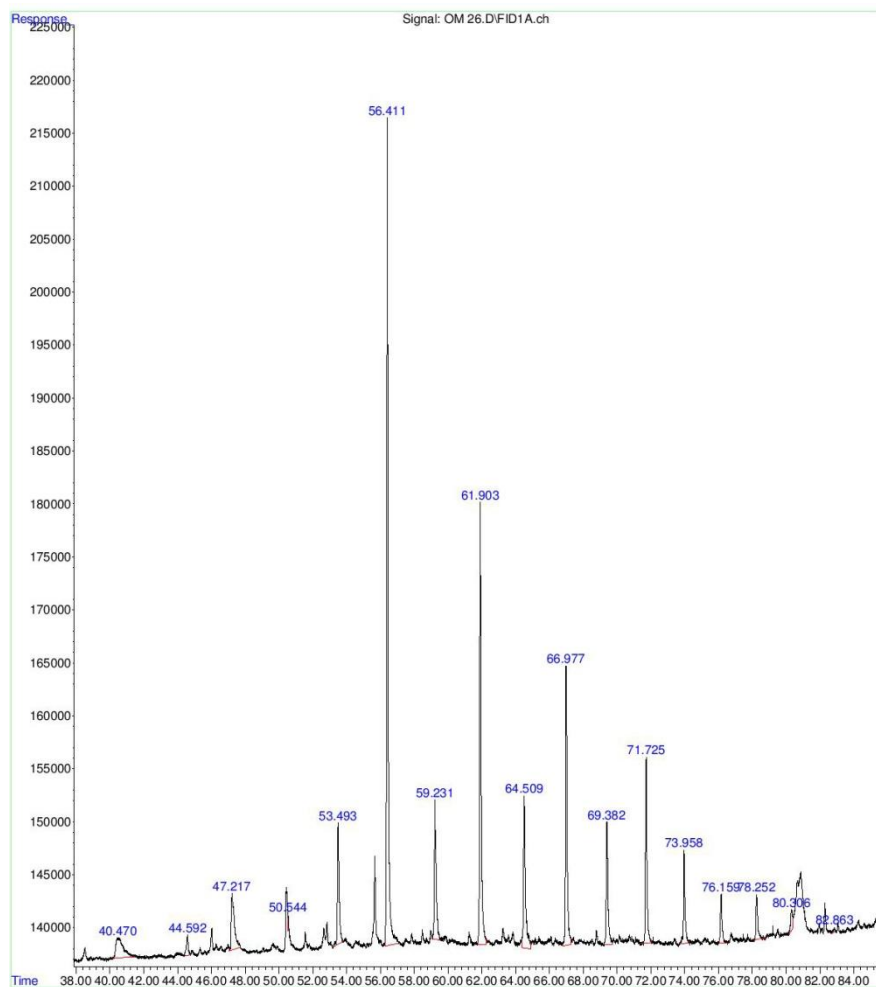
PRILOG V – PCR produkti mitohondrijalnog nekodirajućeg regiona *nad7* intron1 *P. nigra*

PRILOG VI – Elektroferogrami jedarnih EST-mikrosatelita (EST-SSRs) *P. nigra*

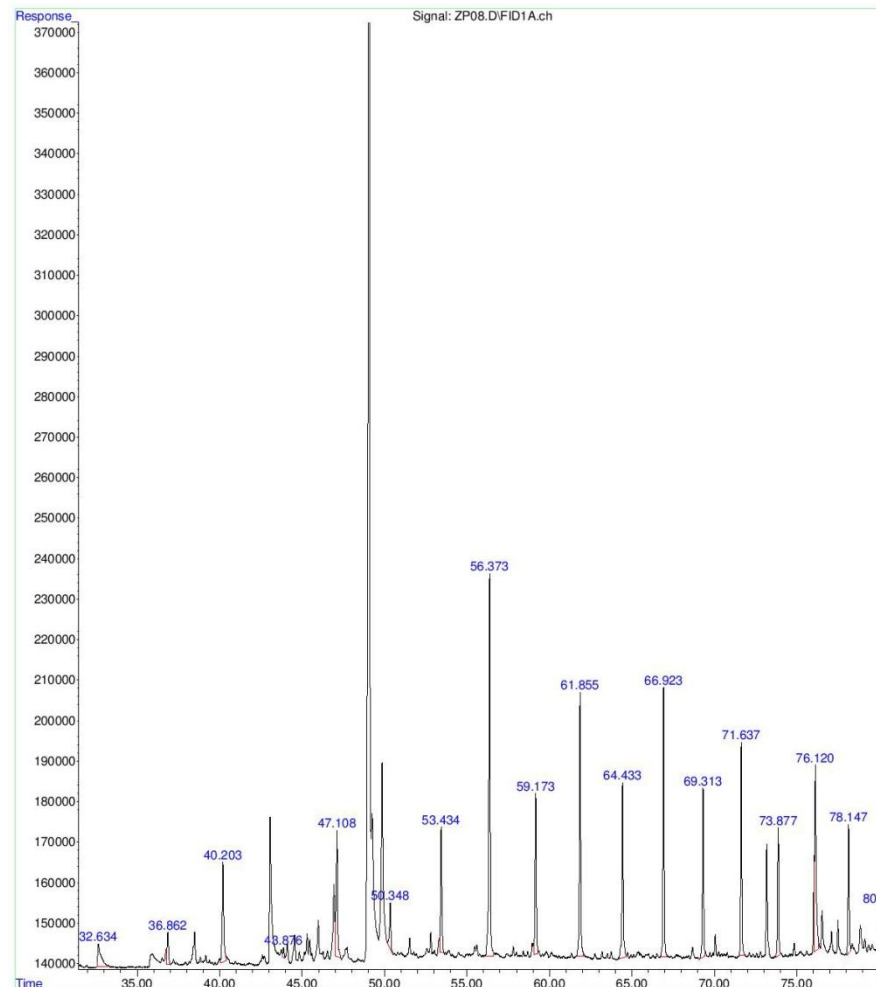
PRILOG VII – Elektroferogrami hloroplastnih mikrosatelita (cpSSRs) *P. nigra*

PRILOG VIII – Prikaz poravnatih mitohondrijalnih DNK sekvenci nekodirajućeg regiona *nad7* intron1 *P. nigra*

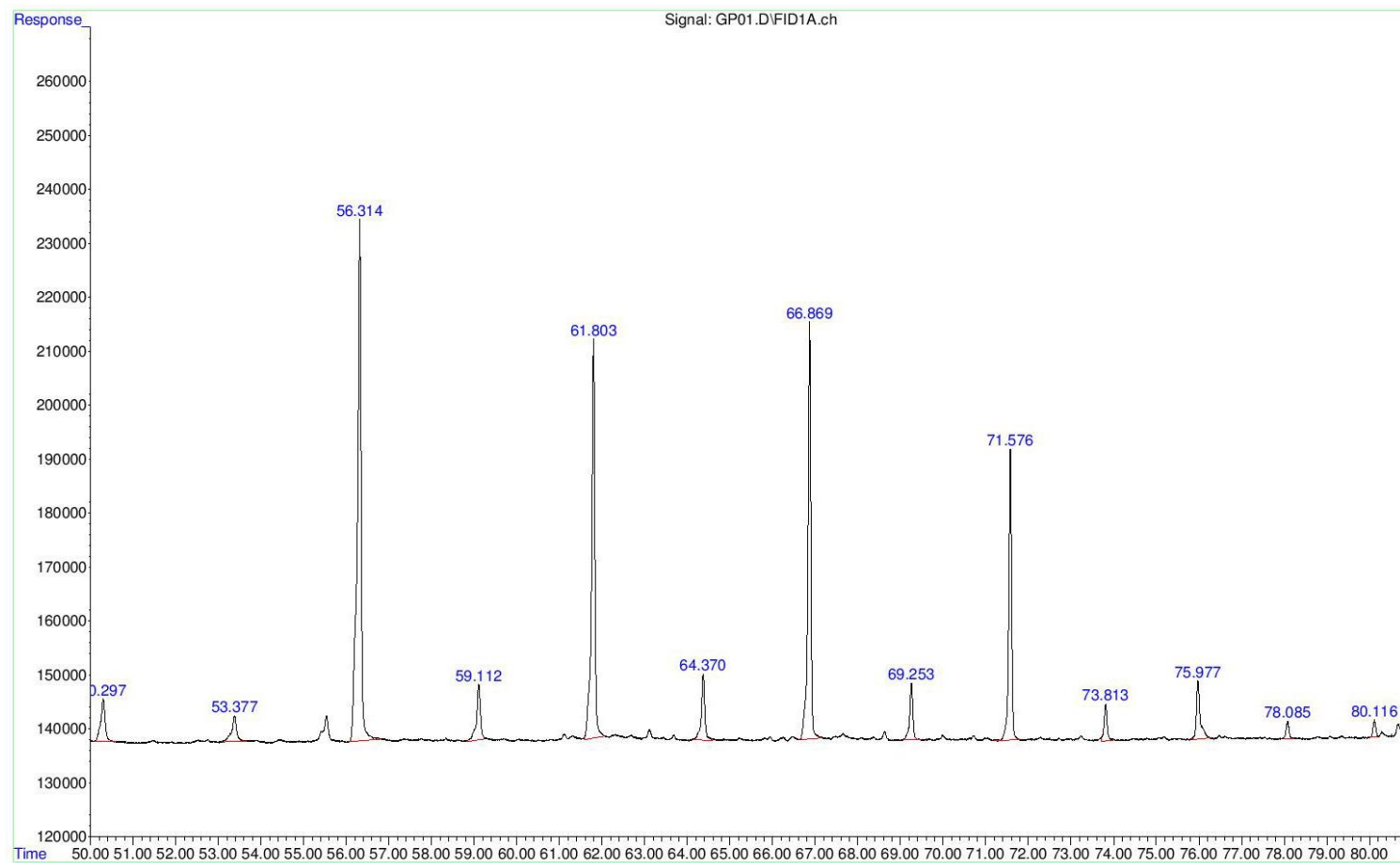
PRILOG I – FID hromatogrami kutikularnog voska četina *Pinus nigra*Slika 7-1. Kutikularni vosak četina *Pinus nigra* ssp. *nigra* (Banjska stena: uzorak B01)



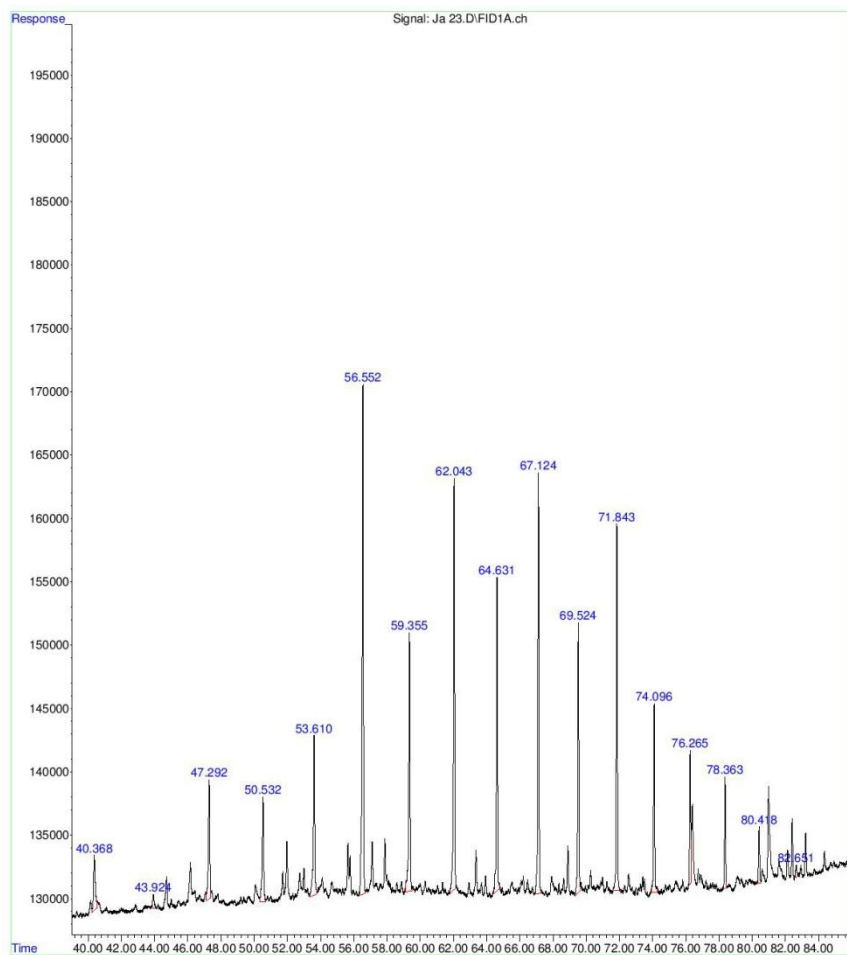
Slika 7-2. Kutikularni vosak četina *Pinus nigra* ssp. *nigra*
(Omar: uzorak O26)



