

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Vera B. Vidaković

**Sadržaj diarilheptanoida u kori crne  
(*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) i sive jove  
(*Alnus incana* (L.) Moench) kao indikator  
taksonomske i populacione  
varijabilnosti**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Vera B. Vidaković

**Content of diarylheptanoids in the bark  
of black (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.)  
and grey alder (*Alnus incana* (L.)  
Moench) as an indicator of taxonomic  
and population variability**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

**KOMISIJA:**

---

**Dr Srdan Bojović**, naučni savetnik Instituta za  
biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u  
Beogradu; **Mentor**

---

**Dr Vele Tešević**, vanredni profesor Hemijskog  
fakulteta Univerziteta u Beogradu; **Mentor**

---

**Dr Zorica Popović**, viši naučni saradnik Instituta za  
biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u  
Beogradu

---

**Dr Miroslav Novaković**, naučni saradnik Centra za  
hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju  
Univerziteta u Beogradu

---

**Dr Ljubodrag Vujisić**, docent Hemijskog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

---

**Dr Petar D. Marin**, redovni profesor Biološkog  
fakulteta Univerziteta u Beogradu

**Datum odbrane:**

Beograd, \_\_\_\_\_

Ova doktorska disertacija je urađena na Odeljenju za ekologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i na Odeljenju za instrumentalnu analizu pri Katedri za organsku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Najiskrenije se zahvaljujem mentorima, **dr Srđanu Bojoviću**, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i **dr Veletu Teševiću**, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na pruženoj šansi, ukazanom poverenju, prenesenom znanju i nesebičnoj podršci u svim fazama izrade ove disertacije.

**Dr Zorici Popović**, višem naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, zahvaljujem se na prenesenom znanju iz ekofiziologije, ekspeditivnosti prilikom čitanja teze i izuzetno korisnim sugestijama koje su učinile ovu tezu mnogo boljom.

Veliku zahvalnost želim da izrazim **dr Miroslavu Novakoviću**, naučnom saradniku Centra za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu, koji je u koordinaciji sa mentorima učestvovao u odabiru teme za ovaj rad. Miroslavu veliko hvala i na nesebičnoj pomoći, uvek prisutnoj podršci i prenesenom znanju prilikom eksperimentalnog rada, kao i na vedrom duhu, druženju i razgovorima koji su me obogatili.

**Dr Ljubodragu Vujisiću**, docentu Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, zahvaljujem se na korisnim savetima i pomoći u oblikovanju doktorske disertacije.

**Dr Petru D. Marinu**, redovnom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, zahvaljujem se na kritičkom sagledavanju teksta teze, korisnim sugestijama u cilju njegovog poboljšanja i velikoj podršci koju je iskazao.

Svim članovima komisije veliko hvala na sugestijama i predusretljivosti.

Želim da izrazim posebnu zahvalnost kolegincama iz Odeljenja za ekologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“:

**dr Mileni Stefanović**, naučnom saradniku, na pomoći u realizaciji geometrijske morfometrijske analize, velikoj podršci i druženju;

**dr Radi Matić**, višem naučnom saradniku, na pruženoj podršci i korisnim savetima prilikom pisanja naučnih radova;

**Milici Marković i Zorani Matarugi**, istraživačima saradnicima, na kolegijalnosti i veseloj atmosferi kojom ispunjavaju svaki radni dan.

Kolegi doktorantu Hemijskog fakulteta, **Milanu Jankoviću**, zahvaljujem se na prenesenom znanju i pomoći u tečno-masenoj analizi.

Zahvaljujem se **dr Milki Jadranić i svim kolegama iz Odeljenja za instrumentalnu analizu** Hemijskog fakulteta na pomoći prilikom eksperimentalnog rada.

Neizmerno hvala mom životnom sapatniku, **Borisu**, na strpljenju, ljubavi i podršci, mojoj **Mili** za jedan potpuno novi pogled na svet, **porodici i prijateljima**, što ste uvek uz mene.

**Sadržaj diarilheptanoida u kori crne (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) i sive jove  
(*Alnus incana* (L.) Moench) kao indikator taksonomske i populacione  
varijabilnosti**

**IZVOD**

Ovim istraživanjem obuhvaćene su dve populacije *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. (Prilički kiseljak i Rimski most) i dve populacije *Alnus incana* (L.) Moench (Golijaska reka i Sastavci) uzorkovane na planini Goliji. Osnovni ciljevi bili su: 1) ispitivanje varijabilnosti i odnosa populacija unutar i između vrsta u odnosu na koncentraciju diarilheptanoida u kori prirodnih populacija *A. glutinosa* i *A. incana*; 2) ispitivanje sezonske varijabilnosti diarilheptanoida u kori vrsta *A. glutinosa* i *A. incana*; 3) procena hemotaksonomskog značaja diarilheptanoida u ispitivanim vrstama; 4) procena mogućnosti primene diarilheptanoida u detekciji spontanih hibrida između *A. glutinosa* i *A. incana*; 5) ispitivanje varijabilnosti oblika, veličine i nervature lista u populacijama *A. glutinosa* i *A. incana*; 6) procena spontane hibridizacije između ove dve vrste na osnovu morfologije lista.

Koncentracija najzastupljenijih diarilheptanoida (hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozida, oregonina, hirsutanonola, alnuzida A, platifilozida i rubranozida A) u etanolnim ekstraktima kore ispitivanih populacija određena je pomoću UHPLC-MS/MS. Međupopulaciona varijabilnost koncentracije diarilheptanoida ispitana je pomoću parametarskih (ANOVA) i neparametarskih (Kruskal-Wallis) testova, analize glavne komponente (PCA) i diskriminantne analize (DA).

Prvi uvid u kvantitativnu distribuciju odabranih diarilheptanoida kod *A. glutinosa* i *A. incana* je procenjen na osnovu analize populacija Rimski most i Sastavci. DA je pokazala 100% diskriminacije između tri grupe individua koje je izdvojila PCA, na osnovu čega je postavljena hipoteza da je jedna grupa od četiri individue hibridogenog porekla. Diarilheptanoidi su se pokazali dobrim hemotaksonomskim markerima na interspecijskom nivou i utvrđena je njihova mogućnost primene u detekciji spontanih hibrida.

U narednoj vegetacijskoj sezoni, ispitana je sezonska, unutarpopulaciona, međupopulaciona i interspecijska varijabilnost koncentracije diarilheptanoida u dve geografski bliske (Rimski most i Sastavci) i dve relativno udaljene populacije crne i sive jove sa tipičnih staništa za svaku vrstu: Prilički kiseljak (*A. glutinosa*) i Golijska reka (*A. incana*). PCA je pokazala tendenciju jasnog međusobnog odvajanja grupa individua iz udaljenih populacija *A. glutinosa* i *A. incana* i preklapanja grupa individua iz geografski bliskih populacija ovih vrsta. Sve populacije su pokazale izrazit unutarpopulacioni varijabilitet, pri čemu je najheterogenija populacija Sastavci.

Sezonska varijabilnost diarilheptanoida u kori uzorkovanoj u junu 2015. i aprilu 2016. godine ispitana je u populacijama Rimski most i Sastavci. Većina diarilheptanoida bila je prisutna u većoj koncentraciji u uzorcima sa istog staništa iz juna. Ovi rezultati mogu ukazati na postojanje različitih plastičnih odgovora kod ispitivanih vrsta u različitim sezonama.

Geometrijskom morfometrijom je ispitana varijabilnost oblika lista u sve četiri populacije *Alnus* spp. PCA je pokazala kontinuum oblika listova, od oblika tipičnih za *A. glutinosa* do oblika tipičnih za *A. incana*, uz postojanje prelaznih oblika u oblasti preklapanja. Rezultati PCA ukazuju na morfološku bliskost listova vrsta *A. glutinosa* i *A. incana*, zatim na veliku varijabilnost i fenotipsku plastičnost individua u okviru populacija, kao i na verovatnoću postojanja hibrida. Potencijalni hibridi na koje je ukazala DA imaju intermedijarnu vrednost broja parova nerava (SN) između *A. glutinosa* i *A. incana*. Veličina lista, merena pomoću veličine centroida (CS), bila je značajno manja u populaciji Sastavci u odnosu na druge populacije; populacije *A. glutinosa* se nisu razlikovale prema SN i CS. Rezultati ukazuju na to da su alometrija lista, SN i CS relativno pouzdani indikatori delovanja sredinskih faktora.

**Ključne reči:** *Alnus glutinosa*, *Alnus incana*, Betulaceae, diarilheptanoidi, diverzitet, geometrijska morfometrija, hemotaksonomija, hibridizacija, morfologija, populaciona varijabilnost

**Naučna oblast:** Biohemija, Organska hemija prirodnih proizvoda

**Uža naučna oblast:** Fitohemija, morfologija i hemotaksonomija biljaka

**UDK broj:** 577.1:582.632.1(497.11)(043.3)

**Content of diarylheptanoids in the bark of black (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) and grey alder (*Alnus incana* (L.) Moench) as an indicator of taxonomic and population variability**

**ABSTRACT**

In this study, two populations of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. (Prilički kiseljak and Rimski most) and two populations of *Alnus incana* (L.) Moench (Golijska reka and Sastavci) were sampled on mountain Golijska with the aims to investigate: 1) variability and relations of populations within and among species based on the concentration of diarylheptanoids in the bark of natural populations of *A. glutinosa* and *A. incana*; 2) seasonal variability of diarylheptanoids in the bark of *A. glutinosa* and *A. incana*; 3) the reliability of diarylheptanoids as chemotaxonomic markers in the studied species; 4) the reliability of diarylheptanoids for the detection of spontaneous hybrids between *A. glutinosa* and *A. incana*; 5) variability of leaf shape, size and venation in the populations of *A. glutinosa* and *A. incana*; 6) spontaneous hybridization between the studied species based on leaf morphology.

Six diarylheptanoids (hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, oregonin, hirsutanonol, alnuside A, platyphylloside and rubranoside A) were quantified in bark ethanol extracts of four *Alnus* spp. populations by UHPLC-MS/MS. Interpopulation variability of diarylheptanoid concentration was investigated with ANOVA, Kruskal-Wallis test, principal component analysis (PCA) and discriminant analysis (DA).

Quantitative distribution of selected diarylheptanoids in the bark of *A. glutinosa* and *A. incana* was first analyzed in populations Rimski most and Sastavci. DA completely discriminates three groups of individuals that were implied by PCA. Based on the results, a hypothesis is proposed that the group of four individuals is of hybridogenic origin. Diarylheptanoids proved to be good chemotaxonomic markers at the interspecific level and may also reveal hybrid species.

In the next vegetation season, seasonal, within population, among population and interspecies variability of diarylheptanoid concentration were investigated in two geographically close (Rimski most and Sastavci), and two relatively distant populations

of black and grey alder sampled from the typical localities for the two species: Prilički kiseljak (*A. glutinosa*) and Golijska reka (*A. incana*). PCA shows clear separation of groups of individuals that belong to distant populations of *A. glutinosa* and *A. incana*, and partial overlapping of groups of individuals from geographically close populations Rimski most and Sastavci. All populations display pronounced intrapopulation variability. The most diversified is population Sastavci.

Seasonal variability of diarylheptanoid content was studied in the bark sampled from populations Rimski most (*A. glutinosa*) and Sastavci (*A. incana*) in two seasons (June 2015 and April 2016). The majority of diarylheptanoids are more abundant in samples collected in June than in April. These results may indicate different plastic responses of investigated species in different seasons.

The variability of leaf shape in four investigated alder populations was examined by geometric morphometry. PCA shows a continuum of leaf shapes between shapes typical for *A. glutinosa* and shapes typical for *A. incana*, with transitional shapes in the overlapping zone. These results implicate leaf morphological similarity of *A. glutinosa* i *A. incana*, great variability and phenotypic plasticity of individuals within populations and probable hybrid occurrence. Leaves from potential hybrid individuals indicated by DA have intermediate number of pairs of secondary leaf veins (SN) between *A. glutinosa* and *A. incana*. Leaf size was measured by centroid size (CS) which was significantly lower in population Sastavci (*A. incana*) compared to other populations; SN and CS did not show significant differences in populations of *A. glutinosa*. Leaf allometry, CS and SN seem to be good indicators of the influences of environmental factors.

**Key words:** *Alnus glutinosa*, *Alnus incana*, Betulaceae, diarylheptanoids, diversity, geometric morphometry, chemotaxonomy, hybridization, morphology, population variability

**Scientific field:** Biochemistry, Organic chemistry of natural products

**Scientific subfield:** Phytochemistry, morphology and plant chemotaxonomy

**UDC number:** 577.1:582.632.1(497.11)(043.3)



# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO.....	2
2.1. Područje istraživanja – planina Golija.....	2
2.2. Familija Betulaceae.....	3
2.2.1. Rod <i>Alnus</i> Mill. – jove.....	3
2.2.1.1. <i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gaertn. – crna jova.....	6
2.2.1.2. <i>Alnus incana</i> (L.) Moench – siva jova, bela jova.....	9
2.2.1.3. <i>Alnus × pubescens</i> Tausch – hibrid između crne i sive jove.....	13
2.3. Morfologija listova.....	14
2.4. Kora.....	15
2.5. Sekundarni metaboliti.....	16
2.5.1. Sekundarni metaboliti kore.....	18
2.6. Hemosistematika i hemotaksonomija.....	21
2.7. Diarilheptanoidi.....	22
2.7.1. Biološke aktivnosti i ekološki značaj diarilheptanoida.....	25
2.7.2. Biosinteza diarilheptanoida.....	27
2.8. Populaciono-hemijska istraživanja.....	28
3. CILJEVI RADA.....	31
4. MATERIJAL I METODE.....	32
4.1. Istraživane populacije <i>Alnus</i> spp.....	32
4.2. Hemijske analize.....	34
4.2.1. Analitički standardi i rastvarači.....	34
4.2.2. Priprema ekstrakata kore.....	35
4.2.3. Visokofikasna tečna hromatografija – tandemna masena spektrometrija (UHPLC-MS/MS).....	35

4.2.4. Statistička obrada podataka.....	39
4.3. Geometrijska morfometrija.....	39
4.3.1. Uzorkovanje listova i digitalizacija.....	39
4.3.2. Procena greške merenja.....	40
4.3.3. Statistička obrada podataka.....	43
5. NAŠI RADOVI .....	44
5.1. Hemovarijabilnost odabranih populacija crne i sive jove.....	44
5.1.1. Ispitivanje hemovarijabilnosti populacija <i>A. glutinosa</i> (Rimski most) i <i>A. incana</i> (Sastavci) uzorkovanih u junu 2015. godine – Rezultati.....	44
5.1.2. Ispitivanje hemovarijabilnosti populacija <i>A. glutinosa</i> (Rimski most) i <i>A. incana</i> (Sastavci) uzorkovanih u junu 2015. godine – Diskusija.....	49
5.1.3. Ispitivanje hemovarijabilnosti populacija <i>A. glutinosa</i> (Prilički kiseljak, Rimski most) i <i>A. incana</i> (Golijska reka, Sastavci) uzorkovanih u aprilu 2016. godine – Rezultati.....	51
5.1.3.1. Hemovarijabilnost udaljenih populacija <i>A. glutinosa</i> (Prilički kiseljak) i <i>A. incana</i> (Golijska reka).....	53
5.1.3.2. Hemovarijabilnost geografski bliskih populacija <i>A. glutinosa</i> (Rimski most) i <i>A. incana</i> (Sastavci).....	55
5.1.3.3. Intra- i interspecijska hemovarijabilnost <i>A. glutinosa</i> i <i>A. incana</i> .....	57
5.1.4. Ispitivanje hemovarijabilnosti populacija <i>A. glutinosa</i> (Prilički kiseljak, Rimski most) i <i>A. incana</i> (Golijska reka, Sastavci) uzorkovanih u aprilu 2016. godine – Diskusija.....	62
5.1.5. Ispitivanje sezonske varijabilnosti populacija <i>A. glutinosa</i> (Rimski most) i <i>A. incana</i> (Sastavci) uzorkovanih u junu 2015. i aprilu 2016. godine – Rezultati.....	64
5.1.6. Ispitivanje sezonske varijabilnosti populacija <i>A. glutinosa</i> (Rimski most) i <i>A. incana</i> (Sastavci) uzorkovanih u junu 2015. i aprilu 2016. godine – Diskusija.....	67
5.2. Varijabilnost listova odabranih populacija crne i sive jove.....	71

5.2.1. Ispitivanje intra- i interspecijske varijabilnosti listova <i>A. glutinosa</i> i <i>A. incana</i> – Rezultati .....	71
5.2.1.1. Varijabilnost oblika listova.....	71
5.2.1.2. Varijabilnost nervature lista .....	76
5.2.1.3. Varijabilnost veličine listova i alometrija.....	79
5.2.2. Ispitivanje intra- i interspecijske varijabilnosti listova <i>A. glutinosa</i> i <i>A. incana</i> – Diskusija.....	82
5.3. Diskusija .....	85
6. ZAKLJUČCI .....	91
LITERATURA.....	94
BIOGRAFIJA.....	117

# 1. UVOD

Područje Srbije pripada jednom od centara diverziteta dendroflora (IUCN) u kome se razvijaju i šume reliktnih, endemičnih, ekonomski važnih (ili potencijalno važnih) i ugroženih šumskih vrsta, neponovljivih u vremenu i prostoru. Posebno bogate riznice predstavljaju klisure, kanjonske doline i planinski masivi Srbije kakav je i Rezervat biosfere „Golija-Studenica“ (područje pod zaštitom Organizacije Ujedinjenih nacija za obrazovanje, nauku i kulturu – UNESCO). Upravo ovi refugijumi su omogućili očuvanje i reprodukciju bogate i raznovrsne flore, tercijarnih relikata i endemorelikata i predstavljaju prave *in vivo* muzeje od posebnog značaja za nauku. Populacije *Alnus* spp. (*A. glutinosa* i *A. incana*) koje naseljavaju ove prostore su pravi istraživački izazovi, jer su njihov hemijski sastav i reproduktivni potencijal još uvek malo poznati. Kvalitativni i kvantitativni hemijski sastav biljaka zavisi od genotipa i sredinskih uslova, pa je varijabilnost sekundarnog metabolizma na populacionom nivou odraz populacionog diverziteta. Sam populacioni diverzitet ima značajnu adaptivnu ulogu, a pored toga utiče i na diverzitet ekosistema, zbog čega su istraživanja populacione varijabilnosti hemijskih karakteristika veoma aktuelna u oblasti fitohemije i hemijske ekologije.

## 2. OPŠTI DEO

### 2.1. Područje istraživanja – planina Golija

Golija se nalazi na prostoru jugozapadne Srbije. Na severu je okružena planinom Jelicom, na zapadu Javorom, na istoku Kopaonikom, Čemernim i Radočelom, a na jugu Zlatarom, Jadovnikom i visoravni Pešter. Bogata je šumama, livadama, pašnjacima i vodama; ima veliki broj izvora, reka i potoka, a najznačajniji rečni tokovi su Moravica i Studenica. Na planini se javljaju lišćarske, lišćarsko-četinarske i četinarske fitocenoze. Na vertikalnom profilu smenjuju se pojasevi hrastovih, bukovih, mešovitih šuma bukve, jele i smrče, i smrčevih šuma koje se nalaze na najvišem delu planine. Floristički biodiverzitet Golije obuhvata oko 1100 taksona, što čini oko 20% biljnih vrsta zastupljenih u Srbiji. Planinu odlikuje refugijalni karakter staništa u kome su opstale brojne reliktno vrste. Jedna od najznačajnijih vrsta je planinski javor, *Acer heldreichii*, endemit Balkanskog poluostrva i tercijarni reliktno (Gajić 1989; Perović 2014; Sekulić i sar. 2014).

U zavisnosti od geografskog položaja, razuđenosti reljefa, nadmorske visine, vegetacije i drugih faktora, klima na Goliji je dosta raznolika i izdvajaju se tri klimatska rejon. Dolinsko-brdski rejon doseže do 700 m nadmorske visine, a karakteriše ga umereno kontinentalna klima koju modifikuje uticaj okolnih planina. Prelazni rejon, na visinama između 700 i 1300 m, karakterišu duge i oštre zime sa obilnim snežnim padavinama. Planinski rejon sa subalpskom klimom obuhvata prostore na nadmorskim visinama preko 1300 m, a odlikuju ga duge i oštre zime sa dosta snega i kratka prohladna leta. Ovakve klimatske karakteristike uslovljene su reljefom, eksponiranošću pojedinih površina, ali i položajem dinarskih visokoplaninskih venaca koji sprečavaju prodor tropskih vazdušnih masa sa Mediterana, pa je područje Golije izloženo pretežno severnim i severozapadnim strujama koje dospevaju iz srednje i severoistočne Evrope i Sibira (Gajić 1989; Milanović i Milovanović 2010).

Populacije jova se na Goliji mogu naći uz rečne tokove, gde imaju značajnu ulogu u zaštiti od spiranja zemljišta zahvaljujući razvijenom korenovom sistemu. Crna jova je prisutna u dolinsko-brdskoj zoni, u pojasu hrastova na nadmorskim visinama do

700 m, dok siva jova obrazuje fitocenoze u prelaznoj zoni, kao i fitocenoze sa smrčom u planinskoj zoni.

Goliju odlikuje bogatstvo i visok kvalitet vodnih resursa, šuma, poljoprivrednog zemljišta, lekovitog bilja i biljnog i životinjskog sveta uopšte. U cilju očuvanja prirodnih resursa, diverziteta i staništa biljnih i životinjskih zajednica, 2001. godine doneta je Uredba Vlade Republike Srbije kojom je područje planina Golije i Radočela stavljeno pod zaštitu kao Park prirode i svrstano u I kategoriju zaštite kao prirodno dobro od izuzetnog značaja („Službeni glasnik“ RS, broj 45/2001). Iste godine je deo Parka prirode „Golija“ odlukom Komisije UNESCO-a proglašen za Rezervat biosfere „Golija-Studenica“ prema programu MAB-a (Program „Čovek i biosfera“, eng. *Man and Biosphere*). Glavni cilj ovog programa je ostvarivanje održive ravnoteže između zaštite biološke raznovrsnosti, očuvanja kulturnih vrednosti i socio-ekonomskog razvoja.

## **2.2. Familija Betulaceae**

Familija Betulaceae pripada redu Fagales i obuhvata 120 – 150 vrsta listopadnog drveća i žbunja svrstanih u šest rodova i dve potfamilije koje čine jednu monofiletsku grupu: Betuloideae sa rodovima *Alnus* i *Betula*, i Coryloideae sa rodovima *Carpinus*, *Corylus*, *Ostrya* i *Ostryopsis*. Monofiletsko poreklo familije Betulaceae je utvrđeno na osnovu morfologije, anatomije drveta, embriologije, serologije i sličnosti u staništima rodova koji je sačinjavaju, a potvrđeno je molekularno-genetičkim metodama (Chen i sar. 1999; Grimm i Renner 2013). Geografsko rasprostranjenje vrsta iz ove familije je uglavnom na severnoj Zemljinoj hemisferi, sa nekoliko izuzetaka koji se mogu naći u Južnoj Americi. Smatra se da rodovi familije Betulaceae vode poreklo sa azijskog kontinenta, odakle su se raširili na ostale severne kontinente; danas je samo još rod *Ostryopsis* endemičan na području Kine. *Alnus glutinosa* je jedina vrsta iz familije Betulaceae koja se javlja i na teritoriji Afrike (Chen i sar. 1999).

### **2.2.1. Rod *Alnus* Mill. – jove**

U ovaj rod se svrstavaju jednodome drvenaste i žbunaste vrste prečnika stabla od 1 cm do 2 m čije grančice imaju karakteristično trouglast oblik srži. Kod većine vrsta

kora je glatka, ali kod nekih većih vrsta ispuca i dobije formu velikih ploča. Lišće je raspoređeno naizmenično na stabljikama i grančicama. Cvetanje je većinom pre listanja. Muške rese se formiraju u jesen, a ženske u jesen ili u proleće. Svaki priperak ženske rese nosi u pazuhu dva cveta. Dozrevanjem priperci odrvene i ostanu na osi nakon ispadanja plodova formirajući „šišaricu“. Plod je dvokrilna ili beskrilna spljoštena orašica (Furrow 1979; Jovanović 2007, 1970).

Rod *Alnus* obuhvata između 20 i 35 vrsta svrstanih u tri podroda: *Alnus*, *Clethropsis* i *Alnobetula*. Kriterijumi za razlikovanje podrodova su nervatura listova, morfologija pupoljaka i cvetova, izloženost ženskih resa u zimskim mesecima i sezona cvetanja i oprašivanja. Varijacije u morfologiji lista na inter- i intraspecijskom nivou pokazuju kontinuum, što otežava postavljanje jasnih granica između vrsta i dovodi do neslaganja autora oko broja vrsta jova. Osim toga, taksonomsku determinaciju otežava i postojanje interspecijske hibridizacije, zbog jedinki koje imaju prelazne odlike između roditeljskih vrsta (Furrow 1979; Heuvel 2011).

Jove najčešće rastu na vlažnim staništima – u vlažnim i poplavnim šumama, močvarama, pored reka i potoka, na nadmorskim visinama i do 2800 m. Vrste ovog roda se uglavnom oprašuju vetrom, retko insektima, dok se semena prenose vodenim tokovima na veće, i vetrom na manje razdaljine. Sve do sada opisane vrste imaju mogućnost stvaranja simbiotskih asocijacija sa bakterijom azotofiksatorom u vidu orašastih izraštaja (nodula) na korenju. Azotofiksator je aktinomiceta *Frankia alni*. Ona obezbeđuje biljci azot vezujući atmosferski azot u amonijak, dok od biljke koristi fotosintezom fiksiran ugljenik u formi glukoze. Ova simbioza omogućava biljci da kolonizuje staništa siromašna azotom. Jove su stoga pionirske vrste koje učestvuju u prvoj fazi sukcesije biljaka u razvoju biljne zajednice i na vlažnim i na suvim staništima, jer obogaćuju zemljište azotom i time obezbeđuju uslove za rast kasnijih sukcesivnih vrsta. Međutim, na staništima sa permanentno povoljnim uslovima za jove – pored potoka i reka, one postaju kompetitivne i mogu formirati klimatogene zajednice (Gömöry i Paule 2002; Heuvel 2011; Krstinić i sar. 2002).

Čovek od davnina upotrebljava jove, najviše za proizvodnju predmeta od drveta, štavljenje i bojenje kože. Kako jove rastu pored vode, prepoznat je njihov kvalitet posedovanja otpornosti prema vlazi. Tako su stari Grci i Rimljani koristili drvo jove u

brodogradnji, a srednjovekovni graditelji su veliki deo Venecije i Amsterdama podigli na stubovima od jovovih stabala. Drvo jova se koristi još u stolariji, u proizvodnji nameštaja, igračkaka, kutija, zatim drvenih đonova i klompi, a pulpa u proizvodnji papira. Grančice, kora i šišarice su korišćene za dobijanje crne boje (Furlow 1979).

Različite vrste roda *Alnus* su se kroz istoriju upotrebljavale i još uvek se koriste u narodnoj medicini. Čaj od kore i listova jova korišćen je u lečenju dijareje i hematurije, kao i stomatitisa i faringitisa u vidu sredstva za ispiranje usta (Furlow 1979). Starosedeooci ostrva Vankuver koriste tonik napravljen od kore *Alnus rubra* za prečišćavanje krvi, stomadne tegobe, ali i kao hranu (Turner i Hebda 1990). Kora *Alnus japonica* je popularni narodni lek za hepatitis i kancer u Koreji (Kim i sar. 2005). U indijskoj tradicionalnoj medicini, dekokt korena *Alnus nepalensis* se koristi za lečenje dijareje, dok se pasta napravljena od listova ove biljke nanosi na rane i posekotine kao hemostatik (Changkija 1999). Na severu Perua, listovi *Alnus acuminata* se koriste u lečenju reumatizma i kancera materice (Hammond i sar. 1998). Kora vrste *A. glutinosa* korišćena je u tretmanu otoka, reumatizma, upala u usnoj duplji i faringitisa, a poznata je i po svojim adstringentnim, alterativnim, emetičkim, purgativnim i hemostatičkim svojstvima (Sati i sar. 2011), dok je *A. incana* upotrebljavana u lečenju anemije, urinarnih problema, protiv unutrašnjeg krvarenja, kao emetik i u vidu obloga za bolna mesta na koži i za modrice (Quattrocchi 2012).

