



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ



**Јелена С. Николић**

**МОРФО-АНАТОМСКА И ФИТОХЕМИЈСКА  
ВАРИЈАБИЛНОСТ РОДА *ABIES* MILL.  
(PINACEAE) НА БАЛКАНСКОМ  
ПОЛУОСТРВУ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Текст ове докторске дисертације ставља се на увид јавности,  
у складу са чланом 30., став 8. Закона о високом образовању  
("Сл. гласник РС", бр. 76/2005, 100/2007 – аутентично тумачење, 97/2008, 44/2010,  
93/2012, 89/2013 и 99/2014)

**НАПОМЕНА О АУТОРСКИМ ПРАВИМА:**

Овај текст сматра се рукописом и само се саопштава јавности (члан 7. Закона о ауторским  
и сродним правима, "Сл. гласник РС", бр. 104/2009, 99/2011 и 119/2012).

**Ниједан део ове докторске дисертације не сме се користити ни у какве сврхе,  
осим за упознавање са њеним садржајем пре одбране дисертације.**

Ниш, 2023.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



**Jelena S. Nikolić**

**MORPHO-ANATOMICAL AND  
PHYTOCHEMICAL VARIABILITY OF  
GENUS *ABIES* MILL. (PINACEAE) IN THE  
BALKAN PENINSULA**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2023.

МЕНТОР:

**др Зорица Митић, ванредни професор**

*Универзитет у Нишу*

*Природно-математички факултет*

*Департман за биологију и екологију*

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

**др Бојан Златковић, редовни професор**

*Универзитет у Нишу*

*Природно-математички факултет*

*Департман за биологију и екологију*

**др Марина Јушковић, редовни професор**

*Универзитет у Нишу*

*Природно-математички факултет*

*Департман за биологију и екологију*

**др Снежана Јевтовић, ванредни професор**

*Универзитет у Нишу*

*Природно-математички факултет*

*Департман за хемију*

**др Биљана Николић, научни саветник**

*Институт за шумарство у Београду*

*Одељење за оплемењивање, семенарство и расадничарство*



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
НИШ**

**КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА**

Редни број, <b>РБР:</b>	
Идентификациони број, <b>ИБР:</b>	
Тип документације, <b>ТД:</b>	Монографска
Тип записа, <b>ТЗ:</b>	текстуални / графички
Врста рада, <b>ВР:</b>	докторска дисертација
Аутор, <b>АУ:</b>	Јелена С. Николић
Ментор, <b>МН:</b>	Зорица С. Митић
Наслов рада, <b>НР:</b>	Морфо-анатомска и фитохемијска варијабилност рода <i>Abies</i> Mill. (Pinaceae) на Балканском полуострву
Језик публикације, <b>ЈП:</b>	Српски
Језик извода, <b>ЈИ:</b>	Српски/енглески
Земља публикавања, <b>ЗП:</b>	Србија
Уже географско подручје, <b>УГП:</b>	Србија
Година, <b>ГО:</b>	2023.
Издавач, <b>ИЗ:</b>	ауторски репринт
Место и адреса, <b>МА:</b>	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, <b>ФО:</b>	8 поглавља, 200 страна, 225 цитата, 55 слика, 19 табела
Научна област, <b>НО:</b>	Биологија
Научна дисциплина, <b>НД:</b>	Ботаника
Кључне речи, <b>ПО:</b>	<i>Abies alba</i> , <i>A. x borisii-regis</i> , <i>A. cephalonica</i> , Pinaceae, Балканско полуострво, морфо-анатомија, микроморфологија, HS испарљиве компоненте, старска уља, кутикуларни воскови, мултиваријационе анализе, варијабилност, диференцијација, хемотаксономија
<b>УДК</b>	581.4 + 582.475 (4-924.64)(043.3) 577.3 + 582.475 (4-924.64)(043.3)
Чува се, <b>ЧУ:</b>	Библиотека
Важна напомена, <b>ВН:</b>	
Извод, <b>ИЗ:</b>	У овој докторској дисертацији анализирана је морфо-анатомска и фитохемијска варијабилност и диференцијација 19 аутохтоних популација <i>Abies alba</i> , <i>A. x borisii-regis</i> и <i>A. cephalonica</i> из претпостављене зоне природне хибридизације на Балканском полуострву. С обзиром да је један од показатеља присуства хибридне зоне клинално варирање свих или већег броја карактеристика на географском подручју између вредности типичних за сваку од две врсте, уочена географска дистрибуција морфо-анатомских и хедсепјс (HS) испарљивих профила у овој студији подржава хипотезу да су <i>A. alba</i> и <i>A. cephalonica</i> доживеле секундарни контакт током последњег глацијалног максимума. На основу статистичких униваријационих анализа морфо-анатомских и фитохемијских маркера, утврђене су јасне разлике између источне генетичке лозе <i>A. alba</i> и <i>A. cephalonica</i> , али нестабилне карактеристике за <i>A. x borisii-regis</i> . Мултиваријационе анализе показале су јасну диференцијацију популација <i>A. alba</i> и <i>A. cephalonica</i> на нивоу морфо-анатомских карактеристика и HS испарљивих компоненти, док варијабилност компоненти воскова није успела да подржи диференцијацију популација родитељских врста. Поред тога, приказани резултати указали су на хибридни статус 10 проучаваних популација у оквиру шире прелазне зоне између <i>A. alba</i> и <i>A. cephalonica</i> (јужна и југозападна Бугарска, крајњи југ Северне Македоније и готово цела Грчка). Све хибридне популације требало би укључити у конзервационе пројекте будући да генетичка конституција полиморфних <i>Abies</i> популација може да садржи корисне податке о генетичким варијацијама неопходним за суочавање са будућим еколошким изазовима у овој области. Такође, присуство <i>A. x borisii-regis</i> јединки на скоро читавој територији Грчке, чак и у претпостављеним чистим <i>A. cephalonica</i> популацијама на Пелопонезу, захтева хитне мере конзервације <i>A. cephalonica</i> обзиром на ендемски статус овог таксона.
Датум прихватања теме, <b>ДП:</b>	31.05.2021.
Датум одбране, <b>ДО:</b>	
Чланови комисије, <b>КО:</b>	<p>Председник: др Бојан Златковић, редовни професор</p> <p>Члан: др Марина Јушковић, редовни професор</p> <p>Члан: др Снежана Јевтовић, ванредни професор</p> <p>Члан: др Биљана Николић, научни саветник</p> <p>Члан, ментор: др Зорица Митић, ванредни професор</p>





**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
НИШ**

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number, <b>ANO</b> :											
Identification number, <b>INO</b> :											
Document type, <b>DT</b> :	monograph										
Type of record, <b>TR</b> :	textual / graphic										
Contents code, <b>CC</b> :	doctoral dissertation										
Author, <b>AU</b> :	Jelena S. Nikolić										
Mentor, <b>MN</b> :	Zorica S. Mitić										
Title, <b>TI</b> :	Morpho-anatomical and phytochemical variability of genus <i>Abies</i> Mill. (Pinaceae) in the Balkan Peninsula										
Language of text, <b>LT</b> :	Serbian										
Language of abstract, <b>LA</b> :	English										
Country of publication, <b>CP</b> :	Serbia										
Locality of publication, <b>LP</b> :	Serbia										
Publication year, <b>PY</b> :	2023										
Publisher, <b>PB</b> :	author's reprint										
Publication place, <b>PP</b> :	Niš, Višegradska 33.										
Physical description, <b>PD</b> :	8 chapters, 200 pages, 225 references, 55 figures, 19 tables										
Scientific field, <b>SF</b> :	Biology										
Scientific discipline, <b>SD</b> :	Botany										
Subject/Key words, <b>S/KW</b> :	<i>Abies alba</i> , <i>A. x borisii-regis</i> , <i>A. cephalonica</i> , Pinaceae, Balkan peninsula, morpho-anatomy, micromorphology, HS volatiles, essential oils, cuticular waxes, multivariate analysis, variability, differentiation, chemotaxonomy										
<b>UC</b>	581.4 + 582.475 (4-924.64)(043.3) 577.3 + 582.475 (4-924.64)(043.3)										
Holding data, <b>HD</b> :	library										
Note, <b>N</b> :											
Abstract, <b>AB</b> :	This doctoral dissertation deals with morpho-anatomical and phytochemical variability and differentiation in <i>Abies alba</i> , <i>A. x borisii-regis</i> and <i>A. cephalonica</i> , using 19 native populations from the assumed hybrid zone in the Balkan Peninsula. The observed clinal pattern in the distribution of morpho-anatomical and phytochemical variation over the broader transition zone between <i>A. alba</i> and <i>A. cephalonica</i> supported the hypothesis that these two species experienced secondary contact following the main range shifts throughout the climatic oscillations of the Pleistocene. Based on univariate statistical analyses of morpho-anatomical and phytochemical markers, we determined clear differences between the eastern <i>A. alba</i> lineage and <i>A. cephalonica</i> , but unstable characteristics of <i>A. x borisii-regis</i> . The multivariate analyses revealed sharp differentiation between populations of <i>Abies alba</i> and <i>A. cephalonica</i> at the level of morpho-anatomical characteristics and headspace (HS) volatiles, while variability of wax compounds entirely failed in supporting delineation of populations of parent species. In addition, the obtained results indicated that 10 of the studied populations may be hybridogenous within a wider geographical area (southwestern and southern Bulgaria, southernmost North Macedonia and almost the entire Greece). All hybrid populations should be included in conservation projects, as the genetic constitution of these polymorphic fir populations may contain useful genetic variation necessary for survival regarding the future environmental challenges in this area.										
Accepted by the Scientific Board on, <b>ASB</b> :	May 31, 2021										
Defended on, <b>DE</b> :											
Defended Board, <b>DB</b> :	<table border="1"> <tr> <td>President:</td> <td>PhD Bojan Zlatković, Full Professor</td> </tr> <tr> <td>Member:</td> <td>PhD Marina Jušković, Full Professor</td> </tr> <tr> <td>Member:</td> <td>PhD Snežana Jevtović, Associate Professor</td> </tr> <tr> <td>Member:</td> <td>PhD Biljana Nikolić, Full Research Professor</td> </tr> <tr> <td>Member, Mentor:</td> <td>PhD Zorica Mitić, Associate Professor</td> </tr> </table>	President:	PhD Bojan Zlatković, Full Professor	Member:	PhD Marina Jušković, Full Professor	Member:	PhD Snežana Jevtović, Associate Professor	Member:	PhD Biljana Nikolić, Full Research Professor	Member, Mentor:	PhD Zorica Mitić, Associate Professor
President:	PhD Bojan Zlatković, Full Professor										
Member:	PhD Marina Jušković, Full Professor										
Member:	PhD Snežana Jevtović, Associate Professor										
Member:	PhD Biljana Nikolić, Full Research Professor										
Member, Mentor:	PhD Zorica Mitić, Associate Professor										

## Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	др Зорица Митић, ванредни професор, Универзитет у Нишу, Природно-математички факултет, Департман за биологију и екологију
Наслов:	Морфо-анатомска и фитохемијска варијабилност рода <i>Abies</i> Mill. (Pinaceae) на Балканском полуострву
Резиме:	<p>У овој докторској дисертацији анализирана је морфо-анатомска и фитохемијска варијабилност и диференцијација 19 аутохтоних популација <i>Abies alba</i>, <i>A. x borisii-regis</i> и <i>A. cephalonica</i> из претпостављене зоне природне хибридизације на Балканском полуострву. С обзиром да је један од показатеља присуства хибридне зоне клинално варирање свих или већег броја карактеристика на географском подручју између вредности типичних за сваку од две врсте, уочена географска дистрибуција морфо-анатомских и хедспејс (HS) испарљивих профила у овој студији подржава хипотезу да су <i>A. alba</i> и <i>A. cephalonica</i> доживеле секундарни контакт током последњег глацијалног максимума. На основу статистичких униваријационих анализа морфо-анатомских и фитохемијских маркера, утврђене су јасне разлике између источне генетичке лозе <i>A. alba</i> и <i>A. cephalonica</i>, али нестабилне карактеристике за <i>A. x borisii-regis</i>. Мултиваријационе анализе показале су јасну диференцијацију популација <i>A. alba</i> и <i>A. cephalonica</i> на нивоу морфо-анатомских карактеристика и HS испарљивих компоненти, док варијабилност компоненти воскова није успела да подржи диференцијацију популација родитељских врста. Поред тога, приказани резултати указали су на хибридни статус 10 проучаваних популација у оквиру шире прелазне зоне између <i>A. alba</i> и <i>A. cephalonica</i> (јужна и југозападна Бугарска, крајњи југ Северне Македоније и готово цела Грчка). Све хибридне популације требало би укључити у конзервационе пројекте будући да генетичка конституција полиморфних <i>Abies</i> популација може да садржи корисне податке о генетичким варијацијама неопходним за суочавање са будућим еколошким изазовима у овој области. Такође, присуство <i>A. x borisii-regis</i> јединки на скоро читавој територији Грчке, чак и у претпостављеним чистим <i>A. cephalonica</i> популацијама на Пелопонезу, захтева хитне мере конзервације <i>A. cephalonica</i> обзиром на ендемски статус овог таксона.</p>
Научна област:	Биологија
Научна дисциплина:	Ботаника

Кључне речи:	<i>Abies alba</i> , <i>A. x borisii-regis</i> , <i>A. cephalonica</i> , Pinaceae, Балканско полуострво, морфо-анатомија, микроморфологија, HS испарљиве компоненте, етарска уља, кутикуларни воскови, мултиваријационе анализе, варијабилност, диференцијација, хемотаксономија
УДК:	581.4 + 582.475 (4-924.64)(043.3) 577.3 + 582.475 (4-924.64)(043.3)
CERIF класификација:	В 004 Ботаника, В 191 Биохемија биљака, В 290 Систематска ботаника, таксономија, морфологија, фитогеографија, хемотаксономија, физиологија неваскуларних биљака
Тип лиценце Креативне заједнице:	<b>CC BY-NC-ND</b>

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor: PhD Zorica Mitić, Associate professor, University of Niš, Faculty of Sciences and Mathematics, Department of Biology and Ecology

Title: Morpho-anatomical and phytochemical variability of genus *Abies* Mill. (Pinaceae) in the Balkan Peninsula

Abstract: This doctoral dissertation deals with morpho-anatomical and phytochemical variability and differentiation in *Abies alba*, *A. x borisii-regis* and *A. cephalonica*, using 19 native populations from the assumed hybrid zone in the Balkan Peninsula. The observed clinal pattern in the distribution of morpho-anatomical and phytochemical variation over the broader transition zone between *A. alba* and *A. cephalonica* supported the hypothesis that these two species experienced secondary contact following the main range shifts throughout the climatic oscillations of the Pleistocene. Based on univariate statistical analyses of morpho-anatomical and phytochemical markers, we determined clear differences between the eastern *A. alba* lineage and *A. cephalonica*, but unstable characteristics of *A. x borisii-regis*. The multivariate analyses revealed sharp differentiation between populations of *Abies alba* and *A. cephalonica* at the level of morpho-anatomical characteristics and headspace (HS) volatiles, while variability of wax compounds entirely failed in supporting delineation of populations of parent species. In addition, the obtained results indicated that 10 of the studied populations may be hybridogenous within a wider geographical area (southwestern and southern Bulgaria, southernmost North Macedonia and almost the entire Greece). All hybrid populations should be included in conservation projects, as the genetic constitution of these polymorphic fir populations may contain useful genetic variation necessary for survival regarding the future environmental challenges in this area.

Scientific Field: Biology  
 Scientific Discipline: Botany

Key Words: *Abies alba*, *A. x borisii-regis*, *A. cephalonica*, Pinaceae, Balkan peninsula, morpho-anatomy, micromorphology, HS volatiles, essential oils, cuticular waxes, multivariate analysis, variability, differentiation, chemotaxonomy

UDC: 581.4 + 582.475 (4-924.64)(043.3)  
 577.3 + 582.475 (4-924.64)(043.3)

CERIF  
Classification:

B 004 Botany, B 191 Plant biochemistry, B 290 Systematic botany,  
taxonomy, morphology, phytogeography, chemotaxonomy.  
Physiology of nonvascular plants

Creative  
Commons  
License Type:

**CC BY-NC-ND**

*Највећу захвалност дугујем свом ментору, проф. др Зорици Митић са Департмана за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Нишу, на предусретљивости, разумевању и помоћи у свим етапама израде ове дисертације.*

*Посебно се захваљујем и члановима комисије, проф. др Бојану Златковићу, проф. др Марини Јушковић, проф. др Снежани Јевтовић и научном саветнику др Биљани Николић на многобројним саветима и сугестијама који су значајно допринели квалитету дисертације.*

*Захвалност желим да изразим и проф. др Владимиру Ранђеловићу са Департмана за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Нишу, на помоћи у сакупљању биљног материјала.*

*Од великог значаја за израду ове дисертације била је и стручна помоћ проф. др Гордане Стојановић са Департмана за хемију Природно-математичког факултета у Нишу, којој се овом приликом захваљујем.*

*Захвалност дугујем и проф. др Миодрагу Борђевићу са Департмана за математику Природно-математичког факултета у Нишу, на сугестијама и помоћи у статистичкој обради резултата.*

*Најсрдачније се захваљујем дипл. инж. Мирославу Миљковићу из Лабораторије за електронску микроскопију Медицинског факултета у Нишу, на драгоцену помоћ и одвојеном времену за микроморфолошке анализе.*

*Захваљујем се и научном сараднику др Димитрији Савић Здравковић са Департмана за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Нишу, на изради илустрација које прате ову докторску дисертацију.*

*Бескрајну захвалност дугујем својој породици, веренику и пријатељима који су ми на све начине помагали уз неизмерну љубав и подршку.*

## ОЗНАКЕ И СКРАЋЕНИЦЕ

### Номенклатура

ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i> (АТР-везујући касетни транспортери)
ACP	<i>Acyl Carrier Protein</i> (протеин носач ацил-групе)
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i> (аденозин-трифосфат)
CoA, CoASH	<i>Coenzyme A</i> (коензим А)
NADP	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i> (никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат)
TPP	<i>Thiamine Pyrophosphate</i> (тиамин-дифосфат)
<i>n</i>	нормални низ
<i>o, p</i>	<i>orto-</i> и <i>para-</i> префикси
<i>E</i>	<i>Entgegen</i> (стереодескриптор)
<i>Z</i>	<i>Zusammen</i> (стереодескриптор)

### Хроматографија и масена спектрометрија

AMDIS	<i>Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System</i> (аутоматизовани систем за идентификацију и деконволуцију масених спектра)
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (гасна хроматографија-масена спектрометрија)
HS	<i>Headspace</i> (хедспејс)
RI	<i>Retention Index</i> (ретенциони индекс)
Rt	<i>Retention Time</i> (ретенционо време)

### Статистика

Avg	<i>Average</i> (средња вредност)
Max	<i>Maximum</i> (максимум)
Min	<i>Minimum</i> (минимум)
SD	<i>Standard Deviation</i> (стандардна девијација)
CV	<i>Coefficient of Variation</i> (кофицијент варијације)
<i>p</i>	значајност статистичког теста

<i>r</i>	коэффициент корелације
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (анализа варијансе)
CDA	<i>Canonical Discriminant Analysis</i> (канонијска дискриминантна анализа)
CAs	<i>Canonical Axes</i> (канонијске осе)
CA	<i>Cluster Analysis</i> (кластер анализа)

### Биоклиматски параметри

BIO1	средња годишња температура
BIO2	средњи дневни опсег (средња вредност разлике температурних минимума и максимума у току месеца)
BIO3	изотермалност (BIO2/ BIO7)*100
BIO4	температурна сезоналност (стандардна девијација * 100)
BIO5	највиша температура најтоплијег месеца
BIO6	најмања температура најхладнијег месеца
BIO7	температурни опсег (BIO5-BIO6)
BIO8	средња температура највлажнијег квартала
BIO9	средња температура најсувљег квартала
BIO10	средња температура најтоплијег квартала
BIO11	средња температура најхладнијег квартала
BIO12	укупне годишње падавине
BIO13	укупне падавине у највлажнијем месецу
BIO14	укупне падавине у најсушнијем месецу
BIO15	сезоналност падавина
BIO16	укупне падавине у највлажнијем кварталу
BIO17	укупне падавине у најсушнијем кварталу
BIO18	укупне падавине у најтоплијем кварталу
BIO19	укупне падавине у најхладнијем кварталу

### Опште скраћенице

DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (дезоксирибонуклеинска киселина)
-----	---



---

mtDNA	<i>Mitochondrial DNA</i> (митохондријална DNA)
cpDNA	<i>Chloroplast DNA</i> (хлоропластна DNA)
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (једнонуклеотидни полиморфизам)
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> (скенирајућа електронска микроскопија)
LGM	<i>Last Glacial Maximum</i> (последњи глацијални максимум)
IBD	<i>Isolation by Distance</i> (изолација путем дистанце)
UV	<i>UltraViolet</i>
WFO	<i>World Flora Online</i>
HMN	<i>Herbarium Moesiacum Niš</i>

## САДРЖАЈ

1. УВОД .....	1
2. ОПШТИ ДЕО .....	4
2.1. Род <i>Abies</i> Mill. (јеле) .....	5
2.1.1. Еволуција источно медитеранских јела.....	9
2.1.2. <i>Abies alba</i> Mill. (јела, обична јела).....	11
2.1.3. <i>Abies cephalonica</i> Loudon (грчка јела).....	21
2.1.4. <i>Abies x borisii-regis</i> Mattf. (јела краља Бориса, бугарска јела).....	29
2.2. Терпени .....	36
2.2.1. Монотерпени .....	36
2.2.2. Сесквитерпени.....	37
2.2.3. Биосинтеза .....	38
2.2.4. Етарска уља .....	43
2.2.5. Методе изоловања испарљивих терпена .....	44
2.2.6. Биолошка улога.....	46
2.2.7. Варијабилност и употреба терпена у таксономским истраживањима.....	47
2.3. Кутикуларни воскови.....	49
2.3.1. Биосинтеза .....	50
2.3.2. Микроморфологија епикуткуларних воскова.....	53
2.3.3. Повезаност између хемијског састава и микроморфологије епикуткуларних воскова .....	55
2.3.4. Биолошка улога.....	57
2.3.5. Варијабилност и употреба компоненти кутикуларних воскова у таксономским истраживањима .....	58
3. ЦИЉЕВИ РАДА.....	60
4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....	63
4.1. Биљни материјал .....	64
4.2. Абиотички еколошки параметри .....	69
4.3. Морфо-анатомска анализа.....	70
4.4. Фитохемијска анализа.....	75
4.4.1. Изоловање хедспејс (HS) испарљивих компоненти .....	75
4.4.2. Изоловање етарских уља.....	75
4.4.3. Гасна хроматографија куплована са масеном спектрометријом (GC-MS) .....	77
4.4.4. Микроморфолошка анализа.....	78

4.4.5. Статистичка анализа.....	79
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	81
5.1. Морфо-анатомске карактеристике .....	82
5.1.1. Варијабилност морфо-анатомских карактеристика четина испитиваних таксона .....	82
5.1.2. Мултиваријационе статистичке анализе (CDA и CA) морфо-анатомских карактеристика четина на популационом нивоу .....	94
5.2. HS испарљиве компоненте .....	100
5.2.1. Варијабилност HS испарљивих компоненти четина испитиваних таксона..	100
5.2.2. Мултиваријационе статистичке анализе (CDA и CA) HS испарљивих компоненти четина на популационом нивоу .....	112
5.2.3. Корелациона анализа.....	117
5.3. Етарска уља.....	119
5.3.1. Варијабилност састава етарског уља гранчица са четинама испитиваних таксона .....	119
5.3.2. Мултиваријациона статистичка анализа (CA) компоненти етарског уља на специјском нивоу .....	124
5.4. Кутикуларни воскови.....	127
5.4.1. Варијабилност компоненти кутикуларних воскова четина испитиваних таксона .....	127
5.4.2. Мултиваријационе статистичке анализе (CDA и CA) компоненти кутикуларних воскова на популационом нивоу .....	135
5.4.3. Мултиваријационе статистичке анализе (CDA и CA) компоненти кутикуларних воскова на специјском нивоу .....	139
5.4.4. Спирманова корелација рангова.....	143
5.4.5. Микроморфологија епикутуларних воскова .....	145
6. ОПШТА ДИСКУСИЈА.....	152
6.1. Диференцијација популација <i>A. alba</i> и <i>A. cephalonica</i> .....	153
6.2. Хибридне популације .....	155
6.3. Диференцијација популација <i>A. alba</i> .....	160
6.4. Диференцијација популација <i>A. cephalonica</i> .....	161
7. ЗАКЉУЧЦИ .....	163
8. ЛИТЕРАТУРА.....	175
БИОГРАФИЈА СА БИБЛИОГРАФИЈОМ.....	196

## **1. УВОД**

Хибридима се сматрају организми настали унакрсном оплодњом јединки различитих врста (Rieseberg & Carney, 1998). Према мало ширем схватању, хибриди представљају потомство јединки из популација „које се разликују на основу једне или више наследних карактеристика“ (Harrison, 1990). Слично, интрогресија се може дефинисати као кретање гена између врста путем повратног укрштања (енгл. *backcrossing*), или шире као трансфер гена између генетски различитих популација (Rieseberg & Carney, 1998). Термин хибрид се углавном односи на један, одређени фенотип. Међутим, ситуација у природи је мало другачија и у једној популацији се углавном среће већи број хибридних фенотипова (Barton & Hewitt, 1985). Хибридни фенотип се може разликовати од оба родитељска таксона, налазити се између њих, или бити сличнији једном од родитеља. Хибридне јединке могу даље да се укрштају и продукују наредне генерације хибрида или могу бити стерилне. Такође, може доћи и до повратног укрштања хибрида са родитељским таксонима чиме они постају сличнији оном родитељском таксону са којим се укрсте.

У почетку се мислило да је хибридизација у природи ретка, и да уколико се и деси нема еволуциони значај јер доводи до настанка стерилних хибрида (Arnold et al., 2001; Burke & Arnold, 2001). Међутим, процеси хибридизације и интрогресије су чести код биљака и процењује се да у њима учествује најмање 25% врста (Mallet, 2005). Ефекти нових комбинација гена, који се успостављају код хибридних јединки, могу се уочити на различитим нивоима и имати различите последице. Неке од последица могу бити: 1) пораст интраспецијског генетичког диверзитета популација које учествују у хибридизацији; 2) настанак нових врста; 3) изумирање врста услед генетичке асимилације; или 4) настанак веома инвазивних генотипова (López-Caamal & Tovar-Sánchez, 2014). Да ли ће последице бити позитивне или негативне зависи од степена генетичке диференцијације родитељских таксона, односно очекивано је да хибриди сроднијих таксона буду вијабилни (Nolte & Tautz, 2010). Међутим, највећи број биљних хибрида одликује хетерозис који подразумева већу бујност раста, фекундитет, отпорност, као и прилагодљивост променама животне средине у поређењу са родитељским таксонима (Janeček & Koblíha, 2007; Xiao et al., 2021).

Са друге стране, репродуктивне баријере су изолациони механизми који спречавају хибридизацију два таксона и јављају се у различитим облицима. Уколико су репродуктивне баријере два таксона који долазе у контакт непотпуне, долази до

формирања хибридних зона. Хибридна зона представља једну или више клина између два таксона који међусобно хибридују, а имају парapatричку дистрибуцију. Дакле, то је ужа област у којој се два таксона срећу, укрштају и продукују хибриде (Barton & Hewitt, 1985). Ове зоне се често називају и зонама секундарног контакта. На пример, до диверзификације је долазило након плеистоценских глацијација када је из рефугијума кретала реколонизација у различитим правцима, што је водило просторној изолацији популација и њиховој даљој специјацији (Hewitt, 2000). Приликом промене услова, изоловани таксони могу доћи поново у контакт и хибридизовати (Barton & Hewitt, 1985; Harrison, 1993).

Услед великог таксономског, еколошког и економског значаја, биљни хибриди се већ дуго налазе у фокусу различитих типова истраживања. Наиме, формирање нових хибридних таксона је од огромног значаја како са таксономског аспекта (идентификација нових таксона), тако и због њихове еколошке и/или економске супериорности у односу на родитељске врсте. С обзиром на значај хибридизације у еволуцији биљака, од велике је важности тачно идентификовати хибридне јединке и/или хибридне популације. Код четинара, природна хибридизација је релативно честа појава (10 хибридних врста је препознато у „*A Handbook of the World's Conifers*“ (Farjon, 2010), при чему је до појаве хибрида углавном долазило услед секундарног контакта између претходно алопатричних врста (Bella et al., 2014). У оквиру ареала рода *Abies* постоји неколико хибридних зона, нпр. *A. procera* Rehder x *A. lasiocarpa* (Hook.) Nutt. у Северној Америци, *A. sibirica* Ledeb. x *A. nephrolepis* Maxim. у источној Азији, или *A. cephalonica* Loudon x *A. nordmanniana* (Steven) Spach у Турској (Klaehn & Winieski, 1962). Са европског становишта, најинтересантнија хибридна зона налази се на југу Балканског полуострва, односно на контакту ареала *A. alba* Mill. и *A. cephalonica* (Volekova et al., 2014).

## **2. ОПШТИ ДЕО**

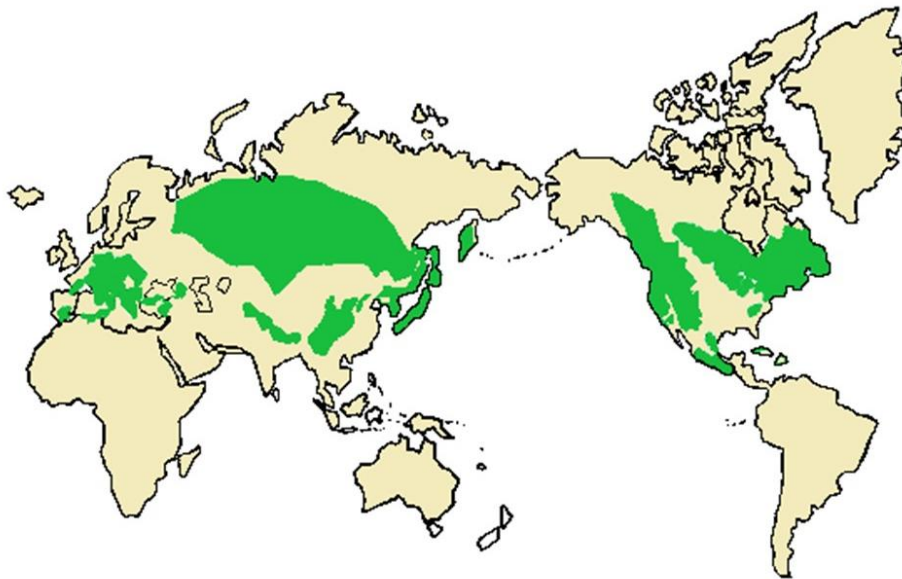
## 2.1. Род *Abies* Mill. (јеле)

Род *Abies* Mill. (јеле) други је по величини род фамилије Pinaceae, кога је први пут као засебан таксон описао енглески ботаничар Phillip Miller 1754. године (Gradečki-Roštenjak, 2010). Биогеографија рода, као и динамика његове специјације и дисперзије представљају комплексан процес који је укључивао интерконтинеталне миграције, изумирања и брзе диверзификације (Aguirre-Planter et al., 2012; Xiang et al., 2015; Semerikova & Semerikov, 2016). Данас су представници рода *Abies* значајне врсте тамних четинарских шума северне хемисфере са три главна подручја дистрибуције (слика 2-1): 1) источна Азија (25-27 врста); 2) Северна и Централна Америка (17-19 врста); и 3) јужна Европа и Медитеран са Кавказом (8-10 врста; Matsenko, 1964; Liu, 1971; Farjon & Ruskhforth, 1989; Sánchez-Robles et al., 2014; Semerikova & Semerikov, 2016). Иако је дистрибуција рода претежно везана за северну хемисферу, неколико представника се јавља на високим планинама суптропских области (Xiang et al., 2007). Вертикална дистрибуција рода креће се од нивоа мора до висине од 4700 m. Због потребе за умерено хладним и влажним окружењем, на мањим географским ширинама јеле се јављају на већим надморским висинама и обрнуто (Xiang et al., 2007). Углавном су алопатричне врсте, мада се у западном делу Северне Америке, Јапану и Медитерану јављају и симпатричне врсте (Klaehn & Winieski, 1962).

Јеле су зимзелено, једнодомо, високо дрвеће, пирамидалне крошње; гране у пршљеновима; гранчице углавном нису висеће; избојци глатки, пупољци обично смоласти, округласти или јајолики до вретенасти. Четине већином дворедне, често поређане око избојака или смештене попут четке на горњој страни избојка, већином пљоснате, са горње стране тамнозелене, а са доње стране са две плавкасте или беле пруге стоминих отвора, понекад се стоме јављају и са горње стране; за анатомску грађу четина карактеристичан је облик попречног пресека, положај проводних снопића, као и број и положај смоних канала. Четине могу бити без смоних канала, са два или ређе са четири смона канала која су обично маргинално, а ређе медијално смештена. Четине на доњем крају, којим належу на гранчицу, кружно проширене; после опадања четина, гранчице готово глатке, са округластим траговима у нивоу коре. Мушки стробилуси (микростробилуси) су ресолики, јављају се у пазуху горњих четина прошлогодишње



гранчице; поленова зрна имају по два крилца. Женски стробилуси (макростробилуси, шишарке) на прошлогодишњим гранчицама усправне. Састоје се од многобројних плодних љуспи на којима се налазе по два семена заметка; стерилне љуспе често дуже од плодних, разне су дужине, уске и кожасте. Зреле шишарке такође усправно стојеће; распадају се на дрвету; Семе је са смоним кесицама, окриљено; котиледона 4-8 (Vidaković, 1991; Jovanović, 1992).



Слика 2-1. Дистрибуција рода *Abies* (прилагођено према The Gymnosperm Database-<https://www.conifers.org/pi/Abies.php>).

Савремене класификационе шеме рода *Abies* су неконзистентне и разликују се по броју врста који варира између 48 и 59 (Liu, 1971; Farjon & Rushforth, 1989). Према подацима *World Flora Online* (WFO, 2023), род *Abies* укључује 52 врсте. До значајних разлика између бројних класификационих приступа дошло је услед великог специјског диверзитета, што овај род чини таксономски врло сложеном групом (Liu, 1971). Велики специјски диверзитет сматра се последицом широке географске дистрибуције, дуговечности, могућности хибридације, као и разноврсности еколошких станишта на којима се представници овог рода јављају (Liu, 1971; Kormutak, 1985; Vidaković, 1991). На основу морфолошких карактеристика, Farjon и Rushforth (1989) поделили су род *Abies* на 10 секција (табела 2-1).

Табела 2-1. Класификација рода *Abies* (Farjon & Rushforth, 1989).

<b>Секција <i>Abies</i>:</b> <i>A. alba</i> , <i>cephalonica</i> , <i>nordmanniana</i> (subsp. <i>equi-trojani</i> ), <i>nebrodensis</i> , <i>cilicica</i> , <i>x borisii-regis</i> .
<b>Секција <i>Piceaster</i>:</b> <i>A. pinsapo</i> (var. <i>marocana</i> , var. <i>tazaotana</i> ), <i>numidica</i> .
<b>Секција <i>Bracteata</i>:</b> <i>A. bracteata</i> .
<b>Секција <i>Momi</i>, Подсекција <i>Homolepides</i>:</b> <i>A. homolepis</i> (var. <i>umbellata</i> ), <i>recurvata</i> (var. <i>ernestii</i> ); <b>Подсекција <i>Firmae</i>:</b> <i>A. firma</i> , <i>A. beshanzuensis</i> ; <b>Подсекција <i>Holophyllae</i>:</b> <i>A. holophylla</i> , <i>chensiensis</i> (subsp. <i>salouenensis</i> , subsp. <i>yulongxueshanensis</i> ), <i>pindrow</i> (var. <i>brevifolia</i> ), <i>ziyuanensis</i> .
<b>Секција <i>Amabilis</i>:</b> <i>A. amabilis</i> , <i>mariesii</i> .
<b>Секција <i>Pseudopicea</i>, Подсекција <i>Delavayanae</i>:</b> <i>A. delavayi</i> (var. <i>nukiangensis</i> ), <i>fabri</i> (subsp. <i>minensis</i> ), <i>forrestii</i> (var. <i>georgei</i> ), <i>chengii</i> , <i>densa</i> , <i>spectabilis</i> , <i>fargesii</i> (var. <i>sutchuenensis</i> , var. <i>faxoniana</i> ), <i>fanjingshanensis</i> , <i>yuanshaoshanensis</i> ; <b>Подсекција <i>Squamatae</i>:</b> <i>A. squamata</i> .
<b>Секција <i>Balsamea</i>, Подсекција <i>Laterales</i>:</b> <i>A. kawakamii</i> , <i>sibirica</i> , <i>balsamea</i> , <i>lasiocarpa</i> ; <b>Подсекција <i>Medianae</i>:</b> <i>A. sachalinensis</i> (var. <i>mayriana</i> ), <i>koreana</i> , <i>fraseri</i> , <i>nephrolepis</i> , <i>veitchii</i> (var. <i>sikokiana</i> ).
<b>Секција <i>Grandis</i>:</b> <i>A. grandis</i> , <i>concolor</i> , <i>durangensis</i> (var. <i>coahuilensis</i> ), <i>guatemalensis</i> , <i>flinckii</i> .
<b>Секција <i>Oiamel</i>, Подсекција <i>Religiosae</i>:</b> <i>A. religiosa</i> , <i>vejarii</i> , <i>mexicana</i> , <i>colimensis</i> ; <b>Подсекција <i>Hickelianae</i>:</b> <i>A. hickelii</i> (var. <i>oaxacana</i> ).
<b>Секција <i>Nobilis</i>:</b> <i>A. procera</i> , <i>magnifica</i> (var. <i>shastensis</i> ).

Подручје Медитерана настањује осам *Abies* врста које су класификоване у секције *Abies* и *Piceaster* (Farjon & Rushforth, 1989). За представнике секције *Abies* карактеристични су хипостоматични листови, женске шишарке са тупим или оштрим врхом (понекад је врх лептирастог изгледа) и стерилним љуспама које штрче, уназад повијене. Представници секције *Piceaster* имају мање или више амфистоматичне листове, врх женске шишарке је лептирастог изгледа, стерилне љуспе нису штрчеће. Иако се медитеранске јеле одликују значајном морфолошком диференцијацијом, сматра се да су баријере између њих више географске, него генетичке (Moulalis, 1986). Наиме, све медитеранске јеле имају способност међусобног укрштања, што је потврђено у експериментима контролисане хибридизације приликом којих су настали вијабилни и фертилни хибриди (Greguss & Paule, 1988).

Молекуларни подаци указали су да је род *Abies* монофилетски, настао током касне креде на подручју северне Евроазије. Наиме, најстарији фосил из касне креде пронађен је у западном Сибиру (Xiang et al., 2009; Valao et al., 2020). Према Xiang и сар. (2007), род се најпре проширио на Северну Америку преко Беринговог копненог моста, а затим је током еоцена стигао у Европу са истока Северне Америке, преко Грендланда, Атлантског копненог моста и Исланда. Међутим, на основу истраживања једнонуклеотидног

полиморфизма (SNPs, енгл. *Single Nucleotide Polymorphisms*), Balao и сар. (2020) сматрају да су јеле колонизовале Медитеран са истока, у периоду између еоцена и олигоцена, након чега су се релативно брзо прошириле до његових најзападнијих делова. Опадање генетичког диверзитета јела од истока ка западу медитеранског региона, као и стабилнији палеоеколошки услови у источном делу Медитерана за време последњег глацијалног максимума (LGM, енгл. *Last Glacial Maximum*), такође указују на њихову колонизацију са истока (Fady & Conord, 2010; Alizoti et al., 2011; Conord et al., 2012). Премда је род *Abies* настао још у касној креди (Xiang et al., 2007), дуго времена се сматрало да је до диверзификације медитеранских јела дошло доста касније, тј. да су секције медитеранских јела дивергирале у миоцену, а да се диверзификација врста у оквиру секције *Abies* одиграла у касном плиоцену и раном плеистоцену (Linares, 2011). Ипак, Balao и сар. (2020) указали су на веома рани пулс специјације медитеранских јела на граници између олигоцена и миоцена претходећи ранијим хипотезама милионима година.

На основу фосилних података, утврђено је да су медитеранске јеле имале много ширу дистрибуцију, као и да је постојао већи број врста које су се јављале на местима где их природно више нема (Liu, 1971). Томе сведоче фосили који су пронађени на Централном Масиву у Француској са краја миоцена и почетка плиоцена (Farjon & Filer, 2013). Данас већина медитеранских јела има фрагментисану и ограничену дистрибуцију (Caudullo & Tiner, 2020), при чему око 71% њих представља ендемичне таксоне (Xiang, 2007). Међутим, и поред ограниченог распрострањења и мале величине популација, медитеранске јеле поседују висок ниво генетичке варијабилности упоредљив са осталим четинарима Европе (Scaltsoyiannes et al., 1999; Parducci et al., 2001; Hansen et al., 2005). Генетичка варијабилност, али делом и еколошки услови, узрок су изражене варијабилности њихових морфолошких, анатомских и биохемијских особина (Liu, 1971; Kormutak, 1985; Vidaković, 1991).

Подручје источног Медитерана настањују четири уобичајено прихваћене *Abies* врсте које су сврстане у секцију *Abies* (Farjon & Rushforth, 1989): *A. alba* Mill. (јела, обична јела), *A. cephalonica* Loudon (грчка јела), *A. nordmanniana* (Steven) Spach (понтска, кавкаска јела) и *A. cilicica* (Antoine & Kotschy) Carrière (киликијска јела). Поред тога, описане су и *A. x borisii-regis* Mattf. (јела краља Бориса, бугарска јела), *A. equi-trojani* (Asch. & Sint. ex Boiss.) Mattf. (тројанска јела) и *A. bornmuelleriana* Mattf. (турска јела) чији је таксономски

статус изузетно контроверзан. Према савременим флористичким базама података, *A. x borisii-regis* је препознат као посебна хибридна врста, *A. equi-trojani* се сматра подврстом *A. nordmanniana* (*A. nordmanniana* subsp. *equi-trojani* (Asch. & Sint. ex Boiss.) Coode & Cullen), а *A. bornmuelleriana* само као синоним ове подврсте (Euro+Med, 2006+; WFO, 2023). Од поменутих, три врсте су присутне на Балканском полуострву: *A. alba*, *A. cephalonica* и *A. x borisii-regis*.

### 2.1.1. Еволуција источно медитеранских јела

Палеогеографски подаци говоре у прилог могућем постојању заједничког источно-медитеранског терцијарног претка за данашње егејске врсте јела (Mitsopoulos & Panetsos, 1987). Међутим, месинска климатска криза (Palamarev, 1989) и плиоценска морска трансгресија су вероватно условиле просторно раздвајање предачких популација на две групе, једну на Балканском полуострву, а другу у Малој Азији (Linares, 2011).

Како су садашње источне популације *A. alba* морфолошки и биохемијски сличније *A. nordmanniana* (понтска, кавкаска јела) него *A. cephalonica*, претпоставља се да је *A. alba* настала у Понтском региону (североисточна Турска) током плиоцена (Fady et al., 1992). Овај динамични, нови таксон се затим проширио по целој средњој и западној Европи (Linares, 2011). У прилог овој хипотези говори податак да су плиоценски макрофосили који се приписују *A. alba* откривени у западној Европи (Gaussen, 1964; Liu, 1971). Ипак, повремени копнени мостови су вероватно одржавали проток гена између источних балканских популација претка *A. alba* и понтских популација претка *A. nordmanniana* (Fady et al., 1992).

Дакле, након плиоценске трансгресије егејског басена, *A. alba* се вероватно појавила у северном делу Егеја и потом колонизовала целу Европу, док је *A. nordmanniana* настала у источном, а *A. cephalonica* у западном делу (Mitsopoulos & Panetsos, 1987). Током плеистоценских глацијација, источне популације *A. alba* су једним делом мигрирале према Малој Азији, где су у глацијалним рефугијумима долазиле у секундарни контакт са популацијама *A. nordmanniana*. Ово је било омогућено општим снижавањем

нивоа мора (100-120 m испод садашњег нивоа мора). Чести плеистоценски контакти праћени разменом генетичког материјала између ове две врсте су вероватно допринели индивидуализацији *A. nordmanniana* subsp. *equi-trojani*, као и специфичну морфологију источних популација *A. alba* (Kaya et al., 2008). Такође, анализа матернално наслеђене mtDNA (митохондријалне DNA) указала је на постојање две генетичке лозе *A. alba*: једне распрострањене у западној и централној Европи, и друге на јужном Балкану и источним Карпатима (Liepelt et al., 2002).

Са друге стране, јужне плеистоценске миграције *A. alba* и секундарни контакт са *A. cephalonica* у глацијалним рефугијумима на југу Балканског полуострва условиле су појаву новог, хибридног таксона *A. x borisii-regis* (Linares, 2011). Иако је до сада предложено неколико хипотеза о пореклу *A. x borisii-regis*, већина студија подржава хипотезу да су *A. alba* и *A. cephalonica* доживеле секундарни контакт у глацијалним рефугијумима на југу Балканског полуострва, приликом чега је дошло до размене њиховог генетичког материјала након специјације (Liepelt et al., 2010). Познато је да је Балканско полуострво представљало рефугијални центар за многе средње европске па чак и за неке источно алпске врсте, које су се током периода глацијације, “повлачиле” на територију овог географски отвореног и јужно позиционираног полуострва, док су се током знатно хумиднијих фаза интерглацијације “враћале” на подручје централне Европе. Сматра се да је велики проценат савремених хибридних зона у Европи настао током LGM путем секундарног контакта претходно изолованих, сродних врста (Hewitt, 1999). Молекуларни подаци су такође указали да је *A. x borisii-regis* нестабилан таксон, настао услед недавне хибридизације и интрогресије између *A. alba* и *A. cephalonica* (Krajmerová et al., 2016; Balao et al., 2020).

### 2.1.2. *Abies alba* Mill. (јела, обична јела)

*Abies alba* Mill. (syn. *A. pectinata* (Lam.) DC.; *A. picea* Lindl.) је једина широко распрострањена врста рода *Abies* у Европи (Chater, 1964; Jalas & Suominen, 1973). Први пут је описана у околини Стразбура (Christensen, 1997). Након плиоценске трансгресије Егејског басена, *A. alba* се вероватно појавила у северном делу Егеја и потом колонизовала целу Европу (детаљније у поглављу „2.1.1. Еволуција источно медитеранских јела“). Током плеистоценских глацијација главне рефугијалне области *A. alba* биле су лоциране на југу Балканског полуострва. Међутим, на основу фосилних поленских записа као и макрофосила утврђено је да су глацијални рефугијуми обичне јеле били локализовани и на подручју Мађарске (Terhürne-Berson et al., 2004).

**Морфологија и варијабилност.** *Abies alba* се сматра се највишом врстом јеле у Европи (Maugé et al., 2016). Максимална висина забележена је у Босни и Херцеговини (прашума Перућица) и износила је 65 m (Leibundgut, 1976). Према Jovanović (1992), *A. alba* је зимзелено, једнодомо дрво високо до 65 m и са пречником до 1,5 m. Крошња конична до готово цилиндрична, са пршљенастим, хоризонтално разведеним гранама (слика 2-2). Кора одраслог стабла беличастосива, пуца у облику угластих љуспи. Младе гранчице длакаве, старије голе. Пупољци без смоле; на терминалним избојцима понекад мало смоласти. Четине рашчешљане (слика 2-3), 17-30 mm дуге, до 2,5 mm широке; на фертилним гранама зашиљене; са горње стране тамнозелене и сјајне, са доње стране са две беле пруге стоминих отвора; смони канали маргинални. Мушки стробилуси жути, ресолики, ваљкасти, дуги као четине. Шишарке стоје усправно; зреле дуге 10-30 cm, широке до 5 cm, ваљкасте, тамносмеђе; плодне љуспе 25-30 mm широке, лепезасте; стерилне љуспе штрче из шишарке, уназад су повијене. Стробилуси се јављају у периоду од априла до јуна у зависности од станишта. Семе дуго 7-10 mm, троугласто, жућкастосмеђе, сјајно, има по себи смоне кесице; крилце црвенкастосмеђе и двапут дуже од семенке; зрело у септембру - октобру. Број котиледона 4-8, најчешће 5, који су 2,5-3,5 cm дуги и до 2 mm широки, линеарни (Vidaković, 1991).





**Слика 2-2.** *Abies alba* (Бугарска, Рила; фото: Митић, 2018).



Слика 2-3. *Abies alba*, изглед гранчица са четинама (Србија, Тара; фото: Златковић, 2018).

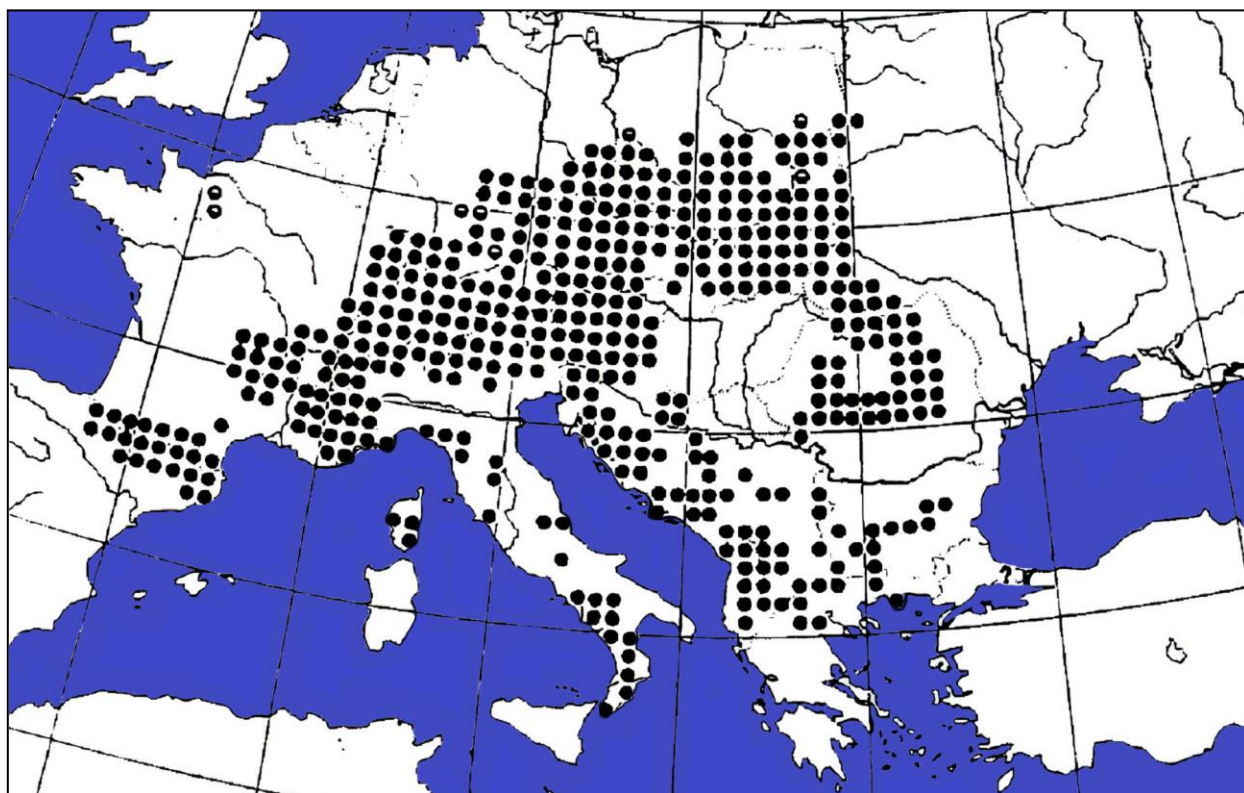
*Abies alba* је морфолошки релативно мало варијабилна врста (Јовановић, 1992):

а) var. *alba* је типичан, широко распрострањен облик у ареалу врсте.

б) var. *pyramidalis* (Carr.) Conif. (syn. *A. pectinata fastigiata* hort.) има уску, ваљкасто-купасту крошњу. Четине нису рашчешљане и приметно су краће него код типичног облика. Јавља се местимично, врло ретко у оквиру ареала врсте. Међутим, према WFO (2023), *A. alba* f. *pyramidalis* (Carrière) Voss се сматра само синонимом *A. alba*.



Хоролошке, еколошке и фитоценолошке карактеристике. *Abies alba* је једина широко распрострањена врста рода *Abies* у Европи (слика 2-4). Расте на планинама централне, јужне и делом западне Европе, протежући се на исток до Белорусије; није поуздано да је аутохтона у северозападној Француској; често је сађена ради добијања дрвне грађе у северној и западној Европи (Chater, 1964). Такође, према мапи приказаној у „*An Atlas of the World's Conifers*“ (Farjon & Filer, 2013), *A. alba* је широко распрострањена у централној Европи укључујући Алпе, Пиринеје, Карпате, Балкан, Италију и Корзику (слика 2-5). Најјужније популације налазе се у Калабрији (јужна Италија); најсеверније у низијама Пољске око 51° N.



Слика 2-4. Дистрибуција *A. alba* (прилагођено према Jalas & Suominen, 1973).

Међутим, граница ареала *A. alba* на Балканском полуострву је нејасна, што је последица интрогресије са *A. cephalonica* током поновљених “повлачења” обичне јеле са севера у плеистоцену. Према Farjon и Filer (2013), једна *A. alba* популација из северне Грчке и једна из западне Бугарске налазе се у оквиру или у близини ареала хибридног

таксона (*A. x borisii-regis*). Међутим, *Christensen* (1997) у „*Mountain Flora of Greece*“ наводи два локалитета *A. alba* на подручју северне Грчке (североцентрална Грчка - Варноус и североисточна Грчка - Фалакро), док *Jordanov* (1963) у „*Flora Republicae Popularis Bulgaricae*“ наводи већи број локалитета за територију Бугарске (Стара планина, Средња гора, Витоша, Осогово, Рила, Пирин, Славјанка, Беласица, централни и западни Родопи).



Слика 2-5. Дистрибуција *A. alba* (прилагођено према *Farjon & Filer*, 2013).

У Италији, *A. alba* је ретка на већем делу Апенина; чешћа је или шире распрострањена на северу тог подручја и у Калабрији (*Farjon & Filer*, 2013). Врста је ретка на Централним Алпима где преовладава сувља и хладнија клима. С обзиром да је *A. alba* често сађена ради добијања дрвне грађе, многе објављене мапе дистрибуције ове врсте укључиле су и популације које нису аутохтоне. Мапа приказана од стране *Farjon* и *Filer* (2013), није укључила популације *A. alba* са Централног масива и Нормандије (Француска), јер није поуздано да су аутохтоне (посебно популације у Нормандији; слика 2-5).

Према *Jovanović* (1992), *A. alba* има следеће распрострањење у Србији: североисток (Малиник изнад Злота, Ртањ, Бељаница - Јелова коса, Ресавска клисура), исток (Сува планина, Стара планина), северозапад (Повлен, Маљен), запад (Јелова гора, Тара, Чемерно, Златибор - Торник), југозапад (Голија, Златар, Јавор, Јадовник, Радочело, Побигеник), средишња Србија (Гоч, Студена, Жељин, Копаоник), Метохија (Проклетије, Мокра планина, Жљеб, Паштрик, Коритник, Ошљак, Коца Балкан), Косово (Шар планина, Островица).

Обичној јели одговарају влажнија и хладнија станишта са летњом температуром између 14 и 19 °C, где може да преживи и до 600 година (*Pignatti*, 1982; *Ellenberg*, 2009). Отпорнија је на хладноћу у односу на друге медитеранске јеле, али је веома осетљива на сушу у току зиме, касне и ране мразеве, као и недостатак воде током раста изданака (*Hansen & Larsen*, 2004). Оптимална надморска висина за њен раст је између 400 и 1500 m, иако се се може јавити и на већим надморским висинама (до 2000 m; *Gradečki-Poštenjak*, 2010). Толерише широк спектар услова земљишта, тако да се може се наћи на земљиштима различите текстуре, нивоа хранљивих материја и рН вредности, али ретко на поплавленим и сувим земљиштима (*Krajňáková et al.*, 2014). Може формирати чисте састојине, али се чешће јавља у мешовитим састојинама са врстама *Picea abies* и *Pinus sylvestris*, а на мањим надморским висинама са *Fagus sylvatica* (*Ellenberg*, 2009; *Farjon*, 2010).

У Србији, *A. alba* је врста планинских шума. Као врста која не подноси суво земљиште и ваздух, као ни касне пролећне мразеве - јавља се у појасу букве са којом гради мешовите састојине (*Abieto-Fagetum*) на киселим и базичним стенама. Врло је осетљива на загађења у ваздуху присутна у градовима, тако да је у парковима врло ретка.

Описане су бројне фитоценозе са њеним учешћем (*Jovanović*, 1992). Буково-јелове шуме (*Abieti-Fagenion moesiacaе* В. Јов 1976 ) простиру се од (400) 800-1800 m н.в. широм бивше Југославије. Најзаступљеније су у динарском подручју Словеније, Хрватске и Босне. Шумска заједница *Abieti-Fagetum* (Нт 1938) Трег. 1957 s. I. изграђује климарегионални висински појас на надморској висини од 700/800 до 1700/1800 m н.в. (*Mišić*, 2006). На ширем подручју динарских планина ове шуме се јављају на карбонатној подлози, али се јављају и на некарбонатним супстратима. У областима где се јављају

клима је хумидна са падавинама у границама од 1100 до 2800 mm годишње, а годишње температуре у распону од 5 до 8 °C. Развијају се на дубоком киселом смеђем земљишту које по механичком саставу припада лаким иловачама, што одговара шумским врстама, нарочито букви и јели. Земљиште мањих дубина, иако има одговарајућу структуру, има водно-ваздушне особине који су за овај тип шуме неповољне (Јовић, 1973). На већим надморским висинама и у сувљим условима развијају се и на плићим киселим смеђим земљиштима. Поред заједнице *Abieti-Fagetum*, заједница *Piceo-Abieti-Fagetum* представља основну заједницу буковог појаса на планинама Србије, Румуније и Бугарске. У овим заједницама, јела има знатно ужи екоценолошки, као и висински дијапазон и углавном је присутна у средњепланинском појасу на већини планинских масива бивше Југославије. Ове заједнице имају знатан степен реликности, већи у поређењу са монодоминантним заједницама, а показатељи тога су сложен флористички састав, појава реликтних врста (*Ilex aquifolium*, *Corylus colurna*, *Picea omorika*, *Pinus heldreichii*, *Taxus baccata* и др.) и стабилан, одговарајући комплекс еколошких фактора (Мишић, 2006).

Истраживана подручја у Србији под буково-јеловим шумама највећим делом имају хумидну климу разних интензитета: благо до умерено хумидна је на мањим висинама, а јако хумидна на већим. Подручја западне Србије су највлажнија, где на висинама већим од 1000 m влада перхумидна клима. Просечни хумидитет опада од запада према истоку (Мишић, 2006).

Буково-јелове шуме су у Србији присутне на вишим (Копачица, Стара планина, Сува планина, Проклетије, Шар планина, Жљеб, Мокра планина, Голија), средње високим (Јастребац, Ртањ, Гледићке планине, Маљен, Гоч, Тара, Повлен, итд.) и нижим планинама (Борања). Јављају се углавном на северној страни масива, што указује на осетљивост јеле према топлоти. Јела не толерише летњу сушу у храстовом појасу, нити мраз и велике хладноће у субалпијском буковом појасу, тако да симболизује климу средњепланинског, буковог или боље рећи буково-јеловог појаса многих високих планина бивше Југославије. На неким теренима Србије сачуване су недирнуте прашуме са огромним стаблима јеле, смрче и букве, као што је случај у резервату „Љуте ливаде“ на Црном врху на планини Голији (Мишић, 1990).

Лишћарско-четинарска заједница букве, јеле и смрче (*Piceo-Fago-Abietetum* Šol. 1965) сличнија је по висинском појасу који насељава, као и по флористичком саставу, буково-јеловом него смрчевом типу шуме. Ограничена је на висински појас од 1000 до 1500 m н.в., где буква и јела имају оптималан прираст и дебљину, међутим, на неким влажнијим масивима спушта се и ниже. Јела одређује горњу и доњу границу ове шуме својим висинским дијапазоном. Иако је ограничена на одређени појас планине, има изражен групни и индивидуални варијабилитет и насељава еколошки различита станишта са тенденцијом пењања у више, субалпијске регионе. Смрча се одржава на мањим висинама. Ова шума је историјски старији тип шуме од буковог, буково-јеловог и смрчево-јеловог типа јер је ближи предачком лишћарско-четинарском типу шуме који је био присутан у највећем делу рефугијалног појаса наших планина од Пљешевце до Родопа (Мишић, 2006). Доминантна је на Тари где покрива 80% планинске заравни изнад 950 m. У Бугарској је широко распрострањена и изграђује посебан појас на високим планинама од Балкана, преко Риле до Родопа. Неке од њих имају прашумски карактер, као на пример у резервату Парангалица (Marinov et al., 1961; Radkov, 1963).

Због постојања разлика између заједница *Fago-Abietetum* и *Piceo-Fago-Abietetum* у западним и источним деловима наше земље, *Gajić* (1970) додаје називу ових заједница у западним деловима *illyricum*, а у источним *moesiicum*. *Stefanović* (1977) се сложио с тим мишљењем и истакао значај климатских прилика које одређују разлике између буково-јелових шума без смрче у нижим и буково-јелових шума са смрчом у вишим регионима планина у Босни и Србији.

Буково-јелове шуме су у лошем стању услед недовољне заштите, сталних сеча и неподизања нових шума. С обзиром да су мешовити лишћарско-четинарски екосистеми стабилнији и продуктивнији од чистих, смањивање површина под мешовитим шумама наноси штету шумарству. Уколико се поремети однос букве и јеле у шумама то доводи до поремећаја читаве структуре и флористичког састава шуме, као и смањеног приноса дрвне масе обеју врста едификатора. Поремећај структуре отвара пут коровским врстама које много лакше продиру у такве системе и не само да продиру него загосподаре у нижим спратовима (Мишић, 2006).

Заједница смрче са јелом и црњушом (*Erico-Abietetum* Mišić et Popović (54) 1960) је присутна на стрмим стеновитим падинама у кањону испод Козјих стена на Копаонику. То је станиште са доста влаге у ваздуху, стрмим тереном и плитким земљиштем. По структури, као и по карактеристикама станишта, ова заједница се прилично разликује од других смрчевих шума у Србији. Висински прираст смрче и јеле је одличан упркос стрмом терену. Заједница се граничи са шумом букве и јеле на дну падине у кањону (Mišić & Dinić, 2006).

Шума оморике, смрче, јеле и других врста (*Piceo omorikae-Abietetum* Čolić 1965) је најстарија фитоценоза у реликтном ареалу оморике у Србији (Čolić, 1965). Ове предачке прашуме су се током историје диференцирале и деградирале преко шума букве, јеле и смрче, затим заједнице букве и јеле до монодоминантних чистих букових и смрчевих шума (Mišić & Jovanović, 1983). Данас је присутна већином у микрорефугијумима на Тари у које се склонила за време интерглацијација.

Према фитоценолошкој класификацији, објављеној у монографији „Вегетација Србије“ из 2006. године (Mišić, 2006; Mišić & Dinić, 2006), поменуте асоцијације су класификоване на следећи начин:

**Разред** *Alnetea glutinosae* Br. -Bl. Et R. Tx 1943

**Ред** *Fagetalia sylvaticae* Pawl. 1928

**Подред** *Fagenalia moesiaca* B. Jov. 1986

**Свеза** *Fagion moesiace* Bleč. Et Lak. 1970

**Подсвеза** *Abieti-Fagenion moesiaca* B. Jov 1976

**Асоцијација** *Abieti-Fagetum* (Ht 1938) Treg. 1957 s. 1.

**Асоцијација** *Piceo-Fago-Abietetum* Čol. 1965

**Разред** *Vaccinio-piceetea* in Br.-Bl. et al. 1939 emend. Zupančić (1976) 2000

**Ред** *Vaccinio-piceetalia* Br.-Bl. in Br.-Bl. et al. 1939 em. K. Lund 1967

**Свеза** *Vaccinio-Piceion* Br.-Bl. 1939

**Асоцијација** *Erico-Abietetum* Mišić et Popović (54) 1960

Свеза *Piceion omorikae* Tregubov 1941Асоцијација *Piceo omorikae-Abietetum* Čolić 1965

**Привредни значај.** *Abies alba* представља важну шумску врсту (Јовановић, 1992). Дрво жућкасто-бело, срж необојена; меко, лако без смоних канала. У употреби као стругано, рудничко и целулозно дрво, за фурнире, шиндру, каце, сандуке, музичке инструменте. Често употребљена врста за „очетињавање“ лишћарских шума. У парковима, због осетљивости, ретка; чешће су неке стране врсте.

Свеже четине и избојци обичне јеле садрже доста витамина С (Sarić, 1989). Као превентивно средство против хиповитаминозе и авитаминозе витамином С препоручивало се у току Народноослободилачке борбе Југославије и обично жвакање јелових избојака и четина (Grlić, 1980). Најбогатије витамином С су четине *A. alba* у зимским месецима. Такође, од четина и шишарки добија се етарско уље. Етарско уље четина (*Abietis albae aetheroleum*) је састојак мирисних есенција, средстава за инхалирање код обољења органа за дисање, лекова за утрљавање код реуматизма, ишијаса, гихта, неких кожних болести и у неким козметичким препаратима. Етарско уље шишарки (*A. fructum aetheroleum*) има сличну терапијску и другу употребу, а служи и за добијање лимонена. Јелова кора (*A. cortex*) је богата танинским материјама (7-16%), али се ретко користи као адстрингенс, већ служи за добијање танинског екстракта за штављење коже. У народу се у разне лековите сврхе употребљава и јелова смола (*Terebinthina*; Sarić, 1989).