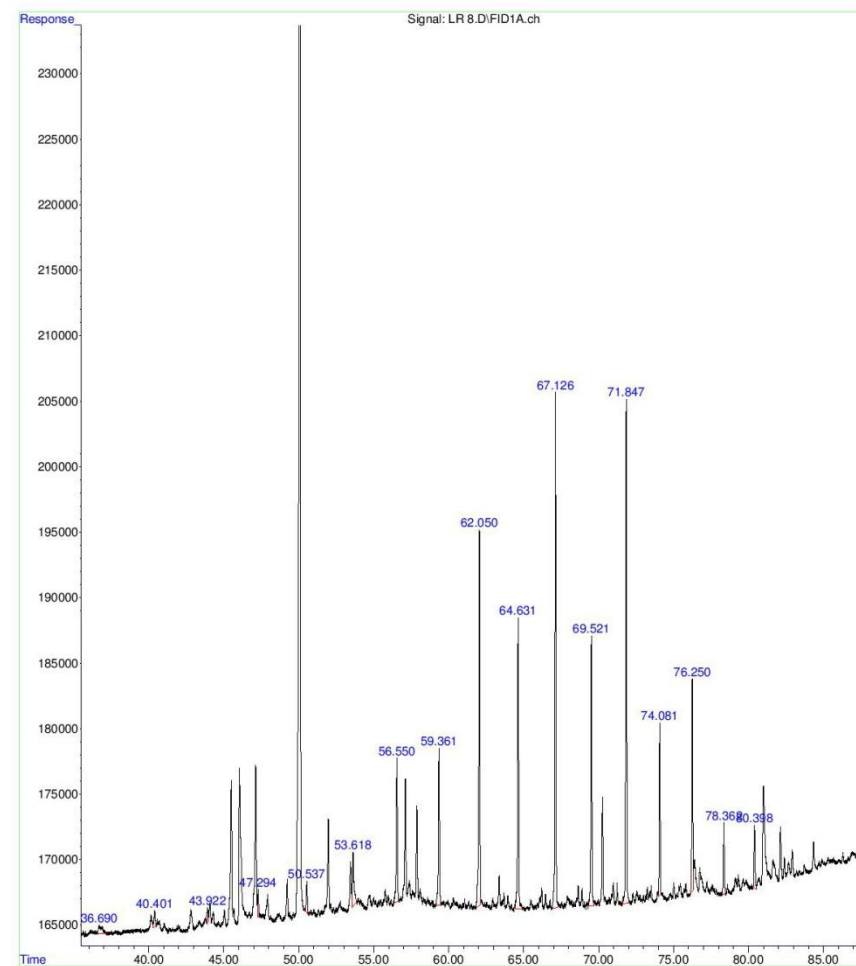
Slika 7-3. Kutikularni vosak četina *Pinus nigra* ssp. *nigra*
(Zmajevački potok: uzorak Z08)



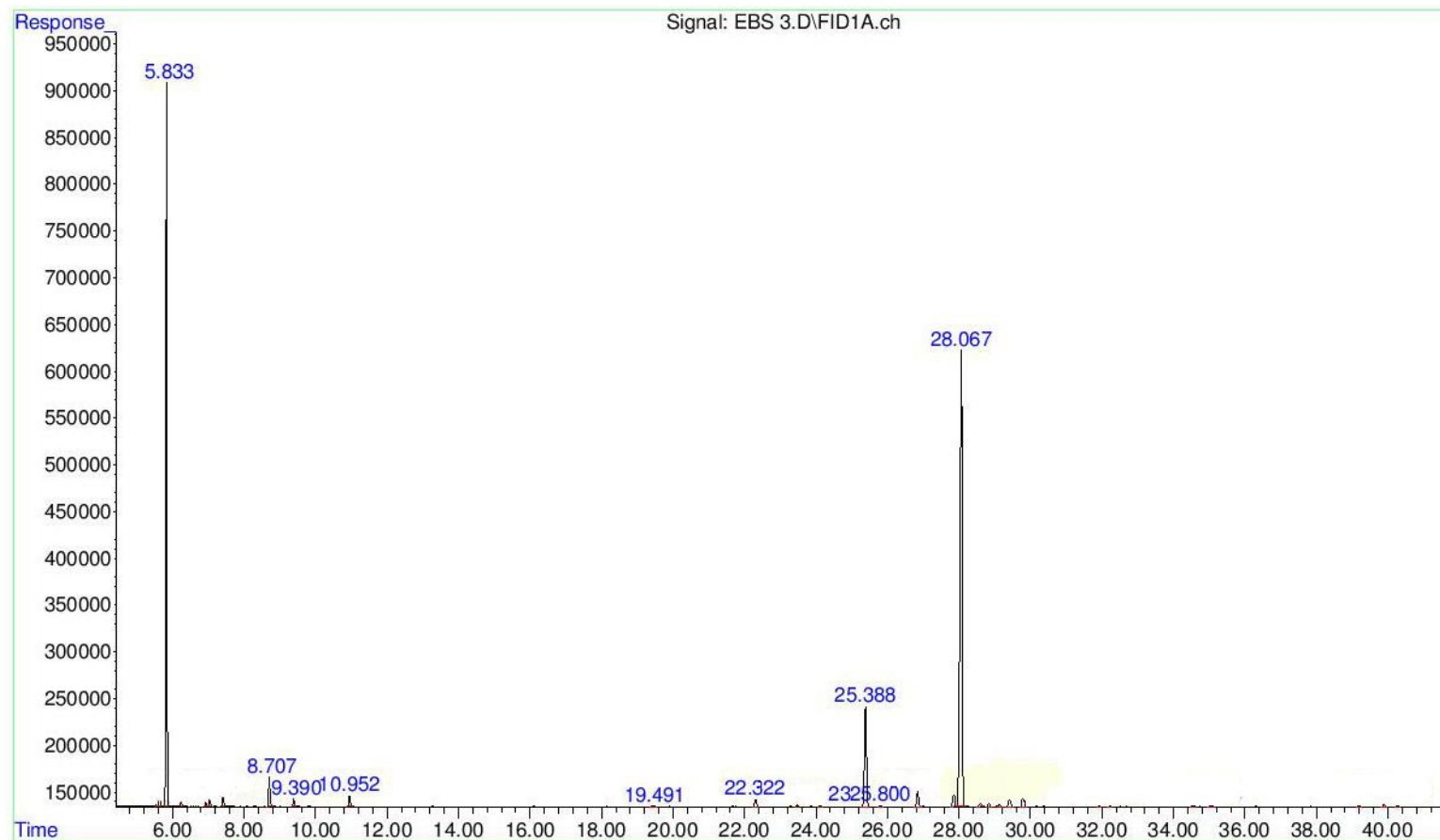
Slika 7-4. Kutikularni vosak četina *Pinus nigra* var. *gocensis* (Goč: uzorak G1)

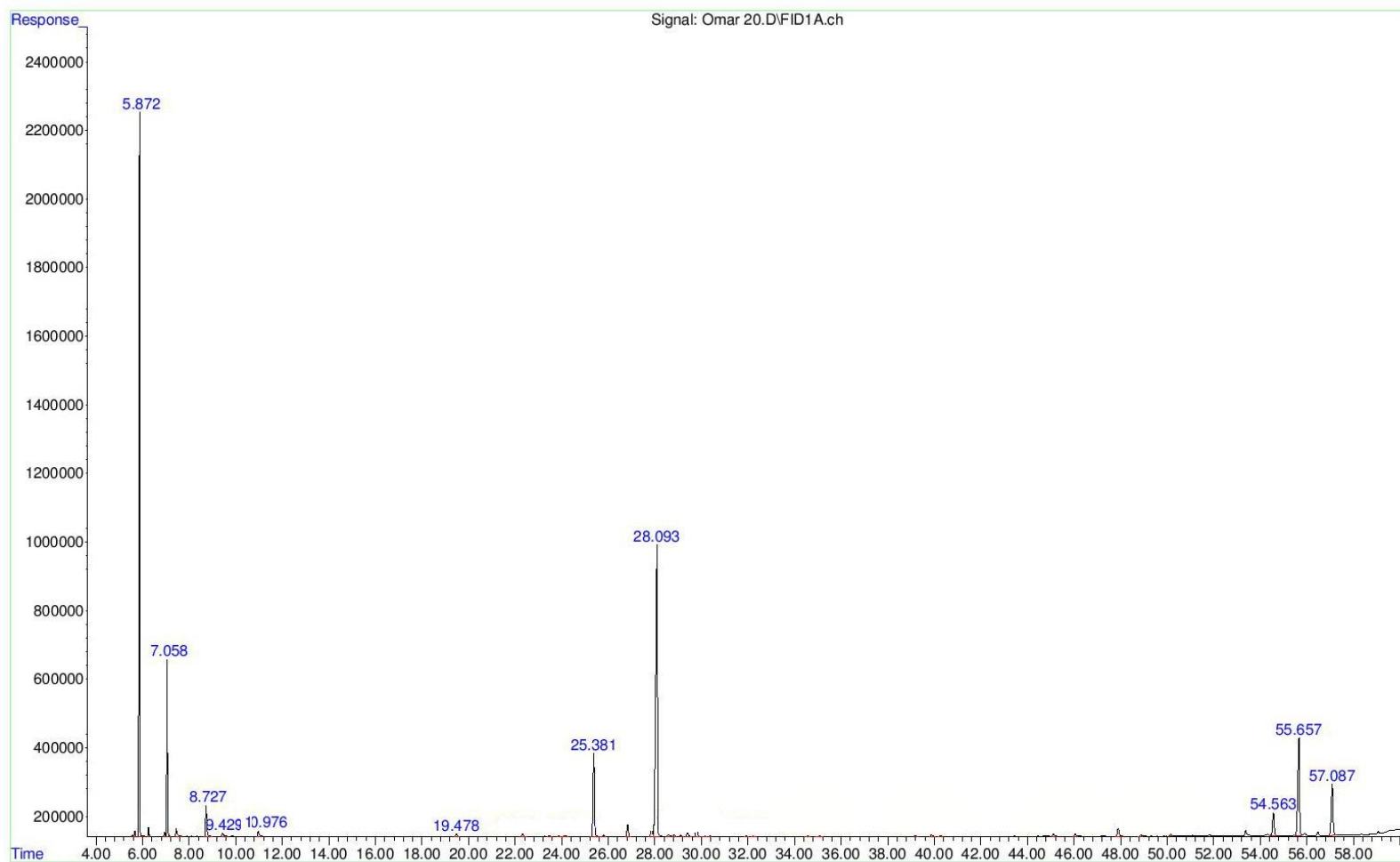


Slika 7-5. Kutikularni vosak četina *Pinus nigra* ssp. *pallasiana* (Jarešnik: uzorak J23)

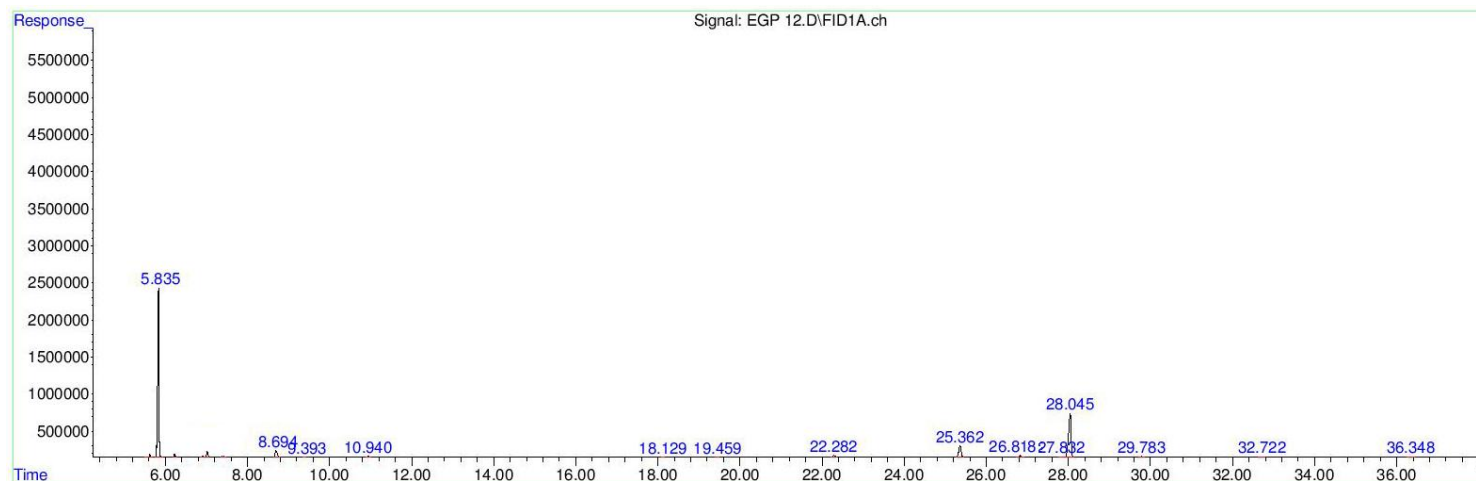
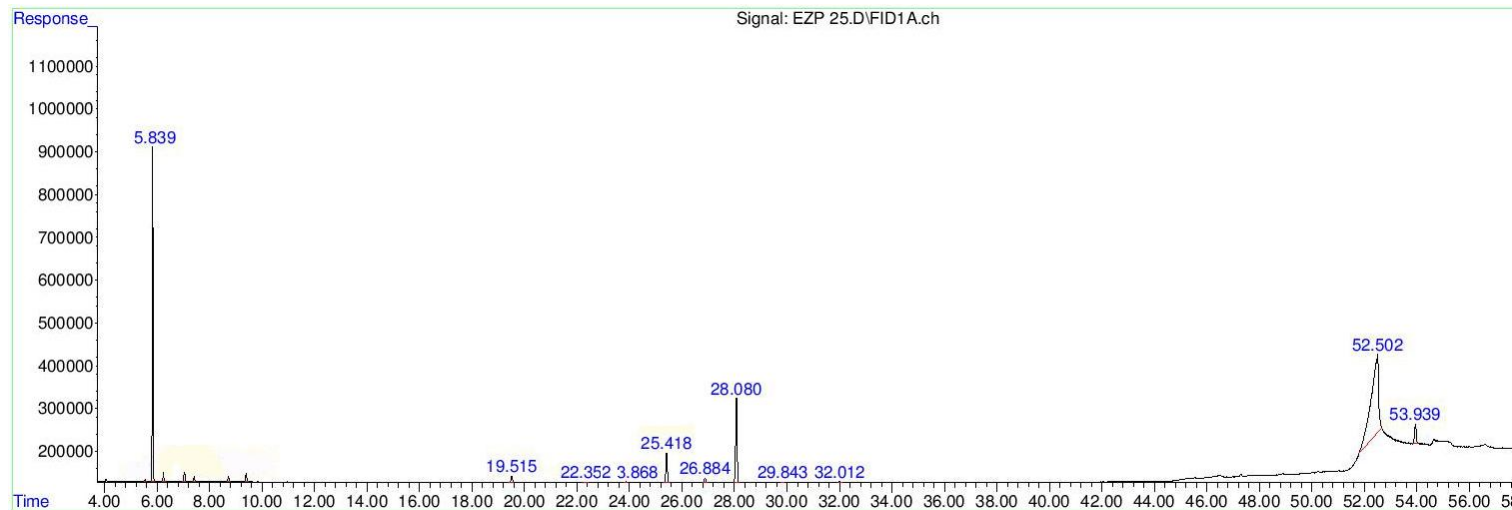