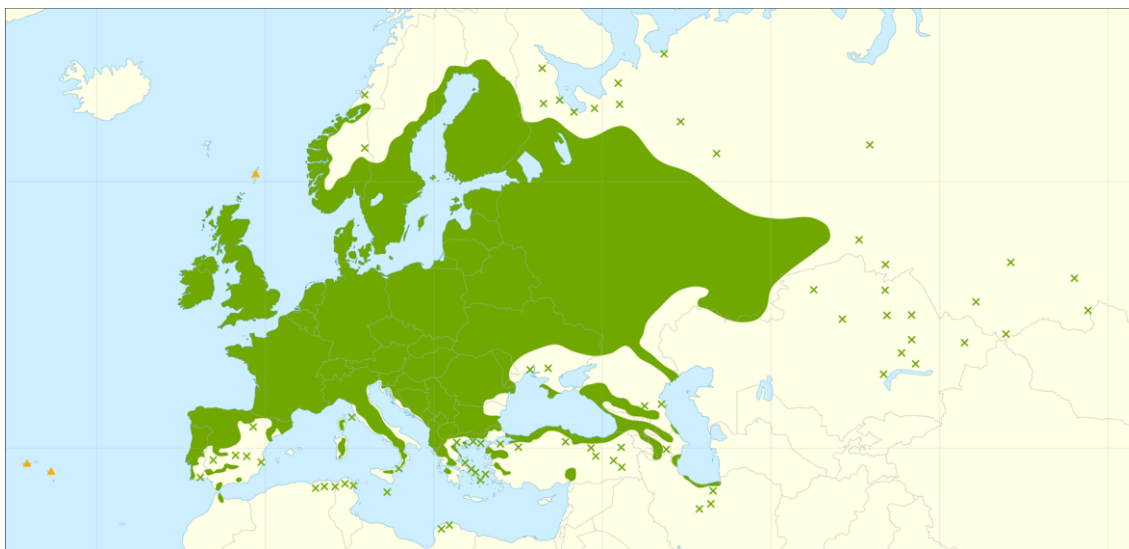
Biološka aktivnost u vezi je sa hemijskim sastavom i prisustvom aktivnih jedinjenja u različitim delovima biljaka. Fitohemijska ispitivanja utvrdila su zastupljenost diarilheptanoida, flavonoida, tanina, terpenoida, steroida i drugih sekundarnih metabolita u jovama (Sati i sar. 2011). Čista jedinjenja, kao i biljni ekstrakti iz kojih su izolovana, ispoljavaju širok spektar farmakoloških aktivnosti *in vitro* i *in vivo*, a neke od njih su: citotoksična, antimikrobna, antiadipogena, anti-inflamatorna, antioksidativna i hemoprotektivna aktivnost (Dinić i sar. 2014, 2015; Lai i sar. 2012; Li i sar. 2015; Martineau i sar. 2010; Novakovic i sar. 2017).

U Srbiji postoje tri autohtone vrste jova: *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *A. incana* (L.) Moench i *A. viridis* (Chaix) DC., kao i hibrid između *A. glutinosa* i *A. incana*, *Alnus* × *pubescens* Tausch (Jovanović 2007).



### 2.2.1.1. *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. – crna jova

Crna jova pripada evroazijskom flornom elementu. Ima široko rasprostranjenje – od centralne Skandinavije do severa Afrike, i od Irske pa sve do Sibira (**Slika 1**) (Jovanović 2007). Introdukovana je na kontinent Severne Amerike i sada prirodno raste u severoistočnom delu SAD i u Kanadi (Shaw i sar. 2014).

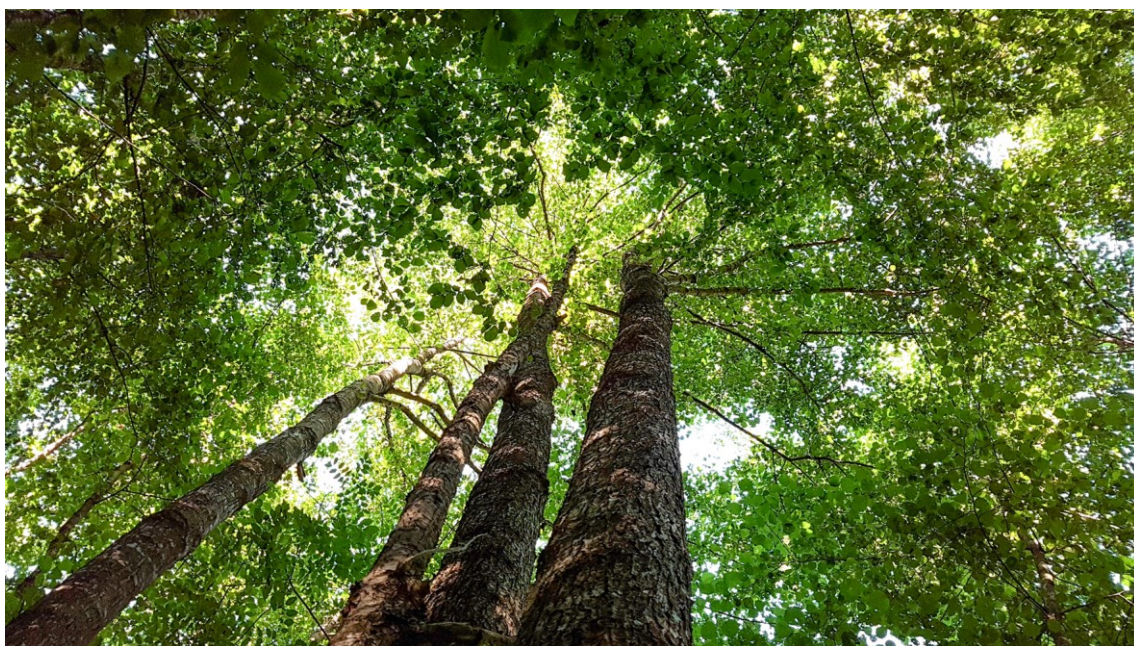


**Slika 1.** Rasprostranjenost crne jove: ■ prirodni areal; × izolovane populacije; ▲ introdukovane i naturalizovane populacije (Caudullo i sar. 2017).

Visinski, crna jova je nizijsko – ravničarska i brdska vrsta. Staništa crne jove u Srbiji nalaze se obično u pojasu hrastova, do 700 m nadmorske visine. Premda u Alpima i Karpatima ide i do 1230 m, najčešće zauzima nizine bogate vodom. Zemljište je uglavnom vrlo vlažno od izvorske ili podzemne vode, ili je redovno plavljeno. Trajno vlažno zemljište čini crnu jovu nezavisnom od klime (od atlantske do kontinentalne). Predstavlja vrstu polusenke i svetlosti (Jovanović 2007; Jovanović i sar. 1997).

Drvo crne jove dostiže visinu do 25 m. Ima vitko stablo koje se proteže pravo do vrha krošnje, sa horizontalno postavljenim granama koje su relativno tanke (**Slika 2**). Krošnja je jajasto-kupasta, umereno gusto lisnata. Koren ima veliku prilagodljivost zemljištu. Na suvim, plitkim, zbijenim zemljištima, koren se površinski plitko razvija, dok se kraj obala reka i potoka u vodu pružaju dugački tanki korenovi koji su pokriveni

mnogobrojnim bočnim žilama (**Slika 3**). Na njima su česte orašaste kvržice od azotofiksirajućih aktinomiceta. Kora je kod mladog stabla glatka, kasnije tamnosmeđa i ispucala u ljuspe (**Slika 4**). List je pri osnovi klinast, objajast, na vrhu zaobljen, tup ili usečen, po obodu prosto ili dvojno nazubljen, izuzev pri osnovi gde su mu cele ivice (**Slika 4**). Mlad list je s lica lepljiv, odakle i potiče latinski naziv biljke (glutinosus – lepljiv); u punoj zrelosti je go (s naličja dlakav u pazuhu nerava), širine 4 – 9 cm, dužine 5 – 10 cm, sa 1,5 – 2 cm dugom peteljkom. Cvetanje je rano, u februaru i martu, dve do pet nedelja pre listanja. Muške cvasti su formirane već u jesen, duge su 5 – 6 cm, viseće, po 3 – 4 u grozdu na debeloj dršci; ženske su jajaste, imaju izdužene drške, zrele u jesen i duge 1 – 2 cm (**Slika 5**). Plod je spljošten, opkoljen plutastim omotačem, dug 1 – 2 mm. Zri na jesen, ali ostaje u zatvorenim šišaricama do februara – marta, kada ispada i rasejava se po snegu, ledu i vodi (Jovanović 1970, 2007).



**Slika 2.** Crna jova – stablo i krošnja. Lokalitet: Rimski most, Kumanica. Autor: Boris Vezmar, 2017.



**Slika 3.** Crna jova – koren. Lokalitet: Bosa noga, Arilje. Autor: Boris Vezmar, 2017.



**Slika 4.** Kora i list crne jove. Autor: Boris Vezmar, 2017.



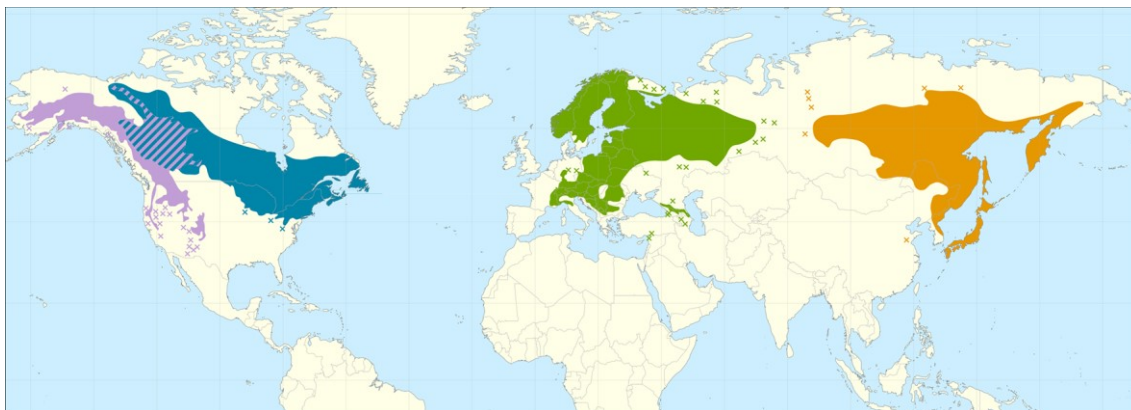
**Slika 5.** Muške cvasti (levo) i ženske šišarice (desno) crne jove. Autor: Boris Vezmar, 2017.

Drvo crne jove je osrednje tvrdo, elastično i male trajnosti, zbog čega se ne koristi u građevinskim konstrukcijama za koje je potrebna snaga. Pri stalnom dodiru sa vodom drvo postaje trajno, pa se upotrebljava u vodogradnji, rudarstvu i stolariji, kao i u proizvodnji posebne vrste papira. Kora crne jove koristi se za štavljenje i bojenje kože (Jovanović 1970).

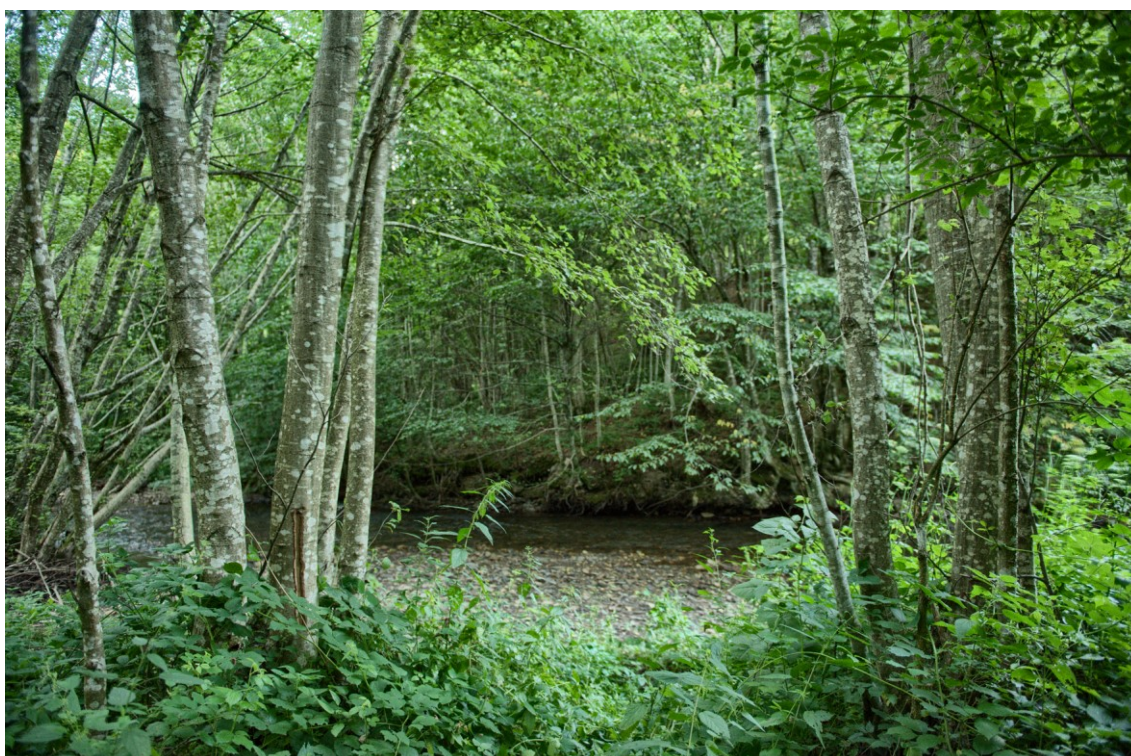
#### **2.2.1.2. *Alnus incana* (L.) Moench – siva jova, bela jova**

Siva jova pripada borealno-cirkumpolarnom flornom elementu, to je biljka hladnijih predela (Gajić 1989). Ova vrsta, sa svojim podvrstama, ima široko rasprostranjenje na severnoj hemisferi (**Slika 6**). Nalazi se na većim nadmorskim visinama od crne jove, od 500 do 1300 m, na Alpima i do 2000 m. Šuma sive jove (**Slika 7**) je najčešća pored rečica i potoka koji teku kroz smrčevu šumu, pa se uglavnom sreće u planinskom regionu bukve, jele i smrče. Manje je higrofilna od crne

jove – podnosi suvlje terene, a izbegava stagnirajuću vlagu (Jovanović 2007, 1970; Jovanović i sar. 1997).

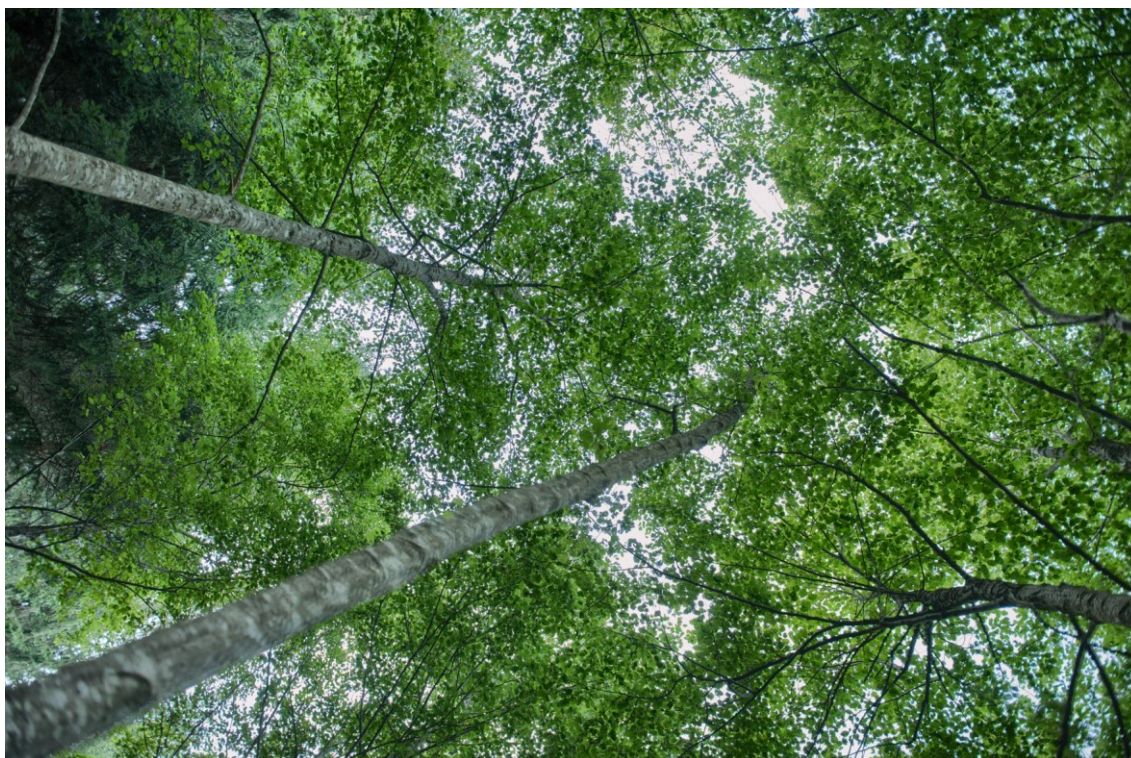


**Slika 6.** Rasprostranjenost sive jove: ■ *A. incana* subsp. *tenuifolia*; ■ *A. incana* subsp. *rugosa*; ■ *A. incana* subsp. *incana*; ■ *A. incana* subsp. *hirsuta* (Caudullo i sar. 2017).



**Slika 7.** Šuma sive jove. Lokalitet: Sastavci, Kumanica. Autor: Boris Vezmar, 2017.

Drvo sive jove je visine do 20 m (**Slika 8**). Habitus joj je sličan crnoj jovi, ali su joj grane uspravnije, a krošnja jajastog oblika i lisnatija, jer traži manje svetlosti. Ima pliće korenje od crne jove, razgranato i sa aktinomicetama. Kora joj je glatka, svetlo srebrnasto siva (**Slika 9**), odakle i potiče latinski naziv biljke (*incanus – siv, sed*); tek u velikoj starosti kora malo ispuca. List je jajasto-eliptičan, dvostruko testerast, sa široko klinastom bazom i zašiljenim vrhom, nije lepljiv, dužine 4 – 10 cm, širine 3 – 7 cm, na 1 – 3 cm dugoj peteljci (**Slika 9**). Lice lista je gotovo golo i tamnozeleno, a naličje sivozeleno i gusto dlakavo. Muške i ženske cvasti se javljaju u jesen, a cvetanje je pre listanja u martu. Muške cvasti su duge do 7 cm, sa izrazito žutim anterama; ženske su sedeće ili gotovo sedeće, sa vrlo kratkom drškom (**Slika 10**), za razliku od crne jove kod koje su sa jasnom drškom. Šišarice su duge oko 1 cm, elipsoidne, crno-smeđe. Plod je pljosnat, okruglast, opkoljen uskim plutastim kriocetom, zreo u oktobru (Jovanović 2007; Jovanović i sar. 1997).



**Slika 8.** Siva jova – stablo i krošnja. Lokalitet: Sastavci, Kumanica. Autor: Boris Vezmar, 2017.



**Slika 9.** Kora i list sive jove. Autor: Boris Vezmar, 2017.



**Slika 10.** Šišarice sive jove. Autor: Boris Vezmar, 2017.

Drvo je meko i, osim u vodi, malo trajno, pa je, slično crnoj jovi, našlo primenu u vodogradnji, rezbarstvu, proizvodnji alata, furnira, ali znatno manje od crne jove zbog slabijih mehaničkih i dekorativnih karakteristika. Osim toga, siva jova se upotrebljava za uspostavljanje šumskih plantaža na osiromašenom poljoprivrednom zemljištu, zbog brzog rasta i malih zahteva u pogledu produktivnosti zemljišta. Kora se koristi za bojenje kože i tkanine (Jovanović 1970; Voronova i sar. 2015).

I crna i siva jova su ekološki veoma značajne vrste. Ovo su jedine vaskularne vrste šumskih ekosistema u Evropi koje fiksiraju azot, obogaćujući tako zemljište. Imaju važnu ulogu i u sprečavanju erozije jer, zahvaljujući razvijenom korenovom sistemu, stabilizuju obale reka i pomažu u suzbijanju poplava. Osim toga, ove vrste deluju kao prečišćivači vazduha i voda, i doprinose biodiverzitetu šuma obezbeđujući stanište za floru i faunu na svojim nadzemnim i podzemnim delovima (Claessens i sar. 2010; Mejnartowicz 2008; Mikola i sar. 1983).

### **2.2.1.3. *Alnus × pubescens* Tausch – hibrid između crne i sive jove**

Hibridi između crne i sive jove često se mogu naći na mestima gde ove dve vrste rastu zajedno. Jedinke mogu imati prelazne karakteristike između oba roditelja, biti bliži jednom od roditelja, ili posedovati karakteristike koje se značajno razlikuju od oba roditelja. Hibride je u prirodnim populacijama teško determinisati, jer se na jednom stablu mogu ispoljiti karakteristike koje su obeležje oba roditelja: listovi na jednoj individui mogu imati liske tipične za *A. incana*, a u pazuhu nerava na naličju dlačice karakteristične za *A. glutinosa*; na istoj grani se mogu naći listovi koji po obliku liče na obe vrste. Jedna od svojstvenih karakteristika hibrida koju su našli Banaev i Bažant je broj parova nerava koji je intermedijaran između roditeljskih vrsta (9-10) (Banaev i Bažant 2007). Maljavost listova kod hibrida je takođe intermedijarno svojstvo (Gange 1995).

Hibridi crne i sive jove se retko javljaju u prirodi, najverovatnije zbog različitih perioda cvetanja dve vrste – siva jova cveta jednu do dve nedelje ranije u odnosu na crnu (Banaev i Bažant 2007; Prus-Gowacki i Mejnartowicz 1992). U prilog tome govori i zapažanje da hibridi sa nešto većom učestalošću nastaju u tzv. anomalističnim godinama koje karakterišu niske temperature u proleće, kada dolazi do preklapanja



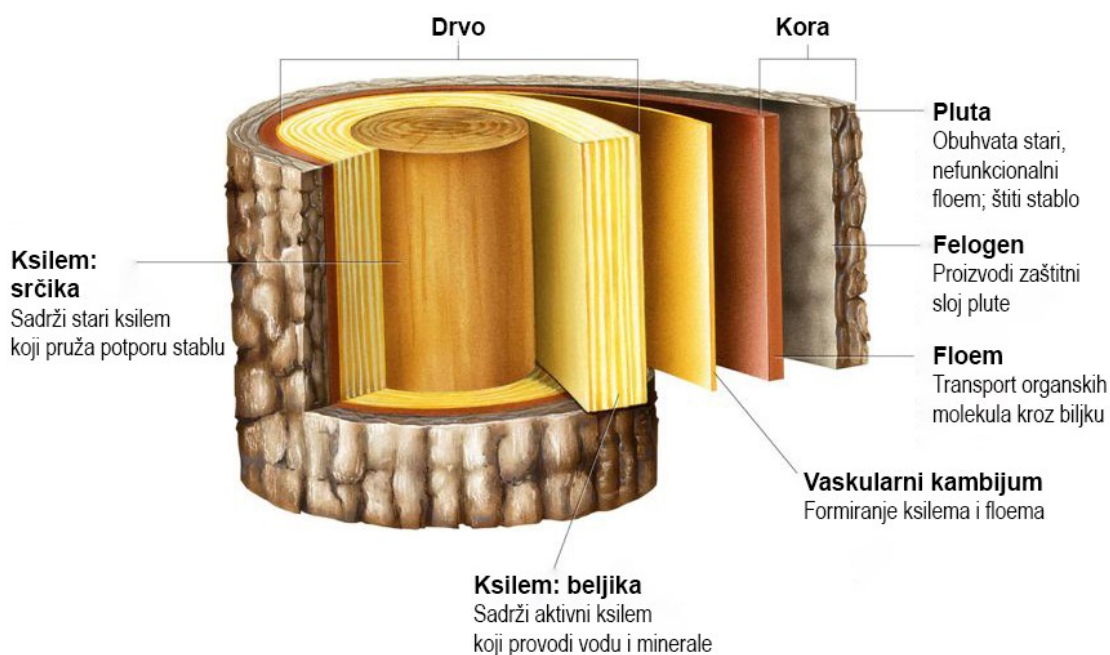
perioda cvetanja. Bez obzira na procenat hibrida u populacijama jova, oni su od značaja za biodiverzitet jer umnogome doprinose ukupnoj genetičkoj varijabilnosti ovih vrsta, između ostalog i zbog povratnog ukrštanja sa roditeljskim vrstama. Time je, međutim, otežana determinacija vrsta. Osim toga, prema nekim istraživanjima F1 hibridi ispoljavaju tzv. heterotični efekat, odnosno imaju bolje morfološke i fiziološke karakteristike od roditeljskih vrsta – brže rastu, drvo je boljih mehaničkih svojstava, dostižu veću visinu i veći prečnik stabla u odnosu na roditeljske vrste i imaju veću otpornost prema suši i prema parazitima iz roda *Pythium* koji izazivaju bolesti korena jova (Mejnartowicz 1999, 2008). U kontrolisanim eksperimentima (eng. *common garden experiments*) je pokazano da je hibridizacija uspješnija i heterotični efekat izraženiji kod hibrida u kojima je *A. incana* bila materinska biljka. U slučajevima kada je *A. glutinosa* materinska, dobijen je značajno manji broj fertilnih semena hibrida [Vaclav (1970) prema Mejnartowicz (1999)].

### 2.3. Morfologija listova

Morfologija listova ima značajnu ulogu u sistematici roda *Alnus* Mill. *sensu lato* (Banaev i Bažant 2007). Morfologija listova roda *Alnus* je detaljno proučavana tradicionalnom morfometrijom (Akbarian i sar. 2011; Banaev 2009; Banaev i Bažant 2007; Krauze-Michalska i Boratyńska 2013) koja je zasnovana na merenju distanci, odnosa i uglova, a svako pojedinačno merenje se smatra karakteristikom za sebe i predstavlja jednu varijablu. S druge strane, u geometrijskoj morfometriji oblik individue se opisuje konfiguracijom specifičnih tačaka koje predstavljaju multidimenzionalni set podataka pre nego skup više različitih varijabli (Zelditch i sar. 2012). Analize ovih konfiguracija su po prirodi multivarijacione i imaju veću moć u detekciji suptilnih razlika u morfologiji. Kvantitativne analize varijabilnosti bioloških oblika predstavljaju moćno sredstvo, a naročito su pogodne u ispitivanju morfologije kompleksa taksona koji se međusobno ukrštaju, kao što su *Alnus* spp. (Vander Mijnsbrugge 2015), *Quercus* spp. (Jensen i sar. 1993; Viscosi 2015; Viscosi i sar. 2009), *Acer* spp. (Jensen i sar. 2002), *Sorbus* spp. (Vít i sar. 2012) i *Crataegus* spp. (Piedra-Malagón i sar. 2016). Dodatna prednost ovih analiza je niska cena u odnosu na molekularno-genetičke markere koji imaju široku primenu u determinaciji taksona (Duminil i Michele 2009).

## 2.4. Kora

Kora obuhvata tkiva koja se nalaze sa spoljne strane vaskularnog kambijuma kod vaskularnih biljaka (**Slika 11**). Sastoji se od unutrašnje kore, koju najvećim delom čini floem, i spoljašnje kore koju čini peridermis. Kora ima značajnu ulogu u zaštiti od različitih spoljnih uticaja i u skladištenju i transportu organskih molekula.



**Slika 11.** Šematski prikaz građe stabla. Prilagođeno prema:

<https://slideplayer.com/slide/7401635/>.

Mlado stablo je prvobitno prekriveno epidermisom koji predstavlja primarno pokrovno tkivo najčešće izgrađeno od jednog sloja ćelija tankih ćelijskih zidova. Između epidermisa i floema nalazi se korteks. Kod drvenastih vrsta sa rastom dolazi do debljanja stabla i do pucanja epidermisa i korteksa, što unutrašnja tkiva izlaže riziku od infekcija i isušivanja. Pre pucanja epidermisa počinje da se stvara novo tkivo, peridermis. Glavni deo peridermisa je pluta. Ona nastaje tangencijalnom deobom ćelija felogena (plutinog kambijuma) ka površini organa. Vrlo često se felogen deli i ka unutrašnjosti organa, a novonastale ćelije, odvojene od felogena, grade posebno tkivo –

feloderm. Feloderm se sastoji od živih ćelija koje su slične ćelijama korteksa primarne kore. U definitivnom stanju ćelije plute su mrtve i ispunjene vazduhom. Zidovi plutinih ćelija sadrže suberin koji je nepropustljiv za vodu i gasove. Pluta tako štiti organe biljaka od isušivanja i od mehaničkih povreda. Na površini biljnih organa pokrivenih plutom nalaze se lenticule – otvori koji omogućavaju izmenu gasova sa spoljašnjom sredinom. Kod većine drvenastih biljaka, felogen se posle izvesnog vremena potpuno diferencira u plutu. Dediferenciranjem ćelija koje se nalaze znatno dublje nastaje novi felogen, koji tangencijalnim deobama ka površini ponovo daje ćelije plute, a proces oplutnjavanja i formiranja novog felogena se ponavlja. Svake godine felogen se sve dublje formira. Tkiva koja se nalaze iznad novoformirane plute izumiru, jer je pluta prekinula njihov kontakt sa tkivima koja sprovode vodu i hranljive materije. Na taj način se stvara mrtva kora, koja je nekada znatne debljine. Glavna uloga mrtve kore je u zaštiti stabla od mehaničkih oštećenja, patogena, herbivora, ekstremnih temperatura, odnosno isušivanja i mraza, i ostalih spoljnih uticaja (Kojić i sar. 2001; Pásztor i sar. 2016).