### 2.1.3. *Abies cephalonica* Loudon (грчка јела)

*Abies cephalonica* Loudon (syn. *A. apollinis* Link) је балкански ендемит који се јавља само на планинама јужне и централне Грчке (Mattfeld, 1926). Епитет врсте се односи на њено класично налазиште (*locus classicus*), јонско острво Кефалонија у Грчкој (Farjon, 2010). Реконструкција холоценске историје грчке јеле представља тежак задатак за ботаничаре, с обзиром да се фосилни поленски записи различитих врста рода *Abies* тешко разликују (Terhurne-Berson et al., 2004). Ипак, како је дистрибуција ове врсте ограничена на јужни Балкан, који је представљао важно рефугијално подручје током плеистоценских глацијација, сматра се да величина популација, распрострањеност и генетичка структура ове врсте нису значајно промењене (Krajnakova et al., 2014).

**Морфологија и варијабилност.** *Abies cephalonica* је зимзелено, једнодомо дрво високо до 30 m и са пречником до 1 m (слика 2-6). Кора стабла сивосмеђа, код старијих стабала уздужно испуцала; крошња пирамидалног облика, гране густо распоређене, хоризонтално положене; једногодишњи избојци сивосмеђи, голи; пупољци јајолики, црвенкасти и јако смоласти (Vidaković, 1991). Четине на доњим гранама и младим биљкама радијално постављене, 20-25 mm дуге, трнасто зашиљеног врха; на горњим гранама краће, закривљене, слабије зашиљеног или заобљеног врха; на лицу сјајне, тамнозелене, са више испрекиданих линија стома при врху; на наличју светлосребрнасте, са две беле пруге стома, од којих свака има 6-7 линија стома (слика 2-7). Мушки стробилуси ресолики, 12-18 mm дуги, пурпурноцрвени. Шишарке цилиндричне, 10-12 cm дуге, 2,5-4,5 cm широке, смеђе и смоласте; плодне љуспе 2,5-3,5 cm широке; стерилне љуспе нешто штрчеће, уназад повијене. Семе троугласто, 12-14 mm дуго; котиледона 5-9, који су 20-25 mm дуги (Vidaković, 1991).





**Слика 2-6.** *Abies cephalonica* (Грчка, Кефалонија, Енос; фото: Павловић, 2019).



Слика 2-7. *Abies cephalonica*, изглед гранчица са четинама (Грчка, Пелопонез, Мега Спилеон; фото: Николић, 2019).

*Christensen* (1997) наводи два варијетета *A. cephalonica* на подручју Грчке:

а) var. *cephalonica* одликују маргинални смони канали у четинама на фертилним изданцима; на стерилним изданцима присутне зашиљене четине чији је врх продужен у дужи или краћи наставак, радијално постављене.

б) var. *graeca* (Fraas) Liu (syn. *A. apollinis* Link, *A. cephalonica* var. *apollinis* (Link) Beissn.) одликују медијални смони канали у четинама на фертилним изданцима; на стерилним изданцима четине са кратким оштрим врхом, постављене са доње стране гранчице.

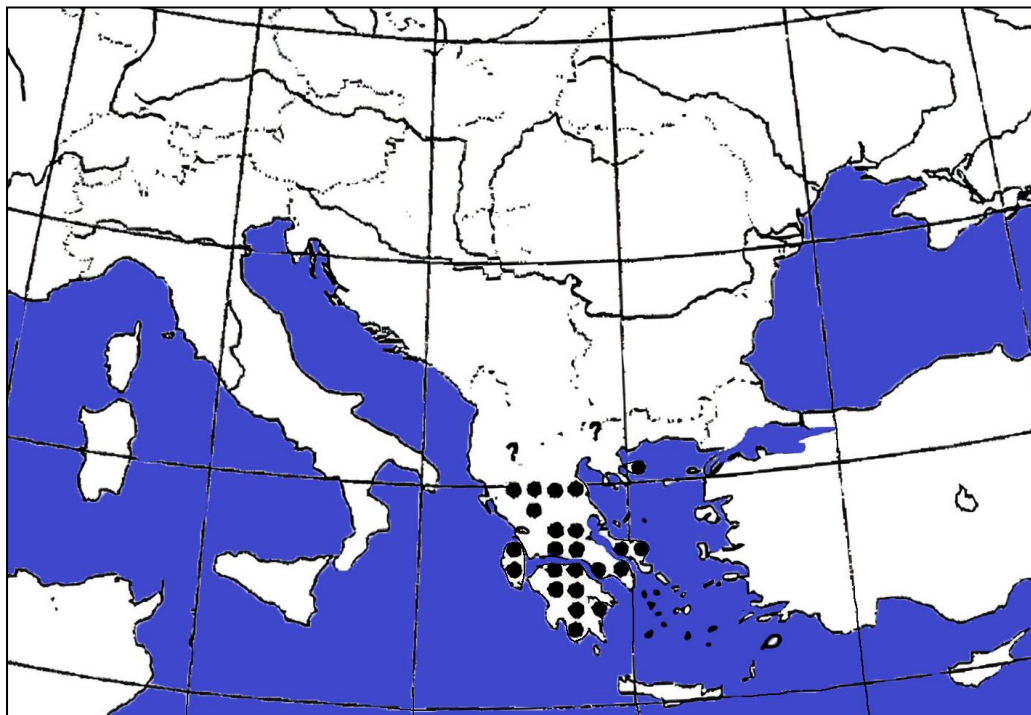
Према *Liu* (1971), популације *A. cephalonica* са острва Евија као и оближње континенталне популације (нпр. са планина Парнита и Парнас) требало би класификовати као *A. cephalonica* var. *graeca* заједно са *A. nordmanniana* subsp. *equi-trojani* (са планине



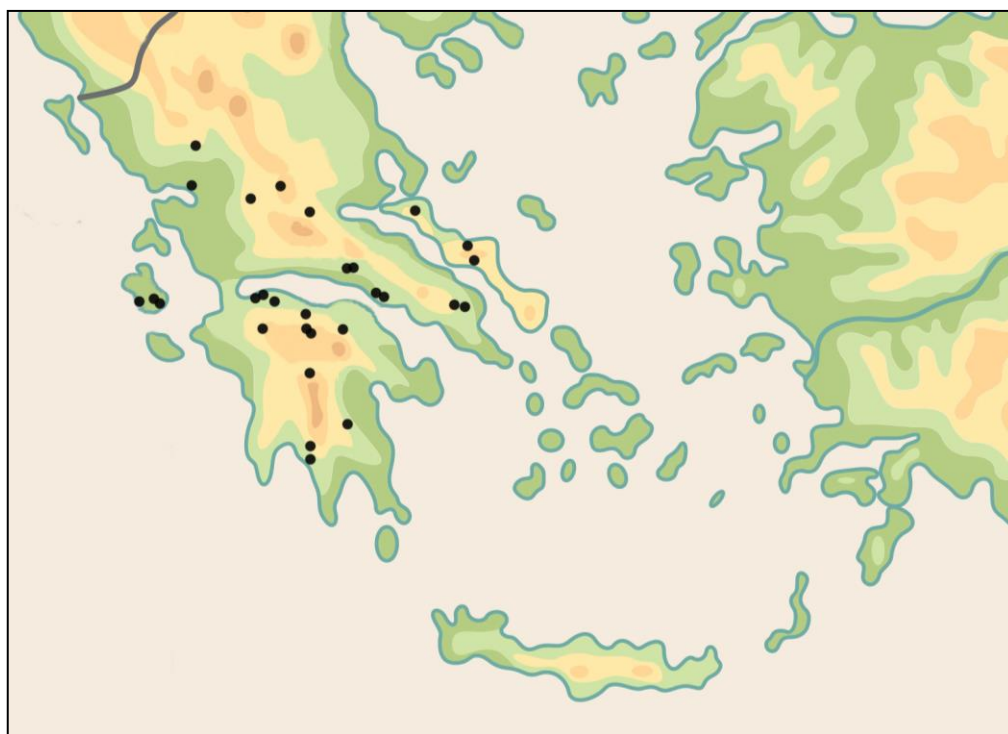
Ида из северозападног дела азијске Турске), док све остале популације грчке јеле представљају типски варијетет врсте (*A. cephalonica* var. *cephalonica*). Међутим, у савременим флористичким базама података (Euro+Med, 2006; WFO, 2023), *A. cephalonica* var. *graeca* се сматра само синонимом *A. nordmanniana* subsp. *equi-trojani*.

**Хоролошке, еколошке и фитоценолошке карактеристике.** Таксономија врсте *A. cephalonica*, а тиме и њена распрострањеност није ни данас у потпуности разјашњена. Често се њена дистрибуција сматра острвском, с обзиром да не постоји физичка повезаност између већине популација (Mitsopoulos & Panetsos, 1987; Christensen, 1997). Према *Jalas* и *Suominen* (1973), *A. cephalonica* је балкански ендемит који се јавља претежно на планинама јужне и централне Грчке (**слика 2-8**). Такође, према мапи приказаној од стране *Farjon* и *Filer* (2013), *A. cephalonica* је распрострањена од јужног Пинда на северу (где се среће са *A. x borisii-regis* и популације грчке јеле можда више нису чисте) кроз централну Грчку и Пелопонез до планине Тајгетос на југу (**слика 2-9**). Такође, јавља се на острву Кефалонија на западу и Евија на истоку. Међутим, претпоставља се да је *A. cephalonica* некада имала већи ареал ширећи се даље на север, где се сада углавном јавља *A. x borisii-regis*. Уколико током глобалног загревања лета постану сушнија, оваква промена климе би више одговарала грчкој јели (премда је тешко утврдити да ли се *A. cephalonica* већ сада шири на север). Са друге стране, пошумљавање планина на којима се јавља *A. cephalonica* са *A. alba* и/или *A. x borisii-regis* преокренуло би експанзију *A. cephalonica* у корист хибридног таксона (Farjon & Filer, 2013).

*Christensen* (1997) за територију Грчке наводи следеће локалитете *A. cephalonica* (укључујући североцентралну и североисточну Грчку): Пелопонез (Тајгетос, Нераидховоуни, Хионовуни, Парнон, Меналон, Килини, Хелмос, Еримантос, Панахаикон, у близини Калаврите, у близини Мега Спилеона), централна Грчка (Геранеиа, Патерас, Парнита, Дирфи, Кандхилион, Еликон, Парнас, Гиона, Ета, Тимфристос), јужни Пинд (Перистерии, Лапато и Гионскала у близини Семерника, Граница), јонска острва (Кефалонија), североцентрална Грчка (Олимп), североисточна Грчка (Атос).



Слика 2-8. Дистрибуција *A. cephalonica* (прилагођено према Jalas & Suominen, 1973).



Слика 2-9. Дистрибуција *A. cephalonica* (прилагођено према Farjon & Filer, 2013).

Висинска распрострањеност грчке јеле је обично између 400 и 1800 m, а врло ретко и преко 2000 m. Оптимум висинске распрострањености је од 800 до 1200 m (Panetsos, 1975). Јавља се у областима са сувим летима и влажним зимама, где је средња годишња температура између 7,5 и 16 °C, екстремне температуре од -20 до +33 °C (Jagodziński et al., 2011), а годишња количина падавина између 700 и 1500 mm (Aussenac, 2002, Gouvas & Sakellariou, 2011). Сушу подноси боље од других медитеранских јела (Aussenac, 2002, Bergmeier, 2002). Ипак, суша може постати озбиљна претња на плитким земљиштима са смањеним капацитетом задржавања воде (Schütt, 1994). Са друге стране, осетљивија је на мраз, при чему јој температура од -15 °C ствара проблеме, док остале медитеранске јеле подносе добро и температуре до -30 °C (Aussenac, 2002). Може се регенерисати на местима са јаким малом количином светлости, а саднице могу преживети у дубокој сенци и до 60 година (Panetsos, 1975). Грчка јела се јавља на кречњаку, доломиту, серпентиниту, шкриљцима и шисту са рН од 5 до 8. Земљишта на којима се најчешће јавља су добро дренирана и калцификована, иако на северу свог ареала расте и на силицијумским земљиштима, која могу бити слабо кисела (Eckenwalder, 2009; Farjon, 2010). На мањим надморским висинама гради мешовите шуме са *Fagus orientalis*, *Quercus* spp., *Castanea sativa* и *Pinus nigra*, док на већим гради шуме са *Juniperus oxycedrus* (Eckenwalder, 2009; Farjon, 2010).

Шуме грчке јеле су подељене на ксерофилни тип са бројним медитеранским елементима које представља *Helictotricho convoluti-Abietetum cephalonicae* Barbero Quézel 1976 и мезофилни тип карактеристичан за веће надморске висине представљен са *Lilichalcedonicae-Abietetum cephalonicae* Barbero Quézel 1976 *nom. mut. propos* (Bergmeier, 2002).

*Helictotricho convoluti-Abietetum cephalonicae* Barbéro & Quézel 1976 представља мешовите јело-борове шуме у којима доминирају јеле. Описане су на различитим планинама Пелопонеза и у области централне Грчке (Парнон) на нижим надморским висинама, између 550 и 1200 m, на најтоплијим и најсушнијим локацијама које јеле могу да поднесу. Обично се јавља на стрмим северозападним падинама, на мраморној подлози (Bergmeier, 2002).

*Lilio chalconicae-Abietetum cephalonicae* Barbéro & Quézel 1976 представља јелове или мешовите јело-борове шуме са јако мало борова које су присутне на различитим планинама Пелопонеза (Парнон, Тајгетос, Меналон, Олигиртос, Килини). Јављају се на стрмим падинама западно-северне оријентације где је влажност релативно велика, на мраморној подлози, ређе на кречњаку. У овим асоцијацијама јела је јако витална и често се јавља испод крошњи борова (Bergmeier, 2002).

На острву Кефалонија, Knapp (1964) је описао две вегетацијске јединице: шуме јеле високог вегетацијског појаса - *Scillo bifoliae-Abietetum cephalonicae* Knapp 1964 и шуме ниског вегетацијског појаса *Cyclamini hederifoli-Abietetum cephalonicae* Knapp 1964. Horvat (1974) је ове две асоцијације сврстао заједно са свим шумама јеле у јужној Грчкој у свезу *Abietion cephalonicae*, мада касније у својој књизи није споменуо име синтаксона вишег од ранга асоцијације (Bergmeier, 2002). Barbéro и Quézel (1976) сматрају да је *Abietion cephalonicae* више физиогномска него фитоценолошка јединица због недостатка флористичких критеријума. Исти аутори су удружили шуме јеле и црног бора јужне Грчке у свезу *Abieti-Pinion*. Данас се оба назива од стране различитих аутора користе као синоними.

*Abies cephalonica* се јавља и у асоцијацији *Trifolio grandiflori-Abietetum borisii-regis* Barbéro & Quézel 1976 која је описана на планинама Вардзија, Оксия и Тимфростос. Ова асоцијација је карактеристична за шуме *A. x borisii-regis* у најјужнијем делу Пиндских планина (регион Кардитса).

Према Samaras (2012), поменуте асоцијације су класификоване на следећи начин:

**Класа:** *Quercetea pubescentis* Doing-Kraft ex Scamoni et Passarge 1959

**Ред:** *Quercetalia pubescentis* Klika 1933

**Свеза:** *Abietion cephalonicae* Horvat et al. 1974.

**Асоцијација:** *Scillo bifoliae-Abietetum cephalonicae* Knapp 1964

**Асоцијација:** *Cyclamini hederifoli-Abietetum cephalonicae* Knapp 1964,

**Асоцијација:** *Lilio chalconicae-Abietetum cephalonicae* Barbéro & Quézel 1976

**Свеза:** *Quercion confertae* Ht. Ex Horvat 1958

**Асоцијација:** *Trifolio grandiflori-Abietetum borisii-regis* Barbéro & Quézel 1976

**Класа:** *Quercetea ilicis* Br.- Bl. ex A. Bolò s 1950

**Ред:** *Quercetalia ilicis* Br.- Bl. ex Molinier 1934

**Свеза:** *Quercion ilicis* Br.- Bl. ex Molinier 1934

**Асоцијација:** *Helictotricho convoluti-Abietetum cephalonicae* Barbéro & Quézel 1976

**Привредни значај.** Некада је грчка јела била врло важно привредно дрво, међутим данас је сувише ретка да би била од економског значаја (Farjon, 2010). У последњих пет деценија честа је појава дивљих пожара у шумским заједницама где доминира *A. cephalonica*, што је довело до значајног смањења величине популација ове врсте (Raftoyannis & Radoglou, 2001). С обзиром да је бржег раста од обичне јеле као и да боље подноси сушу, употребљавана је при пошумљавању крша. Врло је декоративна врста; користи се као Божићно дрво и у орнаменталне сврхе. У Београду врло витални стварни примерци у баштама (Дедиње; Јовановић, 1992).

#### 2.1.4. *Abies x borisii-regis* Mattf. (јела краља Бориса, бугарска јела)

*Abies x borisii-regis* Mattf. (syn. *A. cilicica* (Antoine & Kotschy) Carrière var. *borisii-regis* (Mattf.) Silba; *A. alba* ssp. *borisii-regis* (Mattf.) Kozuharov & N. Andreev; *A. alba* var. *acutifolia* Turrill; *A. alba* ssp. *acutifolia* (Turrill) Fukarek) је балкански ендемит чији таксономски статус, дистрибуција и порекло још увек нису у потпуности разјашњени. Овај таксон је први пут описан са Централних Родопа у Бугарској као природни хибрид између *A. alba* и *A. cephalonica* (Mattfeld et al., 1925). Према опису који је дао Mattfeld (1926), *A. x borisii-regis* поседује интермедијарне особине или комбинацију особина вегетативних органа (изданака, четина, пупољака) претпостављених родитељских врста. Такође, Mattfeld (1930) је јелу краља Бориса окарактерисао као “*populus hybridogenus*” користећи термин који се односи на изузетно полиморфне хибриде чије популације представљају мешавину различитих морфотипова са различитим степеном прелаза између *A. alba* и *A. cephalonica*. Изражена морфолошка варијабилност као и недостатак дистинктивних морфолошких карактеристика које би олакшале разликовање од родитељских врста, довели су до неконзистентних литературних података о пореклу и дистрибуцији овог таксона.

Према Mattfeld (1930), хибридни таксон *A. x borisii-regis* је настао током плеистоценских глацијација као резултат „повлачења“ *A. alba* према југу Балканског полуострва и секундарног контакта са *A. cephalonica* у глацијалним рефугијумима, при чему су ове две врсте размениле генетички материјал након специјације. Са друге стране, Turrill (1937) је предложио да је *A. x borisii-regis* древни, предачки таксон од којег је *A. alba* дивергирала према северу и *A. cephalonica* према југу. Ипак, прва (хибридизациона) теорија је много шире прихваћена (Mitsopoulos & Panetsos, 1987; Liepelt et al., 2010; Bella et al., 2014; Krajmerová et al., 2016; Balao et al., 2020; Litkowiec et al., 2021; Siskas et al., 2023) у односу на другу (Scaltsoyiannes et al., 1999). Познато је да је Балканско полуострво у плеистоцену представљало рефугијални центар за многе средње европске па чак и за неке источно алпске врсте, које су се током периода глацијације, “повлачиле” на територију овог географски отвореног и јужно позиционираног полуострва, док су се током знатно хумиднијих фаза интерглацијације “враћале” на подручје централне Европе. Сматра се да је велики проценат савремених хибридних зона у Европи настао током LGM



путем секундарног контакта претходно изолованих, сродних врста (Hewitt, 1999). Молекуларни подаци су такође указали да је *A. x borisii-regis* нестабилан таксон, настао услед недавне хибридизације и интрогресије између *A. alba* и *A. cephalonica* (Krajmerová et al., 2016; Balao et al., 2020).

**Морфологија и варијабилност.** *Abies x borisii-regis* је зимзелено, једнодомо дрво високо до 40 m (слика 2-10). Млади избојци светложути са густим кратким длачицама; пупољци смоласти. Четине густо постављене, са горње стране избојка нису рапчешљане, до 3 cm дуге, зашиљене, понекад заобљеног или урезаног врха, на лицу без стома, а на наличју са две беле пруге стома (слика 2-11). Према Chater (1964), ова хибридна врста је по облику и распореду четина сличнија са јужном родитељском врстом (*A. cephalonica*) него са северном (*A. alba*). Шишарке су ваљкасте до конусне, 15 cm дуге; плодне љуспе 3-3,5 cm широке; стерилне љуспе вире и уназад су повијене (Vidaković, 1991).

Matfeld (1930) је *A. x borisii-regis* окарактерисао као “*populus hybridogenus*” користећи термин који се односи на изузетно полиморфне хибриде чије популације представљају мешавину различитих морфотипова са различитим степеном прелаза између *A. alba* и *A. cephalonica*.



**Слика 2-10.** *Abies x borisii-regis* (Грчка, Олимп; фото: Златковић, 2018).





Слика 2-11. *Abies x borisii-regis*, изглед гранчица са четинама (Грчка, Олимп; фото: Златковић, 2018).

**Хоролошке, еколошке и фитоценолошке карактеристике.** С обзиром на велику морфолошку варијабилност *A. x borisii-regis* као и недостатак дистинктивних морфолошких карактеристика које би олакшале разликовање од претпостављених родитељских врста, утврђивање граница ареала овог таксона представља изузетно тежак задатак за ботаничаре. Према *Jalas* и *Suominen* (1973), *A. x borisii-regis* се јавља у јужној Албанији, готово целој Грчкој (осим острва Кефалонија, Евија и јужне половине Пелопонеза), најјужнијим деловима Северне Македоније и широм југозападне и јужне Бугарске (слика 2-12). Према овој хипотези, *A. x borisii-regis* расте парapatрично са претпостављеним родитељским врстама, тј. у северним деловима ареала са *A. alba*, а у јужним са *A. cephalonica*. Сагласно са овим, *Jordanov* (1963) је указао на присуство

јединки *A. x borisii-regis* широм југозападне и јужне Бугарске у мешовитим популацијама са *A. alba* (Рила, Пирин, Славјанка, Беласица, Родопи). Слично, *Christensen* (1997) је известио о присуству *A. x borisii-regis* јединки на три планине на Пелопонезу (Хелмос, Зириа и Парнон) дубоко унутар ареала *A. cephalonica*. Са друге стране, према *Farjon* и *Filer* (2013), *A. alba*, *A. x borisii-regis* и *A. cephalonica* су углавном алопатричне врсте, тј. *A. x borisii-regis* се јавља у веома уском појасу између претпостављених родитељских врста (слика 2-13): у јужној Албанији, северној и североисточној Грчкој и југозападној Бугарској (Родопске планине). Коначно, *Fady* (1993) је само популације из централне Грчке класификовао као *A. x borisii-regis*, што је у супротности са чињеницом да је овај таксон првобитно описан у Бугарској (*Mattfeld et al.*, 1925).



Слика 2-12. Дистрибуција *A. x borisii-regis* (прилагођено према *Jalas & Suominen*, 1973).



Слика 2-13. Дистрибуција *A. x borisii-regis* (прилагођено према Farjon & Filer, 2013).

*Christensen* (1997) за територију Грчке наводи следеће локалитете *A. x borisii-regis*: Пелопонез (Килини), јужни Пинд (Цумерка, Перистери, Халикион, Граница), северни Пинд (Зигос, Смоликас, у близини Мецовона, изнад Коница, долина Аспропотамос у близини села Милеа и Полидеа), источноцентрална Грчка (Пилион, Оса), североцентрална Грчка (Црвена Гора, Олимп, Каракамен), североисточна Грчка (Холомон, Атос, Пангеон, Врондос, Заградениа - Родопи), егејска острва (Тасос).

*Jordanov* (1963) за територију Бугарске: Рила, Пирин, Славјанка, Беласица, Родопи.

*Micevski* (1985) за територију Северне Македоније: Шар планина, Рудока, Бистра, Јакупица, Карацица, Кораб, Галичица, Пелистер, Нице, Дудица, Кожуф, Беласица. Такође,

Мавровски Ханови се наводе као локалитет на коме се јавља посебна форма *A. x borisii-regis* која на основу облика и распореда четина веома подсећа на *A. alba*.

*Abies x borisii-regis* је планинска врста која се углавном јавља на надморској висини од 700 до 1500 m. Може формирати мешовите састојине са *Picea abies* или се јавља у више мање чистим састојинама; на нижим надморским висинама може формирати мешовите шуме са *Fagus sylvatica* (Voleková et al., 2014).

*Acevski* и *Simovski* (2011) су навели неколико заједница *A. x borisii-regis* које се јављају на силикатној подлози у оквиру националног парка Маврово:

- *Abieti-Fagetum macedonicum* Em (1962) 1985 је заједница која се формира обично на камбисолу, а понекад и на кречњаку, у региону букових шума, између 1100 и 1600 m надморске висине на планинама Кожуф, Бистра, Кораб и Радика. Карактеристичне врсте су: *Fagus sylvatica* ssp. *moesiaca* и *A. x borisii-regis*. Доста су заступљене и *Pinus nigra* и *Pinus sylvestris*. У спрату грмља јавља се јако мали број биљка и то углавном биљке толерантне према засени. Због брзог ширења и велике толеранције према засени, јела представља опасност у овим асоцијацијама.
- *Abieti-Fagetum subass. Pinetosum nigrae nomen nudum.* - карактеристичне врсте су: *Fagus sylvatica* ssp. *moesiaca*, *A. x borisii-regis*, *Pinus nigra*, *Picea abies*.
- *Abieti-Piceetum scardicum* Em (1958) 1985 је најјужнија асоцијација у којој се јавља смрча. Присутна је на Шар планини у басену реке Ацина, на 1400-1800 m н.в. Карактеристичне врсте су: *A. x borisii-regis* и *Picea abies*.
- *Fago-Abietetum meridionale* Em 1973 јавља се на планинама Бистра, Радика и Шар планина, на надморској висини од 1000 до 1600 m, у условима планинске климе са атрибутима мезофилне, при чему у току лета нема суше. Карактеристичне врсте су: *A. x borisii-regis*, *Fagus sylvatica* ssp. *moesiaca*, *Acer pseudoplatanus*, *A. platanoides*.

**Привредни значај.** Врста *Abies x borisii-regis* сађена је у европским арборетумима посебно у 19. веку и многа од ових стабала су још увек жива; на Британским острвима расте у бољем стању од *A. alba* (Farjon, 2010). Дрво *A. x borisii-regis* је драгоцено и користи се углавном за унутрашњу изградњу као шпер плоча или фурнир (Farjon, 2010). Слично је дрвету *A. alba* по свим особинама и употреби.

## 2.2. Терпени

Терпени представљају структурно најразноврснију класу секундарних метаболита биљака. Назив су добили по томе што су први пут изоловани из терпентина. Сви терпени настају репетитивним спајањем разгранатих C5 јединица базираних на изопентанском скелету. Међутим, ови мономери се често називају изопренске јединице, јер се термичким разлагањем многих терпена добија гасовити алкен - изопрен као производ. Исто тако у одговарајућим хемијским условима може доћи до полимеризације изопрена и настанка великог броја разноврсних терпенских структура. Зато се терпени често називају изопрени, иако изопрен сам по себи није њихов биолошки прекурсор (Croteau et al., 2000).

Према броју изопренских јединица извршена је подела терпена на хемитерпене (C5), монотерпене (C10), сесквитерпене (C15), дитерпене (C20), сестертерпене (C25), тритерпене (C30) и тетратерпене (C40). Постоје и политерпени који настају повезивањем веома великог броја C5 јединица (C40+; гутаперка, каучук). Екстензија ланца повећава број могућих циклизација, а самим тим и структурну варијабилност групе. Терпени који садрже кисеоник названи су терпеноиди или изопреноиди (Bakkali, 2008).

### 2.2.1. Монотерпени

Монотерпени се састоје из две изопренске јединице, односно имају 10 угљеникоивх атома (C10). У зависности од начина повезивања изопренских јединица постоје: испарљиви монотерпени („глава-реп“ повезивање) и неиспарљиви монотерпени - иридоиди („глава-глава“ повезивање). Испарљиви монотерпени су главни састојци етарских уља великог броја биљака у којима се њихов удео креће и до 90% (Bakkali, 2008). Иридоиди се у биљним ткивима најчешће налазе везани за шећере (Kovačević, 2004). Према грађи угљеничног скелета монотерпени могу бити ациклични, моноциклични и бициклични. У односу на присуство функционалне групе на основном скелету деле се на (Bakkali, 2008):

Угљене хидрате:

Ациклични: мирцен, оцимен итд.

Моноциклични: терпинен, феландрен итд.

Бициклични: пинени,  $\delta$ -3-карен, камфен, сабинен итд.

Алкохоле:

Ациклични: гераниол, линалол, цитронелол, лавандулол, нерол итд.

Моноциклични: ментол,  $\alpha$ -терпинеол, карвеол итд.

Бициклични: борнеол, фенхол, хризантенол, тујан-3-ол итд.

Алдеhide:

Ациклични: гераниал, нерал, цитронелал итд.

Кетоне:

Ациклични: тегетон итд.

Моноциклични: ментони, карвон, пулегон, пиперитон итд.

Бициклични: камфор, фенхон, тујон, омбелулон, пинокамфон, пинокарвон итд.

Естре:

Ациклични: линалил-ацетат или пропионат, цитронелил ацетат итд.

Моноциклични: ментил или  $\alpha$ -терпинил ацетат итд.

Бициклични: изоборнил-ацетат итд.

Етре:

1,8-цинеол, ментофуран итд.

Пероксиде: аскаридол итд.

Феноле: тимол, карвакрол итд.

### **2.2.2. Сесквитерпени**

Сви сесквитерпени се састоје од три изопренске јединице, односно њихов скелет садржи 15 угљеникових атома (C15). Испарљиви сесквитерпени су, као и монотерпени, веома чести састојци етарских уља (Croteau et al., 2000), док другу групу чине неиспарљиви сесквитерпени који у свом молекулу садрже  $\gamma$ -лактонски прстен



(сесквитерпенски лактони; Kovačević, 2004). На основу функционалних група могу се поделити на (Bakkali, 2008):

Угљене хидрате: азулен,  $\beta$ -бисаболен, кадинен,  $\beta$ -кариофилен, лонгифолен, куркумени, елемени, фарнезени, зингеберени итд.

Алкохоле: бисабол, кедрол,  $\beta$ -неролидол, фарнезол, каротол,  $\beta$ -санталол, патулол, виридифлорол итд.

Кетоне: гермакрон, ноткатон, *cis*-лонгипинен-2,7-дион,  $\beta$ -ветинон, турмерони итд.

Епоксиде: кариофилен-оксид, хумулен, епоксиди итд.

### 2.2.3. Биосинтеза

Немачки хемичар *Otto Wallach* је свој истраживачки рад једним делом посветио карактеризацији терпенских једињења. Приметио је да терпенске структуре садрже одређени број структурних јединица од пет угљеникових атома, што је даље и условило класификацију ове класе једињења према броју C5 (изопренских) јединица. С обзиром на униформност обрасца, *Wallach* је формулисао „*изопренско правило*“ према коме већина терпена настаје удруживањем изопренских јединица. Са данашњег становишта, ово правило има своје недостатке, али је омогућило концептуални оквир за даља истраживања структуре терпена. Касније га је изменио *Leopold Ruzicka* и формулисао „*биогенетско изопренско правило*“ стављајући нагласак на елонгације, циклизације и друге модификације молекула (Croteau et al., 2000).

Биосинтеза свих терпена може се поделити на четири корака (Croteau et al., 2000):

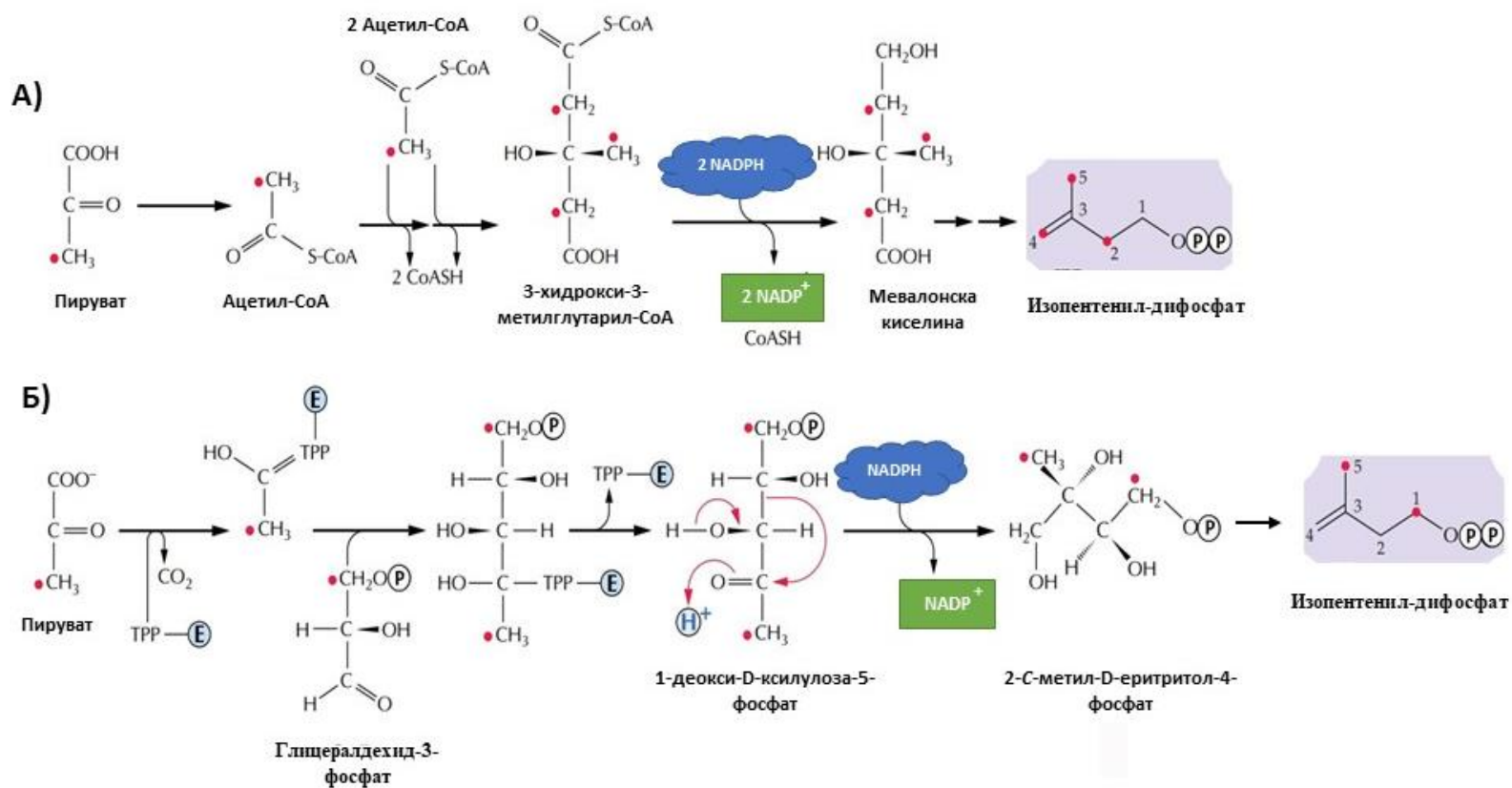
а) синтеза основних C5 јединица: изопентенил-дифосфата и његовог таутомера диметилаллил-дифосфата;

б) „глава-реп“ повезивање основних C5 јединица при чему настају три већа пренил-дифосфата;

в) обрада пренил-дифосфата од стране терпенских синтаза и настанак цикличних родитељских скелета сваке терпенске класе;

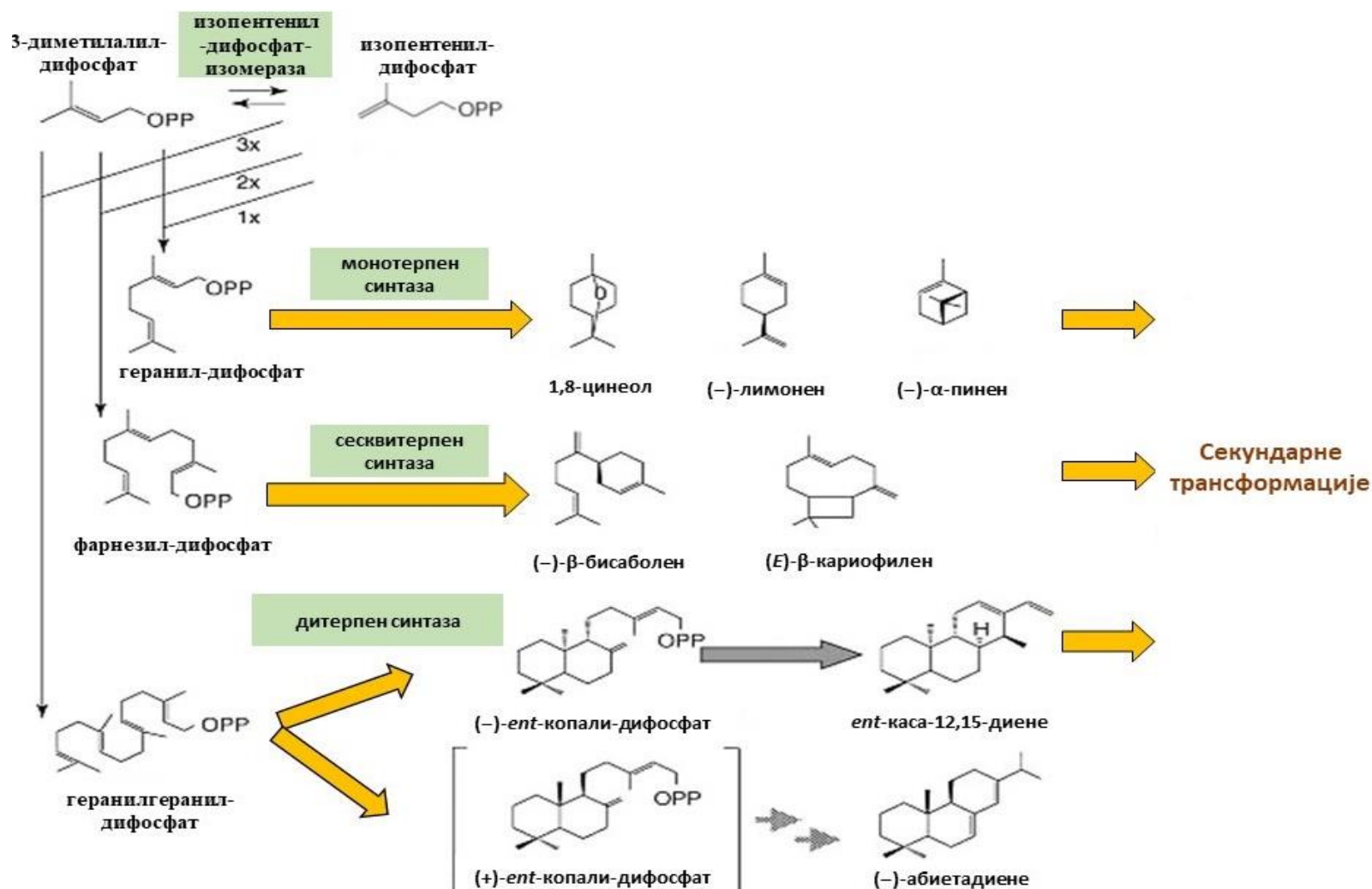
г) секундарне ензимске модификације родитељских скелета додавањем функционалних група и настајање различитих терпенских метаболита.

Универзални терпенски прекурсор изопентенил-дифосфат може настати преко два биосинтетичка пута (**слика 2-14**): мевалонатног и метилеритритол-фосфатног пута (не-мевалонатни пут). Мевалонатни пут се одвија у цитосолу где као финални производи настају сесквитерпени, тритерпени и политерпени. Почиње двостепеном кондензацијом три молекула ацетил-СоА која је катализована тиолазом и хидроксиетилглутарил-СоА синтазом при чему настаје 3-хидрокси-3-метилглутарил-СоА. Након тога следе реакције редукције уз помоћ 3-хидрокси-3-метилглутарил-СоА редуктазе у којима се формира мевалонска киселина. Након две узастопне фосфорилације мевалонске киселине и накнадне декарбоксилације настаје изопентенил-дифосфат. Метилеритритол-фосфатни пут се одвија у пластидима где настају монотерпени, дитерпени и тетратерпени. Почиње реакцијом пирувата са тиамин-дифосфатом дајући хидроксиетил-тиамин-дифосфат, који се кондензује са глицералдехид-3-фосфатом. Након тога, тиамин-дифосфат се ослобађа и формира се петоугљенични интермедијер, 1-деокси-D-ксилулозо-5-фосфат, који се редукује у 2-C-метил-D-еритритол 4-фосфат и накнадно трансформише у изопентенил-дифосфат (Croteau et al., 2000).



Слика 2-14. Синтеза изопентенил-дифосфата преко два биосинтетичка пута: А) мевалонатни; Б) метилеритритол-фосфатни пут (прилагођено према Croteau et al., 2000).

Изомеризацијом изопентенил-дифосфата у присуству изопентенил-дифосфат-изомеразе настаје његов таутомер диметилалил-дифосфат. Ова два изомера представљају универзалне прекурсоре свих терпена (**слика 2-15**). Њиховом кондензацијом („глава-реп“ повезивањем) настају линеарни пренил-дифосфати: геранил-дифосфат (C10), фарнезил-дифосфат (C15) и геранилгеранил-дифосфат (C20) (Gorunović & Lukić, 2001). Активношћу ензима терпенских синтаза (тзв. циклаза) из геранил-дифосфата, фарнезил-дифосфата и геранилгеранил-дифосфата, путем различитих реакција циклизације и реорганизације молекула, настају родитељски скелети монотерпена, сесквитерпена и дитерпена, респективно. „Глава-глава“ повезивањем два молекула фарнезил-дифосфата или геранилгеранил-дифосфата настају сквален (C30) или фитоен (C40), који представљају прекурсоре за синтезу свих тритерпена односно тетратерпена. Након тога следе секундарне ензимске модификације базичног родитељског скелета и настанак великог броја терпенских метаболита. Секундарне трансформације обично укључују реакције оксидације, редукције, изомеризације и коњугације.



Слика 2-15. Синтеза различитих терпенских класа из пренил-дифосфата (прилагођено према Tholl, 2006).

## 2.2.4. Етарска уља

Етарска уља представљају концентроване смеше испарљивих липофилних састојака, изразитог мириса (Ковачевић, 2004). Обично садрже 20-200 компоненти, међу којима највећи удео имају испарљиви терпени (моно- и сесквитерпени, ређе дитерпени) и у мањој мери су присутни деривати фенилпропана. Неке компоненте су присутне у већим концентрацијама (20-95%) и називају се главним компонентама, док су остале присутне у мањим количинама (1-20%) или у траговима (испод 1%). У неким случајевима фенилпропанска једињења могу бити доминантна као што је случај са етарским уљем коре цимета (*Cinnamomum verum* J.Presl) где доминира циметалдехид или корена першуна (*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss.) где су најзаступљенији апиол и миристицин (Croteau et al., 2000; Betts, 2001; Bowles, 2003; Pichersky et al., 2006).

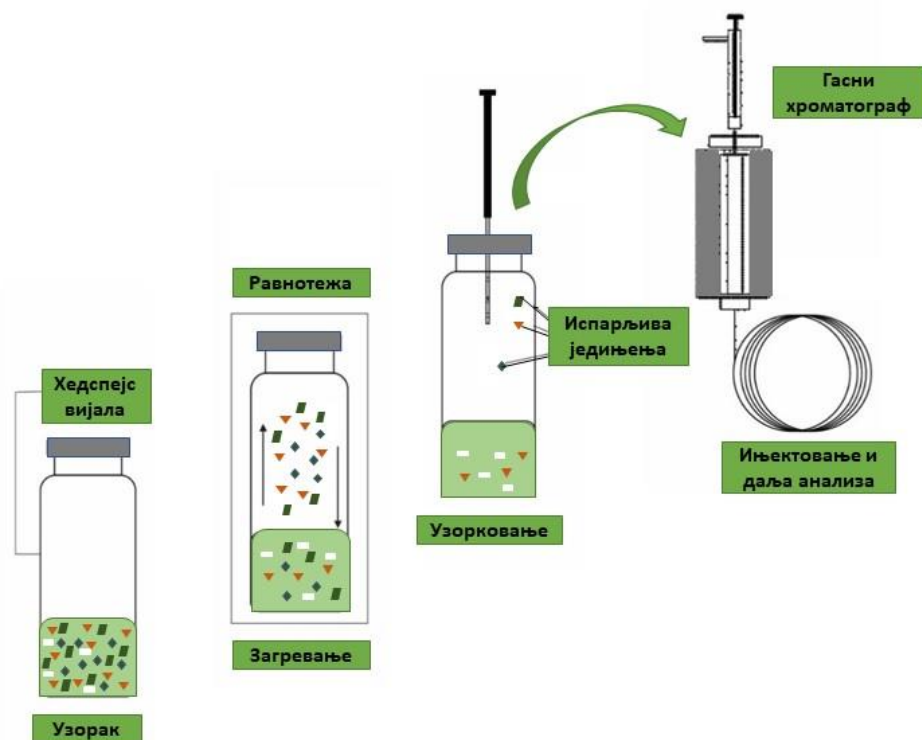
На собној температури етарска уља су углавном течности, ређе имају вискозну или получврсту конзистенцију. Углавном су безбојне, жуте или жутозелене боје, а понекад могу бити и специфично обојена (*Caryophylli aetheroleum*, *Cinnamomi aetheroleum*). Мирис потиче од састојака са кисеоничним функционалним групама. Растварају се у липидима и неполарним органским растварачима и углавном су мање густине од воде (Bakkali, 2008).

Етарска уља могу бити локализована у различитим органима биљака: корену, стаблу, листу, цвету, плоду и семену. Ове мирисне течности настају у биљкама активношћу секреторних ћелија и ткива када етарско уље остаје у ћелији у којој је настало (интрацелуларно излучивање) и жлезаних ћелија и ткива (жлезда) када етарско уље напушта ћелију у којој је настало, тј. излучује се из протопласта кроз ћелијски зид у посебне интрацелуларе или на површину биљног тела (екстрацелуларно излучивање). Неке биљне фамилије су посебно богате етарским уљима, као што су: Pinaceae, Cupressaceae, Lauraceae, Zingiberaceae, Rutaceae, Myrtaceae, Lamiaceae, Apiaceae и Asteraceae.

### 2.2.5. Методе изоловања испарљивих терпена

**Хедспејс** (HS, енгл. *headspace*) је метода која се користи за изоловање веома испарљивих једињења из биљног материјала, тзв. HS испарљивих компоненти. Ова метода захтева малу количину биљног материјала (врло је погодна за истраживање угрожених биљних таксона), а омогућава испитивање великог броја узорака без њихове скупе и дуготрајне припреме (Kolb & Ettre, 2006; Reale et al., 2014). Најчешће се примењују статички и динамички HS. Статички HS служи за анализу нискомолекуларних испарљивих компоненти без утицаја растварача, поступак је аутоматизован и омогућава брз скрининг. Након термостатирања и успостављања термодинамичке равнотеже у HS вијали са узорком формирају се две фазе: фаза узорка која може бити чврст или течан аналит у који се може додати растварач или матрикс-модификатор и HS гасна фаза изнад узорка (**слика 2-16**). Одговарајућа запремина парне фазе се узима микролитарским шприцем, а потом убризгава у гасни хроматограф. Ради оптимизације HS технике неопходно је имати у виду неколико параметара: температура узорка, растворљивост матрикса и испарљивост аналита. Фактори који могу повећати ефикасност екстракције су: промена температуре или састава матрикса (нпр. додавањем соли у водени матрикс), естерификација, алкиловање, ацетиловање и силиловање.

Предности HS методе су једноставна припрема узорака, ниска цена анализе по узорку, висока осетљивост, једноставан мониторинг и елиминација реагенаса. Са друге стране, главни недостатак се огледа у томе што се може применити само за узорке који садрже велике количине испарљивих једињења (Cadwallader, 2007).

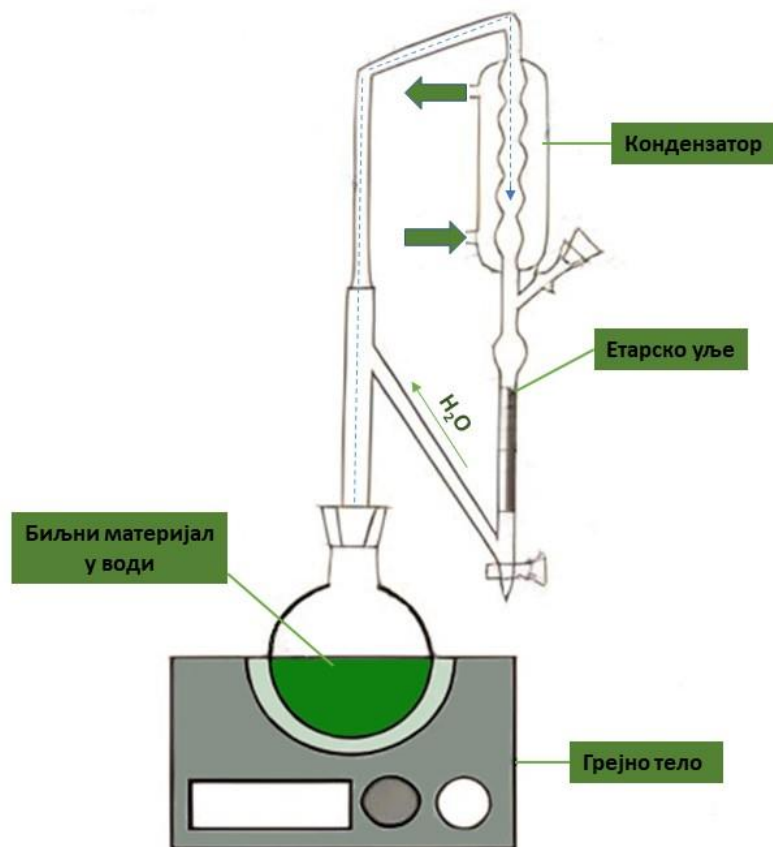


Слика 2-16. Принцип статичког хедспејс поступка: екстракција нискомолекуларних испарљивих једињења у хедспејс вијали.

Најчешће коришћена метода за изоловање етарских уља јесте **хидродестилација** (нпр. по Клевенцеровој методи; **слика 2-17**). Хидродестилација је техника која се користи за изоловање секундарних метаболита без употребе органских растварача. Примењује се за дестиловање једињења са високом тачком кључања и једињења које се не растварају у води или се врло мало растварају (Mitić et al., 2020). Уситњени биљни материјал се прелије одговарајућом запремином воде и цела смеша се загрева до кључања, при чему врела вода „ослобађа“ испарљива једињења етарског уља из биљног материјала. Паре етарског уља заједно са воденом паром се кондензују и у мерном делу наставка по Клевенцеру добија се смеша предестиловане воде и етарског уља, која је због њихове немешљивости врло често мутна или се јасно раздвоје два слоја: горњи – лакши слој етарског уља и доњи – водени слој. Недостаци ове методе су у томе што је дуготрајна, неекономична и захтева велику количину материјала. Поред тога, долази до губитка дела



испарљивих компоненти као и деградације неких термолабилних једињења (Shes et al., 2000; Yamini et al., 2002).



Слика 2-17. Апаратура за хидродестилацију по Клевенцеру.

### 2.2.6. Биолошка улога

Једна од важнијих улога етарских уља јесте учешће у биотичким интеракцијама. Пре свега, етарска уља имају одбрамбену улогу штитећи биљку од микроба (вируса, бактерија, гљива) и хербивора (нематода, инсеката, кичмењака; Gershenzon et al., 2012). Са друге стране, мирис етарских уља привлачи различите симбионте, полинаторе као и животиње које разносе плодове и семена (Martin, 2004). Познато је и да етарска уља смањују конкуренцију спречавањем клијања семена и раста јединки других врста у

непосредној близини (алелопатија; Thompson, 2005). Такође, етарска уља могу повећати толеранцију биљке на високе температуре ваздуха. Испаравањем етарског уља хлади се површина биљних органа и ствара специфична микроклима око биљке која спречава прекомерну транспирацију (Sharkey & Singaas, 1995).

### **2.2.7. Варијабилност и употреба терпена у таксономским истраживањима**

Биосинтеза терпена одређена је генима са диференцијалном експресијом која је регулисана развојним потребама биљке као и потребама које зависе од утицаја стресних фактора што доводи до велике сложености и пластичности овог процеса (Tholl, 2006). Да би се терпени ефикасно користили као хемотаксономски маркери, веома је важно упознати њихове епигенетске промене. Епигенетске промене терпена односе се на варијације повезане са биљним органом, фазом онтогенетског развоја као и утицајима абиотичких и биотичких еколошких фактора. Постоје значајне разлике у саставу терпена између различитих органа исте биљке (Roberts, 1970), као и између органа различите старости (Adams & Hagerman, 1976). Онтогенетске разлике у саставу терпена су претежно последица њихове појачане синтезе у стационарној фази, тј. након завршетка раста и развића биљке. Наиме, један од предуслова продукције секундарних метаболита у ћелији односи се на снабдевеност прекурсора из примарног метаболизма. Како се прекурсори не троше само у секундарном метаболизму већ и за синтезу ћелијских конституената, увек постоји нека врста утркивања између развића и секундарног метаболизма. Крајњи исход такве конкуренције је да секундарни метаболизам почиње након диференцирања, тј. онда када се процес развића успорава (Van der Plas et al., 1995; Roze et al, 2011).

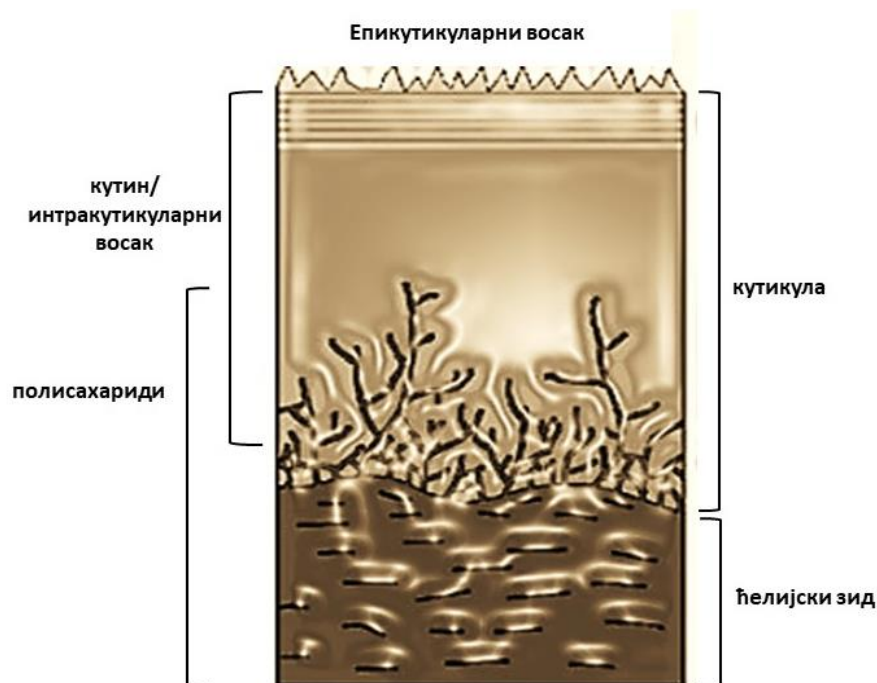
Услед могуће варијабилности терпена као последице утицаја еколошких фактора, а не генетичких разлика између таксона, потребно је широко узорковање материјала и прелиминарно испитивање које се односи на интра- и интерпопулациону варијабилност одређеног таксона. Такође, доследност у поступцима сакупљања и складиштења биљног

материјала као и методама изоловања и анализе предуслови су валидне интерпретације добијених резултата.

С обзиром на то да се терпени одликују великим структурним диверзитетом као и да су прилично широко дистрибуирани у биљном свету, често су коришћени у систематици биљака као хемотаксономски маркери (Roussis et al., 2000; Nikolić et al., 2011; Celiński et al., 2015; Jasińska et al., 2017; Mitić et al., 2017a). Међутим, узимајући у обзир спорадично појављивање терпена у различитим биљним фамилијама које су често филогенетски удаљене, можемо рећи да је њихово коришћење у систематици поуздано пре свега на нижим нивоима класификације (највише до нивоа рода).

### 2.3. Кутикуларни воскови

Насељавање копна од стране биљака десило се пре око 450 милиона година, између осталог, захваљујући развоју заштитиног липидног омотача - кутикуле. Кутикула је мултифункционални, екстрацелуларни липидни слој наталожен на спољашњим зидовима епидермалних ћелија. Присутна је на површини свих надземних зеластих биљних органа; једино секундарна биљна ткива (дрво и кора) и неке маховине могу опстати без њене заштите. Највећи део кутикуле (40-80%) чини нерастворљиви полимер кутин, а мањи део сложена смеша липофилних једињења, тј. восак (слика 2-18). Кутин гради тродимензионалну мрежу у коју је у виду аморфне масе урођен интракутикуларни восак, док се восак наталожен на спољашњој површини кутина назива епикутикуларни восак (Kolattukudy, 1980, 2001). Поред тога у мањим количинама присутна су и кутинизирана полисахаридна влакна - целулоза, хемицелулоза и пектин, која повезују кутикулу са ћелијским зидом (Holloway, 1982, 1994).



Слика 2-18. Шематски приказ грађе кутикуле (прилагођено према Koch et al., 2008).

Због своје полимерне структуре кутин је нерастворљив и не може се екстраховати, док су компоненте воскова растворљиве у неполарним растварачима као што су хексан, бензен, хлороформ, диетил-етар итд. (Koch & Ensikat, 2008). Међутим, постоје и такве компоненте које се не растварају у органским растварачима као што су естолиди у восковима голосеменица (von Rudloff, 1959) или полимерни алдехиди у восковима *Nepenthes* (Riedel et al., 2003). Поларнија једињења воскова, као што су масне киселине, делимично се растварају у поларним растварачима као што су етанол и етил-ацетат (Jeffree, 2006).

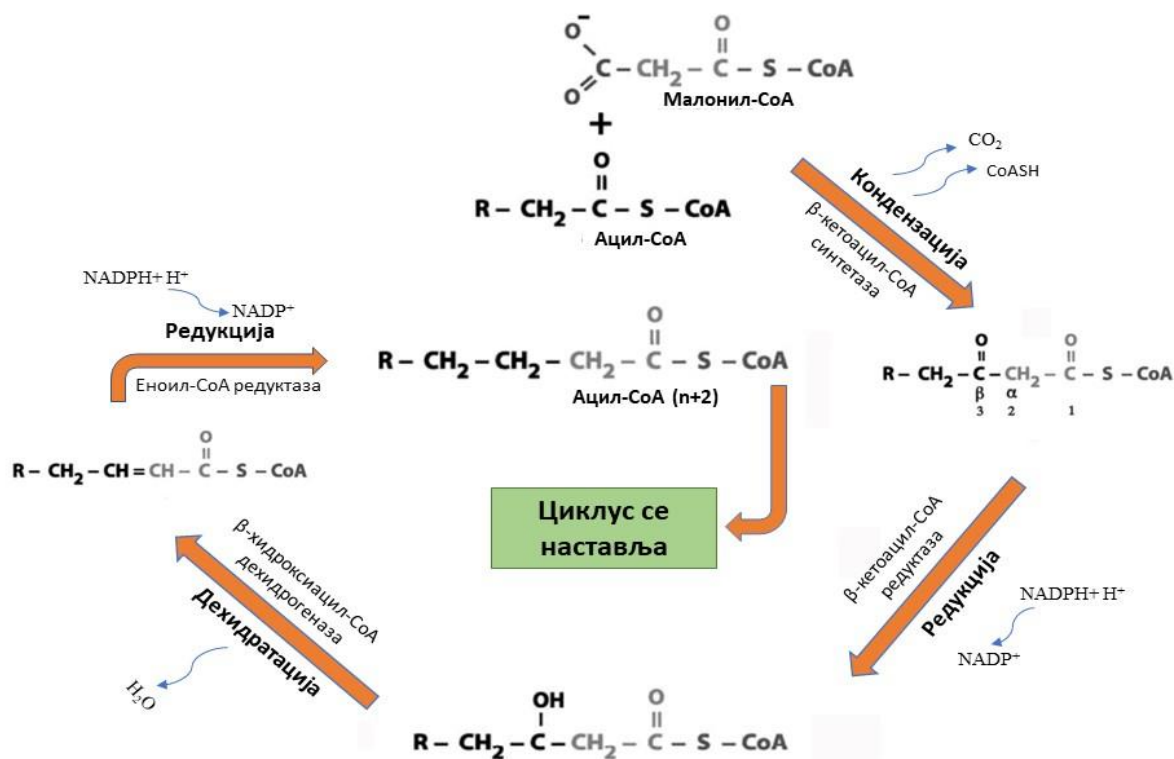
### 2.3.1. Биосинтеза

Биосинтеза компоненти кутикуларних воскова одиграва се у епидермалним ћелијама кроз три фазе:

1. *de novo* биосинтеза масних киселина;
2. биосинтеза масних киселина веома дугог ланца - елонгација;
3. трансформација масних киселина веома дугог ланца у компоненте кутикуларних вокова.

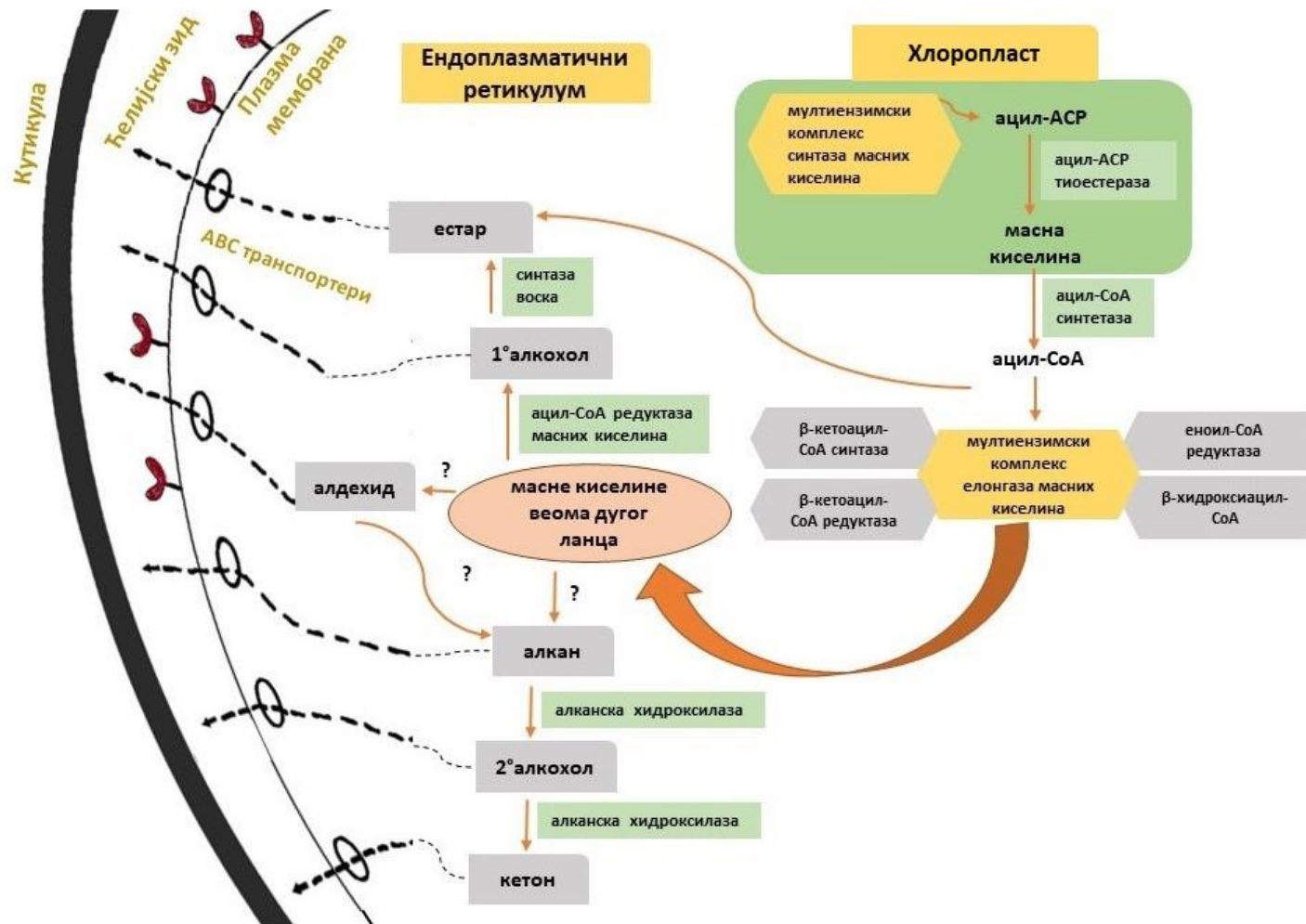
Прекурсори за биосинтезу воскова су  $C_{16}$  и  $C_{18}$  масне киселине које се синтетишу *de novo* у строми хлоропласта уз учешће мултиензимског комплекса који је означен као синтаза масних киселина. Након тога следи елонгација  $C_{16}$  и  $C_{18}$  масних киселина која се одиграва у додиру са мембраном ендоплазматичног ретикулума помоћу мултиензимског комплекса означеним као елонгаза масних киселина. Наиме, од  $C_{16}$  и  $C_{18}$  масних киселина и маноил-коензима А (маноил-СоА) у понављајућем циклусу од четири реакције настају засићене масне киселине веома дугог ланца ( $\geq 20$  С атома). Реакције катализују  $\beta$ -кетоацил-СоА синтаза,  $\beta$ -кетоацил-СоА редуктаза,  $\beta$ -хидроксиацил-СоА дехидратаза и еноил-СоА редуктаза (слика 2-19). Ови ензими секвенцијално продужују ланац ацил-СоА (акцептор угљеника) за два угљеника од малонил-СоА (донор угљеника), затим се одвијају

процеси редукције и дехидратације, и још једна редукциона реакција при чему настаје засићени ацил-CoA (Kunst & Samuels, 2009).