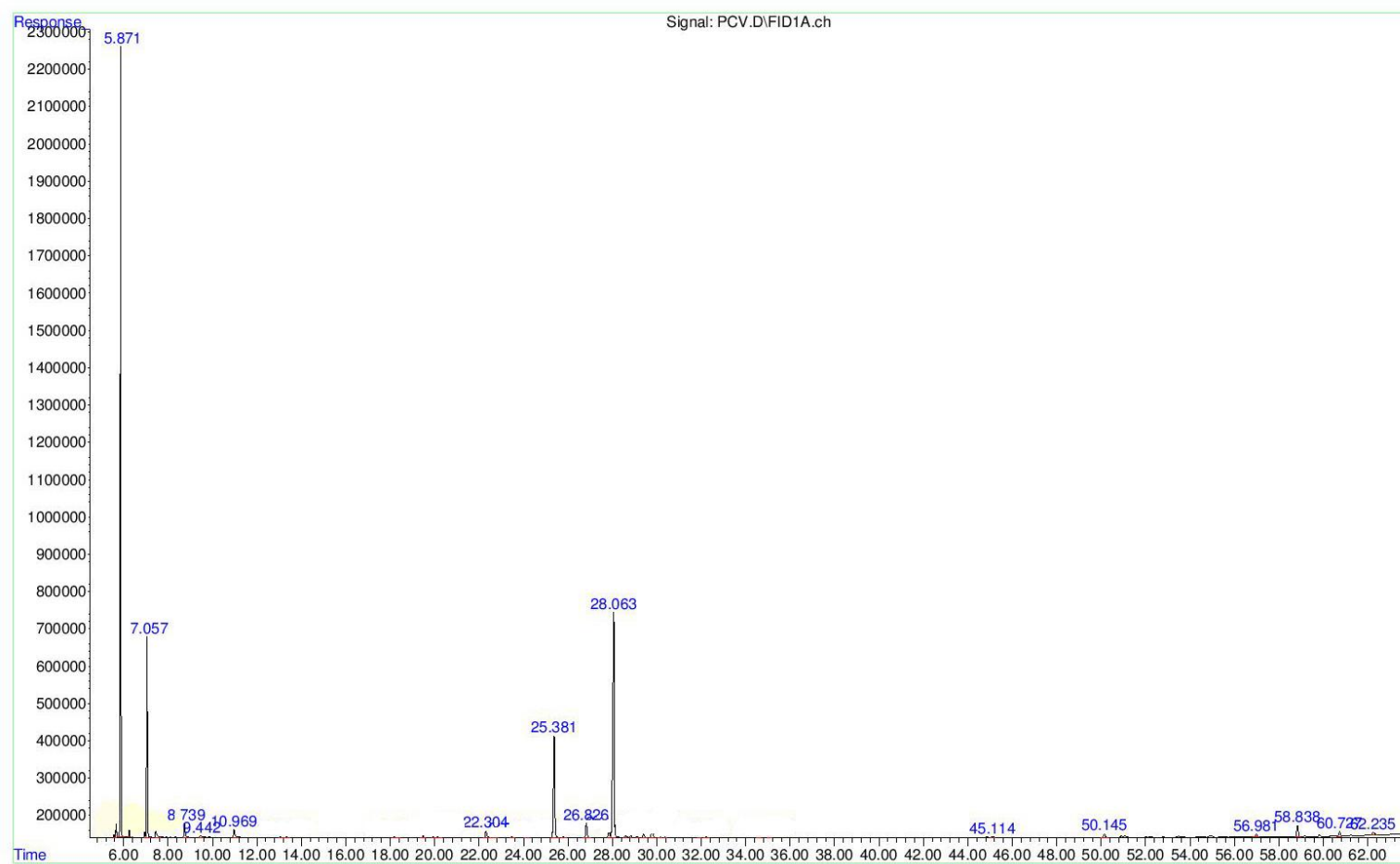
Slika 7-6. Kutikularni vosak četina *Pinus nigra* var. *banatica* (Lazareva reka: uzorak L8)

PRILOG II – FID hromatogrami etarskog ulja četina *Pinus nigra*Slika 7-7. Etarsko ulje četina *Pinus nigra* ssp. *nigra* (Banjska stena: uzorak B3)

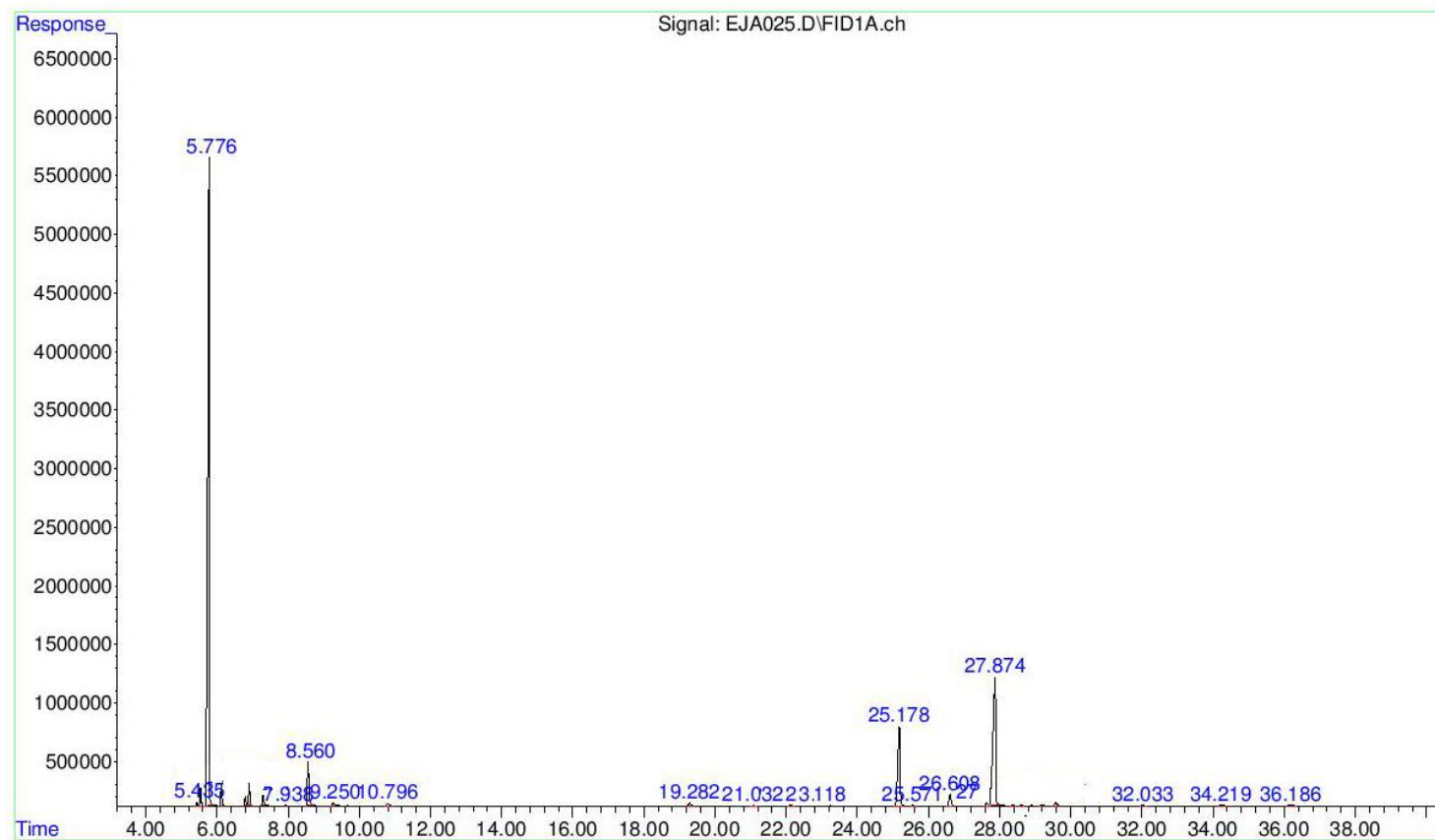


Slika 7-8. Etarsko ulje četina *Pinus nigra* ssp. *nigra* (Omar: uzorak O3)

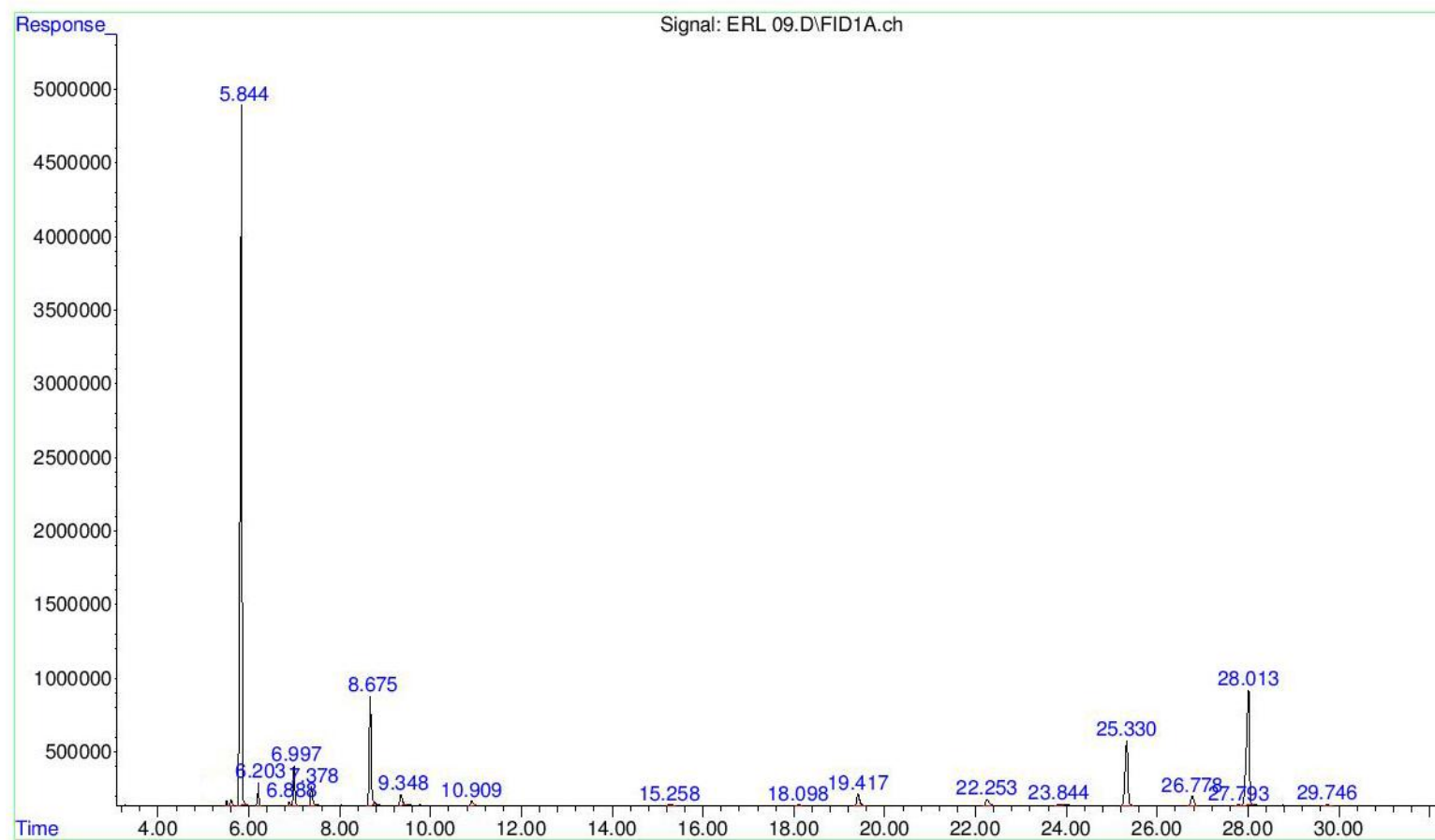
Slika 7-9. Etarsko ulje četina *Pinus nigra* ssp. *nigra* (Zmajevački potok: uzorak Z25)Slika 7-10. Etarsko ulje četina *Pinus nigra* var. *gocensis* (Goč: uzorak G12)