## **2.5. Sekundarni metaboliti**

Sekundarni metaboliti su proizvodi ćelijskog metabolizma biljaka koji imaju ulogu u zaštiti i odbrani, kao i u komunikaciji biljaka i spoljašnje sredine. Dok primarni metabolizam biljke obuhvata procese neophodne za rast i razvoj, sekundarni metabolizam je odgovoran za interakcije biljaka sa biotičkim i abiotičkim elementima njihove okoline i ima veliku ekološku ulogu u prilagođavanju i opstanku vrsta na staništima (Hartmann 2007).

Smatra se da je izolovanje morfina 1806. godine, aktivnog principa iz opijuma maka, od strane nemačkog farmaceuta Fridriha Vilhelma Zertirnera (Friedrich Wilhelm Sertürner) događaj koji je obeležio početak razvoja fitohemije kao naučne discipline koja se bavi proučavanjem sekundarnih metabolita biljaka (Hartmann 2007). Otkriće da se aktivni princip biljne droge može pripisati jednom hemijskom jedinjenju pokrenulo je razvoj hemije prirodnih proizvoda, što je u kratkom vremenu dovelo do izolovanja brojnih aktivnih principa i postavilo temelje za razvoj farmaceutske industrije. Dugo se, međutim, smatralo da ova jedinjenja nemaju nikakvu ulogu u biljci jer ne doprinose

„unutrašnjoj ekonomiji“ biljke, odnosno ne učestvuju u procesima rasta i razvoja, te da predstavljaju otpadne proizvode metabolizma ili detoksifikacije, zbog čega su nazvani sekundarnim metabolitima (sporednim u odnosu na primarne). Prvi su entomolozi, koji su se bavili proučavanjem interakcija između insekata i biljaka, prepoznali sekundarne metabolite kao posrednike ovih interakcija. Fraenkel (1959) je izneo hipotezu o adaptivnoj koevoluciji biljaka i insekata po kojoj su sekundarni metaboliti nastali kao sredstvo za odbijanje i privlačenje insekata i drugih životinja. U svom radu on ponovo otkriva eksperimente Štala još iz 1888. godine koji je izučavao hemijsku zaštitu biljaka od puževa. Štal je došao do zaključka da se pojavljivanje jedinjenja poput tanina, etarskih ulja i alkaloida može objasniti kroz uticaj koji ovi metaboliti biljaka ostvaruju na životinjski svet (Hartmann 2007). Ideja o ekološkoj funkciji sekundarnog metabolizma i njegovog nastanka pod selektivnim pritiskom okoline biljaka biva prepoznata i sve češće prihvaćena u naučnim krugovima tek šezdesetih godina XX veka, kada počinje da se razvija nova disciplina, hemijska ekologija.

Danas je opšteprihvaćeno gledište da sekundarni metaboliti reflektuju adaptivne karakteristike koje su razvijene putem prirodne selekcije tokom evolucije biljaka, u cilju zaštite od mikroorganizama, drugih biljaka i životinja. Osim toga, sekundarni metaboliti imaju ulogu i u privlačenju životinja u cilju oprašivanja i raznošenja semena (na primer, isparljivi monoterpeni iz etarskih ulja, ili obojeni antocijanini i karotenoidi u cvetovima), kao i u zaštiti od UV-zračenja (fenolna jedinjenja).

Osnovna svojstva sekundarnog metabolizma su velika plastičnost i diverzitet, koji obezbeđuju fleksibilnost biljkama prilikom adaptacije na okolinu koja se stalno menja (Hartmann 2007; Wink 2003). Kvalitativna i kvantitativna varijabilnost sekundarnih metabolita zapaža se na svim nivoima: između vrsta, populacija, individua i različitih delova biljke (Holeski i sar. 2012; Moore i sar. 2014). Unutar biljne vrste, sastav i količina sekundarnih metabolita varira u zavisnosti od tkiva, faze ontogenetskog razvića, starosti jedinke, indukcije herbivorima/patogenima, geografske lokacije populacije, kao i od dnevnih i godišnjih (sezonskih) ciklusa (Moore i sar. 2014). Hemijski fenotip jedinke je pod uticajem tri faktora: genotipa, sredine i njihove međusobne interakcije (Hamilton i sar. 2001). U kojoj meri će varijabilnost genotipa i sredine doprineti ukupnoj varijabilnosti fenotipa hemijskih karakteristika razlikovaće se

od vrste do vrste. Na primer, kod *Betula pubescens* ssp. *tortuosa* na koncentraciju fenolnih jedinjenja i kondenzovanih tanina najviše utiče sredina (fertilizacija zemljišta i senka), a znatno manje utiču genotip i oštećenje defolijacijom (Ruohomaki i sar. 1996), dok kod *Betula pendula* najznačajniji uticaj na varijabilnost 36 ispitanih sekundarnih metabolita ima genotip, a znatno manji uticaj imaju fertilizacija zemljišta i defolijacija (Keinänen i sar. 1999). Uticaj sredine manifestuje se kroz direktan uticaj na genotip – indukciju ili supresiju odgovarajućih gena, ali i kroz interakcije genotipa i sredine, što znači da će stepen indukcije/supresije varirati između različitih genotipova (Hamilton i sar. 2001). Ovaj dinamički odnos između genotipa i sredine određen je ekološkim faktorima i ima značajan uticaj na evoluciju.

Fenomen da jedan genotip može da ispolji niz različitih fenotipova u zavisnosti od sredine se naziva fenotipska plastičnost. Nastali fenotipovi biće pod uticajem sredinski zavisne selekcije, što će za rezultat imati različite brzine reprodukcije jedinki i promene u genotipu. Plastičnost bi trebalo da omogući zasnivanje populacije i preživljavanje jedinki u novoj sredini, ali od toga koliko je plastični odgovor blizak fenotipskom optimumu u datoj sredini zavisiće da li će doći do usmerene selekcije i do adaptivne divergencije između populacija (Ghalambor i sar. 2007; Weckwerth 2011).

### **2.5.1. Sekundarni metaboliti kore**

Hemijski sastav kore drveća obuhvata brojna jedinjenja. U kori se mogu naći terpenoidi, flavonoidi, lignani i neolignani, tanini, alkaloidi i mnogi drugi sekundarni metaboliti (Obst 1997). Fernandes i sar. (2011) su u pluti *Quercus suber* identifikovali 33 fenolna jedinjenja, većinom derivata galne i elaginske kiseline. U kori *Betula pubescens* prisutni su terpenoidi, ugljovodonici i njihovi epoksidi, etarska ulja, steroidi, tanini, flavonoidi, hidrosikumarini (Abyshev i sar. 2007). Iz kore *Alnus viridis* ssp. *viridis* izolovani su pentaciklični triterpenoidi, diarilheptanoidi i druga polifenolna jedinjenja (Novakovic i sar. 2017; Novaković i sar. 2014a). Pentaciklični triterpenoidi betulin, betulinska kiselina i betulon su identifikovani kao glavni antimikobakterijski konstituenti kore *A. incana* (Li i sar. 2015). Betulinska kiselina ispoljava snažno antitumorsko dejstvo indukujući apoptozu ćelija kancera (Patočka 2003). Preparati dobijeni od kore rogača, vrbe, hrasta, brešta i jasena se primenjuju kod raznih oboljenja. Ekstrakt kore vrste *Frangula alnus* ima antiviralno, antifungalno i laksativno dejstvo.

Dekokt od *Quercus robur* i *Q. petraea* korsiti se u lečenju upalnih procesa na koži i mukoznim membranama. Ekstrakt kore vrsta *Salix alba* i *S. fragilis* je dobar analgetik i antipiretik. Sekundarni metaboliti su u kori prisutni u relativno visokoj koncentraciji i često su specifični za određeni rod ili familiju, a mnogi se koriste i u savremenoj medicini. Jedno od prvih značajnih izolovanja iz kore bilo je izolovanje aktivnog sastojka kore *Salix* sp., salicina, početkom XIX veka (Mahdi 2010). Krajem XIX veka nemački hemičar Feliks Hofman zaposlen u farmaceutskoj kompaniji Bayer, sintetise acetilsalicilnu kiselinu koja se plasira na tržište kao aspirin, lek sa analgetskim, antipiretskim i anti-inflamatornim dejstvom. Iz kore *Taxus brevifolia* je izolovan diterpenoidni alkaloid taksol, koji se koristi u terapiji nekih vrsta kancera. Lek protiv malarije, kinin, izoluje se iz kore nekoliko vrsta roda *Cinchona*. Cimet, kamfor i još neki začini takođe se dobijaju iz kore drveta (Lev-Yadun 2011; Pásztorj i sar. 2016).

Na osnovu dosadašnjih istraživanja, kojih nema mnogo, mesto biosinteze sekundarnih metabolita u kori mogu biti floem (Ou i sar. 1988), parenhimske ćelije (Backhaus 1985), ćelije felogena (Vassão i sar. 2010), kao i specijalizovane parenhimske ćelije floema (PP ćelije) kod četinarara (Franceschi i sar. 1998). Do dubljih delova stabla – beljike i srčike, prenose se pomoću parenhimskih ćelija radijalnih zrakova (Barlow 2005), u kojima se takođe odvija i biosinteza nekih sekundarnih metabolita (Vassão i sar. 2010). Sekundarni metaboliti se često akumuliraju na mestu biosinteze, ali se u nekim slučajevima transportuju do udaljenih delova biljke putem ksliema, floema ili apoplasta (Wink 2010). Generalno se malo zna o transporterima i mehanizmima koji olakšavaju proces mobilizacije (Khatoon 2017).

Hemijska istraživanja kore biljaka pretežno su usredsređena na identifikaciju i izolovanje biološki aktivnih jedinjenja sa potencijalnom primenom u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (npr. Abedini i sar. 2016; Lauberts i sar. 2017; Mshvildadze i sar. 2007; Telysheva i sar. 2011; Yesil-Celiktas i sar. 2009). Kora se proučava i sa aspekta primene kao bioindikatora zagađivača iz vazduha (Berlizov i sar. 2007; Mandiwana i sar. 2006; Sawidis i sar. 2011). Ona dugo zadržava polutante, pa analiza teških metala akumuliranih u usecima kore nastalim prilikom oštećenja može dati istorijski pregled zagađenja vazduha u prošlosti (Bellis i sar. 2002; Conkova i Kubiznakova 2008). Poseban aspekt u bioindikaciji zagađenosti vazduha zauzima

izučavanje lišajeva i mahovina naseljenih na kori drveta (Berlizov i sar. 2007; Rühling i Tyler 1984). Lišajevi i mahovine ne poseduju kutikulu, pa većinu nutrijenata dobijaju kroz padavine i suve depozite. Osim toga, oni imaju veliki kapacitet katjonske izmene što im omogućava nagomilavanje znatnih količina teških metala između apoplasta i simplasta bez oštećenja vitalnih funkcija ćelija. Ispitivanjem crne topole (*Populus nigra*) utvrđeno je da kora ove vrste ima dobru moć akumulacije teških metala, uporedivu sa kapacitetom lišajeva, i da se može koristiti kao indikator zagađenja u slučaju nedostatka indikatorskih vrsta (Berlizov i sar. 2007).

Ispitivanja varijabilnosti sekundarnih metabolita u kori kod nas još uvek nisu rađena, ali interesovanje naučne javnosti za ovaj vid istraživanja postoji (Laitinen i sar. 2004; Liimatainen i sar. 2012; Vidaković i sar. 2018a, 2018b). Studije varijabilnosti hemijskih karakteristika kore su značajne jer mogu dati odgovore na mnoga ekološka pitanja. Fontoura i sar. (2015) su pokazali da stabla *Sterculia apetala* na kojima se gnezde hijacintne are (*Anodorhynchus hyacinthinus*) pokazuju veću varijabilnost i veću koncentraciju kumarina, triterpena i steroida u kori u odnosu na stabla bez gnezda, što povećava otpornost ovih stabala na gljivice iz roda *Trichoderma* i utiče na reproduktivni uspeh ara. Ova vrsta istraživanja je u većini slučajeva bazirana na ispitivanju genetički i sredinski uslovljene varijabilnosti u kontrolisanim eksperimentima (Laitinen i sar. 2005, 2004; Liimatainen i sar. 2012; Muilenburg i sar. 2011). Eksperimentalni pristup pokazuje određene prednosti zbog mogućnosti detekcije uzročno-posledičnih odnosa, ali se njime ne može predvideti prirodna varijabilnost odbrambenih jedinjenja, jer se frekvencija biljnih genotipova u eksperimentalnim uslovima razlikuje u odnosu na prirodne populacije, a u obzir se uzima samo jedan određeni set faktora čiji se uticaj ispituje. Kvalitativna i kvantitativna varijabilnost sekundarnih metabolita obezbeđuje simultanu otpornost na varijabilne sredinske uslove i različite herbivore i patogene. Ona može biti genetički uslovljena, kao rezultat selekcije određenih genotipova pod pritiskom okoline, a može biti i odraz fenotipske plastičnosti individua. Stoga je varijabilnost hemijskih karakteristika važna i za procenu mogućnosti adaptacije u različitim sredinama, a informacije dobijene ispitivanjem varijabilnosti mogu biti od velikog značaja za poljoprivredu i šumarstvo, gde je za gajene plantaže neophodno odabrati stabla koja će imati uspešan rast u novoj sredini. Crna jova se koristi u drvnjoj industriji, ali i u šumarstvu gde se gaji ili kao pionirska

vrsta u cilju obogaćivanja zemljišta azotom, ili u mešovitim plantažama sa drugim drvenastim vrstama koje u ovim zajednicama pokazuju bolji rast (Krstinic i sar. 2002). Za ovu vrstu primene postoje istraživanja i na sivoj jovi (Aosaar i Uri 2008; Uri i sar. 2003). Veća varijabilnost određenog seta karakteristika u populaciji pokazatelj je veće fenotipske plastičnosti njenih individua i time većih kapaciteta prilagođavanja na izmenjene uslove sredine (Lemke i sar. 2012).

## **2.6. Hemosistematika i hemotaksonomija**

Hemosistematika je naučna disciplina koja se bavi proučavanjem filogenetskih odnosa između organizama na osnovu distribucije hemijskih konstituenata, najčešće sekundarnih metabolita u slučaju biljaka, kroz sakupljanje saznanja o biosintezi ovih jedinjenja i funkciji koju imaju u fiziologiji i ekologiji biljaka (Reynolds 2007; Waterman 2007). Zasniva se na pretpostavci da sekundarni metaboliti određenog strukturnog tipa dele biosintetsko poreklo, te stoga reflektuju biološke veze između organizama koji ih proizvode. Hemosistematika i hemotaksonomija su termini koji se često upotrebljavaju kao sinonimi. Ipak, hemosistematika je širi pojam koji se odnosi na proučavanje evolutivne istorije i odnosa između organizama, dok se hemotaksonomija bavi njihovom klasifikacijom na osnovu hemijskih konstituenata. Razumljivo je da hemotaksonomija ima smisla samo ako se oslanja na hemosistematiku, zato što određena grupa hemijskih konstituenata nije uvek ograničena na filogenetski i taksonomski bliske organizme. Zabeleženi su brojni primeri da se jedna klasa sekundarnih metabolita pojavljuje u međusobno udaljenim taksonomskim grupama, što može biti rezultat ili konvergentne evolucije (proces nastanka sličnih karakteristika kod udaljenih organizama pod sličnim selektivnim pritiskom okoline) ili različite ekspresije gena: vrlo je verovatno da su u nekim slučajevima geni koji kodiraju enzime uključene u biosintezu sekundarnih metabolita određenog strukturnog tipa nastali rano tokom evolucije, ali da su u određenim filogenetskim linijama ostali neaktivni. Ti geni bi mogli ponovo biti eksprimirani u nekom kasnijem trenutku (Wink 2003).

Iako je sekvenciranje nuklearne i hloroplastne DNK, kao i RNK molekula dalo značajan doprinos izučavanju filogenije biljaka, ono ipak nije potisnulo hemotaksonomiju (Harborne 2000). Na prvom mestu, upotreba biljaka u ishrani čoveka

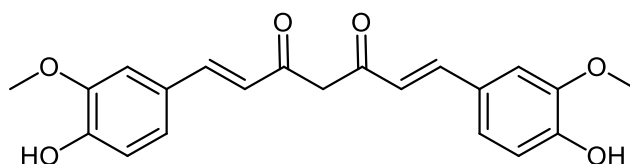


zavisi od njihovih hemijskih karakteristika, npr. prisustva antioksidanasa ili fiziološke aktivnosti alkaloida, ukoliko ih ima. Zatim, taksonomija i ekologija su blisko povezane discipline i poznavanje biljne hemije može da reši neka ekološka pitanja. Na primer, larve leptira *Euphydryas* mogu alternativno kao hranu da koriste biljke iz rodova *Plantago* (Plantaginaceae) i *Castilleja* (Scrophulariaceae). Larve nakupljaju iridoid-glukozide (katalpol i aukubin) prisutne u obe ove familije, koje odrasle jedinke koriste kao hemijsku zaštitu od ptica predatora (Harborne 2000). Sekundarni metaboliti mogu biti od pomoći na nižim nivoima klasifikacije. Primenom glikozilflavona i glikoksantona rešeno je hibridno poreklo nekih aloploidnih vrsta iz roda *Iris*, kada su se kariološke studije pokazale nedovoljne (Williams i sar. 1997). Konačno, sekundarni metaboliti su potencijalni izvori novih lekova u medicini, a takođe mogu dati smernice za sintezu novih jedinjenja slične strukture sa lekovitim svojstvima. Već je spomenut taksol koji je prvi put izolovan iz kore vrste *Taxus brevifolia* i koji se koristi u terapiji nekih vrsta kancera. Međutim, kako se taksol nalazi u unutrašnjoj kori, cela biljka je morala biti žrtvovana za dobijanje male količine aktivnog jedinjenja, što je pretilo da ugrozi vrstu. Fitohemijском analizom ustanovljeno je da se ovo jedinjenje javlja i u drugim vrstama iz roda *Taxus*, kao i da se u četinama *Taxus baccata* nalaze znatne količine njegovog prekursora, 10-deacetilbakatina III, te se taksol danas dobija semisintetski iz ovog prekursora (Harborne 2000). Iz navedenih primera može se videti veliki značaj koji hemotaksonomija još uvek ima. Svakako se najkompletniji podaci u određivanju filogenije biljaka mogu postići poređenjem makromolekulskih (DNK i RNK), mikromolekulskih (sekundarni metaboliti) i morfoloških karakteristika.

## 2.7. Diarilheptanoidi

Diarilheptanoidi su jedinjenja karakteristična za rod *Alnus*, kao i za ostale rodove familije Betulaceae. Javljaju se i u drugim familijama, ali je najviše predstavnika u familijama Betulaceae i Zingiberaceae (Claeson i sar. 2002). Prvi otkriveni diarilheptanoid bio je kurkumin iz rizoma biljke *Curcuma longa* (Zingiberaceae) koji se još početkom XIX veka spominje kao žuti pigment kurkume (Keserü i Nógrádi 1995). Čist preparat kurkumina dobijen je sredinom XIX veka, a struktura ovog jedinjenja je određena 1910. godine (Slika 12). Polovinom XX veka započela su istraživanja biološke aktivnosti kurkumina, ali pravo interesovanje istraživača raste tek krajem XX

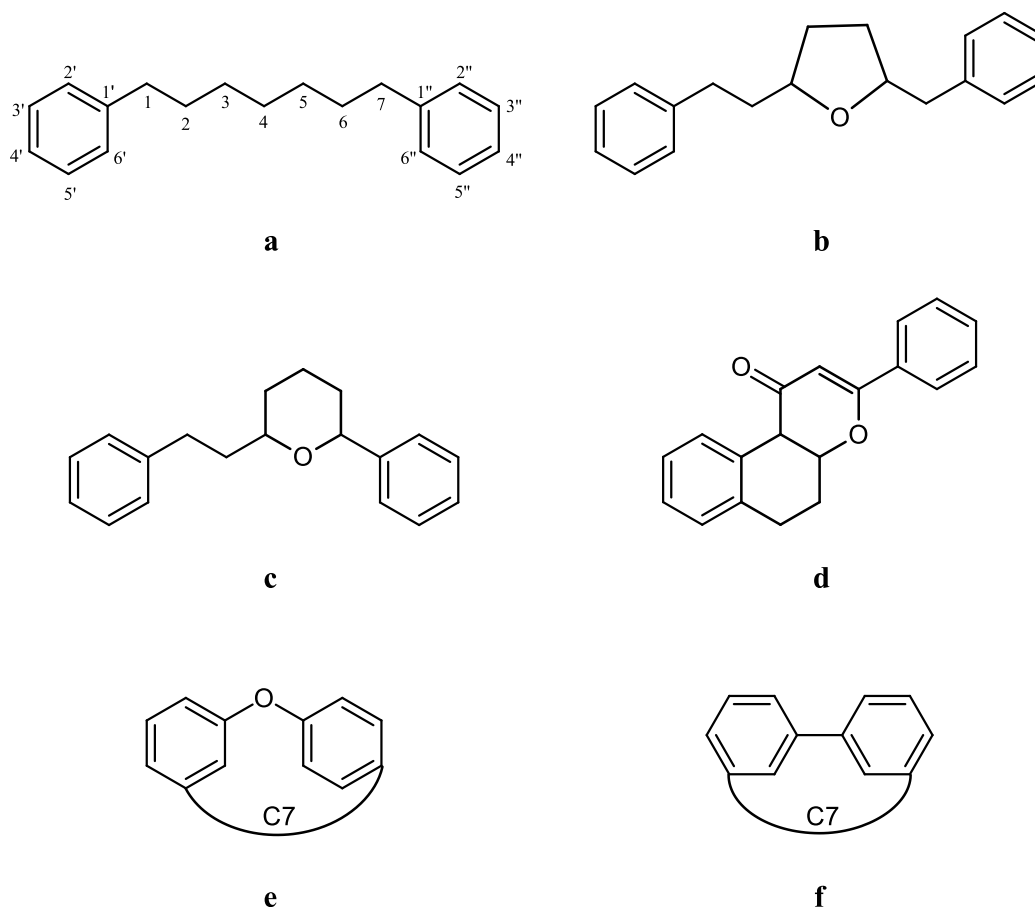
veka kada su otkrivena njegova antikancerogena svojstva; od tada do danas objavljeno je preko 4000 radova u kojima su dokazane brojne aktivnosti kurkumina, a neke od njih su antibakterijska, antiparazitska, anti-inflamatorna, antioksidativna, proapoptotska, antiproliferativna i hemoterapeutska aktivnost. Studije na životinjama su pokazale da bi kurkumin mogao biti aktivan protiv brojnih humanih oboljenja, kao što su dijabetes, neurološki i psihijatrijski poremećaji i kancer, kao i protiv hroničnih oboljenja jetre, bubrega, pluća, gastrointestinalnog i kardiovaskularnog sistema (Gupta i sar. 2012). Iako postoji sumnja u terapeutsku primenu kurkumina zbog njegove slabe apsorpcije u organizmu, brzog metabolizma i sistemske eliminacije, zbog brojnih bioloških aktivnosti koje ispoljava *in vitro* i na životinjskim modelima, interesovanje za ovo jedinjenje ne jenjava. Vrše se različita testiranja u cilju povećanja njegove apsorpcije i stabilnosti u organizmu. Tako su formulisani adjuvansi kurkumina i piperina koji značajno povećavaju serumsku koncentraciju kurkumina, a ispitivanja sa nanočesticama, micelama, lipozomima, fosfolipidnim kompleksima i strukturnim analogima takođe daju obećavajuće rezultate (Li i sar. 2005; Liu i sar. 2006; Ohori i sar. 2006; Shoba i sar. 1998; Suresh i Srinivasan 2007; Tiyaboonthai i sar. 2007).



**Slika 12.** Kurkumin.

Diarilheptanoidi u svojoj strukturi imaju 1,7-difenilheptanski skelet. Postoje linearni i ciklični predstavnici – ciklofani (**Slika 13**). Kod linearnih diarilheptanoida može doći do ciklizacije heptanskog lanca, pri čemu nastaju tetrahidrofuranski, tetrahidropiranski i neki složeniji strukturni tipovi (**Slika 13b-d**). Ciklofani nastaju povezivanjem aromatičnih prstenova na dva načina: preko kiseonika vezanog za neki od prstenova (**Slika 13e**) ili direktnim povezivanjem C-C vezama (**Slika 13f**). Zabeleženi su i primeri kompleksnih diarilheptanoida koji uz osnovni skelet sadrže vezan i neki

drugi molekul, npr. halkon, flavon ili fenolnu kiselinu (Lv i She 2012; Novaković 2014).



**Slika 13.** Osnovne strukture diarilheptanoida: **a)** linearni, **b)** tetrahidrofuranski, **c)** tetrahidropiranski, **d)** tetrahidronaftopiranski, **e)** *meta-para* difeniletri, **f)** *meta-meta* bifenili.

Diarilheptanoidi mogu biti raznovrsno supstituisani, što doprinosi njihovoj brojnosti i raznolikosti – preko 400 predstavnika ove grupe identifikovano je do sada (Lv i She 2012). Jedinjenja sa nesupstituisanim aromatičnim prstenovima su retka. Od supstituenata su, kod linearnih diarilheptanoida (**Slika 13a**), uobičajene hidroksilne i metoksi grupe, najčešće u pozicijama 3' i 4', odnosno 3'' i 4'' prstena, pri čemu C-4' i C-4'' hidroksilne grupe mogu biti acetilovane ili glikozilovane. Alifatični heptanski niz može biti ili zasićen, ili imati do tri dvostruke veze. Supstituenti se najčešće javljaju na

C-3 i/ili C-5 atomu alifatičnog niza. To su obično hidroksilna, karbonilna ili metoksi grupa, neka mono-, di- ili trisaharidna jedinica, kao i kombinacija monosaharida i fenolne kiseline (Alberti i sar. 2018; Novaković 2014).

Ova grupa sekundarnih metabolita predstavlja dobre kandidate za hemotaksonomske markere, zato što je rasprostranjenje određenih strukturnih tipova često ograničeno na pojedine rodove ili familije. Linearni diarilheptanoidi su rasprostranjeni u rodovima *Alnus*, *Betula* (Betulaceae), *Curcuma*, *Zingiber* i *Alpinia* (Zingiberaceae), dok su ciklični derivati karakteristični za rodove *Myrica* i *Morella* (Myricaceae), a javljaju se još u vrstama iz rodova *Acer* (Aceraceae), *Garuga* (Burseraceae), *Corylus*, *Betula*, *Carpinus* (Betulaceae) i *Juglans* (Juglandaceae) (Alberti i sar. 2018; Claeson i sar. 2002; Lv i She 2012; Silva i sar. 2015). Oregonin, najzastupljeniji diarilheptanoidni derivat u kori *A. glutinosa* i *A. incana*, do sada je identifikovan samo u rodovima *Alnus* i *Corylus* (Betulaceae) (Choi 2013; Riethmüller i sar. 2016), sa izuzetkom *Pinus flexilis* (Pinaceae) (Lee i sar. 1998). Kao što je već spomenuto u prethodnom odeljku, ovaj fenomen da se ista klasa jedinjenja javlja u taksonomski udaljenim grupama organizama može biti rezultat konvergentne evolucije ili diferencijalne ekspresije inače široko zastupljenih gena koji regulišu biosintezu nekog metabolita. Supstituenti na aromatičnom prstenu ili heptanskom lancu diarilheptanoida su u nekim slučajevima karakteristični za vrstu. Diarilheptanoidi iz kore *A. viridis* odlikuju se isključivo *p*-hidroksifenil aromatičnim grupama, dok ova jedinjenja iz kore *A. glutinosa* imaju bar jednu kateholSKU grupu, dok druga aromatična grupa može biti *p*-hidroksifenil ili kateholSKU (Novaković 2014). Osim toga, kore *A. glutinosa* i *A. incana* imaju sličan sastav diarilheptanoida (Martineau i sar. 2010; Novaković i sar. 2013; Telysheva i sar. 2011), dok je *A. viridis* po sastavu ovih jedinjenja bliža vrsti *Betula platyphylla* var. *japonica* (Novaković i sar. 2014a).