Слика 2-19. Елонгација  $\text{C}_{16}$  и  $\text{C}_{18}$  масних киселина уз помоћ мултиензимског комплекса (β-кетоацил-CoA синтетаза, β-кетоацил-CoA редуктаза, β-хидроксиацил-CoA дехидрогеназа и еноил-CoA редуктаза; прилагођено према Kunst & Samuels, 2009).

Последњи корак је трансформација масних киселина веома дугог ланца у одговарајуће алифатичне компоненте кутикуларних воскова. Код већине биљака, постоје два основна пута бисинтезе једињења воска од масних киселина веома дугог ланца: редукциони пут којим настају примарни алкохоли и естри и пут декарбоксилације који даје алдехиде, алкане, секундарне алкоhole и кетоне (слика 2-20). Након биосинтезе, компоненте воска се акумулирају у мембрани епидермалне ћелије одакле се уз помоћ АТФ-везујућих касетних (ABC, енгл. *ATP-Binding Cassette*) транспортера крећу ка површини биљног органа.



Слика 2-20. Процес трансформације масних киселина веома дугог ланца у одговарајуће алифатичне компоненте воскова (прилагођено према Kunst & Samuels, 2009).

### 2.3.2. Микроморфологија епикутикларних воскова

На површини кутикуле епикутикларни восак формира танак дводимензионални филм и тродимензионалне структуре (тзв. кристалоиде). За воштани филм се раније сматрало да је „аморфан“, међутим, и воштани филм и тродимензионалне структуре су кристалне природе и настају самоудруживањем молекула (Ensikat et al., 2006; Koch & Ensikat, 2008). На глатким површинама биљака епикутикларни восак је присутан у мањим количинама у виду танког воштаног филма који је видљив само микроскопом високе резолуције (Koch & Ensikat, 2008). Кристалоиди нису увек присутни, а када јесу јављају се заједно са воштаним филмом који се налази испод њих (Jeffree et al., 1975; Barthlott et al., 1998; Ensikat et al., 2006; Koch et al., 2006a, 2008). У неким случајевима епикутикларни воскови се могу видети голим оком као беле или плаве превлаке на површини биљних органа (нпр. код плода грожђа или шљиве). Ови беличасти воштани омотачи су последица рефлексије дела видљивог дела спектра електромагнетног зрачења од стране кристалоида (Barthlott et al., 2017).

Кристалоиди углавном имају карактеристичан облик (љуспе, плочице, штапићи, тубуле (цевчице), кончасте структуре, итд.) и величину (0,5-100  $\mu\text{m}$ ) (Koch et al., 2008). Генерално, имају неправилну дистрибуцију, мада могу бити и паралелно распоређени, концентрисани око и унутар стома или код неких врста груписани у специфичне асамбле (розете љуспица, кластери тубула, кластери штапића, лонгитудинално удружени штапићи итд.; Barthlott et al., 1998). Бројне студије су уз помоћ скенирајуће електронске микроскопије (SEM, енгл. *Scanning Electron Microscopy*) показале да се кристалоиди карактеришу великим микроморфолошким диверзитетом (Jeffree, 2006; Koch et al., 2008; Tomaszewski & Zieliński, 2014; Ramos, 2015; Barthlott et al., 2017). Прву класификацију епикутикларних воскова предложили су *Amelunxen* и сар. (1967). Након тога су *Barthlott* и сар. (1998) и *Jeffree* (2006) дали детаљнији преглед микроморфолошких типова воскова. Наиме, највећи број микроморфолошких типова (23) предложили су *Barthlott* и сар. (1998), који су уједно дали преглед корелација структуре и хемијског састава воска. Са друге стране, *Jeffree* (2006) разликује шест микроморфолошких типова воска укључујући и воштани филм.



Доминантан тип кристалоида код многих голосеменица (*Ginkgo*, *Chamaecyparis*, *Taxus*, *Picea*, *Agathis*, *Pseudotsuga*, *Pinus*, *Abies*) јесу тубуле (Jeffree et al., 1975, 1976). Тубуле су цилиндрични, шупљи кристалоиди са терминалним отвором. Међутим, у многим студијама тубуле су погрешно интерпретиране као штапићи (Hallam, 1967, 1970; Johnson & Jeffree, 1970; Jeffree et al., 1975, 1976). Основна разлика између тубула и штапића огледа се у томе што је врх штапића без отвора, углавном неправилног, кружног, троугластог или полигоналног облика (Barthlott et al., 1998). Међутим, на SEM микрографијама није увек могуће направити разлику, с обзиром на то да су терминални отвори тубула често замагљени или се не виде због ограничене резолуције (Jeffree, 2006). Такође, постоје и прелазне форме кристалоида између тубула и штапића (Barthlott et al., 1998). На основу хемијског састава, тубуле се могу поделити у две групе: тубуле богате нонакозан-10-олом и тубуле богате  $\beta$ -дикетонима. Оба типа тубула су по изгледу врло слична и тешко их је разликовати на SEM микрографијама. Наиме, угао гранања је најважнија карактеристика за њихово разликовање, при чему нонакозанол-тубуле одликује прав угао гранања, док се  $\beta$ -дикетон-тубуле гранају под оштрим углом (Barthlott et al., 1998).

За голосеменице су углавном карактеристичне нонакозанол-тубуле (Riederer, 1989). Код многих представника фамилије Pinaceae, тубуле на четинама показују тенденцију концентрисања унутар стома као и на површинама између стома у редовима које стоме формирају (Crossley & Fowler, 1986; Tomaszewski & Zieliński, 2014; Mitić et al., 2017b). Међутим, на избојцима ситуација може бити потпуно другачија. На пример, код *Abies pinsapo* Boiss. тубуле на четинама су углавном концентрисане у близини стома, док су на избојцима мање-више равнмерно распоређене (Tomaszewski & Zieliński, 2014).

У току времена, тубуле на површини листова четинара постепено деградирају у аморфну воштану масу као резултат старења, иако овај процес може бити значајно убрзан различитим спољашњим факторима (Wells & Franich, 1977; Crossley & Fowler, 1986; Jeffree, 2006). Међутим, епикутикуларни восак одликује и способност рекристализације захваљујући којој може поново да успостави и одржи тродимензионалну структуру (Fox, 1958; Schulze et al., 1989). Дакле, након деградације аморфна воштана маса има способност рекристализације и поновног формирања кристалоида. Ипак, у току времена

главна тенденција епикутуларног воска јесте деградација кристалоида и формирање аморфне воштане масе у све већој количини, са све мањим степеном рекристализације.

С обзиром да су микроморфолошки типови епикутуларног воска као и њихов образац оријентације карактеристични за поједине биљне таксоне, они се могу користити и у систематици биљака (Herbin & Sharma, 1969; Hanover & Reicosky, 1971; Hennig et al., 1994; Barthlott et al., 2003). Barthlott и сар. (2003) су дали детаљан преглед микроморфолошких типова воска код 13000 биљних врста, узимајући у обзир све групе копнених биљака. Међутим, код четинара највише је проучаван утицај различитих загађивача из спољашње средине на структуру епикутуларног воска, обзиром да различити средински фактори могу убрзати деградацију кристалоида у аморфну воштану масу (Cape & Fowler, 1981; Huttunen & Laine, 1983; Riding & Percy, 1985; Crossley & Fowler, 1986; Bermadinger et al., 1987; Tuomisto, 1988; Ваџић et al., 2005). Из тог разлога се стање епикутуларних кристалоида, односно формирање аморфне воштане масе сматра индикатором загађености ваздуха (Crossley & Fowler, 1986; Tuomisto, 1988).

### **2.3.3. Повезаност између хемијског састава и микроморфологије епикутуларних воскова**

Одређени микроморфолошки типови воска често су повезани са присуством специфичних хемијских компоненти што указује на њихову корелисаност (Baker, 1982; Walton, 1990; Bianchi, 1995). Данас је општеприхваћено да тип кристалоида зависи од хемијског састава воска, при чему доминантне компоненте имају највећи утицај (Jeffree et al., 1976; Baker, 1982). На пример, секундарни алкохол нонакозан-10-ол представља доминантну компоненту кутикуларног воска многих голосеменица (*Abies*, *Ginkgo*, *Picea*, *Pinus*, *Taxus*) и сматра се одговорним за формирање тубуларне микроструктуре епикутуларног воска код ових биљака (Matas et al., 2003; Jeffree, 2006). Поред нонакозан-10-ола, на формирање тубула могу да утичу и  $\beta$ -дикетони (Hallam, 1970; Jeffree et al., 1975), док се појава љуспи углавном повезује са доминацијом примарних алкохола (Jeffree et al., 1975), појава штапића са доминацијом кетона и алкана, а воштани филм са

доминацијом масних киселина и примарних алкохола са 22, 24 и 26 C атома (Ensikat et al., 2006).

У експериментима *in vitro* показано је да нонакозан-10-ол може рекристалисати у тубуле, али под одређеним условима и у друге микроморфолошке типове што указује да хемијски састав воска има формативан, али не и искључиви утицај на формирање одређеног типа кристалоида (Koch & Ensikat, 2008). Такође, микроморфологија кристалоида није увек одређена само доминантном компонентом воска или класом доминантних компоненти. Пример су трансверзални штапићи који садрже у већој количини хентриаконтан-16-он (палмитон), али који не одређује самостално њихову структуру (Meusel et al., 1999). На формирање ових кристалоида утичу све компоненте које улазе у састав воска, што значи да они не могу да рекристалишу само од палмитона, већ су непоходне и остале компоненте присутне у мањим количинама.

За одређивање тачног хемијског састава кристалоида и доприноса специфичних хемијских компоненти у њиховом формирању, неопходне су методе које би омогућиле изоловање и анализу самих кристалоида. Иако је хемијски састав воскова код различитих група копнених биљака интензивно истраживан до сада (Baker, 1982; Riederer and Markstädter, 1996; Kunst and Samuels, 2003; Jetter et al., 2006), у већини истраживања је испитиван укупан кутикуларни восак, односно није прављена разлика између епикутикуларног и интракутикуларног воска. Разлика у хемијском саставу између ова два воштана слоја може се направити након селективног изоловања и анализе, најпре епикутикуларног, а затим и интракутикуларног воска: механички или крио-адхезином техником са водом (Koch et al., 2006a, 2006b; Koch & Ensikat, 2008). Међутим, још увек није познато да ли се уз помоћ ових метода епикутикуларни восак уклања у потпуности.

У већини случајева, кутикуларни воскови биљака представљају смешу дуголанчаних алифатичних компоненти (20-40 C атома, у случају естара и до 60), као што су *n*-алкани, масне киселине, алкохоли, алдехиди, кетони, естри итд. (Barthlott et al., 1998; Müller & Riederer, 2005; Koch & Ensikat, 2008). Поред тога, могу се јавити и цикличне компоненте као што су пентациклични тритерпени или флавоноиди (Barthlott & Wollenweber, 1981; Baker, 1982; Holloway, 1984; Walton, 1990). Код неких врста јављају се и полимерне компоненте као што су полимеризовани алдехиди који се слабо растварају у хлороформу.

Такође, воскови четинара могу да садрже и естолиде као што су олигомерне хидрокси масне киселине (von Rudloff, 1959). Треба напоменути да хемијски састав воска може бити варијабилан између различитих органа исте биљке или се могу јавити промене под утицајем различитих еколошких фактора или онтогенетског развоја (Jetter & Schäffer, 2001; Jetter et al., 2006).

### 2.3.4. Биолошка улога

Кутикуларни воскови представљају веома ефикасну транспортну баријеру и спречавају неконтролисан губитак воде транспирацијом. Основна улога интракутикуларног воска јесте смањење стопе кутикуларне транспирације (Riederer & Schreiber, 1995). Међутим, епикутикуларни восак контролише и стоматерну транспирацију. Наиме, у стомином отвору може бити присутна различита количина воска, од тога да восак у потпуности затвори отвор, до тога да уопште не буде присутан (Hanover & Reicosky, 1971). Стомини отвори испуњени воском могу смањити стопу транспирације за 1/3 (Jeffrey et al., 1971). Поред тога, кутикуларни воскови имају улогу у одбрани биљке од патогена (Müller, 2006), учествују у различитим интеракцијама са инсектима или хербиворима (Eigenbrode & Espelie, 1995), док рефлексом или апсорпцијом ултравиолетног (UV, енгл. *UltraViolet*) зрачења штите DNA и смањују интензитет светлости (Reicosky & Hanover, 1978; Pfündel et al., 2006). Веома успешна стратегија одбране од патогена је могућност самочишћења супер-хидрофобних површина („лотосов ефекат“), с обзиром да је адхезија патогена, капљица воде, као и других партикула на њима сведена на минимум. Ово је могуће услед хидрофобности и неравне површине епикутикуларног воска на микрометарском нивоу, тј. присуства кристалоида на површини биљних органа (Barthlott & Neinhuis, 1997).

### 2.3.5. Варијабилност и употреба компоненти кутикуларних воскова у таксономским истраживањима

*n*-Алкани су једна од најзаступљенијих компоненти кутикуларних воскова, при чему код већине биљака алкани непарног низа доминирају у односу на алкане парног низа. Такође, *n*-алкани су једна од најчешће коришћених група секундарних метаболита биљака у систематици биљака из више разлога: 1) универзално су присутни код копнених биљака; 2) карактерише их изузетна хемијска стабилност (не садрже функционалне групе) тако да се могу изоловати и из хербарског као и фосилног материјала; 3) лако се изолују и идентификују; и 4) често показују специјес специфичну дистрибуцију.

Иако је бисинтеза компоненти кутикуларних воскова под снажном генетичком контролом, постоји одређен степен њихове варијабилности као последице утицаја различитих еколошких фактора (Dodd & Afzal-Rafii, 2000). Једна од основних функција биљне кутикуле огледа се у спречавању неконтролисаног губитка воде транспирацијом. Пропустљивост биљне кутикуле пре свега зависи од дебљине липидног слоја на површини биљног органа. Бројна истраживања су показала да је количина воска коју биљка продукује обрнуто пропорцијална количини падавина, а расте са порастом температуре (Rajčević, 2015; Mitić et al., 2020). Такође, утврђено је да кутикуларне воскове биљака, које се јављају у топлијим и сувљим климатским условима, одликује већи садржај *n*-алкана веома дугог низа (Dodd et al., 1998). Наиме, што су ланци алифатичних једињења воска дужи, формира се хомогенији слој кроз који молекули воде теже могу да дифундују. Према томе, пропустљивост кутикуле зависи и од састава и организације самих једињења воска унутар ње. У сваком случају, услед могуће варијабилности састава кутикуларних воскова као последице утицаја еколошких фактора, а не генетичких разлика између таксона, неопходно широко узорковање материјала и прелиминарно испитивање које се односи на интра- и интерпопулациону варијабилност одређеног таксона. Осим тога, доследност у поступцима сакупљања и складиштења биљног материјала као и метода изоловања и анализе предуслови су валидне интерпретације добијених резултата.

Хемотаксономски значај *n*-алкана потврђен је у великом броју радова и то на различитим нивоима класификације (Marin, 2003): на нивоу фамилија (Herbin & Robins, 1968a; Tulloch, 1981; Maffei, 1996; Maffei et al., 2004), родова (Herbin & Robins, 1968b;

Corrigan et al., 1978; Maffei et al., 2004), подродова (Li et al., 2012), врста (Oros et al., 1999; Nikolić et al., 2013; 2018) као и детекцији хибрида (Dempsey et al., 2003).

### **3. ЦИЉЕВИ РАДА**

Услед великог таксономског, еколошког и економског значаја, биљни хибриди се већ дуго налазе у фокусу различитих типова истраживања. Наиме, формирање нових хибридних таксона је од огромног значаја како са таксономског аспекта (идентификација нових таксона), тако и због њихове еколошке и/или економске супериорности у односу на родитељске врсте. С обзиром на велики значај хибридизације у еволуцији биљака, од велике је важности тачно идентификовати хибридне јединке и/или хибридне популације.

Узимајући у обзир сва досадашња истраживања, постоје три главна проблема везана за утврђивање географске дистрибуције *A. x borisii-regis*: 1) скоро сва досадашња истраживања изведена су на популационом нивоу, што је омогућило идентификацију хибридних популација (али не и хибридних јединки), тако да су читаве популације приписиване једном од три балканска *Abies* таксона на основу морфо-анатомских (Mitsopoulos & Panetsos, 1987; Jasińska et al., 2017; Litkowiec et al., 2021), фитохемијских (Mitsopoulos & Panetsos, 1987) или DNA маркера (Liepelt et al., 2010; Bella et al., 2014; Krajmerová et al., 2016; Litkowiec et al., 2021). Према томе, ниједна од наведених студија није спроведена на индивидуалном нивоу и самим тим није утврдила постојање мешовитих популација у којима се јављају два или чак сва три балканска *Abies* таксона; 2) услед велике морфолошке варијабилности иста популација је од стране различитих аутора приписивана различитим таксонима (најчешћи случај са бугарским и северномакедонским популацијама класификованим као *A. alba* или *A. x borisii-regis*), што је условило извођење различитих закључака; и 3) веома мали број досадашњих студија је спроведен на већем делу потенцијалог ареала *A. x borisii-regis* укључујући ширу прелазну зону између *A. alba* и *A. cephalonica* (Krajmerová et al., 2016).

Недавно су Siskas и сар. (2023) по први пут спровели идентификацију три балканска *Abies* таксона на индивидуалном нивоу користећи специјес специфичне cpDNA (хлоропластна DNA) и mtDNA (митохондријална DNA) маркере и тиме омогућили увид у њихову дистрибуцију на скоро читавој територији Грчке (осим североисточног дела). Према поменутиим ауторима, скоро све проучаване популације одликују се присуством *A. x borisii-regis* јединки, при чему је њихов број веома мали у популацијама из јужне и централне Грчке, али већи у северном делу земље. Изузетак су популације са острва Кефалонија и најјужнијег врха Пелопонеза - Тајгетос које представљају чисте *A. cephalonica* популације.



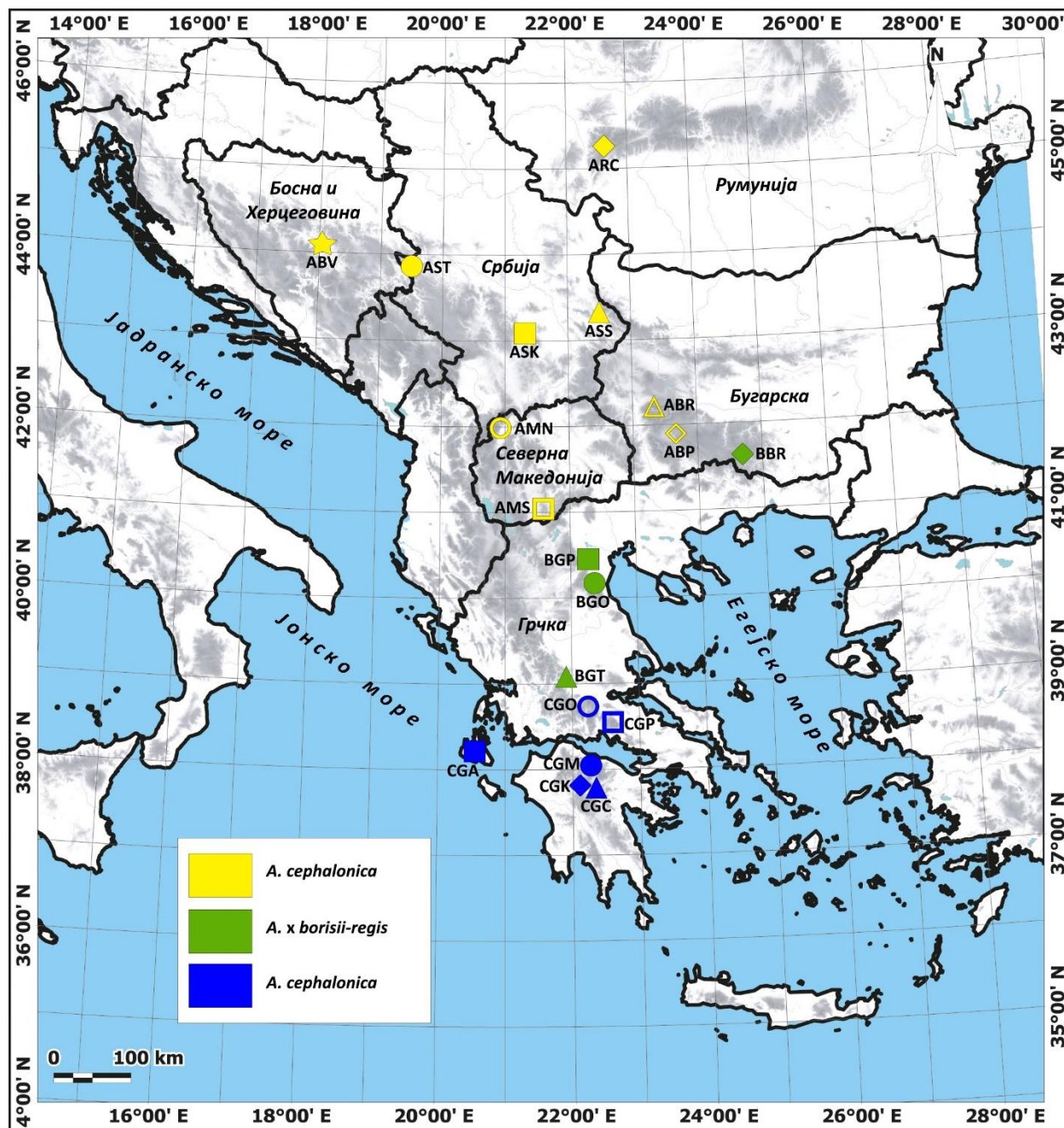
Основни циљеви овог научног истраживања могу се представити у неколико теза:

1. Узорковање материјала врста *A. alba*, *A. x borisii-regis* и *A. cephalonica* на подручју Балканског полуострва укључујући скоро цео потенцијални ареал хибридног таксона;
2. Анализа морфо-анатомских карактеристика четина доњег и горњег низа;
3. Изоловање испарљивих терпена четина (статички хедспејс и хидродестилација по Клевенџеру);
4. Изоловање кутикуларних воскова са површине четина (екстракција укупног кутикуларног воска неполарним раставарачем);
5. Анализа хедспејс испарљивих компоненти, етарских уља и екстраката воска помоћу гасне хроматографије-масене спектрометрије (GC-MS);
6. Одређивање микроморфолошких типова кристалоида епикутуларног воска на површини четина различите старости помоћу скенирајуће електронске микроскопије (SEM);
7. Анализа варијабилности и диференцијације балканских *Abies* таксона на основу морфо-анатомских, микроморфолошких и фитохемијских карактеристика;
8. Издвајање високо варијабилних карактеристика, као и оних ниско варијабилних у оквиру истраживаних таксона;
9. Дефинисање карактеристика значајних за диференцијацију испитиваних таксона, односно издвајање карактеристика које се могу користити као поуздане у идентификацији;
10. Утврђивање да ли и у којој мери постоји подударност између морфо-анатомске, микроморфолошке и фитохемијске диференцијације таксона.
11. Идентификација хибридних популација;
12. Сагледавање контроверзног таксономског статуса, дистрибуције и порекла *A. x borisii-regis*;
13. Утврђивање потенцијалне корелације између различитих абиотичких еколошких фактора (географских, орографских, геолошких и биоклиматских) и фитохемијских маркера.

## **4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО**

## 4.1. Биљни материјал

Биљни материјал (гранчице са четинама) из 19 аутохтоних популација *A. alba*, *A. x borisii-regis* и *A. cephalonica* сакупљен је на подручју Балканског полуострва и јужних Карпата током лета и ране јесени у периоду од 2017. до 2020. године. Таксономска идентификација узорака на индивидуалном нивоу је била отежана, с обзиром на то да су јединке често представљале морфолошке прелазе између морфотипова описаних од стране *Mattfeld* (1930). Међутим, на популационом нивоу, преовлађујући морфотипови су углавном били у сагласности са *a priori* класификацијом базираној на географској дистрибуцији ових таксона према *Farjon* и *Filer* (2013). Мапа истраживаног подручја са локацијама одабраних популација испитиваних таксона приказана је на **слици 4-1**, а одговарајући географски и геолошки подаци, број проучаваних јединки, датум сакупљања, као и подаци о ваучерима за сваку популацију наведени су у **табели 4-1**. У свим популацијама је одабрано по 15 адултних јединки које су биле међусобно удаљене најмање 30 m, изузев популација са Централних Родопа (Бугарска) и Јужних Карпата (Румунија) где је издвојено 14 и 5 јединки, респективно. Приликом одабира јединки тежило се просторном покривању целокупне популације одабирајући стабла на што већој хоризонталној и вертикалној удаљености у зависности од величине одабране популације. Такође, одабране су искључиво неоштећене и неинфициране адултне јединке (без трагова напада биљоједа или патогена), због потенцијалног утицаја биотичког стреса на продукцију терпена и компоненти кутикуларних воскова. Есикати за сваки локалитет са ког је сакупљен материјал су депоновани у „*Herbarium Moesiacum Niš*“ (HMN) Департмана за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу.



Слика 4-1. Географски положај истраживаних популација *A. alba*, *A. x borisii-regis* и *A. cephalonica* на подручју Балканског полуострва и јужних Карпата. Карактеристике локалитета дате су у табели 4-1.

Табела 4-1. Локалитети и станишне карактеристике испитиваних популација *A. alba*, *A. x borisii-regis* и *A. cephalonica*.

Таксон	Локалитет	Акроним	Географска ширина (N)	Географска дужина (E)	Надморска висина (m)	Геолошка подлога	Број анализираних јединки	Датум сакупљања	Број ваучера	Анализа <sup>1</sup>
<i>A. alba</i>	Босна и Херцеговина, Враница, Прокошко језеро	ABV	43°57'32"	17°45'15"	1600	Силикат	15	Јун, 2020	14391 HMN	а, г
<i>A. alba</i>	Румунија, Јужни Карпати, Трансфегарашан	ARC	45°23'30"	24°37'56"	957	Силикат	5	Август, 2018	13950 HMN	б
<i>A. alba</i>	Србија, Тара, Предов Крст	AST	43°56'21"	19°18'34"	1096	Кречњак	15	Јун, 2018	13949 HMN	а, б, г, д
<i>A. alba</i>	Србија, Копаоник, Кадијевац	ASK	43°19'43"	20°45'41"	1350	Силикат	15	Јун, 2017	13946 HMN	а, б, г
<i>A. alba</i>	Србија, Стара планина, Арбиње	ASS	43°18'25"	22°47'18"	1295	Силикат	15	Август, 2018	13944 HMN	а, б, в, г
<i>A. alba</i>	Северна Македонија, Шар-планина, Лешница	AMS	42° 1'17"	20°47'04"	1505	Кречњак	15	Август, 2017	13945 HMN	а, б, г
<i>A. alba</i>	Северна Македонија, Нице	AMN	40°58'54"	21°47'31"	1900	Силикат	15	Август, 2018	13948 HMN	а, б, г
<i>A. alba</i>	Бугарска, Пирин, изнад Банског	ABP	41°48'6.4"	23°28'33"	1290	Силикат	15	Октобар, 2018	13942 HMN	а, б, г
<i>A. alba</i>	Бугарска, Рила, изнад Рилског манастира	ABR	42° 09'17"	23°24'49"	1536	Силикат	15	Октобар, 2018	13947 HMN	а, б, г
<i>A. x borisii-regis</i>	Бугарска, Централни Родопи, Пампорово	BBR	41°39'01"	24°41'40"	1620	Силикат	14	Септембар, 2020	14389 HMN	а, б, г
<i>A. x borisii-regis</i>	Грчка, Пијерија, Фтери	BGP	40°11'47"	22°10'48"	921	Силикат	15	Октобар, 2018	13943 HMN	а, б, в, г
<i>A. x borisii-regis</i>	Грчка, Олимп, изнад Лептокарије	BGO	40° 01'54"	22°30'25"	640	Кречњак	15	Октобар, 2018	13951 HMN	а, б, г, д

<i>A. x borisii-regis</i>	Грчка, Тимфростос, Селос	BGT	38°54'33"	21°54'36"	971	Кречњак	15	Септембар, 2019	13997 HMN	а, б, г
<i>A. cephalonica</i>	Грчка, Ета	CGO	38°44'15"	22°22'54"	895	Кречњак	15	Септембар, 2019	14002 HMN	а, б, г
<i>A. cephalonica</i>	Грчка, Парнас, Плејаде	CGP	38°33'06"	22°34'10"	1660	Кречњак	15	Септембар, 2019	14001 HMN	а, б, г
<i>A. cephalonica</i>	Грчка, Пелопонез, манастир Мега Спилеон	CGM	38°05'17"	22°10'23"	860	Кречњак	15	Септембар, 2019	14000 HMN	а, б, г
<i>A. cephalonica</i>	Грчка, Пелопонез, Хелмос, Калаврита	CGK	38°00'41"	22°09'52"	1368	Кречњак	15	Септембар, 2019	13998 HMN	а, б, г
<i>A. cephalonica</i>	Грчка, Пелопонез, Хелмос	CGC	38°00'56"	22°10'57"	1550	Кречњак	15	Септембар, 2019	13999 HMN	а, б, в, г
<i>A. cephalonica</i>	Грчка, Кефалонија, Енос	CGA	38°09'37"	20°37'13"	1005	Кречњак	15	Јул, 2019	13996 HMN	а, б, г, д

<sup>1</sup>Анализа: а – морфо-анатомске карактеристике; б – HS испарљиве компоненте; в - етарска уља; г – компоненте кутикуларних воскова; д – микрофологија епикутикуларних воскова

Морфо-анатомска анализа четина укључила је укупно 269 јединки из 18 популација сва три таксона (**табела 4-1** и **слика 5-4**). За сваку јединку посебно издвојено је 20 четина (по 10 из доњег и горњег низа) из централног дела двогодишње гранчице. Четине су одмах након узорковања конзервисане у 70% алкохолу и тако чуване до даље анализе.

За анализу HS испарљивих компоненти сакупљен је материјал 259 јединки из 18 популација сва три таксона (**табела 4-1** и **слика 5-12**), док је анализа кутикуларних воскова укључила идентичан узорак као морфо-анатомска анализа, тј. 269 јединки из 18 популација (**табела 4-1** и **слика 5-25**). Узорак сваког појединачног стабла (око 5 g двогодишњих четина за HS односно 10 g за кутикуларне воскове) стављен је у засебну зип кесицу заједно са ознаком локалитета, датумом сакупљања и редним бројем јединке како не би дошло до мешања узорака. За анализу етарских уља сакупљен је материјал (око 400 g гранчица са четинама) из по једне популације сваког испитиваног таксона: *A. alba* - Србија, Стара планина; *A. x borisii-regis* - Грчка, Пијерија; и *A. cephalonica* - Грчка, Пелопонез, Хелмос (**табела 4-1**).

Микроморфолошка анализа епикутуларних воскова четина различите старости укључила је по једну јединку сва три таксона са следећих локалитета: *A. alba* - Србија, Копаоник; *A. x borisii-regis* - Грчка, Олимп; и *A. cephalonica* - Грчка, Кефалонија, Енос (**табела 4-1**). За сваку јединку посебно издвојено је 6 четина, тј. по две четине из централног дела једно-, дво-, и трогодишње гранчице.

Биљни материјал за фитохемијска и микроморфолошка истраживања је на терену одмах пакован у зип кесице и чуван у теренском фрижидеру до доласка у лабораторију. У лабораторији је део материјала за микроморфолошка истраживања одвојен и осушен (на собној температури) у трајању од 7 дана, док је за фитохемијска истраживања чуван у замрзивачу (на -20 °C) до момента даље употребе.

## 4.2. Абиотички еколошки параметри

Географски положај локалитета истраживаних популација одређен је уз помоћ GPS уређаја (GPS Garmin eTrex Vista® C). Подаци о надморској висини за истраживане локалитете су преузети из SRTM (енгл. *Shuttle Radar Topography Mission*) дигиталног елевационог модела резолуције 90 x 90 m (Farr et al., 2007) помоћу софтвера ArcGIS 10 (ESRI, 2011). Резултати су приказани у **табели 4-1**.

Екстракција биоклиматских параметра локалитета из WorldClim сета глобалних климатских лејера је извршена помоћу софтвера DIVA-GIS 7.5. (Hijmans et al., 2005, 2012).

Списак биоклиматских параметара:

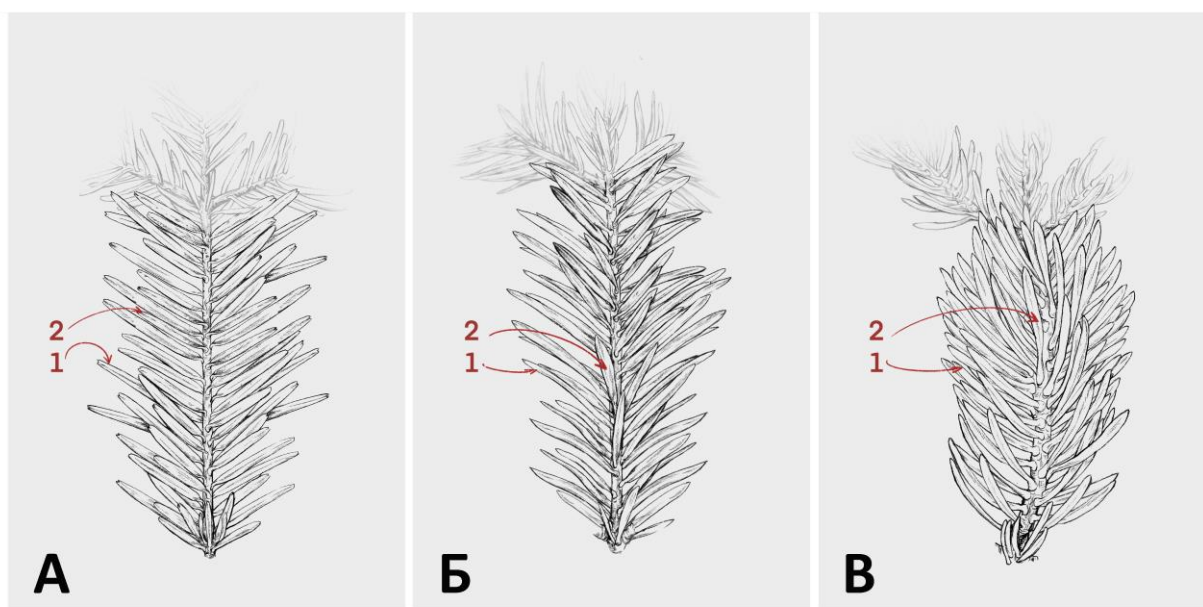
<b>BIO1</b>	средња годишња температура
<b>BIO2</b>	средњи дневни опсег (средња вредност разлике температурних минимума и максимума у току месеца)
<b>BIO3</b>	изотермалност (BIO2/ BIO7)*100
<b>BIO4</b>	температурна сезоналност (стандардна девијација * 100)
<b>BIO5</b>	највиша температура најтоплијег месеца
<b>BIO6</b>	најмања температура најхладнијег месеца
<b>BIO7</b>	температурни опсег (BIO5-BIO6)
<b>BIO8</b>	средња температура највлажнијег квартала
<b>BIO9</b>	средња температура најсувљег квартала
<b>BIO10</b>	средња температура најтоплијег квартала
<b>BIO11</b>	средња температура најхладнијег квартала
<b>BIO12</b>	укупне годишње падавине
<b>BIO13</b>	укупне падавине у највлажнијем месецу
<b>BIO14</b>	укупне падавине у најсушнијем месецу
<b>BIO15</b>	сезоналност падавина (кофицијент варијације)
<b>BIO16</b>	укупне падавине у највлажнијем кварталу



<b>ВІО17</b>	укупне падавине у најсушнијем кварталу
<b>ВІО18</b>	укупне падавине у најтоплијем кварталу
<b>ВІО19</b>	укупне падавине у најхладнијем кварталу

### 4.3. Морфо-анатомска анализа

Морфо-анатомска анализа четина укључила је укупно 269 јединки из 18 популација сва три истраживана таксона (табела 4-1 и слика 5-4). За сваку јединку посебно издвојено је 20 четина (по 10 из доњег и горњег низа) из централног дела двогодишње гранчице. Компаративни приказ распореда четина на горњој страни двогодишње гранчице код истраживаних *Abies* таксона дат је на слици 4-2. Четине су одмах након узорковања конзервисане у 70% алкохолу и тако чуване до даље анализе.



Слика 4-2. Компаративни приказ распореда четина на горњој страни двогодишње гранчице истраживаних *Abies* таксона: А) *A. alba*; Б) *A. x borisii-regis*; и В) *A. cephalonica* (1 – четине доњег низа, 2 – четине горњег низа. Илустрација: др Димитрија Савић Здравковић).

Десет четина (по 5 из доњег и горњег низа) коришћено је за морфометријску анализу, а друга група од 10 је коришћена за припрему нативних препарата попречних пресека четина за потребе анатомских мерења. Морфометријска анализа обухватила је мерења 11 квантитативних карактеристика четина приказних у **табели 4-2**. Припрема препарата рађена је на предметним плочицама уз помоћ пинцета и игала. Као подлога препарата код фотографисања коришћен је милиметарски папир (**слика 4-3**). Квантитивне карактеристике мерене су коришћењем програма Digimizer Image Analysis софтвера (MedCalc Software©, Belgium), на предходно направљеним фотографијама.

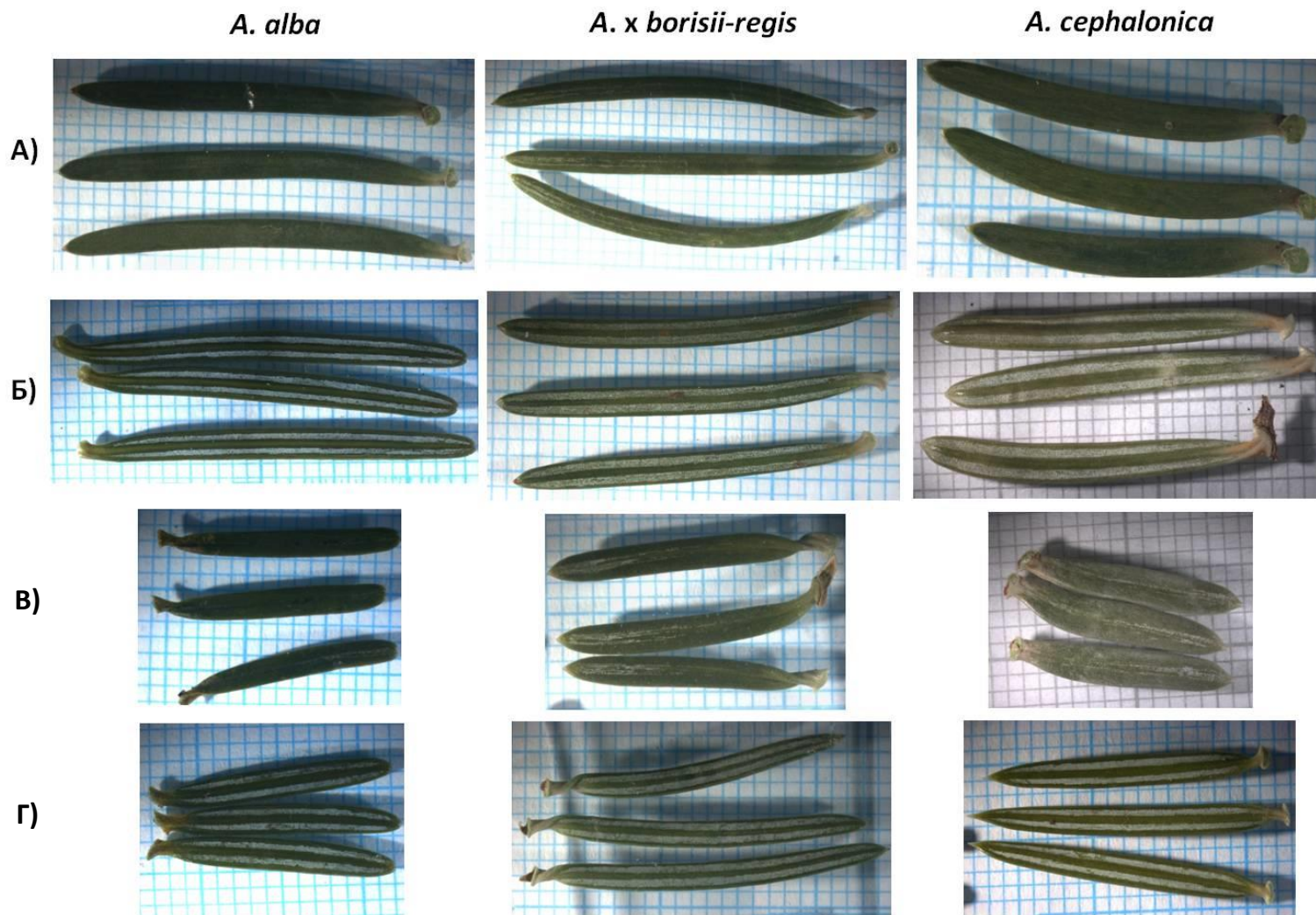
За израду нативних препарата направљени су попречни пресеци четина на мануелном микротому (Gligorijević & Rejčinović, 1983). Након тога су попречни пресеци фотографисани на Leica DM 1000 (Leica Microsystem, Germany) микроскопу (**слика 4-4**). Квантитивне анатомске карактеристике четина мерене су коришћењем програма ImageJ софтвера (Schneider et al., 2012), на предходно направљеним фотографијама. Анализа је обухватила мерења 15 анатомских карактеристика четина на основу којих је израчунато још 8 односа (**табела 4-2**).

**Табела 4.2.** Преглед анализираних квантитативних морфо-анатомских карактеристика четина.

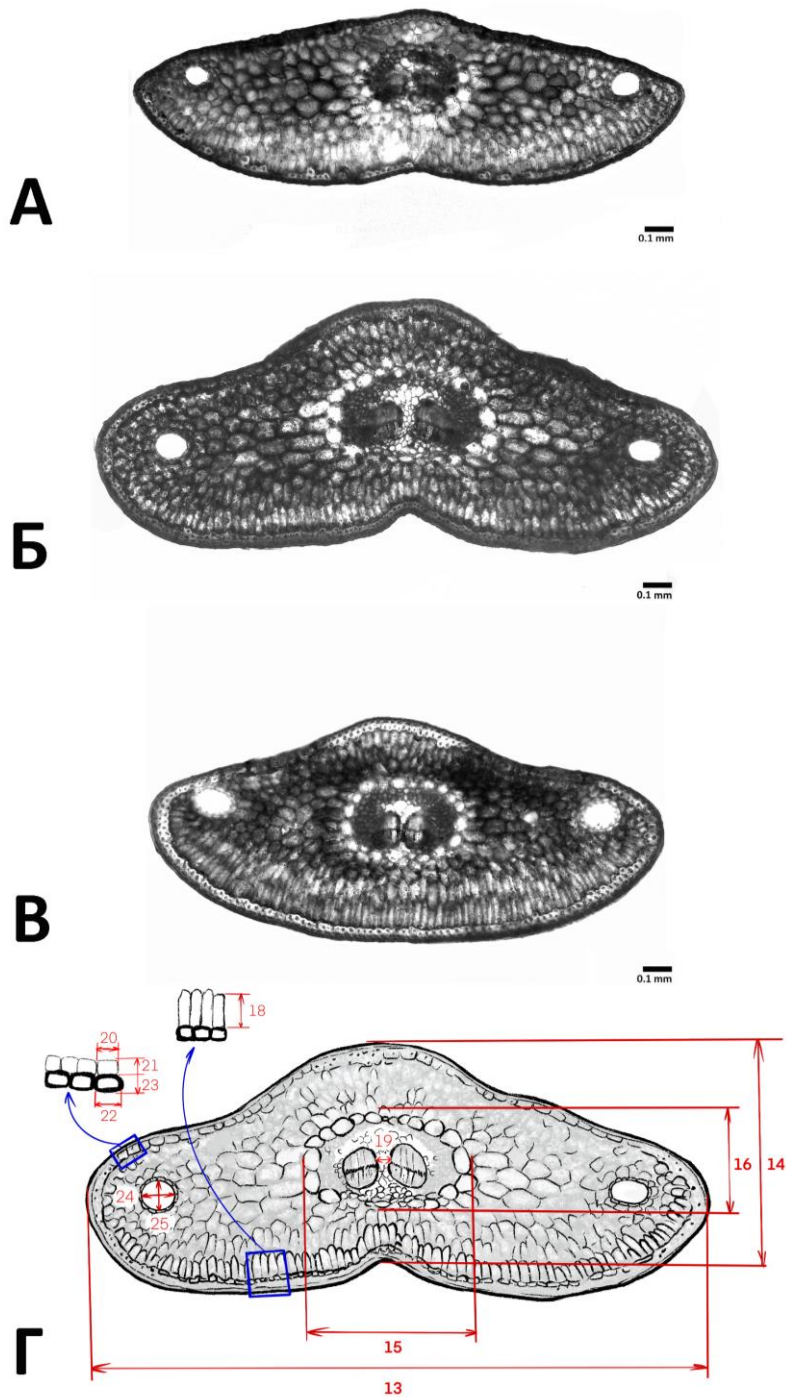
Р. бр.	Морфо-анатомске карактеристике четина	Акроним
<i>Мерене карактеристике</i>		
1.	Површина четине (mm <sup>2</sup> )	П
2.	Обим четине (mm)	О
3.	Дужина четине (mm)	Д
4.	Максимална ширина четине (mm)	МШ
5.	Ширина четине на 95% њене дужине (mm)	Ш_95
6.	Ширина четине на 50% њене дужине (mm)	Ш_50
7.	Растојање од базе четине до њене максималне ширине (mm)	РБШ
8.	Број редова стома на централном делу лица четине	БРЛ
9.	Број стома на 1 mm централног дела лица четине	БСЛ
10.	Број редова стома на централном делу наличја четине	БРН
11.	Број стома на 1 mm централног дела наличја четине	БСН
12.	Површина попречног пресека четине (μm <sup>2</sup> )	ПП

13.	Ширина попречног пресека четине ( $\mu\text{m}$ )	ШП
14.	Дебљина четине на попречном пресеку ( $\mu\text{m}$ )	ДП
15.	Ширина ендодермиса ( $\mu\text{m}$ )	ШЕ
16.	Висина ендодермиса ( $\mu\text{m}$ )	ВЕ
17.	Број слојева палисадног ткива	БСП
18.	Висина једног од слојева палисадног ткива ( $\mu\text{m}$ )	ВСП
19.	Растојање између проводних снопића ( $\mu\text{m}$ )	РС
20.	Ширина епидермалне ћелије ( $\mu\text{m}$ )	ШЕЋ
21.	Висина епидермалне ћелије ( $\mu\text{m}$ )	ВЕЋ
22.	Ширина хиподермалне ћелије ( $\mu\text{m}$ )	ШХЋ
23.	Висина хиподермалне ћелије ( $\mu\text{m}$ )	ВХЋ
24.	Ширина смоног канала ( $\mu\text{m}$ )	ШС
25.	Висина смоног канала ( $\mu\text{m}$ )	ВС
26.	Број смоних канала	БС
	<b>Односи</b>	
27.	Облик попречног пресека четине [ШП/ ДП]	ОП
28.	Облик ендодермиса [ШЕ/ВЕ]	ОЕ
29.	Однос ширине попречног пресека четине и ширине ендодермиса [ШП/ШЕ]	ОШПЕ
30.	Однос дебљине четине на попречном пресеку и висине ендодермиса [ДП/ВЕ]	ОДПЕ
31.	Марцетов коефицијент [РС/ШП $\times$ ДП]	МК
32.	Облик епидермалне ћелије на попречном пресеку [ШЕЋ/ВЕЋ]	ОЕЋ
33.	Облик хиподермалне ћелије на попречном пресеку [ШХЋ/ ВХЋ]	ОХЋ
34.	Облик смоног канала на попречном пресеку [ШС/ВС]	ОС

---



Слика 4-3. Изглед четина истраживаних *Abies* таксона: А) лице четина доњег низа; Б) налицје четина доњег низа; В) лице четина горњег низа; и Г) налицје четина горњег низа.



Слика 4-4. Попречни пресеци четина доњег низа: А) *A. alba*; Б) *A. x borisii-regis*; В) *A. cephalonica*; Г) опис мерења анатомских карактеристика (бројеви се односе на редне бројеве карактеристика у табели 4-2. Илустрација: др Димитрија Савић Здравковић).

## 4.4. Фитохемијска анализа

### 4.4.1. Изоловање хедспејс (HS) испарљивих компоненти

За анализу статичким HS сакупљен је материјал (двогодишње четине) 259 јединки из 18 популација сва три испитивана таксона (табела 4-1 и слика 5-12). Биљни материјал за фитохемијска истраживања чуван је у замрзивачу (на -20 °C) до момента даље употребе.

За сваку јединку посебно одмерено је 0,5 g четина које су затим лабораторијским маказама устињене на дужину од 2-3 mm. Уситњени биљни материјал смешетен је у унапред обележене HS вијале од 20 ml у које је додат по 1 ml дестиловане воде. Аутоматизованим поступком вијале су смештене у купатило где је уследило загревање узорака на 80 °C у току 20 min уз смењивање поступка мућкања (у трајању од 5 s) и паузирања (од 2 s). Након 20 min, испарљиве компоненте су узорковане HS-семплером и ињектоване у гасни хроматограф.

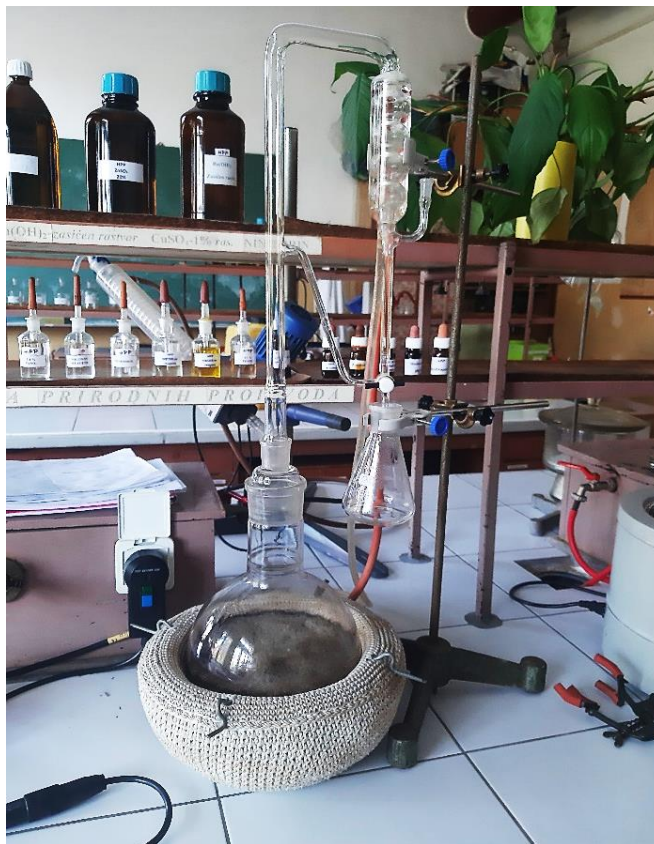
### 4.4.2. Изоловање етарских уља

За анализу етарских уља сакупљен је материјал (гранчице са четинама) из по једне популације сваког испитиваног таксона: *A. alba* - Србија, Стара планина; *A. x borisii-regis* - Грчка, Пијерија; и *A. cephalonica* - Грчка, Пелопонез, Хелмос (табела 4-1). За сваки таксон посебно одмерено је 300 g гранчица са четинама које су затим лабораторијским маказама уситњене на дужину од 2-3 mm. Уситњени материјал је сипан у балоне од 5000 ml у које је додато по 500 ml дестиловане воде. Балони са биљним материјалом су постављени у грејна тела и повезани са наставцима по Клевенџеру (слика 4-5).

Након 2,5 h, садржај из мерног дела наставка пренет је у левак за одвајање и подвгнут течно-течно екстракцији диетил-етром како би се етарско уље у потпуности одвојило од воденог дела. Поступак је поновљен три пута, након чега је у ерленмајер са сакупљеним етарским слојевима додато средство за сушење (анхидровани магнезијум-сулфат) како би се уклонила влага. Садржај је профилиран у обележени балон округлог



дна, након чега је диетил-етар упарен на ротационом вакум упаривачу без загревања воденог купатила. Етарско уље је пребачено у хроматографску вијалу од 2 ml и чувано у затвореној вијали у фрижидеру (на +4 °C) до даље анализе.



Слика 4-5. Хидродестилација по Клевенџеру (фото: Николић, 2020).

### 2.2.1. Изоловање кутикуларних воскова

Анализа кутикуларних воскова укључила је исти узорак као морфо-анатомска анализа, тј. двогодишње четине 269 јединки из истих 18 популација (табела 4-1 и слика 5-25). Екстракција укупног кутикуларног воска, за сваку јединку посебно, извршена је потапањем 5 g целих четина у 10 ml *n*-хексана у трајању од 60 s. Након филтрације, добијени екстракт је концентрован на запремину од 1 ml и потом елуиран са 5 ml *n*-хексана кроз мини-колону (пипета по Пастеру напуњена флорисилом и анхидрованим

натријум-сулфатом). Добијени пречишћени екстракт је поново концентрован на запремину од 1 ml, пребачен у хроматографску вијалу од 2 ml и чуван у затвореној вијали у фрижидеру (на +4 °C) до даље анализе.

#### 4.4.3. Гасна хроматографија куплована са масеном спектрометријом (GC-MS)

Сви HS узорци, етарска уља растворена у етру (10 mg/ml) као и екстракти воска снимљени су у трипликату на 7890/7000В гасном хроматографу (Agilent Technologies, USA) са Combi PAL ауто-семплером и HP-5 MS колоном (5% фенил-метил-силоксан, 25 m x 250  $\mu$ m i.d. и 0,25  $\mu$ m дебљина филма) који је куплован са масеним детектором 5977А (MS). GC услови: температура ињектора 250 °C; интерфејса 300 °C; температурни програм - изотермално првих 2,25 min на 50 °C (хедспејс узорци и етарска уља) односно 70 °C (екстракти воска), затим линеарни пораст температуре (градијент 4 °C /min) до 200 °C (хедспејс узорци), 290 °C (етарска уља) и 300 °C (екстракти воска), на крају изотермално још 10 min (осим код хедспејс узорка); константан проток носећег гаса (хелијум) од 1,0 ml/min; ињектована запремина HS испарљивих компоненти 500  $\mu$ l (сплит 10:1), етарских уља 1  $\mu$ l (сплит 40:1) и екстраката воска 5  $\mu$ l (сплит 2:1). MS услови: јонизација 70 eV; опсег маса 40-440 amu (хедспејс узорци), 35-500 amu (етарска уља), 40-650 amu (екстракти воска); време скенова 0,32 s.

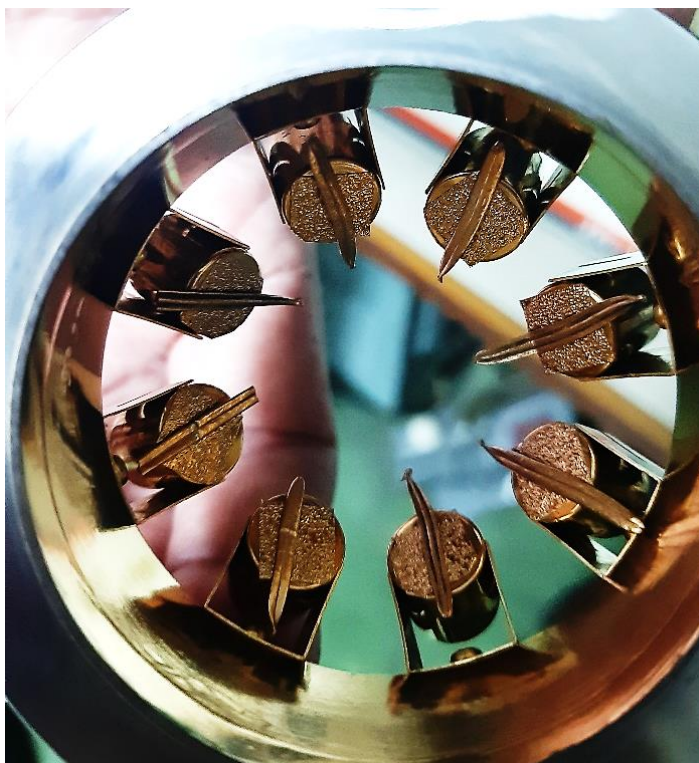
HS испарљиве компоненте, компоненте етарских уља као и компоненте екстраката воска идентификоване су помоћу AMDIS софтвера (енгл. *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*, Ver. 2.1, DTRA/NIST, 2011) на основу линеарних ретенционих индекса (RI, енгл. *Retention Index*) и масених спектра. Вредности RI су одређене на основу ретенционих времена (Rt, енгл. *Retention Time*) стандардне серије *n*-алкана (C<sub>8</sub>-C<sub>40</sub>) снимљене на истом апарату и под истим условима као испитивани узорци, а упоређиване су са литературним RI вредностима (NIST MS Search 2.0; NIST Chemistry WebBook SRD69; Adams, 2007). Такође, идентификација је укључила поређење масених



спектра компоненти са литературним/библиотечким масеним спектрима (Wiley 6; NIST02; Adams, 2007).

#### 4.4.4. Микроморфолошка анализа

Микроморфолошка анализа епикутуларних воскова четина различите старости укључила је по једну јединку сва три таксона са следећих локалитета: *A. alba* - Србија, Копаоник; *A. x borisii-regis* - Грчка, Олимп; и *A. cephalonica* - Грчка, Кефалонија, Енос (табела 4-1). За сваку јединку посебно издвојено је 6 четина, тј. по две четине из централног дела једно-, дво-, и трогодишње гранчице. Биљни материјал је у лабораторији осушен (на собној температури) без покривања у року од 7 дана. Једна од две четине исте старости коришћена је за сликање лица, а друга за сликање наличја.



Слика 4-6. Припремљени узорци за SEM (четине обложене златом; фото: Николић, 2021).

Након сушења, четине су на одговарајућим сталцима обложене златом (техника наношења злата распршивањем; слика 4-6) и анализирани помоћу JEOL JSM 5300 скенирајућег електронског микроскопа (SEM, енгл. *Scanning Electron Microscope*). Средишњи део лица и наличја сваке четине фотографисан је на увећањима у распону од 50-7500х.

#### 4.4.5. Статистичка анализа

За статистичку обраду података коришћен је софтвер STATISTICA 8 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Урађена је **основна дескриптивна статистика** за сваки сет података (средња вредност (Avg, енгл. *Average*), максимум (Max, енгл. *Maximum*), минимум (Min, енгл. *Minimum*), стандардна девијација (SD, енгл. *Standard Deviation*) и коефицијент варијације (CV, енгл. *Coefficient of Variation*), на основу које је урађена анализа варијабилности испитиваних карактеристика у оквиру истраживаних таксона. CV је коришћен за описивање варијабилности карактеристика и у односу на његове вредности карактеристике су окарактерисане као ниско варијабилне ( $CV\% < 10$ ), умерено варијабилне ( $10 < CV\% < 50$ ), високо варијабилне ( $50 < CV\% < 100$ ), док су оне карактеристике код којих је  $CV\% > 100$  означене као јако високо варијабилне.

С обзиром на то да је нормална дистрибуција података предуслов за многе параметарске статистичке технике, **нормалност расподеле** свих сетова података је тестирана стандардним тестовима (Kolmogorov-Smirnov (K-S), Lilliefors и Shapiro-Wilk тест). Код сетова података код којих је утврђена нормална дистрибуција (морфо-анатомске карактеристике и хедспејс испарљиве компоненте) урађена је **једнофакторска анализа варијансе (ANOVA, енгл. *Analysis of Variance*)** да би се утврдило да ли постоје статистички значајне разлике у средњим вредностима анализираних карактеристика између истиваних таксона. Такође, да би се утврдило између којих конкретних таксона су испољене статистички значајне разлике, извршена је и *post-hoc* провера резултата добијених ANOVA тестом, коришћењем **Tukey's HSD** (енгл. *Honestly Significant Difference*) **for unequal N post-hoc** теста. Међутим, с обзиром да већина компоненти кутикуларних воскова није пратила нормалну дистрибуцију, значајност разлика у

њиховим средњим вредностима између три *Abies* таксона утврђена је **непараметријским Крускал-Валисовим тестом**. Након тога, извршена су *post-hoc* **поређења средњих рангова свих парова група** (Siegel & Castellan, 1988) да би се утврдила значајност разлика између појединачних парова таксона.

За мултиваријационе статистичке анализе коришћене су само карактеристике које нису биле веома високо корелисане ( $r \geq \pm 0,9$ ) и које су имале просечни садржај  $>0,5\%$  (у случају фитохемијских маркера). На овај начин, у мултиваријационим анализама коришћени су сетови од 18 морфо-анатомских карактеристика, 12 HS испарљивих компоненти, 27 компоненти етарских уља као и 18 компоненти кутикуларних воскова. Да би се утврдило да ли постоји диференцијација популација и/или таксона на основу анализираних сетова карактеристика урађена је **канонијска дискриминантна анализа (CDA, енгл. Canonical Discriminant Analysis)** са популацијама и/или таксонима као *a priori* групама. Ова анализа има за циљ да утврди колико се унапред дефинисане групе међусобно разликују и које карактеристике највише доприносе њиховој диференцијацији. Такође, урађена је и **кластер анализа (CA, енгл. Cluster Analysis)** базирана на матрици Махаланобисових дистанци које су израчунате у CDA, а за коју је коришћен Вордов метод (енгл. *Ward's method*) хијерархијског кластеровања, при чему су резултати приказани графички уз помоћ дендрограма. Ова анализа је коришћена да би се утврдила сличност између првобитно неклассификованих популација и/или таксона.

**Корелациона анализа/Спирманова корелација рангова** је урађена са циљем да се утврди међусобна повезаност између варирања фитохемијских маркера (хедпсјес испарљивих компоненти/компоненти кутикуларних воскова) и абиотичких (географских, орографских, геолошких и биоклиматских) параметара локалитета истраживаних популација. Тип геолошког супстрата, који је квалитативна карактеристика, у статистичкој матрици је представљен као квантитативна на следећи начин: силикат - 1 и кречњак - 2.

## **5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА**

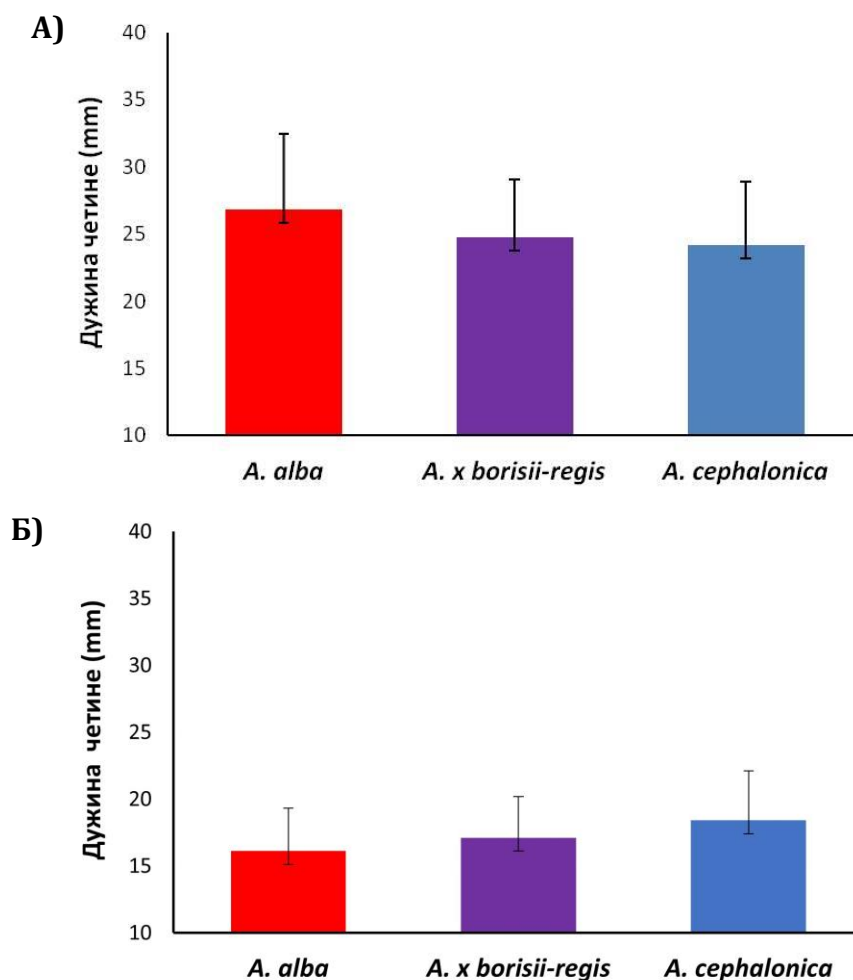
## 5.1. Морфо-анатомске карактеристике

### 5.1.1. Варијабилност морфо-анатомских карактеристика четина испитиваних таксона

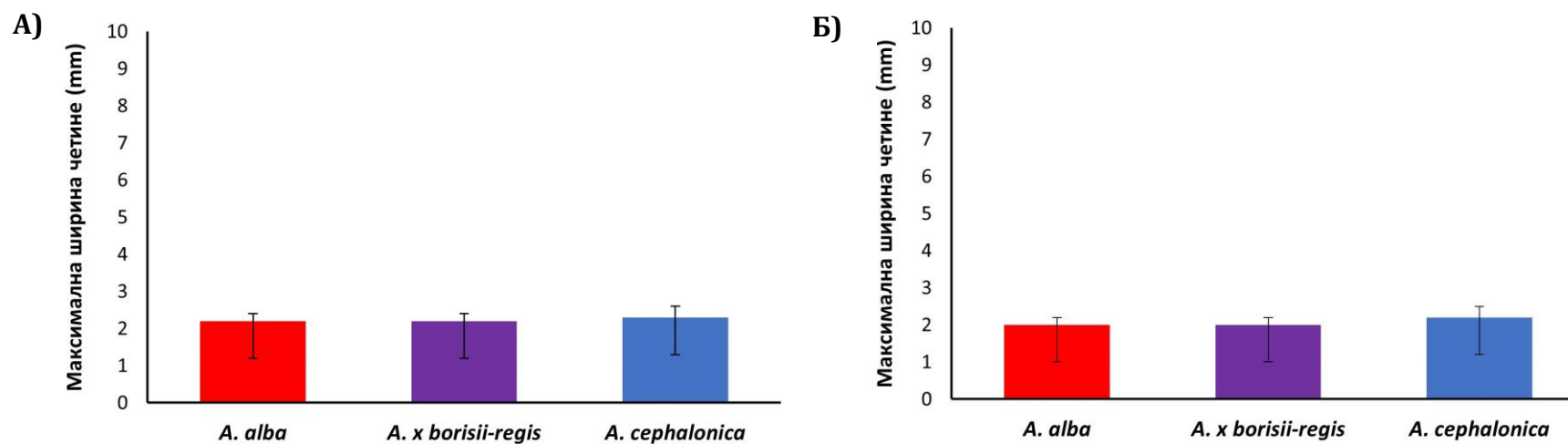
На нивоу четина доњег низа, највећа средња вредност дужине четине (Д) утврђена је код *A. alba*, а најмања код *A. cephalonica*, док је у случају четина горњег низа ситуација обрнута (слика 5-1; табеле 5-1 и 5-3). Поред тога, код оба типа четина, највећа средња вредност дебљине четине на попречном пресеку (ДП) утврђена је код *A. cephalonica*, а најмања код *A. alba* (слика 5-3; табеле 5-1 и 5-3). Међутим, средње вредности максималне ширине четине (МШ) биле су једнаке код *A. alba* и *A. x borisii-regis*, а нешто веће код *A. cephalonica* (слика 5-2; табеле 5-1, 5-2 и 5-3). Добијене средње вредности за карактеристике дужина четине (Д) и максимална ширина четине (МШ) за сва три таксона налазе се у оквиру опсега вредности ових карактеристика датим у кључевима савремених европских „флора“: „*Flora Republicae Popularis Bulgaricae*“ (Jordanov, 1963), „*Flora Europea*“ (Chater, 1964), „*Flora Srbije*“ (Jovanović, 1992) и „*Mountain Flora of Greece*“ (Christensen, 1997). Међутим, ово је прва студија у којој је анализирана варијабилност морфо-анатомских карактеристика посебно за четине доњег и горњег низа.