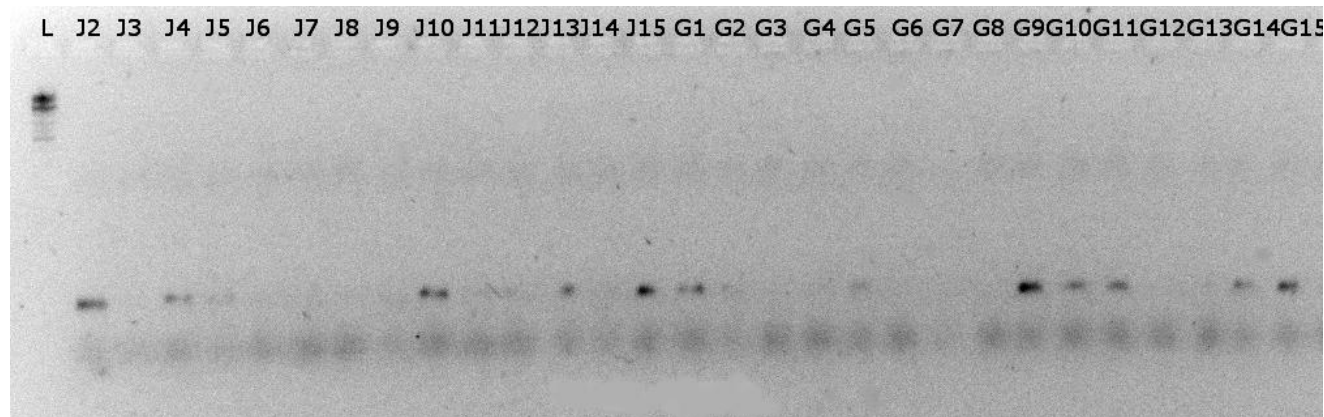
Slika 7-11. Etarsko ulje četina *Pinus nigra* var. *gocensis* (Priboj: uzorak P6)



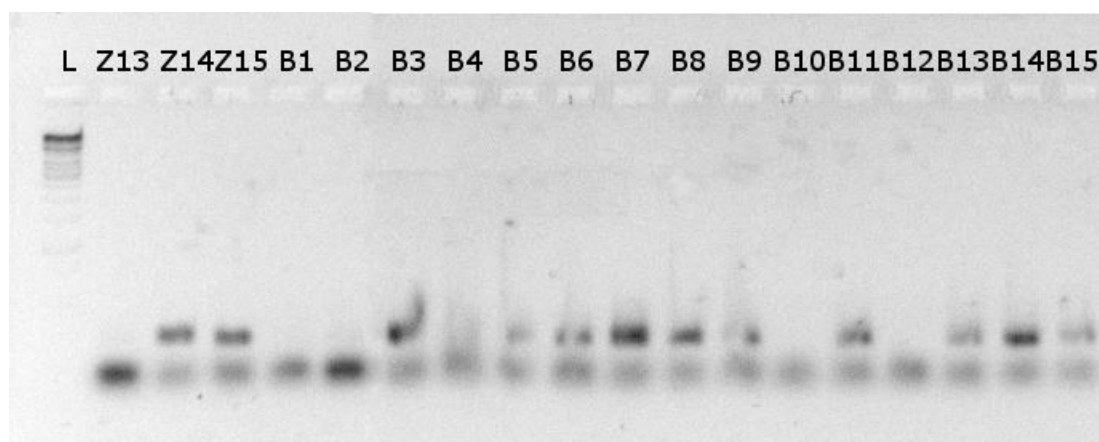
Slika 7-12. Etarsko ulje četina *Pinus nigra* ssp. *pallasiana* (Jarešnik: uzorak J25)



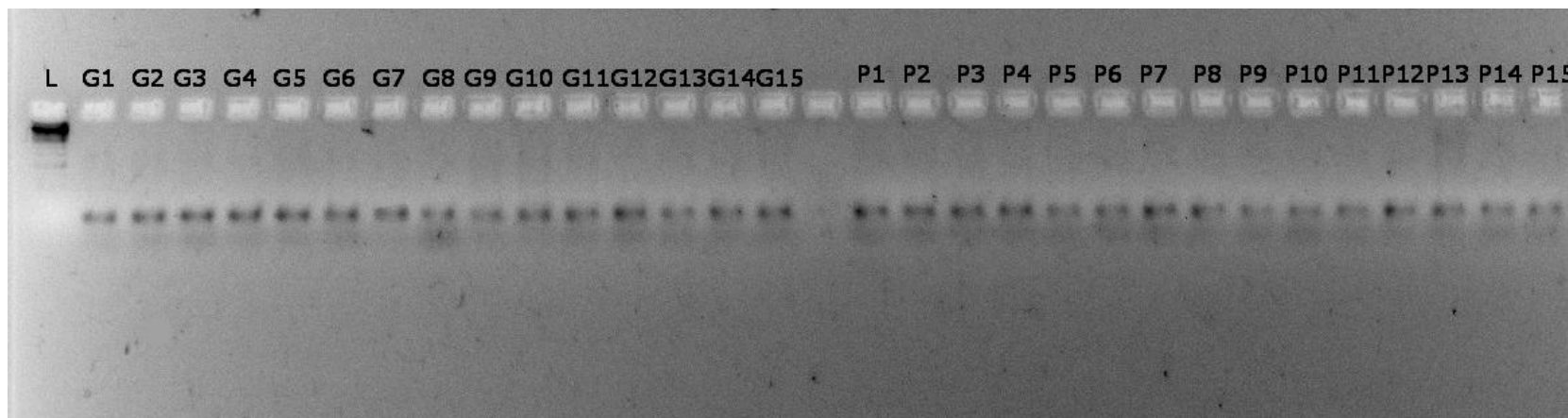
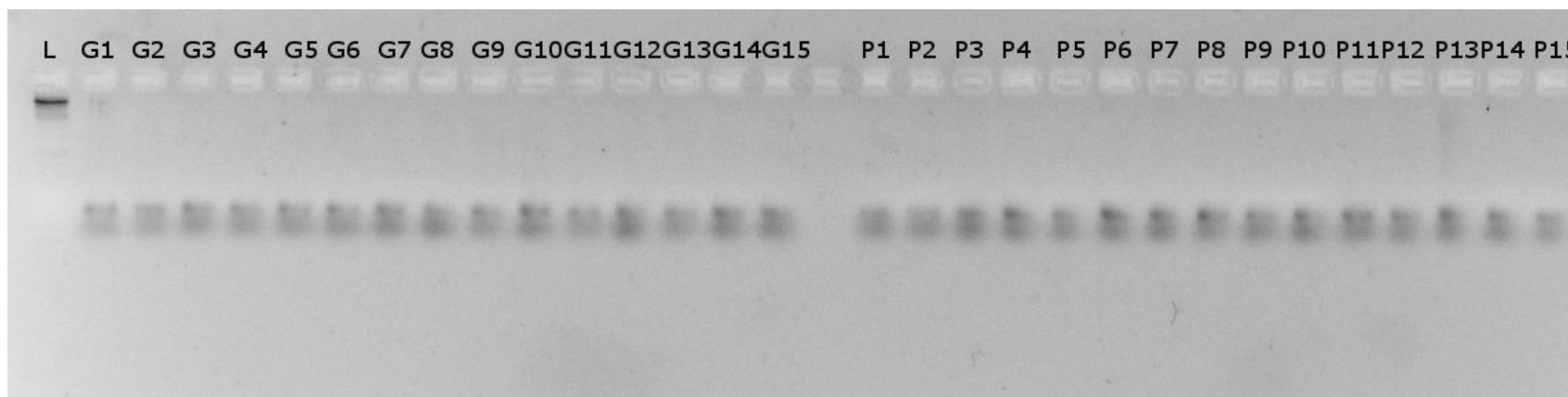
Slika 7-13. Etarsko ulje četina *Pinus nigra* var. *banatica* (Lazareva reka: uzorak L9)

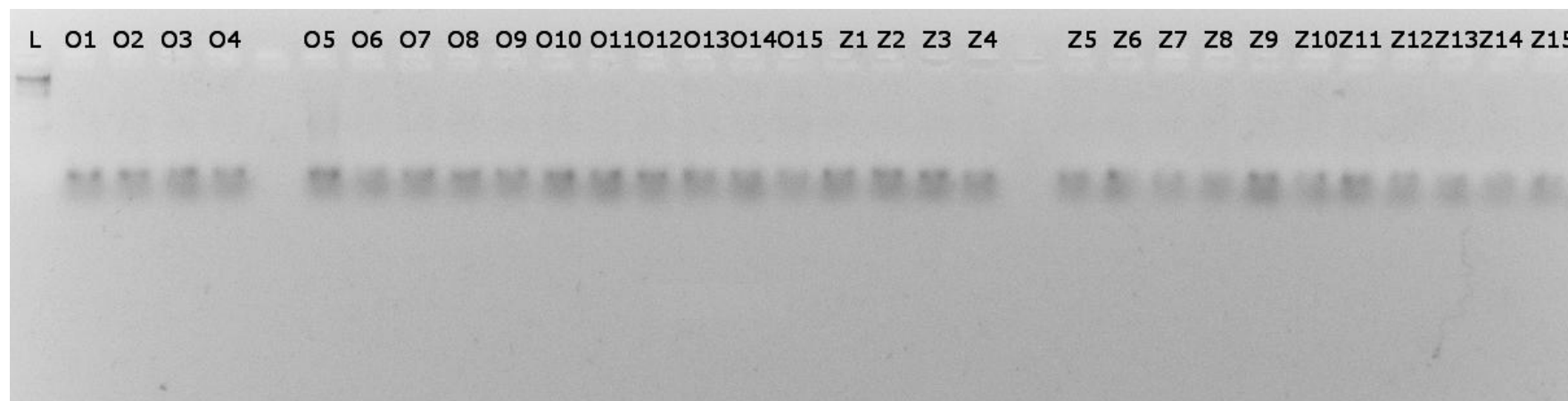
PRILOG III – PCR produkti jedarnih EST-mikrosatelita (EST-SSRs)

Slika 7-14. PCR produkti jedarnog EST-SSR SP444 *P. nigra* ssp. *pallasiana* (Jarešnik: uzorci: J2-J15) i *P. nigra* var. *gocensis* (Goč: uzorci G1-G15)

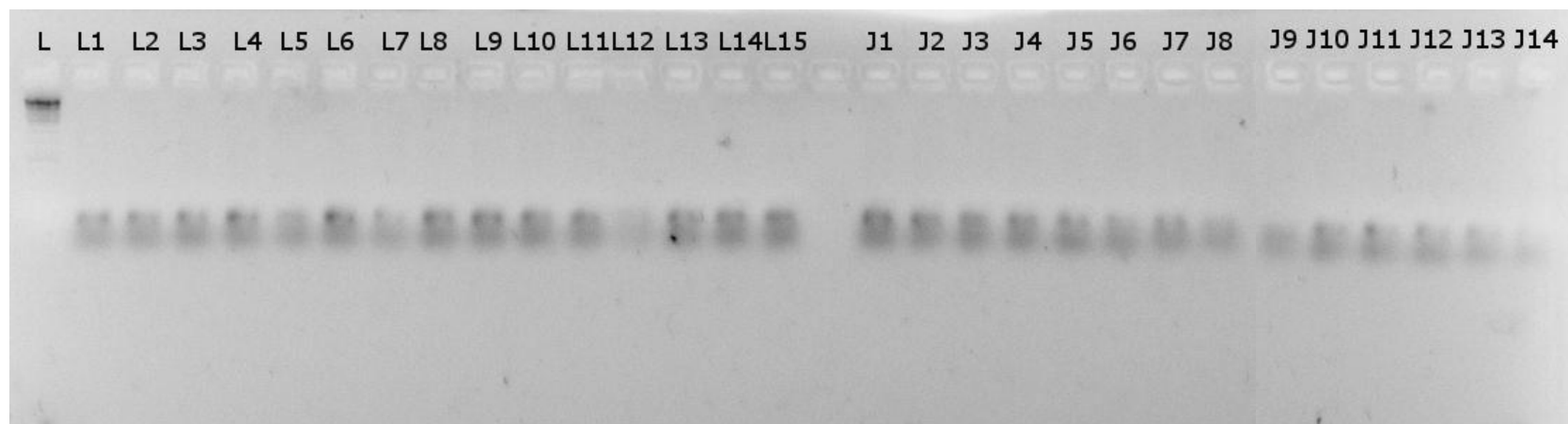


Slika 7-15. PCR produkti jedarnog EST-SSR SP731 *P. nigra* ssp. *nigra* (Zmajevački potok: uzorci: Z13-Z15 i Banjska stena: uzorci B1-B15)