### **2.7.1. Biološke aktivnosti i ekološki značaj diarilheptanoida**

Popularnost kurkumina dovela je do intenzivnih ispitivanja drugih jedinjenja iz ove grupe prirodnih proizvoda i utvrđivanja njihovih bioloških aktivnosti. Oregonin, glavni diarilheptanoid u kori i listovima nekih vrsta jova (*A. glutinosa*, *A. formosana*, *A. incana*, *A. japonica*), ispoljava brojna farmakološka dejstva: anti-inflamatorno dejstvo, putem redukcije inflamacije, akumulacije lipida i produkcije reaktivnih kiseoničnih

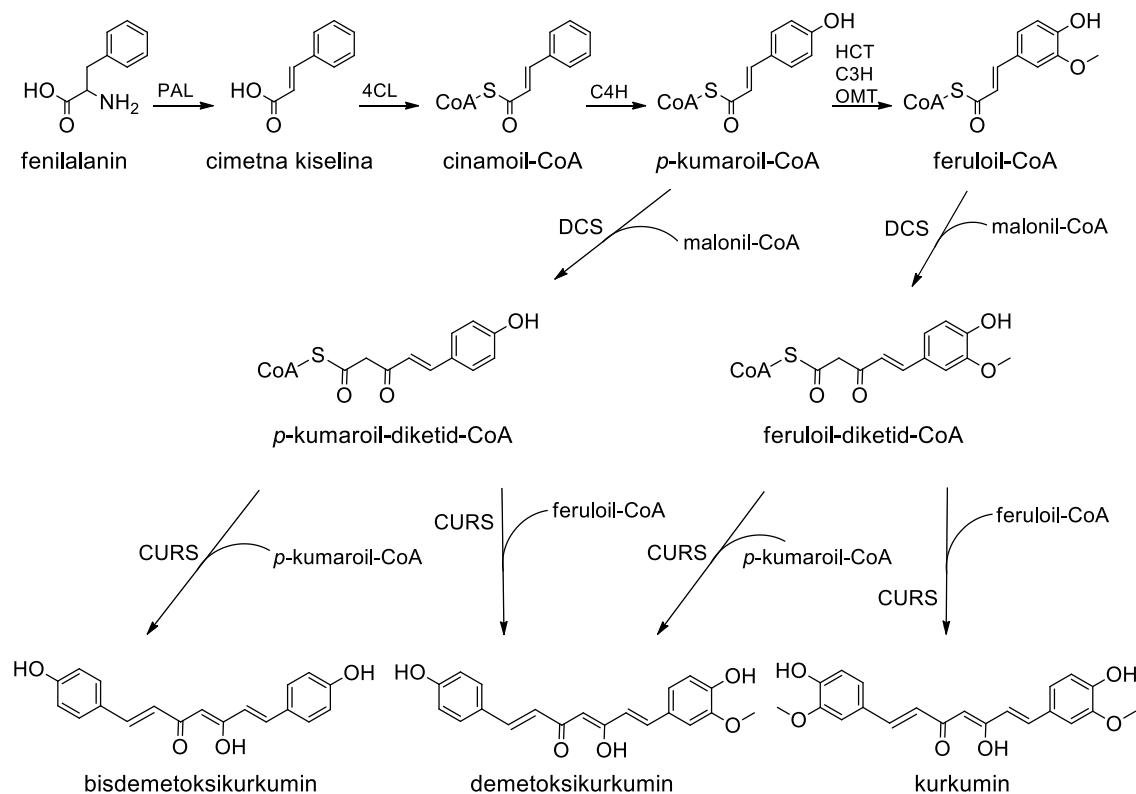
vrsta u primarnim humanim makrofagima koji prilikom zapaljenskih procesa učestvuju u formiranju aterosklerotičnih plaka (Lundqvist i sar. 2015); imunoregulatorno dejstvo prilikom tretmana atopičnog dermatitisa kod miševa preko smanjenja nivoa IgE antitela i eozinofila i inhibicije ekspresije inducibilne NO-sintaze (iNOS) i ciklooksigenaze-2 (COX-2) (Choi i sar. 2010); antitumorsko dejstvo i inhibiciju metastaze ćelija melanoma u miševima, aktivacijom NK ćelija koje su odgovorne za rani imuni odgovor (Joo i sar. 2002). Hirsutenon iz *A. japonica*, *A. hirsuta* i *A. glutinosa* je u studijama pokazao antivirusno dejstvo protiv virusa teškog akutnog respiratornog sindroma (SARS-a) preko inhibicije cistein proteaze neophodne za replikaciju virusa, zatim antiproliferativno i proapoptotsko dejstvo u humanim ćelijskim linijama leukemije preko aktivacije kaspaza (Uto i sar. 2015), kao i antiadipogeno dejstvo, vezivanjem za fosfatidilinozitol-3-kinazu (PI3K) i ekstraćelijski regulisanu kinazu (ERK) u ranoj fazi adipogeneze (Cheong i sar. 2015). Iz kore crne i zelene jove izolovani su diarilheptanoidi koji su pokazali citotoksičnu aktivnost prema ćelijskim linijama humanog nesitnoćelijskog karcinoma pluća (Novaković i sar. 2014b), protektivni efekat na DNK humanih limfocita (Novaković i sar. 2014a, 2013) i hemoprotektivni efekat prema normalnim humanim keratinocitima (Dinić i sar. 2015).

Iako su ekološke studije na diarilheptanoidima oskudne, na osnovu tradicionalne upotrebe biljnih delova bogatih ovim jedinjenjima, kao i na osnovu rezultata biomedicinskih istraživanja, može se pretpostaviti da imaju ulogu u hemijskoj odbrani biljaka od herbivora i patogena. Sunnerheim i sar. (1988) su pokazali da je za inhibitornu aktivnost grančica breze *B. pendula* na digestiju tečnosti rumena preživara *in vitro* zaslužan platifilozid. Kurkumin inhibira bakterijsku citokinezu tako što se vezuje za FtsZ proteine kod *Bacillus subtilis* i sprečava njihovu polimerizaciju (Rai i sar. 2008). FtsZ proteini, prokariotski analozi eukariotskom citoskeletnom proteinu tubulinu, esencijalni su za bakterijsku deobu i vijabilnost. Njihovom polimerizacijom nastaje Z-prsten na sredini ćelije koji dalje upravlja deobom. Kurkumin takođe ispoljava toksično dejstvo na neke gljivice povećanjem reaktivnih kiseoničnih vrsta i indukcijom apoptoze. On aktivira CaMCA1 gen u *Candida albicans*, koji je odgovoran za sintezu metakaspaze 1 – aktivatora apoptoze gljivičnih ćelija (Ansari i sar. 2013). Jove su pretežno biljke vlažnih staništa, te im je potrebna adekvatna zaštita od truljenja i mikroorganizama. Dirailheptanoidi iz kore crne i sive jove pokazali su antioksidativno

dejstvo prema DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> i superoksid anjon radikalima (Lauberts i sar. 2017; Telysheva i sar. 2011), a jedinjenja iz kore crne i zelene jove ispoljila su antibakterijsku aktivnost na vrste *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativne bakterije), *Streptosporangium longisporum* i *Bacillus subtilis* (Gram-pozitivne bakterije) i izrazitu antifungalnu aktivnost na *Fusarium equiseti*, *F. tricinctum*, *C. albicans* i *Saccharomyces cerevisiae* (Novaković i sar. 2015).

### 2.7.2. Biosinteza diarilheptanoida

Biosinteza diarilheptanoida je do sada proučavana jedino na primeru kurkuminoida. Oni su izvedeni iz fenilpropanoidnog biosintetskog puta od fenilalanina (Kita i sar. 2008). Dve fenilpropanoidne jedinice nastale u tom putu povezuju se C-atomom iz malonil-koenzima A, pri čemu nastaju kurkuminoidi. Pitanje supstitucije na aromatičnom prstenu ostaje donekle nerazjašnjeno. Eksperimenti Kita i sar. (2008) sa <sup>13</sup>C obeleženim fenilpropanoidnim prekursorima su pokazali da se cimetna kiselina mnogo efikasnije ugrađuje u kurkuminoide od *p*-kumarinske i ferulične kiseline, te je zaključak ovih autora bio da do inkorporacije hidroksilnih i metoksi funkcionalnih grupa dolazi verovatno nakon sinteze diarilheptanoidnog skeleta. Međutim, nešto kasnije su Katsuyama i sar. (2009) klonirali i okarakterisali dva nova enzima poliketid sintaze III iz kurkume: diketid-CoA sintazu (DCS) i kurkumin sintazu (CURS). DCS katalizuje formiranje diketidnog intermedijera kondenzacijom feruloil-CoA sa malonil-CoA, a CURS katalizuje sintezu kurkumina od nastalog diketidnog intermedijera i feruloil-CoA. Na osnovu ovih otkrića, Katsuyama i sar. (2009) su predložili biosintetski put kurkuminoida po kom osnovni skelet nastaje od *p*-kumaroil-CoA i feruloil-CoA (Slika 14).



**Slika 14.** Biosinteza diarilheptanoida. Enzimi: PAL, fenilalanin amonijum lijaza; 4CL, 4-kumarat:CoA ligaza; C4H, cinamat-4-hidroksilaza; HCT, hidroksicinamoil transferaza; C3H, cinamat-3-hidroksilaza; OMT, *O*-metiltransferaza; DCS, diketid-CoA sintaza; CURS, kurkumin sintaza.

## 2.8. Populaciono-hemijska istraživanja

Populaciono-hemijska istraživanja baziraju se na ispitivanju varijabilnosti sekundarnih metabolita na različitim taksonomskim nivoima. Ova ispitivanja značajna su za rasvetljavanje biogeografije, taksonomije, filogenije, evolucije i ekologije biljnih vrsta i populacija (Hunter i sar. 1996; Nikolić i sar. 2011), kao i za utvrđivanje sastava biološki aktivnih jedinjenja lekovitih biljnih vrsta različitog geografskog porekla.

Varijabilnost sastava sekundarnih metabolita može se ispoljiti između vrsta, populacija, individua i različitih delova biljke. Hemijski profil je ispitan kod velikog broja biljnih vrsta. Fitohemijska istraživanja su uglavnom fokusirana na karakterizaciju

novih, nepoznatih jedinjenja. Međutim, zbog velike varijabilnosti u sastavu i koncentraciji pojedinih biološki aktivnih jedinjenja u prirodnim populacijama, nameće se potreba detaljnijeg istraživanja populacija.

Sastav sekundarnih metabolita značajno utiče na farmakološko dejstvo lekovitog bilja, te se mora uzeti u obzir prilikom odabira varijeteta za gajenje, konzervaciju i farmakološke i kliničke studije. Na primer, u literaturi postoje oprečni podaci o biološkoj aktivnosti ginsenga. Ispitivanjem azijskog (*Panax ginseng*) i američkog ginsenga (*Panax quinquefolius*) utvrđeno je da je kod prvog dominantan ginsenzoid Rg1 koji utiče na aktivaciju angiogeneze i podstiče zarastanje rana, dok je kod drugog dominantan Rb1 koji inhibira angiogenezu i ispoljava antitumorsko svojstvo (Sengupta i sar. 2004). Schlag i McIntosh (2013) su zatim klasifikovali američki ginseng različitog porekla prema hemotipu, odnosno relativnom odnosu ginsenzoida Re i Rg1.

Ispitivanje hemovarijabilnosti doprinosi rešavanju taksonomskih problema na različitim hijerarhijskim nivoima. Analizom sastava etarskog ulja četina utvrđeno je geografsko poreklo populacija *Pinus nigra* u jugozapadnoj Evropi (Bojovic i sar. 2005) i postignuta je diferencijacija infraspecijskih taksona u Srbiji (Šarac i sar. 2013). Dve morfološki veoma slične vrste, *Cinnamomum micranthum* i *C. kanehirae*, mogu se razlikovati na osnovu hemijskih profila metanolnih ekstrakata listova (Wu i sar. 2017). Anderson i sar. (1970) su otkrili različitu raspodelu smonih kiselina u nekoliko podrodova *Pinus* roda.

Sredinski faktori mogu jače ili slabije uticati na kvantitativni sastav sekundarnih metabolita. Popović i sar. (2018) su ispitivali koncentraciju šest fenolnih jedinjenja (neohlorogenske kiseline, kvercitrina, izokvercetrina, hiperozida, rutozida i kverciturona) u metanolnim ekstraktima plodova dve vrste drene, *Cornus mas* i *C. sanguinea*, sa različitih lokaliteta. Kod *C. mas* je utvrđen jak, a kod *C. sanguinea* slab uticaj spoljašnjih faktora (nadmorske visine i pokrovnosti vegetacije na staništu) na sadržaj sekundarnih metabolita. Na osnovu utvrđenih korelacija, zaključeno je da je uticaj sredinskih faktora na količinu ispitivanih sekundarnih metabolita specifičan za svaku vrstu. Demasi i sar. (2018) su našli značajne varijacije u aromi i odnosu terpena u etarskom ulju lavande (*Lavandula angustifolia*) u širem geografskom opsegu lokaliteta. Kvantitativna varijabilnost sekundarnih metabolita se dosta proučava i sa aspekta



populacione ekologije (Hunter i sar. 1996). Varijabilnost odbrambenih jedinjenja između individua unutar biljnih vrsta dovodi do lokalizovane adaptacije odgovarajućih herbivora. Tokom vremena dolazi do recipročnih promena i adaptacija i kod biljaka i kod herbivora. Ovde su naročito važna istraživanja populacija na prirodnim staništima. Kontrolisani eksperimenti ne mogu adekvatno da odraze sve izazove sa kojima se herbivori suočavaju prilikom odabira jedinki za ishranu (Moore i Foley 2005).

### 3. CILJEVI RADA

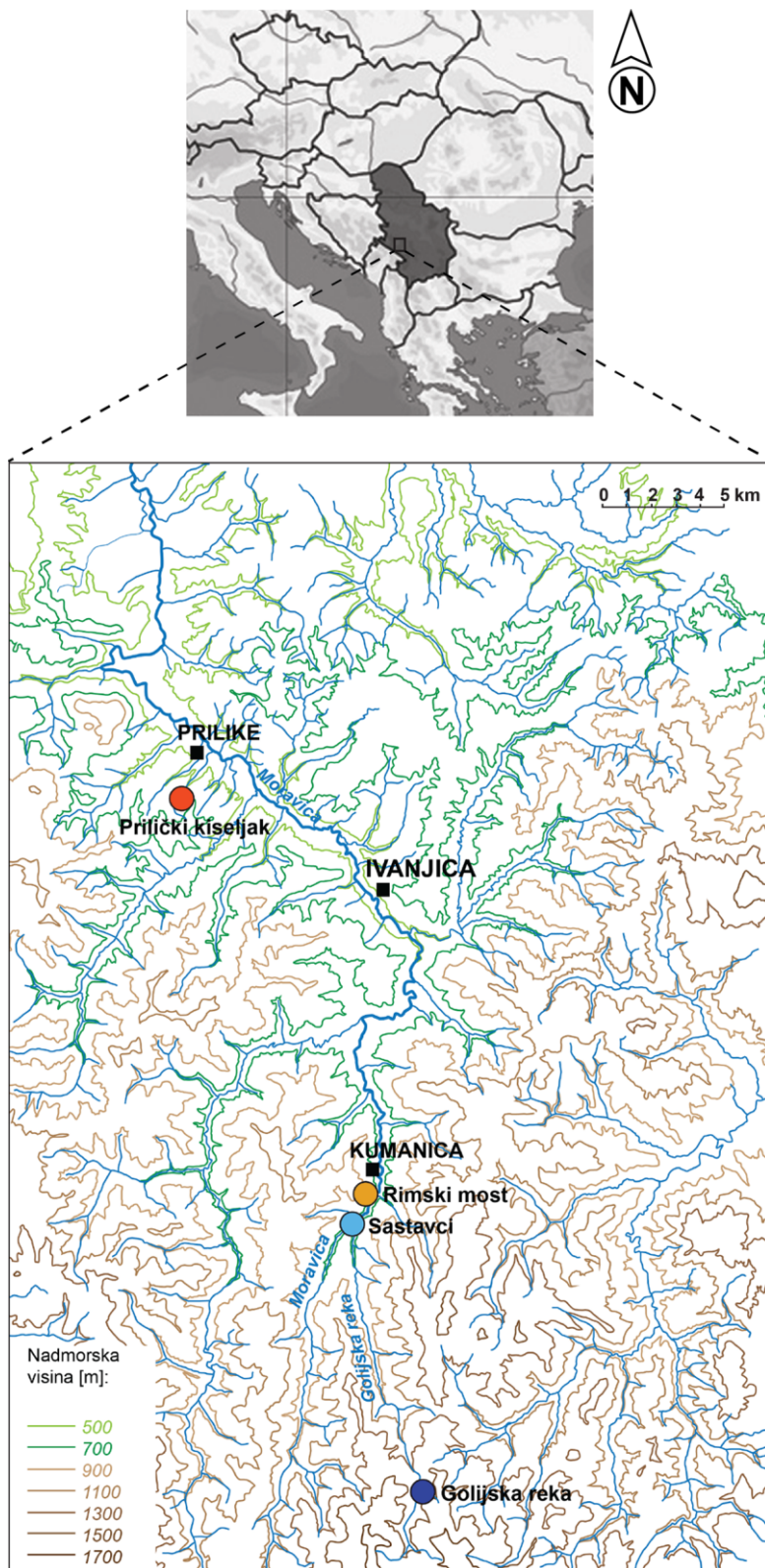
Osnovni naučni ciljevi ovog istraživanja su bili sledeći:

- 1) ispitivanje varijabilnosti i odnosa populacija unutar i između vrsta u odnosu na koncentraciju diarilheptanoida u kori prirodnih populacija *A. glutinosa* i *A. incana*,
- 2) ispitivanje sezonske varijabilnosti diarilheptanoida u kori vrsta *A. glutinosa* i *A. incana*,
- 3) procena hemotaksonomskog značaja diarilheptanoida u vrstama *A. glutinosa* i *A. incana*,
- 4) procena mogućnosti primene diarilheptanoida u detekciji spontanih hibrida između *A. glutinosa* i *A. incana*,
- 5) ispitivanje varijabilnosti oblika, veličine i nervature lista u populacijama *A. glutinosa* i *A. incana*,
- 6) procena spontane hibridizacije između *A. glutinosa* i *A. incana* na osnovu morfologije lista.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Istraživane populacije *Alnus* spp.

Populacije crne i sive jove uzorkovane su na planini Goliji, u slivu reke Moravice. U cilju ispitivanja primene diarilheptanoida u hemotaksonomiji vrsta *A. glutinosa* i *A. incana* i detekciji interspecijskih hibrida, u junu 2015. godine uzorkovana je kora iz dve populacije na relativno bliskoj međusobnoj udaljenosti (1,2 km): Rimski most (*A. glutinosa*) i Sastavci (*A. incana*). Da bi se ispitaio hemovarijabilitet i odnosi populacija unutar i između vrsta, u aprilu 2016. godine ponovo su uzorkovane ove dve, zajedno sa još dve, međusobno relativno udaljene populacije (30 km), izabrane kao kontrolne vrste na tipičnim lokalitetima: Prilički kiseljak (*A. glutinosa*) i Golijska reka (*A. incana*). Geografski položaj, veličina uzorka i klimatološki podaci lokaliteta ispitivanih populacija prikazani su na **Slici 15** i u **Tabeli 1**. Determinacija individua urađena je na osnovu morfologije listova, izgleda šišarica, kore i habitusa, kao i karakteristika staništa za svaku vrstu (Jovanović 2007). Da bi se umanjili sredinski uticaji na sadržaj diarilheptanoida i dobio uniforman uzorak, odabrane su zrele jedinke približne starosti, a kora je uzorkovana istog dana (jun 2015. godine) ili tokom dva dana (22.-23. april 2016. godine) na istoj visini i na istoj ekspoziciji stabla.



**Slika 15.** Sliv reke Moravice sa označenim populacijama *A. glutinosa* (Prilički kiseljak i Rimski most) i *A. incana* (Sastavci i Golijska reka).

**Tabela 1.** Geografski položaj ispitivanih populacija, veličina uzorka i aproksimirani klimatološki podaci za period od 1961.-2011. godine (Ruml i sar. 2017).

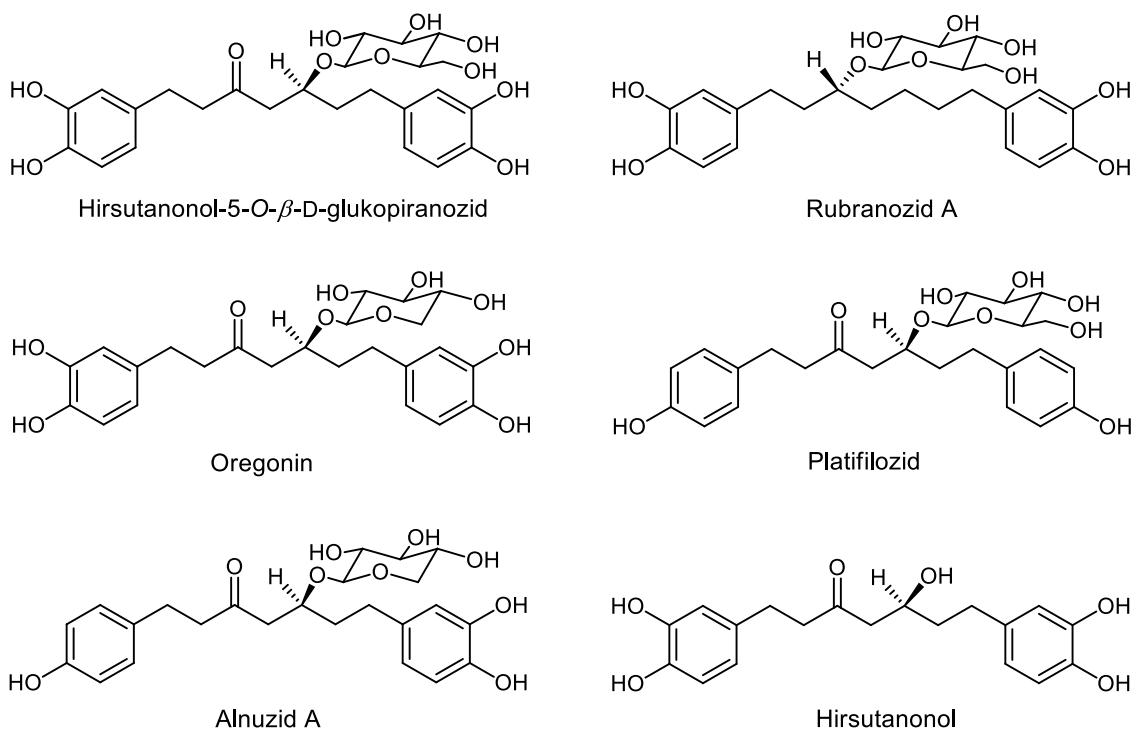
Vrsta	<i>Alnus glutinosa</i>		<i>Alnus incana</i>	
Lokalitet/Populacija	Prilički kiseljak	Rimski most	Sastavci	Golijska reka
Nadmorska visina (m)	565	655	670	1396
Geografska širina (N)	43°36'55"	43°28'09.2"	43°27'38.5"	43°21'46"
Geografska dužina (E)	20°08'04"	20°14'05.9"	20°13'22.0"	20°15'26"
Uzorci kore	2015.	-	21	21
	2016.	21	20	18
Uzorci listova	$n_s^1$	21	20	21
	$n_l^2$	367	321	317
SGT <sup>3</sup> (°C)	9,6	8,9	8,8	5,8
SVT <sup>4</sup> (°C)	15,1	14,1	14,0	10,7
UGP <sup>5</sup> (mm)	877,6	911,7	903,8	1013,8
UVP <sup>6</sup> (mm)	580,8	603,9	598,9	664,5

<sup>1</sup> $n_s$ , broj uzorkovanih stabala za morfometriju listova; <sup>2</sup> $n_l$ , broj uzorkovanih listova; <sup>3</sup>SGT, srednja godišnja temperatura; <sup>4</sup>SVT, srednja temperatura u periodu vegetacije, od aprila do oktobra; <sup>5</sup>UGP, ukupna godišnja količina padavina; <sup>6</sup>UVP, ukupna količina padavina u periodu vegetacije.

## 4.2. Hemijske analize

### 4.2.1. Analitički standardi i rastvarači

Standardi koji su korišćeni prilikom određivanja koncentracije diarilheptanoida u ekstraktima (hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid, oregonin, hirsutanonol, alnuzid A, platifilozid i rubranozid A) (**Slika 16**) prethodno su izolovani iz kore crne jove (Novaković i sar. 2013). Za ekstrakciju biljnog materijala korišćen je sveže predestilovani 96% etanol. Rastvarači za tečno-masenu analizu (HPLC kvaliteta) kupljeni su od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).



**Slika 16.** Strukturne formule ispitivanih diarilheptanoida.

#### 4.2.2. Priprema ekstrakata kore

Sakupljena kora osušena je na vazduhu, usitnjena i sprašena. Zatim je 2 g kore ekstrahovano 96% etanolom ( $4 \times 20$  ml, 24 h) na sobnoj temperaturi u mraku, uz upotrebu ultrazvučnog kupatila u posljednjem satu svake ekstrakcije. Spojeni ekstrakti su upareni na rotacionom vakuum uparivaču i određen je prinos ekstrakcije. Pred tečno-masenu analizu, ekstrakti su rastvoreni u metanolu u koncentraciji 1,0 mg/ml (uzorci iz 2015. godine), odnosno 0,2 mg/ml (uzorci iz 2016. godine) i filtrirani kroz filter veličine pora  $0,45 \mu\text{m}$  (Agilent Technologies).

#### 4.2.3. Visokoeffikasna tečna hromatografija – tandemna masena spektrometrija (UHPLC-MS/MS)

Tečno-masena analiza ekstrakata kore urađena je na aparatu Waters Acquity Ultra Performance H Class system (Waters, Milford, MA, USA). Program za UHPLC hromatografiju ekstrakata razlikovao se u dve godine, zbog različitih kolona koje su

korišćene za razdvajanje. Uslovi hromatografisanja ekstrakata kore po godinama uzorkovanja i odgovarajući elucioni programi dati su u **Tabelama 2, 3 i 4**.

**Tabela 2.** Uslovi hromatografisanja ekstrakata kore jove po godinama uzorkovanja.

Godina uzorkovanja	2015.	2016.
Kolona	Acquity UPLC BEH C18, Waters (1,7 $\mu$ m, 2,1 mm $\times$ 150 mm) Waters VanGuard pre-column	Zorbax Eclipse Plus C18, Agilent (1,8 $\mu$ m, 2,1 mm $\times$ 100 mm)
Pretkolona	Acquity UPLC BEH C18 (1,7 $\mu$ m, 2,1 mm $\times$ 5 mm)	–
Mobilna faza A	0,2% mravlja kiselina	0,2% mravlja kiselina
Mobilna faza B	acetonitril	acetonitril
Temperatura kolone ( $^{\circ}$ C)	40	40
Brzina protoka (ml/min)	0,3	0,4
Injekciona zapremina ( $\mu$ l)	2	10

**Tabela 3.** Elucioni program za razdvajanje ekstrakata kore jove uzorkovane u 2015. godini.

Vreme (min)	0,0	12,0	12,1	13,9	14,0	16,0
% B	20	30	100	100	20	20

**Tabela 4.** Elucioni program za razdvajanje ekstrakata kore jove uzorkovane u 2016. godini.

Vreme (min)	0,0	6,0	7,0	7,1	10,0	10,1	12,0
% B	19	19	21	100	100	19	19

Odabrani diarilheptanoidi su detektovani i kvantifikovani pomoću trostrukog kvadrupolnog masenog spektrometra (eng. *triple quadrupole*) Acquity TQD (Waters), spregnutog sa UHPLC sistemom. Za sakupljanje podataka korišćen je softverski

program MassLynx, verzija 4.1. Primenjena je tehnika elektrosprej jonizacije (ESI) u negativnom modu. Napon kapilare jonskog izvora bio je 3,3 kV, temperatura 150°C, a temperatura i protok azota (gasa za desolvaciju) bile su 450°C i 500 l/h, respektivno. Kao kolizioni gas upotrebljen je argon čistoće 5.0. Diarilheptanoidi su analizirani primenom moda za praćenje višestruke fragmentacije (MRM, eng. *multiple reaction monitoring*), prema parametrima datim u **Tabeli 5**. Parametri za kvantifikaciju komponenata, uključujući jonizacioni mod, napone na konusu, kolizione energije i karakteristične prelaze, dobijeni su pomoću IntelliStart programa direktnim ubrizgavanjem metanolnih rastvora standarda u maseni spektrometar.