Као најстабилнија карактеристика издвојио се број смоних канала (БС), који се заправо одликује потпуним одсуством варијабилности ( $CV\%=0$ ) код сва три таксона и оба типа четина. Присуство два смона канала у четинама је заједничка карактеристика многих *Abies* врста (Sękiewicz et al., 2013; Boratyńska et al., 2015; Jasińska et al., 2017; Litkowiec et al., 2021), иако постоји и неколико изузетака (*A. firma* има четири, а *A. hicheli* од 8 до 12; Panetsos, 1992). Такође, потпуно одсуство варијабилности ове карактеристике утврђено је код неколико популација *A. cilicica* (Boratyńska et al., 2015) као и шпанске популације *A. pinsapo* (Sękiewicz et al., 2013). Поред тога, још две карактеристике су се издвојиле као ниско варијабилне ( $CV\%<10$ ) у скоро свим случајевима: број стома на 1 mm централног дела наличја четине (БСН) и површина попречног пресека четине (ПП). Са друге стране, у оквиру јако високог степена варијабилности ( $CV\%>100$ ) налазе се карактеристике које се односе на бројност стома и редова стома на централном делу лица четине (број стома на 1 mm централног дела лица четине (БСЛ) и број редова стома на централном делу лица

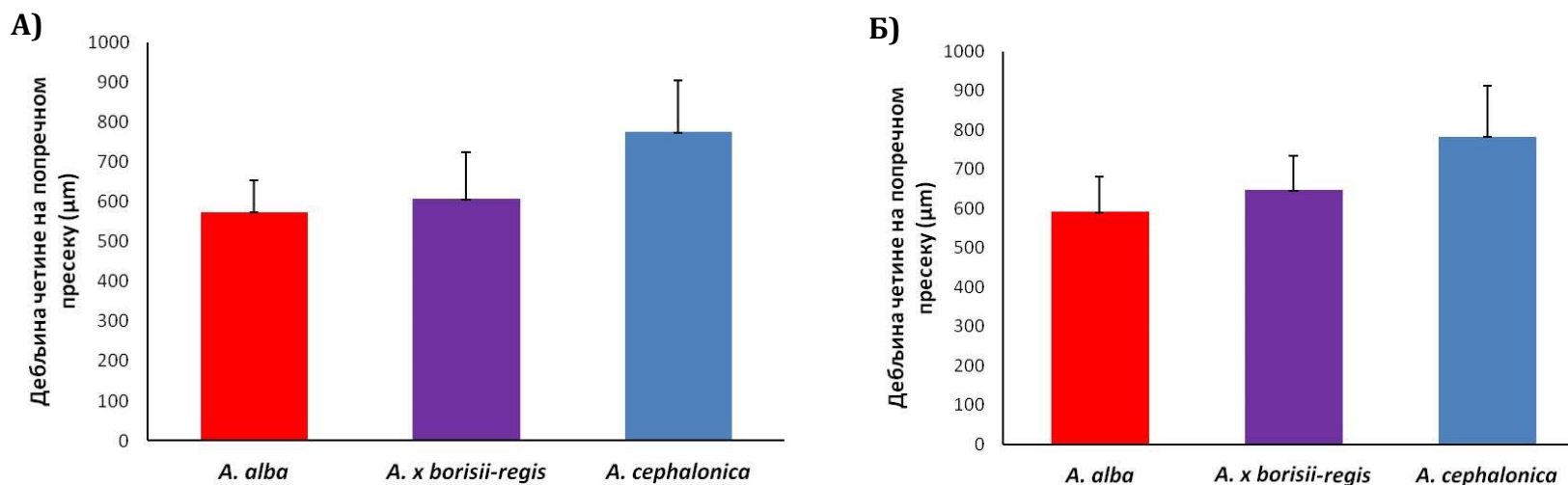
четине (БРЛ)). Наиме, јако висока варијабилност ове две карактеристике утврђена је код свих таксона за четине горњег низа, као и у случају четина доњег низа код *A. x borisii-regis*. Код преостала два таксона на централном делу лица четина доњег низа није утврђено присуство стома. У сагласности са нашим резултатима, *Jasińska* и сар. (2017) известили су о јако високој варијабилности карактеристике БРЛ ( $CV% > 100%$ ) у студији 6 медитеранских *Abies* таксона.



Слика 5-1. Средње вредности са стандардним девијацијама карактеристике дужина четине (mm) испитиваних таксона: А) четине доњег низа; Б) четине горњег низа.



Слика 5-2. Средње вредности са стандардним девијацијама карактеристике максимална ширина четине (mm) испитиваних таксона: А) четине доњег низа; Б) четине горњег низа.



Слика 5-3. Средње вредности са стандардним девијацијама карактеристике дебљина четине на попречном пресеку (µm) испитиваних таксона: А) четине доњег низа; Б) четине горњег низа.

**Табела 5-1.** Резултати дескриптивне статистике за 34 квантитативне морфо-анатомске карактеристике четина доњег и горњег низа 120 јединки *A. alba*.

Морфо-анатомске карактеристике	Акроним	ЧЕТИНЕ ДОЊЕГ НИЗА					ЧЕТИНЕ ГОРЊЕГ НИЗА				
		Avg	Min	Max	SD	CV	Avg	Min	Max	SD	CV
<i>Мерене карактеристике</i>											
Површина четине (mm <sup>2</sup> )	П	51,3	24,4	109,1	15,4	29,9	26,5	12,8	61,5	7,7	29,0
Обим четине (mm)	О	55,7	34,5	91,7	11,5	20,7	34,2	21,0	59,1	6,6	19,1
Дужина четине (mm)	Д	26,8	16,4	44,4	5,7	21,2	16,1	9,7	27,8	3,2	19,8
Максимална ширина четине (mm)	МШ	2,2	1,8	2,9	0,2	10,0	2,0	1,5	2,6	0,2	10,3
Ширина четине на 95% њене дужине (mm)	Ш_95	1,5	1,0	2,1	0,2	11,3	1,1	0,8	1,8	0,2	17,2
Ширина четине на 50% њене дужине (mm)	Ш_50	2,2	1,7	2,9	0,2	10,7	1,9	1,4	2,5	0,2	10,4
Растојање од базе четине до њене максималне ширине (mm)	РБШ	13,4	8,2	22,1	2,8	21,2	8,0	4,7	14,0	1,6	20,1
Број редова стома на централном делу лица четине	БРЛ	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,2	495,1
Број стома на 1 mm централног дела лица четине	БСЛ	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	5,7	0,8	471,9
Број редова стома на централном делу наличја четине	БРН	14,9	10,3	19,0	2,0	13,1	15,2	11,3	21,3	2,2	14,5
Број стома на 1 mm централног дела наличја четине	БСН	10,7	8,7	12,7	0,9	8,8	10,9	8,7	13,3	0,9	8,3
Површина попречног пресека четине (μm <sup>2</sup> )	ПП	3945,4	3055,4	5091,9	390,4	9,9	3824,8	3061,4	5056,6	374,2	9,8
Ширина попречног пресека четине (μm)	ШП	1934,1	1430,8	2493,8	200,6	10,4	1843,3	1355,0	2358,0	184,3	10,0
Дебљина четине на попречном пресеку (μm)	ДП	573,7	413,4	836,4	79,8	13,9	591,2	346,0	875,7	88,8	15,0



Ширина ендодермиса ( $\mu\text{m}$ )	ШЕ	316,6	227,9	501,6	48,5	15,3	310,0	200,5	541,5	54,6	17,6
Висина ендодермиса ( $\mu\text{m}$ )	ВЕ	207,7	139,8	325,2	30,3	14,6	207,0	135,9	292,5	33,6	16,2
Број слојева палисадног ткива	БСП	1,5	1,0	2,0	0,5	32,5	1,6	1,0	3,0	0,5	32,0
Висина једног од слојева палисадног ткива ( $\mu\text{m}$ )	ВСП	63,6	31,1	115,6	15,5	24,4	60,8	27,3	100,8	16,6	27,2
Растојање између проводних снопића ( $\mu\text{m}$ )	РС	25,4	2,6	62,5	10,4	41,0	19,0	2,6	54,0	9,4	49,2
Ширина епидермалне ћелије ( $\mu\text{m}$ )	ШЕЋ	40,0	20,8	61,9	7,3	18,1	38,3	17,9	68,5	8,5	22,1
Висина епидермалне ћелије ( $\mu\text{m}$ )	ВЕЋ	20,3	12,3	37,0	4,9	24,0	20,3	7,8	37,3	5,6	27,8
Ширина хиподермалне ћелије ( $\mu\text{m}$ )	ШХЋ	51,0	25,9	70,4	9,1	17,8	45,9	15,7	70,8	11,7	25,4
Висина хиподермалне ћелије ( $\mu\text{m}$ )	ВХЋ	43,0	19,8	76,0	9,0	20,9	39,3	12,0	73,9	11,6	29,4
Ширина смоног канала ( $\mu\text{m}$ )	ШС	99,2	45,5	333,0	30,3	30,6	106,6	33,9	160,0	27,1	25,5
Висина смоног канала ( $\mu\text{m}$ )	ВС	71,3	26,2	182,1	20,7	29,1	78,9	24,4	130,1	22,6	28,6
Број смоних канала	БС	2,0	2,0	2,0	0,0	0,0	2,0	2,0	2,0	0,0	0,0
<i>Односи</i>											
Облик попречног пресека четине [ШП/ДП]	ОП	2,0	2,1	5,3	0,6	16,8	3,2	2,2	5,4	0,5	16,0
Облик ендодермиса [ШЕ/ВЕ]	ОЕ	1,5	1,0	2,1	0,2	11,0	1,5	1,0	2,0	0,2	10,9
Однос ширине попречног пресека четине и ширине ендодермиса [ШП/ШЕ]	ОШПЕ	6,2	4,4	8,5	0,8	13,6	6,1	4,1	9,4	0,9	14,8
Однос дебљине на попречном пресеку четине и висине ендодермиса [ДП/ВЕ]	ОДПЕ	2,8	2,1	3,6	0,3	12,5	2,9	1,8	3,9	0,4	14,4
Марцетов коефицијент [РПС/ШП $\times$ ДП]	МК	7,4	0,9	16,0	2,8	38,0	6,2	0,8	16,9	3,2	52,4
Облик епидермалне ћелије на попречном пресеку [ШЕЋ/ВЕЋ]	ОЕЋ	2,1	1,1	3,6	0,5	24,8	2,0	1,1	3,2	0,4	21,7
Облик хиподермалне ћелије на попречном пресеку [ШХЋ/ВХЋ]	ОХЋ	1,2	0,5	2,7	0,3	23,4	1,2	0,7	1,9	0,2	19,8
Облик смоног канала на попречном пресеку [ШС/ВС]	ОС	1,4	1,0	2,6	0,3	18,7	1,4	0,8	2,3	0,2	17,5

**Табела 5-2.** Резултати дескриптивне статистике за 34 квантитативне морфо-анатомске карактеристике четина доњег и горњег низа 59 јединки *A. x borisii-regis*.

Морфо-анатомске карактеристике	Акроним	ЧЕТИНЕ ДОЊЕГ НИЗА					ЧЕТИНЕ ГОРЊЕГ НИЗА				
		Avg	Min	Max	SD	CV	Avg	Min	Max	SD	CV
<i>Мерене карактеристике</i>											
Површина четине (mm <sup>2</sup> )	П	46,6	21,0	85,2	11,5	24,6	28,6	14,9	51,0	7,7	26,8
Обим четине (mm)	О	51,8	33,5	72,6	8,5	16,5	36,3	23,9	51,7	6,2	17,1
Дужина четине (mm)	Д	24,8	16,0	34,5	4,3	17,5	17,1	10,9	24,7	3,1	18,2
Максимална ширина четине (mm)	МШ	2,2	1,6	2,9	0,2	10,5	2,0	1,7	2,7	0,2	11,4
Ширина четине на 95% њене дужине (mm)	Ш_95	1,3	0,6	1,8	0,3	23,4	0,9	0,4	1,6	0,3	31,8
Ширина четине на 50% њене дужине (mm)	Ш_50	2,1	1,5	2,9	0,2	11,0	2,0	1,6	2,6	0,2	11,6
Растојање од базе четине до њене максималне ширине (mm)	РБШ	12,5	8,0	17,3	2,1	16,9	8,6	5,6	12,3	1,5	17,7
Број редова стома на централном делу лица четине	БРЛ	0,1	0,0	1,7	0,3	397,3	0,2	0,0	4,0	0,7	370,8
Број стома на 1 mm централног дела лица четине	БСЛ	0,2	0,0	4,3	0,8	393,6	0,5	0,0	8,7	1,7	361,0
Број редова стома на централном делу наличја четине	БРН	16,4	13,3	21,0	1,7	10,4	15,9	11,0	20,0	1,8	11,2
Број стома на 1 mm централног дела наличја четине	БСН	10,9	9,0	13,7	0,8	7,8	10,9	8,7	13,3	1,0	9,3
Површина попречног пресека четине (μm <sup>2</sup> )	ПП	4042,2	3371,7	4564,5	280,8	6,9	3866,1	3231,8	4885,1	330,8	8,6
Ширина попречног пресека четине (μm)	ШП	1930,8	1664,3	2234,2	140,9	7,3	1814,4	1356,2	2339,7	170,2	9,4
Дебљина четине на попречном пресеку (μm)	ДП	606,2	239,2	860,1	118,0	19,5	646,8	491,7	886,5	86,6	13,4
Ширина ендодермиса (μm)	ШЕ	340,8	254,2	465,1	52,6	15,4	317,2	217,5	463,5	54,8	17,3
Висина ендодермиса (μm)	ВЕ	216,2	169,1	291,6	28,1	13,0	219,7	159,5	647,0	62,1	28,3

Број слојева палисадног ткива	БСП	1,8	1,0	3,0	0,5	28,8	1,6	1,0	2,0	0,5	30,0
Висина једног од слојева палисадног ткива (µm)	ВСП	54,9	32,3	85,8	14,1	25,8	56,3	31,1	81,9	11,2	19,9
Растојање између проводних снопића (µm)	РС	30,1	9,3	57,2	10,3	34,1	24,5	7,5	51,8	11,5	47,2
Ширина епидермалне ћелије (µm)	ШЕЋ	35,4	25,8	47,8	5,3	15,0	36,8	27,0	48,5	5,8	15,7
Висина епидермалне ћелије (µm)	ВЕЋ	18,9	11,7	31,3	3,9	20,8	19,4	12,3	28,7	3,6	18,5
Ширина хиподермалне ћелије (µm)	ШХЋ	45,1	27,2	59,2	6,8	15,1	45,9	28,5	64,0	7,5	16,3
Висина хиподермалне ћелије (µm)	ВХЋ	41,3	27,2	55,3	6,2	15,0	40,6	23,8	59,5	7,3	17,9
Ширина смоног канала (µm)	ШС	80,6	32,8	161,6	23,6	29,3	90,8	36,7	157,9	28,7	31,6
Висина смоног канала (µm)	ВС	62,6	21,9	123,7	17,7	28,3	67,4	32,1	132,2	23,0	34,0
Број смоних канала	БС	2,0	2,0	2,0	0,0	0,0	2,0	2,0	2,0	0,0	0,0
<i>Односи</i>											
Облик попречног пресека четине [ШП/ДП]	ОП	3,3	2,1	8,2	0,9	25,9	2,8	2,1	3,8	0,4	14,0
Облик ендодермиса [ШЕ/ВЕ]	ОЕ	1,6	1,1	2,1	0,2	12,2	1,5	0,5	1,9	0,2	15,0
Однос ширине попречног пресека четине и ширине ендодермиса [ШП/ШЕ]	ОШПЕ	5,8	4,2	7,8	0,9	14,9	5,8	4,1	7,6	0,8	13,5
Однос дебљине на попречном пресеку четине и висине ендодермиса [ДП/ВЕ]	ОДПЕ	2,8	1,1	3,6	0,4	14,9	3,0	1,0	3,8	0,4	14,7
Марцетов коефицијент [РПС/ШП×ДП]	МК	9,4	2,4	17,1	3,3	35,2	8,8	2,4	22,9	4,4	50,4
Облик епидермалне ћелије на попречном пресеку [ШЕЋ/ВЕЋ]	ОЕЋ	1,9	1,3	2,7	0,4	18,4	1,9	1,2	4,0	0,4	21,1
Облик хиподермалне ћелије на попречном пресеку [ШХЋ/ВХЋ]	ОХЋ	1,1	0,7	1,6	0,2	17,4	1,2	0,8	1,7	0,2	17,0
Облик смоног канала на попречном пресеку [ШС/ВС]	ОС	1,3	0,9	1,8	0,2	13,5	1,4	1,0	1,8	0,2	14,4

**Табела 5-3.** Резултати дескриптивне статистике за 34 квантитативне морфо-анатомске карактеристике четина доњег и горњег низа 90 јединки *A. cephalonica*.

Морфо-анатомске карактеристике	Акроним	ЧЕТИНЕ ДОЊЕГ НИЗА					ЧЕТИНЕ ГОРЊЕГ НИЗА				
		Avg	Min	Max	SD	CV	Avg	Min	Max	SD	CV
<i>Мерене карактеристике</i>											
Површина четине (mm <sup>2</sup> )	П	46,8	22,3	87,9	13,2	28,1	33,2	15,7	78,0	10,6	31,9
Обим четине (mm)	О	50,8	29,2	73,9	9,6	18,8	39,1	24,0	64,2	7,7	19,7
Дужина четине (mm)	Д	24,2	13,5	35,8	4,7	19,4	18,4	10,9	30,4	3,7	20,3
Максимална ширина четине (mm)	МШ	2,3	1,6	3,0	0,3	11,1	2,2	1,6	3,1	0,3	12,5
Ширина четине на 95% њене дужине (mm)	Ш_95	1,3	0,6	2,1	0,3	23,7	1,0	0,4	1,9	0,3	28,5
Ширина четине на 50% њене дужине (mm)	Ш_50	2,2	1,6	2,9	0,3	11,5	2,1	1,6	3,0	0,3	12,5
Растојање од базе четине до њене максималне ширине (mm)	РБШ	12,2	6,7	18,0	2,4	19,7	9,2	5,4	15,3	1,9	20,4
Број редова стома на централном делу лица четине	БРЛ	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	0,3	948,7
Број стома на 1 mm централног дела лица четине	БСЛ	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	8,0	0,8	948,7
Број редова стома на централном делу наличја четине	БРН	15,8	12,0	19,7	1,9	11,9	16,1	11,3	21,0	1,9	12,1
Број стома на 1 mm централног дела наличја четине	БСН	10,7	8,7	14,0	0,9	8,8	10,9	8,7	13,7	1,0	9,5
Површина попречног пресека четине (μm <sup>2</sup> )	ПП	4283,3	3284,2	6041,3	482,5	11,3	4096,7	3101,7	5172,3	481,7	11,8
Ширина попречног пресека четине (μm)	ШП	2002,3	1511,5	2820,8	225,6	11,3	1878,1	605,7	2434,9	255,1	13,6
Дебљина четине на попречном пресеку (μm)	ДП	774,7	431,3	1186,6	129,7	16,7	782,3	329,2	1128,8	130,6	16,7
Ширина ендодермиса (μm)	ШЕ	413,2	247,3	641,5	74,4	18,0	386,6	224,3	602,1	77,1	20,0
Висина ендодермиса (μm)	ВЕ	248,4	158,1	454,8	41,9	16,9	246,6	143,7	343,3	41,5	16,8

Број слојева палисадног ткива	БСП	1,9	1,0	3,0	0,3	16,1	2,0	1,0	3,0	0,4	20,6
Висина једног од слојева палисадног ткива (µm)	ВСП	60,9	36,5	99,7	12,0	19,8	55,6	20,2	98,3	11,7	21,1
Растојање између проводних снопића (µm)	РС	36,0	1,8	87,2	16,2	45,1	33,0	9,2	95,5	14,9	45,3
Ширина епидермалне ћелије (µm)	ШЕЋ	37,3	23,5	66,6	7,8	20,8	35,3	19,9	47,9	6,5	18,5
Висина епидермалне ћелије (µm)	ВЕЋ	21,2	11,1	39,8	5,0	23,4	20,4	11,6	34,1	4,9	23,9
Ширина хиподермалне ћелије (µm)	ШХЋ	49,7	33,2	77,0	7,5	15,1	48,3	27,2	69,1	9,1	18,9
Висина хиподермалне ћелије (µm)	ВХЋ	45,8	29,6	72,8	8,6	18,8	44,0	24,4	67,4	9,8	22,4
Ширина смоног канала (µm)	ШС	83,4	0,0	139,4	26,4	31,6	83,9	39,2	144,8	26,3	31,3
Висина смоног канала (µm)	ВС	59,6	0,0	97,5	18,4	30,9	62,0	26,6	105,4	18,4	29,7
Број смоних канала	БС	2,0	2,0	2,0	0,0	0,0	2,0	2,0	2,0	0,0	0,0
<i>Односи</i>											
Облик попречног пресека четине [ШП/ДП]	ОП	2,6	1,7	4,7	0,5	17,4	2,4	1,8	3,3	0,3	13,3
Облик ендодермиса [ШЕ/ВЕ]	ОЕ	1,7	1,1	2,2	0,2	12,5	1,6	1,1	2,2	0,2	11,3
Однос ширине попречног пресека четине и ширине ендодермиса [ШП/ШЕ]	ОШПЕ	4,9	3,8	7,2	0,7	14,1	5,0	1,0	7,5	0,9	17,2
Однос дебљине на попречном пресеку четине и висине ендодермиса [ДП/ВЕ]	ОДПЕ	3,1	2,1	4,6	0,4	13,4	3,2	1,0	4,5	0,4	13,6
Марцетов коефицијент [РПС/ШП×ДП]	МК	14,0	0,5	35,1	6,8	48,5	14,0	3,1	43,2	7,2	51,2
Облик епидермалне ћелије на попречном пресеку [ШЕЋ/ВЕЋ]	ОЕЋ	1,8	1,1	2,6	0,3	17,1	1,8	1,1	3,0	0,3	19,6
Облик хиподермалне ћелије на попречном пресеку [ШХЋ/ВХЋ]	ОХЋ	1,1	0,8	1,6	0,2	15,3	1,1	0,7	1,8	0,2	19,5
Облик смоног канала на попречном пресеку [ШС/ВС]	ОС	1,4	0,0	1,9	0,2	17,5	1,4	0,9	2,2	0,2	15,4

У циљу утврђивања присуства статистички значајних разлика у средњим вредностима анализираних карактеристика између испитиваних таксона урађена је ANOVA. Тестиране су све морфо-анатомске карактеристике изузев броја смоних канала (БС) као једине карактеристике која је показала попутно одсуство варијабилности (табела 5-4). Од 33 тестиране карактеристике, ANOVA је указала на постојање значајних разлика између испитиваних таксона за већину, тј. 32 и 26 карактеристика четина доњег и горњег низа, респективно. Дакле, за само једну карактеристику четина доњег низа (БСН), односно за 7 карактеристика четина горњег низа (БРЛ, БСЛ, БСН, ШП, ВЕЋ, ШХЋ, ОС), није утврђено да доприносе разликама између испитиваних таксона услед одсуства статистички значајних разлика између њихових средњих вредности.

Извршена је и *post-hoc* провера резултата добијених на основу ANOVA коришћењем Tukey's HSD for unequal N теста, да би се утврдило између којих конкретних таксона постоје значајне разлике (табела 5-4). Ова анализа је укључила све морфо-анатомске карактеристике чија је значајност утврђена ANOVA тестом. Међутим, на нивоу четина доњег низа, *post-hoc* тест није подржао постојање значајних разлика за још четири карактеристике (П, МШ, Ш\_50 и ШП) односно у случају четина горњег низа за још једну (ОХЋ). И поред тога, укупан број значајних карактеристика је и даље био нешто већи код четина доњег (28) у поређењу са четинама горњег низа (25). Као што је и очекивано, код већине карактеристика четина доњег низа (20) утврђене су значајне разлике између претпостављених родитељских врста *A. alba* и *A. cephalonica*, при чему се *A. x borisii-regis*: 1) разликовао од *A. cephalonica*, али не од *A. alba* (ПП, ДП, ШЕ, ВЕ, РС, ОП, ОЕ, ОДПЕ, МК); 2) разликовао од *A. alba*, али не од *A. cephalonica* (Ш\_95, БРН, БСП, ШЕЋ, ШС, ВС и ОХЋ); и 3) није разликовао ни од једне родитељске врсте (О, Д, РБШ и ОЕЋ). Код само једне карактеристике (ОШПЕ) утврђене су значајне разлике између сва три *Abies* таксона. Слични резултати добијени су и на нивоу четина горњег низа, где је такође 20 карактеристика показало значајне разлике између *A. alba* и *A. cephalonica*, при чему се хибридни таксон: 1) није разликовао ни од једне родитељске врсте (О, Д, РБШ, БРН, ВСП, ШЕЋ, ВХЋ, ОДПЕ, ОЕЋ); 2) разликовао од *A. cephalonica*, али не од *A. alba* (П, МШ, Ш\_50, ПП, ШЕ, ВЕ, БСП, ОЕ, ОШПЕ); и 3) разликовао од *A. alba*, али не од *A. cephalonica* (ШС и ВС). Значајне разлике између сва три таксона утврђене су за четири карактеристике (ДП, РС, ОП и МК).

Табела 5-4. Резултати ANOVA и Tukey's HSD for unequal N *post-hoc* теста.

Морфо-анатомске карактеристике	Акроним	ЧЕТИНЕ ДОЊЕГ НИЗА					ЧЕТИНЕ ГОРЊЕГ НИЗА				
				<i>A. alba</i>	<i>A. x borisii-regis</i>	<i>A. cephalonica</i>			<i>A. alba</i>	<i>A. x borisii-regis</i>	<i>A. cephalonica</i>
		F <sup>2</sup>	<i>p</i>	N <sup>1</sup> =120 Avg <sup>4</sup>	N=59 Avg	N=90 Avg	F	<i>p</i>	N=120 Avg	N=59 Avg	N=90 Avg
<i>Мерене карактеристике</i>											
Површина четине (mm <sup>2</sup> )	П	3,6	*	51,3 <sup>a</sup>	46,6 <sup>a</sup>	46,8 <sup>a</sup>	15,0	***	26,5 <sup>a</sup>	28,6 <sup>a</sup>	33,2 <sup>b</sup>
Обим четине (mm)	О	6,6	**	55,7 <sup>b</sup>	51,8 <sup>ab</sup>	50,8 <sup>a</sup>	12,7	***	34,2 <sup>a</sup>	36,3 <sup>ab</sup>	39,1 <sup>b</sup>
Дужина четине (mm)	Д	7,5	***	26,8 <sup>b</sup>	24,8 <sup>ab</sup>	24,2 <sup>a</sup>	12,4	***	16,1 <sup>a</sup>	17,1 <sup>ab</sup>	18,4 <sup>b</sup>
Максимална ширина четине (mm)	МШ	3,6	*	2,2 <sup>a</sup>	2,2 <sup>a</sup>	2,3 <sup>a</sup>	20,4	***	2,0 <sup>a</sup>	2,0 <sup>a</sup>	2,2 <sup>b</sup>
Ширина четине на 95% њене дужине (mm)	Ш_95	28,8	***	1,5 <sup>b</sup>	1,3 <sup>a</sup>	1,3 <sup>a</sup>	14,5	***	1,1 <sup>b</sup>	0,9 <sup>a</sup>	1,0 <sup>b</sup>
Ширина четине на 50% њене дужине (mm)	Ш_50	3,1	*	2,2 <sup>a</sup>	2,1 <sup>a</sup>	2,2 <sup>a</sup>	15,7	***	1,9 <sup>a</sup>	2,0 <sup>a</sup>	2,1 <sup>b</sup>
Растојање од базе четине до њене максималне ширине (mm)	РБШ	6,3	**	13,4 <sup>b</sup>	12,5 <sup>ab</sup>	12,2 <sup>a</sup>	12,7	***	8,0 <sup>a</sup>	8,6 <sup>ab</sup>	9,2 <sup>b</sup>
Број редова стома на централном делу лица четине	БРЛ	6,7	**	0,0 <sup>a</sup>	0,1 <sup>b</sup>	0,0 <sup>a</sup>	3,0	нз	0,0	0,2	0,0
Број стома на 1 mm централног дела лица четине	БСЛ	6,8	**	0,0 <sup>a</sup>	0,2 <sup>b</sup>	0,0 <sup>a</sup>	2,4	нз	0,2	0,5	0,1
Број редова стома на централном делу наличја четине	БРН	14,8	***	14,9 <sup>a</sup>	16,4 <sup>b</sup>	15,8 <sup>b</sup>	5,6	**	15,2 <sup>a</sup>	15,9 <sup>ab</sup>	16,1 <sup>b</sup>
Број стома на 1 mm централног дела наличја четине	БСН	0,9	нз	10,7	10,9	10,7	0,0	нз	10,9	10,9	10,9
Површина попречног пресека четине (μm <sup>2</sup> )	ПП	18,3	***	3945,4 <sup>a</sup>	4042,2 <sup>a</sup>	4283,3 <sup>b</sup>	12,4	***	3824,8 <sup>a</sup>	3866,1 <sup>a</sup>	4096,7 <sup>b</sup>
Ширина попречног пресека четине (μm)	ШП	3,7	*	1934,1 <sup>a</sup>	1930,8 <sup>a</sup>	2002,3 <sup>a</sup>	1,7	нз	1843,3	1814,4	1878,1
Дебљина четине на попречном пресеку (μm)	ДП	96,0	***	573,7 <sup>a</sup>	606,2 <sup>a</sup>	774,7 <sup>b</sup>	87,9	***	591,2 <sup>a</sup>	646,8 <sup>b</sup>	782,3 <sup>b</sup>
Ширина ендодермиса (μm)	ШЕ	70,4	***	316,6 <sup>a</sup>	340,8 <sup>a</sup>	413,2 <sup>b</sup>	41,7	***	310,0 <sup>a</sup>	317,2 <sup>a</sup>	386,6 <sup>b</sup>
Висина ендодермиса (μm)	ВЕ	38,0	***	207,7 <sup>a</sup>	216,2 <sup>a</sup>	248,4 <sup>b</sup>	21,1	***	207,0 <sup>a</sup>	219,7 <sup>a</sup>	246,6 <sup>b</sup>

Број слојева палисадног ткива	БСП	21,3	***	1,5 <sup>a</sup>	1,8 <sup>b</sup>	1,9 <sup>b</sup>	17,2	***	1,6 <sup>a</sup>	1,6 <sup>a</sup>	2,0 <sup>b</sup>
Висина једног од слојева палисадног ткива (µm)	ВСП	7,6	***	63,6 <sup>b</sup>	54,9 <sup>a</sup>	60,9 <sup>ab</sup>	4,1	*	60,8 <sup>b</sup>	56,3 <sup>ab</sup>	55,6 <sup>a</sup>
Растојање између проводних снопића (µm)	РС	18,1	***	25,4 <sup>a</sup>	30,1 <sup>a</sup>	36,0 <sup>b</sup>	35,3	***	19,0 <sup>a</sup>	24,5 <sup>b</sup>	33,0 <sup>b</sup>
Ширина епидермалне ћелије	ШЕЋ	9,4	***	40,0 <sup>b</sup>	35,4 <sup>a</sup>	37,3 <sup>a</sup>	4,3	*	38,3 <sup>b</sup>	36,8 <sup>ab</sup>	35,3 <sup>a</sup>
Висина епидермалне ћелије (µm)	ВЕЋ	4,2	*	20,3 <sup>ab</sup>	18,9 <sup>a</sup>	21,2 <sup>b</sup>	0,8	нз	20,3	19,4	20,4
Ширина хиподермалне ћелије (µm)	ШХЋ	10,3	***	51,0 <sup>b</sup>	45,1 <sup>a</sup>	49,7 <sup>b</sup>	1,7	нз	45,9	45,9	48,3
Висина хиподермалне ћелије (µm)	ВХЋ	5,8	**	43,0 <sup>ab</sup>	41,3 <sup>a</sup>	45,8 <sup>b</sup>	5,5	**	39,3 <sup>a</sup>	40,6 <sup>ab</sup>	44,0 <sup>b</sup>
Ширина смоног канала (µm)	ШС	12,6	***	99,2 <sup>b</sup>	80,6 <sup>a</sup>	83,4 <sup>a</sup>	18,9	***	106,6 <sup>b</sup>	90,8 <sup>a</sup>	83,9 <sup>a</sup>
Висина смоног канала (µm)	ВС	10,4	***	71,3 <sup>b</sup>	62,6 <sup>a</sup>	59,6 <sup>a</sup>	17,1	***	78,9 <sup>b</sup>	67,4 <sup>a</sup>	62,0 <sup>a</sup>
Број смоних канала	БС			2,0	2,0	2,0			2,0	2,0	2,0
<i>Односи</i>											
Облик попречног пресека четине [ШП/ДП]	ОП	45,4	***	3,4 <sup>b</sup>	3,3 <sup>b</sup>	2,6 <sup>a</sup>	77,3	***	3,2 <sup>b</sup>	2,8 <sup>b</sup>	2,4 <sup>a</sup>
Облик ендодермиса [ШЕ/ВЕ]	ОЕ	14,3	***	1,5 <sup>a</sup>	1,6 <sup>a</sup>	1,7 <sup>b</sup>	5,3	**	1,5 <sup>a</sup>	1,5 <sup>a</sup>	1,6 <sup>b</sup>
Однос ширине попречног пресека четине и ширине ендодермиса [ШП/ШЕ]	ОШПЕ	64,4	***	6,2 <sup>b</sup>	5,8 <sup>b</sup>	4,9 <sup>a</sup>	41,2	***	6,1 <sup>b</sup>	5,8 <sup>b</sup>	5,0 <sup>a</sup>
Однос дебљине на попречном пресеку четине и висине ендодермиса [ДП/ВЕ]	ОДПЕ	24,3	***	2,8 <sup>a</sup>	2,8 <sup>a</sup>	3,1 <sup>b</sup>	14,0	***	2,9 <sup>a</sup>	3,0 <sup>ab</sup>	3,2 <sup>b</sup>
Марцетов коефицијент [РПС/ШП×ДП]	МК	53,0	***	7,4 <sup>a</sup>	9,4 <sup>a</sup>	14,0 <sup>b</sup>	61,1	***	6,2 <sup>a</sup>	8,8 <sup>b</sup>	14,0 <sup>b</sup>
Облик епидермалне ћелије на попречном пресеку [ШЕЋ/ВЕЋ]	ОЕЋ	9,9	***	2,1 <sup>b</sup>	1,9 <sup>ab</sup>	1,8 <sup>a</sup>	5,2	**	2,0 <sup>b</sup>	1,9 <sup>ab</sup>	1,8 <sup>a</sup>
Облик хиподермалне ћелије на попречном пресеку [ШХЋ/ВХЋ]	ОХЋ	8,2	***	1,2 <sup>b</sup>	1,1 <sup>a</sup>	1,1 <sup>a</sup>	3,1	*	1,2 <sup>a</sup>	1,2 <sup>a</sup>	1,1 <sup>a</sup>
Облик смоног канала на попречном пресеку [ШС/ВС]	ОС	5,0	**	1,4 <sup>b</sup>	1,3 <sup>a</sup>	1,4 <sup>ab</sup>	0,2	нз	1,4	1,4	1,4

<sup>1</sup>N: број анализираних јединки за сваки истраживани таксон. <sup>2</sup>F: ANOVA F-тест. <sup>3</sup>p: ниво значајности теста (нз: нема значајности; \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001).

<sup>4</sup>Avg: средње вредности са различитим суперскрипт словима у истом реду (а, б, в) се значајно разликују (Tukey's HSD for unequal N *post-hoc* тест).



### 5.1.2. Мултиваријационе статистичке анализе (CDA и CA) морфо-анатомских карактеристика четина на популационом нивоу

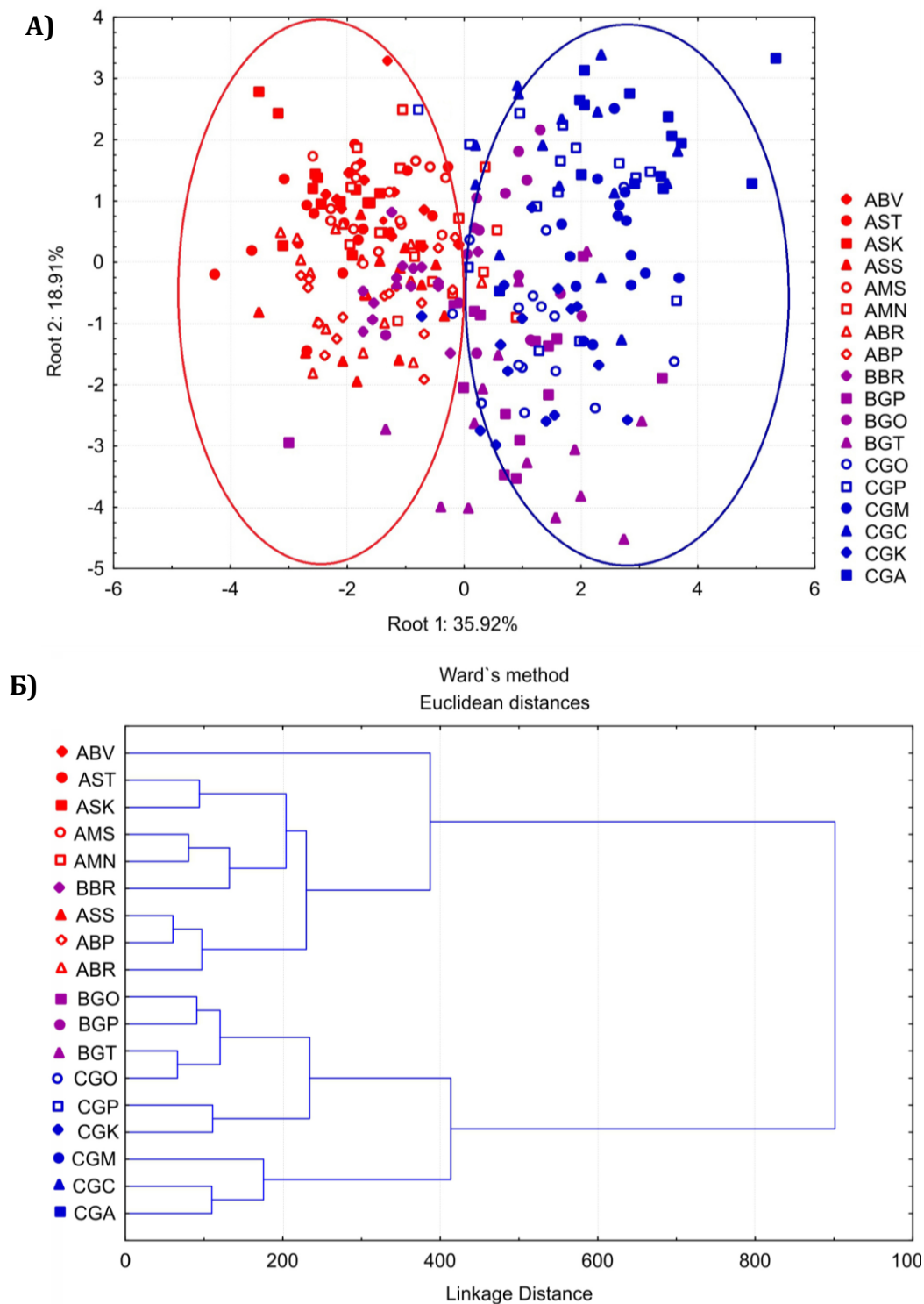
На нивоу четина доњег низа, CDA за 18 истраживаних популација из претпостављене зоне природне хибридизације на Балканском полуострву (слика 5-4) показала је да прве две канонијске осе (CAs, енгл. *Canonical Axes*) учествују у 54,8% укупне дискриминације, од чега прва оса (CA1) са 35,9% (слика 5-5А; табела 5-5).



Слика 5-4. Географски положај испитиваних популација. Акрони популација, информације о локалитетима и станишним карактеристикама приказани су у табели 4-1.

На добијеном дијаграму расипања (енгл. *scatter plot*; **слика 5-5А**) јасно се уочава тенденција формирања две групе популација дуж СА1 која објашњава највећи проценат дискриминације: скоро све јединке из популација *A. alba* формирале су групу на негативном делу СА1 (црвена елипса), док је већина јединки из популација *A. cephalonica* показала позитивне вредности за СА1 (плава елипса). Према томе, ова анализа је указала да се популације *A. alba* и *A. cephalonica* могу јасно разликовати на основу морфо-анатомских карактеристика четина доњег низа.

Међутим, четири проучаване популације *A. x borisii-regis* могу се окарактерисати као хетерогене и на интер- и на интрапопулационом нивоу (**слика 5-5А**). Наиме, већина јединки из северне *A. x borisii-regis* популације са подручја јужне Бугарске (BBR) припала је групи “alba” са једном јединком која је била позиционирана у позитивном делу СА1 унутар “cephalonica” групе; *vice versa* већина јединки из јужних *A. x borisii-regis* популација са територије Грчке (BGP, BGO и BGT) налазила се у оквиру “cephalonica” групе са по неколико јединки које су припале групи “alba” показујући негативне вредности за СА1. Међутим, слична хетерогена дистрибуција јединки у односу на СА1 уочена је код још пет популација, које су географски најближе описаним популацијама *A. x borisii-regis*. Наиме, једна популација са крајњег југа Северне Македоније (AMN) и једна популација из југозападне Бугарске (ABR), које су прелиминарно класификоване као *A. alba* у овој студији, показале су сличан образац хетерогене дистрибуције јединки као што је описано за суседну *A. x borisii-regis* популацију из јужне Бугарске (BBR). Са друге стране, две популације из централне Грчке (CGO и CGP) и једна са Пелопонеза (CGK), класификоване као *A. cephalonica*, показале су сличан образац као *A. x borisii-regis* популације из централне (BGT) и северне Грчке (BGO и BGP). На овај начин, CDA је показала да је 9 проучаваних *Abies* популација полиморфно делећи групе са обе претпостављене родитељске врсте. У исто време, може се уочити и латитудинална клина учесталости “alba”/“cephalonica” група унутар ових 9 популација, што би могао бити сигнал нешто шире дистрибуције *A. x borisii-regis* у односу на прелиминарну класификацију примењену у овој студији.



**Слика 5-5.** Мултиваријационе статистичке анализе на основу 18 морфо-анатомских карактеристика четина доњег низа 269 јединки из 18 популација: А) CDA; Б) СА. Акроними и симболи се односе на популације као што је назначено на **слици 5-3** и у **табели 4-1**. Боје симбола: црвена - *A. alba*, љубичаста - *A. x borisii-regis*, плава - *A. cephalonica*. Црвена и плава елипса обухватају већину јединки *A. alba* и *A. cephalonica* популација, респективно.

Значајан утицај на СА1 (табела 5-5) имала је само карактеристика дебљина четине на попречном пресеку (ДП), при чему је њена статистичка значајност потврђена и *post-hoc* тестом (табела 5-4). Овај резултат подржава ранија опажања од стране *Mitsopoulos* и *Penetsos* (1987), који су указали на клинално (север-југ) варирање дебљине четина дуж *Abies* ареала на подручју Грчке.

**Табела 5-5.** Стандардизовани коефицијенти за прве две канонијске осе (CAs) 18 морфо-анатомских карактеристика четина доњег и горњег низа на основу CDA са 18 *a priori* група (популација). Значајни коефицијенти су болдирани.

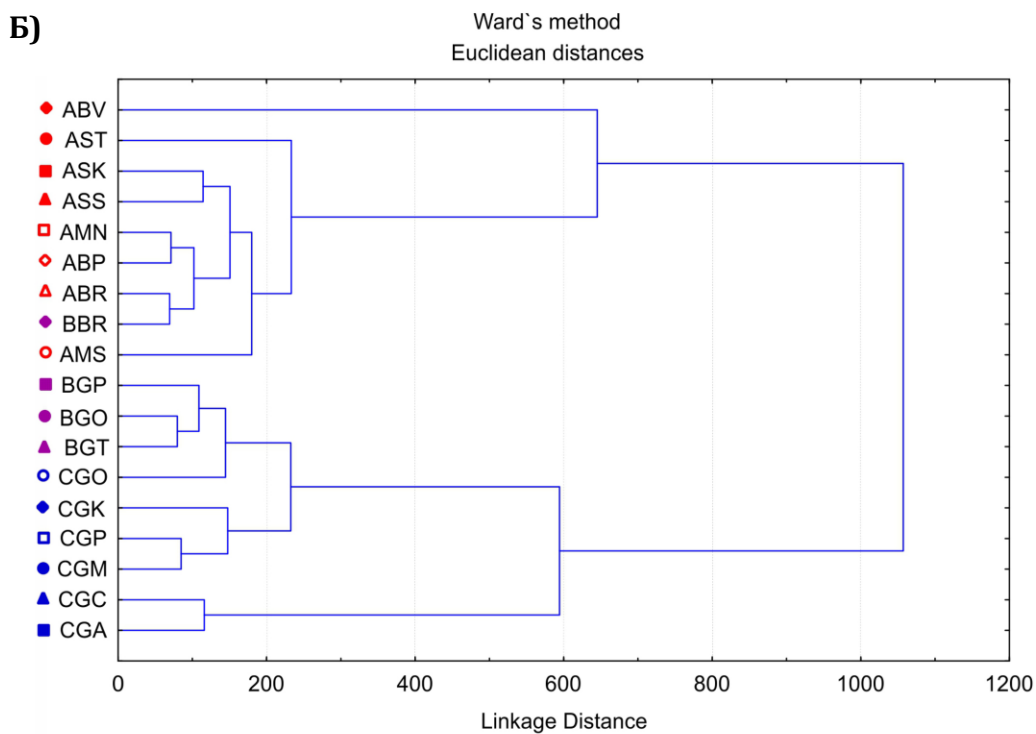
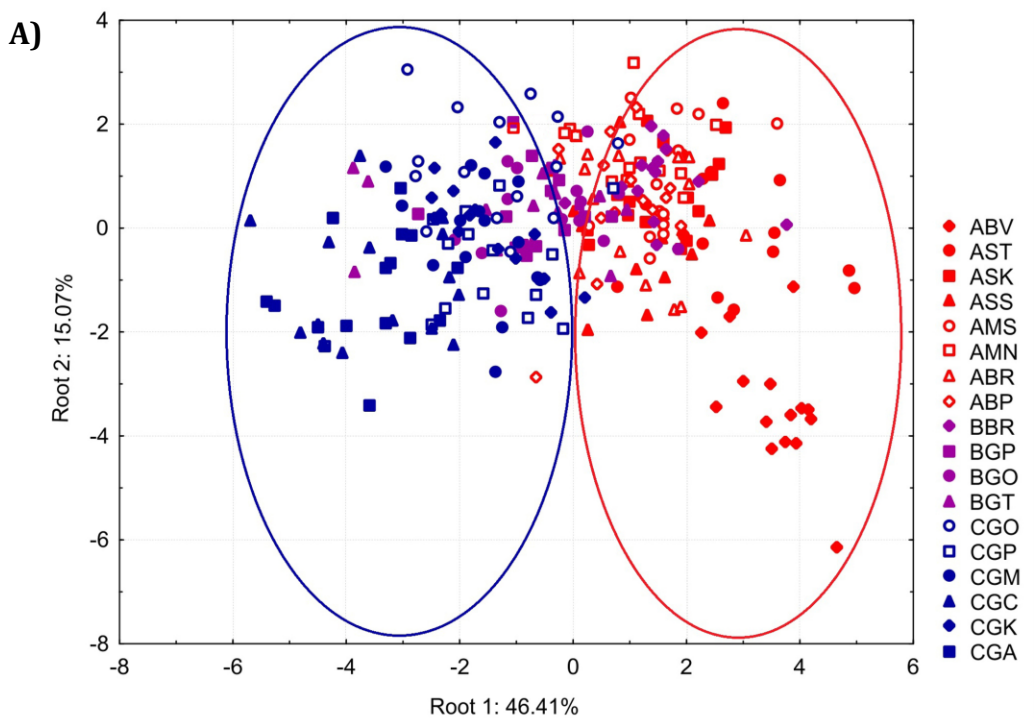
Варијабле	Четине доњег низа		Четине горњег низа	
	СА1	СА2	СА1	СА2
Д	-0,224	<b>-0,601</b>	-0,344	0,009
МШ	0,447	0,019	<b>-2,639</b>	<b>0,896</b>
Ш_95	-0,481	<b>0,877</b>	<b>2,813</b>	<b>-1,321</b>
БРН	0,171	-0,274	-0,036	0,134
БСН	-0,073	0,051	-0,019	0,157
ШП	-0,218	-0,112	0,358	-0,104
ДП	<b>0,762</b>	0,311	<b>-0,921</b>	0,230
ШЕ	0,354	0,348	-0,136	<b>-0,646</b>
ВЕ	-0,217	-0,087	0,042	-0,135
БСП	0,165	-0,154	-0,068	-0,372
ВСП	-0,281	0,034	0,338	-0,457
РС	0,179	-0,013	-0,245	0,143
ШЕЋ	-0,241	0,228	0,273	0,166
ВЕЋ	0,087	0,127	-0,107	-0,013
ШХЋ	-0,082	0,214	-0,144	0,143
ВХЋ	0,042	-0,035	-0,177	0,231
ШС	-0,384	0,256	0,396	0,185
ВС	0,111	-0,007	-0,116	-0,042
Eigen-вредности	2,853	1,502	3,933	1,278
Кумулативни % објашњене дискриминације	0,359	0,548	0,464	0,615

СА је подржала постојање две групе популација (слика 5-5Б), које су идентичне групама добијеним на основу CDA (слика 5-5А). Добијени дендрограм указао је на већу сличност северне бугарске популације *A. x borisii-regis* (BBR) са популацијама *A. alba*, односно јужних грчких популација *A. x borisii-regis* са популацијама *A. cephalonica*. Такође, може се уочити да дистрибуција популација на дендрограму углавном прати њихов латитудинални градијент, што указује на клинално варирање морфо-анатомских карактеристика четина са променом географске ширине у оквиру истраживаног подручја.

CDA на основу морфо-анатомских карактеристика четина горњег низа показала је да прве две канонијске осе учествују у 61,5% укупне дискриминације, од чега СА1 са 46,4% (табела 5-5; слика 5-6А). На добијеном дијаграму расипања се такође уочава тенденција формирања две групе популација које су веома сличне групама добијеним на основу претходне CDA (слика 5-5А). У ствари, једина уочена разлика односи се на чињеницу да се у овој анализи и друга популација из југозападне Бугарске (ABP), прелиминарно класификована као *A. alba*, показала као полиморфна (слика 5-6А). Поред тога, карактеристике максимална ширина четине (МШ), ширина четине на 95% њене дужине (Ш\_95) и дебљина четине на попречном пресеку (ДП) имале су значајан утицај на СА1 (табела 5-6). У сагласности, статистичка значајност ових карактеристика потврђена је и резултатима *post-hoc* теста (табела 5-4). Коначно, СА (слика 5-6Б) груписала је проучаване популације у сагласности са CDA (слика 5-5А).

Природне хибридне зоне углавном одликује просторни образац у коме се вредности проучаваних карактеристика постепено мењају на географском подручју између вредности типичних за сваку од две врсте (Campbell et al., 2018). Према томе, уочено клинално варирање морфо-анатомских карактеристика четина у оквиру шире прелазне зоне између *A. alba* и *A. cephalonica* у овој студији подржава хибридизациону теорију, односно хипотезу да су ове две врсте доживеле секундарни контакт током LGM. Овај закључак потврђује ранија опажања од стране Mitsopoulos и Penetsos (1987), који су такође указали да је клинални образац варирања појединих карактеристика четина и терпена у грчким шумама јеле секундарног порекла услед хибридизације између *A. alba* и *A. cephalonica*. Поред тога, неколико група аутора је указало и на латитудиналну клину у фреквенцијама *A. alba/A. cephalonica* генских фондова дуж *Abies* ареала на подручју Грчке (Volekova et al., 2014; Krajmerová et al., 2016).





**Слика 5-6.** Мултиваријационе статистичке анализе на основу 18 морфо-анатомских карактеристика четина горњег низа 269 јединки из 18 популација: А) CDA; Б) СА. Акроними и симболи се односе на популације као што је назначено на **слици 5-3** и у **табели 4-1**. Боје симбола: црвена - *A. alba*, љубичаста - *A. x borisii-regis*, плава - *A. cephalonica*. Црвена и плава елипса обухватају већину јединки *A. alba* и *A. cephalonica* популација, респективно.

## 5.2. HS испарљиве компоненте

### 5.2.1. Варијабилност HS испарљивих компоненти четина испитиваних таксона

GC-MS анализа HS испарљивих компоненти четина 259 јединки из 18 популација *A. alba*, *A. x borisii-regis* и *A. cephalonica* показала је присуство 73 компоненте (табела 5-6). Експериментални и литературни ретенциони индекси (RI и LI) као и класе једињења којима идентификоване компоненте припадају приказани су у табели 5-6. Неколико одабраних хроматограма HS испарљивих компоненти четина сва три истраживана таксона приказано је на сликама 5-7, 5-8 и 5-9.

Као најиспарљивији терпени, монотерпенски угљоводоници представљали су доминантну класу HS испарљивих компоненти четина код сва три таксона (слика 5-10), незнатно варирајући од 95,8% (*A. alba*) до 96,6% (*A. cephalonica*). Са друге стране, садржај оксидованих монотерпена и сесквитерпенских угљоводоника био је знатно нижи, тј. у опсегу од 1,0% (*A. cephalonica*) до 2,6% (*A. alba*), и од 1,5% (*A. alba*) до 2,2% (*A. cephalonica*), респективно.

Код *A. alba*, доминантне HS испарљиве компоненте представљали су  $\beta$ -пинен и лимонен+ $\beta$ -феландрен (30,6 и 21,7%, респ.), док су  $\beta$ -пинен и  $\alpha$ -пинен били најзаступљенији код *A. x borisii-regis* (38,6 и 23,1%, респ.) и *A. cephalonica* (33,9 и 31,2%, респ.; слика 5-11). Као трећа доминантна компонента издвојио се камфен код сва три таксона и то у опсегу од 15,0% (*A. cephalonica*) до 19,2% (*A. alba*). Према томе, фитохемијски профили доминантних HS испарљивих компоненти четина балканских *Abies* таксона могу се представити на следећи начин:

*A. alba*:  $\beta$ -пинен >> лимонен+ $\beta$ -феландрен > камфен >  $\alpha$ -пинен

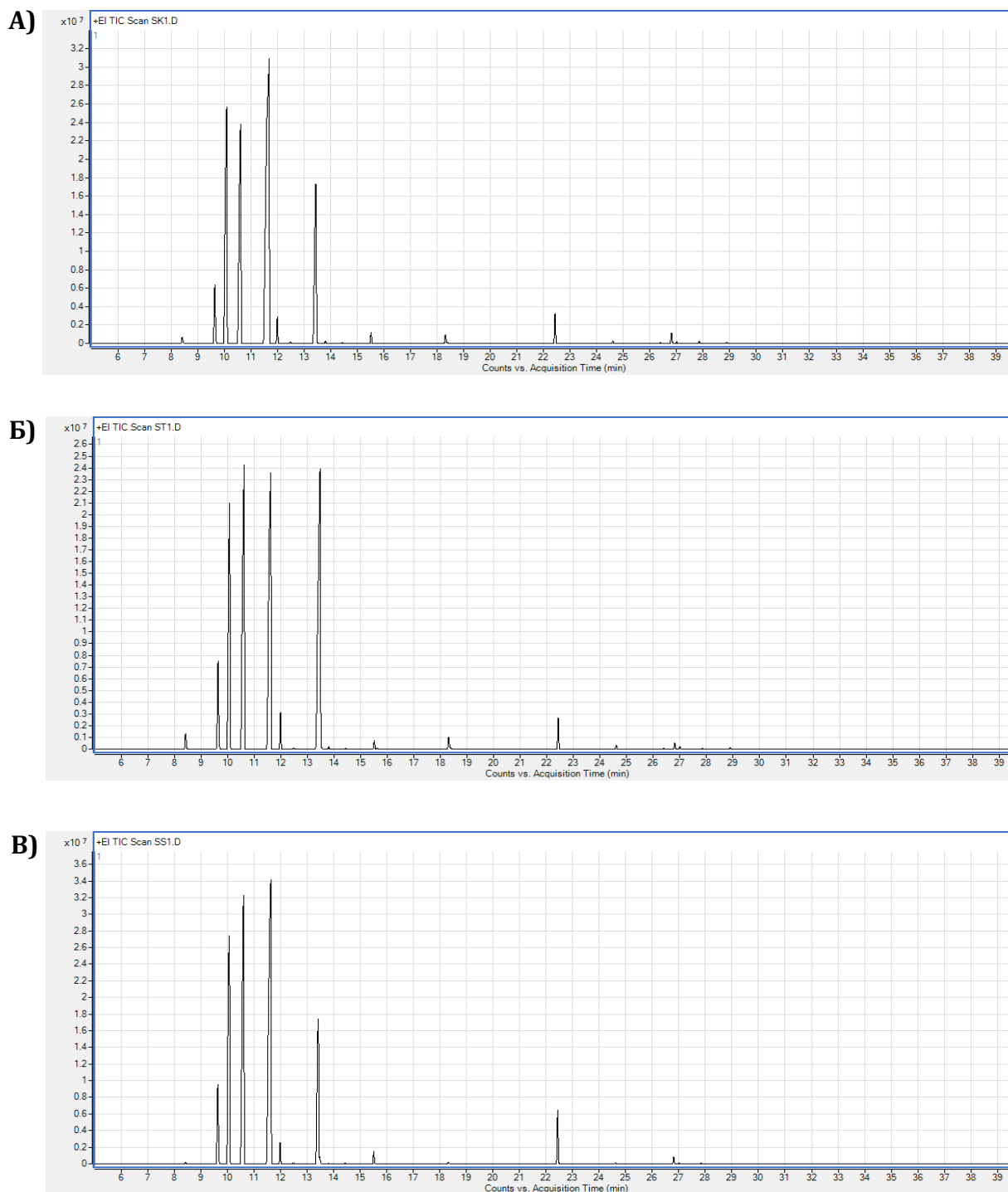
*A. x borisii-regis*:  $\beta$ -пинен >>  $\alpha$ -пинен >> камфен > лимонен+ $\beta$ -феландрен

*A. cephalonica*:  $\beta$ -пинен >  $\alpha$ -пинен >>> камфен > лимонен+ $\beta$ -феландрен

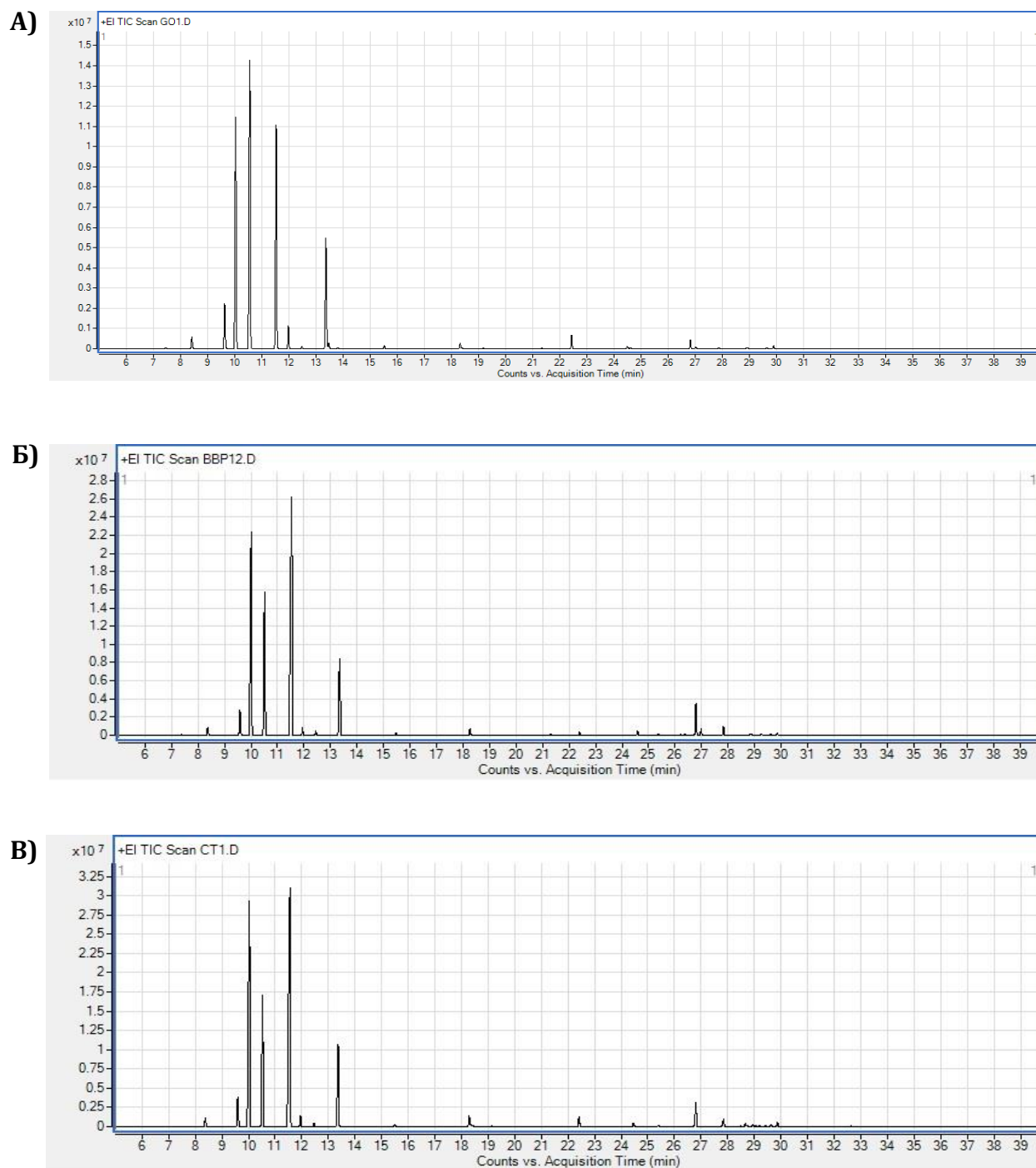
(где према Petrakis и сар. (2001), =, >, >>, и >>> представљају разлике од 0,1-1,0%, 1,1-5,0%, 5,1-15,0%, и више од 15,1%, респ.).

Код балканских *Abies* таксона терпени су до сада испитивани само са аспекта састава етарских уља изолованих хидродестилацијом из различитих биљних органа (Koukos et al., 2001; Roussis et al., 2000; Wajs-Bonikowska et al., 2015). Имајући у виду лако испарљиву фракцију монотерена у етарском уљу четина *A. alba*, *A. x borisii-regis* и *A. cephalonica*, Roussis и сар. (2000) су указали на доминацију исте четири компоненте као у овој студији (иако у другачијим редоследима). Поред тога, поменути аутори су утврдили и значајан садржај неких мање испарљивих сесквитерпенских компоненти као што је на пример оксидовани сесквитерпен глобулол (нарочито у уљу *A. cephalonica* и *A. x borisii-regis*). Овакве разлике у хемијском саставу терпена у односу на нашу студију су у потпуности очекиване, а могу се првенствено објаснити различитим методама изолације: хидродестилација vs. статички хедспејс. Са друге стране, Wajs-Bonikowska и сар. (2015) показали су доминацију лимонена (82,9%) у етарском уљу семена односно  $\alpha$ -пинена (50,0%) у етарском уљу шишарки *A. alba*. Такође, лимонен (46,5%) је детектован као доминантна компонента у етарском уљу гранчица *A. x borisii-regis* (Koukos et al., 2001).