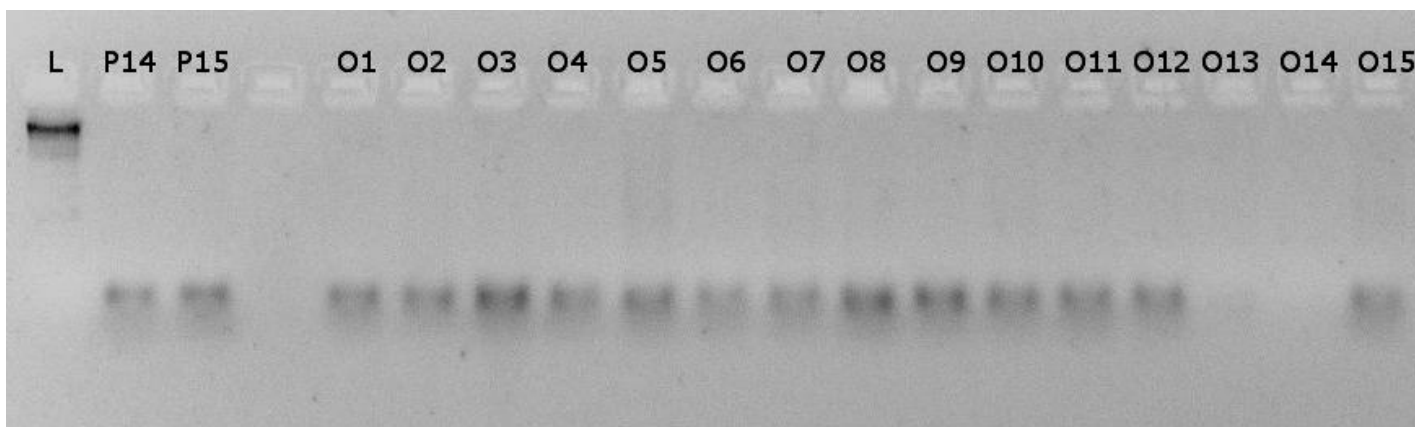
PRILOG IV – PCR produkti hloroplastnih mikrosatelita (cpSSRs)Slika 7-16. PCR produkti cpSSR Pt15169 *Pinus nigra* var. *gocensis* (Goč: uzorci G1-G15 i Priboj: uzorci P1-P15)Slika 7-17. PCR produkti cpSSR Pt30204 *P. nigra* var. *gocensis* (Goč: uzorci G1-G15 i Priboj: uzorci P1-P15)



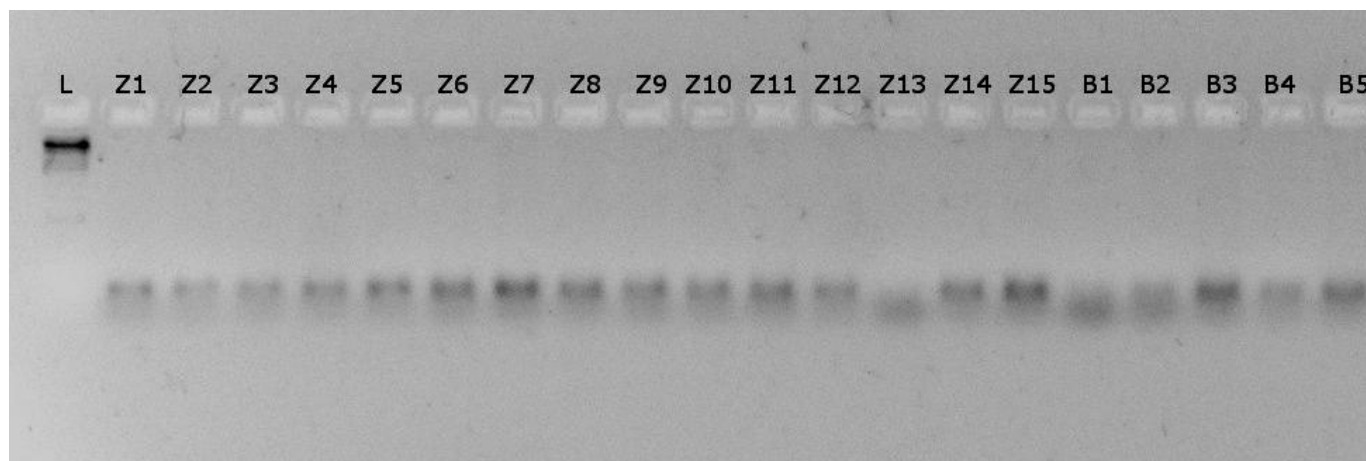
Slika 7-18. PCR produkti cpSSR Pt30204 *P. nigra* ssp. *nigra* (Omar: uzorci O1-O15 i Zmajevački potok: uzorci Z1-Z15)



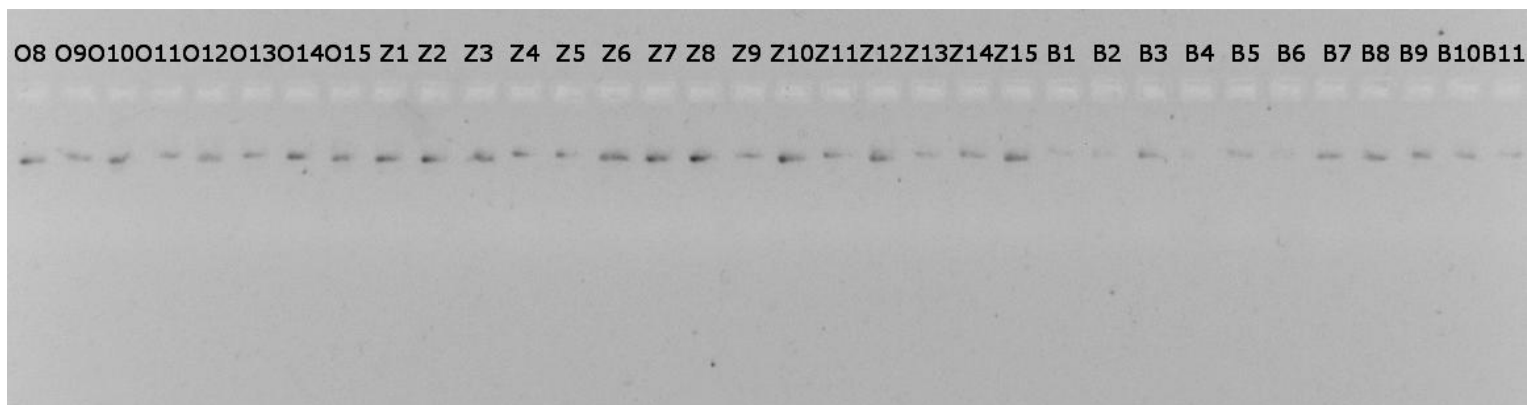
Slika 7-19. PCR produkti cpSSR Pt30204 *P. nigra* var. *banatica* (Lazareva reka: uzorci L1-L15) i *P. nigra* ssp. *pallasiana* (Jarešnik: uzorci J1-J15)



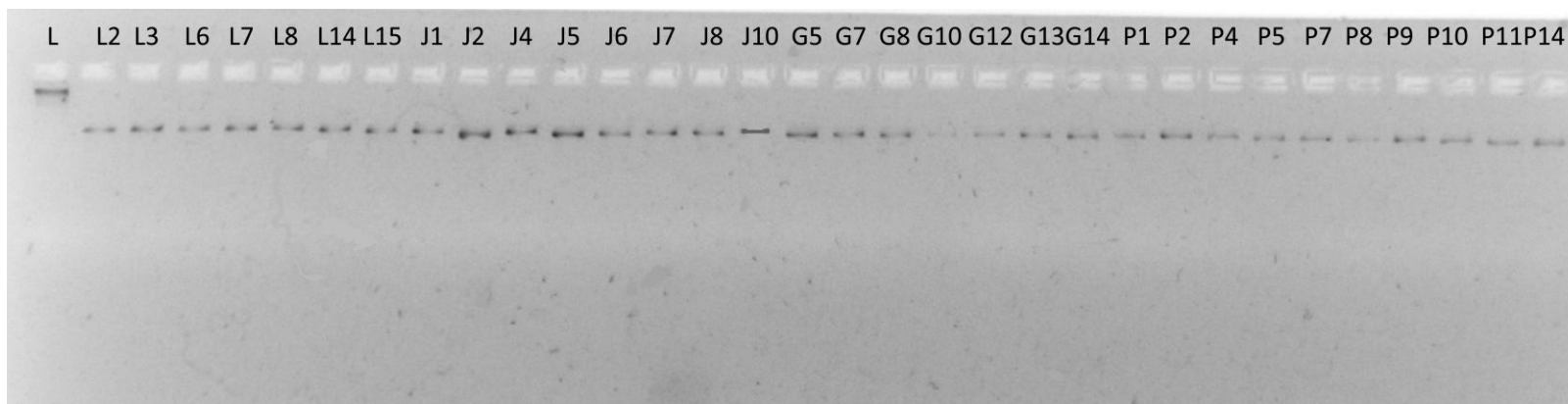
Slika 7-20. PCR produkti cpSSR Pt87268 *P. nigra* var. *gocensis* (Priboj: uzorci P14 i P15) i *P. nigra* ssp. *nigra* (Omar: uzorci O1-O15)



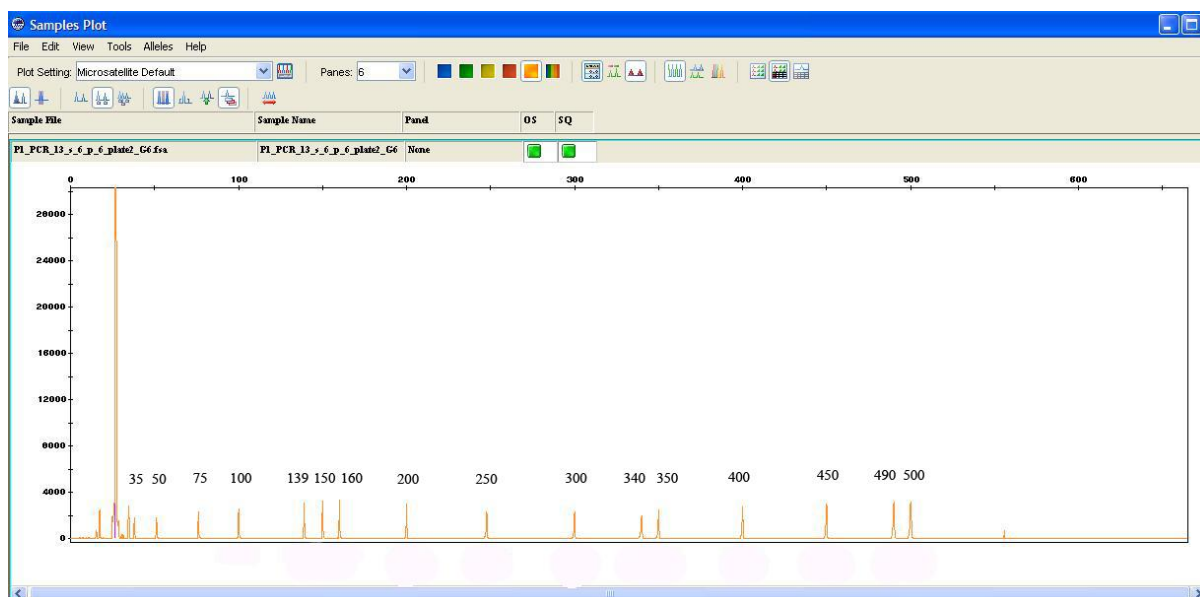
Slika 7-21. PCR produkti cpSSR Pt87268 *P. nigra* ssp. *nigra* (Zmajevački potok: uzorci Z1-Z15 i Banjska stena: uzorci B1-B5)

PRILOG V – PCR produkti mitohondrijalnog nekodirajućeg regiona *nad7* intron 1

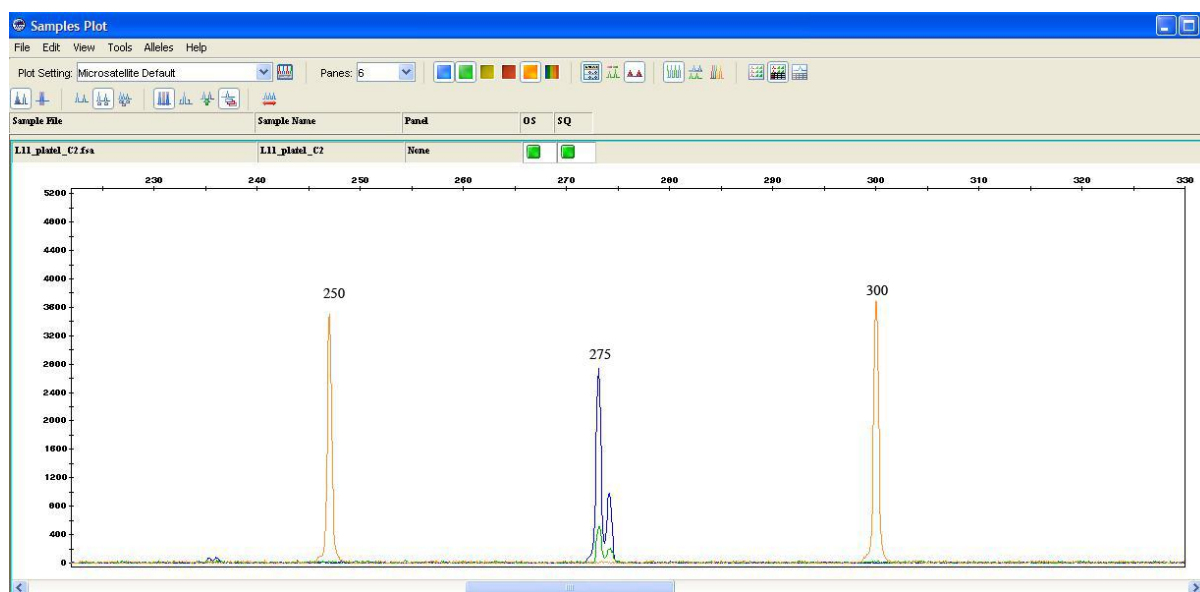
Slika 7-22. PCR produkti *nad7* intron 1 *P. nigra* ssp. *nigra* (Omar: uzorci O8-O15, Zmajevački potok: uzorci Z1-Z15 i Banjska stena: uzorci B1-B11)