**Tabela 5.** Optimizovani MRM uslovi za analizu diarilheptanoida UHPLC-MS/MS metodom.

Jedinjenje	Prekursor jon ( <i>m/z</i> )	Produkt jon ( <i>m/z</i> )	Napon na konusu (V)	Koliziona energija (V)
Hirsutanonol-5- <i>O</i> - $\beta$ - D-glukopiranozid	507,35	327,20	42	20
Oregonin	477,34	327,15	44	22
Hirsutanonol	345,17	165,02	44	22
Alnuzid A	461,35	311,13	40	16
Platifilozid	475,36	295,17	32	10
Rubranozid A	493,37	331,23	72	36

U cilju određivanja koncentracije diarilheptanoida u ekstraktima kore, pripremljen je metanolni rastvor smeše diarilheptanoidnih standarda (hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozida, oregonina, hirsutanonola, alnuzida A, platifilozida i rubranozida A) u koncentraciji 500  $\mu$ g/ml. Od ovog rastvora napravljena je serija kalibracionih rastvora u rasponu koncentracija od 2,5 ng/ml do 200  $\mu$ g/ml. Standardni rastvori snimani su pod istim uslovima kao i ekstrakti. Kalibracione krive konstruisane su na osnovu površina pikova, dok su linearne jednačine za određivanje koncentracije diarilheptanoida izračunate primenom metode težinskih (ponderisanih) najmanjih kvadrata. Ovaj metod se primenjuje kada se varijanse opservacija menjanju od merenja do merenja, što je čest slučaj u hromatografskim kalibracijama u kojima se koristi veliki raspon koncentracija za dobijanje kalibracione krive. Ovde je uobičajena pojava da se varijansa odgovora instrumenta povećava sa povećanjem koncentracije standarda



(Almeida i sar. 2002) ili približavanjem koncentracije standarda limitu detekcije (Da Silva i sar. 2015), zbog čega ove kalibracione tačke treba da nose manju težinu u formiranju modela kako bi se povećala tačnost metode. Za regresionu analizu u ovom radu korišćen je  $1/y$  težinski faktor, gde je  $y$  površina hromatografskog pika. Ovaj faktor pokazao se najboljim jer je dao najmanje sume procenata relativnih grešaka (%RE), pomoću kojih se porede koncentracije dobijene primenom regresionih jednačina za svaki težinski faktor ( $C_{exp}$ ) sa nominalnim koncentracijama standarda ( $C_{nom}$ ):

$$\%RE = \frac{C_{exp} - C_{nom}}{C_{nom}} \times 100$$

Linearne jednačine, izračunate za opseg koncentracija diarilheptanoida koji se javlja u ekstraktima, sa odgovarajućim koeficijentima korelacije, prikazane su u **Tabeli 6**. Regresiona analiza je pokazala da je predložena metoda linearna u ispitivanom opsegu koncentracija.

**Tabela 6.** Rezultati regresione analize.

Jedinjenje	Godina	Kalibraciona kriva, $y = ax + b$	Koeficijent korelacije, $r$
Hirsutanonol-5- <i>O</i> -	2015.	$2,26 \times 10^6 x + 141,5$	0,9994
$\beta$ -D-glukopiranozid	2016.	$1,01 \times 10^7 x + 72,8$	0,9993
Oregonin	2015.	$2,14 \times 10^6 x + 248,5$	0,9955
	2016.	$6,43 \times 10^6 x + 6477,2$	0,9916
Hirsutanonol	2015.	$3,29 \times 10^6 x + 549,5$	0,9913
	2016.	$3,02 \times 10^7 x + 659,2$	0,9912
Alnuzid A	2015.	$2,03 \times 10^6 x + 298,9$	0,9961
	2016.	$7,94 \times 10^6 x + 116,4$	0,9985
Platifilozid	2015.	$1,17 \times 10^6 x + 267,9$	0,9975
	2016.	$3,62 \times 10^6 x + 74,6$	0,9993
Rubranozid A	2015.	$1,07 \times 10^6 x + 92,5$	0,9993
	2016.	$4,37 \times 10^6 x + 229,6$	0,9961

#### 4.2.4. Statistička obrada podataka

Normalnost raspodele svakog svojstva posebno (ukupno je analizirano sedam svojstava: koncentracije šest diarilheptanoida i prinos etanolnih ekstrakata kore) proveravana je Shapiro-Wilk testom (nivo značajnosti  $P > 0,05$  ukazivao je na normalnu raspodelu). U slučaju normalne raspodele poređenje populacija je vršeno na osnovu srednjih vrednosti (parametarski test analize varijanse – ANOVA,  $P \leq 0,05$ , sa Fišerovim LSD<sup>1</sup> *post hoc* testom za utvrđivanje značajnih razlika između pojedinačnih grupa), a u slučaju raspodele koja nije normalna poređenje populacija je vršeno na osnovu medijana (neparametarski Kruskal-Wallis test,  $P \leq 0,05$ , sa Bonferonijevim korekcijama prilikom određivanja značajnih razlika). Analiza glavne komponente (PCA, eng. *Principal component analysis*) je urađena u cilju lakšeg sagledavanja strukture svojstava i elemenata iz obimne tabele podataka. Diskriminantna analiza (DA) je korišćena za diskriminaciju grupa koje su definisane *a priori*, kao i za razvrstavanje elemenata u okviru tako definisanih grupa. Da bi se korigovala asimetrija raspodele, PCA i DA su urađene na transformisanim podacima:  $y' = \log_{10}(y + 1)$ . U obradi i grafičkom prikazivanju podataka korišćeni su softveri: R (R fondacija za statističke proračune, 64-bit verzija 3.4.0) i Addinsoft XLSTAT 2017 (besplatna probna verzija).

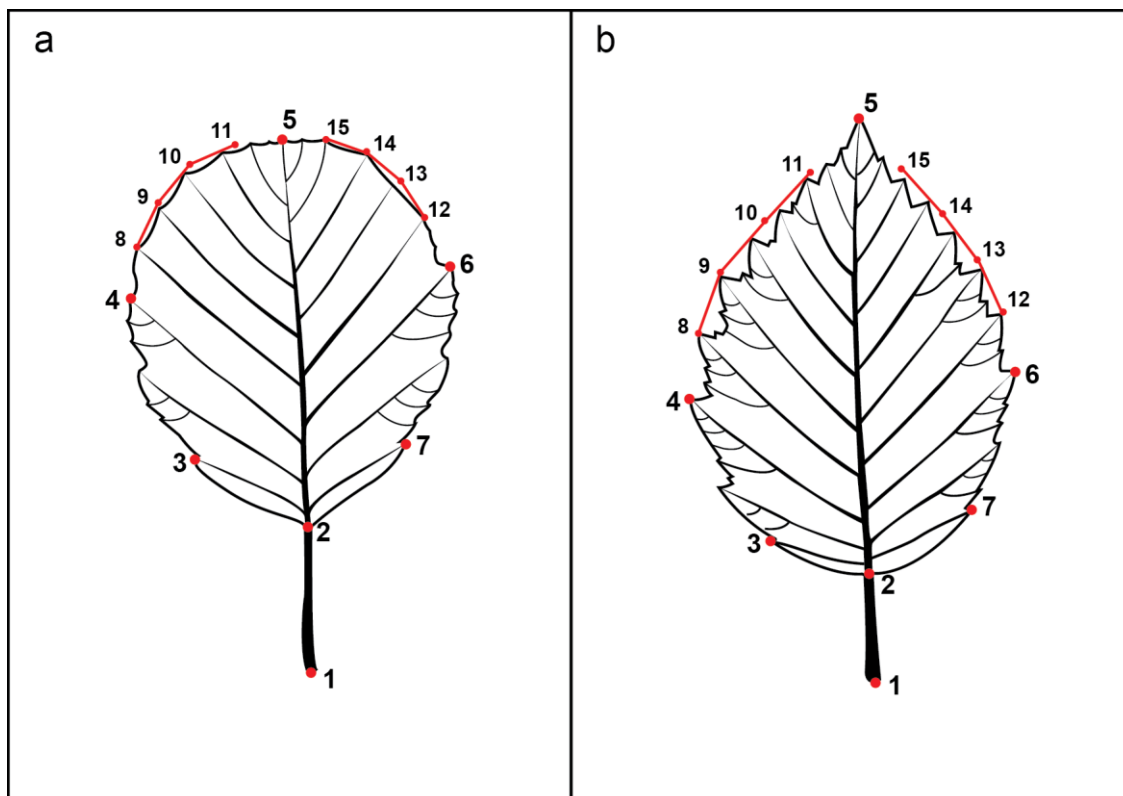
### 4.3. Geometrijska morfometrija

#### 4.3.1. Uzorkovanje listova i digitalizacija

Analizom je obuhvaćeno ukupno 1315 zrelih listova uzorkovanih iz četiri populacije jova (**Tabela 1**). Listovi su uzorkovani u jesen 2017. godine i skenirani sa naličja pomoću Epson Perfection V370 skenera u rezoluciji od 600 dpi u cilju dobijanja 2D konfiguracija. Osnovni oblik listova obe vrste opisan je sa sedam specifičnih konfiguracionih tačaka (**Slika 17**). Dodatno, dve pomoćne krive sa po četiri specifične tačke su ucrtane sa obe strane lista da bi se opisao vrh. Vrhovi nerava iznad tačaka 4 i 6 su korišćeni kao polazne tačke za ove krive.

---

<sup>1</sup> eng. *Least significant difference* – najmanja značajna razlika.



**Slika 17.** Konfiguracije specifičnih tačaka za *A. glutinosa* (a) i *A. incana* (b): 1 – početak lisne drške, 2 – spoj lisne drške sa liskom, 3 i 7 – vrhovi prvog para nerava od lisne drške, 4 i 6 – vrhovi para nerava u najširem delu liske, 5 – vrh lista, od 8 do 15 – pomoćne tačke.

Uzorci listova su digitlizovani pomoću tpsUtil (Rohlf 2016a) i tpsDig (Rohlf 2016b) programa. Dodatno je izmeren broj parova sekundarnih lisnih nerava (SN) za svaki list.

#### 4.3.2. Procena greške merenja

U cilju procene greške digitalizacije, urađena je pilot studija na 400 primeraka (pet stabala po populaciji, deset listova po stablu i dva ponavljanja po listu). Generalizovana Prokrustova analiza, odnosno Prokrustova superimpozicija, i Prokrustova ANOVA urađene su u programu MorphoJ (Klingenberg 2011) za svaku populaciju posebno. Pomoću Prokrustove superimpozicije se uklanjaju varijacije nastale usled razlika u orijentaciji, poziciji i veličini listova, tako da preostale razlike u

konfiguraciji tačaka odražavaju razlike u obliku listova. Pomoću Prokrustove ANOVA-e su kvantifikovane greške merenja (Klingenberg 2015; Klingenberg i sar. 2002; Klingenberg i McIntyre 1998). Rezultati procene greške digitalizacije su prikazani u **Tabeli 7**. Od interesa za interpretaciju greške merenja je  $F$  vrednost koja predstavlja odnos varijansi (MS u **Tabeli 7**, eng. *mean square* vrednosti) efekta od interesa i odgovarajućeg efekta greške. Za svaku populaciju greška digitalizacije je bila zanemarljivo mala u odnosu na najniži nivo biološke varijacije, a to je interakcija individua×strana lista (leva, odnosno desna), što se može videti iz  $F$  vrednosti koja iznosi od 8,57 za populaciju Sastavci do 14,54 za populaciju Rimski most.

Efekat fluktuirajuće asimetrije, koji se procenjuje na osnovu interakcije individua×strana, je bio značajan u svim populacijama. Fluktuirajuća asimetrija predstavlja odstupanje asimetrije svake individue od prosečne asimetrije cele populacije i odražava kombinovani efekat fenotipske plastičnosti i razvojne nestabilnosti (Klingenberg i sar. 2012). Pošto je predmet ovog istraživanja interspecijska hibridizacija, u fokusu daljih analiza bila je samo simetrična komponenta varijacije koja odražava genetičku varijabilnost i fenotipsku plastičnost.

**Tabela 7.** Prokrustova ANOVA oblika i veličine listova u pilot studiji.

Populacija		Efekat	SS	MS	df	<i>F</i>	<i>P</i>	
Prilički kiseljak	Oblik	Stablo	0,29376	0,00565	52	5,65	<0,0001	
		List	0,58487	0,001	585	2,13	<0,0001	
		Strana	0,00585	0,00045	13	0,96	0,4893	
		Individua × Strana	0,29865	0,00047	637	<b>9,34</b>	<0,0001	
		Greška	0,06528	0,00005	1300			
	Veličina	Stablo	10928,2	2732,06	4	2,36	0,0676	
		List	52120,7	1158,24	45	1891,58	<0,0001	
		Greška	30,66	0,612	50			
	Rimski most	Oblik	Stablo	0,06687	0,00129	52	1,29	0,0927
			List	0,5854	0,001	585	2,38	<0,0001
Strana			0,00604	0,00046	13	1,1	0,3537	
Individua × Strana			0,2 36	0,00042	637	<b>14,54</b>	<0,0001	
Greška			0,03767	2,9×10 <sup>-5</sup>	1300			
Veličina		Stablo	12009,6	3002,4	4	4,35	0,0047	
		List	31092,4	690,942	45	1781,44	<0,0001	
		Greška	19,39	0,39	50			
Golijska reka		Oblik	Stablo	0,06172	0,00119	52	1,36	0,0503
			List	0,50874	0,00087	585	2,32	<0,0001
	Strana		0,00772	0,00059	13	1,58	0,0849	
	Individua × Strana		0,23882	0,00038	637	<b>10,23</b>	<0,0001	
	Greška		0,04763	3,7×10 <sup>-5</sup>	1300			
	Veličina	Stablo	6393,46	1598,37	4	2,36	0,0675	
		List	30476,4	677,253	45	657,89	<0,0001	
		Greška	51,47	1,02	50			
	Sastavci	Oblik	Stablo	0,08548	0,00164	52	2,07	<0,0001
			List	0,46472	0,00079	585	1,75	<0,0001
Strana			0,0048	0,00037	13	0,81	0,6449	
Individua × Strana			0,28892	0,00045	637	<b>8,57</b>	<0,0001	
Greška			0,06877	5,3×10 <sup>-5</sup>	1300			
Veličina		Stablo	10268	2566,99	4	7,63	<0,0001	
		List	15133,7	336,305	45	1299,75	<0,0001	
		Greška	12,94	0,259	50			

### 4.3.3. Statistička obrada podataka

Prokrustova superimpozicija 1315 konfiguracija listova istraživanih populacija je urađena u MorphoJ programu, uzimajući u obzir objektnu simetriju. Glavni trendovi varijacije oblika su predstavljeni simetričnom komponentom koja objašnjava 80,8% varijabilnosti.

Inter- i intraspezijska varijabilnost oblika listova je ispitana pomoću PCA i kanonijske varijacione analize (CVA) na matrici kovarijansi simetrične komponente. Razdvajanje vrsta je dalje ispitano diskriminantnom analizom (DA). Razlike između vrsta i populacija u SN i veličini centroida (CS) su ispitane pomoću hijerarhijske (eng. *nested*) ANOVA-e u softveru Minitab 17 (Minitab 17 Statistical Software, 2010, Minitab Inc., State College, PA, USA). Pojedinačna stabla su označena kao slučajni faktori, a populacije u okviru kojih se nalaze ova stabla kao fiksni faktori.

Pirsonov produkt-moment koeficijent korelacije je korišćen da se ispita veza između SN i CS.

Pomoću metode delimičnih najmanjih kvadrata (PLS, eng. *Partial least squares*) ispitana je kovarijacija između simetrične komponente varijacije oblika (blok 1) i SN (blok 2). Za analizu su korišćene srednje vrednosti konfiguracija listova po stablu, kao i vrednosti SN transformisane kvadratnim korenom.

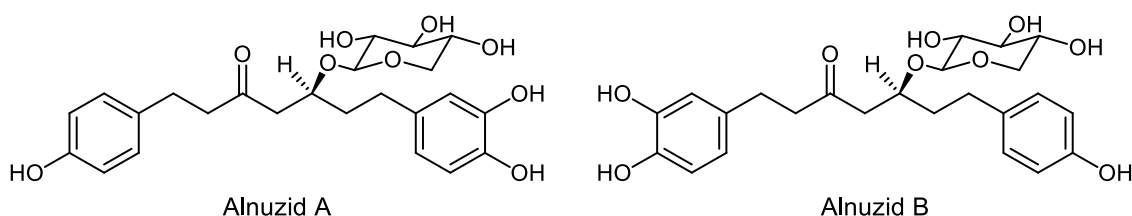
CVA, DA i PLS su urađene u MorphoJ programu.

Alometrija je morfološka varijabilnost koja je uzrokovana varijacijama u veličini. Alometrijske studije ispituju vezu između veličine i oblika, ili kovarijacije delova usled varijacija u veličini. Statička alometrija je rezultat genetičke i sredinske varijabilnosti veličine u okviru populacije na određenom ontogenetskom stupnju (Klingenberg 2016). Statička alometrija je ispitana multivarijacionom regresijom simetrične komponente varijacije oblika na CS za svaku populaciju posebno. Homogenost nagiba alometrijskih krivih između populacija je ispitana pomoću paketa Geomorph 3.0.5 (Adams i Otárola-Castillo 2013) u R statističkom softveru, prema modelu:  $\text{Shape} \sim \log(\text{CS}), \sim \text{Population}$ .

## 5. NAŠI RADOVI

### 5.1. Hemovarijabilnost odabranih populacija crne i sive jove

Šest diarilheptanoida (hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid, oregonin, hirsutanonol, alnuzid A, platifilozid i rubranozid A) kvantifikovano je u etanolnim ekstraktima kore *Alnus* spp. Alnuzid A i B su strukturni izomeri (Slika 18) i daju iste prekursor i produkt jone za MRM, tako da se nisu mogli razdvojiti primenjenom metodom na UHPLC, te je njihova suma korišćena u daljim analizama.



Slika 18. Strukturne formule alnuzida A i B.

#### 5.1.1. Ispitivanje hemovarijabilnosti populacija *A. glutinosa* (Rimski most) i *A. incana* (Sastavci) uzorkovanih u junu 2015. godine – Rezultati

Osnovni parametri deskriptivne statistike za svako svojstvo i populaciju dati su u **Tebeli 8**. Analiza glavne komponente je primenjena kao eksplorativna statistička metoda u cilju sticanja uvida u strukturu podataka i otkrivanja obrazaca grupisanja, ukoliko oni postoje. PCA je rezultovala u dvokomponentnom modelu prema Kajzerovom kriterijumu, prema kome je za smislenu interpretaciju modela dovoljno zadržati one glavne komponente čije su ajgen vrednosti veće od 1 (Kaiser 1960). Prva komponenta (PC1) je objasnila 49,7% ukupne varijabilnosti, a druga (PC2) 17,7%, što znači da je 67,4% ukupne varijanse podataka objašnjeno ovim modelom. Na osnovu sume kvadriranih kosinusa projektovanih tačaka svojstava u ravni prve dve ose (Slika 19a) možemo zaključiti da su sva svojstva dobro reprezentovana u ovoj ravni ( $0,65 < \text{suma } \cos^2 < 0,80$ ), izuzev oregonina koji je nešto slabije reprezentovan ( $\text{suma } \cos^2 =$

0,45). Kvadrirani kosinusi tačaka u grafikonu svojstava zapravo predstavljaju kvadrirane korelacije odgovarajućih varijabli sa osama. Što su sume  $\cos^2$  tačaka bliži jedinici, veće su korelacije odgovarajućih svojstava sa osama, i, shodno tome, ta svojstva su bolje prezentovana u datoj ravni osa, odnosno bolje opisuju varijabilnost datog seta podataka. PCA pokazuje da sedam svojstava u skupnom delovanju jasno svrstava individue u dve glavne grupe koje odgovaraju analiziranim vrstama (**Slika 19b**): grupa I-RM (19 individua *A. glutinosa*, leva strana grafikona) i grupa II-S (19 individua *A. incana*, desna strana grafikona). Osnovni statistički parametri za svako svojstvo i sve grupe sugerisane na osnovu PCA prikazani su na **Slici 20**. Individue iz grupe I-RM bogatije su u sadržaju hirsutanonola, a siromašnije u prinosu ekstrakcije i sadržaju hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozida i platifilozida, u odnosu na individue iz grupe II-S. Četiri individue (4, 8, 38 i 39) čine posebnu grupu (III-H), koja se od ostalih grupa razlikuje po većem sadržaju rubranozida A. Individue 4 i 8 fizički pripadaju populaciji Rimski most (*A. glutinosa*), a individue 38 i 39 populaciji Sastavci (*A. incana*), što bi moglo ukazivati na to da su ove četiri individue hibridi između crne i sive jove. Izdvojen položaj na grafikonu PCA zauzimaju i stabla 10, 21 i 36, ali su eliminisana kao mogući članovi grupe zbog nedovoljno pouzdane reprezentacije na diskriminantnim osama (dobijeno na osnovu provere trigonometrijskih funkcija u programu).

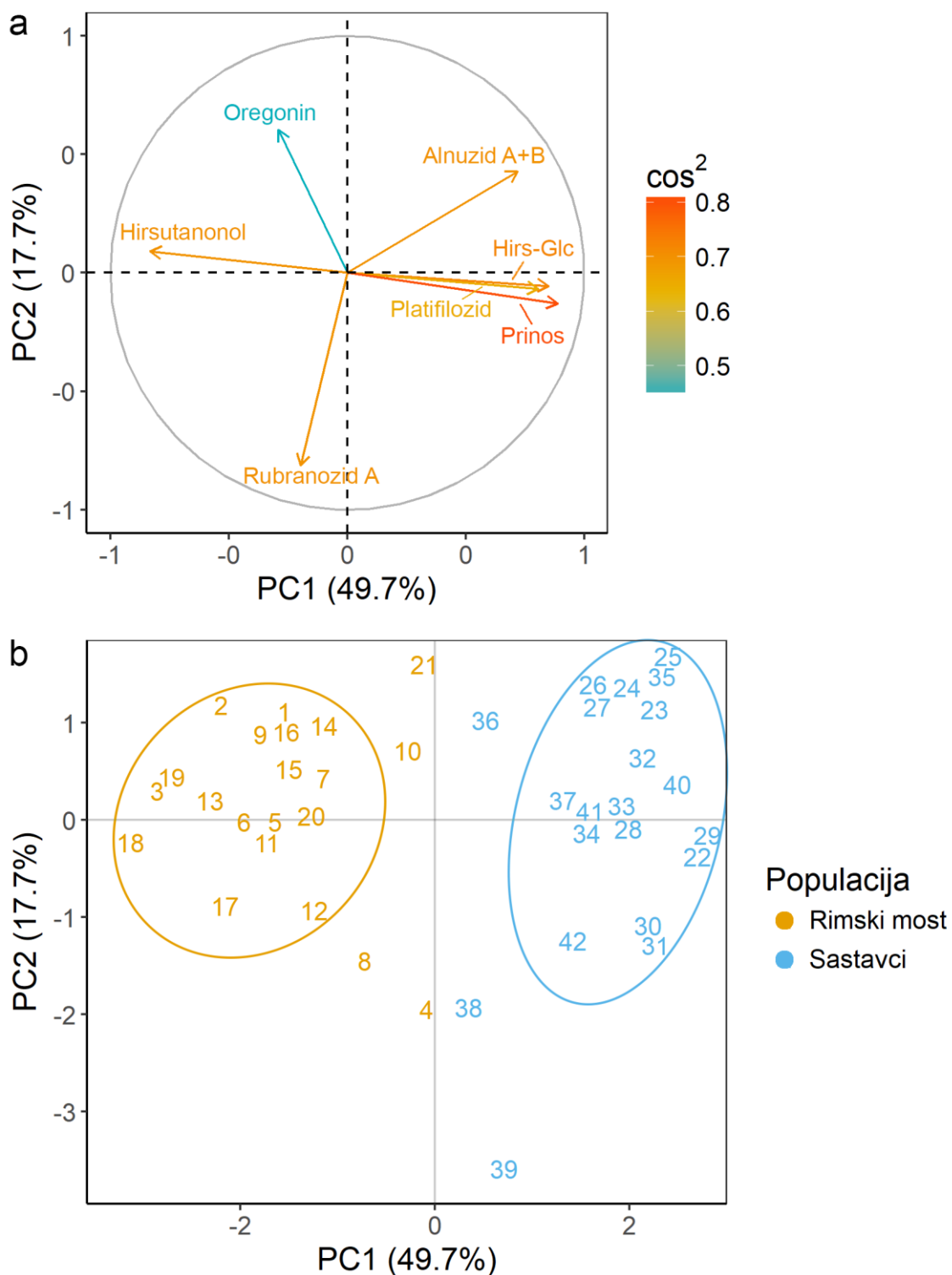
**Tabela 8.** Deskriptivna statistika ispitivanih svojstava kore u populacijama Rimski most (*A. glutinosa*) i Sastavci (*A. incana*) uzorkovanim u junu 2015. godine.

Svojstvo	Rimski most			Sastavci		
	Srednja vrednost <sup>1</sup>	Medijana	CV <sup>2</sup>	Srednja vrednost	Medijana	CV
Hirsutanonol-5- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukopiranozid	10,87	10,43	32,78	22,00	22,33	19,26
Oregonin	296,32	292,72	8,65	265,45	261,13	11,84
Hirsutanonol	6,71	5,95	72,27	0,26	0,21	84,01
Alnuzid A+B	19,99	20,29	24,09	27,70	28,08	20,11
Platifilozid	15,64	14,62	23,64	40,45	41,00	40,25
Rubranozid A	30,92	26,86	33,24	25,14	19,70	48,48
Prinos	20,52	18,40	28,44	32,10	31,40	9,76

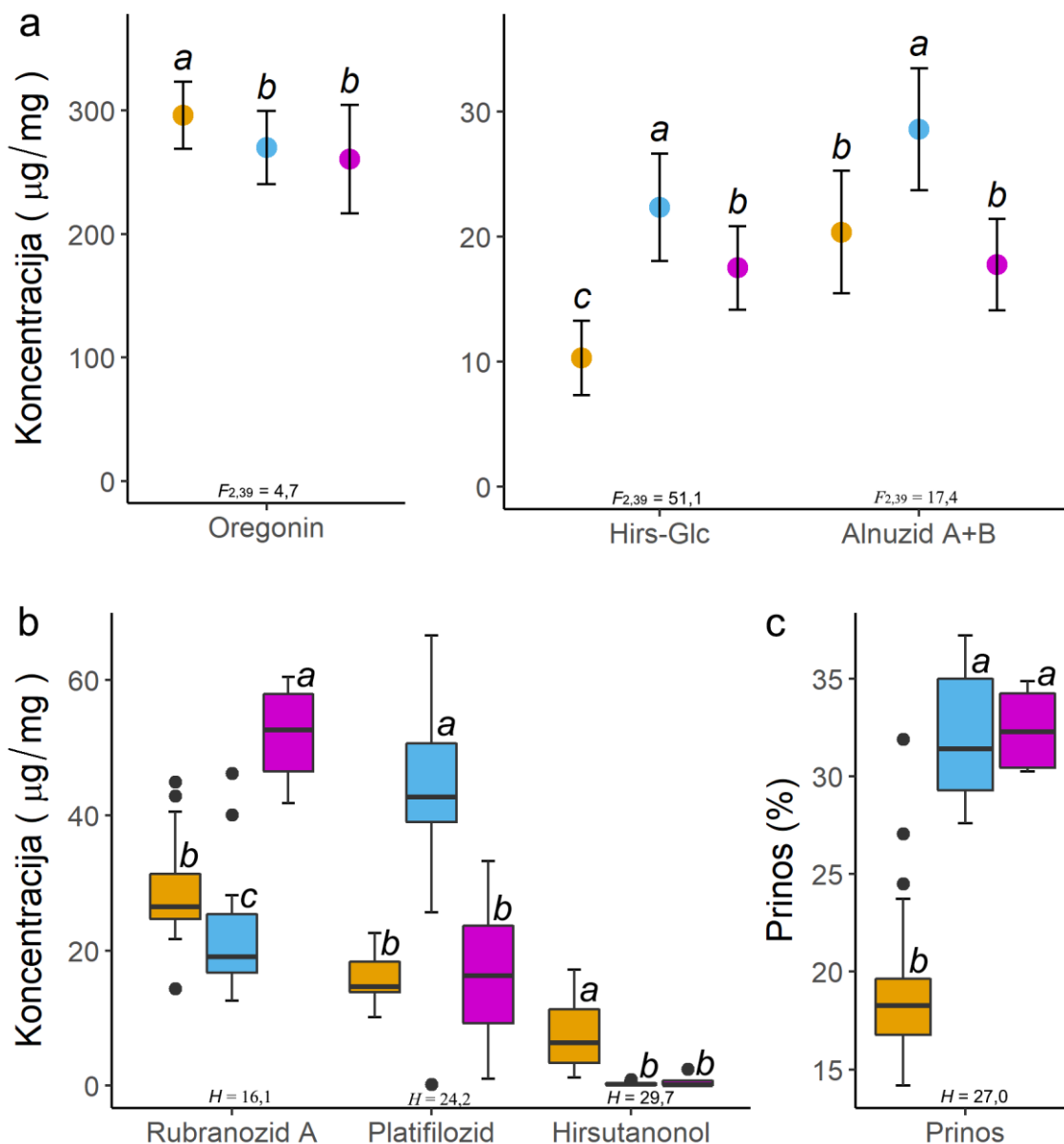
<sup>1</sup>Koncentracija ekstrakata izražena je u  $\mu\text{g}$  diarilheptanoida/mg ekstrakta, a prinos u procentima (% w/w);

<sup>2</sup>CV, koeficijent varijacije – relativna standardna devijacija.