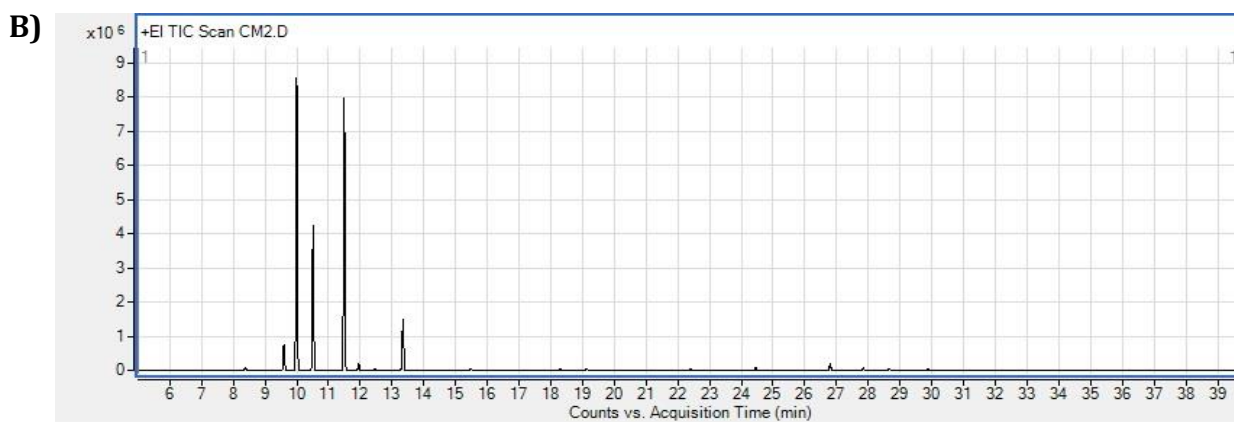
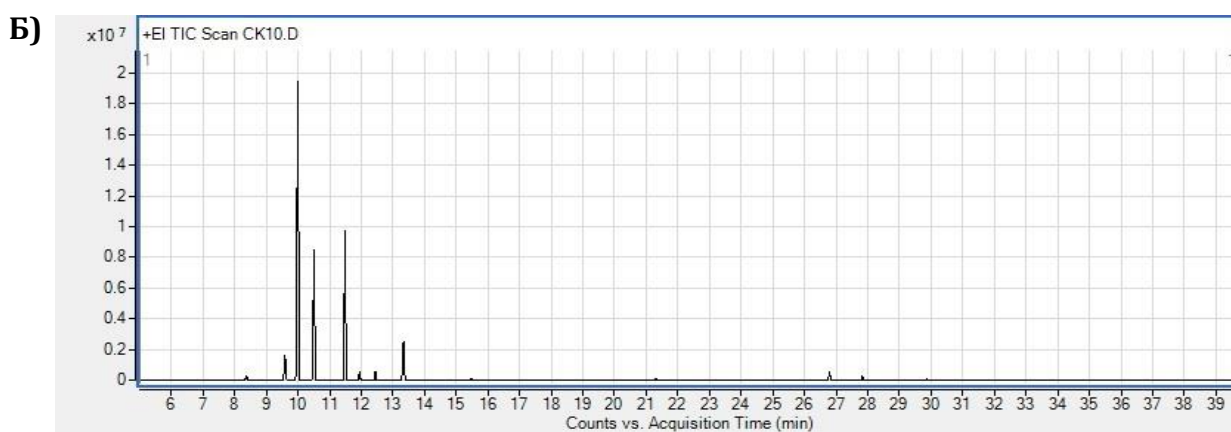
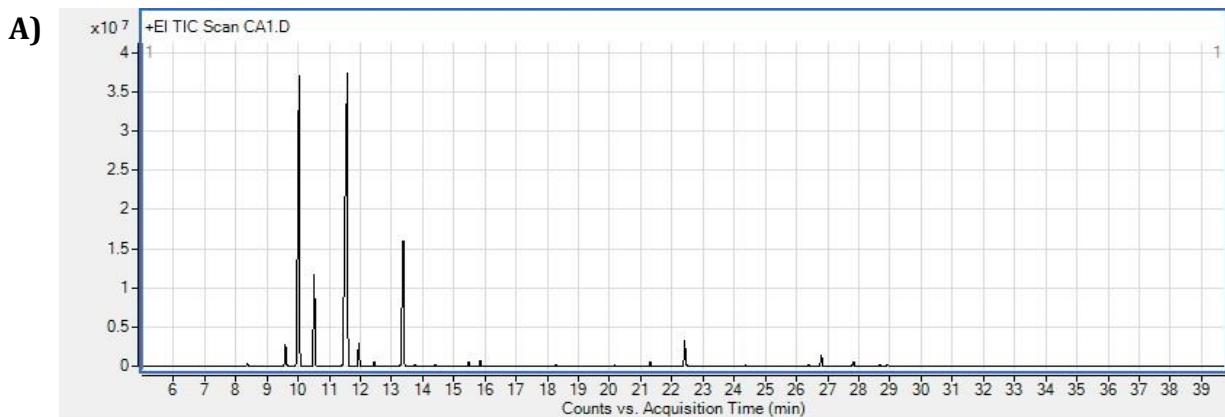




**Слика 5-7.** Хроматограми HS испарљивих компоненти четина *A. alba*: А) јединка ASK\_1; Б) јединка AST\_1; и В) јединка ASS\_1 (акроними популација приказани су у **табели 4-1**).



**Слика 5-8.** Хроматограми HS испарљивих компоненти четина *A. x borisii-regis*: А) јединка BGO\_1; Б) јединка BBR\_12; и В) јединка BGT\_1 (акроними популација приказани су у **табели 4-1.**)



**Слика 5-9.** Хроматограми HS испарљивих компоненти четина *A. cephalonica*: А) јединка CGA\_1; Б) јединка CGK\_10; и В) јединка CGM\_2 (акроними популација приказани су у **табели 4-1**).

Табела 5-6. Резултати дескриптивне статистике за HS испарљиве компоненте четина истраживаних *Abies* таксона.

Р. бр.	Једињење	RI <sup>1</sup>	LI <sup>2</sup>	<i>A. alba</i> N <sup>3</sup> =110					<i>A. x borisii-regis</i> N=59					<i>A. cephalonica</i> N=90					
				Avg	Min	Max	SD	CV	Avg	Min	Max	SD	CV	Avg	Min	Max	SD	CV	
1.	хексанал	801	801	тр					тр						тр				
2.	( <i>E</i> )-2-хексенал	849	846	0,1	0,0	0,7	0,1	161,5	0,1	0,0	0,5	0,1	152,3	тр					
3.	( <i>E</i> )-3-хексен-1-ол	850	850	тр					тр					тр					
4.	( <i>E</i> )-2-хексен-1-ол	860	859	-					тр					тр					
5.	циклохексанол	865	866 <sup>2a</sup>	тр					тр					-					
6.	хексанол	866	863	тр					-					тр					
7.	сантен	884	884	0,5	0,1	1,5	0,3	56,9	0,7	0,0	3,0	0,5	70,3	0,7	0,0	2,2	0,4	61,1	
8.	трициклен	921	921	3,9	1,4	6,8	1,2	31,8	2,8	0,0	5,8	1,3	46,8	3,2	0,9	5,6	1,0	31,6	
9.	$\alpha$ -тујен	926	924	-					тр					тр					
<b>10.</b>	<b><math>\alpha</math>-пинен</b>	<b>934</b>	<b>932</b>	<b>18,0</b>	<b>11,4</b>	<b>26,4</b>	<b>3,6</b>	<b>19,9</b>	<b>23,1</b>	<b>15,3</b>	<b>42,4</b>	<b>4,8</b>	<b>20,7</b>	<b>31,2</b>	<b>18,0</b>	<b>45,5</b>	<b>5,8</b>	<b>18,6</b>	
<b>11.</b>	<b>камфен</b>	<b>949</b>	<b>946</b>	<b>19,2</b>	<b>8,2</b>	<b>37,2</b>	<b>5,4</b>	<b>28,2</b>	<b>16,6</b>	<b>0,2</b>	<b>34,0</b>	<b>7,2</b>	<b>43,5</b>	<b>15,0</b>	<b>4,7</b>	<b>27,4</b>	<b>4,7</b>	<b>31,3</b>	
12.	туја-2,4(10)-диен	952	953	-					-					тр					
13.	сабинен	971	969	-					тр					тр					
<b>14.</b>	<b><math>\beta</math>-пинен</b>	<b>980</b>	<b>974</b>	<b>30,6</b>	<b>0,8</b>	<b>49,7</b>	<b>11,0</b>	<b>36,0</b>	<b>38,6</b>	<b>13,0</b>	<b>61,4</b>	<b>9,8</b>	<b>25,5</b>	<b>33,9</b>	<b>18,9</b>	<b>51,1</b>	<b>7,0</b>	<b>20,7</b>	
15.	мирцен	990	988	1,3	0,6	2,4	0,4	31,7	1,0	0,3	1,9	0,4	43,3	1,4	0,6	9,5	1,0	75,0	
16.	$\alpha$ -феландрен	1004	1002	0,1	0,0	0,5	0,1	85,5	0,3	0,0	1,1	0,2	77,7	0,4	0,1	1,1	0,2	51,3	
17.	$\alpha$ -терпинен	1015	1014	Тр					тр					тр					
18.	<i>o/p</i> -цимен	1024	1022	-					тр					тр					
<b>19.</b>	<b>лимонен+<math>\beta</math>-феландрен</b>	<b>1029</b>	<b>1024/1025</b>	<b>21,7</b>	<b>6,5</b>	<b>49,8</b>	<b>11,1</b>	<b>51,3</b>	<b>13,0</b>	<b>5,6</b>	<b>26,8</b>	<b>4,7</b>	<b>36,0</b>	<b>10,4</b>	<b>5,2</b>	<b>34,9</b>	<b>4,8</b>	<b>46,2</b>	
20.	еукалиптол	1030	1026	тр					0,2	0,0	1,5	0,3	179,3	0,1	0,0	0,4	0,1	153,5	
21.	2-хептил-ацетат	1040	1038	тр					тр					тр					
22.	$\gamma$ -терпинен	1057	1054	тр					тр					тр					

23.	терпинолен	1087	1086	0,4	0,0	0,9	0,2	46,3	0,2	0,0	0,7	0,2	76,4	0,3	0,1	1,1	0,1	54,1
24.	2-нонанон	1089	1087	тр					тр					0,1	0,0	10,0	1,1	842,0
25.	линалол	1098	1095	тр					тр					тр				
26.	<i>cis-p</i> -мент-2-ене-1-ол	1120	1121	тр					тр					-				
27.	<i>trans-p</i> -мент-2-ене-1-ол	1138	1140 <sup>2a</sup>	тр					тр					тр				
28.	2,6-диметил-1,3,5,7-октатетраен	1143	1134 <sup>2a</sup>	-					-					тр				
29.	камфор	1145	1141	тр					-					-				
30.	камфен-хидрат	1148	1145	тр					-					-				
31.	борнеол	1166	1165	0,9	0,0	3,5	0,8	83,7	0,4	0,0	3,3	0,6	141,9	0,1	0,0	0,7	0,2	122,0
32.	<i>cis</i> -пинокамфон	1174	1172	тр					-					-				
33.	неидентификована*	1189	-	-					тр					0,1	0,0	0,3	0,1	140,4
34.	$\alpha$ -терпинеол	1190	1186	тр					тр					тр				
35.	линалил-ацетат	1254	1254	тр					тр					0,2	0,0	1,7	0,3	169,2
36.	борнил-ацетат	1287	1287	1,6	0,0	7,7	1,4	88,5	0,7	0,0	4,3	0,9	130,3	0,4	0,0	3,0	0,6	148,3
37.	$\alpha$ -терпинил-ацетат	1349	1346	тр					0,1	0,0	0,7	0,2	203,8	0,2	0,0	1,7	0,3	152,0
38.	$\alpha$ -кубебен	1350	1345	-					тр					тр				
39.	$\alpha$ -лонгипинен	1353	1350	0,1	0,0	0,7	0,2	120,2	0,1	0,0	0,4	0,1	189,3	тр				
40.	$\alpha$ -иланген	1373	1373	тр					тр					тр				
41.	лонгициклен	1374	1374 <sup>2a</sup>	тр					-					-				
42.	циклосативен	1375	1369 <sup>2a</sup>	тр					-					-				
43.	$\alpha$ -копаен	1377	1374	тр					тр					тр				
44.	$\beta$ -бурбонен	1387	1387	-					-					тр				
45.	$\beta$ -елемен	1392	1389	-					-					тр				
46.	сибирен	1404	1400	тр					тр					тр				
47.	лонгифолен	1409	1407	тр					тр					тр				

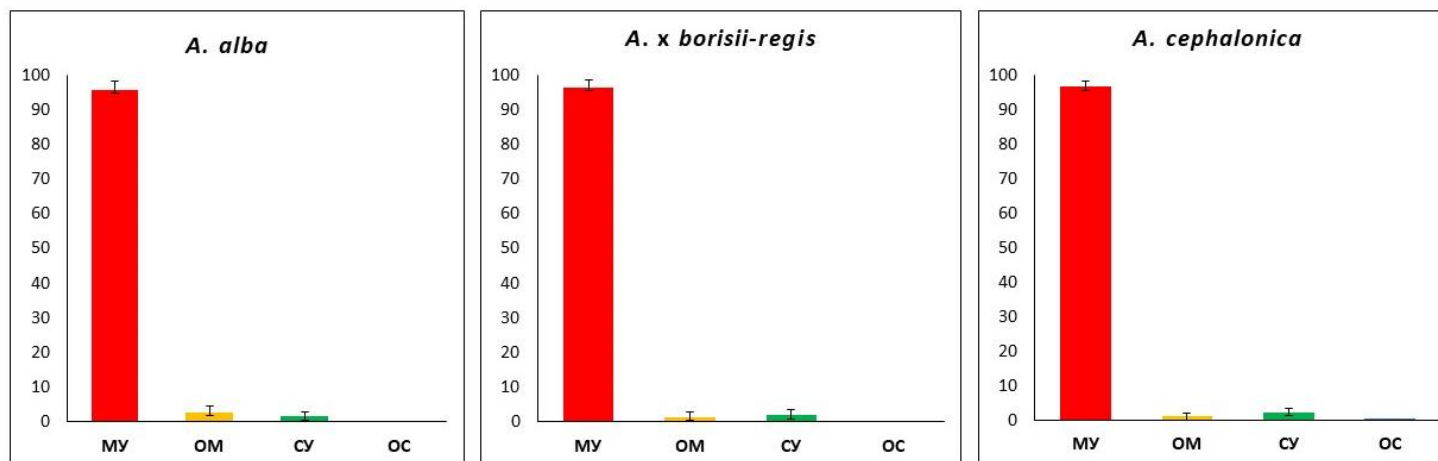
48.	(E)-кариофилен	1420	1417	0,9	0,0	4,6	0,8	89,8	1,2	0,1	3,5	0,9	78,5	1,0	0,1	3,3	0,7	63,9
49.	химахала-2,4-диен	1429	1429 <sup>2a</sup>	0,1	0,0	0,6	0,1	143,1	0,1	0,0	1,1	0,2	247,9	тр				
50.	$\beta$ -копасен	1432	1430	-					тр					тр				
51.	6,9-гуаиадиен	1445	1442	тр					-					-				
52.	cis-муурола-3,5-диен	1451	1448	тр					-					-				
53.	$\alpha$ -химахален	1452	1449	тр					тр					тр				
54.	trans-муурола -3,5-диен	1454	1454 <sup>2a</sup>	тр					тр					тр				
55.	хумулен	1456	1452	0,2	0,0	1,2	0,2	103,9	0,3	0,0	0,9	0,2	86,4	0,4	0,0	1,2	0,2	68,0
56.	9-epi-(E)-кариофилен	1471	1464	-					тр					тр				
57.	trans-кадина-1(6)-4-диен	1476	1475	-					тр					0,1	0,0	0,5	0,1	105,0
58.	$\gamma$ -муролен	1478	1478	-					тр					-				
59.	$\alpha$ -аморфен	1482	1483	тр					тр					тр				
60.	гермакрен D	1484	1848	тр					тр					-				
61.	$\gamma$ -химахален	1486	1481	тр					тр					тр				
62.	11- $\alpha$ H-химахала-1,4-диен	1488	1485	-					тр					тр				
63.	$\beta$ -селинен	1490	1489	0,1	0,0	0,4	0,1	131,6	тр					тр				
64.	$\delta$ -селинен	1494	1492	тр					тр					0,1	0,0	0,4	0,1	65,9
65.	валенцен	1496	1496	-					тр					тр				
66.	$\alpha$ -селинен	1498	1498	тр					тр					0,1	0,0	0,3	0,1	105,9
67.	$\alpha$ -муролен	1501	1500	тр					тр					тр				
68.	$\beta$ -химахален	1503	1500	тр					тр					тр				
69.	$\beta$ -дихидроагарофуран	1505	1503	тр					тр					тр				
70.	$\delta$ -аморфен	1509	1511	тр					тр					тр				
71.	$\gamma$ -кадинен	1516	1513	тр					тр					0,1	0,0	0,3	0,1	121,3
72.	$\delta$ -кадинен	1525	1522	тр					0,1	0,0	0,4	0,1	139,6	0,2	0,0	0,7	0,1	89,0

73.	10- <i>epi</i> - $\gamma$ -еудезмол	1622	1622	-					тр					тр				
	Укупно			100,0	100,0	100,0	0,0	0,0	100,0	99,8	100,3	0,1	0,1	100,0	99,3	100,4	0,1	0,1
	Монотерпенски угљоводоници (МУ)			95,8	87,4	99,3	2,4	2,6	96,6	91,3	99,8	2,2	2,2	96,6	92,1	99,4	1,8	1,8
	Оксидовани монотерпени (ОМ)			2,6	0,1	9,6	1,8	69,3	1,4	0,0	6,3	1,4	97,9	1,0	0,0	6,0	1,0	101,1
	Сесквитерпенски угљоводоници (СУ)			1,5	0,2	7,0	1,4	90,4	1,9	0,1	5,9	1,5	78,4	2,2	0,1	5,9	1,3	59,2
	Оксидовани сесквитерпени (ОС)			тр					тр					тр				
	Остало (О)			0,1	0,0	0,9	0,2	131,2	0,1	0,0	0,9	0,2	134,2	0,1	0,0	0,8	0,1	130,9

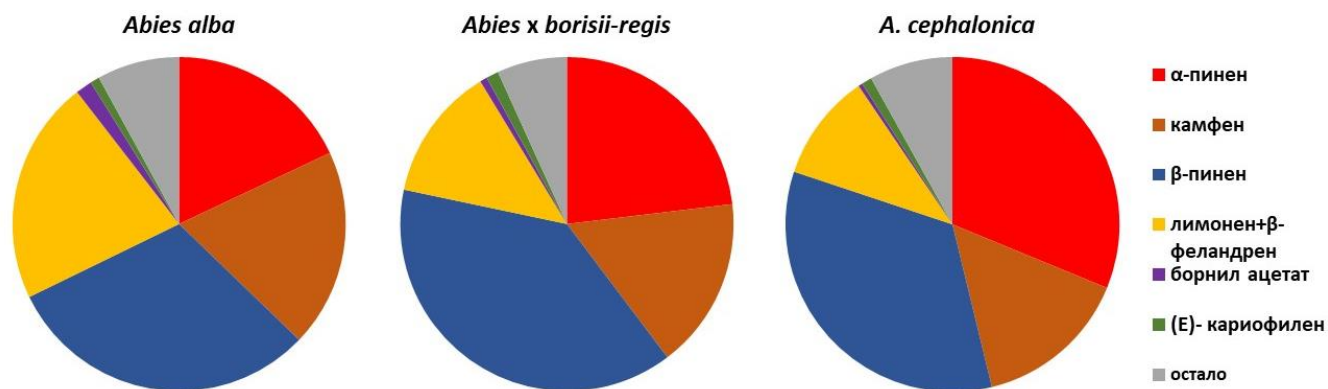
<sup>1</sup>RI: експериментални линеарни ретенциони индекси у односу на *n*-алкане C<sub>8</sub>-C<sub>40</sub>. <sup>2</sup>LI: литературни индекси - Адамсови ретенциони индекси (Adams, 2007) и <sup>2a</sup>у складу са NIST базом података. <sup>3</sup>N: број анализираних јединки за сваки истраживани таксон.

\*неидентификована компонента, MS подаци: маса фрагмената (интензитет) 93 (99), 68 (65), 121 (50), 67 (50), 136 (47), 91 (41), 79 (38), 92 (32).

тр - траг (<0,05%), компоненте које нису детектоване су означене као (-). Компоненте заступљене у просечној концентрацији  $\geq 10\%$  су болдиране.



Слика 5-10. Средње вредности са стандардним девијацијама различитих класа HS испарљивих компоненти четина истраживаних *Abies* таксона. МУ- монотерпенски угљоводоници; ОМ - оксидовани монотерпени; СУ - сесквитерпенски угљоводоници; ОС - оксидовани сесквитерпени.



Слика 5-11. Просечни садржај (%) доминантних HS испарљивих компоненти четина истраживаних *Abies* таксона.



У односу на вредност коефицијента варијације (CV%), ниједна HS компонента се није издвојила као ниско варијабилна (CV%<10). У оквиру умереног степена варијабилности (10<CV%<50) код сва три таксона налазили су се  $\alpha$ -пинен, трициклен, камфен и  $\beta$ -пинен (табела 5-6). Умереним степеном варијабилности одликовао се још мирцен код *A. alba* и *A. x borisii-regis*, лимонен+ $\beta$ -феландрен код *A. x borisii-regis* и *A. cephalonica* и терпинолен код *A. alba*. Са друге стране, у оквиру високог степена варијабилности (50<CV%<100) код сва три таксона налазили су се сантен,  $\alpha$ -феландрен и (*E*)-кариофилен. Такође, високим степеном варијабилности одликовао се још лимонен+ $\beta$ -феландрен, борнеол и борнил-ацетат код *A. alba*, мирцен,  $\delta$ -селинен и  $\delta$ -кадинен код *A. cephalonica* и терпинолен и хумулен код *A. x borisii-regis* и *A. cephalonica*. Остале компоненте налазиле су се у оквиру јако високог степена варијабилности (CV%>100). Најниже вредности овог коефицијента утврђене су за  $\alpha$ -пинен који се може сматрати најстабилнијом HS компонентом код сва три таксона (18,6% - *A. cephalonica*, 19,9% - *A. alba*, 20,7% - *A. x borisii-regis*), док су највише вредности забележене за химахала-2,4-диен (247,9%) код *A. x borisii-regis*, линалил-ацетат (169,2%) код *A. cephalonica* и (*E*)-2-хексенал (161,5%) код *A. alba*, које се могу сматрати најваријабилнијим HS компонентама.

У циљу утврђивања да ли постоје статистички значајне разлике у средњим вредностима HS испарљивих компоненти између испитиваних таксона урађена је ANOVA (табела 5-7). Ова анализа је укључила све компоненте чији је просечни садржај био  $\geq 0,5\%$  код бар једног од испитиваних таксона. На овај начин, тестирано је 12 компоненти, а ANOVA је указала на постојање значајних разлика за све, осим за (*E*)-кариофилен. Извршена је и *post-hoc* провера добијених резултата коришћењем Tukey's HSD for unequal N теста, да би се утврдило између којих конкретних таксона постоје значајне разлике (табела 5-7). Тестиране су све компоненте чија је значајност утврђена ANOVA тестом. *Post-hoc* тест је подржао статистичку значајност разлика између појединачних парова испитиваних таксона за свих 11 компоненти у сагласности са ANOVA тестом. Међутим, само три компоненте ( $\alpha$ -пинен,  $\alpha$ -феландрен и борнеол) су показале значајне разлике између сва три таксона. Наиме, већина компоненти (сантен, трициклен, камфен, лимонен+ $\beta$ -феландрен, терпинолен и борнил-ацетат) је указала на диференцијацију *A. alba* у односу на *A. x borisii-regis* и *A. cephalonica*.

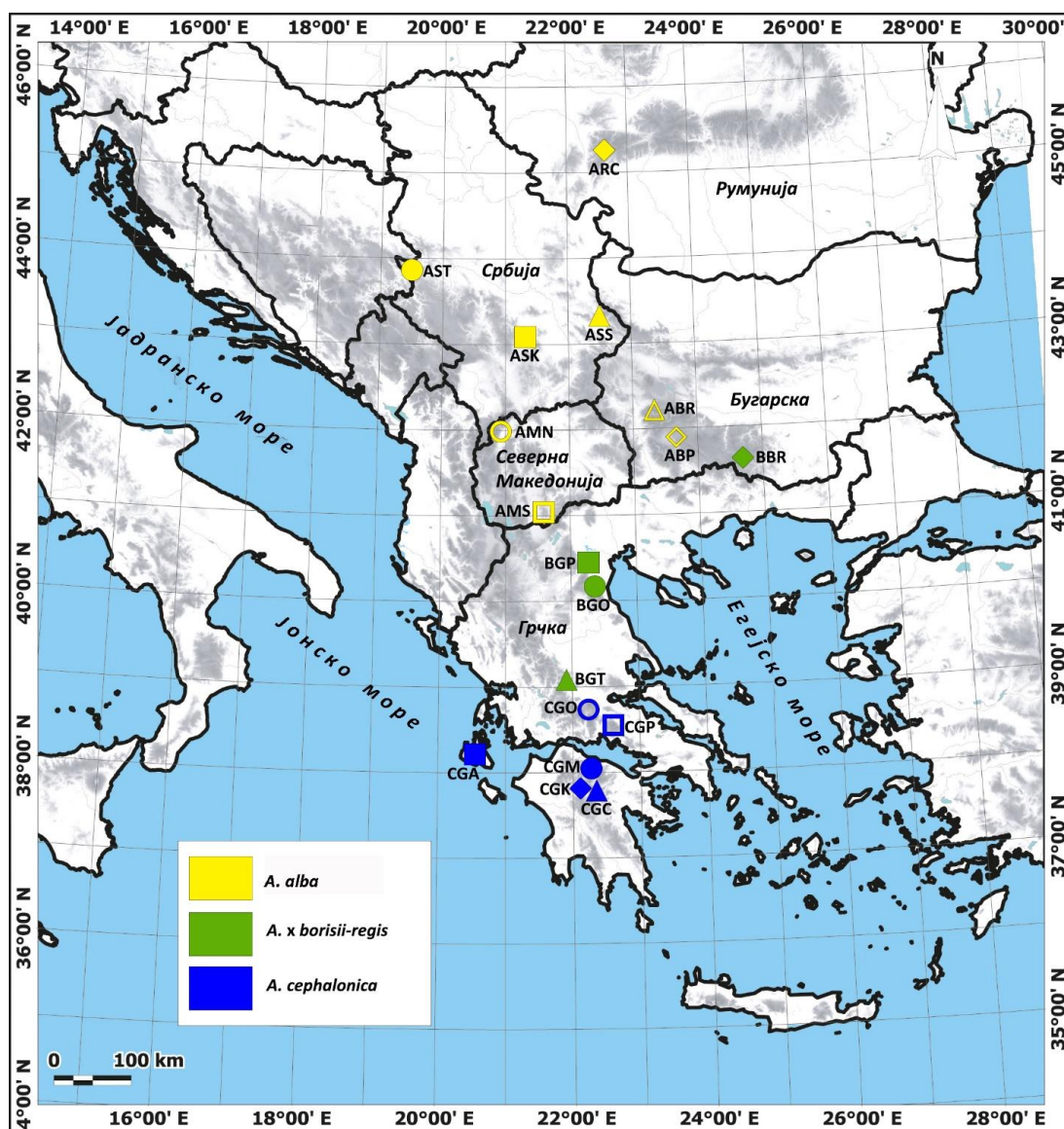
Табела 5-7. Резултати ANOVA и Tukey's HSD for unequal N *post-hoc* теста.

Једињење	F <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	<i>A. alba</i> N <sup>1</sup> =110 Avg <sup>4</sup>	<i>A. x borisii-regis</i> N=59 Avg	<i>A. cephalonica</i> N=90 Avg
сантен	6,5	**	0,5 <sup>a</sup>	0,7 <sup>б</sup>	0,7 <sup>б</sup>
трициклен	17,7	***	3,9 <sup>б</sup>	2,8 <sup>a</sup>	3,2 <sup>a</sup>
α-пинен	192,7	***	18,0 <sup>a</sup>	23,1 <sup>б</sup>	31,2 <sup>б</sup>
камфен	14,0	***	19,2 <sup>б</sup>	16,6 <sup>a</sup>	15,0 <sup>a</sup>
β-пинен	13,5	***	30,6 <sup>a</sup>	38,6 <sup>б</sup>	33,9 <sup>a</sup>
мирцен	5,3	**	1,3 <sup>аб</sup>	1,0 <sup>a</sup>	1,4 <sup>б</sup>
α-феландрен	66,1	***	0,1 <sup>a</sup>	0,3 <sup>б</sup>	0,5 <sup>б</sup>
лимонен+β-феландрен	52,5	***	21,7 <sup>б</sup>	13,0 <sup>a</sup>	10,4 <sup>a</sup>
терпинолен	22,2	***	0,5 <sup>б</sup>	0,2 <sup>a</sup>	0,3 <sup>a</sup>
борнеол	46,0	***	0,9 <sup>б</sup>	0,4 <sup>б</sup>	0,1 <sup>a</sup>
борнил-ацетат	31,9	***	1,6 <sup>б</sup>	0,7 <sup>a</sup>	0,4 <sup>a</sup>
(E)- кариофилен	1,9	нс	0,9	1,2	1,0

<sup>1</sup>N: број анализираних јединки за сваки истраживани таксон. <sup>2</sup>F: ANOVA F-тест. <sup>3</sup>p: ниво значајности теста (нс: нема значајности; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001). <sup>4</sup>Avg: средње вредности са различитим суперскрипт словима у истом реду (а, б, в) се значајно разликују (Tukey's HSD for unequal N *post-hoc* тест).

### 5.2.2. Мултиваријационе статистичке анализе (CDA и CA) HS испарљивих компоненти четина на популационом нивоу

CDA на основу 12 HS испарљивих компоненти четина 259 јединки из 18 популација *A. alba*, *A. x borisii-regis* и *A. cephalonica* (третираних као 18 *a priori* група) са подручја Балканског полуострва (слика 5-12) показала је да прве две канонијске осе учествују у 62,9% укупне дискриминације, од чега CA1 са 44,5% (слика 5-13; табела 5-8).

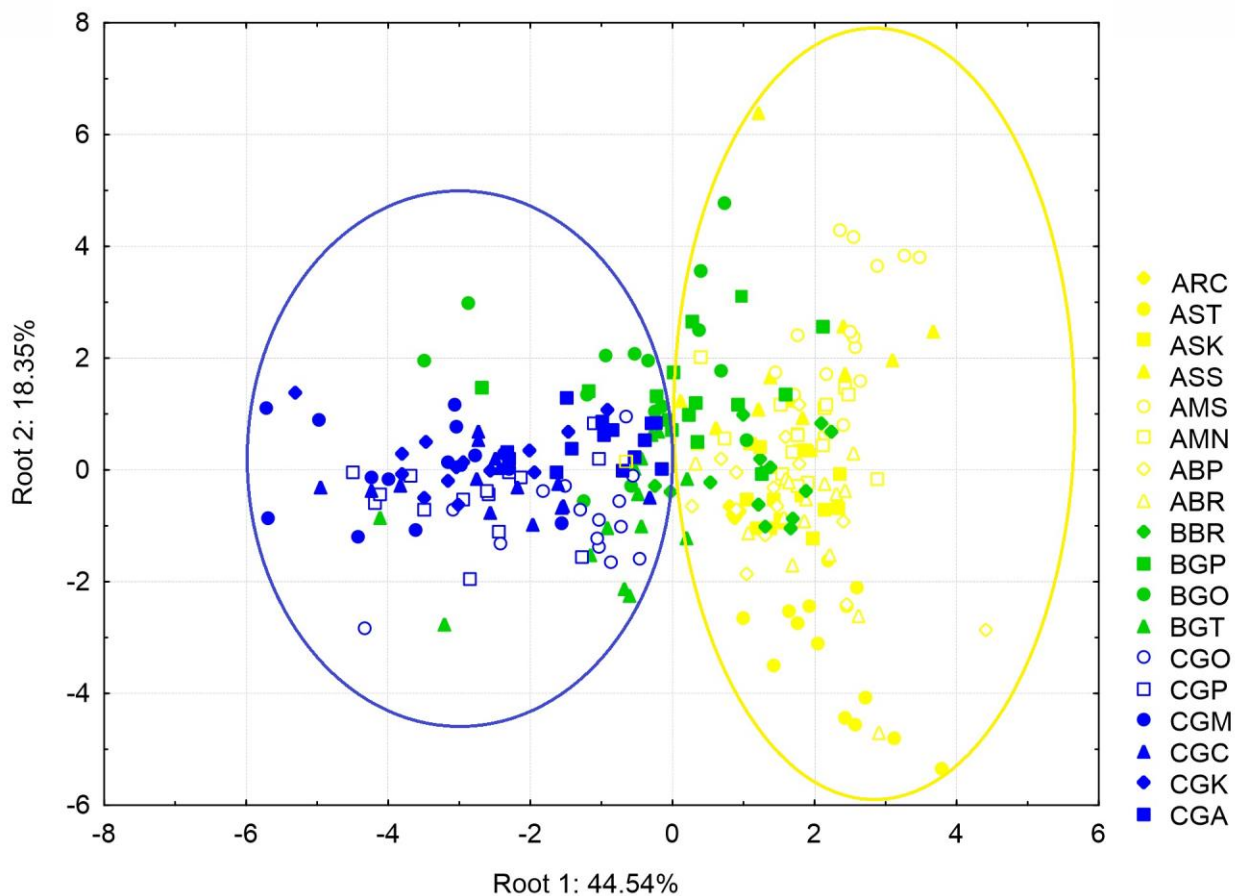


Слика 5-12. Географски положај испитиваних популација. Акрони популација, информације о локалитетима и станишним карактеристикама приказани су у табели 4-1.

Добијени дијаграм расипања указао је на јасну диференцијацију популација *A. alba* и *A. cephalonica* дуж СА1, која објашњава и највећи проценат дискриминације (слика 5-13). Наиме, скоро све јединке из популација *A. alba* показале су позитивне вредности за СА1 (жута елипса), док су јединке популација *A. cephalonica* формирале групу на негативном делу СА1 (плава елипса). Четири компоненте ( $\beta$ -пинен, лимонен+ $\beta$ -феландрен, камфен и  $\alpha$ -пинен) су имале значајан утицај на обе канонијске осе, док је борнил-ацетат значајно утицао само на СА2 (табела 5-8). У сагласности, резултати *post-hoc* теста за ове компоненте подржали су статистичку значајност разлика између претпостављених родитељских врста (осим у случају  $\beta$ -пинена; табела 5-7). Према томе, добијене групе могу бити описане као два HS испарљива профила на следећи начин: “alba” профил одликује већи садржај лимонена+ $\beta$ -феландрена и камфена (21,7 и 19,2%, респ.), а мањи садржај  $\alpha$ -пинена (18,0%) у поређењу са “cephalonica” профилем; *vice versa* “cephalonica” профил одликује мањи садржај лимонена+ $\beta$ -феландрена и камфена (10,4 и 15,0%, респ.), а већи садржај  $\alpha$ -пинена (31,2%) у односу на “alba” профил. На овај начин, *A. alba* и *A. cephalonica* могу се јасно разликовати на основу HS испарљивих компоненти четина.

Међутим, четири проучаване популације *A. x borisii-regis* могу се окарактерисати као хетерогене и на интра- и на интерпопулационом нивоу, слично као и на основу морфоанатомских карактеристика четина (слике 5-5А и 5-6А). Наиме, код северне *A. x borisii-regis* популације са подручја јужне Бугарске (BBR), већина јединки припала је групи “alba” са једном јединком која је била позиционирана у негативном делу СА1 унутар “cephalonica” групе. Међутим, јединке из две јужније популације са територије северне Грчке (BGP и BGO) биле су мање-више равномерно распоређене са обе стране СА1 указујући на приближно једнаку заступљеност оба профила у овим популацијама. Коначно, већина јединки из најјужније *A. x borisii-regis* популације из централне Грчке (BGT) налазила се је у оквиру “cephalonica” групе са неколико јединки које су припале групи “alba” показујући позитивне вредности за СА1. Према томе, све четири проучаване *A. x borisii-regis* популације одликовало је присуство HS испарљивих профила обе родитељске врсте, при чему учесталост профила клинално варира са променом географске ширине у оквиру истраживаног подручја. Међутим, слична хетерогена дистрибуција јединки у односу на СА1 уочена је код још једне популације са крајњег југа Северне

Македоније (AMN), која је прелиминарно класификована као *A. alba* у овој студији. Наиме, ова популација је показала сличан образац као што је описано за суседну *A. x borisii-regis* популацију из јужне Бугарске (BBR) указујући на нешто ширу дистрибуцију *A. x borisii-regis* у односу на прелиминарну класификацију примењену у овој студији.

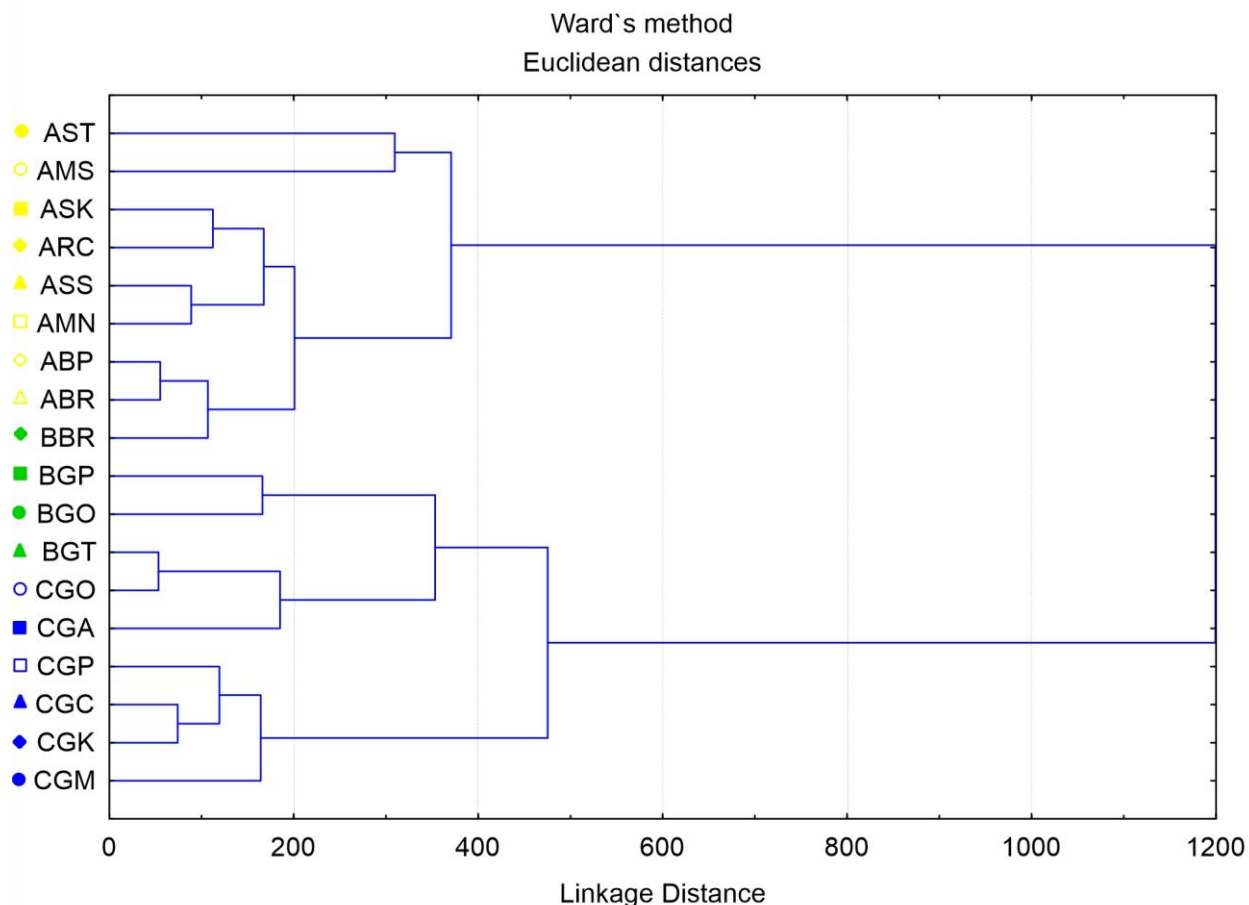


**Слика 5-13.** CDA на основу 12 HS испарљивих компоненти четина 259 јединки из 18 популација. Акроними и симболи се односе на популације као што је назначено на **слици 5-11** и у **табели 4-1**. Боје симбола: жута - *A. alba*, зелена - *A. x borisii-regis*, плава - *A. cephalonica*. Жута и плава елипса обухватају већину јединки *A. alba* и *A. cephalonica* популација, респективно.

**Табела 5-8.** Стандардизовани коефицијенти за прве две канонијске осе (CAs) 12 HS испарљивих компоненти четина на основу CDA са 18 *a priori* група (популација). Значајни коефицијенти су болдирани.

Варијабле	CA1	CA2
Сантен	-0,105	-0,164
трициклен	0,827	-0,905
$\alpha$ -пинен	<b>1,123</b>	<b>1,526</b>
камфен	<b>2,193</b>	<b>2,934</b>
$\beta$ -пинен	<b>4,207</b>	<b>2,859</b>
мирцен	0,063	0,056
$\alpha$ -феландрен	-0,089	0,203
лимонен+ $\beta$ -феландрен	<b>3,690</b>	<b>2,987</b>
терпинолен	0,066	-0,177
борнеол	0,468	-0,712
борнил-ацетат	0,610	<b>1,239</b>
( <i>E</i> )-кариофилен	0,730	0,436
Eigen-вредности	4,197	1,729
Кумулативни % објашњене дискриминације	0,445	0,629

CA (слика 5-14) је подржала постојање две групе популација у сагласности са CDA (слика 5-13). Добијени дендрограм је груписао популације *A. alba* и *A. cephalonica* у два одвојена кластера, док су се популације *A. x borisii-regis* показале као хетерогене: северна популација *A. x borisii-regis* из јужне Бугарске (BBR) налазила се у заједничком кластеру са популацијама северне родитељске врсте (*A. alba*), док су се јужније популације *A. x borisii-regis* са територије северне и централне Грчке (BGP, BGO и BGT) груписале заједно са популацијама јужне родитељске врсте (*A. cephalonica*).



**Слика 5-14.** СА на основу 12 HS испарљивих компоненти четина 259 јединки из 18 популација. Акроними и симболи се односе на популације као што је назначено на **слици 5-11** и у **табели 4-1**. Боје симбола: жута - *A. alba*, зелена - *A. x borisii-regis*, плава - *A. cephalonica*.

Описана латитудинална клина у фреквенцијама *A. alba*/*A. cephalonica* HS испарљивих профила у овој студији је у сагласности са ранијим резултатима публикованим од стране Mitsopoulos и Penetsos (1987) и Krajmerová и сар. (2016), који су уочили клинални образац у дистрибуцији морфо-анатомске и генетичке варијабилности дуж *Abies* ареала на подручју Грчке, респективно. С обзиром да је један од показатеља присуства хибридне зоне клинално варирање свих или већег броја карактеристика на географском подручју између вредности типичних за сваку од две врсте, уочена географска дистрибуција HS испарљивих профила у овој студији, подржава хипотезу да су проучаване *A. x borisii-regis* популације секундарног порекла услед хибридизације између *A. alba* и *A. cephalonica*.

### 5.2.3. Корелациона анализа

Корелациона анализа је урађена са циљем да се утврди међусобна повезаност између варирања HS испарљивих компоненти четина и абиотичких (географских, орографских, геолошких и биоклиматских) параметара локалитета истраживаних популација (**табела 5-9**). Иако је ова анализа показала постојање значајних корелација ( $p < 0,05$ ) за сва 23 абиотичка фактора са неком од тестираних компоненти, већина добијених корелација била је слаба ( $r < \pm 0,5$ ), док су само две компоненте показале корелације средње јачине ( $\pm 0,5 < r < \pm 0,8$ ):  $\alpha$ -пинен (LAT, BIO1, BIO5, BIO6, BIO9, BIO10, BIO11, BIO14, BIO15, BIO17, BIO18, BIO19) и  $\alpha$ -феландрен (LAT, BIO15, BIO18, BIO19). Према томе, ова анализа је указала на потпуно одсуство јаке повезаности ( $r > \pm 0,8$ ) HS испарљивих компоненти са било којим од тестираних абиотичких параметара.

До сада је велики број студија указао на сезонску варијабилност састава терпена (Adams, 1970; Satou et al., 2009; Rostaefar et al., 2017) као и различите абиотичке и биотичке факторе који могу да утичу на продукцију терпена код четинара (Armengol, 2015). Иако је анализирани биљни материјал у овој студији претежно сакупљен током истог годишњег доба (лета и ране јесени), потребно је размотрити чињеницу да је сакупљање извршено током различитих месеци (од краја јуна до почетка октобра, **табела 4-1**). Ако упоредимо груписање испитиваних популација (**слика 5-13**) и месеце сакупљања биљног материјала у њима (**табела 4-1**), група “alba” је укључила популације чији је материјал сакупљен током јуна, августа и октобра, док је група “cephalonica” обухватила популације са материјалом сакупљаним у јулу и септембру. Према томе, није утврђена никаква подударност између груписања популација и месеци сакупљања биљног материјала. Штавише, да би се утврдило да ли су месеци сакупљања материјала утицали на разлике у саставу терпена урађен је још један ANOVA тест. Ова анализа са 5 *a priori* популационих група (јун, јул, август, септембар и октобар) такође није показала значајне разлике између средњих вредности за већину тестираних компоненти (резултати нису приказани), што води ка претпоставци о њиховој генетичкој условљености.



**Табела 5-9.** Резултати корелационе анализе за анализиране географске, орографске, геолошке и биоклиматске параметре. Болдирани коефицијенти корелације ( $r_s$ ) су значајни ( $p < 0,05$ ).

	7 <sup>a</sup>	8	10	11	14	15	16	19	23	31	36	48
LAT <sup>1</sup>	<b>-0,19</b>	<b>0,33</b>	<b>-0,74</b>	<b>0,34</b>	<b>-0,16</b>	-0,05	<b>-0,56</b>	<b>0,47</b>	<b>0,37</b>	<b>0,55</b>	<b>0,41</b>	-0,04
LONG <sup>2</sup>	0,03	<b>-0,18</b>	0,06	-0,08	<b>0,16</b>	-0,02	<b>0,13</b>	<b>-0,14</b>	-0,07	-0,07	-0,07	0,11
ALT <sup>3</sup>	<b>-0,22</b>	0,12	<b>-0,21</b>	-0,01	-0,10	0,04	-0,04	<b>0,22</b>	<b>0,26</b>	<b>0,17</b>	<b>0,25</b>	0,07
SUB <sup>4</sup>	<b>0,25</b>	-0,04	<b>0,48</b>	-0,08	-0,11	0,05	<b>0,36</b>	<b>-0,24</b>	-0,06	<b>-0,28</b>	<b>-0,21</b>	0,05
BIO1 <sup>5</sup>	<b>0,25</b>	<b>-0,24</b>	<b>0,58</b>	<b>-0,21</b>	<b>0,17</b>	0,03	<b>0,39</b>	<b>-0,43</b>	<b>-0,37</b>	<b>-0,41</b>	<b>-0,42</b>	-0,01
BIO2	0,09	-0,11	<b>0,22</b>	<b>-0,14</b>	-0,03	<b>0,24</b>	<b>0,28</b>	-0,05	0,09	<b>-0,17</b>	0,02	-0,11
BIO3	0,06	<b>-0,16</b>	<b>0,45</b>	<b>-0,28</b>	0,04	<b>0,28</b>	<b>0,44</b>	<b>-0,20</b>	-0,02	<b>-0,37</b>	-0,09	-0,12
BIO4	0,08	0,02	<b>-0,29</b>	<b>0,19</b>	-0,07	-0,08	<b>-0,23</b>	<b>0,17</b>	0,08	<b>0,23</b>	0,12	0,00
BIO5	<b>0,26</b>	<b>-0,26</b>	<b>0,60</b>	<b>-0,22</b>	<b>0,15</b>	0,06	<b>0,42</b>	<b>-0,42</b>	<b>-0,34</b>	<b>-0,43</b>	<b>-0,39</b>	-0,02
BIO6	<b>0,23</b>	<b>-0,24</b>	<b>0,63</b>	<b>-0,24</b>	<b>0,18</b>	0,01	<b>0,41</b>	<b>-0,46</b>	<b>-0,40</b>	<b>-0,45</b>	<b>-0,44</b>	0,00
BIO7	0,09	-0,03	-0,08	0,04	-0,10	<b>0,12</b>	0,03	0,12	<b>0,18</b>	0,07	<b>0,13</b>	-0,06
BIO8	0,01	<b>0,17</b>	<b>-0,24</b>	<b>0,17</b>	0,06	-0,04	<b>-0,30</b>	0,04	0,01	<b>0,34</b>	-0,05	-0,09
BIO9	<b>0,18</b>	<b>-0,37</b>	<b>0,55</b>	<b>-0,27</b>	<b>0,16</b>	0,00	<b>0,47</b>	<b>-0,37</b>	<b>-0,34</b>	<b>-0,43</b>	<b>-0,34</b>	0,10
BIO10	<b>0,26</b>	<b>-0,24</b>	<b>0,57</b>	<b>-0,19</b>	<b>0,16</b>	0,02	<b>0,37</b>	<b>-0,42</b>	<b>-0,37</b>	<b>-0,40</b>	<b>-0,41</b>	-0,01
BIO11	<b>0,24</b>	<b>-0,24</b>	<b>0,62</b>	<b>-0,24</b>	<b>0,18</b>	0,03	<b>0,42</b>	<b>-0,45</b>	<b>-0,38</b>	<b>-0,44</b>	<b>-0,43</b>	-0,01
BIO12	-0,10	<b>0,21</b>	0,05	-0,04	<b>-0,18</b>	<b>0,15</b>	0,11	0,10	<b>0,27</b>	0,06	<b>0,14</b>	-0,02
BIO13	-0,02	0,07	<b>0,41</b>	<b>-0,18</b>	-0,09	<b>0,20</b>	<b>0,35</b>	<b>-0,15</b>	0,07	<b>-0,23</b>	-0,07	-0,05
BIO14	<b>-0,18</b>	<b>0,29</b>	<b>-0,65</b>	<b>0,27</b>	<b>-0,20</b>	-0,05	<b>-0,45</b>	<b>0,47</b>	<b>0,37</b>	<b>0,49</b>	<b>0,41</b>	0,01
BIO15	<b>0,16</b>	<b>-0,15</b>	<b>0,71</b>	<b>-0,30</b>	0,08	<b>0,17</b>	<b>0,54</b>	<b>-0,42</b>	<b>-0,20</b>	<b>-0,48</b>	<b>-0,34</b>	-0,05
BIO16	-0,02	0,07	<b>0,43</b>	<b>-0,18</b>	-0,08	<b>0,19</b>	<b>0,36</b>	<b>-0,17</b>	0,05	<b>-0,23</b>	-0,09	-0,05
BIO17	<b>-0,20</b>	<b>0,30</b>	<b>-0,68</b>	<b>0,28</b>	<b>-0,20</b>	-0,04	<b>-0,47</b>	<b>0,49</b>	<b>0,40</b>	<b>0,51</b>	<b>0,44</b>	0,02
BIO18	<b>-0,19</b>	<b>0,35</b>	<b>-0,65</b>	<b>0,29</b>	<b>-0,17</b>	-0,02	<b>-0,50</b>	<b>0,43</b>	<b>0,37</b>	<b>0,52</b>	<b>0,38</b>	-0,04
BIO19	0,06	-0,08	<b>0,57</b>	<b>-0,27</b>	-0,01	<b>0,16</b>	<b>0,50</b>	<b>-0,28</b>	-0,06	<b>-0,34</b>	<b>-0,20</b>	0,01

<sup>1</sup>LAT: географска ширина. <sup>2</sup>LONG: географска дужина. <sup>3</sup>ALT: надморска висина. <sup>4</sup>SUB: геолошка подлога. <sup>5</sup>BIO1-BIO19: биоклиматски параметри.

<sup>a</sup>Бројеви у *Italic*-у односе се на редне бројеве једињења, cf. табела 5-6.

### 5.3. Етарска уља

#### 5.3.1. Варијабилност састава етарског уља гранчица са четинама испитиваних таксона

Хидродестилацијом гранчица са четинама три истраживана *Abies* таксона добијена су безбојна етарска уља (*A. alba* и *A. x borisii-regis*) као и етарско уље светло жуте боје (*A. cephalonica*). Хроматограми добијених уља приказани су на **слици 5-15**.

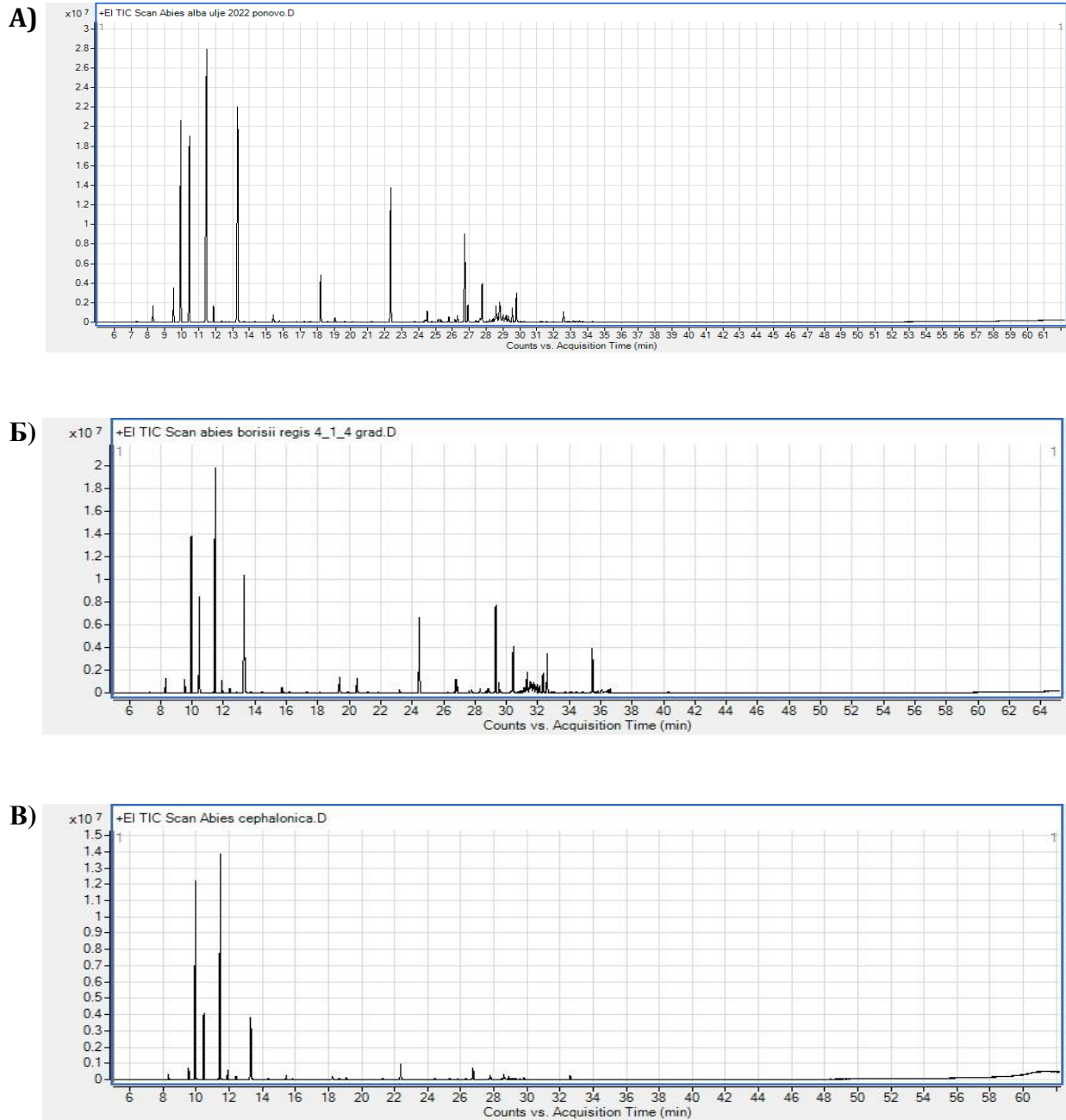
Приноси етарских уља варирали су у опсегу од 0,26% (w/w) код *A. cephalonica* до 0,52 % (w/w) код *A. x borisii-regis* (**табела 5-10**). Код сва три уља, доминантну класу једињења представљали су монотерпенски угљоводоници у опсегу од 55,9% (*A. x borisii-regis*) до 91,7% (*A. cephalonica*; **слика 5-16, табела 5-10**). Такође, код сва три уља,  $\beta$ - и  $\alpha$ -пинен су представљали две најзаступљеније компоненте (**слика 5-17, табела 5-10**). Ипак, садржај ове две компоненте у уљу *A. cephalonica* је био око два пута већи -  $\beta$ -пинен - 35,5% и  $\alpha$ -пинен - 29,2%) у односу на уља друга два таксона: *A. alba* -  $\beta$ -пинен - 22,3% и  $\alpha$ -пинен - 12,4%) и *A. x borisii-regis* -  $\beta$ -пинен - 21,1% и  $\alpha$ -пинен - 11,6%). Са друге стране, највеће концентрације камфена и лимонена утврђене су у уљу *A. alba* (10,9 и 10,7%, респ.). У погледу садржаја камфена, уље *A. cephalonica* је било на другом месту (9,8%), а уље *A. x borisii-regis* на трећем (7,0%), док је нешто већа концентрација лимонена утврђена у уљу *A. x borisii-regis* (7,3%) у поређењу са уљем *A. cephalonica* (5,8%). Према томе, хибридни таксон је према садржају  $\beta$ - и  $\alpha$ -пинена сличнији северној родитељској врсти (*A. alba*), док је у односу на садржај лимонена и камфена нешто ближи јужној родитељској врсти (*A. cephalonica*). На овај начин, фитохемијски профили доминантних компоненти етарског уља гранчица са четинама балканских *Abies* таксона могу се представити на следећи начин:

*A. alba*:  $\beta$ -пинен >>  $\alpha$ -пинен > камфен = лимонен >  $\beta$ -феландрен

*A. x borisii-regis*:  $\beta$ -пинен >>  $\alpha$ -пинен > лимонен = камфен >  $\beta$ -феландрен

*A. cephalonica*:  $\beta$ -пинен >>  $\alpha$ -пинен >>> камфен >  $\beta$ -феландрен = лимонен

(где према *Petrakis* и сар. (2001), =, >, >>, и >>> представљају разлике од 0,1-1,0%, 1,1-5,0%, 5,1-15,0%, и више од 15,1%, респ.).



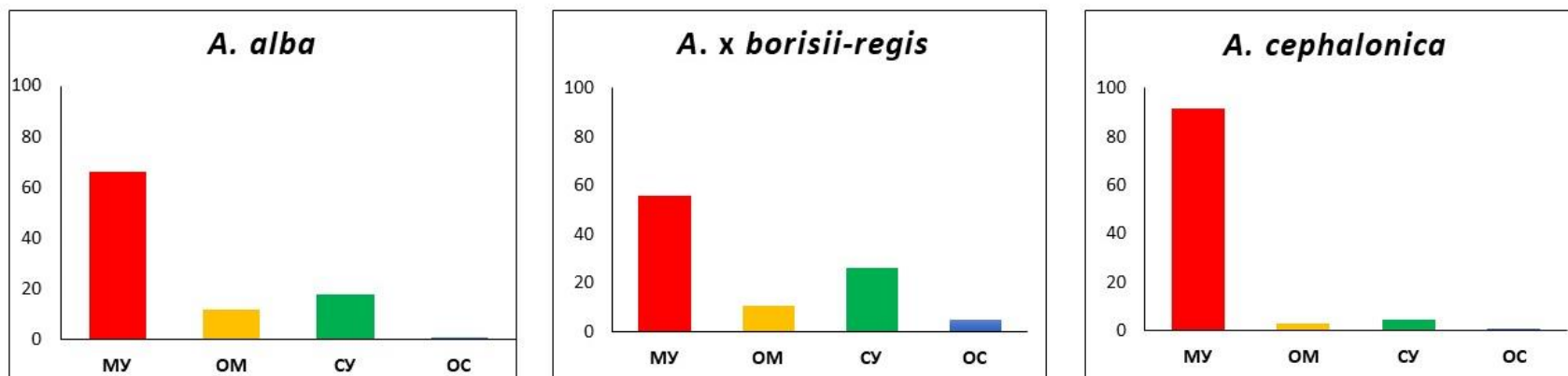
Слика 5-15. Хроматограми старског уља гранчица са четинама: А) *A. alba*; Б) *A. x borisii-regis*; и В) *A. cephalonica*.

Табела 5-10. Хемијски састав етарских уља истраживаних *Abies* таксона.

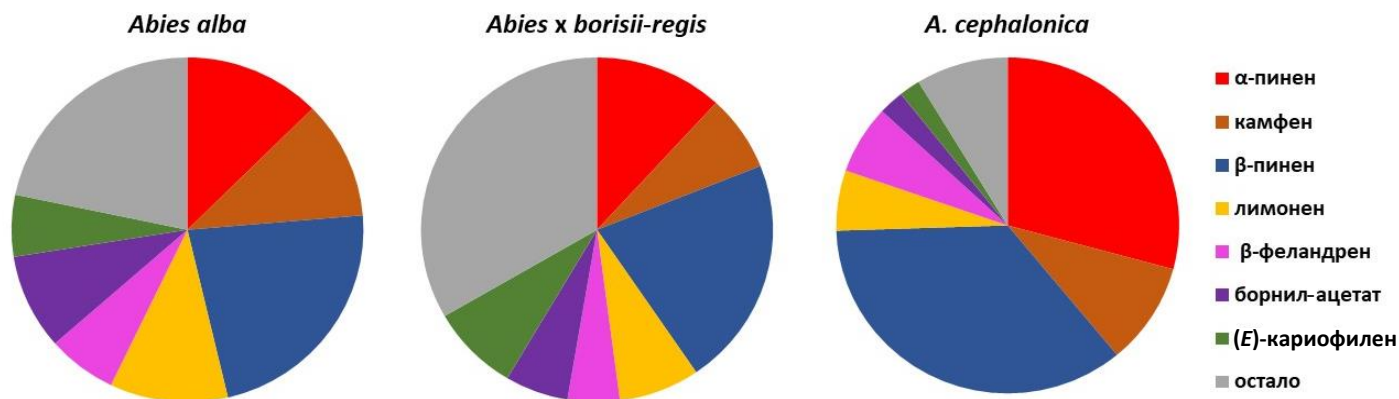
Р. бр.	RI <sup>1</sup>	LI <sup>2</sup>	Једињење	Класа једињења <sup>3</sup>	Садржај (%)		
					<i>A. alba</i>	<i>A. x borisii-regis</i>	<i>A. cephalonica</i>
1.	845	846	( <i>E</i> )-2-хексенал	АД	тр	тр	-
2.	853	850	( <i>E</i> )-3-хексен-1-ол	АК	тр	тр	тр
3.	880	884	сантен	МУ	0,8	1,1	0,7
4.	919	921	трициклен	МУ	1,7	1,1	1,7
5.	923	924	$\alpha$ -тујен	МУ	тр	тр	тр
6.	<b>932</b>	<b>932</b>	<b><math>\alpha</math>-пинен</b>	<b>МУ</b>	<b>12,4</b>	<b>11,6</b>	<b>29,2</b>
7.	<b>946</b>	<b>946</b>	<b>камфен</b>	<b>МУ</b>	<b>10,9</b>	<b>7,0</b>	<b>9,8</b>
8.	970	969	сабинен	МУ	тр	тр	тр
9.	<b>976</b>	<b>974</b>	<b><math>\beta</math>-пинен</b>	<b>МУ</b>	<b>22,3</b>	<b>21,1</b>	<b>35,5</b>
10.	987	988	мирцен	МУ	0,9	1,0	1,3
11.	1001	1002	$\alpha$ -феландрен	МУ	0,1	0,4	0,5
12.	1006	1008	$\delta$ -3-карен	МУ	тр	тр	тр
13.	1013	1014	$\alpha$ -терпинен	МУ	тр	тр	тр
14.	1021	1022	<i>o</i> -цимен	АУ	тр	тр	-
15.	<b>1026</b>	<b>1024</b>	<b>лимонен</b>	<b>МУ</b>	<b>10,7</b>	<b>7,3</b>	<b>5,8</b>
16.	1027	1025	$\beta$ -феландрен	МУ	6,3	4,7	6,6
17.	1055	1054	$\gamma$ -терпинен	МУ	тр	тр	тр
18.	1085	1086	терпинолен	МУ	0,4	0,6	0,6
19.	1100	1095	линалол	ОМ	0,1	тр	тр
20.	1145	1141	камфор	ОМ	тр	тр	-
21.	1149	1145	камфен-хидрат	ОМ	0,1	тр	-
22.	1164	1165	борнеол	ОМ	2,8	1,7	0,6
23.	1175	1174	терпинен-4-ол	ОМ	тр	тр	тр
24.	1187	1186	$\alpha$ -терпинеол	ОМ	0,3	1,6	тр
25.	1223	1223	цитронелол	ОМ	тр	-	-
26.	1251	1254	линалил-ацетат	ОМ	тр	0,3	тр
27.	1285	1287	борнил-ацетат	ОМ	8,8	5,7	2,4
28.	1347	1346	$\alpha$ -терпинил-ацетат	ОМ	тр	1,4	тр
29.	1350	1351	$\alpha$ -лонгипинен	СУ	0,6	0,5	тр
30.	1371	1373	$\alpha$ -иланген	СУ	0,2	0,2	тр
31.	1375	1374	$\alpha$ -копен	СУ	0,2	0,3	тр
32.	1378	1379	геранил-ацетат	ОМ	тр	тр	-

33.	1391	1389	$\beta$ -елемен	СУ	0,3	0,6	тр
34.	1402	1400	сибирен	СУ	0,2	0,2	-
35.	1407	1407	лонгифолен	СУ	0,4	0,5	тр
36.	1421	1417	( <i>E</i> )-кариофилен	СУ	5,7	8,0	2,0
37.	1427	1429 <sup>nist</sup>	химахала-2,4-диен	СУ	1,0	0,9	-
38.	1451	1449	$\alpha$ -химахален	СУ	0,3	0,3	-
39.	1455	1452	$\alpha$ -хумулен	СУ	2,6	4,5	0,8
40.	1476	1475	<i>trans</i> -кадина-1(6),4-диен	СУ	0,1	тр	-
41.	1477	1478	$\gamma$ -мурулен	СУ	0,2	0,5	1,0
42.	1482	1480	гермакрен D	СУ	0,9	2,0	-
43.	1485	1481	$\gamma$ -химахален	СУ	0,2	0,3	-
44.	1488	1489	$\beta$ -селинен	СУ	тр	0,8	-
45.	1490	1492	$\delta$ -селинен	СУ	тр	тр	0,4
46.	1492	1496	валенцен	СУ	1,8	-	-
47.	1496	1498	$\alpha$ -селинен	СУ	0,6	1,0	-
48.	1499	1500	$\alpha$ -мурулен	СУ	0,2	0,4	тр
49.	1503	1500	$\beta$ -химахален	СУ	0,3	0,4	-
50.	1504	1503	$\beta$ -дихидроагарофуран	ОС	0,2	0,2	тр
51.	1507	1511	$\delta$ -аморфен	СУ	0,3	0,6	тр
52.	1514	1513	$\gamma$ -кадинен	СУ	0,8	1,7	тр
53.	1521	1526	7- <i>epi</i> - $\alpha$ -селинен	СУ	0,1	тр	тр
54.	1523	1522	$\delta$ -кадинен	СУ	1,7	3,2	0,4
55.	1540	1537	$\alpha$ -кадинен	СУ	0,1	-	-
56.	1587	1582	кариофилен-оксид	ОС	0,1	тр	-
57.	1621	1622	10- <i>epi</i> - $\gamma$ -еудезмол	ОС	0,8	4,0	0,7
58.	1641	1644	$\alpha$ -муролол	ОС	0,1	0,4	-
Монотерпенски угљоводоници (МУ)					66,4	55,9	91,7
Оксидовани монотерпени (ОМ)					12,1	10,7	3,0
Сесквитерпенски угљоводоници (СУ)					18,0	26,5	4,6
Оксидовани сесквитерпени (ОС)					1,0	5,0	0,7
Остало (АД+АЛ+АУ)					тр	тр	-
Укупно					97,5	98,1	100,0
Принос (% , w/w)					0,36	0,52	0,26

<sup>1</sup>RI: експериментални линеарни ретенциони индекси у односу на *n*-алкане C<sub>8</sub>-C<sub>40</sub>. <sup>2</sup>LI: литературни индекси - Адамсови ретенциони индекси (Adams, 2007) и у складу са *NIST* базом података. <sup>3</sup>Монотерпенски угљоводоници (МУ), оксидовани монотерпени (ОМ), сесквитерпенски угљоводоници (СУ), оксидовани сесквитерпени (ОС), остало (АД - алдехиди, АЛ - алкохоли и АУ - ароматични угљоводоници); тр – траг (<0,1%), компоненте које нису детектоване су означене као (-). Компоненте заступљене у концентрацији  $\geq 10\%$  код бар једног таксона су болдиране.