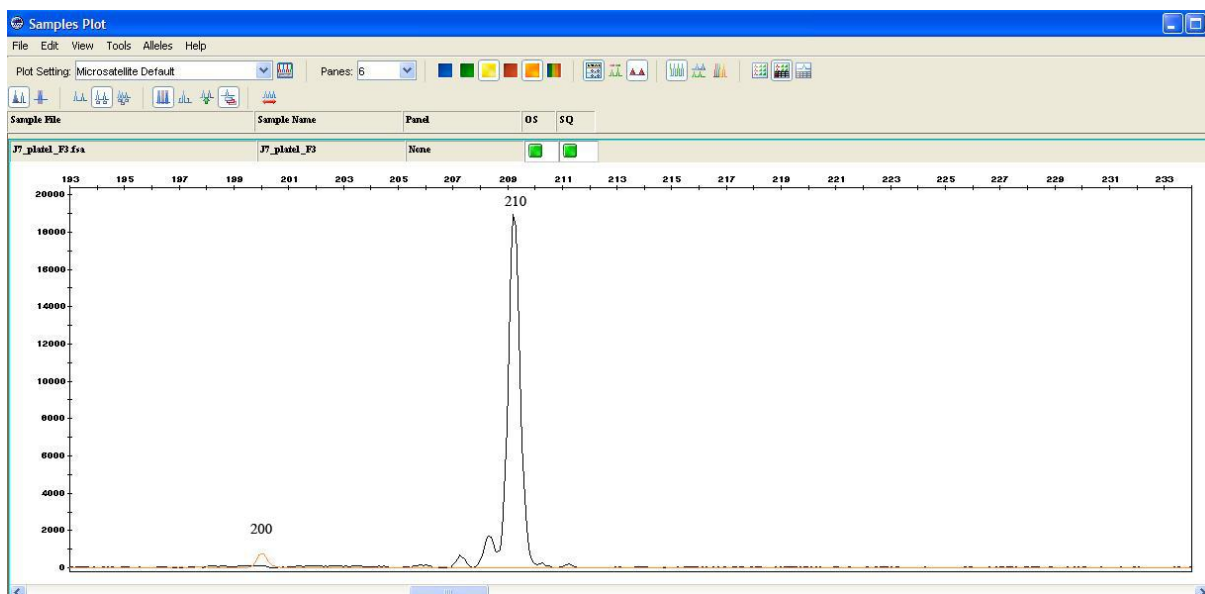


Slika 7-23. PCR produkti *nad7* intron 1 *P. nigra* var. *banatica* (uzorci iz populacije Lazareva reka), *P. nigra* ssp. *pallasiana* (uzorci iz populacije Jarešnik) i *P. nigra* var. *gocensis* (uzorci iz populacija Goč i Priboj)

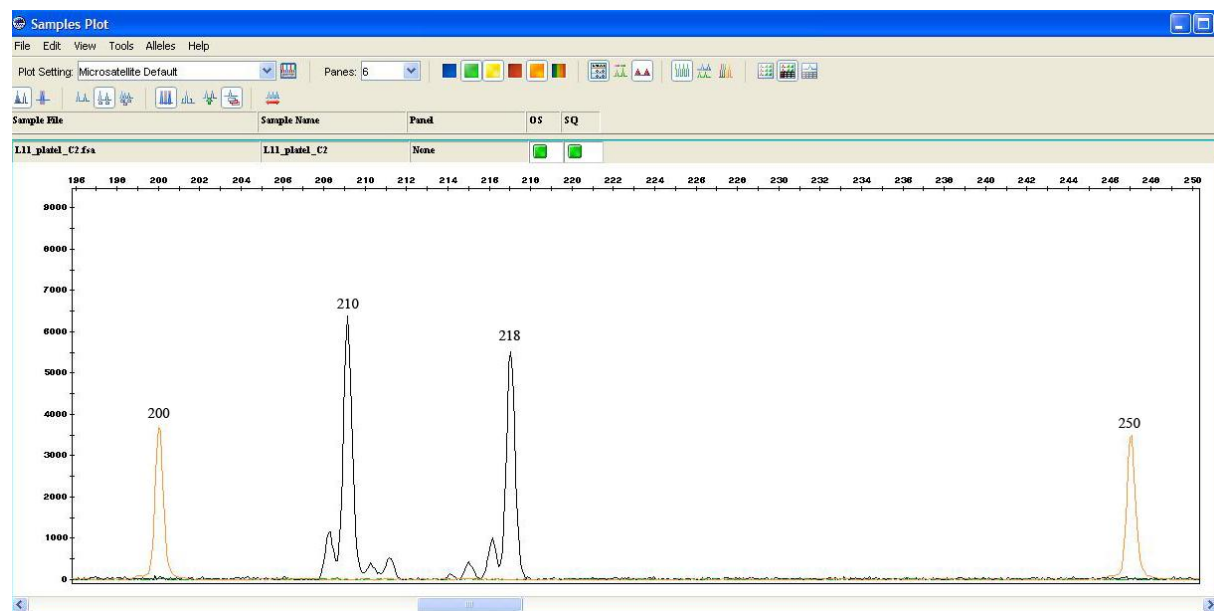
PRILOG VI – Elektroferogrami jedarnih EST-mikrosatelita (EST-SSRs) *P. nigra*

Slika 7-24. Elektroferogram standarda Genescan Liz-500

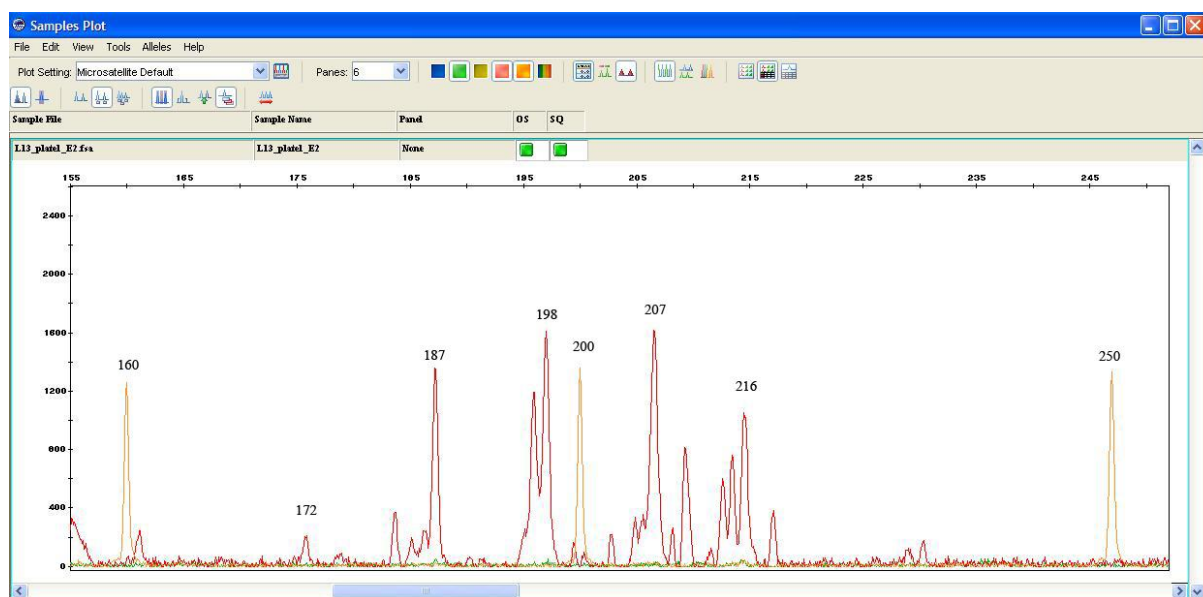
Slika 7-25. Elektroferogram EST-SSR SP444 *P. nigra* var. *banatica* (Lazareva reka: uzorak L11)



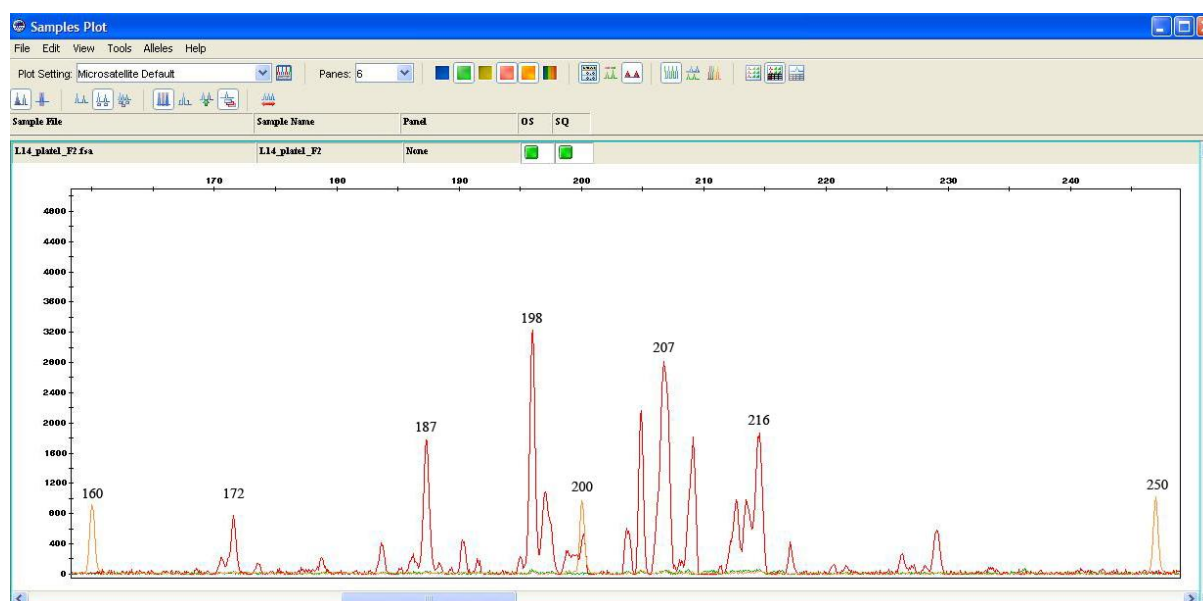
Slika 7-26. Elektroferogram EST-SSR SP731 *P. nigra* ssp. *pallasiana* (Jarešnik: uzorak J7)