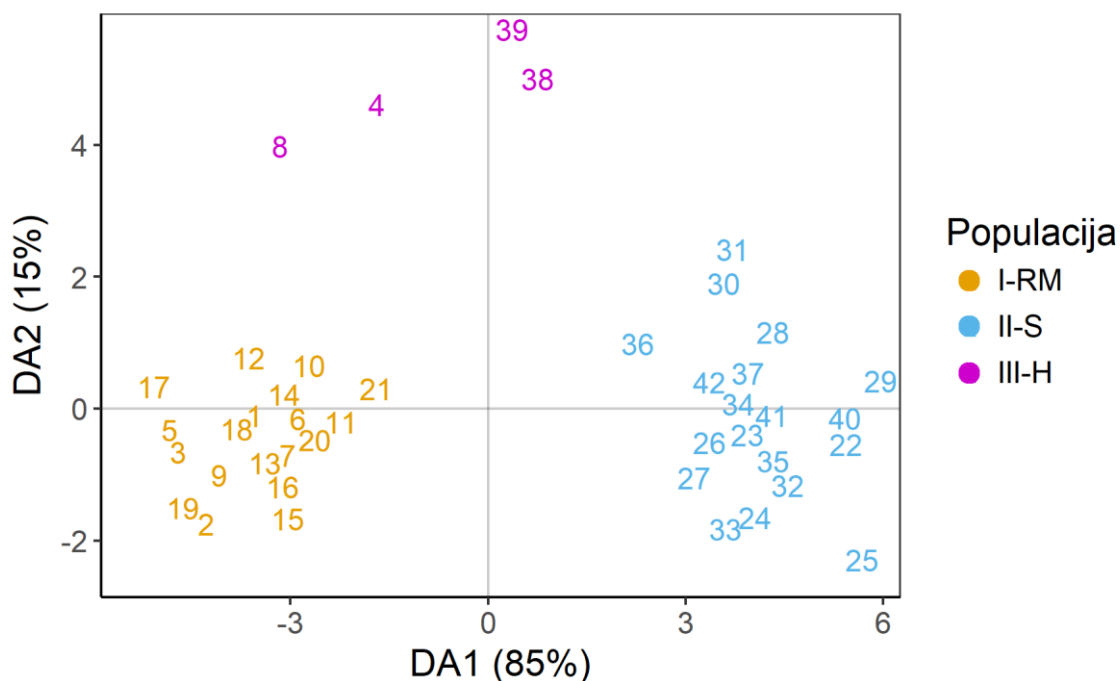


**Slika 19.** PCA: Pozicioniranje varijabli (a) i uzoraka (b) 42 individue iz populacija Rimski most (*A. glutinosa*) i Sastavci (*A. incana*) (2015. godina) u ravni prve dve glavne komponente.



**Slika 20.** Poređenje tri grupe stabala (● I-RM, ● II-S, ● III-H) na osnovu srednjih vrednosti (a) i medijana (b, c) koncentracija diarilheptanoida ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  etanolnog ekstrakta) i prinosa ekstrakata (% w/w).  $F$  (sa brojem stepeni slobode) i  $H$  vrednosti su test statistike dobijene iz ANOVA i Kruskal-Wallis testova, respektivno. Vertikalni stubovi predstavljaju opseg srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (a), odnosno raspon između najmanje i najveće tačke na maksimalnoj udaljenosti  $1,5 \times \text{IQR}$  (interkvartilni raspon, eng. *interquartile range*) od donjeg, odnosno gornjeg kvartila, respektivno (b, c). Homogene grupe (a, b, c) dobijene su na osnovu odgovarajućih *post hoc* testova na 95% nivou pouzdanosti.

Diskriminantna analiza spada u supervizijske metode prepoznavanja obrazaca u skupu podataka, što znači da se ona izvodi na setu predefinisanih grupa, a njeni rezultati treba da ukažu na karakteristike koje najviše utiču na diskriminaciju između grupa, odnosno populacija (Bojović i sar. 2016). Urađena je DA tri skupa stabala na osnovu grupisanja koje je sugerisala PCA (populacije I-RM, II-S i III-H) (Slika 21). Prvom osom je objašnjeno 85% diskriminacije. Prva diskriminantna osa najviše izdvaja populaciju II-S (*A. incana*) od ostalih grupa po većim vrednostima za hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid (Tabela 9, Slika 20). Druga diskriminantna osa najviše utiče na odvajanje grupe od četiri stabala (populacija III-H), mogućih hibrida crne i sive jove, od ostalih grupa po većim vrednostima za rubranozid A. Svi podaci u okviru grupa su korektno klasifikovani.



**Slika 21.** DA tri grupe stabala koje je sugerisala PCA: Pozicioniranje individua i grupa u ravni DA1 i DA2.

**Tabela 9.** Srednje vrednosti kanonijskih varijabli.

Populacija	DA1	DA2
I-RM	-3,676	-0,652
II-S	<b>3,912</b>	-0,331
III-H	-1,123	<b>4,671</b>

### 5.1.2. Ispitivanje hemovarijabilnosti populacija *A. glutinosa* (Rimski most) i *A. incana* (Sastavci) uzorkovanih u junu 2015. godine – Diskusija

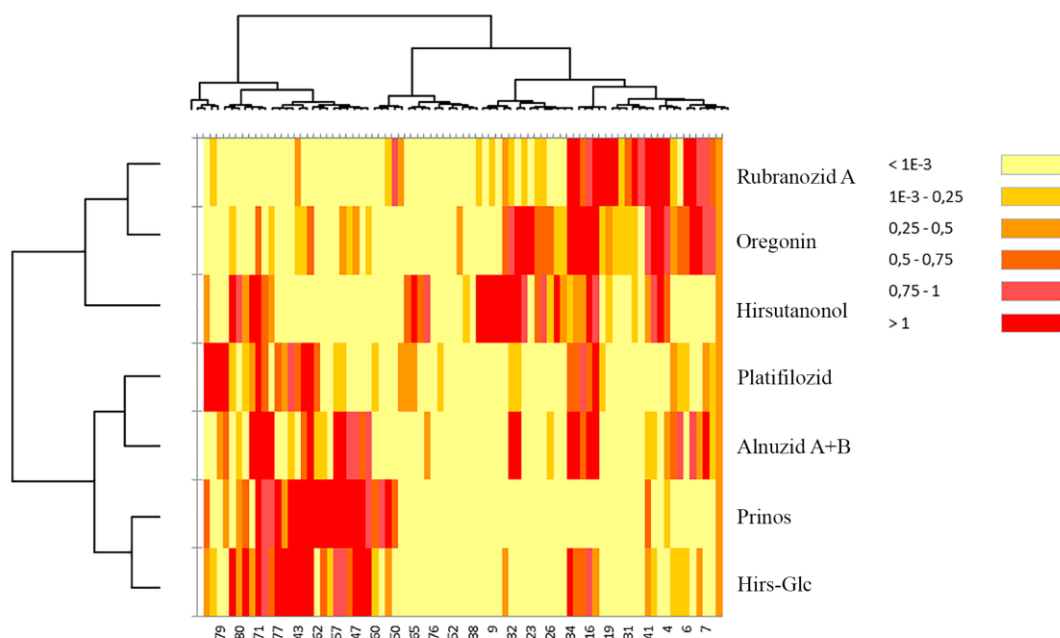
Spontana hibridizacija je uobičajena u simpatričkim populacijama crne i sive jove, mada se javlja sa malom učestalošću (Banaev i Bažant 2007; Bašić i sar. 2014; Poljak i sar. 2014; Vukićević i Jovanović 1983). Mehanizmi izolacije koji onemogućavaju hibridizaciju između vrsta mogu biti preoplodni (ekološke, geografske, fenološke i mehaničke barijere, specifičnost oprašivača, inkompatibilnost polena i stigme) i postoplodni (mortalitet zigota ili embriona, hibridna invijabilnost, hibridna sterilnost, i dr.) (Soltis i Soltis 2009). Jedan od uzroka retke pojave hibrida između crne i sive jove je nepodudarnost fenologije cvetanja: *A. incana* cveta jednu do dve nedelje ranije u odnosu na *A. glutinosa*, zbog čega je učestalost pojavljivanja hibrida veća u tzv. anomalističnim godinama, u uslovima produženih zima i hladnog ranog proleća, kada dolazi do preklapanja perioda cvetanja ovih vrsta (Banaev i Bažant 2007; Prus-Gowacki i Mejnartowicz 1992). Međutim, sigurno je da se javljaju i drugi mehanizmi reproduktivne izolacije ovih vrsta. U kontrolisanim eksperimentima hibridizacije *A. glutinosa* i *A. incana* [Kundziņš (1957) prema Voronova i sar. (2015)], klijavost semena je bila značajno veća u slučajevima kada je *A. incana* korišćena kao materinska biljka (26% germinacije), nego kada je *A. glutinosa* bila materinska biljka (1,5% germinacije). Stoga je verovatnoća nalaženja hibridnih jedinki veća u populaciji Sastavci. Ipak, populacija Rimski most se nalazi na maloj udaljenosti (1,2 km) i nizvodno na reci Moravici od populacije Sastavci, tako da postoji mogućnost pojave hibrida i u populaciji Rimski most, s obzirom na to da je glavni metod rasejavanja ovih vrsta rečnim tokovima.

Hibridizacija predstavlja veoma značajan fenomen u prirodi. Smatra se da je ova pojava odgovorna za poreklo 30 do 80% biljnih vrsta [Stace (1987) prema Gange

(1995)]. Do specijacije dolazi reproduktivnom izolacijom i ekološkom divergencijom hibrida od roditeljskih vrsta (Rieseberg 1997). Genetička distanca između vrsta koje hibridizuju utiče na verovatnoću specijacije nastalih hibrida. Hibridi čije roditeljske vrste imaju veoma slične setove hromozoma će najverovatnije biti visoko fertilni i interfertilni sa parentalnim vrstama, zbog čega će doći do povratnog ukrštanja i spajanja sa jednom od roditeljskih vrsta. Ukoliko se hromozomi roditelja značajno razlikuju, hibridi će verovatno biti visoko infertilni i bez evolutivne budućnosti. Hibridna specijacija je stoga najverovatnija u slučajevima intermedijarne genetičke divergencije između vrsta, pri čemu nastaju slabo fertilni hibridi, što znači da će veći deo nastalih hibridnih jedinki biti sterilno, jedan deo fertilnih jedinki će steći hromozomske strukture roditeljskih vrsta, a jedan deo će imati jedinstveni rekombinantni kariotip sa smanjenom verovatnoćom za ukrštanje sa roditeljskim vrstama i predstavljajući novu stabilnu hibridnu vrstu (Charlesworth 1995; Rieseberg 1997). S obzirom na to da je filogenetska analiza roda *Alnus* na osnovu sekvence ITS regiona jedarnih ribozomskih DNK pokazala da su *A. glutinosa* i *A. incana* deo *A. incana* kompleksa i predstavljaju blisko srodne vrste (Chen i Li 2004), hibridi između ovih vrsta najverovatnije spadaju u prvi tip opisanih hibrida kod kojih dolazi do povratnog ukrštanja sa roditeljima. Sa povratnim ukrštanjem može doći i do introgresije gena jedne roditeljske vrste u drugu, što značajno povećava genetičku varijabilnost odgovarajuće vrste i može dovesti do prenosa ekološki adaptivnih gena iz jedne vrste u drugu (Givnish 2010). Ovi procesi pozitivno utiču na adaptivni potencijal vrste u promenljivim uslovima sredine, a time i na opstanak vrste. Osim toga, genetička varijabilnost hibrida utiče na varijabilnost drugih vrsta. Prema morfološkim, hemijskim i fenološkim karakteristikama hibridi mogu pokazivati intermedijaran položaj u odnosu na roditelje, biti bliži jednom od roditelja, ili ispoljavati potpuno nov i različit fenotip u odnosu na oba roditelja (Banaev i Bažant 2007; Caseys i sar. 2015; Gange 1995; Martin i Willis 2007), što utiče i na druge vrste datog ekosistema. Kroz interakcije sa herbivorima, patogenima i mutualistima, hibridi direktno doprinose biodiverzitetu zajednica u kojima se javljaju i to uglavnom tako što povećavaju zastupljenost i bogatstvo vrsta, a u nekim slučajevima predstavljaju stanište retkim vrstama i novim varijetetima, pa tako utiču i na evoluciju drugih vrsta (Whitham i sar. 1999).

### 5.1.3. Ispitivanje hemovarijabilnosti populacija *A. glutinosa* (Prilički kiseljak, Rimski most) i *A. incana* (Golijska reka, Sastavci) uzorkovanih u aprilu 2016. godine – Rezultati

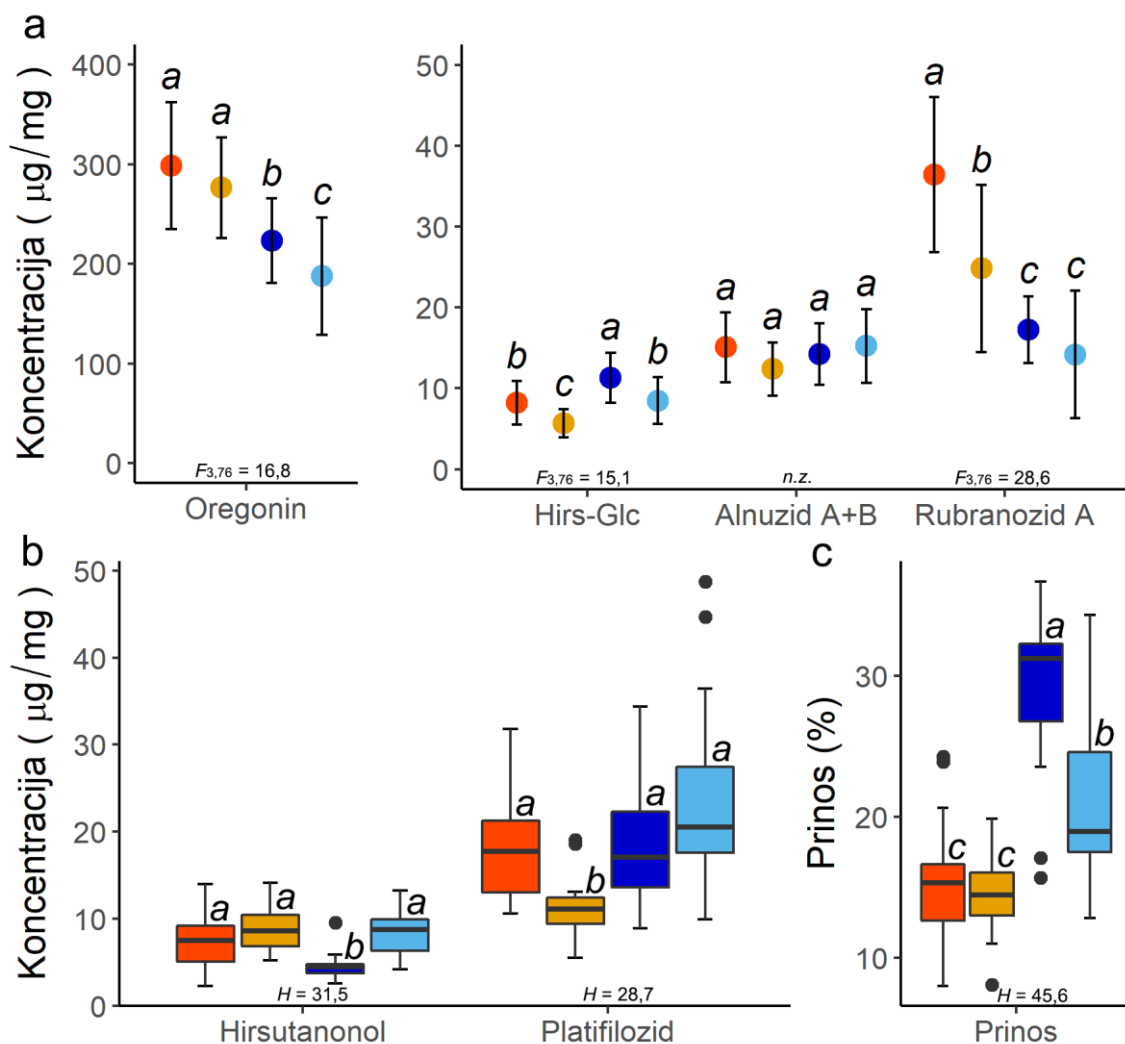
Prvi uvid u sadržaj diarilheptanoida omogućen je pomoću toplotne mape u kojoj tonirane pravougaone površine odgovaraju numeričkim klasama transformisanih podataka iz osnovne tabele (Slika 22). Može se uočiti povišen sadržaj rubranozida A i oregonina u jedinkama *A. glutinosa* (površina gore desno na mapi) i povišen sadržaj hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozida i prinosa ekstrakata u jedinkama *A. incana* (površina dole levo na mapi), što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim prethodne godine (Slika 20).



**Slika 22.** Toplotna mapa sadržaja diarilheptanoida i prinosa ekstrakata kore *Alnus* spp. Oznake individua po populacijama: 1-21 = Prilički kiseljak, 22-41 = Rimski most, 42-62 = Golijska reka, 63-80 = Sastavci. Brojevi na osi označavaju nasumično odabrane individue.

Osnovni pokazatelji deskriptivne statistike i poređenje sadržaja diarilheptanoida i prinosa ekstrakata kore *Alnus* spp. prikazani su na Slici 23. Statistički značajne razlike su više izražene između „čistih“ populacija Prilički kiseljak i Golijska reka nego između bliskih populacija Rimski most i Sastavci. Između jedinki „čistih“ populacija razlike ne

postoje u sadržaju platifilozida, a između jedinki bliskih populacija razlike ne postoje u sadržaju hirsutanonola.

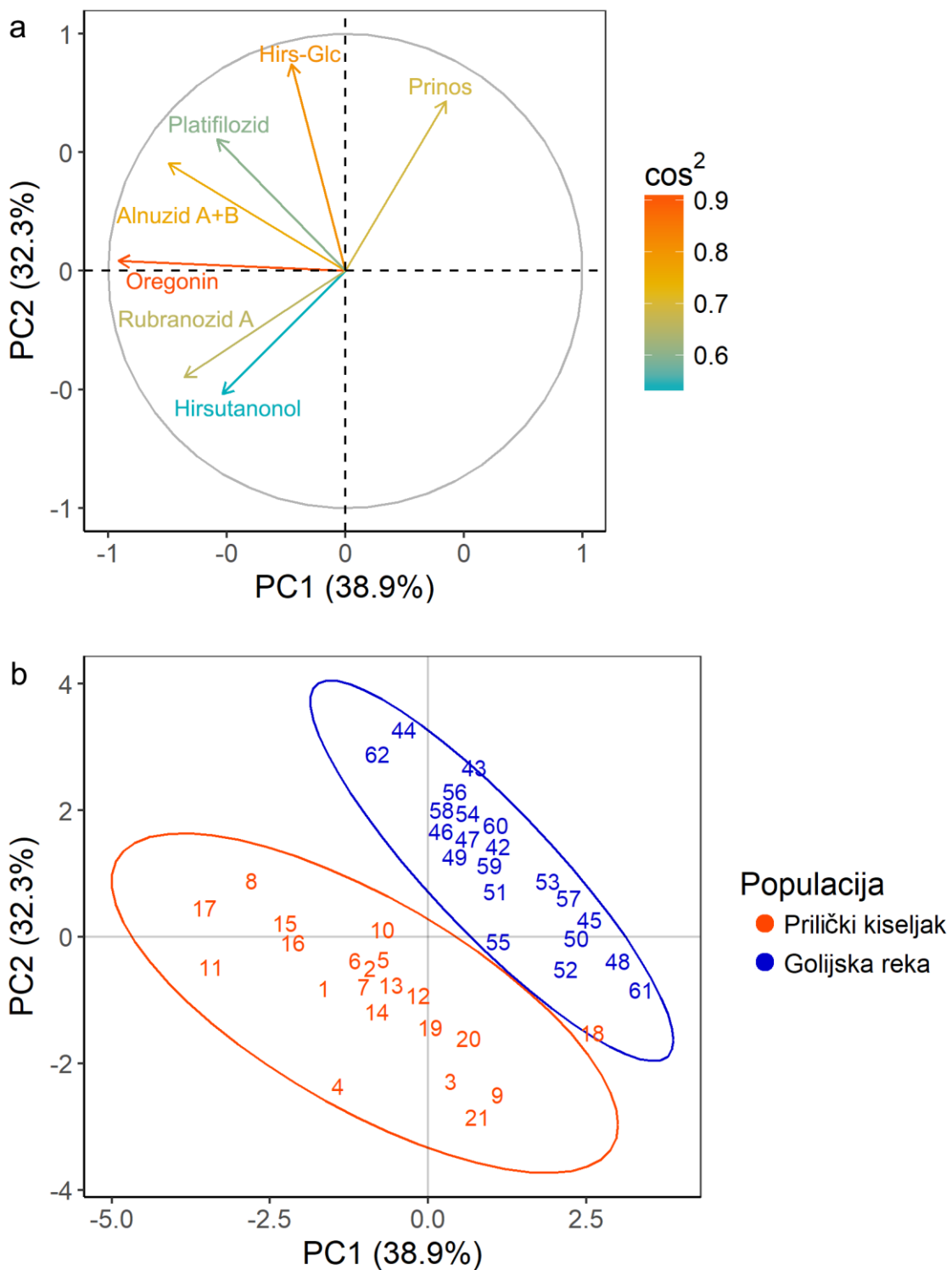


**Slika 23.** Poređenje četiri populacije *A. glutinosa* (● Prilički kiseljak, ● Rimski most) i *A. incana* (● Golijska reka, ● Sastavci) na osnovu srednjih vrednosti (a) i medijana (b, c) koncentracija diarilheptanoida ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  etanolnog ekstrakta) i prinosa ekstrakata (% w/w).  $F$  (sa brojem stepeni slobode) i  $H$  vrednosti su test statistike dobijene iz ANOVA i Kruskal-Wallis testova, respektivno. Vertikalni stubovi predstavljaju opseg srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (a), odnosno raspon između najmanje i najveće tačke na maksimalnoj udaljenosti  $1,5 \times \text{IQR}$  od donjeg, odnosno gornjeg kvartila, respektivno (b, c). Homogene grupe (a, b, c) dobijene su na osnovu odgovarajućih *post hoc* testova na 95% nivou pouzdanosti; *n.z.* = nema značajnih razlika između srednjih vrednosti, odnosno medijana ( $P > 0,05$ ).

### 5.1.3.1. Hemovarijabilnost udaljenih populacija *A. glutinosa* (Prilički kiseljak) i *A. incana* (Golijska reka)

Da bi se procenilo u kakvim međusobnim odnosima stoje dve relativno udaljene populacije crne i sive jove, urađena je analiza glavne komponente sa podacima dobijenim za Prilički kiseljak i Golijsku reku. PCA je rezultovala u dvokomponentnom modelu koji objašnjava 71,2% ukupne varijanse u podacima (PC1 38,9%, PC2 32,3%) (**Slika 24**). Na osnovu sume  $\cos^2$  u planu prve dve ose, može se zaključiti da su najbolje reprezentovana svojstva oregonin (suma  $\cos^2 > 0,90$ ) i hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid (suma  $\cos^2 > 0,80$ ), odnosno da ova svojstva imaju najvažniju ulogu u ukupnoj varijabilnosti fenomena koji se istražuje. Na formiranje prve ose najviše utiče oregonin, a na formiranje druge ose hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid. Struktura svojstava i njihovi odnosi vidljivi su na **Slici 24a**. Tendencije među elementima (individuama), njihova grupisanja, odnosno razdvajanja, vidljiva su u planu prve dve PC ose na **Slici 24b**. Opšti je utisak jasnog razdvajanja populacija Prilički kiseljak i Golijska reka. Sličnost postoji samo u sadržaju platifilozida, dok su vrednosti ostalih komponenti uglavnom u međusobnim kontrastima (**Slika 23**). Individue populacije Golijska reka dale su veći prinos ekstrakata i imaju veći sadržaj hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozida, a siromašnije su u sadržaju hirsutanonola, rubranozida A i oregonina u odnosu na individue populacije Prilički kiseljak.

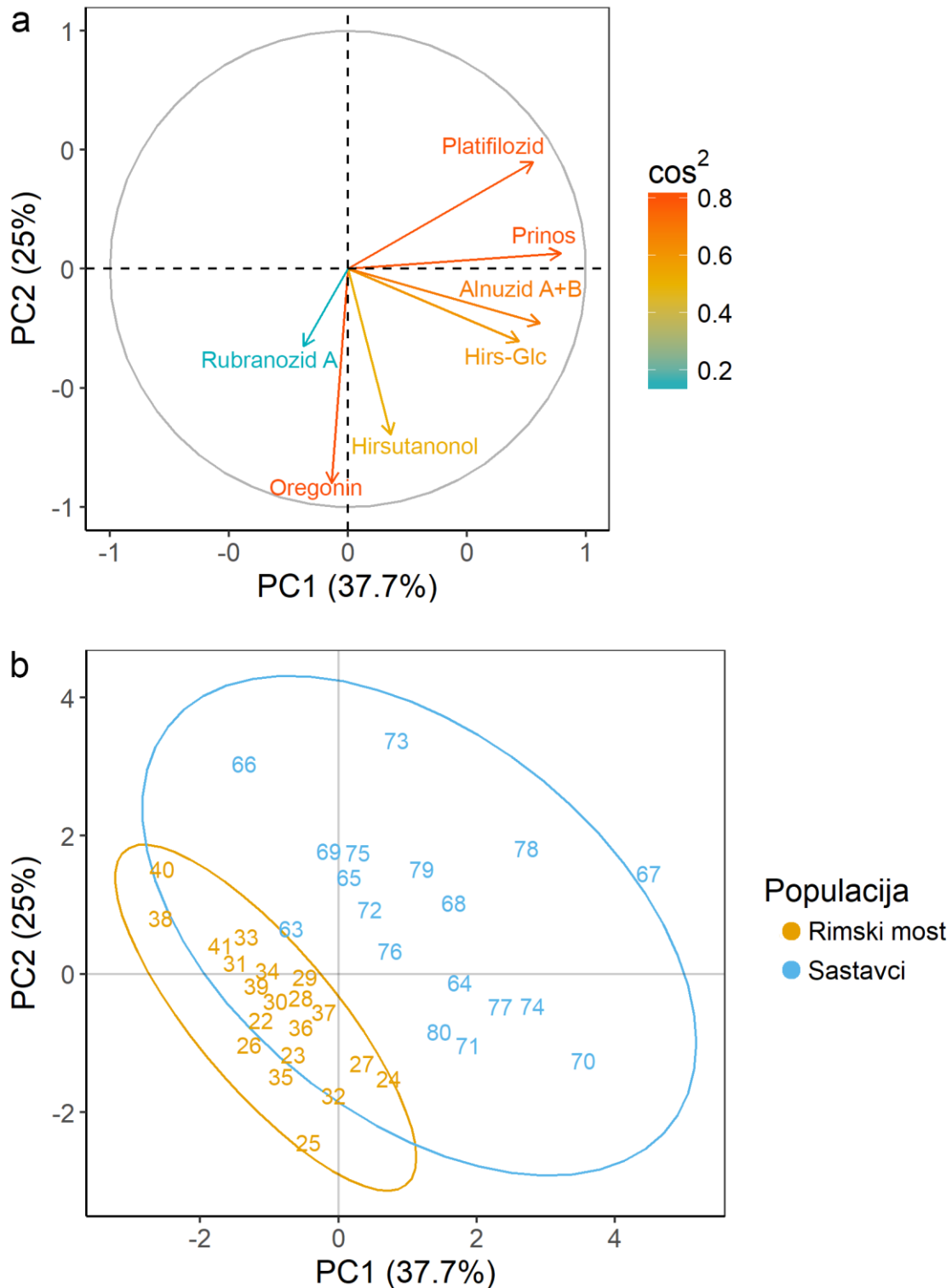




**Slika 24.** PCA: Pozicioniranje varijabli (a) i uzoraka (b) 42 individue iz populacija Prilički kiseljak (*A. glutinosa*) i Golijska reka (*A. incana*) (2016. godina) u ravni prve dve glavne komponente. Elipse opisuju oblasti pouzdanosti na 95% nivou pouzdanosti.

### 5.1.3.2. Hemovarijabilnost geografski bliskih populacija *A. glutinosa* (Rimski most) i *A. incana* (Sastavci)

Analiza glavne komponente urađena na setu podataka za dve bliske populacije crne i sive jove rezultovala je u trokomponentnom modelu koji objašnjava 79,6% ukupne varijanse u podacima (PC1 37,7%, PC2 25,0%, PC3 16,9%) (**Slika 25**). Najpouzdanije reprezentovana svojstva u planu prve dve ose su oregonin, platifilozid, prinos i alnuzid A i B ( $0,70 < \text{suma } \cos^2 < 0,80$ ), te ova svojstva najviše doprinose varijabilnosti fenomena koji se istražuje. Na formiranje prve ose najviše utiču prinos, alnuzid A i B i platifilozid. Na formiranje druge ose najviše utiče oregonin. Struktura svojstava i njihovi odnosi vidljivi su na **Slici 25a**. Grupisanje, odnosno razdvajanje, individua u planu prve dve ose prikazano je na **Slici 25b**. S obzirom na preklapanje elipsi poverenja, stiče se opšti utisak da su individue bliskih populacija Rimski most i Sastavci međusobno sličnije u odnosu na individue iz „čistih“ populacija Prilički kiseljak i Golijska reka. Individue populacije Rimski most su bogatije u sadržaju oregonina i rubranozida A, a siromašnije u sadržaju platifilozida i imaju manji prinos ekstrakata u odnosu na individue populacije Sastavci. Ono što zbližava ove dve populacije je sadržaj hirsutanonola (**Slika 23**).