Слика 5-16. Релативни садржај (%) различитих класа терпена у старским уљима истраживаних *Abies* таксона. МУ - монотерпенски угљоводоници; ОМ - оксидовани монотерпени; СУ - сесквитерпенски угљоводоници; ОС - оксидовани сесквитерпени.



Слика 5-17. Релативни садржај (%) доминантних компоненти ( $\geq 5\%$ ) у старским уљима истраживаних *Abies* таксона.

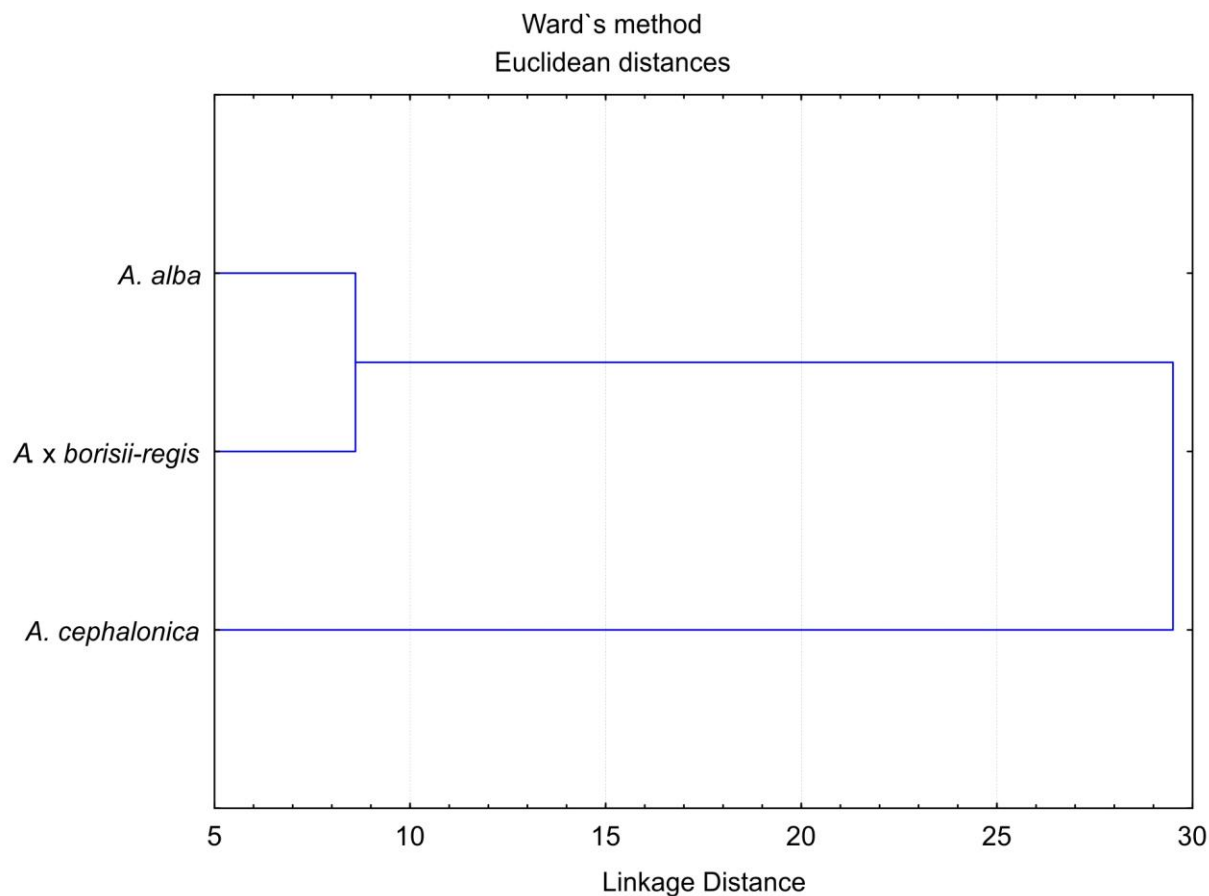
Узимајући у обзир мање заступљене класе терпена, највећи проценат оксидованих монотерпена утврђен је у уљу *A. alba* (12,1%) са борнил-ацетатом (8,8%) као главним представником ове класе. Са друге стране, сесквитерпенски угљоводоници били су најзаступљенији у уљу *A. x borisii-regis* (26,5%) са највећим садржајем (*E*)-кариофилена (8,0%).

Слично приказаним резултатима, *Roussis* и сар. (2000) су показали доминацију  $\beta$ - и  $\alpha$ -пинена, камфена и лимонена у етарском уљу четина *A. alba*, *A. x borisii-regis* и *A. cephalonica*, при чему је сваку врсту одликовао специфичан редослед заступљености ових једињења. Међутим, поменути аутори су као главног представника класе оксидованих монотерпена идентификовали  $\alpha$ -фенцил-ацетат са највећом концентрацијом у уљу *A. alba* (14,2%), док је глобулол био најзаступљенији сесквитерпенски угљоводоник са највећом концентрацијом у уљу *A. x borisii-regis* (7,8%). Занимљиво је да су *Yang* и сар. (2009) приликом анализирања комерцијалног етарског уља *A. alba* добијеног из гранчица са четинама показали доминацију борнил-ацетата (30,3%) и камфена (19,8%). Поред тога, *Koukos* и сар. (2001) су указали на доминацију лимонена (46,5%) у етарском уљу гранчица *A. x borisii-regis*. Такође, лимонен (82,9%) је детектован као доминантна компонента етарског уља семена, а  $\alpha$ -пинен (50,0%) уља шишарки *A. alba* (*Wajs-Bonikowska et al.*, 2015).

### 5.3.2. Мултиваријациона статистичка анализа (СА) компоненти етарског уља на специјском нивоу

Дендрограм добијен на основу СА (слика 5-18) показао је постојање два главна кластера при чему је један укључио *A. alba* и *A. x borisii-regis*, а други *A. cephalonica*. Дакле, на основу састава етарског уља гранчица са четинама хибридни таксон је сличнији северној родитељској врсти (*A. alba*) него јужној (*A. cephalonica*). Овакав резултат СА био је и очекиван, с обзиром на фитохемијске профиле доминантних компоненти приказаних у претходном поглављу (5.3.1. “Варијабилност састава етарског уља гранчица са четинама испитиваних таксона”). Наиме, иако су код сва три уља,  $\beta$ - и  $\alpha$ -пинен представљали две

најзаступљеније компоненте, њихов садржај у уљу *A. cephalonica* је био око два пута већи - 64,7% ( $\beta$ -пинен - 35,5% и  $\alpha$ -пинен - 29,2%) у односу на уља *A. alba* - 34,7% ( $\beta$ -пинен - 22,3% и  $\alpha$ -пинен - 12,4%) и *A. x borisii-regis* - 32,7% ( $\beta$ -пинен - 21,1% и  $\alpha$ -пинен - 11,6%). Са друге стране, уља *A. alba* и *A. x borisii-regis* одликовао је нешто већи садржај борнил-ацетата (8,8 и 5,7%, респ.) и (*E*)-кариофилена (5,7 и 8,0%, респ.) у поређењу са уљем *A. cephalonica* (борнил-ацетат - 2,4% и (*E*)-кариофилен - 2,0%).



**Слика 5-18.** СА на основу 27 компоненти етарског уља гранчица са четинама истраживаних *Abies* таксона.

Ипак, добијени резултат није у сагласности са ранијим студијама, базираним на саставу етарског уља четина (Roussis et al., 2000) као и варијабилности алозима код балканских *Abies* таксона (Fady & Conkle, 1993), које су указале на ближи положај хибридног таксона јужној родитељској врсти (*A. cephalonica*). Међутим, све ове процене о диференцијацији *A. x borisii-regis* у односу на претпостављене родитељске врсте би требало узети са опрезом, с обзиром на то да природне хибридне зоне одликује просторни



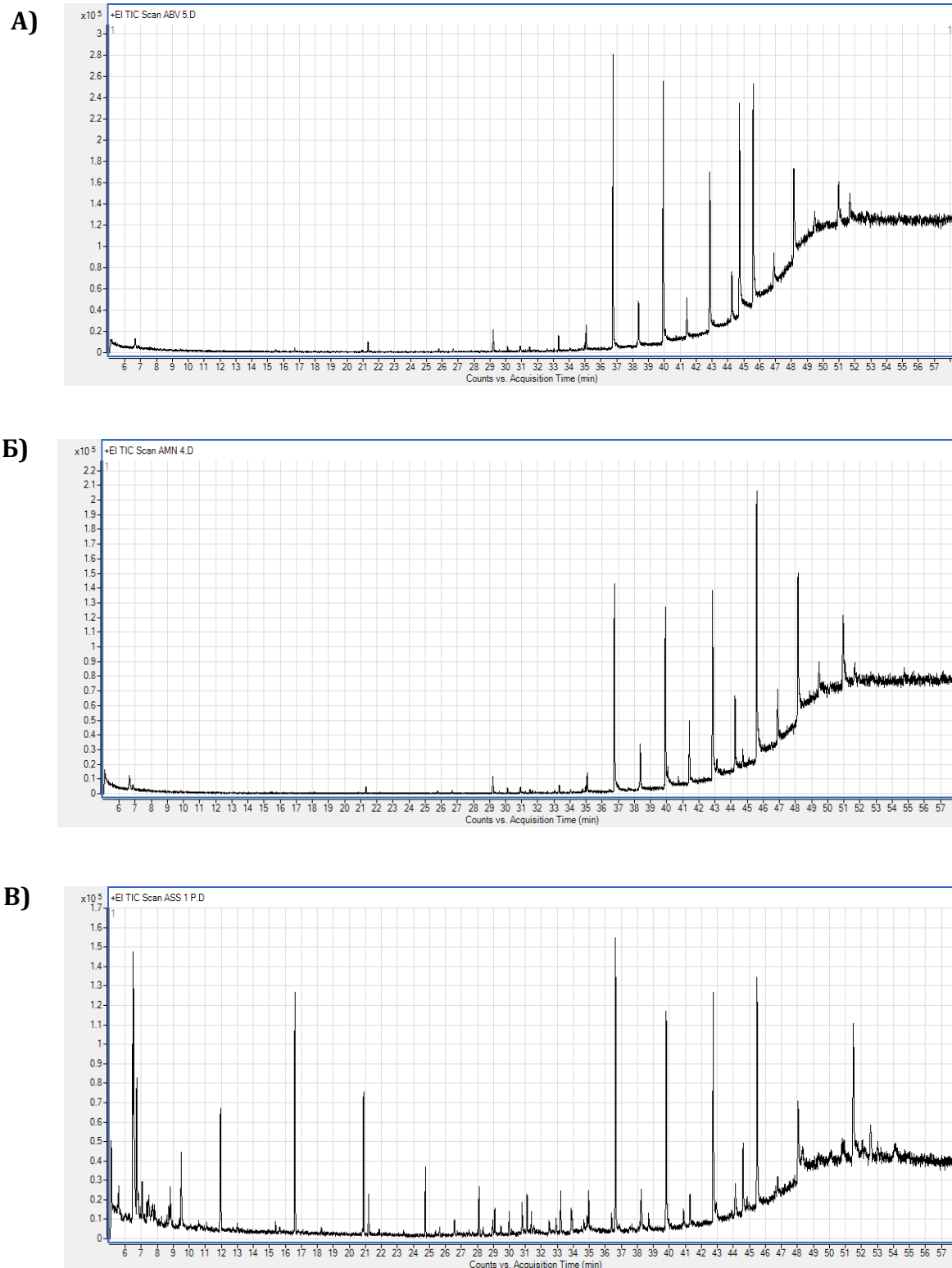
образац у коме се вредности проучаваних карактеристика постепено мењају на географском подручју између вредности типичних за сваку од две врсте. Према томе, приликом процене степена диференцијације требало би узети у обзир географски положај популација које су анализирани. Као што би се могло и претпоставити, популација *A. x borisii-regis* која је анализирана у овој студији са аспекта састава етарског уља (Пијерија) има севернији положај у односу популације *A. x borisii-regis* (Трикала и Пиндос) које су истраживане од стране *Roussis* и сар. (2000) и *Fady* и *Conkle* (1993).

## 5.4. Кутикуларни воскови

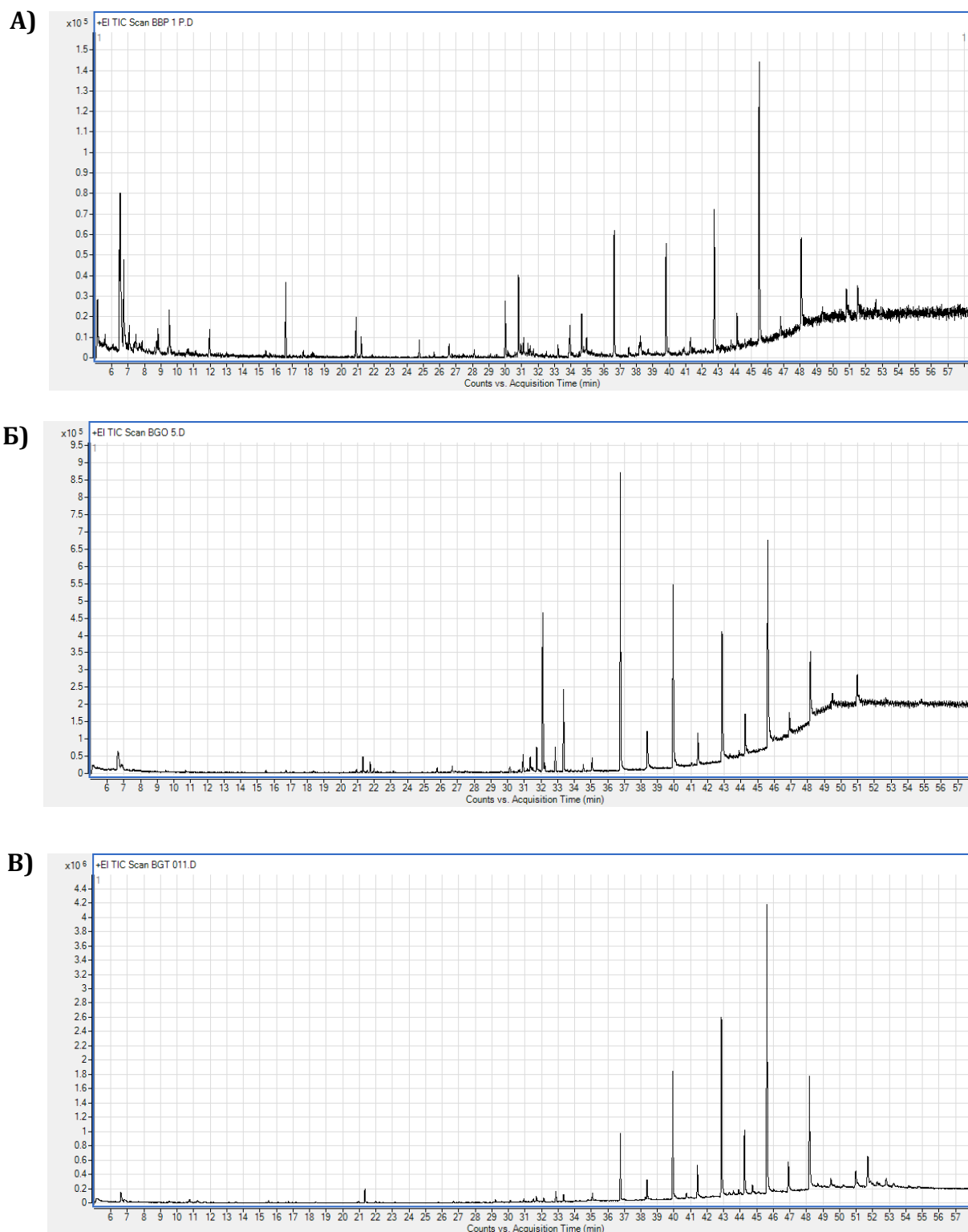
### 5.4.1. Варијабилност компоненти кутикуларних воскова четина испитиваних таксона

У кутикуларним восковима четина 269 јединки из 18 популација *A. alba*, *A. x borisii-regis* и *A. cephalonica* са подручја Балканског полуострва идентификовано је 18 компоненти (табела 5-11). Експериментални и литературни ретенциони индекси (RI и LI) као и класе једињења којима идентификоване компоненте припадају приказани су у табели 5-11. Неколико одабраних хроматограма екстраката воска сва три истраживана таксона приказано је на сликама 5-19, 5-20 и 5-21.

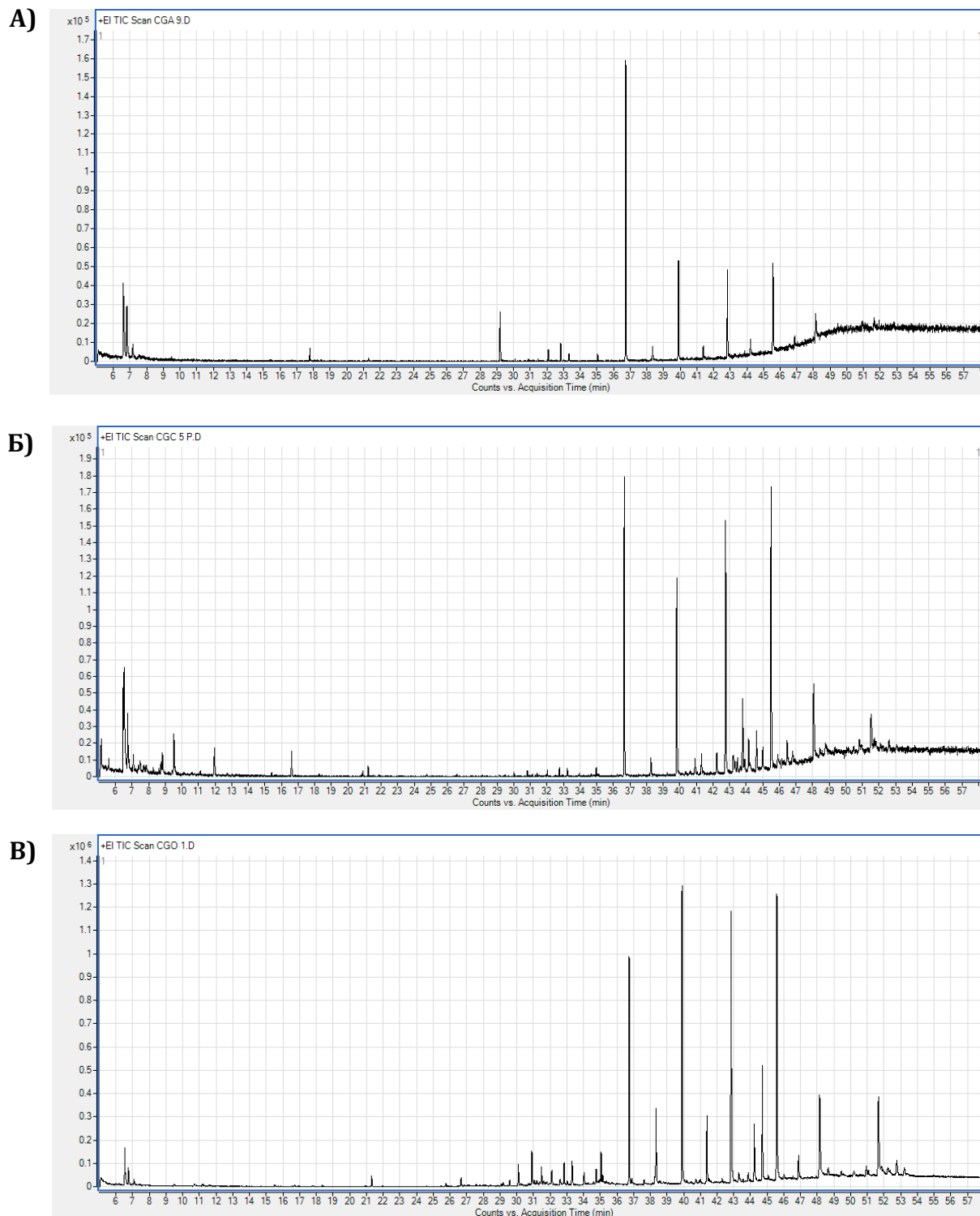
Из класе липидних једињења која настају од масних киселина веома дугог ланца утврђено је присуство једног примарног алкохола (1-хексадеканол) и 13 *n*-алкана (C<sub>21</sub> - C<sub>33</sub>). Поред тога, из класе липидних једињења која воде порекло од изопреноида, идентификована су два дитерпена (абиетатриен и *cis*-абиетатриен), један тритерпен (сквален) и један стерол ( $\gamma$ -ситостерол). Код сва три *Abies* таксона, *n*-алкани су представљали најзаступљенију класу једињења (од 62,0% код *A. cephalonica* до 66,5% код *A. x borisii-regis*), док је садржај свих осталих класа једињења био знатно нижи (испод 10%; слика 5-22). Друга најзаступљенија класа једињења били су или тритерпени (6,7% код *A. cephalonica* и 6,2% код *A. alba*) или стероли (5,1% код *A. x borisii-regis*). Једина класа једињења која је показала ограничену дистрибуцију били су дитерпени: скоро потпуно одсутни код *A. alba*, са средњом концентрацијом од 1,0% код *A. x borisii-regis* и са максималном концентрацијом од 3,3% код *A. cephalonica*. Најзаступљенија класа једињења (*n*-алкани) била је у исто време и најстабилнија класа једињења са коефицијентом варијације (CV) који је незнатно варирао од 24,7% (*A. cephalonica*) до 25,0% (*A. alba*). Са друге стране, скоро све остале класе једињења биле су јако високо варијабилне код сва три таксона (CV>100%).



**Слика 5-19.** Хроматограми кутикуларног воска четина *A. alba*: А) јединка АВV\_5; Б) јединка АМN\_4; и В) јединка АSS\_1 (акроними популација приказани су у **табели 4-1**).



**Слика 5-20.** Хроматограми кутикуларног воска четина *A. x borisii-regis*: А) јединка ВВР\_1; Б) јединка ВГО\_5; и В) јединка ВГТ\_11 (акроними популација приказани су у **табели 4-1**).

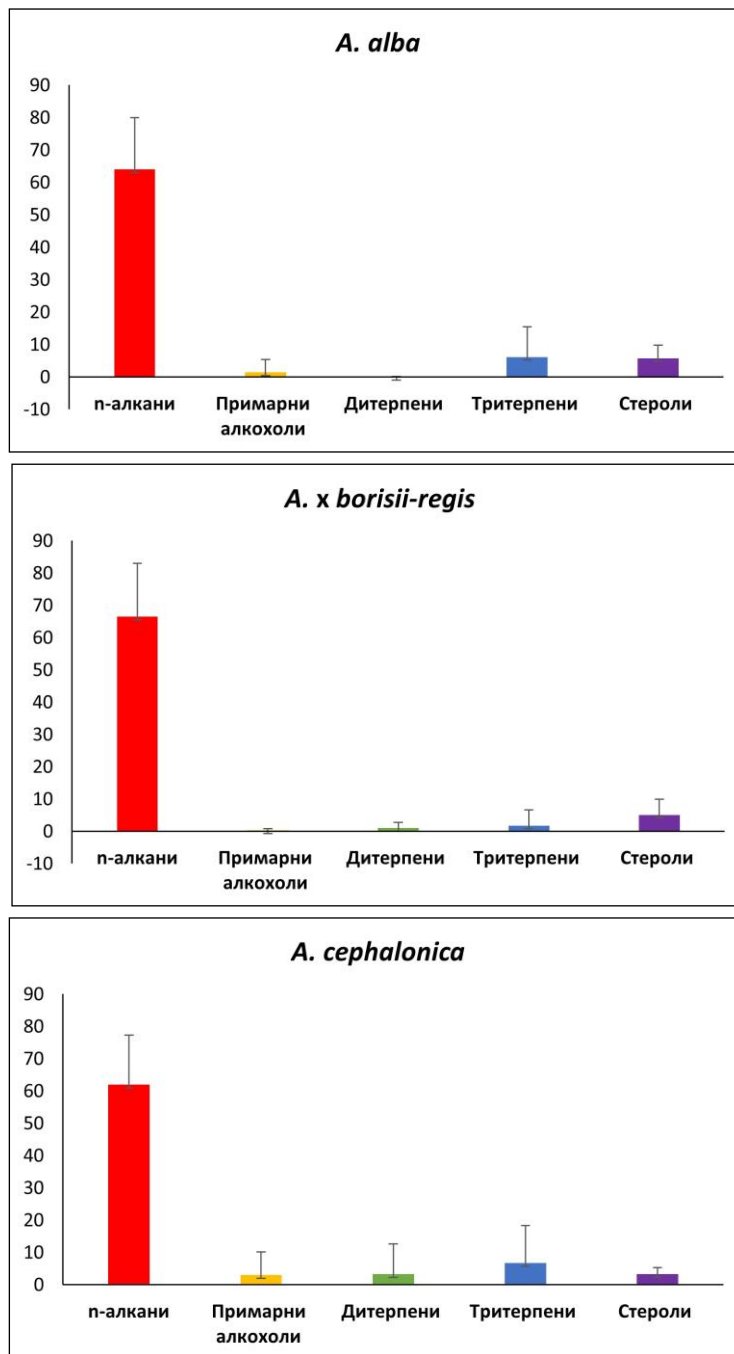


**Слика 5-21.** Хроматограми кутикуларног воска четина *A. cephalonica*: А) јединка CGA\_9; Б) јединка CGC\_5; и В) јединка CGO\_1 (акроними популација приказани су у **табели 4-1**).

Табела 5-11. Резултати дескриптивне статистике за 18 компоненти кутикуларних воскова четина истраживаних *Abies* таксона.

Р. бр.	RI <sup>1</sup>	LI <sup>2</sup>	Једињење	Класа једињења	<i>A. alba</i> N <sup>3</sup> =120					<i>A. x borisii-regis</i> N=59					<i>A. cephalonica</i> N=90				
					Avg	Min	Max	SD	CV	Avg	Min	Max	SD	CV	Avg	Min	Max	SD	CV
1.	1882	1882 <sup>2a</sup>	1-хексадеканол	примарни алкохол	1,4	0,0	33,3	4,0	278,9	0,3	0,0	2,3	0,5	165,7	3,0	0,0	53,7	7,1	235,8
2.	2052	2058 <sup>2a</sup>	абиетатриен (син: 1,2,3,4,4а,9,10,10а-окта hidro- 1,1,4а-триметил-7-(1-метилетил)- <i>trans</i> -фенантрен	дитерпен	-	-	-	-	-	0,5	0,0	9,0	1,4	259,7	1,5	0,0	21,8	3,7	250,9
3.	2070	2073,9 <sup>2a</sup>	<i>cis</i> -абиетатриен (син: 1,2,3,4,4а,9,10,10а-окта hidro- 1,1,4а-триметил-7-(1-метилетил)- <i>cis</i> -фенантрен	дитерпен	тр	0,0	0,8	0,1	876,4	0,4	0,0	2,1	0,6	133,7	1,8	0,0	41,2	5,9	326,7
4.	2100	2100	<i>n</i> -хенеикозан (C <sub>21</sub> )	<i>n</i> -алкан	0,6	0,0	3,6	0,6	89,3	0,8	0,0	4,6	0,8	101,5	0,9	0,0	22,3	3,0	347,4
5.	2200	2200	<i>n</i> -докозан (C <sub>22</sub> )	<i>n</i> -алкан	0,8	0,0	2,3	0,5	60,4	0,6	0,0	2,4	0,5	84,1	0,5	0,0	1,8	0,4	83,5
6.	2300	2300	<i>n</i> -трикозан (C <sub>23</sub> )	<i>n</i> -алкан	7,9	1,4	19,0	4,0	50,7	6,1	0,8	19,2	3,7	60,9	8,4	0,8	55,4	7,6	90,1
7.	2400	2400	<i>n</i> -тетракозан (C <sub>24</sub> )	<i>n</i> -алкан	1,5	0,0	5,6	0,8	53,1	2,1	0,0	7,5	1,3	62,4	1,6	0,0	5,1	0,9	57,2
8.	2500	2500	<i>n</i> -пентакозан (C <sub>25</sub> )	<i>n</i> -алкан	8,5	0,0	26,7	4,9	57,3	8,2	1,1	26,1	5,6	68,0	7,8	1,1	21,0	4,4	55,9
9.	2600	2600	<i>n</i> -хексакозан (C <sub>26</sub> )	<i>n</i> -алкан	1,7	0,0	6,5	0,9	52,2	2,0	0,0	5,5	1,2	58,8	1,7	0,0	5,3	1,0	59,8
<b>10.</b>	<b>2700</b>	<b>2700</b>	<b><i>n</i>-хептакозан (C<sub>27</sub>)</b>	<b><i>n</i>-алкан</b>	<b>10,9</b>	<b>2,4</b>	<b>42,8</b>	<b>5,7</b>	<b>52,6</b>	<b>11,2</b>	<b>0,0</b>	<b>25,1</b>	<b>5,2</b>	<b>46,5</b>	<b>9,1</b>	<b>1,4</b>	<b>21,8</b>	<b>4,2</b>	<b>45,7</b>
11.	2800	2800	<i>n</i> -октакозан (C <sub>28</sub> )	<i>n</i> -алкан	2,3	0,0	5,1	1,0	43,9	2,9	0,0	6,5	1,1	39,2	2,5	0,6	8,7	1,3	51,8
12.	2831	2835,8 <sup>2a</sup>	сквален	тритерпен	6,2	0,0	46,9	9,3	148,5	1,8	0,0	25,3	4,8	265,4	6,7	0,0	68,7	11,6	174,0
<b>13.</b>	<b>2900</b>	<b>2900</b>	<b><i>n</i>-нонакозан (C<sub>29</sub>)</b>	<b><i>n</i>-алкан</b>	<b>13,3</b>	<b>3,0</b>	<b>26,4</b>	<b>4,4</b>	<b>32,7</b>	<b>16,1</b>	<b>3,4</b>	<b>34,8</b>	<b>6,2</b>	<b>38,5</b>	<b>14,2</b>	<b>2,3</b>	<b>29,9</b>	<b>5,2</b>	<b>36,5</b>
14.	3000	3000	<i>n</i> -триаконтан (C <sub>30</sub> )	<i>n</i> -алкан	1,9	0,0	6,1	0,9	49,1	1,9	0,0	3,6	0,7	38,4	1,9	0,0	13,5	1,5	80,0
15.	3100	3100	<i>n</i> -хентриаконтан (C <sub>31</sub> )	<i>n</i> -алкан	8,8	2,1	24,8	3,7	41,7	8,7	4,3	18,0	3,0	33,9	8,4	2,0	18,4	3,8	45,7
16.	3200	3200	<i>n</i> -дотриаконтан (C <sub>32</sub> )	<i>n</i> -алкан	1,3	0,0	4,3	0,9	70,4	1,4	0,0	4,5	0,9	66,1	1,2	0,0	5,9	1,0	81,8
17.	3300	3300	<i>n</i> -тритриаконтан (C <sub>33</sub> )	<i>n</i> -алкан	4,4	0,4	13,2	2,7	60,5	4,6	1,2	21,6	3,2	70,0	3,6	0,0	9,8	2,2	60,0
18.	3345	3351,3 <sup>2a</sup>	γ-ситостерол	стерол	5,8	1,0	24,1	4,0	68,0	5,1	0,0	21,7	4,8	94,4	3,3	0,0	9,1	2,0	62,2
			Укупно		77,6	47,9	96,3	10,7	13,8	74,7	36,0	96,1	15,0	20,1	78,2	46,2	97,0	10,6	13,6
			<i>n</i> -алкани		64,0	11,1	93,0	16,0	25,0	66,5	32,2	94,1	16,5	24,8	62,0	16,9	88,7	15,3	24,7
			Примарни алкохоли		1,4	0,0	33,3	4,0	278,9	0,3	0,0	2,3	0,5	165,7	3,0	0,0	53,7	7,1	235,8
			Дитерпени		тр	0,0	0,8	0,1	876,4	1,0	0,0	10,4	1,8	184,9	3,3	0,0	59,6	9,3	282,9
			Тритерпени		6,2	0,0	46,9	9,3	148,5	1,8	0,0	25,3	4,8	265,4	6,7	0,0	68,7	11,6	174,0
			Стероли		5,8	1,0	24,1	4,0	68,0	5,1	0,0	21,7	4,8	94,4	3,3	0,0	9,1	2,0	62,2

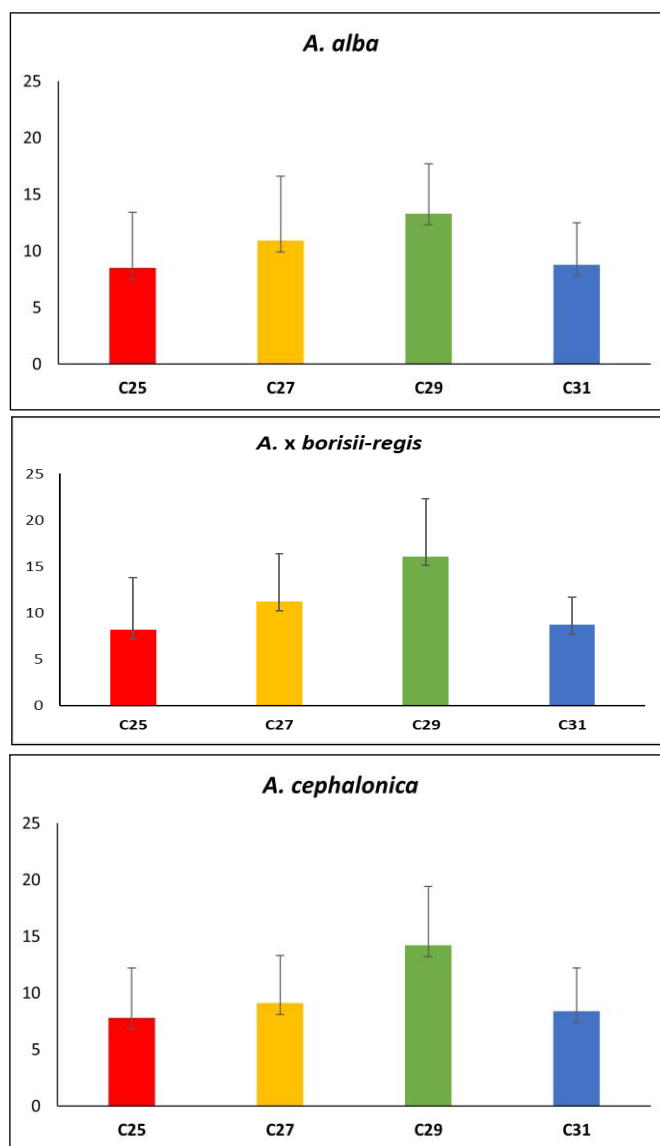
<sup>1</sup>RI: експериментални линеарни ретенциони индекси у односу на *n*-алкане C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>. <sup>2</sup>LI: литературни индекси – Адамсови ретенциони индекси (Adams, 2007) и <sup>2a</sup>у складу са NIST-овом базом података. <sup>3</sup>N: број анализираних јединки за сваки истраживани таксон. Компоненте заступљене у просечној концентрацији ≥10% код бар једног таксона су болдиране.



Слика 5-22. Средње вредности са стандардним девијацијама различитих класа компоненти кутикуларних воскова четина истраживаних *Abies* таксона.

Поређење доминантних компоненти кутикуларних воскова показало је да сва три истраживана *Abies* таксона одликује доминација четири *n*-алкана са непарним бројем *C* атома у истом редоследу:  $C_{29}$ ,  $C_{27}$ ,  $C_{31}$  и  $C_{25}$  (слика 5-23). Са друге стране, према Neubeller (1990), сваки од ових таксона одликује специфичан редослед доминантних *n*-алкана: *A.*

*alba* - C<sub>23</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>25</sub> и C<sub>27</sub>, *A. x borisii-regis* - C<sub>29</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>23</sub> и C<sub>27</sub> и *A. cephalonica* - C<sub>29</sub>, C<sub>23</sub>, C<sub>25</sub> и C<sub>27</sub>. Међутим, биљни материјал из поменуте студије (Neubeller, 1990) није сакупљен *in situ*, него у ботаничкој башти Универзитета у Хохенхајму (Немачка) и самим тиме са великом вероватноћом да анализирани узорак *A. alba* припада западној генетичкој лози ове врсте (као и да је у питању млада јединка). Такође, Maffei и сар. (2004) показали су да су у кутикуларном воску четина *A. alba* (пореклом из расадника из околине Торина, Италија) присутни *n*-алкани у опсегу од C<sub>24</sub> до C<sub>34</sub> при чему су C<sub>31</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>28</sub> и C<sub>29</sub> били доминантни.



Слика 5-23. Средње вредности са стандардним девијацијама доминантних компоненти кутикуларних воскова четина истраживаних *Abies* таксона.



Резултати Крускал-Валисовог теста приказани су у **табели 5-12**. Од 18 тестираних једињења, овај тест је указао на постојање значајних разлика између испитиваних *Abies* таксона за 12 компоненти воскова. Према томе, за 6 компоненти (*n*-алкани C<sub>25</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>30</sub>-C<sub>33</sub>) није утврђено да доприносе разликама између испитиваних таксона услед одсуства статистички значајних разлика између њихових средњих вредности. Извршена су и *post-hoc* поређења средњих рангова свих парова група (Siegel & Castellan, 1988), да би се утврдило између којих конкретних таксона постоје значајне разлике (**табела 5-12**). Код пет компоненти су утврђене значајне разлике између *A. alba* и *A. cephalonica*, при чему се хибридни таксон: 1) разликовао од *A. alba*, али не од *A. cephalonica* (абиетатриен, *cis*-абиетатриен, *n*-алкан C<sub>22</sub> и  $\gamma$ -ситостерол); или 2) разликовао од *A. cephalonica*, али не од *A. alba* (*n*-алкан C<sub>21</sub>). Са друге стране, четири компоненте су показале диференцијацију *A. x borisii-regis* у односу на *A. alba* и *A. cephalonica* (1-хексадеканол, *n*-алкани C<sub>24</sub> и C<sub>28</sub> и сквален). Ниједно од испитиваних једињења није указало на постојање значајних разлика између сва три *Abies* таксона.

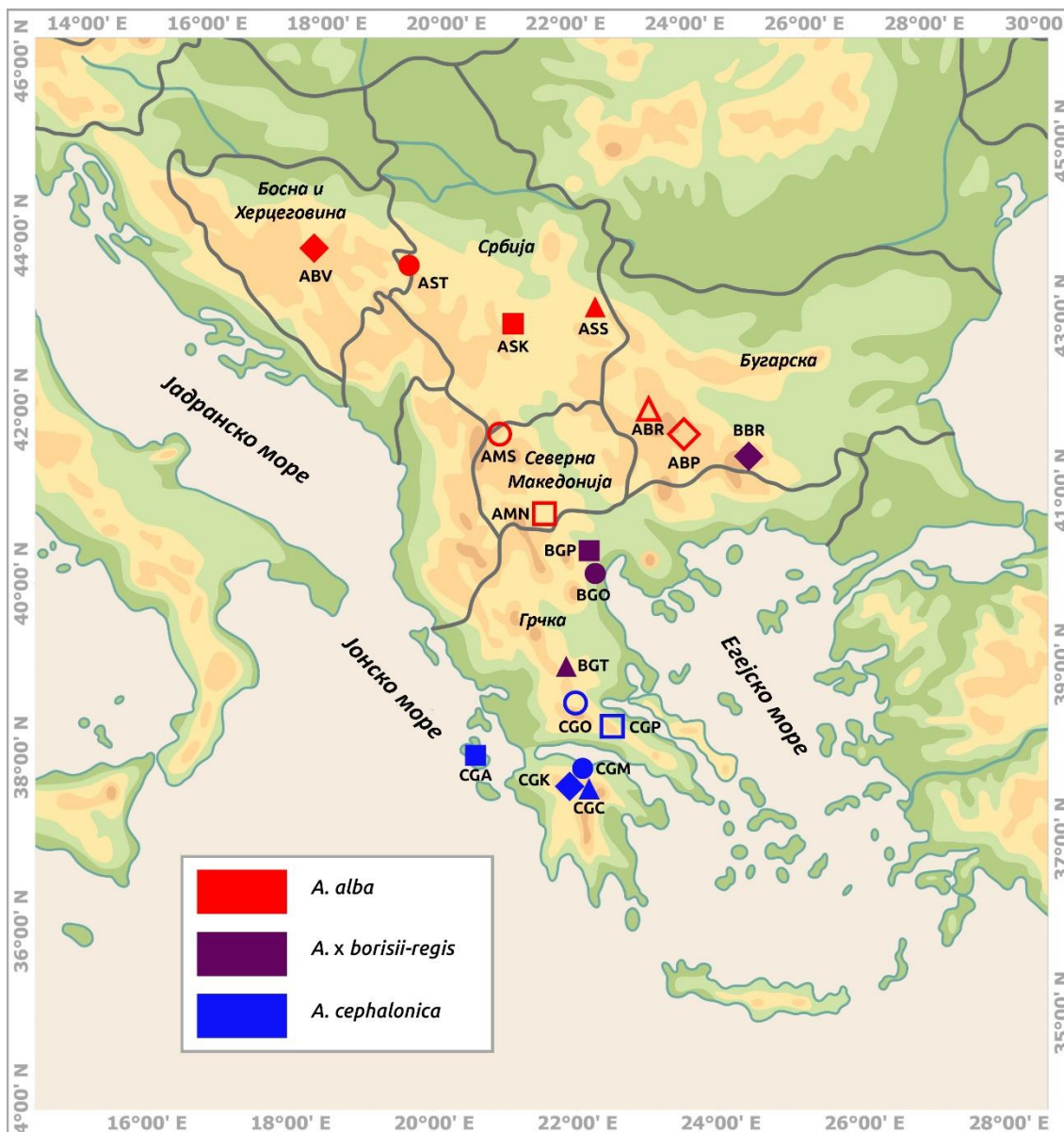
**Табела 5-12.** Резултати Крускал-Валисовог теста и *post-hoc* поређења средњих рангова свих парова група.

Једињење	H <sup>2</sup>	p <sup>3</sup>	<i>A. alba</i>	<i>A. x borisii-regis</i>	<i>A. cephalonica</i>
			N <sup>1</sup> =120 Avg <sup>4</sup>	N=59 Avg	N=90 Avg
1-хексадеканол	15,2	***	1,4 <sup>б</sup>	0,3 <sup>а</sup>	3,0 <sup>б</sup>
абиетатриен	73,3	***	0,0 <sup>а</sup>	0,5 <sup>б</sup>	1,5 <sup>б</sup>
<i>cis</i> -абиетатриен	79,5	***	0,0 <sup>а</sup>	0,4 <sup>б</sup>	1,8 <sup>б</sup>
<i>n</i> -хенеикозан (C <sub>21</sub> )	13,0	**	0,6 <sup>а</sup>	0,8 <sup>а</sup>	0,9 <sup>б</sup>
<i>n</i> -докозан (C <sub>22</sub> )	22,9	***	0,8 <sup>б</sup>	0,6 <sup>а</sup>	0,5 <sup>а</sup>
<i>n</i> -трикозан (C <sub>23</sub> )	7,8	*	7,9 <sup>б</sup>	6,1 <sup>а</sup>	8,4 <sup>аб</sup>
<i>n</i> -тетракозан (C <sub>24</sub> )	9,2	***	1,5 <sup>а</sup>	2,1 <sup>б</sup>	1,6 <sup>а</sup>
<i>n</i> -пентакозан (C <sub>25</sub> )	1,0	нз	8,5	8,2	7,8
<i>n</i> -хексакозан (C <sub>26</sub> )	4,2	нз	1,7	2,0	1,7
<i>n</i> -хептакозан (C <sub>27</sub> )	7,8	*	10,9 <sup>аб</sup>	11,2 <sup>б</sup>	9,1 <sup>а</sup>
<i>n</i> -октакозан (C <sub>28</sub> )	10,7	**	2,3 <sup>а</sup>	2,9 <sup>б</sup>	2,5 <sup>а</sup>
сквален	38,7	***	6,2 <sup>б</sup>	1,8 <sup>а</sup>	6,7 <sup>б</sup>
<i>n</i> -нонакозан (C <sub>29</sub> )	10,1	**	13,3 <sup>а</sup>	16,1 <sup>б</sup>	14,2 <sup>аб</sup>
<i>n</i> -триаконтан (C <sub>30</sub> )	0,7	нз	1,9	1,9	1,9
<i>n</i> -хентриаконтан (C <sub>31</sub> )	0,7	нз	8,8	8,7	8,4
<i>n</i> -дотриаконтан (C <sub>32</sub> )	1,8	нз	1,3	1,4	1,2
<i>n</i> -тритриаконтан (C <sub>33</sub> )	5,2	нз	4,4	4,6	3,6
$\gamma$ -ситостерол	25,5	***	5,8 <sup>б</sup>	5,1 <sup>а</sup>	3,3 <sup>а</sup>

<sup>1</sup>N: број анализираних јединки за сваки истраживани таксон. <sup>2</sup>H: Крускал-Валисов тест. <sup>3</sup>p: ниво значајности теста (нз: нема значајности; \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001). <sup>4</sup>Avg: средње вредности са различитим суперскрипт словима у истом реду (а, б) се значајно разликују (*post-hoc* поређења средњих рангова свих парова група (Siegel & Castellan, 1988)).

### 5.4.2. Мултиваријационе статистичке анализе (CDA и СА) компоненти кутикуларних воскова на популационом нивоу

CDA на основу 18 компоненти кутикуларних воскова 269 јединки из 18 популација *A. alba*, *A. x borisii-regis* и *A. cephalonica* (третираних као 18 *a priori* група) са подручја Балканског полуострва (слика 5-24) показала је да прве две канонијске осе учествују у 38,1% укупне дискриминације, од чега СА1 са 23,1% (слика 5-25А; табела 5-13).

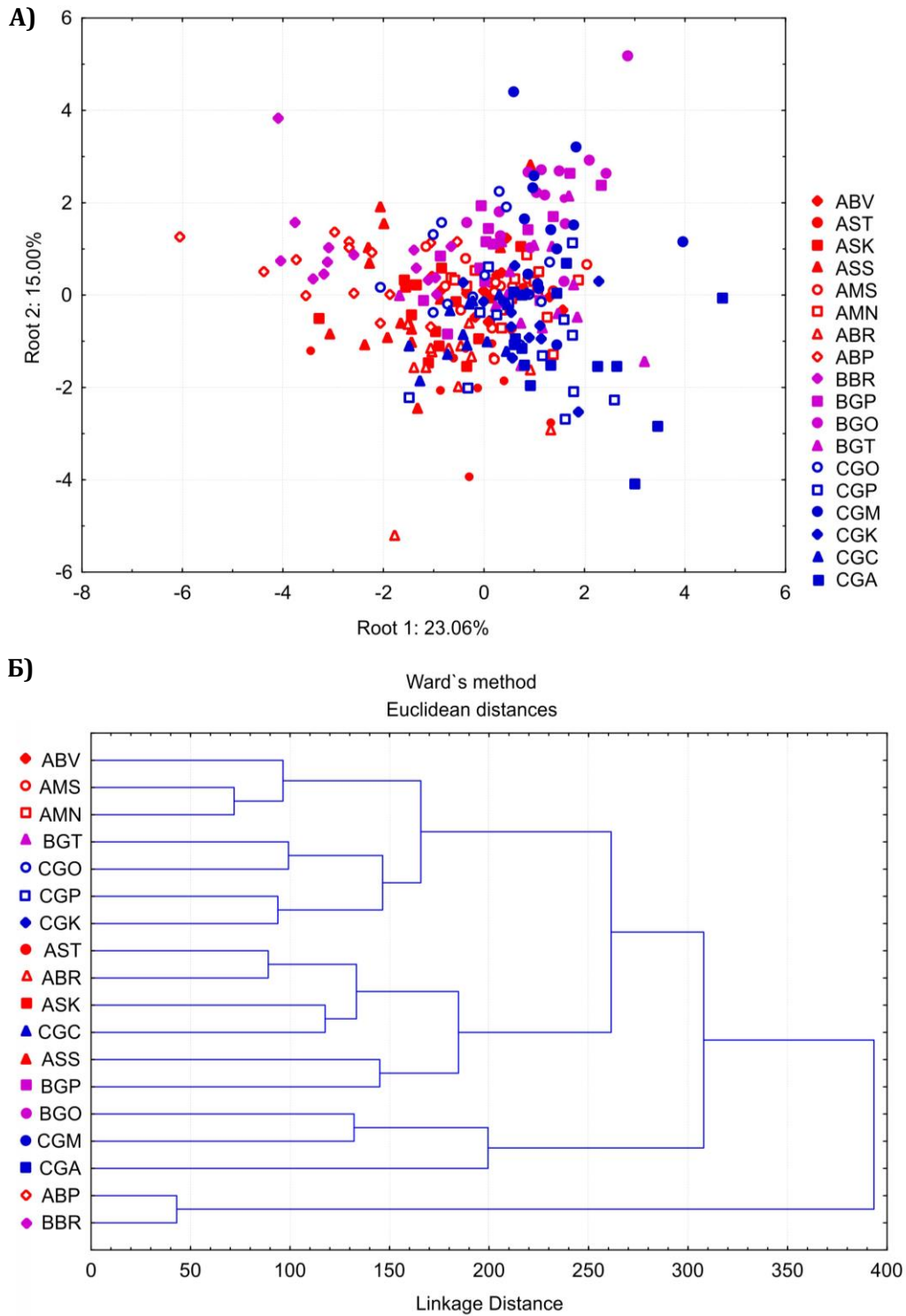


Слика 5-24. Географски положај испитиваних популација. Акроними популација, информације о локалитетима и станишним карактеристикама приказани су у табели 4-1.

Значајан утицај на СА1 имали су *n*-алкан C<sub>21</sub> и  $\gamma$ -ситостерол, док су *cis*-абиетатриен и *n*-алкани C<sub>21</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub> и C<sub>31</sub> показали значајан утицај на СА2 (табела 5-13). Међутим, добијени дијаграм расипања (слика 5-25А) показао је преклапање скоро свих популација са благом тенденцијом диференцијације једне *A. alba* (ABP) и једне *A. x borisii-regis* (BBR) популације. Дендограм (слика 5-25Б) добијен на основу СА указао је на сличан резултат као и CDA (слика 5-25А).

**Табела 5-13.** Стандардизовани коефицијенти за прве две канонијске осе (CAs) 18 компоненти кутикуларних воскова четина на основу CDA са 18 *a priori* група (популација). Значајни коефицијенти су болдирани.

Варијабле	СА1	СА2
1-хексадеканол	0,236	-0,459
абиетатриен	0,327	0,119
<i>cis</i> -абиетатриен	0,482	<b>-0,571</b>
<i>n</i> -хенсикозан (C <sub>21</sub> )	<b>-0,553</b>	<b>0,555</b>
<i>n</i> -докозан (C <sub>22</sub> )	-0,303	-0,072
<i>n</i> -трикозан (C <sub>23</sub> )	0,127	-0,433
<i>n</i> -тетракозан (C <sub>24</sub> )	0,263	<b>0,532</b>
<i>n</i> -пентакозан (C <sub>25</sub> )	0,100	-0,399
<i>n</i> -хексакозан (C <sub>26</sub> )	0,087	0,030
<i>n</i> -хептакозан (C <sub>27</sub> )	-0,219	<b>-0,521</b>
<i>n</i> -октакозан (C <sub>28</sub> )	-0,038	<b>0,616</b>
сквален	-0,227	-0,481
<i>n</i> -нонакозан (C <sub>29</sub> )	0,075	0,241
<i>n</i> -триаконтан (C <sub>30</sub> )	0,042	-0,412
<i>n</i> -хентриаконтан (C <sub>31</sub> )	0,133	<b>-0,729</b>
<i>n</i> -дотриаконтан (C <sub>32</sub> )	0,178	-0,146
<i>n</i> -тритриаконтан (C <sub>33</sub> )	0,249	0,168
$\gamma$ -ситостерол	<b>-0,775</b>	0,149
Еigen-вредности	1,564	1,018
Кумулативни % објашњене дискриминације	0,231	0,381



**Слика 5-25.** Мултиваријационе статистичке анализе на основу 18 компоненти кутикуларних воскова четина 269 јединки из 18 популација: А) CDA; Б) СА. Акроними и симболи се односе на популације као што је назначено на **слици 5-25** и у **табели 4-1**. Боје симбола: црвена - *A. alba*, љубичаста - *A. x borisii-regis*, плава - *A. cephalonica*.

Према томе, мултиваријационе статистичке анализе компоненти кутикуларних воскова на популационом нивоу нису успеле да подрже диференцијацију *A. alba* и *A. cephalonica*, а самим тиме ни да омогуће идентификацију њихових хибридних популација. Ови резултати су у великој мери у супротности са резултатима добијеним на основу HS испарљивих компоненти четина (5.2.2. „Мултиваријационе статистичке анализе (CDA и CA) HS испарљивих компоненти четина на популационом нивоу“), где су CDA и CA указале на јасну диференцијацију популација *A. alba* и *A. cephalonica*, док је хибридне популације одликовало присуство HS испарљивих профила обе родитељске врсте. Такође, уочена је и латитудинална клина у фреквенцијама *A. alba/A. cephalonica* HS испарљивих профила у оквиру истраживане прелазне зоне између *A. alba* и *A. cephalonica* што је подржало хибридизациону теорију, односно хипотезу да су ове две врсте доживеле секундарни контакт током LGM.

Колико нам је познато, ова студија представља прво истраживање диверзитета и диференцијације компоненти воска у оквиру рода *Abies* на популационом нивоу. На основу садржаја *n*-алкана у кутикуларним восковима, *Nikolić* и сар. (2018) су показали преклапање 14 популација три *Pinus* врсте (*P. heldreichii*, *P. nigra* и *P. peuce*) у неколико мултиваријационих анализа, што је сагласно са нашим резултатима. Такође, поново је други тип фитохемијских маркера (терпени) указао на јасну диференцијацију популација ове три *Pinus* врсте, позиционирајући их у складу са инфрагенеричном класификацијом (Mitić et al., 2017a). Коначно, требало би узети у разматрање и чињеницу да је у истраживањима диференцијације популација *P. nigra* (Mitić et al., 2018a) и *P. mugo* (Mitić et al., 2018b) на основу свих идентификованих компоненти воска, дистрибуција примарних алкохола представљала најважнији критеријум. Међутим, у кутикуларним восковима три балканска *Abies* таксона идентификован је само један примарни алкохол (1-хексадеканол) у просечним концентрацијама испод 5%.

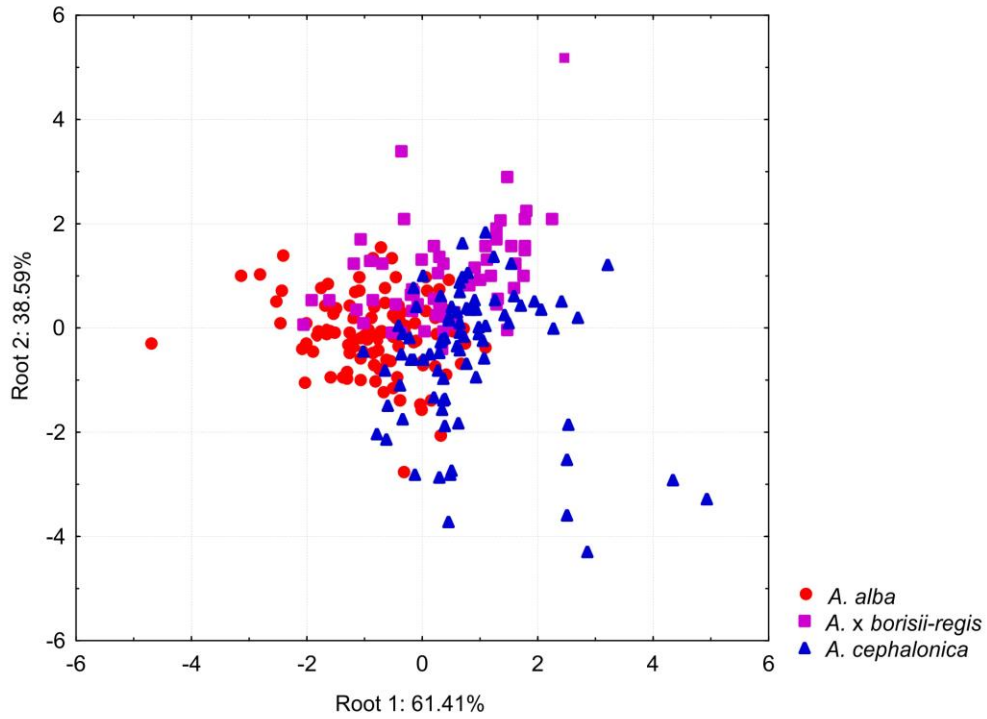
### 5.4.3. Мултиваријационе статистичке анализе (CDA и CA) компоненти кутикуларних воскова на специјском нивоу

CDA на основу 18 компоненти кутикуларних воскова 269 јединки три истраживана *Abies* таксона (третираних као три *a priori* групе) показала је да прве две канонијске осе учествују у 100% укупне дискриминације, од чега CA1 са 61,4% (слика 5-26А; табела 5-14). Значајан утицај на CA1 показали су *cis*-абиетатриен и *n*-алкани C<sub>21</sub>, C<sub>22</sub>, C<sub>27</sub> и C<sub>29</sub>, док су *cis*-абиетатриен, сквален и *n*-алкани C<sub>21</sub>, C<sub>23</sub>, C<sub>24</sub> и C<sub>31</sub> имали значајан утицај на CA2 (табела 5-14).

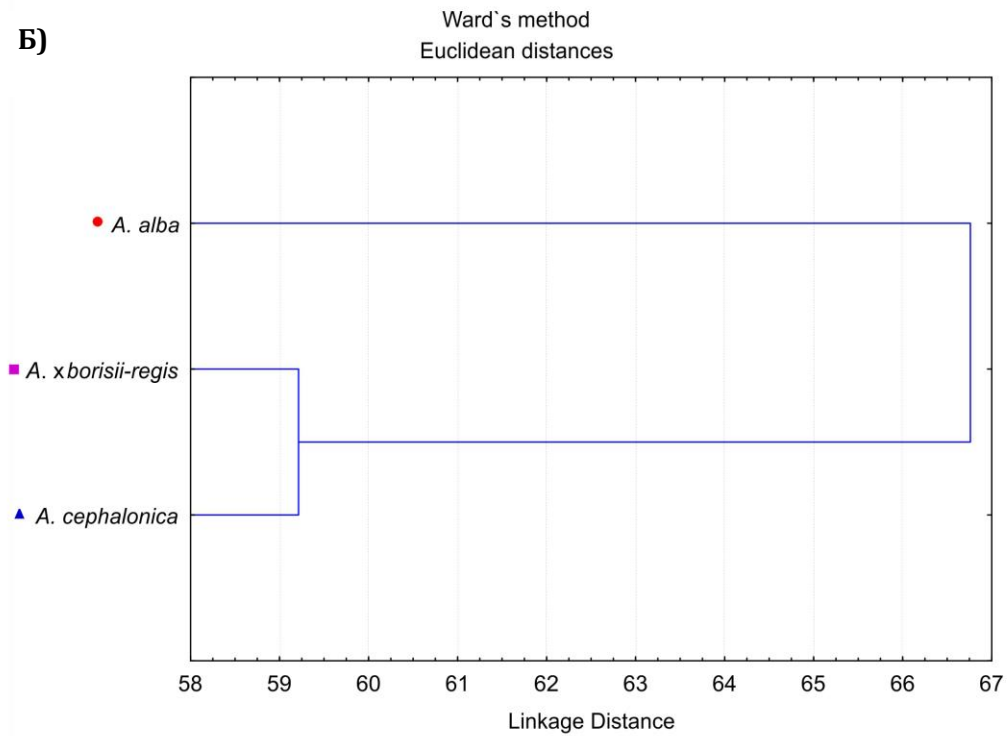
**Табела 5-14.** Стандардизовани коефицијенти за прве две канонијске осе (CAs) 18 компоненти кутикуларних воскова четина на основу CDA са 3 *a priori* групе (врсте). Значајни коефицијенти су болдирани.

Варијабле	CA1	CA2
1-хексадеканол	0,074	-0,360
абиетатриен	0,187	-0,098
<i>cis</i> -абиетатриен	<b>0,607</b>	<b>-0,677</b>
C <sub>21</sub>	<b>-0,707</b>	<b>0,537</b>
C <sub>22</sub>	<b>-0,639</b>	-0,225
C <sub>23</sub>	-0,169	<b>-0,512</b>
C <sub>24</sub>	0,423	<b>0,619</b>
C <sub>25</sub>	0,029	-0,304
C <sub>26</sub>	-0,121	-0,181
C <sub>27</sub>	<b>-0,867</b>	0,011
C <sub>28</sub>	0,274	0,182
сквален	-0,285	<b>-0,546</b>
C <sub>29</sub>	<b>0,636</b>	0,358
C <sub>30</sub>	-0,237	-0,364
C <sub>31</sub>	-0,231	<b>-0,572</b>
C <sub>32</sub>	-0,262	-0,083
C <sub>33</sub>	-0,278	0,266
γ-ситостерол	-0,454	0,158
Eigen-вредности	0,544	0,342
Кумулативни % објашњене дискриминације	0,614	1,000

А)



Б)



Слика 5-26. Мултиваријационе статистичке анализе на основу 18 компоненти кутикуларних воскова четина 269 јединки три *Abies* таксона: А) CDA; Б) СА.

Дијаграм расипања добијен на основу ове CDA указао је на благу тенденцију диференцијације између јединки *A. alba* и *A. cephalonica* углавном дуж CA1 која објашњава и највећи проценат дискриминације (слика 5-26А). Наиме, већина јединки *A. alba* налазила се је у негативном делу CA1 (одсуство *cis*-абиетатриена, мањи садржаји *n*-алкана C<sub>21</sub> и C<sub>29</sub>, и већи садржаји *n*-алкана C<sub>22</sub> и C<sub>27</sub>), док су јединке *A. cephalonica* биле претежно позициониране у позитивном делу CA1 (присуство *cis*-абиетатриена, већи садржаји *n*-алкана C<sub>21</sub> и C<sub>29</sub> и мањи садржај *n*-алкана C<sub>22</sub> и C<sub>27</sub>). Ипак, резултати *post-hoc* теста за ова једињења подржали су значајне разлике између претпостављених родитељских врста само у случају *cis*-абиетатриена и *n*-алкана C<sub>21</sub> и C<sub>22</sub> (табела 5-12). Овакво одсуство потпуне диференцијације између јединки *A. alba* и *A. cephalonica* на основу компоненти кутикуларних воскова био је прилично неочекиван резултат, с обзиром да је неколико досадашњих студија указало на то да је источна генетичка лоза *A. alba* морфолошки и биохемијски сличнија *A. nordmanniana* (понтска, кавкаска јела) него *A. cephalonica* (Fady et al., 1992; Linares, 2011). Наиме, према Linares (2011), *A. alba* и *A. nordmanniana* су вероватно настале од заједничког претка у понтском региону, док је *A. cephalonica* настала од претка балканске јеле током плиоцена. Нажалост, према нашим сазнањима, не постоје литературни подаци који се односе на састав кутикуларних воскова четина у аутохтоним популацијама *A. nordmanniana*, услед чега није ни могуће дискутовати о степену фитохемијске диференцијације између ове три *Abies* врсте.