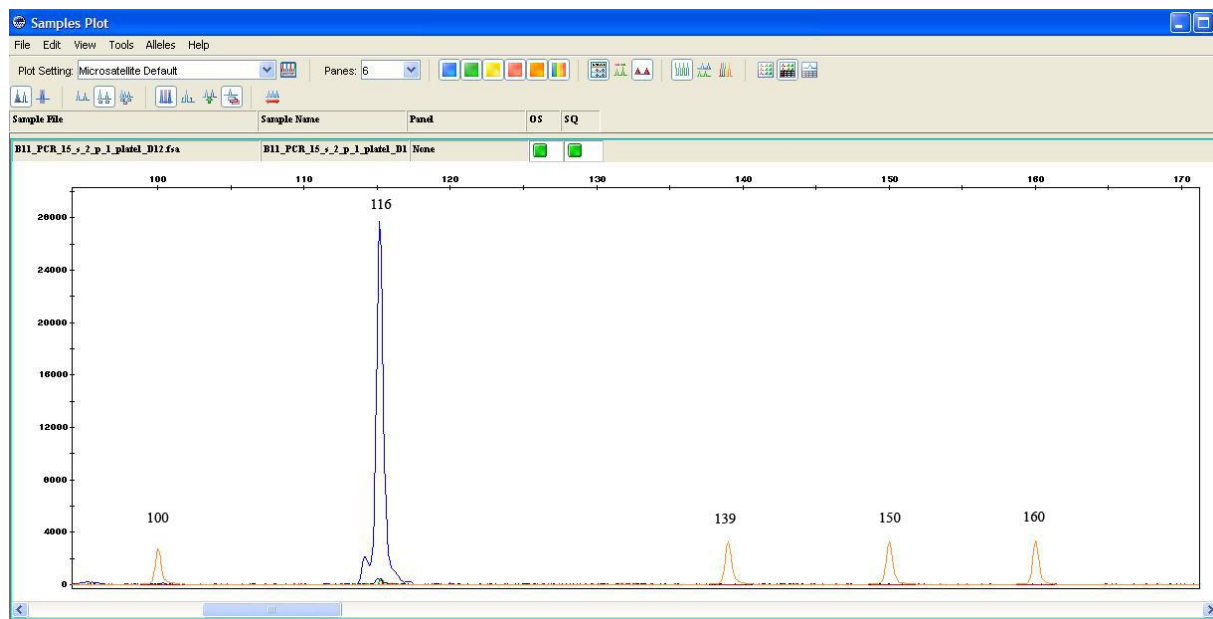
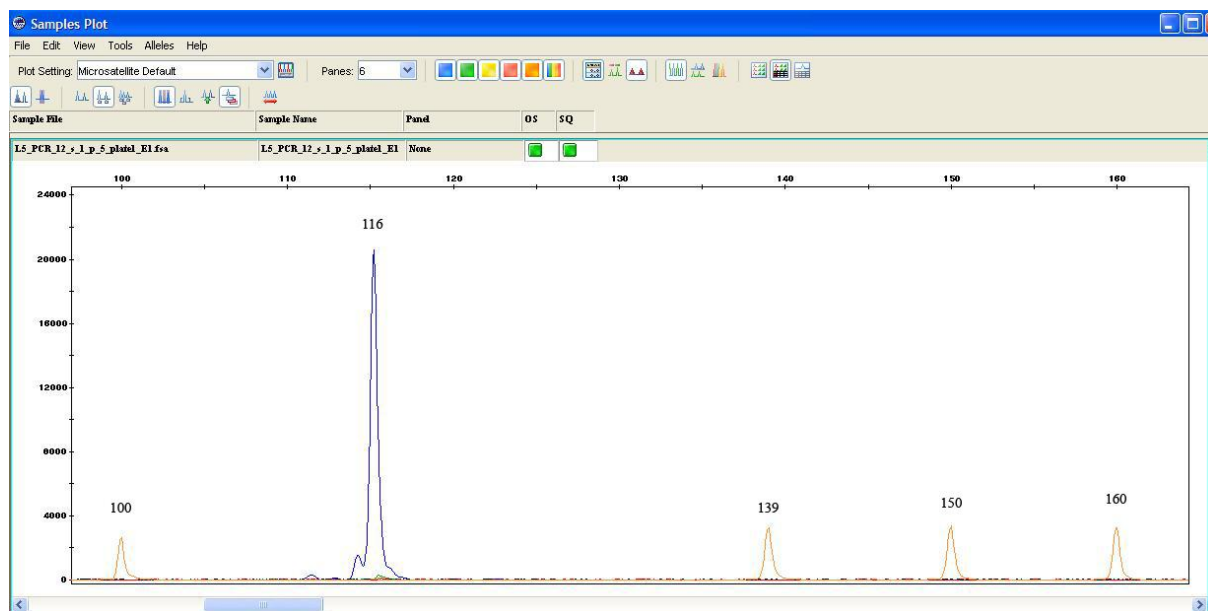
Slika 7-27. Elektroferogram EST-SSR SP731 *P. nigra* var. *banatica* (Lazareva reka: uzorak L11)

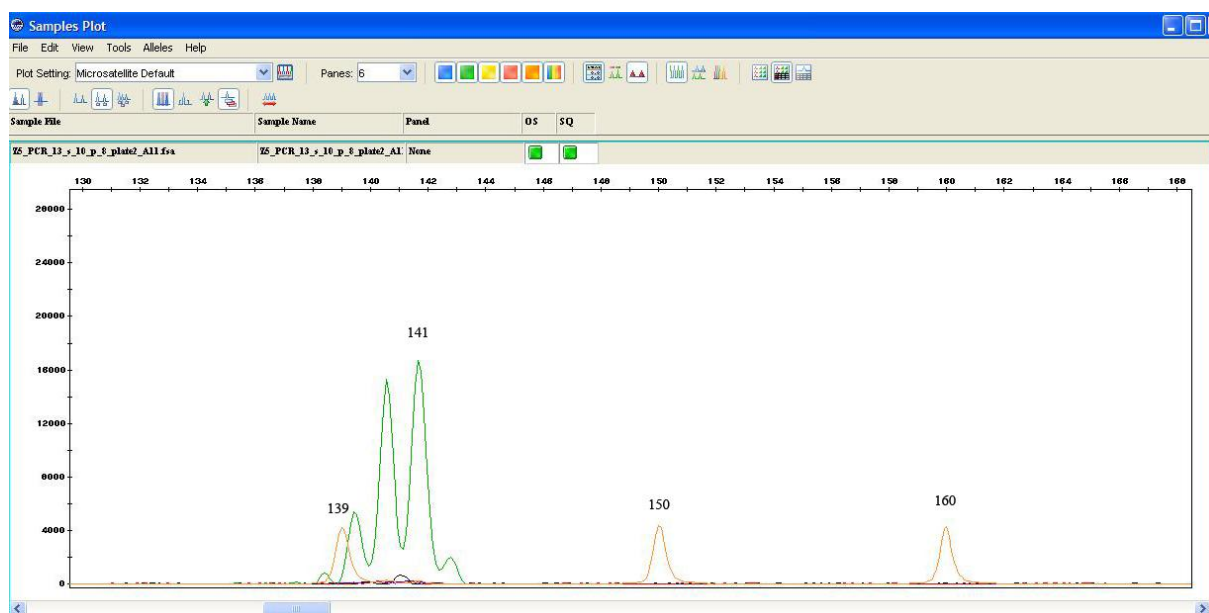


Slika 7-28. Elektroferogram EST-SSR SP865 *P. nigra* var. *banatica* (Lazareva reka: uzorak L13)

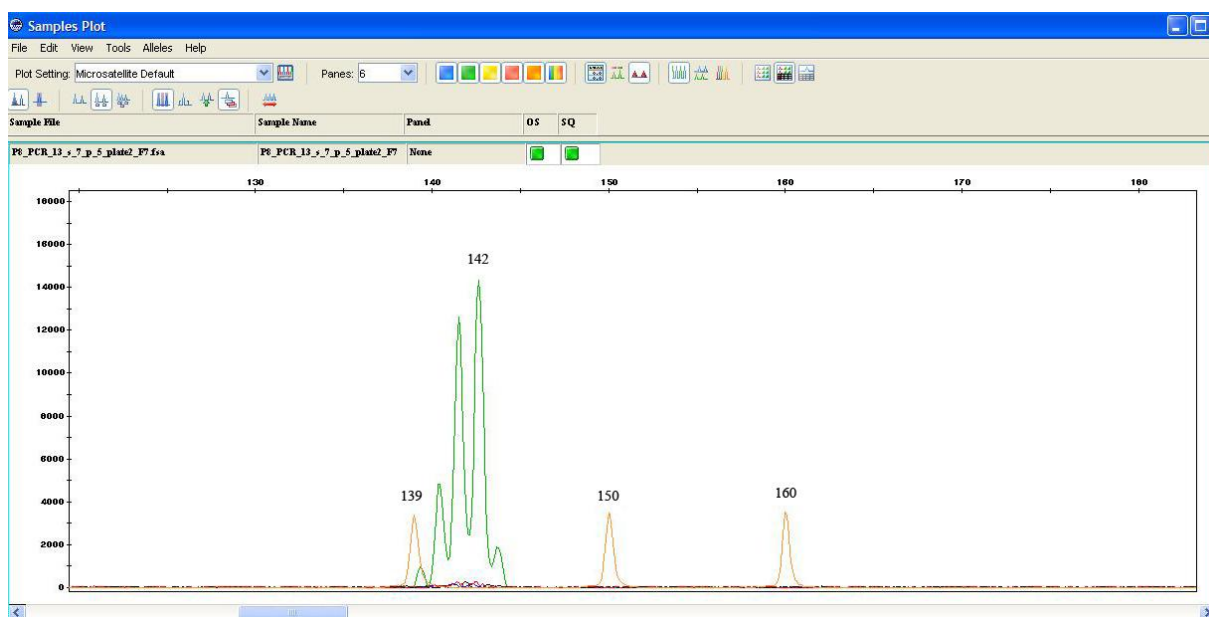


Slika 7-29. Elektroferogram EST-SSR SP865 *P. nigra* var. *banatica* (Lazareva reka: uzorak L14)

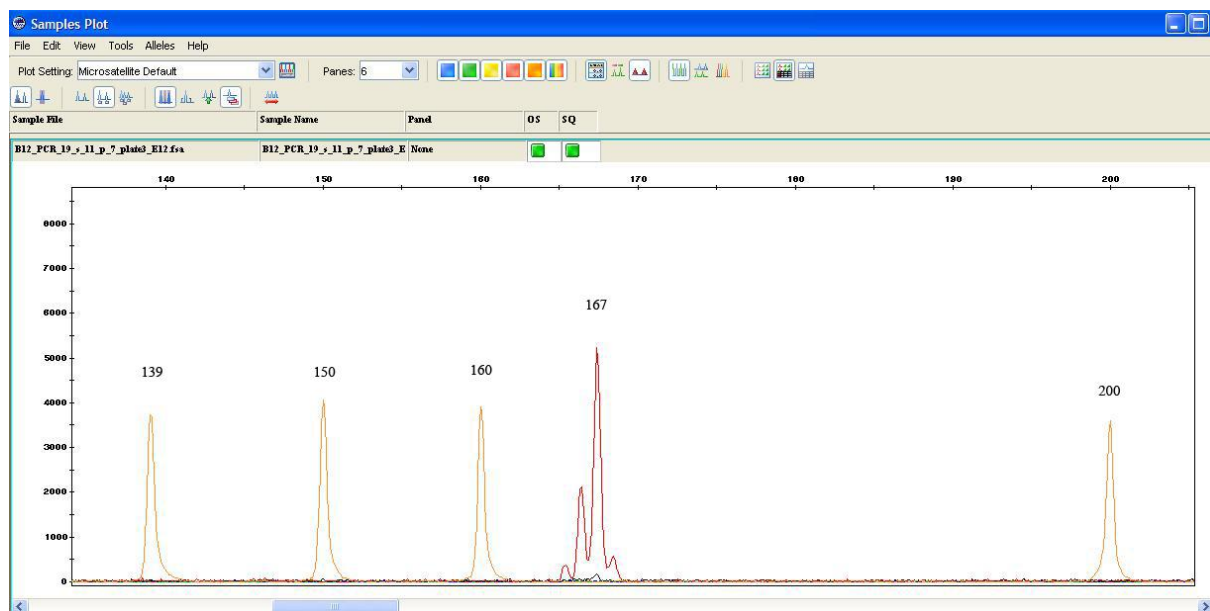
PRILOG VII – Elektroferogrami hloroplastnih mikrosatelita (cpSSRs) *P. nigra*Slika 7-30. Elektroferogram cpSSR Pt15169 *P. nigra* ssp. *nigra* (Banjska stena: uzorak B11)Slika 7-31. Elektroferogram cpSSR Pt15169 *P. nigra* var. *banatica* (Lazareva reka: uzorak L5)



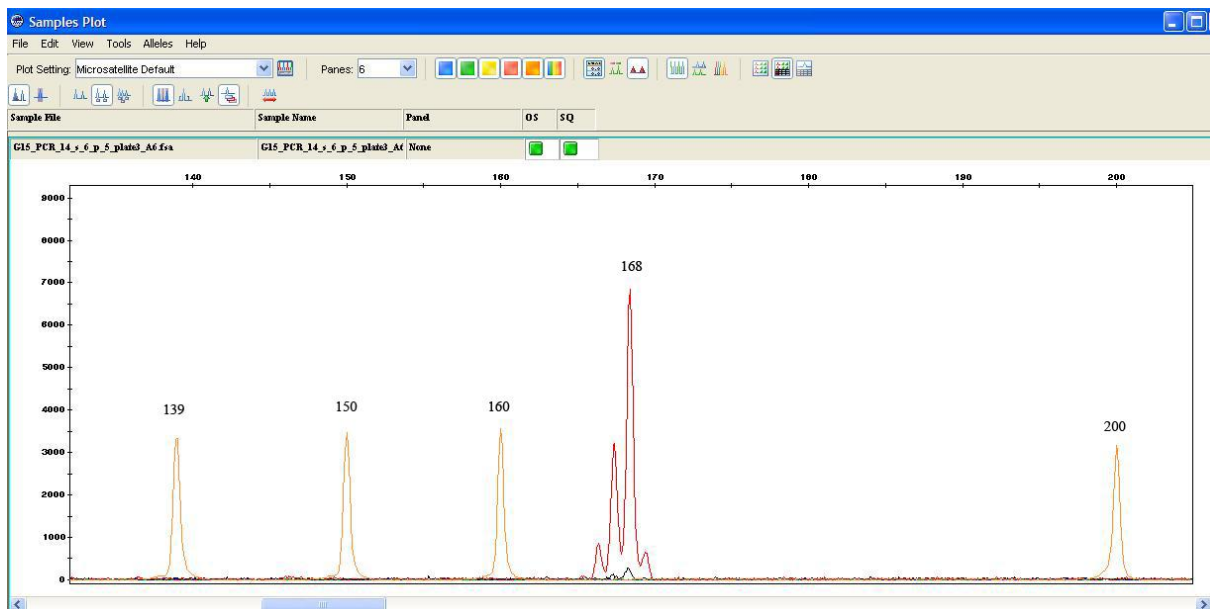
Slika 7-32. Elektroferogram cpSSR Pt30204 *P. nigra* ssp. *nigra* (Zmajevački potok: uzorak Z5)