Јединке *A. x borisii-regis* биле су у највећој мери преклопљене облацима обе родитељске врсте, иако је површина преклапања била нешто већа са *A. cephalonica* него са *A. alba* (слика 5-26А). Такође, дендрограм добијен на основу CA показао је постојање два главна кластера при чему је један укључио *A. alba*, а други *A. cephalonica* и *A. x borisii-regis* (слика 5-26Б). Дакле, у погледу састава кутикуларних воскова, хибридни таксон је сличнији јужној родитељској врсти (*A. cephalonica*) него северној (*A. alba*) што је сагласно са ранијим студијама, базираним на саставу етарског уља четина (Roussis et al., 2000) и варијабилности алозима (Fady & Conkle, 1993). Са друге стране, наши резултати на основу састава етарског уља гранчица са четинама (5.3.2. „Мултиваријациона статистичка анализа (CA) компоненти етарског уља на специјском нивоу“) указали су на ближи положај хибридног таксона северној родитељској врсти (*A. alba*). Међутим, све ове процене о диференцијацији *A. x borisii-regis* у односу на претпостављене родитељске



врсте би требало узети са опрезом, с обзиром на то да природне хибридне зоне одликује просторни образац у коме се вредности проучаваних карактеристика постепено мењају на географском подручју између вредности типичних за сваку од две врсте. Према томе, приликом процене степена диференцијације требало би узети у обзир географски положај популација које су анализирани. Као што би се могло и претпоставити, популација *A. x borisii-regis* која је анализирана у овој студији са аспекта састава етарског уља (Пијерија) има севернији положај у односу популације *A. x borisii-regis* (Трикала и Пиндос) које су истраживане од стране Roussis и сар. (2000) и Fady и Conkle (1993), док је са аспекта састава кутикуларних воскова анализиран нешто већи број хибридних популација (четири). У сваком случају, скоро потпуно преклапање *A. x borisii-regis* са обе родитељске врсте, као што је приказано на добијеном дијаграму расипања (слика 5-26А), подржава хипотезу да је јела краља Бориса нестабилан таксон настао услед недавне хибридизације и интрогресије између *A. alba* и *A. cephalonica* (Krajmerová et al., 2016; Balao et al., 2020).

Према добијеним резултатима, мултиваријационе анализе компоненти воскова на специјском нивоу указале су на извесну тенденцију диференцијације између *A. alba* и *A. cephalonica*. Слично, према Nikolić и сар. (2018), само је CDA на специјском нивоу показала диференцијацију три *Pinus* врсте (*P. heldreichii*, *P. nigra* и *P. peuce*) на основу састава *n*-алкана у кутикуларним восковима, иако их је позиционирала без сагласности са инфрагенеричном класификацијом. Међутим, чињеница да је други тип фитохемијских маркера (терпени) подржао диференцијацију истраживаних *Abies* (ова студија) и *Pinus* (Mitić et al., 2017a) таксона на популационом нивоу, може водити закључку да терпене одликује већа резолуција и поузданост у хемотипизацији појединих четинарских таксона у односу на компоненте кутикуларних воскова.

#### 5.4.4. Спирманова корелација рангова

Корелациона анализа (Спирманова корелација рангова) урађена је са циљем да се утврди међусобна повезаност између варирања компоненти кутикуларних воскова и абиотичких (географских, орографских, геолошких и биоклиматских) параметара локалитета истраживаних популација (**табела 5-15**). Иако је ова анализа показала постојање значајних корелација ( $p < 0,05$ ) за сва 23 абиотичка фактора са неком од компоненти воска, већина добијених корелација била је слаба ( $r < \pm 0,5$ ). Само две компоненте показале су корелације средње јачине ( $\pm 0,5 < r < \pm 0,8$ ): абиетатриен (LAT, BIO1, BIO5, BIO6, BIO9-BIO11, BIO14, BIO15, BIO17 и BIO18) и *cis*-абиетатриен (LAT, SUB, BIO1, BIO5, BIO6, BIO9-BIO11, BIO14, BIO15, BIO17 и BIO18). Према томе, ова анализа је указала на потпуно одсуство јаке повезаности ( $r > \pm 0,8$ ) компоненти кутикуларних воскова са било којим од тестираних абиотичких параметара, слично као и у случају HS испарљивих компоненти четина (5.2.3. „Корелациона анализа“).

Овакво одсуство јаке корелације између тестираних абиотичких параметара и компоненти кутикуларних воскова може бити последица неколико фактора: 1) биљни материјал у овој студији сакупљен је у различитим месецима током лета и ране јесени (од краја јуна до почетка октобра; **табела 4-1**); 2) могући утицај биотичког стреса (микроорганизама и инсеката) на састав кутикуларних воскова; и 3) варијабилност компоненти кутикуларних воскова је углавном условљена генетичким факторима. Пре свега, ако упоредимо груписање проучаваних популација (**слика 5-26**) и месеце сакупљања биљног материјала у њима (**табела 4-1**), очигледно је да не постоји никаква подударност. Такође, CDA и CA на специјском нивоу (**слика 5-27**) указале су на одређен степен диференцијације између *A. alba* и *A. cephalonica*, при чему је биљни материјал у оквиру оба таксона сакупљен током различитих месеци (*A. alba* - јун, август и октобар и *A. cephalonica* - јул и септембар). Како су за ову студију одабране искључиво неоштећене и неинфициране адултне јединке (без трагова напада биљоједа или патогена), можемо закључити да је утврђена варијабилност компоненти кутикуларних воскова вероватно генетички условљена.

**Табела 5-15.** Резултати Спирманове корелације рангова за анализиране географске, орографске, геолошке и биоклиматске параметре. Болдирани Спирманови коефицијенти корелације ( $r_s$ ) су значајни ( $p < 0,05$ ).

	<i>1</i> <sup>a</sup>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
LAT <sup>1</sup>	-0,07	<b>-0,53</b>	<b>-0,55</b>	<b>0,17</b>	<b>0,20</b>	-0,03	-0,10	0,00	-0,07	0,11	-0,07	0,03	-0,12	0,02	0,05	0,05	0,11	<b>0,36</b>
LONG <sup>2</sup>	-0,06	-0,01	-0,01	<b>0,12</b>	-0,05	-0,07	0,00	0,00	-0,10	0,06	-0,09	-0,01	-0,05	<b>-0,19</b>	<b>-0,24</b>	<b>-0,16</b>	<b>-0,24</b>	<b>0,24</b>
ALT <sup>3</sup>	<b>0,29</b>	<b>-0,48</b>	<b>-0,45</b>	-0,10	<b>0,25</b>	0,11	-0,10	-0,02	-0,10	<b>-0,12</b>	-0,06	<b>0,18</b>	0,01	0,07	<b>0,22</b>	0,04	<b>0,15</b>	<b>0,22</b>
SUB <sup>4</sup>	-0,05	<b>0,49</b>	<b>0,52</b>	<b>-0,16</b>	<b>-0,21</b>	0,11	0,11	<b>0,17</b>	0,10	0,00	0,04	-0,09	0,12	-0,06	-0,05	-0,10	-0,08	<b>-0,47</b>
BIO1 <sup>5</sup>	-0,11	<b>0,61</b>	<b>0,66</b>	-0,05	<b>-0,32</b>	-0,10	0,05	-0,03	0,07	-0,06	0,08	-0,05	0,06	-0,06	<b>-0,13</b>	-0,08	<b>-0,15</b>	<b>-0,33</b>
BIO2	-0,03	<b>0,13</b>	<b>0,13</b>	-0,03	0,01	0,07	0,03	0,08	-0,01	-0,02	-0,08	0,11	-0,02	<b>-0,19</b>	-0,11	<b>-0,23</b>	<b>-0,19</b>	0,08
BIO3	0,06	<b>0,31</b>	<b>0,29</b>	-0,11	-0,04	0,11	-0,04	0,07	-0,02	-0,08	-0,11	<b>0,16</b>	-0,05	<b>-0,17</b>	<b>-0,13</b>	<b>-0,19</b>	<b>-0,21</b>	-0,08
BIO4	<b>-0,29</b>	-0,06	-0,07	<b>0,25</b>	0,00	-0,08	0,07	0,01	-0,04	<b>0,13</b>	-0,06	<b>-0,15</b>	-0,06	<b>-0,17</b>	<b>-0,24</b>	<b>-0,15</b>	<b>-0,14</b>	<b>0,14</b>
BIO5	<b>-0,14</b>	<b>0,60</b>	<b>0,65</b>	-0,04	<b>-0,30</b>	-0,06	0,12	0,02	0,12	-0,03	<b>0,12</b>	-0,10	0,11	-0,06	-0,12	-0,09	<b>-0,14</b>	<b>-0,31</b>
BIO6	-0,09	<b>0,62</b>	<b>0,66</b>	-0,08	<b>-0,34</b>	-0,11	0,04	-0,04	0,08	-0,05	0,11	-0,03	0,11	-0,02	-0,07	-0,04	-0,12	<b>-0,35</b>
BIO7	<b>-0,17</b>	0,12	0,11	0,09	0,04	0,08	<b>0,13</b>	<b>0,14</b>	0,06	0,08	-0,04	-0,06	-0,06	<b>-0,19</b>	<b>-0,21</b>	<b>-0,19</b>	<b>-0,20</b>	0,08
BIO8	<b>-0,22</b>	0,01	-0,01	<b>0,19</b>	-0,12	<b>-0,18</b>	<b>-0,24</b>	<b>-0,14</b>	<b>-0,23</b>	0,06	<b>-0,17</b>	0,10	-0,09	<b>-0,22</b>	<b>-0,19</b>	<b>-0,25</b>	<b>-0,23</b>	<b>0,16</b>
BIO9	<b>-0,13</b>	<b>0,62</b>	<b>0,65</b>	-0,11	<b>-0,27</b>	0,01	<b>0,20</b>	0,10	<b>0,19</b>	0,02	<b>0,18</b>	<b>-0,20</b>	<b>0,17</b>	-0,01	-0,08	-0,02	-0,09	<b>-0,35</b>
BIO10	<b>-0,16</b>	<b>0,64</b>	<b>0,67</b>	-0,01	<b>-0,31</b>	-0,10	0,12	-0,01	0,11	-0,03	0,12	-0,07	0,09	-0,05	<b>-0,14</b>	-0,08	<b>-0,15</b>	<b>-0,33</b>
BIO11	-0,08	<b>0,62</b>	<b>0,66</b>	-0,06	<b>-0,33</b>	-0,12	0,03	-0,06	0,07	-0,07	0,10	-0,03	0,09	-0,04	-0,10	-0,05	<b>-0,13</b>	<b>-0,32</b>
BIO12	<b>0,27</b>	-0,10	-0,09	<b>-0,20</b>	0,06	0,07	<b>-0,16</b>	-0,04	-0,06	<b>-0,19</b>	-0,06	<b>0,19</b>	-0,04	<b>0,13</b>	<b>0,21</b>	0,08	<b>0,17</b>	<b>-0,16</b>
BIO13	<b>0,26</b>	<b>0,19</b>	<b>0,19</b>	<b>-0,23</b>	-0,07	0,05	<b>-0,15</b>	-0,04	-0,05	<b>-0,21</b>	-0,07	<b>0,24</b>	-0,03	0,05	0,10	-0,01	0,02	<b>-0,25</b>
BIO14	0,02	<b>-0,59</b>	<b>-0,64</b>	0,10	<b>0,28</b>	0,01	-0,04	-0,04	-0,06	0,04	-0,03	0,04	-0,05	0,11	<b>0,17</b>	0,09	<b>0,21</b>	<b>0,29</b>
BIO15	0,06	<b>0,51</b>	<b>0,54</b>	-0,10	<b>-0,21</b>	-0,01	-0,07	0,01	-0,06	-0,09	-0,11	0,08	-0,07	<b>-0,17</b>	<b>-0,18</b>	<b>-0,16</b>	<b>-0,28</b>	<b>-0,26</b>
BIO16	<b>0,25</b>	<b>0,19</b>	<b>0,21</b>	<b>-0,23</b>	-0,09	0,04	<b>-0,16</b>	-0,03	-0,06	<b>-0,19</b>	-0,08	<b>0,24</b>	-0,03	0,03	0,10	-0,02	0,01	<b>-0,24</b>
BIO17	0,03	<b>-0,59</b>	<b>-0,64</b>	0,11	<b>0,29</b>	0,02	-0,05	-0,04	-0,06	0,03	-0,03	0,06	-0,05	0,10	<b>0,16</b>	0,07	<b>0,20</b>	<b>0,31</b>
BIO18	0,01	<b>-0,59</b>	<b>-0,64</b>	<b>0,13</b>	<b>0,26</b>	-0,02	-0,11	-0,07	-0,12	0,04	-0,08	0,11	-0,08	0,05	0,12	0,02	<b>0,14</b>	<b>0,34</b>
BIO19	<b>0,23</b>	<b>0,27</b>	<b>0,30</b>	<b>-0,30</b>	<b>-0,13</b>	0,06	-0,09	0,02	0,02	<b>-0,16</b>	0,01	<b>0,14</b>	0,08	0,05	0,12	-0,01	0,01	<b>-0,31</b>

<sup>1</sup>LAT: географска ширина. <sup>2</sup>LONG: географска дужина. <sup>3</sup>ALT: надморска висина. <sup>4</sup>SUB: геолошка подлога. <sup>5</sup>BIO1-BIO19: биоклиматски параметри.

<sup>a</sup>Бројеви у *Italic*-у односе се на редне бројеве једињења, cf. табела 5-11.

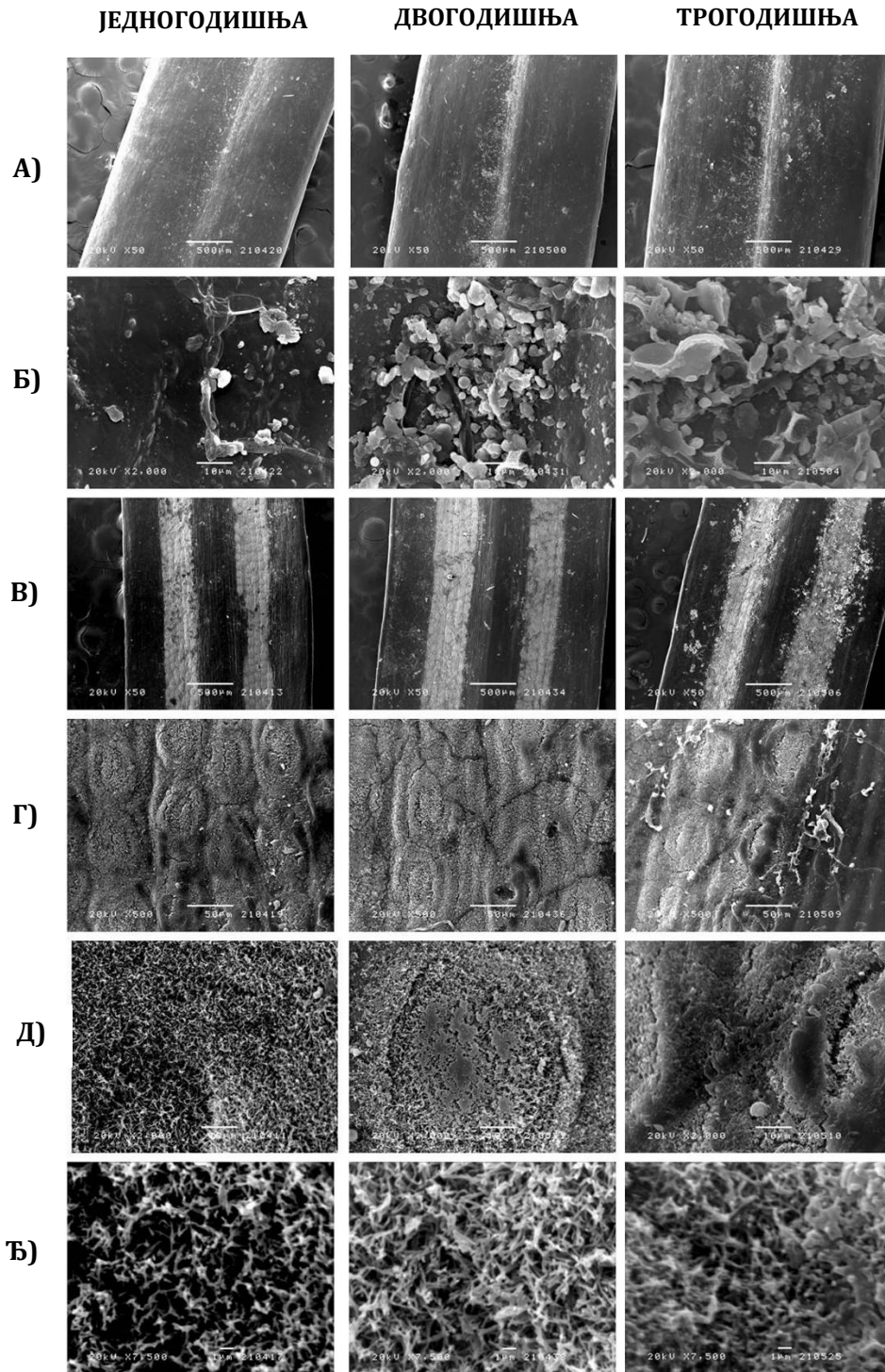
### 5.4.5. Микроморфологија епикутуларних воскова

Код сва три испитивана таксона на средишњем делу лица четина утврђено је присуство слепљених депозита воска (слике 5-27А,Б, 5-28А,Б и 5-29А,Б). Иако су депозити воска били присутни на целој површини лица четина, њихова највећа концентрација примећена је дуж централног нерва. Такође, повећање количине депозита воска са старењем четина била је заједничка карактеристика сва три таксона, тако да је њихова најмања количина уочена на лицу једногодишњих, а највећа на лицу трогодишњих четина (слике 5-27Б, 5-28Б и 5-29Б).

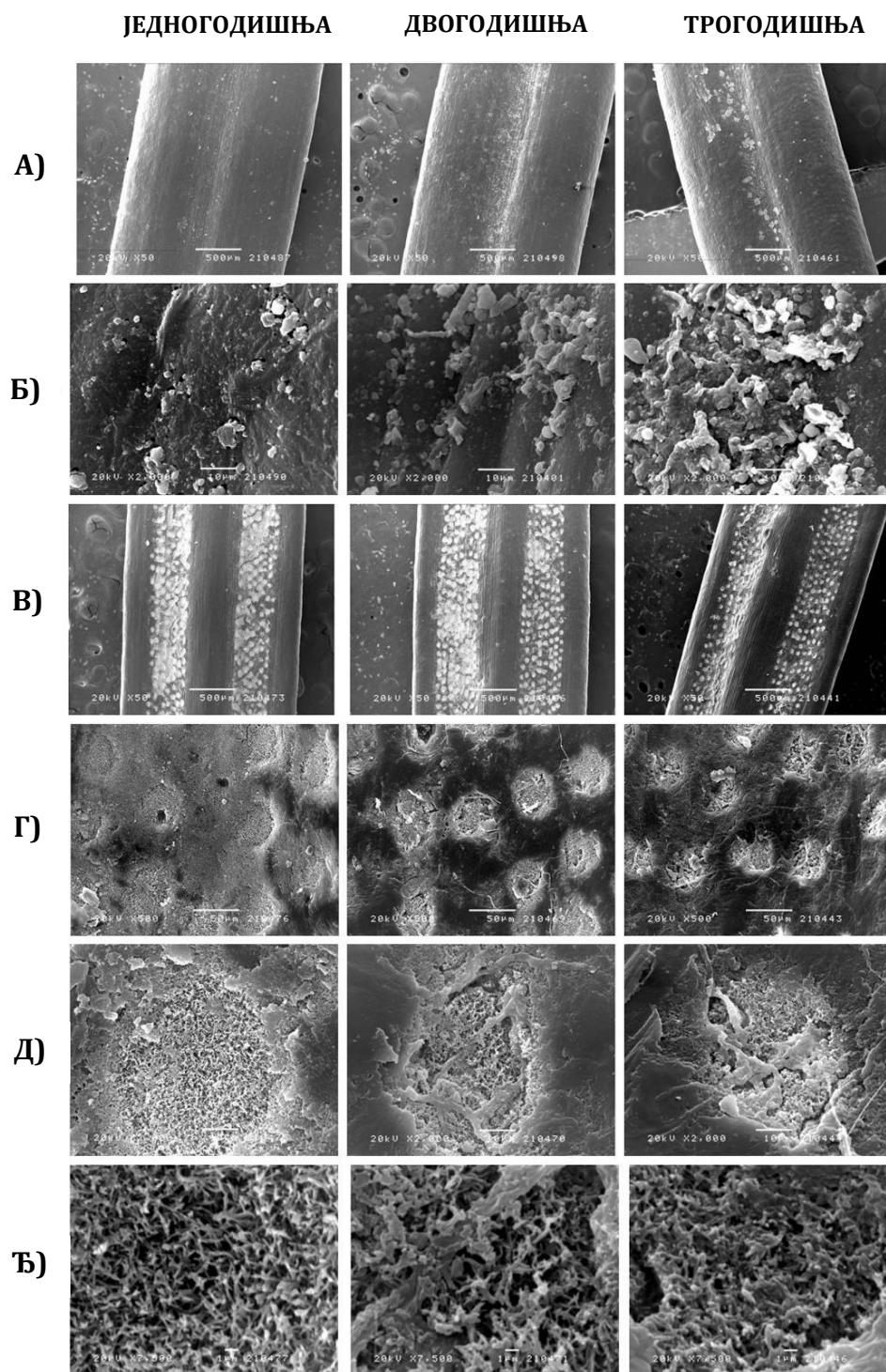
На наличју четина уочене су стоме у уздужним редовима груписаним у две паралелне траке које одваја централни нерв (тзв. стоматалне траке; слике 5-27В, 5-28В и 5-29В). Доминантни тип воштаних кристалоида на наличју четина су вероватно представљале тубуле са тендецијом концентрисања око и унутар стома. Конкретно, тубуле су биле густо распоређене са мрежастим изгледом унутар стоминих комора, док су на ободима стома као и површинама између стома у оквиру стоматалних трака биле спорадично присутне (слике 5-27Г,Б, 5-28Г,Б и 5-29Г,Б). Наиме, површине између стома углавном су изгледале као континуиране воштане превлаке са мање или више израженим површинским структурама типа корица, при чему је на појединим местима било могуће уочити и присуство слепљених депозита воска (слике 5-27Г,Д, 5-28Г,Д и 5-29Г,Д). Приликом испитивања врста из рода *Pinus* L., *Yoshie* и *Sakai* (1985) утврдили су присуство воштаних тубула само на површинама четина са стомама. Присуство воштаних кристалоида искључиво на површинама четина које одликује и присуство стома указује да је порекло структурног епикутуларног воска код четинара у вези са стоматалним комплексима. У складу са тим, многе студије показале су да на површинама листова четинара воштане тубуле нису равномерно распоређене, с обзиром на њихову тенденцију концентрисања унутар стома као и на површинама између стома у редовима које стоме формирају (Crossley & Fowler, 1986; Kim et al., 2011; Ivănescu et al., 2008; Mitić et al., 2017b). Према Ваџић и Поповић (1998), воштане тубуле на четинама *A. alba* присутне су само на наличју четина где се јављају и стоматални комплекси, што је у сагласности са резултатима наше студије. Штавише, ово је била заједничка карактеристика и код балканских ендемичних таксона *A. x borisii-regis* и *A. cephalonica*. Међутим, на избојцима

код представника рода *Abies* ситуација може бити потпуно другачија: код *A. pinsapo* утврђено је да су тубуле мање-више равнмерно распоређене на читавој површини избојака (Tomaszewski & Zieliński, 2014).

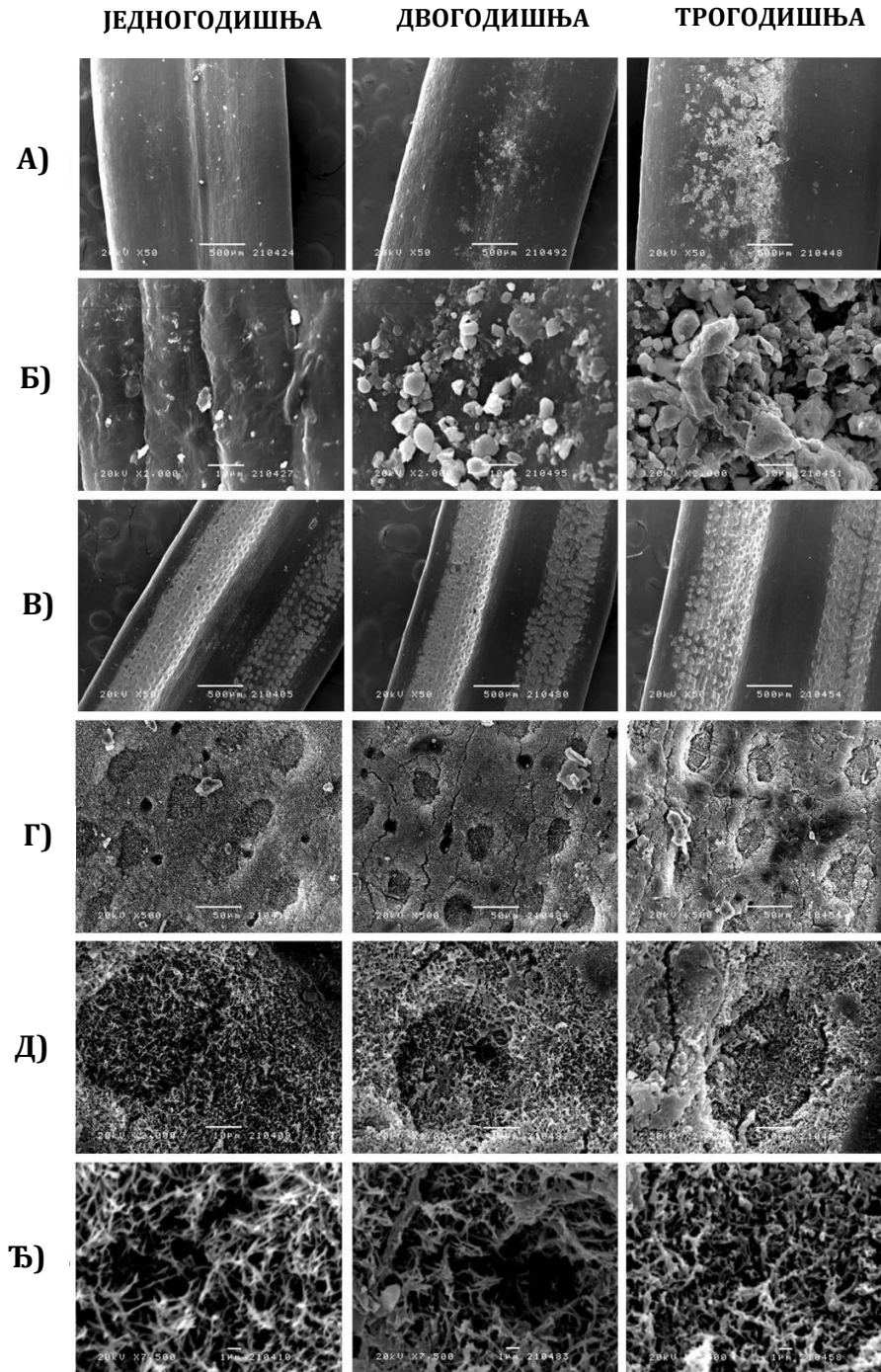
Иако је познато да су тубуле цилиндрични, шупљи кристалоиди, на приказаним микрографијама није било могуће уочити њихове терминалне отворе, тј. тубуле су изгледале као штапићи (слике 5-27Б, 5-28Б и 5-29Б). Међутим, ово је вероватно артефакт с обзиром на то да током процеса припреме узорака за SEM, тј. њиховог облагања златом техником распршивања, може доћи до зачепљења терминалних отвора тубула (Crossley & Fowler, 1986). Наиме, основна разлика између тубула и штапића огледа се у томе што је врх штапића без отвора, углавном неправилног, кружног, троугластог или полигоналног облика (Barthlott et al., 1998). Међутим, на SEM микрографијама често није могуће направити разлику, јер су терминални отвори тубула често замагљени или се не виде због ограничене резолуције (Jeffree, 2006). Данас је општеприхваћено да тубуле представљају доминантни тип кристалоида епикутуларног воска код четинара (Riederer, 1989; Hennig et al., 1994; Jeffree, 2006). Поред тога, познато је да доминантну компоненту воскова код многих голосеменица (*Abies*, *Ginkgo*, *Picea*, *Pinus*, *Taxus*) представља секундарни алкохол нонакозан-10-ол, чији се биолошки значај углавном приписује улози обликовања кристалоида епикутуларног воска у форми специфичних тубула (Matas et al., 2003; Jeffree, 2006; Nikolić et al., 2012). Према Dragota и Riederer (2007), нонакозан-10-ол и диоли са истим бројем С атома одговорни су за тубуларни изглед воштаних кристалоида код *Wollemia nobilis* (Araucariaceae).



Слика 5-27. SEM микрографије епикутикаларних воскова четина *A. alba*: А) и Б) лице четина са уочљивим слепљеним депозитима воска; В) налицје четина са две паралелне траке стома; Г) редови стома на налицју четина; Д) стомине коморе испуњене воштаним тубулама, воштаним тубулама са почетцима формирања аморфне воштане масе или аморфном воштаном масом; Ђ) агломерација, задебљавање и срастање тубула током старења четине.



**Слика 5-28.** SEM микрографије епикутуларних воскова четина *A. x borisii-regis*: **А)** и **Б)** лице четина са уочљивим слепљеним депозитима воска; **В)** наличје четина са две паралелне траке стома; **Г)** редови стома на наличју четина; **Д)** стомине коморе испуњене воштаним тубулама, воштаним тубулама са почетцима формирања аморфне воштане масе или аморфном воштаном масом; **Ђ)** агломерација, задебљавање и срастање тубула током старења четине.



Слика 5-29. SEM микрографије епикутуларних воскова четина *A. cephalonica*: А) и Б) лице четина са уочљивим слепљеним депозитима воска; В) наличје четина са две паралелне траке стома; Г) редови стома на наличју четина; Д) стомине коморе испуњене воштаним тубулама, воштаним тубулама са почетцима формирања аморфне воштане масе или аморфном воштаном масом; Ђ) агломерација, задебљавање и срастање тубула током старења четине.



Уколико упоредимо изглед тубула између четина различите старости, очигледно је да постоје значајне разлике: густо распоређене тубуле са мрежастим изгледом унутар стоминих комора биле су најбоље очуване на једногодишњим четинама код сва три таксона. Поред тога, на једногодишњим четинама *A. alba* и *A. cephalonica*, ободи стома као и површине између стома у оквиру стоматалних трака су такође биле прекривене тубулама (слике 5-27Д и 5-29Д). Међутим, у случају једногодишње четине *A. x borisii-regis*, тубуле су биле концентрисане искључиво унутар стоминих комора, док су ободи стома као и површине између стома биле прекривене аморфном воштаном масом (слика 5-28Д). Код двогодишњих четина сва три таксона јасно се може уочити тенденција агломерације, задебљавања и срастања тубула (слике 5-27Д,Б, 5-28Д,Б и 5-29Д,Б). Штавише, на појединим местима унутар стоминих комора двогодишњих четина могу се уочити и почеци формирања аморфне воштане масе, што је било најизраженије код *A. x borisii-regis*, а најмање код *A. cephalonica*. Код трогодишњих четина, стоме су биле скоро у потпуности затворене аморфном воштаном масом, нарочито код *A. x borisii-regis* (слика 5-28Д). На овај начин, стомине коморе сва три таксона биле су испуњене воштаним тубулама (једногодишње четине), воштаним тубулама са почецима формирања аморфне воштане масе (двогодишње четине) или аморфном воштаном масом (трогодишње четине). Дакле, очигледно је да током времена долази до значајних промена у изгледу воштаних тубула које постепено срастају како унутар стоминих комора тако и на ободима стома и површинама између стома. На крају, долази до образовања чврстог воштаног чепа изнад стомине коморе који у потпуности или делимично затвара стоме на старијим четинама. Wells и Franich (1977) показали су да је густина тубула на четинама *P. radiata* највећа у близини стоминих пора као и да се микроморфологија епикутикуларног воска постепено мења од тубуларне до аморфне током процеса старења четине. У сагласности са тим, наша студија је указала на све већу деградацију тубула са старењем четина код сва три испитивана *Abies* таксона. Овакве промене у микроморфологији епикутикуларног воска део су природног процеса старења четина у току којег структурни восак у попуности деградира у аморфну воштану масу. Ипак, према нашим резултатима, поменути процес деградације воштаних кристалоида био је најбржи и почео најраније на четинама *A. x borisii-regis*, што би требало и статистички проверити у будућим истраживањима.

Са друге стране, познато је и да различити средински фактори као што су механички (ветар), хемијски (гасовити загађивачи из ваздуха) или биотички (епифитски микроорганизми и инсекти) могу убрзати деградацију кристалоида на листовима четинара (Jeffrey, 2006). Према Crossley и Fowler (1986), стање тубула на четинама *P. sylvestris*, односно проценат формирања аморфне воштане масе може се сматрати индикатором загађености ваздуха. Штавише, Ваčić и Popović (1998) су показали почетак агломерације и срастања тубула на веома младим четинама *A. alba* у загађеним подручјима. Ово је указало на убрзани процес деградације структурног воска који не зависи само од природног процеса старења, него је и под утицајем различитих загађивача ваздуха који долазе из индустрије и саобраћаја. Међутим, биљни материјал у нашој студији је сакупљен у природним популацијама истраживаних *Abies* таксона далеко од поменутих извора загађивача ваздуха.

Коначно, познато је да током процеса деградације воштаних кристалоида долази и до постепеног повећања влажности када епикутуларне површине четина могу бити колонизоване од стране зелених алги и гљива. Као последица тога, интензитет фотосинтезе се смањује, а на нивоу целог стабла ово смањење може бити између 4 и 9% (Reveling et al., 1992). У нашој студији, хифе гљива биле су спорадично присутне на лицу и наличју *A. alba* четина свих старости, али најизраженије на трогодишњој четини коју је одликовао и највећи степен деградације тубула (слике 5-27Д). На четинама *A. x borisii-regis* и *A. cephalonica* није утврђено присуство хифа гљива.

## **6. ОПШТА ДИСКУСИЈА**

## 6.1. Диференцијација популација *A. alba* и *A. cephalonica*

Мултиваријационе статистичке анализе (CDA и СА) на основу морфо-анатомских карактеристика четина оба низа указале су на јасну диференцијацију популација *A. alba* и *A. cephalonica* (слике 5-5 и 5-6). На нивоу четина доњег низа, значајан утицај на СА1 имала је само карактеристика дебљина четине на попречном пресеку (ДП), док су карактеристике максимална ширина четине (МШ), ширина четине на 95% њене дужине (Ш\_95) и дебљина четине на попречном пресеку (ДП) имале значајан утицај на СА1 код четина горњег низа (табела 5-5). Штавише, резултати *post-hoc* теста подржали су статистичку значајност разлика између претпостављених родитељских врста за 21 односно 24 тестиране морфо-анатомске карактеристике четина доњег и горњег низа, респективно (табела 5-4). У сагласности, исте мултиваријационе анализе показале су да се популације *A. alba* и *A. cephalonica* могу јасно разликовати и на основу HS испарљивих компоненти четина (слике 5-13 и 5-14). Четири компоненте ( $\beta$ -пинен, лимонен+ $\beta$ -феландрен, камфен и  $\alpha$ -пинен) имале су значајан утицај на СА1 (табела 5-8), док су резултати *post-hoc* теста подржали статистичку значајност разлика између претпостављених родитељских врста за 9 компоненти (табела 5-7).

Са друге стране, CDA и СА на основу компоненти кутикуларних воскова нису успеле да подрже диференцијацију популација *A. alba* и *A. cephalonica* (а самим тиме ни да омогуће идентификацију њихових хибридних популација; слика 5-25). У сагласности са овим резултатима, Nikolić и сар. (2018) показали су преклапање 14 популација три *Pinus* врсте (*P. heldreichii*, *P. nigra* и *P. peuce*) у неколико мултиваријационих анализа на основу садржаја *n*-алкана у восковима. Такође, поново је други тип фитохемијских маркера (терпени) омогућио јасну диференцијацију популација ове три *Pinus* врсте, позиционирајући их у складу са инфрагенеричном класификацијом (Mitić et al., 2017a). Поред тога, требало би узети у разматрање и чињеницу да је у истраживањима диференцијације популација *P. nigra* (Mitić et al., 2018a) и *P. mugo* (Mitić et al., 2018b) на основу свих идентификованих компоненти воска, дистрибуција примарних алкохола представљала најважнији критеријум. Међутим, у кутикуларним восковима три балканска *Abies* таксона идентификован је само један примарни алкохол (1-хексадеканол) у просечним концентрацијама испод 5%.

Ипак, када су мултиваријационе анализе компоненти воскова изведене на специјском нивоу, уочена је блага тенденција диференцијације између јединки *A. alba* и *A. cephalonica* (слика 5-26). Значајан утицај на CA1 показали су су *cis*-абиетатриен и *n*-алкани C<sub>21</sub>, C<sub>22</sub>, C<sub>27</sub> и C<sub>29</sub> (табела 5-14), док су резултати *post-hoc* теста подржали статистичку значајност разлика између претпостављених родитељских врста за 5 компоненти (табела 5-12). Слично, према Nikolić и сар. (2018), само је CDA на специјском нивоу указала на диференцијацију три поменуте *Pinus* врсте (*P. heldreichii*, *P. nigra* и *P. peuce*) на основу *n*-алкана, иако их је позиционирала без сагласности са инфрагенеричном класификацијом. Међутим, чињеница да је други тип фитохемијских маркера (терпени) подржао диференцијацију истраживаних *Abies* (ова студија) и *Pinus* (Mitić et al., 2017a) таксона на популационом нивоу, може водити закључку да терпене одликује већа резолуција и поузданост у хемотипизацији појединих четинарских таксона у односу на компоненте кутикуларних воскова. И поред тога, можемо рећи да је одсуство потпуне диференцијације између јединки *A. alba* и *A. cephalonica* на основу компоненти кутикуларних воскова био прилично неочекиван резултат, с обзиром да је неколико досадашњих студија указало на то да је источна генетичка лоза *A. alba* морфолошки и биохемијски сличнија *A. nordmanniana* (понтска, кавкаска јела) него *A. cephalonica* (Fady et al., 1992; Linares, 2011). Наиме, према Linares (2011), *A. alba* и *A. nordmanniana* су вероватно настале од заједничког претка у понтском региону, док је *A. cephalonica* настала од претка балканске јеле током плиоцена. Нажалост, према нашим сазнањима, не постоје литературни подаци који се односе на састав кутикуларних воскова четина у аутохтоним популацијама *A. nordmanniana*, услед чега није ни могуће дискутовати о степену фитохемијске диференцијације између ове три *Abies* врсте на нивоу поменутог типа маркера.

## 6.2. Хибридне популације

Услед великог таксономског, еколошког и економског значаја, биљни хибриди се већ дуго налазе у фокусу различитих типова истраживања. Наиме, формирање нових хибридних таксона је од огромног значаја како са таксономског аспекта (идентификација нових таксона), тако и због њихове еколошке и/или економске супериорности у односу на родитељске врсте. С обзиром на велики значај хибридизације у еволуцији биљака, од велике је важности тачно идентификовати хибридне јединке и/или хибридне популације.

Узимајући у обзир сва досадашња истраживања, постоје три главна проблема везана за утврђивање прецизне географске дистрибуције *A. x borisii-regis*: 1) скоро сва досадашња истраживања изведена су на популационом нивоу, што је омогућило идентификацију хибридних популација (али не и хибридних јединки), тако да су читаве популације приписиване једном од три балканска *Abies* таксона на основу морфо-анатомских (Mitsopoulos & Panetsos, 1987; Jasińska et al., 2017; Litkowiec et al., 2021), фитохемијских (Mitsopoulos & Panetsos, 1987) или DNA маркера (Liepelt et al., 2010; Bella et al., 2014; Krajmerová et al., 2016; Litkowiec et al., 2021). Према томе, ниједна од наведених студија није спроведена на индивидуалном нивоу и самим тим није утврдила постојање мешовитих популација у којима се јављају два или чак сва три балканска *Abies* таксона; 2) услед велике морфолошке варијабилности иста популација је од стране различитих аутора приписивана различитим таксонима (најчешћи случај са бугарским и северномакедонским популацијама класификованим као *A. alba* или *A. x borisii-regis*), што је условило извођење различитих закључака; и 3) веома мали број досадашњих студија је спроведен на већем делу потенцијалог ареала *A. x borisii-regis* укључујући ширу прелазну зону између *A. alba* и *A. cephalonica* (Krajmerová et al., 2016).

Недавно су Siskas и сар. (2023) по први пут спровели идентификацију три балканска *Abies* таксона на индивидуалном нивоу користећи специјес специфичне cpDNA и mtDNA маркере и тиме омогућили увид у њихову дистрибуцију на скоро читавој територији Грчке (осим североисточног дела). Према поменутиим ауторима, скоро све проучаване популације одликују се присуством *A. x borisii-regis* јединки, при чему је њихов број веома мали у популацијама из јужне и централне Грчке, али већи у северном делу земље.

Изузетак су популације са острва Кефалонија и најјужнијег врха Пелопонеза - Тајгетос које представљају чисте *A. cephalonica* популације.

Резултати наше студије подржали су хибридно порекло 10 односно 5 популација у оквиру шире прелазне зоне између *A. alba* и *A. cephalonica* на основу морфо-анатомских карактеристика и HS испарљивих компоненти, респективно (**табела 6-1**):

- 1) Популације из јужне (Родопи – оба типа маркера) и југозападне (Рила и Пирин – морфо-анатомске карактеристике) Бугарске. Према „*Atlas Florae Europaeae*“ (Jalas & Suominen, 1973), у овој географској области *A. x borisii-regis* се јавља заједно са својом северном родитељском врстом, тј. *A. alba*. Са друге стране, према „*An Atlas of the World's Conifers*“ (Farjon & Filer, 2013), присуство хибридног таксона је сигурно само на Родопима (јужна Бугарска), док се у југозападној Бугарској јавља искључиво *A. alba*. Према нашим сазнањима, досада је свега неколико аутора проучавало *Abies* популације са територије Бугарске. На основу морфо-анатомије четина, *Jasińska* и сар. (2017) и *Litkowiec* и сар. (2021) указали су на већу сличност популација са Риле и Пирине са *A. alba* него са *A. cephalonica* популацијама, што је у сагласности са нашим налазима (**слике 5-5Б и 5-6Б**). Међутим, *Krajmerová* и сар. (2016) нису успели да потврде хибридно порекло ниједне од 13 истраживаних популација из југозападне и јужне Бугарске на основу mtDNA маркера (*nad5-4*). Са друге стране, ова студија указала је на могућност присуство хибридних популација на широј територији и јужне (оба типа маркера) и југозападне Бугарске (морфо-анатомске карактеристике), што је у сагласности са „*Atlas Florae Europaeae*“ (Jalas & Suominen, 1973).
- 2) Популација са крајњег југа Северне Македоније (Нице – оба типа маркера). *Liepert* и сар. (2010) су такође показали да је суседна популација са планине Пелистер вероватно хибридна услед присуства cpDNA хаплотипова обе родитељске врсте (*A. alba* и *A. cephalonica*). Према томе, резултати на основу сва три типа маркера (морфо-анатомске карактеристике, HS испарљиве компоненте и cpDNA маркери) у складу су са хипотезом да ареал *A. x borisii-regis* укључује и најјужније делове Северне Македоније као што је и приказано у „*Atlas Florae Europaeae*“ (Jalas & Suominen, 1973).

## 3) Популације из Грчке:

- северна Грчка (Пијерија и Олимп – оба типа маркера). Ове популације су се већ показале као високо варијабилне популације хибридног порекла на основу mtDNA маркера (Bella et al., 2014). Штавише, Siskas и сар. (2023), који су спровели идентификацију *Abies* таксона у Грчкој на индивидуалном нивоу, показали да су јединке *A. x borisii-regis* доминантне у популацијама из северне Грчке. Наиме, северна Грчка је вероватно представљала језгро контактне зоне између *A. alba* и *A. cephalonica* где су ове две врсте биле/јесу присутне заједно (Bella et al., 2014; Siskas et al. 2023).
- централна Грчка (Тимфростос – оба типа маркера, Ета и Парнас – морфо-анатомске карактеристике). До недавно, хибридно порекло само две популације из централне Грчке (Тимфростос и Рентина) било је потврђено на основу mtDNA маркера (Krajmerová et al., 2016). Међутим, Siskas и сар. (2023) указали су на присуство *A. x borisii-regis* јединки у више популација из овог подручја, укључујући и популацију Парнас која се показала као полиморфна у нашој студији. Ипак, број хибридних јединки у популацијама из централне Грчке био је доста мањи у поређењу са популацијама из северног дела земље (Siskas et al., 2023).
- јужна Грчка (Пелопонез, Хелмос-Калаврита – морфо-анатомске карактеристике). Ипак, ниједан тип маркера који је коришћен у овој студији није указао на хибридни статус за две суседне популације са Пелопонеза (Хелмос и манастир Мега Спилеон) и популацију са острва Кефалонија (Енос). На основу морфолошких карактеристика, Christensen (1997) је већ известио о присуству *A. x borisii-regis* јединки на три планине на Пелопонезу (Хелмос, Зириа и Парнон). Штавише, Siskas и сар. (2023) су показали присуство одређеног броја хибридних јединки у већини истраживаних популација са Пелопонеза, док су једино популације са најјужнијег врха Пелопонеза (Тајгетос) и острва Кефалонија представљале чисте *A. cephalonica* популације. Ови резултати су од великог значаја за конзервацију, узимајући у обзир да већина *Abies* популација на Пелопонезу (претпостављеном језгру ареала чистих



*A. cephalonica* шума) садржи одређен број хибридних јединки, остављајући само најјужнију популацију Тајгетос као чисту популацију грчке јеле на Пелопонезу (Siskas et al., 2023). Према томе, присуство *A. x borisii-regis* јединки на скоро читавој територији Грчке, чак и у претпостављеним чистим *A. cephalonica* популацијама на Пелопонезу, захтева хитне мере конзервације *A. cephalonica* с обзиром на ендемски статус овог таксона.

**Табела 6-1.** Хибридне популације на основу морфо-анатомских и фитохемијских маркера (НС испарљивих компоненти).

Популација <sup>1</sup>	Акроним	Тип маркера	
		Морфо-анатомске карактеристике	НС испарљиве компоненте
Северна Македонија, Нице	AMN	+	+
Бугарска, Рила, изнад Рилског манастира	ABR	+	-
Бугарска, Пирин, изнад Банског	ABP	+	-
Бугарска, Централни Родопи, Пампорово	BBR	+	+
Грчка, Пијерија, Фтери	BGP	+	+
Грчка, Олимп, изнад Лептокарије	BGO	+	+
Грчка, Тимфростос, Селос	BGT	+	+
Грчка, Ета	CGO	+	-
Грчка, Парнас, Плејаде	CGP	+	-
Грчка, Пелопонез, Хелмос, Калаврита	CGK	+	-

<sup>1</sup>Географски положај популација приказан је на **слици 4-1**; карактеристике локалитета дате су у **табели 4-1**.

Дакле, два типа маркера (морфо-анатомске карактеристике и НС испарљиве компоненте) у нашој студији потврдила су хибридни статус *Abies* популација из јужне Бугарске (Родопи), крајњег југа Северне Македоније (Нице), северне (Пијерија и Олимп) и

централне Грчке (Тимфростос), док су морфо-анатомске карактеристике указале на полиморфност још пет суседних популација из југозападне Бугарске (Пирин и Рила), централне (Ета и Парнас) и јужне (Пелопонез, Хелмос-Калаврита) Грчке. Према томе, наши резултати нису указали на хибридни статус за две суседне популације са Пелопонеза и популацију са острва Кефалонија (чисте *A. cephalonica* популације), што се делимично слаже са молекуларним подацима (Siskas et al., 2023). Имајућу у виду територију Грчке, где су Siskas и сар. (2023) спровели идентификацију *Abies* таксона на индивидуалном нивоу користећи специјес специфичне cpDNA и mtDNA маркере, можемо рећи да су морфо-анатомски маркери у већој сагласности са молекуларним у односу на HS испарљиве профиле. Са друге стране, компоненте кутикуларних воскова нису омогућиле диференцијацију популација *A. alba* и *A. cephalonica*, а самим тиме ни идентификацију њихових хибридни популација.

Коначно, све хибридне популације требало би укључити у конзервационе пројекте будући да генетичка конституција полиморфних *Abies* популација може да садржи корисне податке о генетичким варијацијама неопходним за суочавање са будућим еколошким изазовима у овој области. Наиме, јединке *A. x borisii-regis* могу имати неколико потенцијалних предности у смислу генетичких варијација у поређењу са родитељским врстама, с обзиром на то да велики број биљних хибрида одликује хетерозис, који подразумева већи фекундитет, отпорност, као и прилагодљивост променама животне средине. Према томе, популације *A. x borisii-regis* вероватно имају високи генетички капацитет и будуће студије би требало да утврде ниво њихове подобности као репродуктивног материјала за пошумљавање. Са друге стране, присуство *A. x borisii-regis* јединки на скоро читавој територији Грчке, чак и у претпостављеним чистим *A. cephalonica* популацијама на Пелопонезу, захтева хитне мере конзервације *A. cephalonica* с обзиром на ендемски статус овог таксона.

### 6.3. Диференцијација популација *A. alba*

Претходна студија на основу матернално наслеђене mtDNA показала је постојање две генетичке лозе *A. alba*: једне распрострањене у западној и централној Европи, и друге на јужном Балкану и источним Карпатима (Lierpelt et al., 2002). Имајућу у виду да све популације *A. alba* анализирани у овој студији припадају источној лози ове врсте, није очекивана значајна диференцијација међу њеним популацијама. Ипак, на основу морфо-анатомских карактеристика четина оба низа, најзападнија популација *A. alba* из Босне и Херцеговине (ABV) показала је одређен степен диференцијације у односу на све остале проучаване популације (слике 5-5Б и 5-6Б), указујући на „изолацију путем дистанце“ (IBD, енгл. *Isolation by Distance*). С обзиром на то да анализа HS испарљивих компоненти није укључила ову популацију, то би могао да буде предмет будућих истраживања.

Како су садашње источне популације *A. alba* морфолошки и биохемијски сличније *A. nordmanniana* него *A. cephalonica*, претпоставља се да је *A. alba* настала у Понтском региону (североисточна Турска) током плиоцена (Fady et al., 1992). Према Fady и сар. (1992), значајна количина  $\delta^3$ -карена у кортикалној олеорезини гранчица која је утврђена искључиво код румунске провенијенције *A. alba* и *A. nordmanniana* subsp. *equi-trojani* представља један од примера биохемијске сличности између источне лозе *A. alba* и *A. nordmanniana sensu lato*. Штавише, ови аутори су претпоставили да би румунска провенијенција *A. alba* могла представљати биохемијску форму која је блиска претку понтске јеле, јер је еволуција северних медитеранских јела ишла у правцу нестанка  $\delta^3$ -карена (Gassama, 1982). Међутим, ова хипотеза не може бити потврђена резултатима наше студије, с обзиром на то да  $\delta^3$ -карен није детектован ни у једној од истраживаних популација поступком HS изолације.

#### 6.4. Диференцијација популација *A. cephalonica*

Неколико досадашњих студија показало је да се *A. cephalonica* популације са острва Евија као и оближње континенталне популације са планина Парнита и Парнас јасно разликују од осталих популација грчке јеле на основу морфолошких (Christensen, 1986), биохемијских (Fady et al., 1992) и генетичких (Drouzas, 2000; Bella et al., 2014) карактеристика. Према Liu (1971), ове популације заједно са популацијом *A. nordmanniana* subsp. *equi-trojani* са планине Ида из северозападног дела азијске Турске би требало класификовати као *A. cephalonica* var. *graeca* (Fraas) T.S. Liu, док све остале популације грчке јеле представљају типски варијетет врсте (*A. cephalonica* var. *cephalonica*). Наиме, претпоставља се да су током плиоценске морске трансгресије настали северни басени Егејског мора са копненим мостовима од Мале Азије до Грчке преко острва Евија, који су такође било присутни током плио-плеистоценске рецесије (Keraudren, 1979). Овакви копнени мостову су вероватно одржавали проток гена између понтских и источних балканских популација. На овај начин су Fady и сар. (1992) објаснили интермедијарни положај популација Евија и Парнита у односу на *A. cephalonica*, *A. alba* и *A. nordmanniana* s.l. у погледу садржај терпена у кортикалној олеорезини гранчица. Имајућу у виду популацију са планине Парнас која је истраживана у нашој студији, Drouzas (2000) је у њој утврдио висок ниво генетичког полиморфизма и јединствене сpPCR-RFLP алеле. Штавише, Bella и сар. (2014) су показали да се ова популација јасно разликује од осталих *A. cephalonica* популација на основу сpDNA маркера, што може да указује и на њену дугорочну изолацију без ефеката уског грла (енгл. *bottlenecks*). Међутим, резултати наше студије нису подржали значајну диференцијацију ове популације у односу на остале популације *A. cephalonica* како на основу морфо-анатомских карактеристика (слике 5-5 и 5-6) тако и на основу HS испарљивих компоненти (слика 5-14), с обзиром да је показала велики степен сличности са популацијама са Пелепонеза. Такође, у савременим флористичким базама података (Euro+Med, 2006; WFO, 2023), *A. cephalonica* var. *graeca* није препознат као посебан таксон, тј. сматра се само синонимом *A. nordmanniana* subsp. *equi-trojani*.

Такође, требало би узети у разматрање и чињеницу да су Litkowiec и сар. (2021) указали на одређен степен диференцијације популације *A. cephalonica* са класичног

налазишта (*locus classicus*), тј. острва Кефалонија, у односу на остале популације грчке јеле у погледу морфо-анатомских карактеристика четина. Са друге стране, на основу терпена из кортикалне олеорезине гранчица анализираних од стране Fady и сар. (1992) као и сета морфо-анатомских карактеристика (слике 5-5 и 5-6) и NS испарљивих компоненти (слика 5-14) примењених у овој студији, очигледно је да ова популација није показала значајне разлике у односу на популације са Пелопонеза, указујући на бар повремени транспорт полена са копна. Иначе, претпоставља се да је острво Кефалонија одвојено од континенталног дела Грчке још од плиоцена (Fady et al., 1992).

## **7. ЗАКЉУЧЦИ**

1. Као најстабилнија морфо-анатомска карактеристика четина оба низа издвојио се број смоних канала (БС), који се заправо одликује потпуним одсуством варијабилности ( $CV\%=0$ ) код сва три таксона и оба типа четина. Поред тога, још две карактеристике су се издвојиле као ниско варијабилне ( $CV\%<10$ ) у скоро свим случајевима: број стома на 1 mm централног дела наличја четине (БСН) и површина попречног пресека четине (ПП). Са друге стране, у оквиру јако високог степена варијабилности ( $CV\%>100$ ) налазе се карактеристике које се односе на бројност стома и редова стома на централном делу лица четине (број стома на 1 mm централног дела лица четине (БСЛ) и број редова стома на централном делу лица четине (БРЛ)).
2. Униваријационе статистичке анализе подржале су статистичку значајност разлика између претпостављених родитељских врста *A. alba* и *A. cephalonica* за 21 (четине доњег низа) односно 24 (четине горњег низа) морфо-анатомске карактеристике, при чему се хибридни таксон: 1) разликовао од *A. cephalonica*, али не од *A. alba* (9 карактеристика код оба низа четина); 2) разликовао од *A. alba*, али не од *A. cephalonica* (7 – доњи низ, 2 – горњи низ); или 3) није разликовао ни од једне родитељске врсте (4 – доњи низ, 9 – горњи низ). Код само једне карактеристике (ОШПЕ) четина доњег низа односно четири карактеристике четина горњег низа (ДП, РС, ОП и МК) добијене су значајне разлике између сва три *Abies* таксона. На овај начин, утврђене су јасне разлике између *A. alba* и *A. cephalonica*, али нестабилне карактеристике за *A. x borisii-regis*. Овај резултат је у сагласности са хипотезом да је јела краља Бориса нестабилан таксон настао услед недавне хибридизације и интрогресије између *A. alba* и *A. cephalonica*.
3. СДА на основу 18 морфо-анатомских карактеристика четина доњег низа указала је на јасну диференцијацију популација *A. alba* и *A. cephalonica*. Међутим, четири проучаване популације *A. x borisii-regis* могу се окарактерисати као хетерогене и на интер- и на интрапопулационом нивоу. Наиме, већина јединки из северне *A. x borisii-regis* популације са подручја јужне Бугарске (BBR) припала је групи “alba” са једном јединком која је била позиционирана унутар “cephalonica” групе; *vice versa* већина јединки из јужних *A. x borisii-regis* популација са територије Грчке (BGP, BGO и BGT) налазила се у оквиру “cephalonica” групе са по неколико

јединки које су припале групи “alba”. Такође, слична хетерогена дистрибуција јединки уочена је код још пет популација, које су географски најближе описаним популацијама *A. x borisii-regis*. Наиме, једна популација са крајњег југа Северне Македоније (AMN) и једна популација из југозападне Бугарске (ABR), које су прелиминарно класификоване као *A. alba* у овој студији, показале су сличан образац хетерогене дистрибуције јединки као суседна *A. x borisii-regis* популација из јужне Бугарске (BBR). Са друге стране, две популације из централне Грчке (CGO и CGP) и једна са Пелопонеза (CGK), класификоване као *A. cephalonica*, показале су сличан образац хетерогене дистрибуције јединки као *A. x borisii-regis* популације из централне (BGT) и северне Грчке (BGO и BGP). На овај начин, CDA је показала да је 9 проучаваних *Abies* популација полиморфно делећи групе са обе претпостављене родитељске врсте. У исто време, може се уочити и латитудинална клина у учесталости “alba”/“cephalonica” група унутар ових 9 популација, што би могао бити сигнал нешто шире дистрибуције *A. x borisii-regis* у односу на прелиминарну класификацију примењену у овој студији. Коначно, значајан утицај на СА1 имала је само карактеристика дебљина четине на попречном пресеку (ДП), при чему је њена статистичка значајност потврђена и *post-hoc* тестом. СА је подржала постојање две групе популација, које су идентичне групама добијеним на основу CDA. Такође, може се уочити да дистрибуција популација на дендрограму углавном прати њихов латитудинални градијент, што указује на клинало варирање морфо-анатомских карактеристика четина са променом географске ширине у оквиру истраживаног подручја.

4. Код четина горњег низа, CDA на основу истог сета морфо-анатомских карактеристика показала је тенденцију формирања две групе популација које су веома сличне групама добијеним на основу претходне CDA. У ствари, једина уочена разлика односи се на чињеницу да се у овој анализи и друга популација из југозападне Бугарске (ABP), прелиминарно класификована као *A. alba*, показала као полиморфна. Поред тога, карактеристике максимална ширина четине (МШ), ширина четине на 95% њене дужине (Ш\_95) и дебљина четине на попречном пресеку (ДП) имале су значајан утицај на СА1. У сагласности, статистичка



значајност ових карактеристика потврђена је и резултатима *post-hoc* теста. Коначно, СА груписала је проучаване популације у сагласности са CDA.

5. Природне хибридне зоне углавном одликује просторни образац у коме се вредности проучаваних карактеристика постепено мењају на географском подручју између вредности типичних за сваку од две врсте. Према томе, уочено клинално варирање морфо-анатомских карактеристика четина у оквиру шире прелазне зоне између *A. alba* и *A. cephalonica* у овој студији подржава хибридизациону теорију, односно хипотезу да су ове две врсте доживеле секундарни контакт током LGM.
6. GC-MS анализа HS испарљивих компоненти четина 259 јединки из 18 популација *A. alba*, *A. x borisii-regis* и *A. cephalonica* показала је присуство 73 компоненте. Као најиспарљивији терпени, монотерпенски угљоводоници представљали су доминанту класу HS испарљивих компоненти код сва три таксона, незнатно варирајући од 95,8% (*A. alba*) до 96,6% (*A. cephalonica*). Са друге стране, садржај оксидованих монотерпена и сесквитерпенских угљоводоника био је знатно нижи, тј. у опсегу од 1,0% (*A. cephalonica*) до 2,6% (*A. alba*), и од 1,5% (*A. alba*) до 2,2% (*A. cephalonica*), респективно. Код *A. alba*, доминантне HS испарљиве компоненте представљали су  $\beta$ -пинен и лимонен+ $\beta$ -феландрен (30,6 и 21,7%, респ.), док су  $\beta$ -пинен и  $\alpha$ -пинен били најзаступљенији код *A. x borisii-regis* (38,6 и 23,1%, респ.) и *A. cephalonica* (33,9 и 31,2%, респ.).
7. У односу на вредност коефицијента варијације, ниједна HS компонента се није издвојила као ниско варијабилна ( $CV\% < 10$ ). У оквиру умереног степена варијабилности ( $10 < CV\% < 50$ ) код сва три таксона налазили су се  $\alpha$ -пинен, трициклен, камфен и  $\beta$ -пинен. Са друге стране, висок степен варијабилности ( $50 < CV\% < 100$ ) код сва три таксона показали су сантен,  $\alpha$ -феландрен и (*E*)-кариофилен. Остале компоненте налазе се у оквиру јако високог степена варијабилности ( $CV\% > 100$ ). Најниже вредности овог коефицијента утврђене су за  $\alpha$ -пинен који се може сматрати најстабилнијом HS компонентом код сва три таксона, док су највише вредности забележене за химахала-2,4-диен код *A. x borisii-regis*, линалил-ацетат код *A. cephalonica* и (*E*)-2-хексенал код *A. alba*, које се могу сматрати најваријабилнијим HS компонентама.

8. На основу униваријационих статистичких анализа, само три компоненте ( $\alpha$ -пинен,  $\alpha$ -феландрен и борнеол) су подржале значајне разлике између сва три *Abies* таксона. Наиме, већина компоненти (сантен, трициклен, камфен, лимонен+ $\beta$ -феландрен, терпинолен и борнил-ацетат) указала је на диференцијацију *A. alba* у односу на *A. x borisii-regis* и *A. cephalonica*.
9. CDA на основу 12 HS испарљивих компоненти показала је јасну диференцијацију популација *A. alba* и *A. cephalonica*, слично као и на основу морфо-анатомских карактеристика четина. Такође, четири популације *A. x borisii-regis* поново су се показале као хетерогене и на интра- и на интерпопулационом нивоу. Код северне *A. x borisii-regis* популације са подручја јужне Бугарске (BBR), већина јединки припала је групи “alba” са једном јединком која је била позиционирана унутар “cephalonica” групе. Међутим, јединке из две јужније популације са територије северне Грчке (BGP и BGO) биле су мање-више равномерно распоређене са обе стране CA1, указујући на приближно једнаку заступљеност оба HS профила у овим популацијама. Коначно, већина јединки из најјужније *A. x borisii-regis* популације из централне Грчке (BGT) налазила се је у оквиру “cephalonica” групе са неколико јединки које су припале групи “alba”. Дакле, све четири *A. x borisii-regis* популације одликовало је присуство HS испарљивих профила обе родитељске врсте, при чему је учесталост профила клинално варира са променом географске ширине. Поред тога, слична хетерогена дистрибуција јединки уочена је код још једне популације са крајњег југа Северне Македоније (AMN), која је прелиминарно класификована као *A. alba* у овој студији. Наиме, ова популација показала је сличан образац хетерогене дистрибуције јединки као што је описано за суседну *A. x borisii-regis* популацију из јужне Бугарске (BBR), што би могао бити сигнал нешто шире дистрибуције *A. x borisii-regis* у односу на прелиминарну класификацију примењену у овој студији. Коначно, значајан утицај на CA1 имале су четири компоненте ( $\beta$ -пинен, лимонен+ $\beta$ -феландрен, камфен и  $\alpha$ -пинен), при чему је њихова статистичка значајност потврђена и *post-hoc* тестом (осим у случају  $\beta$ -пинена).
10. СА на основу истог сета HS испарљивих компоненти потврдила је постојање две групе популација у сагласности са CDA. Такође, може се уочити да дистрибуција

популација на дендрограму углавном прати њихов латитудинални градијент (слично као и код морфо-анатомских карактеристика четина), што указује на клинално варирање HS испарљивих компоненти четина са променом географске ширине.

11. С обзиром на то да је један од показатеља присуства хибридне зоне клинално варирање свих или већег броја карактеристика на географском подручју између вредности типичних за сваку од две врсте, уочена географска дистрибуција HS испарљивих профила у овој студији, подржава хипотезу да су проучаване *A. x borisii-regis* популације секундарног порекла услед хибридизације између *A. alba* и *A. cephalonica*.
12. Корелациона анализа указала је на потпуно одсуство јаке повезаности ( $r > \pm 0,8$ ) HS испарљивих компоненти са било којим од тестираних абиотичких параметара, док су само две компоненте показале корелације средње јачине ( $\pm 0,5 < r < \pm 0,8$ ):  $\alpha$ -пинен (LAT, BIO1, BIO5, BIO6, BIO9, BIO10, BIO11, BIO14, BIO15, BIO17, BIO18, BIO19) и  $\alpha$ -феландрен (LAT, BIO15, BIO18, BIO19).
13. Хидродестилацијом гранчица са четинама добијена су безбојна етарска уља (*A. alba* и *A. x borisii-regis*) као и етарско уље светло жуте боје (*A. cephalonica*). Код сва три уља, доминантну класу једињења представљали су монотерпенски угљоводоници у опсегу од 55,9% (*A. x borisii-regis*) до 91,7% (*A. cephalonica*). Такође, код сва три уља,  $\beta$ - и  $\alpha$ -пинен су представљали две најзаступљеније компоненте. Ипак, садржај ове две компоненте у уљу *A. cephalonica* је био око два пута већи - 64,7% ( $\beta$ -пинен - 35,5% и  $\alpha$ -пинен - 29,2%) у односу на уља друга два таксона: *A. alba* - 34,7% ( $\beta$ -пинен - 22,3% и  $\alpha$ -пинен - 12,4%) и *A. x borisii-regis* - 32,7% ( $\beta$ -пинен - 21,1% и  $\alpha$ -пинен - 11,6%). Узимајући у обзир мање заступљене класе терпена, највећи проценат оксидованих монотерпена утврђен је у уљу *A. alba* (12,1%) са борнил-ацетатом (8,8%) као главним представником ове класе. Са друге стране, сесквитерпенски угљоводоници били су најзаступљенији у уљу *A. x borisii-regis* (26,5%) са највећим садржајем (*E*)-кариофилена (8,0%).
14. СА на основу 27 компоненти етарских уља показала је постојање два главна кластера при чему је један укључио *A. alba* и *A. x borisii-regis*, а други *A.*

*cephalonica*. Дакле, у погледу састава етарског уља гранчица са четинама хибридни таксон је сличнији северној родитељској врсти (*A. alba*) него јужној (*A. cephalonica*). Овакав резултат СА био је и очекиван, с обзиром на фитохемијске профиле доминантних компоненти. Наиме, иако су код сва три уља,  $\beta$ - и  $\alpha$ -пинен представљали две најзаступљеније компоненте, њихов садржај у уљу *A. cephalonica* био је око два пута већи у односу на уља *A. alba* и *A. x borisii-regis*. Са друге стране, уља *A. alba* и *A. x borisii-regis* одликовао је нешто већи садржај борнил-ацетата и (E)-кариофилена у поређењу са уљем *A. cephalonica*.

15. У кутикуларним восковима четина 269 јединки из 18 популација *A. alba*, *A. x borisii-regis* и *A. cephalonica* идентификовано је 18 компоненти. Из класе липидних једињења која настају од масних киселина веома дугог ланца утврђено је присуство једног примарног алкохола (1-хексадеканол) и 13 *n*-алкана ( $C_{21}$  -  $C_{33}$ ). Поред тога, из класе липидних једињења која воде порекло од изопреноида, идентификована су два дитерпена (абиетатриен и *cis*-абиетатриен), један тритерпен (сквален) и један стерол ( $\gamma$ -ситостерол). Код сва три *Abies* таксона, *n*-алкани су представљали најзаступљенију класу једињења (од 62,0% код *A. cephalonica* до 66,5% код *A. x borisii-regis*), док је садржај свих осталих класа једињења био знатно нижи (испод 10%). Друга најзаступљенија класа једињења били су или тритерпени (6,7% код *A. cephalonica* и 6,2% код *A. alba*) или стероли (5,1% код *A. x borisii-regis*). Најзаступљенија класа једињења (*n*-алкани) била је у исто време и најстабилнија класа једињења са коефицијентом варијације који је незнатно варирао од 24,7% (*A. cephalonica*) до 25,0% (*A. alba*). Са друге стране, скоро све остале класе једињења биле су јако високо варијабилне код сва три таксона ( $CV > 100\%$ ). Поређење доминантних компоненти кутикуларних воскова показало је да сва три истраживана *Abies* таксона одликује доминација четири *n*-алкана са непарним бројем C атома у истом редоследу:  $C_{29}$ ,  $C_{27}$ ,  $C_{31}$  и  $C_{25}$ .

16. На основу униваријационих статистичких анализа, код пет компоненти утврђене су значајне разлике између претпостављених родитељских врста *A. alba* и *A. cephalonica*, док се хибридни таксон: 1) разликовао од *A. alba*, али не од *A. cephalonica* (абиетатриен, *cis*-абиетатриен, *n*-алкан  $C_{22}$  и  $\gamma$ -ситостерол); или 2) разликовао од *A. cephalonica*, али не од *A. alba* (*n*-алкан  $C_{21}$ ). Са друге стране,

четири компоненте су указале на диференцијацију *A. x borisii-regis* у односу на *A. alba* и *A. cephalonica* (1-хексадеканол, *n*-алкани C<sub>24</sub> и C<sub>28</sub> и сквален). Ниједно од испитиваних једињења није показало постојање значајних разлика између сва три *Abies* таксона.

17. CDA на основу 18 компоненти кутикуларних воскова показала је преклапање скоро свих популација са благом тенденцијом диференцијације једне *A. alba* (ABP) и једне *A. x borisii-regis* (BBR) популације. Дендограм добијен на основу СА указао је на сличан резултат као и CDA. Према томе, мултиваријационе анализе компоненти воскова на популационом нивоу нису успеле да подрже диференцијацију између *A. alba* и *A. cephalonica*, а самим тиме ни да омогуће идентификацију њихових хибридних популација. Колико нам је познато, ова студија представља прво истраживање диверзитета и диференцијације компоненти воска у оквиру рода *Abies* на популационом нивоу.
18. Ипак, када су мултивариационе анализе компоненти воскова изведене на специјском нивоу, уочена је блага тенденција диференцијације између јединки *A. alba* и *A. cephalonica*. Значајан утицај на СА1 показали су *cis*-абиетатриен и *n*-алкани C<sub>21</sub>, C<sub>22</sub>, C<sub>27</sub> и C<sub>29</sub>, при чему су резултати *post-hoc* теста подржали статистичку значајност разлика између родитељских врста само у случају *cis*-абиетатриена и *n*-алкана C<sub>21</sub> и C<sub>22</sub>. Међутим, чињеница да је други тип фитохемијских маркера (терпени) подржао диференцијацију ових таксона на популационом нивоу, може водити закључку да терпене одликује већа резолуција и поузданост у хемотипизацији појединих четинарских таксона у односу на компоненте кутикуларних воскова. Јединке *A. x borisii-regis* биле су у највећој мери преклопљене облацима обе родитељске врсте, иако је површина преклапања била нешто већа са *A. cephalonica* него са *A. alba*. Ипак, скоро потпуно преклапање *A. x borisii-regis* са обе родитељске врсте сагласно је са хипотезом да је јела краља Бориса нестабилан таксон настао услед недавне хибридизације и интрогресије између *A. alba* и *A. cephalonica*.
19. Такође, СА на основу истог сета компоненти воскова показала је постојање два главна кластера при чему је један укључио *A. alba*, а други *A. cephalonica* и *A. x*

*borisii-regis*. Дакле, у погледу састава кутикуларних воскова, хибридни таксон је сличнији јужној родитељској врсти (*A. cephalonica*) него северној (*A. alba*) што је у сагласности са ранијим студијама, базираним на саставу етарског уља четина као и варијабилности алозима. Са друге стране, наши резултати на основу састава етарског уља гранчица са четинама указали су на ближи положај хибридног таксона северној родитељској врсти (*A. alba*). Међутим, све ове процене о диференцијацији *A. x borisii-regis* у односу на родитељске врсте требало би узети са опрезом, с обзиром на то да природне хибридне зоне одликује просторни образац у коме се вредности проучаваних карактеристика постепено мењају на географском подручју између вредности типичних за сваку од две врсте. Према томе, приликом процене степена диференцијације требало би узети у обзир географски положај популација које су анализиране.

20. Спирманова корелација рангова указала је на потпуно одсуство јаке повезаности ( $r > \pm 0,8$ ) компоненти кутикуларних воскова са било којим од тестираних абиотичких параметара, слично као и у случају HS испарљивих компоненти четина. Такође, само су две тестиране компоненте показале корелације средње јачине ( $\pm 0,5 < r < \pm 0,8$ ): абиетатриен (LAT, BIO1, BIO5, BIO6, BIO9-BIO11, BIO14, BIO15, BIO17 и BIO18) и *cis*-абиетатриен (LAT, SUB, BIO1, BIO5, BIO6, BIO9-BIO11, BIO14, BIO15, BIO17 и BIO18). На основу ових резултата, можемо закључити да је утврђена варијабилност компоненти кутикуларних воскова вероватно генетички условљена и да не представља адаптивни одговор на различите факторе средине.
21. Код сва три испитивана таксона на средишњем делу лица четина уочени су слепљени депозити воска. Иако су депозити воска били присутни на целој површини лица четина, њихова највећа концентрација примећена је дуж централног нерва. Такође, повећање количине депозита воска са старењем четина била је заједничка карактеристика сва три таксона, тако да је њихова најмања количина уочена на лицу једногодишњих, а највећа на лицу трогодишњих четина.
22. Доминантни тип воштаних кристалоида на наличју четина су вероватно представљале тубуле са тенденцијом концентрисања око и унутар стома. Конкретно,

тубуле су биле густо распоређене са мрежастим изгледом унутар стоминих комора, док су на ободима стома као и површинама између стома у оквиру стоматалних трака биле спорадично присутне. Површине између стома углавном су изгледале као континуиране воштане превлаке са мање или више израженим површинским структурама типа корица, при чему је на појединим местима било могуће уочити и присуство слепљених депозита воска.

23. Уколико упоредимо изглед тубула између четина различите старости, очигледно је да постоје значајне разлике: густо распоређене тубуле са мрежастим изгледом унутар стоминих комора биле су најбоље очуване на једногодишњим четинама код сва три таксона. Поред тога, на једногодишњим четинама *A. alba* и *A. cephalonica*, ободи стома као и површине између стома у оквиру стоматалних трака такође су биле прекривене тубулама. Међутим, у случају једногодишње четине *A. x borisii-regis*, тубуле су биле концентрисане искључиво унутар стоминих комора, док су ободи стома као и површине између стома биле прекривене аморфном воштаном масом. Код двогодишњих четина сва три таксона јасно се може уочити тенденција агрегације, задебљавања и срастања тубула. Штавише, на појединим местима унутар стоминих комора двогодишњих четина могу се уочити и почетци формирања аморфне воштане масе, што је било најизраженије код *A. x borisii-regis*, а најмање код *A. cephalonica*. Код трогодишњих четина, стоме су биле скоро у потпуности затворене аморфном воштаном масом, нарочито код *A. x borisii-regis*. На овај начин, стомине коморе биле су испуњене воштаним тубулама (једногодишње четине), воштаним тубулама са почецима формирања аморфне воштане масе (двогодишње четине) или аморфном воштаном масом (трогодишње четине). Дакле, током времена долази до значајних промена у изгледу воштаних тубула које постепено срастају како унутар стоминих комора тако и на ободима стома и површинама између стома. На крају долази до образовања чврстог воштаног чепа изнад стомине коморе који у потпуности или делимично затвара стоме на старијим четинама. Очигледно је да су овакве промене у микроморфологији епикутуларног воска део природног процеса старења четина током којег структурни восак у потпуности деградира у аморфну воштану масу са гранулама.

24. Резултати наше студије показали су јасну диференцијацију популација источне генетичке лозе *A. alba* и *A. cephalonica* на нивоу морфо-анатомских карактеристика и HS испарљивих компоненти, док варијабилност компоненти воскова није успела да подржи диференцијацију популација родитељских врста. Поред тога, приказани резултати указали су на хибридни статус 10 односно 5 проучаваних популација у оквиру шире прелазне зоне између *A. alba* и *A. cephalonica* на основу морфо-анатомских карактеристика и HS испарљивих компоненти, респективно. Наиме, оба типа маркера потврдила су хибридни статус *Abies* популација из јужне Бугарске (Родопи), крајњег југа Северне Македоније (Нице), северне (Пијерија и Олимп) и централне Грчке (Тимфростос), док су морфо-анатомске карактеристике указале на полиморфност још пет суседних популација из југозападне Бугарске (Пирин и Рила), централне (Ета и Парнас) и јужне (Пелопонез, Хелмос-Калаврита) Грчке. Према томе, ниједан тип маркера није указао на хибридни статус за две суседне популације са Пелопонеза и популацију са острва Кефалонија (чисте *A. cephalonica* популације). Коначно, имајућу у виду територију Грчке, где је претходно спроведена идентификација *Abies* таксона на индивидуалном нивоу употребом специјес специфичних cpDNA и mtDNA маркера, можемо рећи да су морфо-анатомски маркери у већој сагласности са молекуларним у односу на HS испарљиве компоненте.

25. У сваком случају, све хибридне популације требало би укључити у конзервационе пројекте будући да генетичка конституција полиморфних *Abies* популација може да садржи корисне податке о генетичким варијацијама неопходним за суочавање са будућим еколошким изазовима у овој области. Наиме, јединке *A. x borisii-regis* могу имати неколико потенцијалних предности у смислу генетичких варијација у поређењу са родитељским врстама, с обзиром на то да велики број биљних хибрида одликује хетерозис, који подразумева већу бујност раста, фекундитет, отпорност, као и прилагодљивост променама животне средине. Дакле, популације *A. x borisii-regis* вероватно имају високи генетички капацитет и будуће студије би требало да утврде ниво њихове подобности као репродуктивног материјала за пошумљавање. Са друге стране, присуство *A. x borisii-regis* јединки на скоро читавој територији Грчке, чак и у претпостављеним чистим *A. cephalonica* популацијама на



Пелопонезу, захтева хитне мере конзервације *A. cephalonica* узимајући у обзир ендемски статус овог таксона.

26. Наша студија може представљати добру основу за истраживања диверзитета других класа секундарних метаболита (нпр. флавоноида) код сва три балканска *Abies* таксона, као и за идентификацију *A. x borisii-regis* јединки употребом специјес специфичних cpDNA и mtDNA маркера у северном делу потенцијалног ареала овог таксона. Поред тога, приоритет будућих истраживања требало би да представљају *A. x borisii-regis* популације из јужне Албаније за које постоји најмањи број литературних података.

## **8. ЛИТЕРАТУРА**

- Acevski, J, Simovski, B, 2011. Forest associations of the National Park Mavrovo in the Republic of Macedonia, in: Horodnic, SA, Duduman, ML, Palaghianu, C, (Eds.), Integrated Management of Environmental Resources. Proceedings of the International Conference Integrated Management of Environmental Resources - November 4-6th, Suceava, Romania, 17-27.
- Adams, RP, Hagerman, A, 1976. A comparison of the volatile oils of mature versus young leaves of *Juniperus scopulorum*: chemosystematic significance. *Biochem. Syst. Ecol.* 4, 75-79.
- Adams, RP, 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, Allured Publishing Corporation, Illinois.
- Aussenac, G, 2002. Ecology and ecophysiology of circum-Mediterranean firs in the context of climate change. *Ann. For. Sci.* 59, 823-832.
- Aguirre-Planter, É, Jaramillo-Correa, JP, Gómez-Acevedo, S, Khasa, DP, Bousquet, J, Eguiarte, LE, 2012. Phylogeny, diversification rates and species boundaries of Mesoamerican firs (*Abies*, Pinaceae) in a genus-wide context. *Mol. Phylogenet. Evol.* 62, 263-274.
- Alizoti, PG, Fady, B, Prada, MA, Vendramin, GG, 2011. Mediterranean firs (*Abies* spp). Institute of Biosciences and Bioresources. National Research Council of Italy.
- Amelunxen, F, Morgenroth, K, Picksak, T, 1967. Untersuchungen an der epidermis mit dem stereoscan-elektronenmikroskop. *Z. Pflanzenphysiol.* 57, 79-95.
- Arnold, ML, Kentner, EK, Johnston, JA, Cornman, S, Bouck, AC, 2001. Natural hybridisation and fitness. *Taxon.* 50, 93-104.
- Armengol, GF, 2015. Biotic and abiotic factors that determine the emission of volatile organic compounds by flowers. Doctoral dissertation. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
- Bačić, T, Popović, Ž, 1998. Preliminary report on epicuticular wax surface condition on stomata of *Abies alba* Mill. needles from Risnjak National park in Croatia. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 40, 25-31.
- Bačić, T, Krstin, Lj, Roša, J, Popović, Ž, 2005. Epicuticular wax on stomata of damaged silver firs trees (*Abies alba* Mill.). *Acta. Soc. Bot. Pol. Pol. Tow. Bot.* 2, 159-166.

- Balao, F, Lorenzo, MT, Sánchez-Robles, JM, Paun, O, García-Castaño, JL, Terrab A, 2020. Early diversification and permeable species boundaries in the Mediterranean firs. *Ann. Bot.* 125, 495-507.
- Baker, EA, 1982. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes, in: Cutler, DF, Alvin, KL, Price, CE, (Eds.), *The Plant Cuticle*, Academic Press, London, 139-166.
- Bakkali, F, Averbeck, S, Averbeck, D, Idaomar, M, 2008. Biological effects of essential oils- a review. *Food. Chem. Toxicol.* 46, 446-475.
- Barbéro, M, Quézel, P, 1976. Les groupements forestiers de Grèce centro-méridionale. *Ecol. Mediterr.* 2, 3-86.
- Barthlott, W, Wollenweber, E, 1981. Zur feinstruktur, chemie und taxonomischen signifikanz epicuticularer wachse und aehnlicher sekrete. Akademie der Wissenschaften und der Literatur Mainz.
- 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.
- Barthlott, W, Theisen, I, Borsch, T, Neinhuis, C, 2003. Epicuticular waxes and vascular plant systematics: integrating micromorphological and chemical data, in: Stuessy, TF, Mayer, V, Hörandl, E, (Eds.), *Deep Morphology: Toward a Renaissance of Morphology in Plant Systematics*, Gantner Verlag, Ruggell, 189-460.
- Barthlott, W, Mail, M, Bhushan, B, Koch, K, 2017. Plant surfaces: structures and functions for biomimetic innovations. *Nanomicro Lett* 9, 1-40.
- Barton, NH, Hewitt, GM, 1985. Analysis of hybrid zones. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 16, 113-148.
- Bella, E, Liepelt, S, Parducci, L, Drouzas, A, 2014. Genetic insights into the hybrid origin of *Abies x borisii-regis* Mattf. *Plant. Syst. Evol.* 301, 749-759.
- Bermadinger, E, Grill, D, Golob, P, 1987. The different influence of magnesite emissions on the surface waxes of Norway spruce and silver fir. *Can. J. Bot.* 66, 125-129.

- Bergmeier, E, 2002. Plant communities and habitat differentiation in the Mediterranean coniferous woodlands of Mt. Parnon (Greece). *Folia. Geobot.* 37, 309-331.
- Betts, TJ, 2001. Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. *J. Chromatogr. A.* 936, 33-46.
- Bianchi, G, 1995. Plant waxes, in: Hamilton, RJ, (Ed.), *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*, Oily, Dundee, Scotland, 177-222.
- Boratyńska, K, Sękiewicz, K, Jasińska, AK, Tomaszewski, D, Iszkuło, G, Ok, T, Bou Dagher-Kharrat, M, Boratyński, A, 2015. Effect of geographic range discontinuity on taxonomic differentiation of *Abies cilicica*. *Acta Soc. Bot. Pol. Pol. Tow. Bot.* 84, 419-430.
- Bowles, EJ, 2003. *Chemistry of aromatherapeutic oils*. Allen & Unwin, Crowns Nest NSW, Australia.
- Burke, JM, Arnold, ML, 2001. Genetics and the fitness of hybrids. *Annu. Rev. Genet.* 35, 31-52.
- Cadwallader, K, 2007. Measuring cheese flavor, in: Weimer, BC, (Ed.), *Improving the Flavour of Cheese*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 401-417.
- Cape, JN, Fowler, D, 1981. Changes in epicuticular wax of *Pinus sylvestris* exposed to polluted air. *Silva. Fenn.* 15, 1926-1997.
- Campbell, DR, Faidiga, A, Trujillo, G, 2018. Clines in traits compared over two decades in a plant hybrid zone. *Ann. Bot.* 122, 315-324.
- Caudullo, G, Tinner, W, 2020. *Abies*- Circum-Mediterranean firs in Europe: distribution, habitat, usage and threats, in: San-Miguel-Ayanz, J, de Rigo, D, Caudullo, G, Durrant, TH, Mauri, A, (Eds.), *European Atlas of Forest Tree Species*. Publication Office of the European Union.
- Chater, AO, 1964. *Abies* Miller, in: Tutin, TG, Heywood, VH, Burges, NA, Valentine, DH, Walters, SM, Webb, DA, (Eds.), *Flora Europaea*, vol 1. Cambridge University Press, Cambridge, 37-38.

- Christensen, KI, 1997. *Abies* Miller, in: Strid, A, Tan, K, (Eds.), Flora Hellenica, vol. 1. Koeltz Scientific Books, Konigstein, 1-3.
- Celiński, K, Bonikowski, R, Wojnicka-Półtorak, A, Chudzińska, E, Maliński, T, 2015. Volatiles as chemosystematic markers for distinguishing closely related species within the *Pinus mugo* complex. *Chem. Biodivers.* 12, 1208-1213.
- Conord, C, Gurevitch, J, Fady, B, 2012. Large-scale longitudinal gradients of genetic diversity: a meta-analysis across six phyla in the Mediterranean basin. *Ecol. Evol.* 2, 2595-2609.
- Corrigan, D, Timoney, RF, Donnelly, DMX, 1978. *n*-Alkanes and omega-hydroxyalkanoic acids from the needles of twenty-eight *Picea* species. *Phytochemistry.* 17, 907-910.
- Crossley, A, Fowler, D, 1986. The weathering of Scots pine epicuticular wax in polluted and clean air. *New Phytol.* 103, 207-218.
- Croteau, R, Kutchan, TM, Lewis, NG, 2000. Natural products (Secondary metabolites), in: Buchanan, B, Gruissem, WR, Jones, R, (Eds.), Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, 1250-1318.
- Čolić, D, 1965. Poreklo i sukcesija šumskih zajednica sa pančičevom omorikom (*Picea omorica* Panč.) na planini Tari. *Zaštita Prirode*, Beograd, 29-30; 65-90.
- 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.
- Dodd, RS, Rafii, ZA, Power, AB, 1998. Ecotypic adaptation in *Austrocedrus chilensis* in cuticular hydrocarbon composition. *New Phytol.* 138, 699-708.
- Dodd, RS, Afzal-Rafii, Z, 2000. Habitat-related adaptive properties of plant cuticular lipids. *Evolution.* 54, 1438.
- Dragota, S, Riederer, M, 2007. Epicuticular wax crystals of *Wollemia nobilis*: morphology and chemical composition. *Ann. Bot.* 100, 225-231.
- Drouzas, AD, 2000. Determination and analysis of variation of Greek fir species (*Abies* sp.), by using biochemical and molecular markers. Doctoral dissertation. Aristotle University of Thessaloniki (in Greek).

- Eckenwalder, JE, 2009. Conifers of the world. The complete reference. Timber Press, Portland, London.
- Eigenbrode, SD, Espelie, KE, 1995. Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores. *Annu. Rev. Entomol.* 40, 171-194.
- Ellenberg, HH, 2009. Vegetation ecology of Central Europe (4<sup>th</sup> ed.), Cambridge University Press.
- Ensikat, HJ, 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.
- Illes, V, Daood, HG, Perneckzi, S, Szokonya, L, Then, M, 2000. Extraction of coriander seed oil by CO<sub>2</sub> and propane at super and subcritical conditions. *J. Supercrit. Fluids.* 17, 177-186.
- Fady, B, Conkle, MT, 1993. Allozyme variation and possible phylogenetic implications in *Abies cephalonica* Loudon and some related eastern Mediterranean fir. *Silvae Genet.* 42, 351-359.
- Fady, B, Arbez, M, Marpeau, A, 1992. Geographic variability of terpene composition in *Abies cephalonica* Loudon and *Abies* species around the Aegean: hypotheses for their possible phylogeny from the Miocene. *Silvae Genet.* 41, 273-278.
- Fady, B, Conord, C, 2010. Macroecological patterns of species and genetic diversity in vascular plants of the Mediterranean basin. *Div. Distrib.* 16, 53-64.
- Farjon, A, Rushforth, KD, 1989. A classification of *Abies* Miller (Pinaceae). *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh.* 46, 59-77.
- Farjon, A, 2010. A handbook of the world's conifers. Vol. 1. Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands.
- Farjon, A, Filer, D, 2013. An atlas of the World's conifers: an analysis of their distribution, biogeography, diversity and conservation status (1<sup>st</sup> ed.). Koninklijke Brill NV, Leiden.
- Farr, TG, Rosen, PA, Caro, E, Crippen, R, Duren, R, Hensley, S, et al., 2007. The shuttle radar topography mission. *Rev. Geophys.* 45, RG2004. 10.1029/2005RG000183

- Fox, RC, 1958. The relationship of wax crystal structure to the water vapour transmission rate of wax films. *Tappi J.* 41, 283-289
- Gajić, 1970. Asocijacija Querceto-Carpinetum serbicum Rudski u svetlosti novih istraživanja u Srbiji. *Šumarstvo, Beograd.* 23, 35-42.
- Gassama, YK, 1982. Les sapins méditerranéens: hybridation contrôlée, variabilité terpénique et évolution. DEA de Biologie et Physiologie Végétales. Bordeaux I University.
- Gausson, H, 1964. Les gymnosperms actuelles et fossils. *Trav. Lab. Forest Toulouse.* 7, 321-480
- Gershenzon, J, Croteau, R, 2012. Terpenoid, in: Rosenthal, GA, Berenbaum, MR, (Eds.), *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolite: the Chemical Participant* (2<sup>nd</sup> ed.). Academic Press, San Diego, California, U.S.A., 409.
- Gligorijević, S, Pejčinović, D, 1983. Contribution to the methodology of anatomical sections preparation. *Acta biologiae et medicinae experimentalis*, 8, 43-45.
- Gorunović, MS, Lukić, PB, 2001. Farmakognozija. Farmaceutski Fakultet, Beograd.
- Gouvas, M, Sakellariou N, 2011. Climate and forest vegetation of Greece [Vol.1, in Greek]. National Observatory of Athens, Technical Library, Athens, Greece.
- Gradečki-Poštenjak, M, 2010. Utjecaj oštećenosti krošanja na varijabilnost fizioloških i kvantitativnih svojstava obične jele (*Abies alba* Mill.) u sjemenskoj zoni dinarskih bukovo-jelovih šuma u Hrvatskoj. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet. Zagreb.
- Greguss, L, Paule, L, 1988. Artificial hybridization in the genus *Abies*, in: Korpěl, S, Paule, L, (Eds.), 5<sup>th</sup> IUFRO-Tannensymposium. Zvolen: VSLD, 179-184.
- Grlić, Lj, 1980. Samoniklo jestivo bilje, Prosvjeta, Zagreb.
- Hallam, ND, 1967. An electron microscope study of the leaf waxes of the genus *Eucalyptus l'heritier*, Doctoral dissertation, University of Melbourne.
- Hallam, ND, 1970. Growth and regeneration of waxes on the leaves of *Eucalyptus*. *Planta.* 93, 257-268.



- Hanover, JW, Reicosky, DA, 1971. Surface wax deposits on foliage of *Picea pungens* and other conifers. *Am. J. Bot.* 58, 681-687.
- Hansen, JK, Larsen, JB, 2004. European silver fir (*Abies alba* Mill.) provenances from Calabria, southern Italy: 15-year results from Danish provenance field trials. *Eur. J. For. Res.* 123, 127-138.
- Hansen, OK, Kjaer, ED, Vendramin, GG, 2005. Chloroplast microsatellite variation in *Abies nordmanniana* and simulation of causes for low differentiation among populations. *Tree Genet. Genomes.* 1, 116-123.
- Harrison, RG, 1990. Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology.* 7, 69-128.
- Harrison, RG, 1993. Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford University Press, UK.
- Hennig, S, Barthlott, W, Meusel, I, Theisen, I, 1994. Mikromorphologie der epicuticularwaxse und die systematik der magnoliidae. Ranunculidae und hamamelididae. *Tropische und Subtropische Pflanzenwelt.* 90, 5-60.
- Herbin, GA, Sharma, K, 1969. Studies on plant cuticular waxes. V. The wax coatings of pine needles: a taxonomic survey. *Phytochemistry.* 8, 151-160.
- Herbin, GA, Robins, PA, 1968a. Studies on plant cuticular waxes—III. The leaf wax alkanes and  $\omega$ -hydroxy acids of some members of the Cupressaceae and Pinaceae. *Phytochemistry.* 7, 1325-1337.
- Herbin, GA, Robins, PA, 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.
- Hewitt, GM, 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 68, 87-112.
- Hewitt, GM, 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature.* 405, 907-913.

- Hijmans, RJ, Cameron, SE, Parra, JL, Jones, PG, Jarvis, A, 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* 25, 1965-1978.
- Hijmans, RJ, Guarino, L, Bussink, C, Mathur, P, Cruz, M, Barrentes, I, Rojas, E, 2012. DIVA-GIS 7.5. Gregor. Inf. Syst. Anal. Species Distrib. Data Man.
- Holloway, PJ, 1982. Structure and histochemistry of plant epicuticular membranes: an overview, in: Cutler, DF, Alvin, KL, Price, CE, (Eds.), *The Plant Cuticle*. Academic Press, London, New York, 1-32.
- Holloway, PJ, 1984. Surface lipids of plants and animals. in: Mangold, HK, Zweig, G, Sherma, J, (Eds.), *CRC handbook of chromatography. Lipids*. Boca Raton, FL: CRC Press, 347-380.
- Holloway, PJ, 1994. Plant cuticles: physicochemical characteristics and biosynthesis, in: Percy, KE, Cape, JN, Jagels, R, Simpson, CJ, (Eds.), *Air Pollution and the Leaf Cuticle*. Springer, New York, 1-13.
- Horvat, I, Glavac, V, Ellenberg, H, 1974. *Vegetation Südosteuropas: Geobotanica Selecta 4*. G. Fischer-Verlag, Stuttgart.
- Huttunen, S, Laine, K, 1983. Effects of airborne pollutants on the surface wax structure of *Pinus sylvestris* needles. *Ann. Bot. Fenn.* 20, 79-86.
- Ivănescu, L, Toma, C, Zamfirache, MM, Galeş, RC, 2008. Some aspects concerning the interaction between needle surfaces and solid industrial pollutants. *Studia Universitatis "Vasile Goldiș", Seria Științele Vieții (Life Sciences Series)* 18, 275-280.
- Jagodziński, AM, Skorupski, M, Kasprowicz, M, Wojterska, M, Dobies, T, Kałucka, I, et al., 2011. Biodiversity of Greek fir (*Abies cephalonica* Loudon) experimental stands in Rogów Arboretum (Poland). *Acta Sci. Pol. Silv. Colendar. Rat. Ind. Lignar.* 10, 5-1.
- Jalas, J, Suominen, J, 1973. *Atlas florae Europaeae. 2 Gymnospermae (Pinaceae to Ephedraceae)* (Helsinki).
- Janeček V, Koblíha J, 2007. Spontaneous hybrids within the genus *Abies* – growth and development. *J. For. Sci.* 53, 193-203.

- Jasińska, A, Sękiewicz, K, Ok, T, Romo, A, Boratyński, A, Boratyńska, K, 2017. Taxonomic position of *Abies equi-trojani* on the basis of needle characters by comparison with different fir species. *Turk. J. Bot.* 41, 620-631.
- Jeffree, CE, 2006. The Fine structure of the plant cuticle, in: Riederer, M, Müller, C, (Eds.), Annual Plant Reviews Volume 23: Biology of the Plant Cuticle, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 11-125.
- Jeffree, CE, Johnson, RPC, Jarvis, PG, 1971. Epicuticular wax in the stomatal antechamber of Sitka spruce and its effects on the diffusion of water vapour and carbon dioxide. *Planta*, 98, 1-10.
- Jeffree, CE, Baker, EA, Holloway, PJ, 1975. Ultrastructure and recrystallization of plant epicuticular waxes. *New Phytol.* 75, 539-549.
- Jeffree, CE, Baker, EA, Holloway, PJ, 1976. Origins of the fine structure of plant epicuticular waxes, in: Dickinson, CH, Press, TF, (Eds.), Microbiology of Aerial Plant Surfaces, Academic Press, London, 119-158.
- Jetter, R, Kunst, L, Samuels, AL, 2006. Composition of plant cuticular waxes. In: Riederer, M, Müller, C, (Eds.), Biology of the Plant Cuticle. Annual Plant Reviews 23. Blackwell Publishers, 145-175.
- 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.
- Johnson, RPC, Jeffree, CE, 1970. Negative stain in wax tubes from the surface of Sitka spruce leaves. *Planta*. 95, 179-182.
- Jordanov, D, 1963. Flora Republicae Popularis Bulgaricae, Academiae Scientiarum Bulgaricae, Sofija, 1-9.
- Jovanović, B, 1992. *Abies* Mill., in: Sarić, M, (ed.), Flora Srbije 1. Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd, 200-202.
- Jović, N, 1973. Smeđa podzolasta zemljišta Srbije, njihova geneza i osobine. Glasnik Šumarskog Fakulteta, Beograd, 1-88.

- Kaya, Z, Skaggs, A, Neale, DB, 2008. Genetic differentiation of *Abies equi-trojani* (Asch. & Sint. ex Boiss) Mattf. populations from Kazdağ, Turkey and the genetic relationship between Turkish firs belonging to the *Abies nordmanniana* Spach complex. *Turk. J. Botany*, 32, 1-10.
- Kim, KW, Lee, IJ, Kim, CS, Lee, DK, Park, EW, 2011. Micromorphology of epicuticular waxes and epistomatal chambers of pine species by electron microscopy and white light scanning interferometry. *Microsc. Microanal.* 17, 118-124.
- Klaehn, FU, Winieski, JA, 1962. Interspecific hybridization in the genus *Abies*. *Silvae Genet.* 11, 130-142.
- Knapp, R, 1964. Die Vegetation von Kephallinia, Griechenland. Geobotanische untersuchung eines mediterranen Gebietes und einige ihrer anwendungsmöglichkeiten in Wirtschaft und Landesplanung. Number 29 in Geobotanische Mitteilungen. Geobotanisches Institut, Giessen.
- Koch, K, Barthlott, W, Koch, S, Hommes, A, Wandelt, K, Mamdouh, W, DeFeyter, S, Broekmann, P, 2006a. Structural analysis of wheat wax *Triticum aestivum* c.v. 'Naturastar' L.: from the molecular level to three dimensional crystals. *Planta.* 223, 258-270.
- Koch, K, Dommissie, A, Barthlott, W, 2006b. Chemistry and crystal growth of plant wax tubules of lotus *Nelumbo nucifera* and nasturtium *Tropaeolum majus* leaves on technical substrates. *Cryst. Growth Des.* 6, 2571-2578.
- Koch, K, Ensikat, HJ, 2008. The hydrophobic coatings of plant surfaces: Epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly. *Micron.* 39, 759-772.
- Koch, K, Bhushan, B, Barthlott, W, 2008. Diversity of structure, morphology and wetting of plant surfaces. *Soft Matter.* 4, 1943-1963.
- Kolattukudy, PE, 1980. Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science.* 208, 990-1000.
- Kolattukudy, PE, 2001. Polyesters in higher plants, in: Scheper, T, (ed.), *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, Springer, Berlin, 4-49.

- Kolb, B, Ettre, LS, 2006. Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice (2<sup>nd</sup> ed), Wiley-Interscience, New York.
- Kormutak, A, 1985. Study on species hybridization within the genus *Abies*. Acta dendrobiologica. VEDA, Bratislava.
- Koukos, PK, Papadopoulou, KI, Papagiannopoulos, AD, 2001. Essential oils of the twigs of some conifers grown in Greece. *Holz Roh Werkst.* 58, 437-438.
- Kovačević, N, 2004. Osnovi farmakognozije. Treće izdanje. Srpska školska knjiga, Beograd.
- Krajmerová, D, Paule, L, Zhelev, P, Voleková, M, Evtimov, I, Gagov, V, Gömöry, D, 2016. Natural hybridization in eastern-Mediterranean firs: The case of *Abies borisii-regis*. *Pl Biosyst.* 150, 1189-1199.
- Krajňáková, J, Gömöry, D, Häggman, H, 2014. Biotechnology tools for conservation of the biodiversity of European and Mediterranean *Abies* species, in: Ahuja, MR, Ramawat, KG, (Eds.), Biotechnology and biodiversity, Cham, Springer.
- Kunst, L, Samuels, AL, 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.
- Leibundgut, H, 1976. Die grössten fichten und tannen. Schweiz Zeit Forstwirtschaft, 127:427.
- Li, R, Luo, G, Meyers, PA, 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.
- Liepelt, S, Bialozyt, R, Ziegenhagen, B, 2002. Wind-dispersed pollen mediates postglacial gene flow among refugia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 14590-14594.
- 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.
- Linares, JC, 2011. Biogeography and evolution of *Abies* (Pinaceae) in the Mediterranean Basin: the roles of long-term climatic change and glacial refugia. *J. Biogeogr.* 38, 619-630.

- Litkowiec, M, Sękiewicz, S, Romoc, A, Ok, T, Dagher-Kharrat, MB, Jasińska, AK, et al., 2021. Biogeography and relationships of the *Abies* taxa from the mediterranean and central Europe regions as revealed by nuclear DNA markers and needle structural characters. *For. Ecol. Manage.* 479:118606.
- Liu, TS, 1971. A Monograph of the Genus *Abies*. Department Of Forestry. National Taiwan University, College of Agriculture (Taipei).
- López-Caamal, A, Tovar-Sánchez, E, 2014. Genetic, morphological, and chemical patterns of plant hybridization. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 87, 16.
- Maffei, M, 1996. Chemotaxonomic significance of leaf wax alkanes in the Compositae, in: Hind, DJN, Beentje, HJ, (Eds.), Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference. Vol. 1. Royal Botanic Gardens, Kew, 141-158.
- Maffei, M, Badino, S, Rossi, S, 2004. Chemotaxonomic significance of leaf wax n-alkanes in the Pinales (Coniferales). *J. Biol. Res. Thessalon.* 1, 3-19.
- Mallet, J, 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.* 20, 229-237.
- Marin, PD, 2003. Biohemijska i molekularna sistematika biljaka. NNK international, Beograd.
- Marinov, N, Nedjalkov, S, Naumov Z, 1961. Bukovite gori v Bulgarija. - Zemizdat, Sofija.
- Martin, DM, 2004. Functional characterization of nine Norway Spruce *TPS* genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the *TPS-ds* Subfamily. Focus issue on biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* 135, 1908-1927.
- Matas, AJ, Sanz, MJ, Heredia, A, 2003. Studies on the structure of the plant wax nonacosan-10-ol, the main component of epicuticular wax conifers. *Int. J. Biol. Macromol.* 33, 31-35.
- Matsenko, AE, 1964. Firs of the Eastern Hemisphere, in: Flora i Sistematika Vysshikh Rastenii, (Flora and Taxonomy of Higher Plants), Proceedings of V.L. Komarov Botanical Institute, Trudy Botanicheskogo Instituta im. V.L. Komarova, Naukaser, Moscow, 13, 3-103.
- Mattfeld, J, Bornmüller, J, Handel-Mazzetti, H, 1925. Zur Kenntnis der Formenkreise der europäischen und kleinasiatischen Tannen. Notizblatt des Botanischen Gartens und Museums zu Berlin-Dahlem, 229-246.

- Mattfeld, J, 1926. Die Europäischen und Mediterranen Abies Arten. *Die Pflanzenareale*. 1, 22-29 (in German).
- Mattfeld, J, 1930. Über hybridogene Sippen der Tanne. *Bibliotheca Botanica*, 100, 1-84 (in German).
- Mauri, A, de Rigo, D, Caudullo, G, 2016. *Abies alba* in Europe: distribution, habitat, usage and threats, in: San-Miguel-Ayanz, J, de Rigo, D, Caudullo, G, Houston Durrant, T, Mauri, A, (Eds.), *European Atlas of Forest Tree Species*. Publication Office of the European Union.
- Meusel, I, Neinhuis, C, Markstadter, C, Barthlott, W, 1999. Ultrastructure, chemical composition, and recrystallization of epicuticular waxes: transversely ridged rodlets. *Can. J. Bot.* 77, 706-720.
- Micevski, K, 1985. Flora na SR Makedonija, (1). Makedonska Akademija na Naukite i Umetnostite, Skopje, 1-152.
- Mitić, ZS, Jovanović, SC, Zlatković, BK, Nikolić, BM, Stojanović, GS, Marin, PD, 2017a. Needle terpenes as chemotaxonomic markers in *Pinus*: Subsections *Pinus* and *Pinaster*. *Chem. Biodivers.* 14, e1600453.
- Mitić, ZS, Zlatković, BK, Miljković, MS, Jovanović, SČ, Marin, PD, Stojanović, GS, 2017b. First insights into micromorphology of needle epicuticular waxes of south-eastern European *Pinus nigra* J. F. Arnold populations. *Iheringia. Sér. Bot.* 72, 373-379.
- Mitić, ZS, Zlatković, BK, Jovanović, SČ, Nikolić, JS, Nikolić, BM, Stojanović, GS, Marin, PD, 2018a. Diversity of needle *n*-alkanes, primary alcohols and diterpenes in Balkan and Carpathian native populations of *Pinus nigra* J.F. Arnold. *Biochem. Syst. Ecol.* 80, 46-54.
- Mitić, ZS, Nikolić, JS, Zlatković, BK, Milanovici, SJ, Jovanović, SČ, Nikolić, BM, Stojanović, GS, Marin, PD, 2018b. Epicuticular waxes provide insights into phytochemical differentiation of natural populations of *Pinus mugo* Turra sensu stricto. *Chem. Biodivers.* 15, e1800378.
- Mitić, ZS, Jovanović, SC, Zlatković, BK, Milanovici, SJ, Nikolić, BM, Petrović, GM, Stojanović, GS, Marin, PD, 2020. Variation of needle volatiles in native populations of *Pinus mugo* - evidence from multivariate statistical analysis. *Plant Biosyst.* 155, 700-710.

- Mitić, Z, Jovanović, S, Zlatković, B, 2020. Praktikum iz biohemijske sistematike biljaka. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu.
- Mitsopoulos, DJ, Panetsos, CP, 1987. Origin of variation in fir forests of Greece. *Silvae Genet.* 36, 1-15
- Mišić, V, 2006. Podsveza bukovo-jelovih šuma, in: Škorić, DM, Vasić, O, (Eds.), Vegetacija Srbije II, Šumske Zajednice 1. Srpska Akademija Nauka i Umetnosti, Beograd, 207-223.
- Mišić, V, Jovanović, B, 1983. Mešovita šuma bukve, jele i smrče (Piceeto-Abieti-Fagetum s.l.) u Srbiji i njen značaj. *Zaštita prirode*, Beograd, 36, 33-47.
- Mišić, V, Jovanović, S, Mijović, A, 1990. Ekološko-vegetacijske specifičnosti planine Željin u centralnoj Srbiji. *Arhiv bioloških nauka*, Beograd 43, 35-36.
- Mišić, V, Dinić, A. 2006. Šume smrče, in: Škorić, DM, Vasić, O, (Eds.), Vegetacija Srbije II, Šumske Zajednice 2. Srpska Akademija Nauke i Umetnosti, Beograd, 183.
- Moulalis, D, 1986. Diagnosis and characterization of fir hybrids. *Scientific annals of the Department of forestry and natural environment, Aristotle University of Thessaloniki*, 29, 371-404.
- Müller, C, 2006. Plant-insect interactions on cuticular surfaces, in: Riederer, M, Müller, C, (Eds.), *Biology of the Plant Cuticle. Annual Plant Reviews 23*. Blackwell Publishers, 306-392.
- Müller, C, Riederer, M, 2005. Plant surface properties in chemical ecology. *J. Chem. Eco.* 31, 2621-2651.
- Neubeller, J, 1990. Waxes and etheric oils in needles of *Abies* species. *Gartenbauwissenschaft*. 55, 55-59 (in German).
- Nikolić, B, Ristić, M, Tešević, V, Marin, PD, Bojović, S, 2011. Terpene chemodiversity of relict conifers *Picea omorika*, *Pinus heldreichii*, and *Pinus peuce*, endemic to Balkan. *Chem. Biodivers.* 8, 2247-2260.
- Nikolić, B, Tešević, V, Đorđević, I, Todosijević, M, Jadranine, M, Bojović, S, Marin, P, 2012. Population variability of nonacosan-10-ol and n-Alkanes in needle cuticular waxes of Macedonian pine (*Pinus peuce* Griseb.). *Chem. Biodivers.* 9, 1155-1165.



- Nikolić, B, Tešević, V, Bojović, S, Marin, PD, 2013. Chemotaxonomic implications of the n-alkane composition and the nonacosan-10-ol content in *Picea omorika*, *Pinus heldreichii*, and *Pinus peuce*. *Chem. Biodivers.* 10, 677-686
- Nikolić, BM, Mitić, ZS, Tešević, VV, Đorđević, IŽ, Todosijević, MM, Bojović, SR, Marin, PD, 2018. Chemotaxonomic considerations of the n-alkane composition in *Pinus heldreichii*, *P. nigra* and *P. peuce*. *Chem. Biodivers.* 15, e1800161.
- Nolte, AW, Tautz, D, 2010. Understanding the onset of hybrid speciation. *Trends Genet.* 26, 54-58.
- Oros, DR, Standley, LJ, Chena, X, Simoneita, BRT, 1999. Epicuticular wax compositions of predominant conifers of western North America. *Z. Naturforsch. C.* 54, 17-24.
- Palamarev, E, 1989. Paleobotanical evidences of the Tertiary history and origin of the Mediterranean sclerophyll dendroflora. *Plant Syst. Evol.* 162, 93-107.
- Panetsos, CP, 1975. Monograph of *Abies cephalonica* Loudon. *Annales Forestales, Anali za Sumarstvo*, Zagreb, 7, 1-22.
- Pignatti, S, 1982. *Flora d'Italia*, Edagricole, Bologna.
- Panetsos, KP, 1992. Variation in the position of resin canals in the needles of *Abies* species and provenances. *Ann. For. Sci.* 49, 253-260.
- Parducci, L, Szmidt, AE, Madaghiele, A, Andizei, M, Vendramin, GG, 2001. Genetic variation at chloroplast microsatellites (cpSSRs) in *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei and three neighboring *Abies* species. *Theor. Appl. Genet.* 102, 733-740.
- Petrakis, PV, 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.
- Pfündel, EE, Agati, G, Cerovic, ZG, 2006. Optical properties of plant surfaces, in: Riederer, M, Müller, C, (Eds.), *Biology of the Plant Cuticle. Annual Plant Review 3*. Blackwell Publishing, 216-239.
- Pichersky, E, Noel, JP, Dudareva, N, 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science.* 311, 808-811.

- Peveling, E, Burg, H, Tenberge, KB, 1992. Epiphytic algae and fungi on spruce needles. *Symbiosis*. 12, 173-187.
- Radkov, I, 1956. Tipologiĉeski izuĉavaniĉa na iglolisnite gori v Rila planina, BAN, Botaniĉeski institut, Sofija, 4-78.
- Raftoyannis, Y, Radoglou, K, 2001. Crown condition of a fir forest in Karpenisi, Central Greece, in: Proceedings International Conference Forest Research: a Challenge for an Integrated European Approach, NAGREF, Forest Research Institute, Thessaloniki, Greece, 27 August- 1 September, 317-320.
- Ramos, GQ. 2015. Análise morfológica e química das folhas de *Anacardium occidentale* L. Tese 105 f. Universidade Federal do Amapá, Pró-reitoria de pesquisa e Pós-graduação programa de Pós-graduação em ciências farmacêuticas. Macapá.
- Reale, S, Pace, L, D'Archivio, AA, De Angelis, F, Marcozzi, G, 2014. Volatiles fingerprint of *Artemisia umbelliformis* subsp. *eriantha* by headspace-solid phase microextraction GC-MS. *Nat. Prod. Res.* 28, 61-66.
- Reicosky, DA, Hanover, JW, 1978. Physiological effects of surface waxes. I. Light reflectance for glaucous and nonglaucous *Picea pungens*. *Plant Physiol.* 62, 101-104.
- Riedel, M, Eichner, A, Jetter, R, 2003. Slippery surfaces of carnivorous plants: composition of epicuticular wax crystals in *Nepenthes alata* Blanco pitchers. *Planta*. 218, 87-97.
- Rieseberg, LH, Carney, SE, 1998. Plant hybridization. *New Phytol.* 140, 599-624.
- Riding, RT, Percy, KE, 1985. Effects of SO<sub>2</sub> and other air pollutants on the morphology of epicuticular waxes in needles of *Pinus strobus* and *Pinus banksiana*. *New Phytol.* 99, 555-563.
- Riederer, M. 1989. The cuticles of conifers: structures, composition and transport properties, in: Schulze, ED, Lange, OL, Oren, R. (Eds.), *Ecological Studies*, Springer, Berlin, 157-192.
- Riederer, M, Schreiber, L, 1995. Waxes—the transport barriers of plant cuticles, in: Hamilton, RJ, (Ed.), *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*. The Oily Press, Dundee, Scotland, 131-156.

- Riederer, M, Markstädter, K, 1996. Cuticular waxes: a critical assessment of current knowledge, in: Kerstiens, G, (Ed.), *Plant Cuticles—An Integrated Functional Approach*. Bios Scientific Publishers, 189-198.
- Rieseberg, LH, Church, SA, Morjan, CL, 2003. Integration of populations and differentiation of species. *New Phytol.* 161, 59-69.
- Roberts, DR, 1970. Within-tree variation of monoterpene hydrocarbon composition of slash pine oleoresin. *Phytochemistry*, 9, 809-815.
- Rostaefar, A, Hassani, A, Sefidkon, F, 2017. Seasonal variations of essential oil content and composition in male and female plants of *Juniperus communis* L. ssp. *hemisphaerica* growing wild in Iran. *J. Essent. Oil Res.* 29, 357-360.
- Roussis, V, Couladis, M, Tzakou, O, Loukis, A, Petrakis, PV, Dukic, NM, Jancic, R, 2000. A comparative study on the needle volatile constituents of three *Abies* species grown in South Balkans. *J. Essent. Oil Res.* 12, 41-46.
- Roze, LV, Chanda, A, Linz, JE, 2011. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. *Fungal Genet. Biol.* 35-48.
- von Rudloff, E, 1959. The wax of leaves of *Picea pungens* Colorado spruce. *Can. J. Chem.* 37, 1038-1042.
- Sarić, MR, 1989. *Lekovite biljke SR Srbije*, Srpska Akademija Nauka i Umetnosti, Beograd.
- Samaras, D. 2012. The vegetation of Greek fir (*Abies cephalonica* Loudon) forests on the Oxia North Vardousia mountain system, central Greece, in relation to drought. Doctoral dissertation. Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau, Germany.
- Sánchez-Robles, JM, Balao, F, Terrab, A, García-Castaño, JL, Ortiz, MA, Vela, E, Talavera, S, 2014. Phylogeography of SW Mediterranean firs: Different European origins for the North African *Abies* species. *Mol. Phylogenet. Evol.* 79, 42-53.
- Satou, T, Matsuura, M, Murakami, S, Hayashi, S, Koike, K, 2009. Composition and seasonal variation of the essential oil from *Abies sachalinensis* from Hokkaido, Japan. *Nat. Prod. Commun.* 4, 845-848.

- Schneider, CA, Rasband, WS, Eliceiri, KW, 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of 16 image analysis. *Nat. Methods*. 9, 671-675.
- Schulze, ED, Lange, OL, Oren, R, 1989. Forest decline and air pollution. A study of spruce (*Picea alba*) on acid soils. *Ecological Studies* 77. Springer-Verlag, Berlin.
- Sękiewicz, K, Sękiewicz, M, Jasińska, AK, Boratyńska, K, Iszkuło, G, Romo, A, Boratyński, A, 2013. Morphological diversity and structure of West Mediterranean *Abies* species. *Plant Biosyst.* 147, 125-134.
- Semerikova, SA, Semerikov, VL, 2016. Phylogeny of firs (Genus *Abies*, Pinaceae) based on multilocus nuclear markers (AFLP). *Russ. J. Genet.* 52, 1164-1175.
- Scaltsoyiannes, A, Tsaktsira, M, Drouzas, AD, 1999. Allozyme differentiation in the Mediterranean firs (*Abies*, Pinaceae). A first comparative study with phylogenetic implications. *Plant Syst. Evol.* 216, 289-307.
- Schütt, P, 1994. Tannenarten Europas und Kleinasiens. Ecomed Verlagsgesellschaft (The fir species of Europe and Asia Minor), Landsberg am Lech, 132.
- Sharkey, TD, Singaas, EL, 1995. Why plants emit isoprene. *Nature*, 374, 769.
- Siegel, S, Castellan, NJ, 1988. Nonparametric statistics for the behavioral sciences, McGraw-Hill, New York.
- Siskas, E, Bella, E, Papageorgiou, AC, Kappas, I, Tsiripidis, I, Drouzas, AD, 2023. DNA-based identification of *Abies cephalonica*, *A. alba* and their hybrid (*A. x borisii-regis*) at the individual-level. *Plant Biosyst.* 157, 24-37.
- Stefanović, V, 1977. Fitocenologija sa pregledom šumskih fitocenoza Jugoslavije.- Svjetlost, Sarajevo.
- Terhürne-Berson, R, Litt, T, Cheddadi, R, 2004. The spread of *Abies* throughout Europe since the last glacial period: combined macrofossil and pollen data. *Veg. Hist. Archaeobot.* 13, 257-268.
- Tholl, D. 2006. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 297-304.

- Thompson, JD, 2005. Plant Evolution in the Mediterranean: Insights for Conservation (2<sup>nd</sup> ed). Oxford University Press.
- Tomaszewski, D, Zieliński, J, 2014. Epicuticular wax structures on stems and comparison between stems and leaves - a survey. *Flora* 209, 215-232.
- Tulloch, AP, 1981. Composition of epicuticular waxes from 28 genera of Gramineae: differences between subfamilies. *Can. J. Bot.* 59, 1213-1221.
- Tuomisto, H, 1988. Use of *Picea abies* needles as indicators of air pollution: epicuticular wax morphology. *Ann. Bot. Fenn.* 23, 351-364.
- Turrill, WB, 1937. XI-On the flora of the near east: XVIII. New species, new records and notes. *Kew Bull.* 2, 79-86.
- Van der Plas, LHW, Eijkelboom, C, Hagendoorn, MJM, 1995. Relation between primary and secondary metabolism in plant cell suspensions. *Plant Cell Tiss. Org.* 43, 111-116.
- Vidaković, M, 1991. Conifers, morphology and variation. Zagreb: Zdravko Zidovec.
- Voleková, M, Krajmerová, D, Paule, L, Zhelev, P, Gömöry, D, 2014. Natural hybridization in the genus *Abies*: II. Mitochondrial variation in the hybridogenous complex *Abies alba* – *A. borisii-regis* – *A. cephalonica*. *Folia Oecol.* 41, 100-105.
- Walton, TJ, 1990. Waxes, cutin and suberin, in: Harwood, JL, Bowyer, JR, (Eds.), Lipids, membranes and aspects of photobiology. Methods in plant biochemistry. Academic Press, London, 105-158.
- Wajs-Bonikowska, A, Sienkiewicz, M, Stobiecka, A, Maciąg, A, Szoka, Ł, Karna, E, 2015. Chemical composition and biological activity of *Abies alba* and *A. koreana* seed and cone essential oils and characterization of their seed hydrolates. *Chem. Biodiversity.* 12, 407-418.
- Wells, LG, Franich, RA, 1977. Morphology of epicuticular wax on primary needles of *Pinus radiata* seedling. *N. Z. J. Bot.* 15, 525-9.
- Xiang, X-G, Cao, M, Zhou, Z-K, 2007. Fossil history and modern distribution of the genus *Abies* (Pinaceae). *Front. For. China.* 2, 355-365.

- Xiang, Q-P, Xiang, Q-Y, Guo, Y-Y, Zhang, X-C, 2009. Phylogeny of *Abies* (Pinaceae) inferred from nrITS sequence data. *Taxon*, 58, 141-152.
- Xiang, Q-P, Wei, R, Shao, Y-Z., Yang, Z-Y, Wang, X-Q, 2015. Phylogenetic relationships, possible ancient hybridization, and biogeographic history of *Abies* (Pinaceae) based on data from nuclear, plastid, and mitochondrial genomes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 82, 1-14.
- Xiao, Y, Jiang, S, Cheng, Q, Wang, X, Yan, J, Zhang, R, et al., 2021. The genetic mechanism of heterosis utilization in maize improvement. *Genome Biol.* 22, 1-29.
- Xiao, Y, Jiang, S, Cheng, Q. et al. The genetic mechanism of heterosis utilization in maize improvement. *Genome Biol* 22, 148 (2021).
- Yamini, Y, Sefidkon, F, Pourmortazavi, SM, 2002. Comparison of essential oil of Iranian fennel (*Foeniculum vulgare*) obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Flavour Fragr. J.* 17, 345-348.
- Yang, S-A, Jeon, S-K, Lee, E-J, Im, N-K, Jhee, K-H, Lee, S-P, Lee, I-S, 2009. Radical scavenging activity of the essential oil of Silver fir (*Abies alba*). *J. Clin. Biochem. Nutr.* 44, 253-259.
- Yoshie, F, Sakai, A, 1985. Types of Florin rings, distributional patterns of epicuticular wax, and their relationships in the genus *Pinus*. *Can. J. Res.* 63, 2150-2158.

### Web reference

- Euro+Med, 2006. Euro+Med PlantBase- the information resource for EuroMediterranean plant diversity. Published on the Internet. Accessed date: February 2023. <https://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/>.
- The World Flora Online (WFO) 2023. Version 1.1. Published on the internet. Accessed date: February 2023. [www.worldfloraonline.org](http://www.worldfloraonline.org).

## **БИОГРАФИЈА СА БИБЛИОГРАФИЈОМ**

Јелена Николић је рођена 13.09.1993. године у Врању. Основну и средњу школу завршила је у родном граду, као носилац Вукове дипломе.

Природно-математички факултет у Нишу, Департман за биологију и екологију, уписала је школске 2012/2013. године. Након завршетка основних студија, на истом факултету уписала је мастер академске студије школске 2015/2016. године, које у предвиђеном року завршава са просечном оценом 9,5. Мастер тезу под називом „Образац варијабилности и диференцијација природних популација *Pinus tugo* Средње Европе и Балканског полуострва у односу на састав епикутуларних воскова“ одбранила је са оценом 10.

Докторске академске студије на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета у Нишу уписала је школске 2017/2018. Тренутно је на шестој години студија и положила је све испите предвиђене студијским програмом са просечном оценом 10,00 (десет). На Природно-математичком факултету у Нишу изабрана је у звање истраживач-приправник 16.05.2018. године, а у звање истраживач-сарадник 27.04.2021. године, за ужу научну област Ботаника.

Била је добитник стипендије Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије за студенте докторских академских студија. Као стипендиста учествовала је у реализацији пројекта „Микроморфолошка, фитохемијска и молекуларна истраживања биљака - систематски, еколошки и применљиви аспекти“ (бр. 173029) 2018. и 2019. године. На Природно-математичком факултету у Нишу била је ангажована за извођење практичне наставе на предметима Систематика и екологија лековитих биљака (од 2017/2018. до 2020/2021. године) и Биохемијска систематика биљака (2022/2023. године) на мастер академским студијама Биологија и Ботаника (2022/2023. године) на мастер академским студијама Хемија. Добитник је награде за највећи број објављених научних радова међу студентима докторских академских студија на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу за 2018. годину. Похађала је 12. Школу масене спектрометрије, 2023. године на Природно-математичком факултету у Нишу.

Објавила је 2 рада у врхунским међународним часописима, 3 рада у истакнутим међународним часописима, 1 рад у међународном часопису, 1 рад у часопису националног значаја, а поред тога, саопштила је 6 радова на међународним научним скуповима (радови су објављени у изводу). Категоризација радова вршена је према критеријумима



Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Радови под редним бројевима 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10 и 12 део су ове докторске дисертације.

#### Радови објављени у врхунским међународним часописима (M21)

1. Mitić Z.S., **Nikolić J.S.**, Jušković M.Z., Ranđelović V.N., Nikolić B.M., Zlatković B.K. (2023). Geographic differentiation of *Abies alba*, *A. x borisii-regis*, and *A. cephalonica* populations at the Balkan Peninsula based on needle morpho-anatomy. *Trees - Structure and Function*, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s00468-023-02436-y>
2. **Nikolić J.S.**, Zlatković B.K., Jovanović S.Č., Stojanović G.S., Marin P.D., Mitić Z.S. (2021). Needle volatiles as chemophenetic markers in differentiation of natural populations of *Abies alba*, *A. x borisii-regis*, and *A. cephalonica*. *Phytochemistry*, 183, 112612. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112612>

#### Радови објављени у истакнутом међународном часопису (M22)

3. Mitić Z.S., **Nikolić J.S.**, Dimitrijević I.S., Jevtović S.Č., Nikolić B.M., Zlatković B.K., Stojanović G.S. (2023). Cuticular wax variability of *Abies alba*, *A. x borisii-regis* and *A. cephalonica* from the Balkans: chemophenetic and ecological aspects. *Chemistry & Biodiversity*, 20, e202300553. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202300553>
4. Mitić Z.S., Stojanović-Radić Z., Jovanović S.Č., Cvetković V.J., **Nikolić J.S.**, Ickovski J.D., Mitrović T.Lj., Nikolić B.M., Zlatković B.K., Stojanović G.S. (2022). Essential oils of three Balkan *Abies* species: chemical profiles, antimicrobial activity and toxicity toward *Artemia salina* and *Drosophila melanogaster*. *Chemistry & Biodiversity*, 19, e202200235. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200235>
5. Mitić Z.S., **Nikolić J.S.**, Zlatković B.K., Milanovici S., Jovanović S.Č., Nikolić B.M., Stojanović G.S., Marin P.D. (2018). Epicuticular waxes provide insights into

phytochemical differentiation of natural populations of *Pinus mugo* Turra sensu stricto. Chemistry & Biodiversity, 15, e1800378.

<https://doi.org/10.1002/cbdv.201800378>

#### Рад објављен у међународном часопису (M23)

6. Mitić Z.S., Zlatković B.K., Jovanović S.Č., **Nikolić J.S.**, Nikolić B.M., Stojanović G.S., Marin P.D. (2018). Diversity of needle *n*-alkanes, primary alcohols and diterpenes in Balkan and Carpathian native populations of *Pinus nigra* J.F.Arnold. Biochemical Systematics and Ecology, 80, 46-54.

<https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.06.005>

#### Рад објављен у часопису националног значаја (M52)

7. **Nikolić J.S.**, Jovanović S.Č., Zlatković B.K., Stojanović G.S., Mitić Z.S. (2021) Variability of headspace volatiles in native population of *Abies x borisii-regis* from the central Rhodopes. Biologica Nyssana, 12, 23-32.

<http://journal.pmf.ni.ac.rs/bionys/index.php/bionys/article/view/391>

#### Радови саопштени на међународним скуповима објављени у изводу (M34)

8. **Nikolić J.**, Miljković M., Zlatković B., Nikolić B., Mitić Z. (2022) Structural changes of needle epicuticular waxes of *Abies cephalonica* in relation to natural weathering. 14th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Book of abstracts, Kladovo, Serbia, 24.
9. Mitić Z., Cvetković V., **Nikolić J.**, Jovanović S., Stojanović-Radić Z., Ickovski J., Nikolić B., Zlatković B., Stojanović G. (2022) Chemical profile, antimicrobial properties and toxicological evaluation of the essential oil of *Abies cephalonica* from Peloponnesus. 14th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Book of abstracts, Kladovo, Serbia, 138.

10. **Nikolić J.S.**, Jovanović S.Č., Zlatković B.K., Stojanović J.P., Stojanović G.S., Marin P.D., Mitić Z.S. (2020) Diversity of needle volatiles of native *Abies cephalonica* Loudon populations. IV Symposium of biologists and ecologists of Republic of Srpska, Book of abstracts, Banja Luka, Republic of Srpska, 49.
11. Stojanović J.P., Slavković A.B., **Nikolić J.S.**, Zlatković B.K., Mitić Z.S. (2020) Morphological variability of *Achillea millefolium* L. and *A. collina* (Becker ex Rechb.f.) Heimerl from Serbia. IV Symposium of biologists and ecologists of Republic of Srpska, Book of abstracts, Banja Luka, Republic of Srpska, 50.
12. **Nikolić J.**, Zlatković B., Jovanović S., Stojanović G., Marin P.D., Mitić Z. (2019) Needle volatiles as phytochemical markers in differentiation of natural populations of *Abies alba* and *A. x borisii-regis*. 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Book of abstracts, Stara planina, Serbia, 26.
13. Mitić Z.S., **Nikolić J.S.**, Zlatković B.K., Milovanović S.J., Jovanović S.Č., Nikolić B.M., Stojanović G.S., Marin P.D. (2018) Needle *n*-alkanes, primary alcohols and diterpenes: application to the analysis of population differentiation in *Pinus mugo* Turra. 7th Balkan Botanical Congress, Book of abstracts, Novi Sad, Serbia, 134.

## ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

### **МОРФО-АНАТОМСКА И ФИТОХЕМИЈСКА ВАРИЈАБИЛНОСТ РОДА *ABIES* MILL. (PINACEAE) НА БАЛКАНСКОМ ПОЛУОСТРВУ**

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 21.08.2023.

Потпис аутора дисертације:



Јелена С. Николић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**МОРФО-АНАТОМСКА И ФИТОХЕМИЈСКА ВАРИЈАБИЛНОСТ РОДА *ABIES*  
MILL. (PINACEAE) НА БАЛКАНСКОМ ПОЛУОСТРВУ**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 21.08.2023.

Потпис аутора дисертације:



Јелена С. Николић

## ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

### **МОРФО-АНАТОМСКА И ФИТОХЕМИЈСКА ВАРИЈАБИЛНОСТ РОДА *ABIES* MILL. (PINACEAE) НА БАЛКАНСКОМ ПОЛУОСТРВУ**

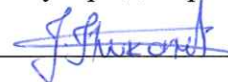
која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 21.08.2023.

Потпис аутора дисертације:



---

Јелена С. Николић