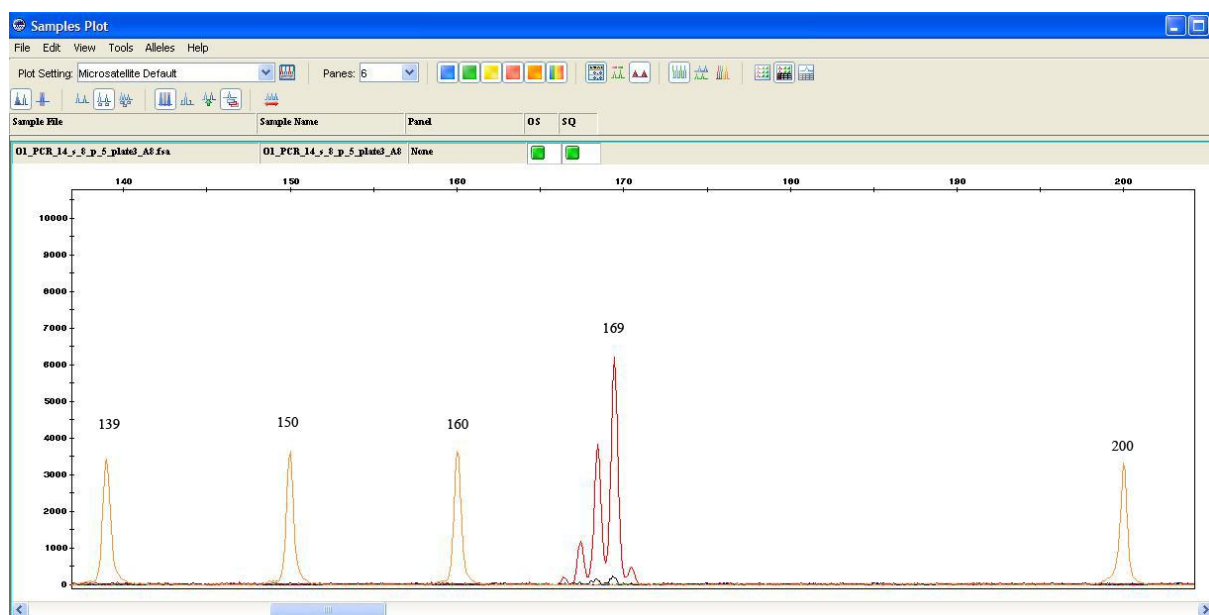
Slika 7-33. Elektroferogram cpSSR Pt30204 *P. nigra* var. *gocensis* (Priboj: uzorak P8)



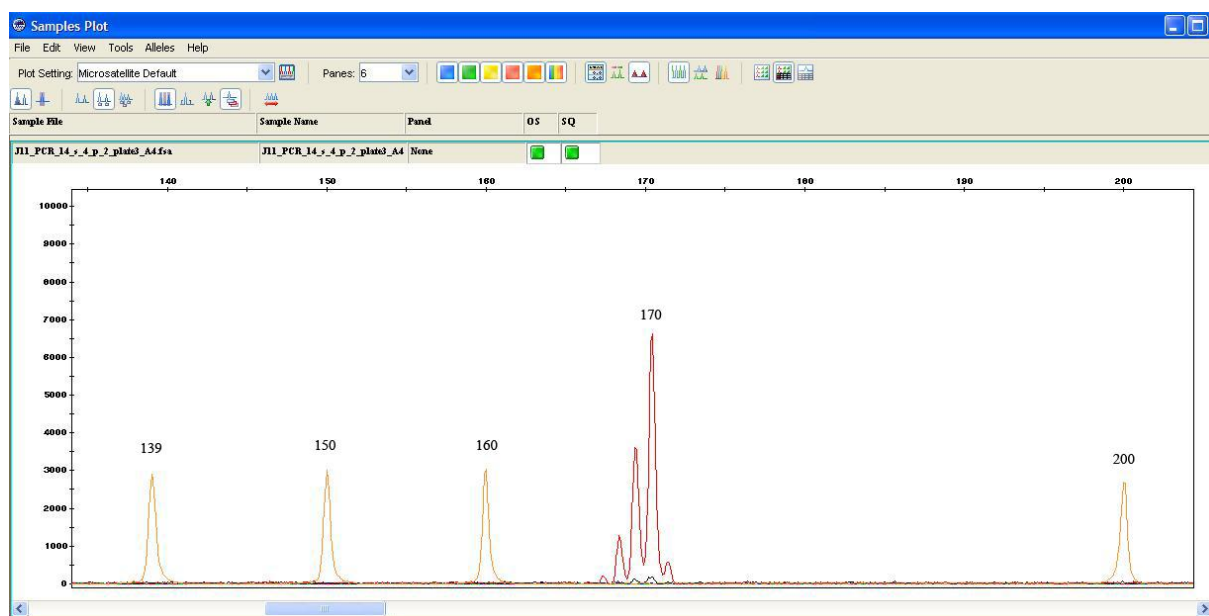
Slika 7-34. Elektroferogram cpSSR Pt87268 *P. nigra* ssp. *nigra* (Banjska stena: uzorak B12)



Slika 7-35. Elektroferogram cpSSR Pt87268 *P. nigra* var. *gocensis* (Goč: uzorak G15)



Slika 7-36. Elektroferogram cpSSR Pt87268 *P. nigra* ssp. *nigra* (Omar: uzorak O1)



Slika 7-37. Elektroferogram cpSSR Pt87268 *P. nigra* ssp. *pallasiana* (Jarešnik: uzorak J11)

PRILOG VIII – Prikaz poravnatih mitohondrijalnih DNK sekvenci nekodirajućeg regiona *nad7* intron1

Species/Abbrv	*****
1. B1 ssp nigra	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
2. B2 ssp nigra	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
3. O8 ssp nigra	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
4. O9 ssp nigra	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
5. O10 ssp nigra	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
6. O11 ssp nigra	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
7. O12 ssp nigra	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
8. Z1 ssp nigra	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
9. Z5 ssp nigra	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
10. Z9 ssp nigra	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
11. P1 var gocensis	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
12. P4 var gocensis	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
13. P5 var gocensis	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
14. P6 var gocensis	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
15. P7 var gocensis	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
16. G2 var gocensis	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
17. G3 var gocensis	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
18. G4 var gocensis	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
19. G6 var gocensis	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
20. G7 var gocensis	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
21. G15 var gocensis	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
22. J1 ssp pallasiana	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
23. J3 ssp pallasiana	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
24. J7 ssp pallasiana	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
25. J8 ssp pallasiana	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
26. J9 ssp pallasiana	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
27. J11 ssp pallasiana	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
28. J15 ssp pallasiana	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
29. L1 var banatica	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
30. L2 var banatica	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
31. L3 var banatica	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
32. L4 var banatica	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
33. L5 var banatica	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
34. L6 var banatica	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
35. L8 var banatica	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
36. HQ185288 Pinus nigra H1	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
37. HQ185287 Pinus nigra H2	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
38. HQ185289 Pinus nigra H3	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
39. HQ185286 Pinus nigra H4	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG
40. EU072473 Pinus sylvestris	CTGGGTTTTCTCGAAGAGCGTTGGCGGGTCTTGGAGTGCCCGTCAAGGGCGCGCATACCCCGGGGTGATTATCACCACCTGCACCCACGATCGATCATCTCGGCACAGTGGAACTGTAACTTG

Slika 7-38. Prikaz poravnatih mtDNK sekvenci (*nad7* intron1): 35 (od 104 analiziranih) jedinki *P. nigra* iz Srbije, 3 jedinke iz Španije i 1 jedinka iz Maroka (GeneBank accession HQ185288, HQ185287, HQ185286, HQ185289, Jaramillo-Correa et al., 2010) i 1 jedinka *P. sylvestris* (EU072473, Pyhajarvi et al., 2008)

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Site # 762

with w/o Gaps

[illegible]

Species/Abbrev	*****	*****
1. B1 ssp nigra	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
2. B2 ssp nigra	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
3. O8 ssp nigra	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
4. O9 ssp nigra	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
5. O10 ssp nigra	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
6. O11 ssp nigra	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
7. O12 ssp nigra	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
8. Z1 ssp nigra	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
9. Z5 ssp nigra	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
10. Z9 ssp nigra	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
11. P1 var gocensis	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
12. P4 var gocensis	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
13. P5 var gocensis	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
14. P6 var gocensis	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
15. P7 var gocensis	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
16. G2 var gocensis	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
17. G3 var gocensis	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
18. G4 var gocensis	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
19. G6 var gocensis	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
20. G7 var gocensis	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
21. G15 var gocensis	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
22. J1 ssp pallasiana	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
23. J3 ssp pallasiana	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
24. J7 ssp pallasiana	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
25. J8 ssp pallasiana	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
26. J9 ssp pallasiana	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
27. J11 ssp pallasiana	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
28. J15 ssp pallasiana	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
29. L1 var banatica	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
30. L2 var banatica	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
31. L3 var banatica	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
32. L4 var banatica	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
33. L5 var banatica	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
34. L6 var banatica	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
35. L8 var banatica	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
36. HQ185288 Pinus nigra H1	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
37. HQ185287 Pinus nigra H2	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
38. HQ185289 Pinus nigra H3	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
39. HQ185286 Pinus nigra H4	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC
40. EU072473 Pinus sylvestris	ACTTATTTGAGAGGGGGGCCGCATCGATTGGAAAGCTCGA-----	CCATCGCCGATTCCCTTTTCC

Site # 956

with

BIOGRAFIJA AUTORA

Zorica Šarac rođena je 03.10.1982. godine u Sarajevu. Osnovnu i srednju školu završila je sa odličnim uspehom u Nišu. Diplomirala je na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu 2007. godine sa prosečnom ocenom 9,77 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Doktorske studije na smeru Eksperimentalna i primenjena botanika Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu upislala je 2007/08. godine. Položila je sve planom i programom predviđene ispite sa prosečnom ocenom 10.

Od 13. 02. 2009. godine zaposlena je kao saradnik u nastavi za naučnu oblast Botanika, na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu. Dana 23.02.2011. godine izabrana je u zvanje asistenta za istu naučnu oblast. Tokom ovog perioda izvodila je praktičnu nastavu iz predmeta: "Sistematika viših biljaka", "Principi laboratorijskog rada u biologiji", "Metodologija eksperimentalnog rada u biologiji", "Terenska istraživanja u biologiji 1" (Osnovne akademske studije BIOLOGIJA), "Sistematika i ekologija lekovitih biljaka", "Sekundarni metaboliti biljaka" i "Metodologija naučno-istraživačkog rada" (Master akademske studije BIOLOGIJA i Master akademske studije EKOLOGIJA I ZAŠTITA PRIRODE).

Tokom 2008. godine pohađala je letnju školu masene spektroskopije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu, kao i školu tečne hromatografije na Hemijskom fakultetu u Beogradu. Učestvovala je u organizaciji 9, 10. i 11. Simpozijuma o flori jugoistočne Srbije i susednih regiona, održanih 2007, 2010. i 2013. godine. Kao član biološkog društva "Dr Sava Petrović" učestvovala je u mnogim akcijama vezanim za zaštitu i očuvanje životne sredine.

Od 2011. godine angažovana u realizaciji naučno-istraživačkog projekta pod nazivom: "Mikromorfološka, fitohemijska, molekularna i istraživanja biljaka – sistemski, ekološki i primenjeni aspekti", koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije (program osnovnih istraživanja MNP Ev. br. 173029).

Tokom dosadašnjeg rada autor je i koautor nekoliko naučnih radova objavljenih u zemlji i inostranstvu. Učestvovala je na više međunarodnih i nacionalnih naučnih skupova, gde je saopštavala rezultate svojih istraživanja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Зорица С. Шарац

број индекса ЕВ 070010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

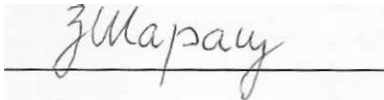
Утврђивање варијабилности и диференцијације природних популација

***Pinus nigra* Arnold у Србији коришћењем фитохемијских и молекуларних
маркера**

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

Потпис докторанда

У Београду, 11.08.2014.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Z. Šarac', is written over a horizontal line.

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора: Зорица Шарац

Број уписа: ЕВ 070010

Студијски програм: Експериментална и примењена ботаника

Наслов рада: Утврђивање варијабилности и диференцијације природних популација *Pinus nigra* Arnold у Србији коришћењем фитохемијских и молекуларних маркера

Ментори: др Петар Д. Марин и др Срђан Бојовић

Потписана Зорица С. Шарац

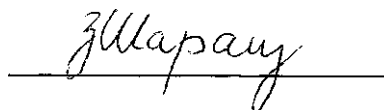
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 11.08.2014.

Handwritten signature of Z. Šarac in black ink, written over a horizontal line.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Утврђивање варијабилности и диференцијације природних популација *Pinus nigra* Arnold у Србији коришћењем фитохемијских и молекуларних маркера

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство - некомерцијално - без прераде

4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима

5. Ауторство - без прераде

6. Ауторство - делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 11.08.2014.