**Slika 25.** PCA: Pozicioniranje varijabli (a) i uzoraka (b) 38 individua iz populacija Rimski most (*A. glutinosa*) i Sastavci (*A. incana*) (2016. godina) u ravni prve dve glavne komponente. Elipse opisuju oblasti pouzdanosti na 95% nivou pouzdanosti.

### 5.1.3.3. Intra- i interspecijska hemovarijabilnost *A. glutinosa* i *A. incana*

Osnovni parametri deskriptivne statistike za svako svojstvo i populaciju dati su u **Tabeli 10** i na **Slici 23**. Rezultati poređenja vrsta, gde su uzete srednje vrednosti, odnosno medijane za obe populacije u svakoj vrsti, dati su u **Tabeli 11**. PCA je urađena na setu podataka sve četiri populacije *A. glutinosa* i *A. incana* (**Slika 26**), gde su dve udaljene populacije (Prilički kiseljak i Golijska reka) poslužile kao predstavnici „čistih“ populacija, tj. pretpostavljeno je da se u ovim populacijama ne javljaju hibridne jedinice. PCA je rezultovala u trokomponentnom modelu koji objašnjava 76% ukupne varijanse. Najpouzdanije reprezentovana svojstva u planu PC1 i PC2 su oregonin, prinos ekstrakata, alnuzid A i B i hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid ( $0,65 < \text{suma } \cos^2 < 0,85$ ) – ova svojstva imaju značajnu ulogu u ukupnoj varijabilnosti fenomena koji se istražuje. Hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid i oregonin su imali najveći uticaj na formiranje PC1 i PC2, respektivno. Struktura svojstava i njihovi odnosi prikazani su na **Slici 26a**. Grupisanje elemenata uočljivo je u ravni prve dve PC ose (**Slika 26b**). Sve populacije pokazuju izražen unutarpopulacioni varijabilitet. Premda su populacije heterogene po karakteristikama individua i delimično se preklapaju, intraspecijske razlike su primetne: individue populacija Prilički kiseljak i Rimski most (*A. glutinosa*) međusobno se razlikuju u koncentraciji hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozida, platifilozida i rubranozida A, dok se individue iz populacija Golijska reka i Sastavci (*A. incana*) razlikuju po sadržaju hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozida, oregonina, hirsutanonola i prinosu ekstrakata (**Slika 23**). Najheterogenija je populacija Sastavci, odnosno ova populacija pokazuje najveću varijabilnost u karakteristikama. Opšti utisak je da geografska bliskost povećava hemijsku sličnost populacija Rimski most i Sastavci.

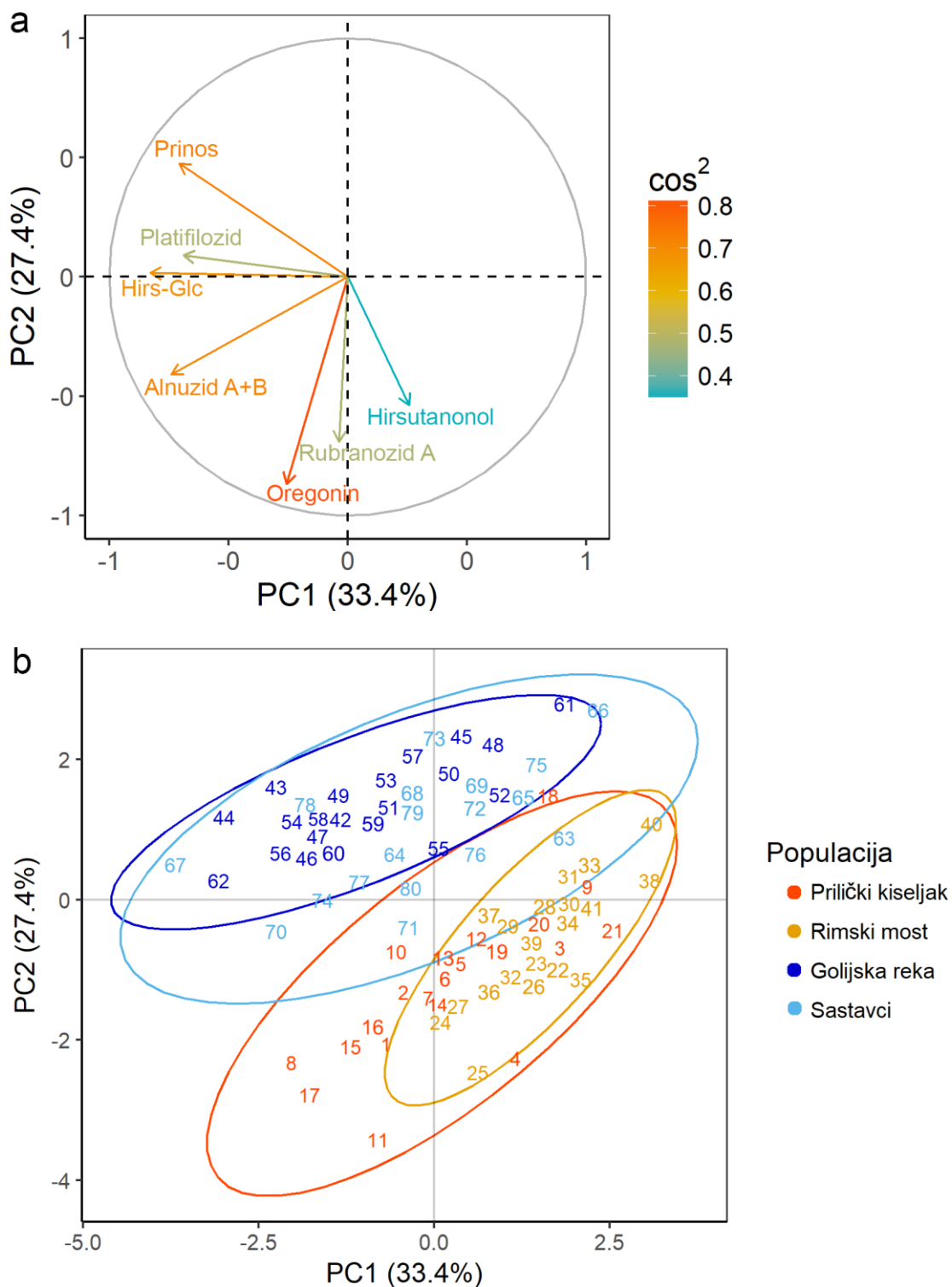
**Tabela 10.** Deskriptivna statistika ispitivanih svojstava kore u populacijama *A. glutinosa* (Prilički kiseljak, Rimski most) i *A. incana* (Golijska reka, Sastavci) uzorkovanim u aprilu 2016. godine.

Svojstvo	Prilički kiseljak			Rimski most			Golijska reka			Sastavci		
	Srednja vrednost <sup>1</sup>	Medijana	CV <sup>2</sup>	Srednja vrednost	Medijana	CV	Srednja vrednost	Medijana	CV	Srednja vrednost	Medijana	CV
Hirsutanonol- 5-O-β-D- glukopiranozid	8,20	8,18	32,91	5,70	5,50	30,55	11,30	11,21	27,45	8,48	8,53	34,47
Oregonin	298,75	302,62	21,35	276,60	273,11	18,23	223,33	236,05	18,94	187,65	187,84	31,43
Hirsutanonol	7,73	7,45	40,35	8,74	8,57	27,93	4,52	4,50	31,32	8,36	8,70	29,39
Alnuzid A+B	15,07	15,52	28,48	12,39	12,13	26,74	14,23	14,72	26,63	15,23	13,77	30,07
Platifilozid	17,55	17,72	29,71	11,04	11,11	31,70	17,97	17,09	32,79	23,67	20,56	44,76
Rubranozid A	36,43	35,13	26,30	24,82	23,70	41,58	17,25	16,41	24,05	14,19	11,23	55,38
Prinos	15,10	15,33	28,71	14,50	14,44	19,25	29,04	31,22	19,22	20,90	18,96	26,52

<sup>1</sup>Koncentracija ekstrakata izražena je u µg diarilheptanoida/mg ekstrakta, a prinos u procentima (% w/w); <sup>2</sup>CV, koeficijent varijacije – relativna standardna devijacija.

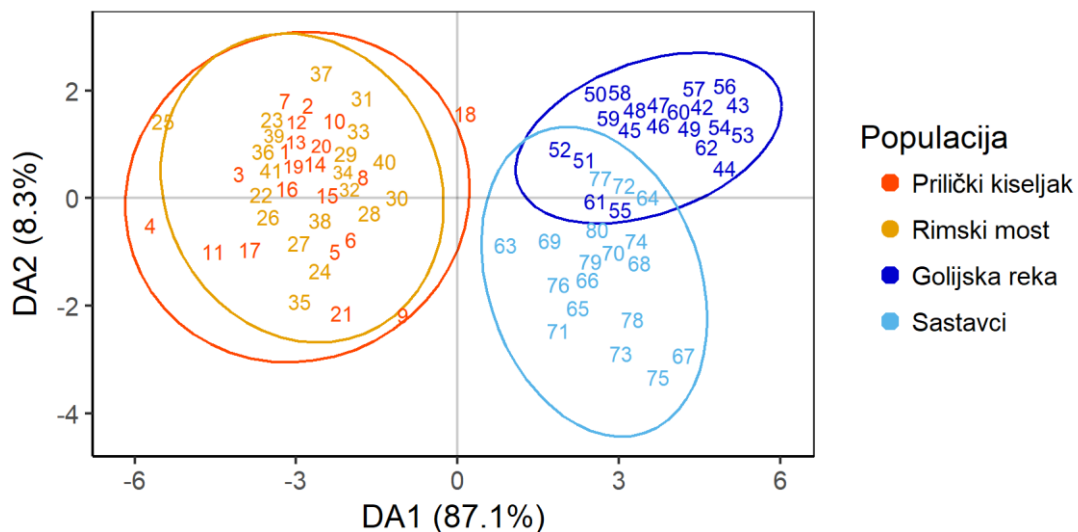
**Tabela 11.** Poređenje *A. glutinosa* i *A. incana* na osnovu srednjih vrednosti, odnosno medijana.

Svojstvo	<i>Alnus glutinosa</i>			<i>Alnus incana</i>			<i>F</i>	<i>H</i>	<i>P</i>
	Srednja vrednost	Medijana	CV	Srednja vrednost	Medijana	CV			
Hirsutanonol-5- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukopiranozid	6,98	6,71	37,04	10,00	9,86	33,03	20,85	-	<0,001
Oregonin	287,94	285,44	20,15	206,86	210,86	25,68	42,36	-	<0,001
Hirsutanonol	8,22	7,81	34,30	6,29	5,36	43,56	-	9,82	<0,01
Alnuzid A+B	13,76	13,05	29,31	14,69	14,59	28,23	1,03	-	>0,05
Platifilozid	14,37	12,98	38,28	20,60	18,71	42,54	-	12,92	<0,001
Rubranozid A	30,77	29,70	37,20	15,84	16,02	39,47	51,69	-	<0,001
Prinos	14,81	14,84	24,53	25,28	26,00	27,13	-	39,81	<0,001



**Slika 26.** PCA: Pozicioniranje varijabli (a) i uzoraka (b) 80 individua iz četiri ispitane populacije *A. glutinosa* (Prilički kiseljak, Rimski most) i *A. incana* (Golijska reka, Sastavci) (2016. godina) u ravni prve dve glavne komponente. Elipse opisuju oblasti pouzdanosti na 95% nivou pouzdanosti.

DA je korišćena za diskriminaciju grupa koje su *a priori* definisane, kao i za razvrstavanje elemenata u okviru tako definisanih grupa (Slika 27). Sve tri dobijene diskriminantne funkcije su statistički značajne ( $\chi^2$  test,  $P < 0,001$ ). Prvom osom je objašnjeno 87,1% diskriminacije. Prva diskriminantna funkcija najviše izdvaja populaciju Golijska reka od ostalih populacija po većim vrednostima za hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid i prinos (Tabela 12, Slika 27, Slika 23). Druga diskriminantna funkcija je odvojila populaciju Sastavci od ostalih grupa po nižim vrednostima za oregonin i višim vrednostima za hirsutanonol. Ukupno 68 od 80 (85%) podataka je korektno klasifikovano, s tim što nema pogrešne klasifikacije između vrsta, već samo između populacija unutar vrsta (Tabela 13).



**Slika 27.** DA četiri populacije *A. glutinosa* (Prilički kiseljak, Rimski most) i *A. incana* (Golijska reka, Sastavci) (2016. godina): Pozicioniranje individua i populacija u ravni DA1 i DA2. Elipse opisuju oblasti pouzdanosti na 95% nivou pouzdanosti.

**Tabela 12.** Srednje vrednosti kanonijskih varijabli.

Populacija	DA1	DA2	DA3
Prilički kiseljak	-2,979	0,025	0,951
Rimski most	-2,892	0,191	<b>-1,002</b>
Golijska reka	<b>3,553</b>	1,119	0,062
Sastavci	2,544	<b>-1,547</b>	-0,068



**Tabela 13.** Klasifikaciona matrica.<sup>1</sup>

Populacija	Prilički kiseljak <i>P</i> = 0,26	Rimski most <i>P</i> = 0,25	Golijska reka <i>P</i> = 0,26	Sastavci <i>P</i> = 0,23	% tačnosti
Prilički kiseljak	17	4	0	0	81
Rimski most	3	17	0	0	85
Golijska reka	0	0	19	2	90
Sastavci	0	0	3	15	83
Ukupno	20	21	22	17	85

<sup>1</sup>Redovi prikazuju utvrđenu klasifikaciju, a kolone klasifikaciju pretpostavljenu na osnovu klasifikacionih funkcija (sa *a priori* verovatnoćom određenom na osnovu veličine svake grupe), tako da se na dijagonali nalaze ispravne klasifikacije, a van dijagonala pogrešne; u poslednjoj koloni dat je procenat ispravno klasifikovanih jedinki za svaku populaciju.

#### 5.1.4. Ispitivanje hemovarijabilnosti populacija *A. glutinosa* (Prilički kiseljak, Rimski most) i *A. incana* (Golijska reka, Sastavci) uzorkovanih u aprilu 2016. godine – Diskusija

Kvantitativna varijabilnost diarilheptanoida unutar populacija vrsta *A. glutinosa* i *A. incana* je vrlo izražena (Slika 26b, Tabela 10). Preklapajući se sa svim populacijama na grafikonu, populacija Sastavci (*A. incana*) pokazuje najveću disperziju individua. Jedan od razloga mogao bi biti pojava hibrida u ovoj populaciji koja se nalazi na maloj udaljenosti (1,2 km) od populacije Rimski most (*A. glutinosa*). Čeng i saradnici su, nadovezujući se na radove Risberga i saradnika (Rieseberg i sar. 1993) i Oriansa (Oriens 2000), sumirali dotadašnje rezultate istraživanja kvalitativnih i kvantitativnih varijacija sekundarnih metabolita u hibridima različitih vrsta (Cheng i sar. 2011). Oko 70% ispitanih jedinjenja bilo je eksprimirano i kod oba roditelja i kod hibrida, 24% jedinjenja se nije javljalo u hibridima, a oko 6% su bila novosintetisana jedinjenja, koja nisu bila prisutna ni kod jednog roditelja. Kvantitativno, 31% sekundarnih metabolita je u hibridima bilo eksprimirano u koncentracijama bliskim roditeljskim (kada su kod oba roditelja bili prisutni u sličnim koncentracijama), 21% je bilo blisko jednom od roditelja, a 28% se nalazilo u intermedijarnim koncentracijama; 11% je bilo prisutno u značajno većoj, a 9% u značajno manjoj koncentraciji u hibridima u odnosu na roditelje. Ovi podaci se odnose na hibride F1 i F2 generacije, kao i na povratno ukrštene jedinice sa nekom od roditeljskih vrsta. Iz priložene statistike

može se zaključiti da hibridi pokazuju veliku kvantitativnu varijabilnost hemijskih karakteristika. Oni se mogu naći u oblasti preklapanja elipsi poverenja populacija Rimski most i Sastavci (**Slike 25b i 26b**), ali mogu predstavljati i pojedinačne individue koje se izoluju od grupe.

Analiza glavne komponente sve četiri populacije je pokazala karakteristično odvajanje grupa (**Slika 26b**). S obzirom na to da su individue *A. incana* pretežno skoncentrisane u gornjem levom kvadrantu, a individue *A. glutinosa* u donjem desnom, može se zaključiti da su obe ose uticale na razdvajanje vrsta. PC2 osa je dodatno grupisala populacije po geografskom i visinskom gradijentu: populacija Golijska reka se nalazi najjužnije i na najvećoj nadmorskoj visini, slede populacije Sastavci, Rimski most i na kraju Prilički kiseljak koja je locirana najsevernije, na najmanjoj nadmorskoj visini. Golijska reka je najbolje izdvojena od ostalih grupa na DA grafikonu, što bi moglo biti posledica drugačijih klimatskih uslova lokaliteta ove populacije (**Tabela 1**), koji se nalazi na najvećoj nadmorskoj visini (1396 m) u odnosu na lokalitete ostalih populacija (500-700 m). Biljke sintetišu sekundarne metabolite kao odgovor na različite abiotičke (temperaturu, UV zračenje, mraz, sušu) i biotičke stresore (herbivore i parazite) u cilju zaštite, odbrane i sticanja kompetitivne prednosti; ova jedinjenja posreduju u interakcijama biljaka sa okolnim živim svetom – sa drugim biljkama, polinatorima, mikroorganizmima korenovog sistema i ostalim mutualistima, kompetitorima i patogenima. Svi ovi faktori variraju kroz prostor i vreme, uzrokujući varijabilnost sekundarnih metabolita u populacijama sa različitih lokaliteta koja omogućava populacijama da se adaptiraju na različite uslove promenljive sredine.

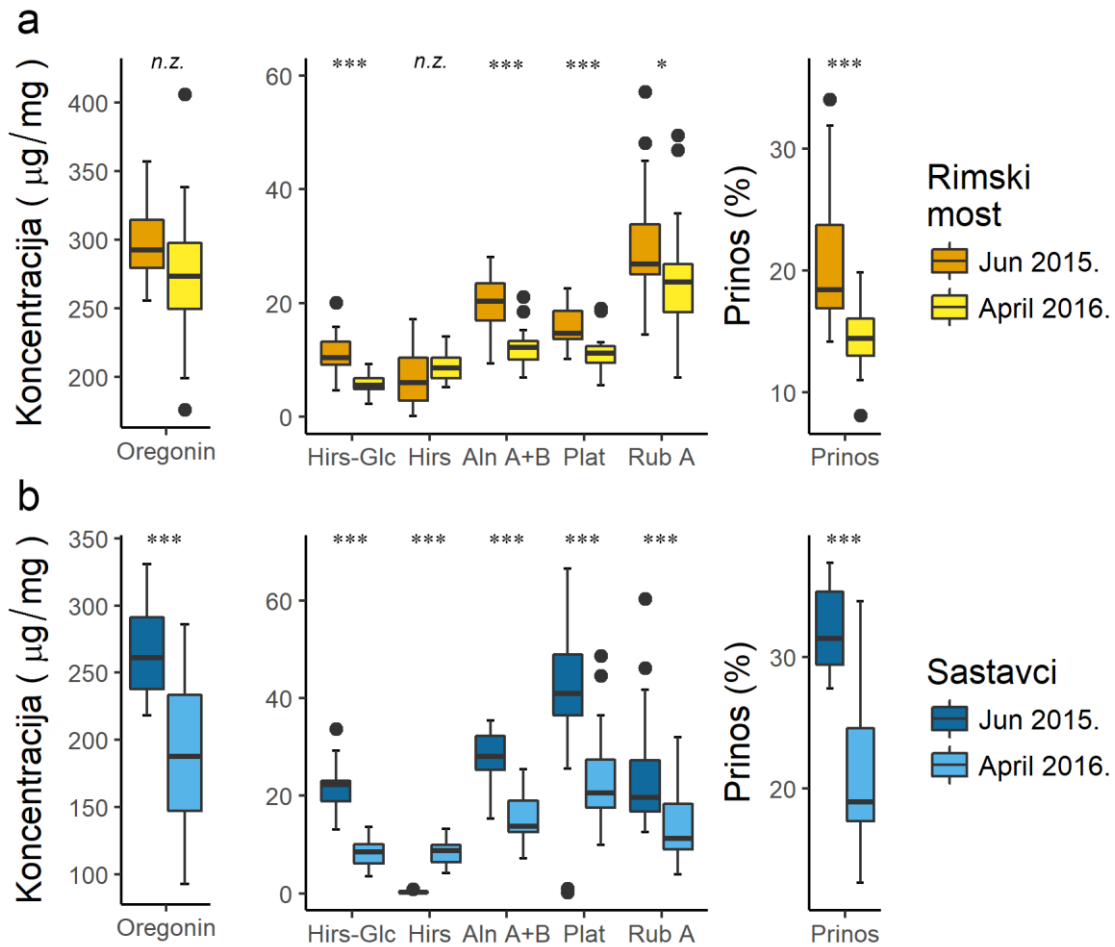
Različiti faktori će imati drugačiji uticaj na pojedine delove biljke u pogledu sinteze sekundarnih metabolita. U listu dolazi do nakupljanja jedinjenja značajnih za zaštitu od suše, ekstremnih temperatura i UV-B zračenja, u korenu, listu i drugim organima akumuliraju se jedinjenja sa alelopatiskim efektom, a u kori i listu jedinjenja koja će odbijati herbivore (Bailie i sar. 2016; McCune i Johns 2007). Za koru su značajna i jedinjenja koja učestvuju u odbrani od mikroorganizama. Eksperimenti *in vitro* su pokazali da diarilheptanoidi učestvuju i u odbijanju herbivora, a imaju i antibakterijska i antifungalna svojstva (Novaković i sar. 2015; Saxena i sar. 1995; Sunnerheim i sar. 1988), pa bi njihova biosinteza mogla biti indukovana ovim

faktorima. Biljke vlažnih staništa kao što su jove potencijalno su podložne mikrobnim infekcijama, pa bi se grupisanje individua i izdvajanje populacije Golijska reka na grafikonima PCA i DA moglo objasniti većom količinom padavina na ovom lokalitetu i stoga drugačijom biosintezom i akumulacijom sekundarnih metabolita. Na primer, individue iz populacije Golijska reka imale su, u odnosu na individue iz populacije Sastavci, značajno veću koncentraciju oregonina (**Slika 23**), koji ima izrazito antibakterijsko i antifungalno dejstvo (Abedini i sar. 2016; Novaković i sar. 2015).

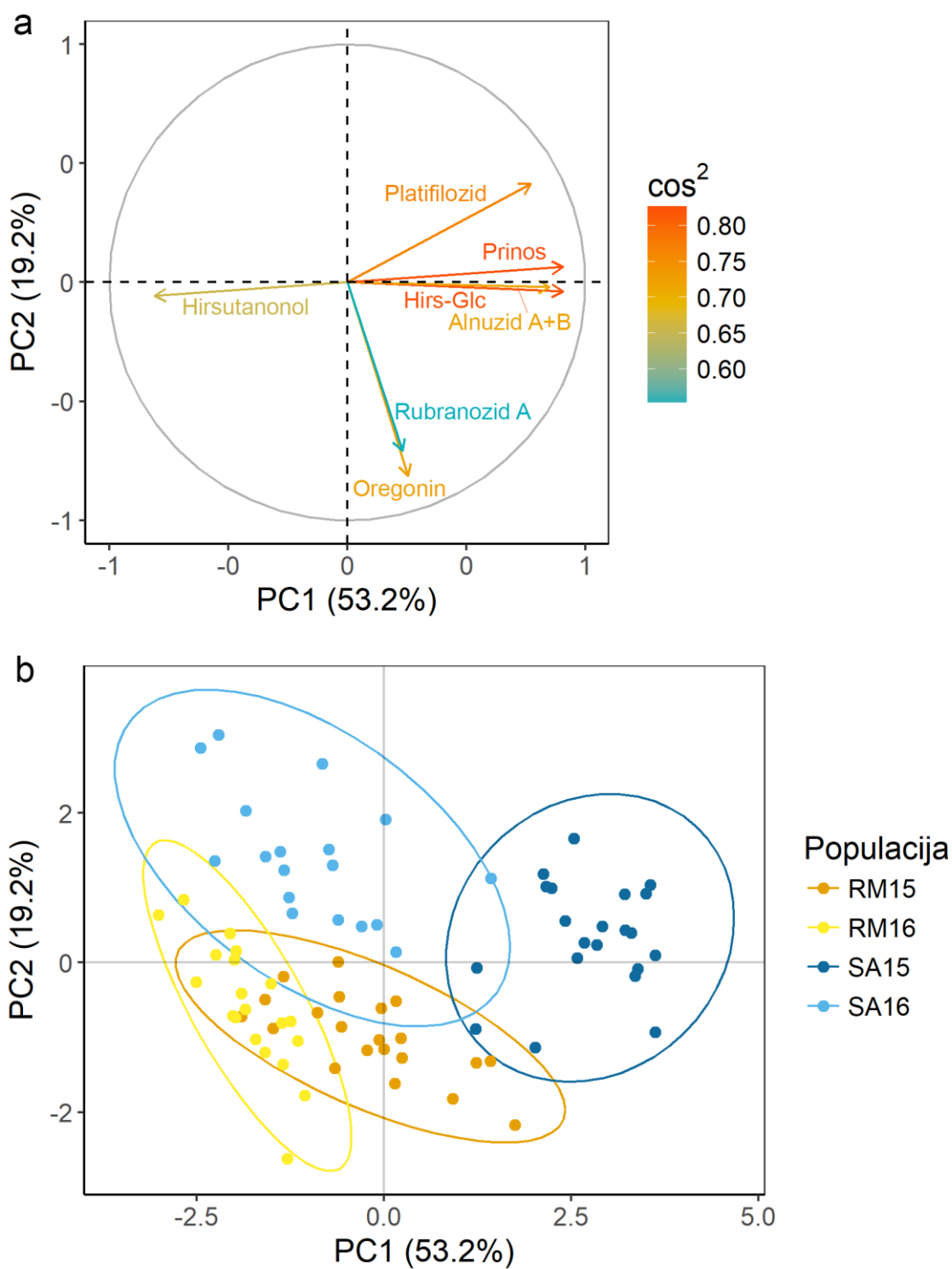
#### **5.1.5. Ispitivanje sezonske varijabilnosti populacija *A. glutinosa* (Rimski most) i *A. incana* (Sastavci) uzorkovanih u junu 2015. i aprilu 2016. godine – Rezultati**

Populacije Rimski most i Sastavci uzorkovane u dve različite sezone upoređene su u cilju sticanja uvida u sezonsku varijabilnost. Na **Slici 28** se može videti da između sezona postoje značajne razlike u koncentraciji svih varijabli po populaciji, osim u koncentraciji oregonina i hirsutanonola u populaciji Rimski most. Osim toga, kora uzorkovana u junu 2015. godine pokazuje veće vrednosti svih varijabli u odnosu na koru iz aprila 2016. godine, izuzev hirsutanonola u populaciji Sastavci, koji je u značajno većoj koncentraciji prisutan u stablima uzorkovanim u aprilu 2016. godine.

Analiza glavne komponente je rezultovala u dvokomponentnom modelu koji objašnjava 72,4% ukupne varijanse u podacima (PC1 53,2%, PC2 19,2%) (**Slika 29**). Najpouzdanije reprezentovana svojstva u planu PC1 i PC2 su prinos, hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid, platifilozid, oregonin i alnuzid A i B ( $0,70 < \text{suma } \cos^2 < 0,85$ ). Struktura svojstava i njihovi odnosi prikazani su na **Slici 29a**, a grupisanje individua u ravni prve dve PC ose na **Slici 29b**. PC1 je najviše uticala na izdvajanje grupe individua koje pripadaju populaciji Sastavci (jun 2015.) od ostalih grupa usled većeg sadržaja hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozida, platifilozida, alnuzida A i B, manjeg sadržaja hirsutanonola, kao i većeg prinosa etanolnih ekstrakata kore individua iz ove populacije u odnosu na individue iz ostalih grupa. U odnosu na PC2, najbolje se odvojila grupa individua iz populacije Sastavci (april 2016.) koja se od ostalih grupa razlikuje po nižem sadržaju oregonina i rubranozida A.



**Slika 28.** Sezonske razlike u koncentraciji diarilheptanoida i prinosu etanolnih ekstrakata kore u populacijama Rimski most (*A. glutinosa*) (a) i Sastavci (*A. incana*) (b). Iznad boks dijagrama prikazane su statistički značajne razlike između populacija: n.z. = nema značajnih razlika,  $P > 0,05$ ; \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ .



**Slika 29.** PCA: Pozicioniranje varijabli (a) i uzoraka (b) 80 individua iz populacija Rimski most (RM15 i RM16) (*A. glutinosa*) i Sastavci (SA15 i SA16) (*A. incana*) uzorkovanih u dve sezone (jun 2015. i april 2016. godine), u ravni prve dve glavne komponente. Elipse opisuju oblasti pouzdanosti na 95% nivou pouzdanosti.

### 5.1.6. Ispitivanje sezonske varijabilnosti populacija *A. glutinosa* (Rimski most) i *A. incana* (Sastavci) uzorkovanih u junu 2015. i aprilu 2016. godine – Diskusija

Do sezonske varijabilnosti sekundarnih metabolita može doći usled delovanja različitih abiotičkih i biotičkih faktora. Sezonske promene i spoljašnji uslovi kao što su svetlost, temperatura i vlažnost vazduha utiču i na kvantitativni i na kvalitativni sadržaj sekundarnih metabolita (Szakiel i sar. 2011). U **Tabeli 14** su prikazani osnovni klimatološki podaci za sezone u kojima su uzorkovane populacije. Podaci su preuzeti iz Meteoroloških godišnjaka za 2015. i 2016. godinu objavljenih na sajtu Republičkog hidrometeorološkog zavoda Republike Srbije. Odabrana je merna stanica Kaona kao stanica koja je najbliža ispitivanim populacijama (43°43'N, 20°25'E; 606 m). Primetne su znatne razlike u temperaturi i padavinama u dve sezone.

**Tabela 14.** Osnovni klimatološki podaci za dve sezone uzorkovanja. Preuzeto sa sajta [http://www.hidmet.gov.rs/ciril/meteorologija/klimatologija\\_godisnjaci.php](http://www.hidmet.gov.rs/ciril/meteorologija/klimatologija_godisnjaci.php).

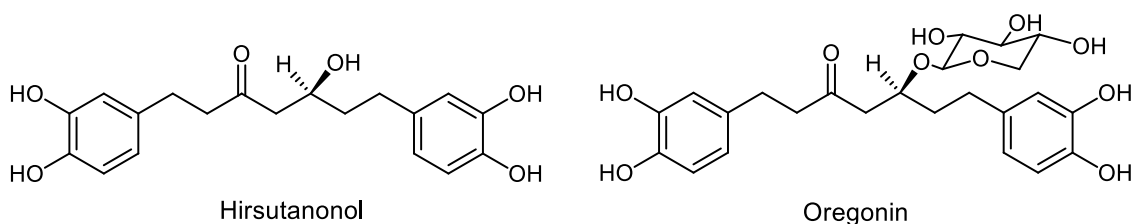
Mesec	Temperatura vazduha (°C)			Napon vodene pare (mb)	Padavine (mm)	Broj dana sa kišom
	max	min	sr	sr	ukupne	
Jun 2015.	23,7	12,9	17,9	16,1	148,6	14
April 2016.	19,6	7,8	13,1	10,4	64,8	8

Kao što se vidi iz **Tabele 14**, različiti vremenski uslovi obeležili su sezone u kojima je sakupljana kora. Jun 2015. godine okarakterisale su više temperature, ali ono što se možda još više ističe su znatno veće količine padavina u odnosu na april 2016. godine. Biljke vlažnih staništa kao što su jove konstantno su izložene stresu vezanom za plavljenje koji može dovesti do razvoja bakterijskih i gljivičnih infekcija, što uslovljava potrebu za adekvatnom antimikrobnom odbranom (McCune i Johns 2007). Stres postaje izraženiji tokom vlažnih meseci, čime bi se mogla objasniti znatno veća količina diarilheptanoida u junu u odnosu na april (**Slika 28**). U brojnim naučnim radovima je pokazana antimikrobna aktivnost diarilheptanoida i diarilheptanoidnih biljnih ekstrakata. U radu Novaković i sar. (2015) dokazana je antibakterijska i antifungalna aktivnost diarilheptanoida izolovanih iz kore zelene i crne jove. Neka od ovih jedinjenja

pokazala su bolju aktivnost od komercijalnih antibiotika i antimikotika. Choi i sar. (2012) su pokazali da etanolni ekstrakt kore *Alnus pendula* poseduje antibakterijsku aktivnost protiv sojeva *Staphylococcus aureus* otpornih na meticilin, a najaktivnija jedinjenja ekstrakta bila su oregonin i hirsutenon. Diarilheptanoidi izolovani iz kore *A. viridis* ssp. *viridis* i *A. glutinosa* negativno utiču na biosintezu signalnih molekula kvorum sensinga kod *P. aeruginosa*, čime inhibiraju stvaranje biofilma i smanjuju virulentnost ovog patogena (Ilic-Tomic i sar. 2017).

Izdvajanje populacije Sastavci uzorkovane u junu 2015. godine (SA15) na PCA grafikonu po PC1 osi u odnosu na ostale grupe (RM15, RM16, SA16) (**Slika 29b**) usled viših koncentracija hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozida, platifilozida, alnuzida A i B, i većeg prinosa ekstrakta kore, navodi na pretpostavku da je do indukcije i povećane sinteze ovih odbrambenih jedinjenja došlo pod uticajem dejstva neke vrste stresora, ili kombinovanog uticaja više faktora. Premda se populacije Rimski most (*A. glutinosa*) i Sastavci (*A. incana*) međusobno značajno razlikuju prema ispitivanim varijablama (**Slike 20 i 23**), trend promene koncentracije diarilheptanoida i prinosa ekstrakata u ove dve vrste je sličan: u aprilu su prisutne značajno manje koncentracije većine jedinjenja u odnosu na jun, što bi moglo biti uslovljeno promenama temperature i padavina (**Tabela 14**). Izuzetak od ovog trenda predstavljaju hirsutanonol i oregonin. Za individue iz populacije Rimski most nisu utvrđene značajne sezonske razlike u koncentracijama ovih jedinjenja, dok u populaciji Sastavci postoje značajne razlike po sezonama: koncentracija oregonina je bila značajno veća, a koncentracija hirsutanonola značajno manja u junu u odnosu na april (**Slika 28**). Hirsutanonol je aglikon oregonina (**Slika 30**) i moguće je da se oba ova jedinjenja konstitutivno sintetišu tokom cele godine u određenoj količini kod obe vrste, a da je glikozilacija hirsutanonola u oregonin u individuama iz populacije Sastavci bila indukovana nekim spoljašnjim faktorom u junu 2015. godine, patogenom ili herbivorom. Vezivanje šećerne grupe za različite supstrate katalizuju enzimi glikoziltransferaze koji učestvuju u regulaciji metabolita fenilpropanoidnog puta u kom nastaju brojni sekundarni metaboliti izvedeni iz fenilalanina i tirozina, kao i u regulaciji drugih puteva sekundarnog metabolizma (Gachon i sar. 2005; Le Roy i sar. 2016). Vezivanje šećera može da promeni bioaktivnost, stabilnost, rastvorljivost i subćelijsku lokalizaciju odgovarajućeg supstrata (Wang i Hou 2009). U nekim slučajevima je aktivnost glikozida manja od

odgovarajućeg aglikona, pa glikozid služi kao skladišna forma odbrambenog jedinjenja koje može biti toksično za ćeliju, dok je u drugim slučajevima glikozilovana forma biološki aktivna (Le Roy i sar. 2016). U dosadašnjim istraživanjima oregonin je pokazao veću antimikrobnu aktivnost od hirsutanonola (Novaković i sar. 2015; Saxena i sar. 1995).



**Slika 30.** Strukturne formule hirsutanonola i oregonina.

Sekundarni metaboliti se sintetišu kada su pojačani stresni uslovi. Na primer, u brojnim studijama je pokazano da sunčeva svetlost, ekstremne temperature i vodni stres dovode do sinteze fenolnih i drugih jedinjenja koja imaju zaštitnu antioksidativnu ulogu. U biljci *Camellia sinensis* (zeleni čaj) dolazi do izraženije akumulacije fenolnih jedinjenja tokom letnjih meseci, kao i u osunčanim biljkama u odnosu na jedinke koje su rasle u senci; pod uticajem suše kod *Sorghum bicolor* dolazi do hidrolize glikozida i nagomilavanja fenolnih aglikona; veći sadržaj fenolnih jedinjenja i flavonoida u izdancima *Mentha longifolia* tokom zimskih meseci se može pripisati stresu izazvanom niskim temperaturama (Soni i sar. 2015). Duže izlaganje direktnoj sunčevoj svetlosti biljaka američkog ginsenga (*Panax quinquefolius*) tokom dana dovodi do povećanog sadržaja ginsenosida u korenu. Međutim, izlaganje zračenju sunca preko određene granice dovodi do redukovane akumulacije ginsenosida, fotoinhibicije, izbeljivanja i na kraju do prerane smrti listova (Szakiel i sar. 2011).

Uticaj sezone na sadržaj sekundarnih metabolita često zapravo reflektuje razvojni stadijum, odnosno fenološku fazu biljke i u vezi je sa njenim fiziološkim stanjem. Riipi i sar. (2002) su ispitali koncentraciju različitih grupa fenolnih jedinjenja u listovima planinske breze (*Betula pubescens* subsp. *czerepanovii*) od momenta



otvaranja pupoljaka do senescencije listova i našli porast koncentracije većine fenolnih jedinjenja (proantocijanidina vezanih u ćelijskom zidu, galotanina, flavonoidnih glikozida i derivata *p*-kumaroilhininske kiseline) u rano proleće, odnosno u pupoljcima koji se tek otvaraju i u mladim listovima, a zatim smanjenje koncentracije ovih jedinjenja tokom leta. Kako su mladi listovi nutritivno najbogatiji – sadržaj proteina i esencijalnih aminokiselina je najveći upravo u mladim listovima (Lindroth i sar. 1987; Riipi i sar. 2002), najveći sadržaj fenolnih jedinjenja u vreme početka listanja može biti mehanizam odbrane pupoljaka i mladih listova od herbivora. Tanini (hidrolizabilni poput galotanina i kondenzovani – proantocijanidini) su polifenolna jedinjenja sa adstringentnim svojstvima koja imaju sposobnost vezivanja i precipitacije proteina (Izawa i sar. 2010). Adstringentno svojstvo ovih jedinjenja može se pripisati vezivanju i denaturaciji proteina iz jezika i mukozne membrane usta, što dovodi do osećaja suvoće i skupljanja, pa biljne delove koji ih sadrže u većoj količini čini nepoželjnim za konzumaciju. U pomenutoj studiji Riipi i sar. (2002) zapažen je konstantan rast solubilnih proantocijanidina tokom sezone, pa je moguće da oni doprinose otpornosti zrelih listova prema herbivorima. Koncentracija ovih jedinjenja je negativno korelisana sa brzinom rasta larvi moljca *Epirrita autumnata* u kasnom larvalnom stadijumu (Ossipov i sar. 2001). Ove larve često napadaju breze i mogu dovesti do defolijacije velikih površina šuma, pa bi proantocijanidini mogli učestvovati u zaštiti biljaka u kasnijim fazama vegetacije.

Kora različitih drvenastih vrsta takođe pokazuje sezonske varijacije u sadržaju sekundarnih metabolita (Fontoura i sar. 2015; Rajan i sar. 2017). Lim i sar. (2004) su našli značajno veće koncentracije diarilheptanoida oregonina i hirsutanonola u kori jedinki *Alnus hirsuta* var. *sibirica* uzorkovanih u junu u odnosu na jedinke uzorkovane u novembru. Förster i sar. (2008) su određivali koncentraciju biološki aktivnih salicilatnih i fenolnih glikozida u kori različitih vrsta vrba (*Salix daphnoides*, *S. pentandra* i *S. purpurea*) tokom sezone vegetacije, u periodu od marta do jula. Uočena je značajna zavisnost koncentracije pomenutih sekundarnih metabolita u odnosu na sezonu, ali i različit trend promene koncentracije kod tri ispitivane vrste; u proseku je sa odmicanjem sezone dolazilo do pada koncentracije ispitivanih jedinjenja.

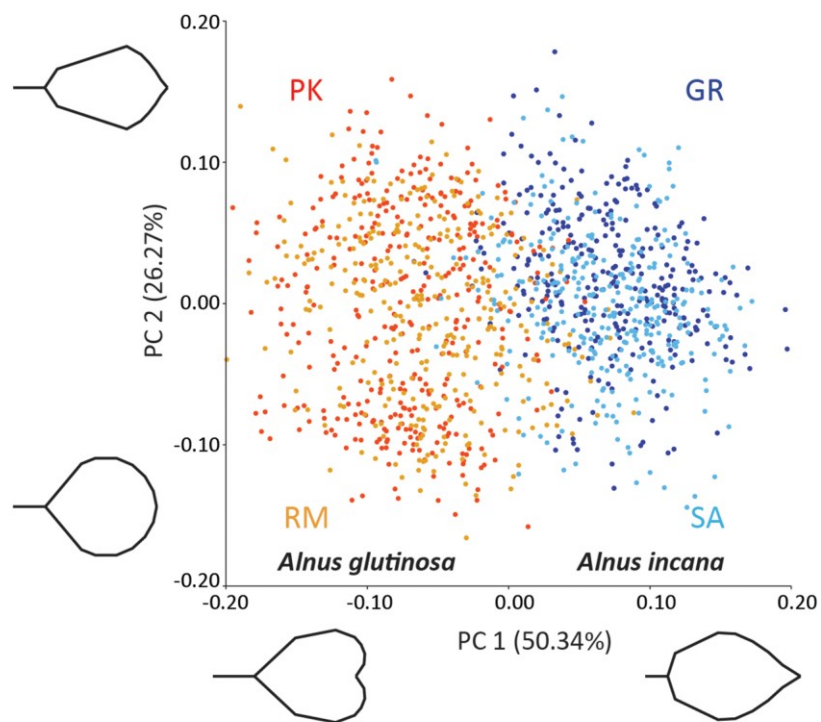
Kora drveta se često koristi u tradicionalnoj medicini u lečenju različitih oboljenja i tegoba (Turner i Hebda 1990). McCune i Johns (2007) su ispitali upotrebu različitih biljnih vrsta od strane narodnih lekara severnih delova Kanade u lečenju simptoma dijabetesa i našli da se u slučaju drvenastih vrsta u čak 70% slučajeva koristi kora biljke. Dobro je poznato da je upotreba kore (kao i drugih delova) lekovitog bilja u vezi sa njenim hemijskim sastavom i zastupljenošću prvenstveno sekundarnih metabolita, te njihovom biološkom aktivnošću, pa su ekstrakti kore ovih vrsta i prečišćena jedinjenja našli primenu u savremenoj medicini i koriste se kao suplementi ili lekovi (Guchelaar i sar. 1994; Maimoona i sar. 2011; Pierpoint 1994). U krajevima gde se zadržala praksa lečenja pomoću prirodnih proizvoda, meštani znaju koje je optimalno doba dana i godine za sakupljanje odgovarajućih delova biljke (Turner i Hebda 1990). Poštovanje vremena sakupljanja lekovitih biljaka ima za cilj da se poveća lekovito, a umanjiti toksično svojstvo bilja.

## **5.2. Varijabilnost listova odabranih populacija crne i sive jove**

### **5.2.1. Ispitivanje intra- i interspecijske varijabilnosti listova *A. glutinosa* i *A. incana* – Rezultati**

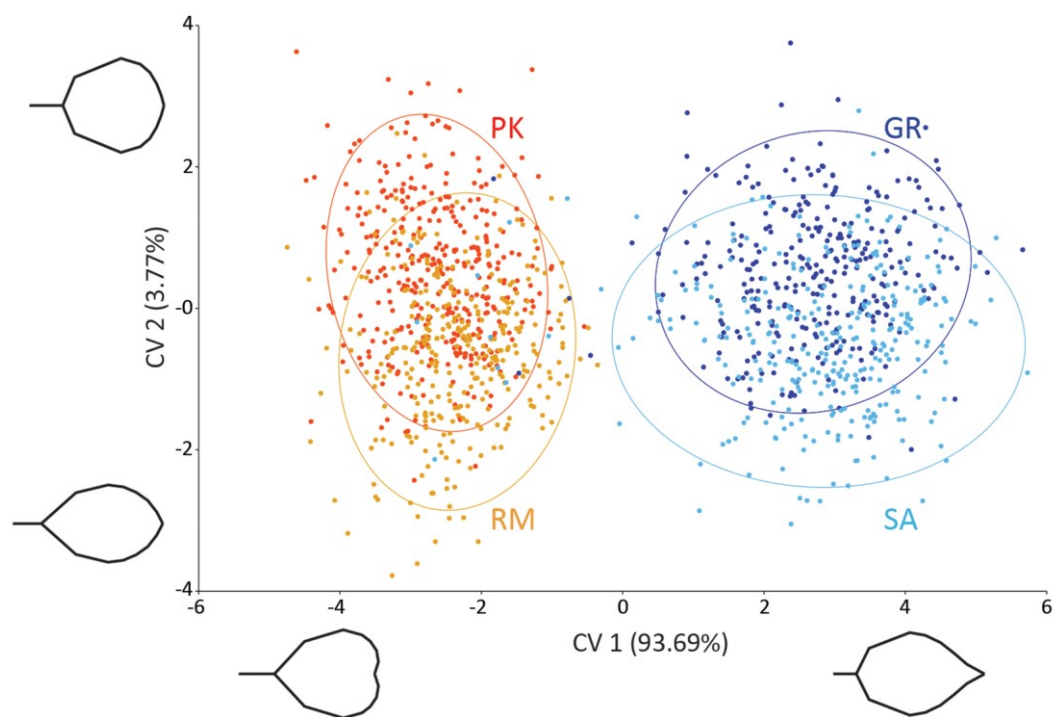
#### **5.2.1.1. Varijabilnost oblika listova**

U cilju sticanja uvida u varijabilnost oblika listova, izvedena je PCA na simetričnoj matrici kovarijansi konfiguracija listova sa 15 specifičnih tačaka (Slika 17). Prve dve glavne komponente objašnjavaju 76,6% ukupne varijabilnosti, od kojih PC1 objašnjava 50,3%. Grafički prikaz prve dve glavne komponente dat je na Slici 31. Individue *A. glutinosa* su distribuirane pretežno u negativnom, a individue *A. incana* u pozitivnom segmentu PC1. Duž PC1 se uočava kontinuum oblika listova: od objajastih oblika sa dugom drškom, uskoklinastom bazom i zaobljenim, usečenim vrhom tipičnim za *A. glutinosa*, do ovalnih oblika sa kratkom drškom, širokoklinastom osnovom i zašiljenim vrhom tipičnim za *A. incana* (Slika 31). Između ovih ekstrema uočeni su prelazni oblici i delimično preklapanje vrsta. Ovi rezultati su u skladu sa ranijim studijama o morfološkom razdvajanju vrsta i njihovih hibrida (Banaev i Bažant 2007; Parnell 1994; Vander Mijnsbrugge 2015).



**Slika 31.** PCA simetrične komponente matrice kovarijansi 1315 konfiguracija listova iz populacija *A. glutinosa* (Prilički kiseljak – PK, Rimski most – RM) i *A. incana* (Golijaska reka – GR, Sastavci – SA).

CVA simetrične komponente je pokazala jasno razdvajanje vrsta duž CV1 koja objašnjava 93,7% varijabilnosti (**Slika 32**). Slično PCA, individue *A. glutinosa* su se rasporedile u negativnom, a individue *A. incana* u pozitivnom segmentu CV1. Međutim, neki listovi koji pripadaju *A. incana* mogu se videti u negativnom segmentu CV1 i oni oblikom više podsećaju na *A. glutinosa*. Na grafiku se takođe mogu uočiti intermedijarni oblici listova. Štaviše, geografski bliske populacije (Rimski most i Sastavci) su međusobno manje razdvojene na grafikonu nego što su geografski udaljene populacije (Prilički kiseljak i Golijaska reka).



**Slika 32.** CVA simetrične komponente matrice kovarijansi 1315 konfiguracija listova iz populacija *A. glutinosa* (Prilički kiseljak – PK, Rimski most – RM) i *A. incana* (Golijaska reka – GR, Sastavci – SA).

Duž CV2, koja objašnjava 3,8% varijabilnosti, populacije unutar vrsta su se delimično razdvojile (**Slika 32**). Promene u oblicima duž CV2 su vezane za izduživanje listova. Duži i uži listovi su više vezani za populacije Rimski most i Sastavci, a kraći i širi listovi preovlađuju u populacijama Prilički kiseljak i Golijaska reka.

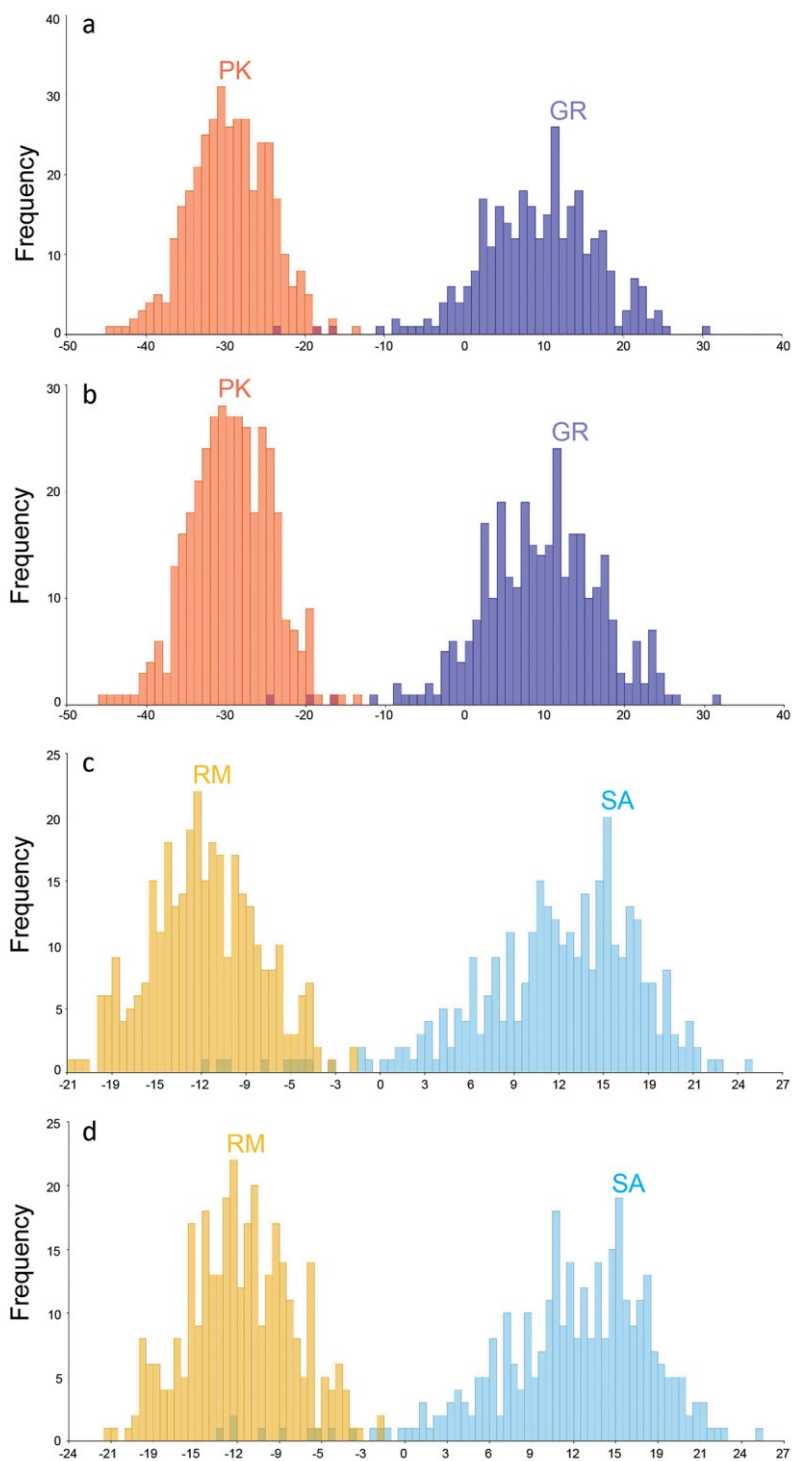
Međupopulacione distance (**Tabela 15**) su pokazale da se populacija Prilički kiseljak najviše, a populacija Rimski most najmanje izdvaja od ostalih populacija. U međusobnim poređenjima, razlike između svih populacija su bile statistički značajne.

**Tabela 15.** Mahalanobisove i Prokrustove distance dobijene nakon CVA simetrične komponente matrice kovarijansi 1315 konfiguracija listova iz populacija *A. glutinosa* (Prilički kiseljak, Rimski most) i *A. incana* (Golijska reka, Sastavci).

Populacija	Mahalanobisove distance			
	Prilički kiseljak	Rimski most	Golijska reka	Sastavci
Prilički kiseljak		<0,0001 <sup>1</sup>	<0,0001	<0,0001
Rimski most	1,3806		<0,0001	<0,0001
Golijska reka	5,3880	5,1616		<0,0001
Sastavci	5,4879	5,1940	1,3680	
Populacija	Prokrustove distance			
	Prilički kiseljak	Rimski most	Golijska reka	Sastavci
Prilički kiseljak		<0,0001	<0,0001	<0,0001
Rimski most	0,0378		<0,0001	<0,0001
Golijska reka	0,1476	0,1329		<0,0001
Sastavci	0,1485	0,1308	0,0275	

<sup>1</sup>*P* vrednosti su dobijene iz permutacionih testova sa 10000 replikacija. Distance su prikazane ispod, a *P* vrednosti iznad dijagonala.

DA je pokazala da je kod udaljenih populacija 1,3% listova *A. incana* pogrešno klasifikovano kao *A. glutinosa* (**Slika 33 a i b**). Kod geografski bliskih populacija oko 3,8% (odnosno 4,2% nakon unakrsne validacije metode) *A. incana* listova je pogrešno klasifikovano kao *A. glutinosa* (**Slika 33 c i d**). Pored toga, nijedan list *A. glutinosa* nije klasifikovan kao *A. incana*. Takođe, za populaciju Golijska reka (*A. incana*) i njoj geografski najbližu ispitanu populaciju *A. glutinosa* (Rimski most) DA je pokazala isti procenat listova (1,3%) *A. incana* pogrešno klasifikovanih kao *A. glutinosa* (ista četiri lista).



**Slika 33.** DA simetrične komponente matrice kovarijansi 1315 konfiguracija listova. Histogrami vrednosti prve diskriminativne funkcije za individue iz udaljenih populacija *A. glutinosa* (Prilički kiseljak – PK) i *A. incana* (Goljijska reka – GR) (**a, b**) i geografski bliskih populacija *A. glutinosa* (Rimski most – RM) i *A. incana* (Sastavci – SA) (**c, d**). Prikazani su rezultati nakon DA (**a, c**) i nakon unakrsne validacije metode (**b, d**).

### 5.2.1.2. Varijabilnost nervature lista

Broj parova sekundarnih nerava (SN) je varirao od 4 do 9 za *A. glutinosa* i od 7 do 15 za *A. incana*, što je u saglasnosti sa ranije zabeleženim vrednostima u okviru prirodnog areala distribucije vrsta (**Tabela 16**). Prema nekim autorima SN je pouzdano svojstvo hibrida koje varira u uskom i intermedijarnom opsegu (Banaev i Bažant 2007; Mejnartowicz 1999; Poljak i sar. 2014). Potencijalni hibridi koje je sugerisala DA (18 pogrešno klasifikovanih listova) zaista su pokazali intermedijarnu vrednost SN (**Tabela 17**), što bi moglo ukazivati na hibridogeno poreklo odgovarajućih stabala. Međutim, u ovom istraživanju detektovan je mali broj potencijalnih hibrida, zbog čega zaključke treba uzeti sa rezervom.

Značajne razlike u SN zabeležene su između vrsta, kao i između populacija *A. incana* (**Tabela 17**). Da bi se ispitala veza između oblika lista i SN za svaku vrstu, izvedena je posebna PLS analiza. Veza između blokova kod obe vrste bila je značajna. Za *A. glutinosa* korelacija između oblika lista i SN (PLS1) bila je umerena (0,48,  $P < 0,05$ ), a za *A. incana* nešto jača (0,65,  $P < 0,001$ ). Promene oblika vezane za PLS1 prikazane su na **Slici 34**. Za *A. glutinosa* (**Slika 34a**) manji SN može se dovesti u vezu sa širom liskom u donjem delu, užom liskom u gornjem delu, dužom peteljkom i usećenim vrhom, dok se veći SN dovodi u vezu sa užom liskom u donjem delu, širom liskom u gornjem delu, kraćom peteljkom i zaobljenim vrhom. Za *A. incana* (**Slika 34b**), promene oblika duž PLS1 se u velikoj meri podudaraju sa CV2 (**Slika 32**) – listovi sa manjim SN imaju kraću i širu lisku sa dužom peteljkom i blago zašiljenim vrhom, dok su listovi sa većim SN izduženiji i užiji, sa kraćom peteljkom i zašiljenijim vrhom.

**Tabela 16.** Literaturni podaci za broj parova sekundarnih lisnih nerava (SN) u okviru prirodnog areala distribucije vrsta.

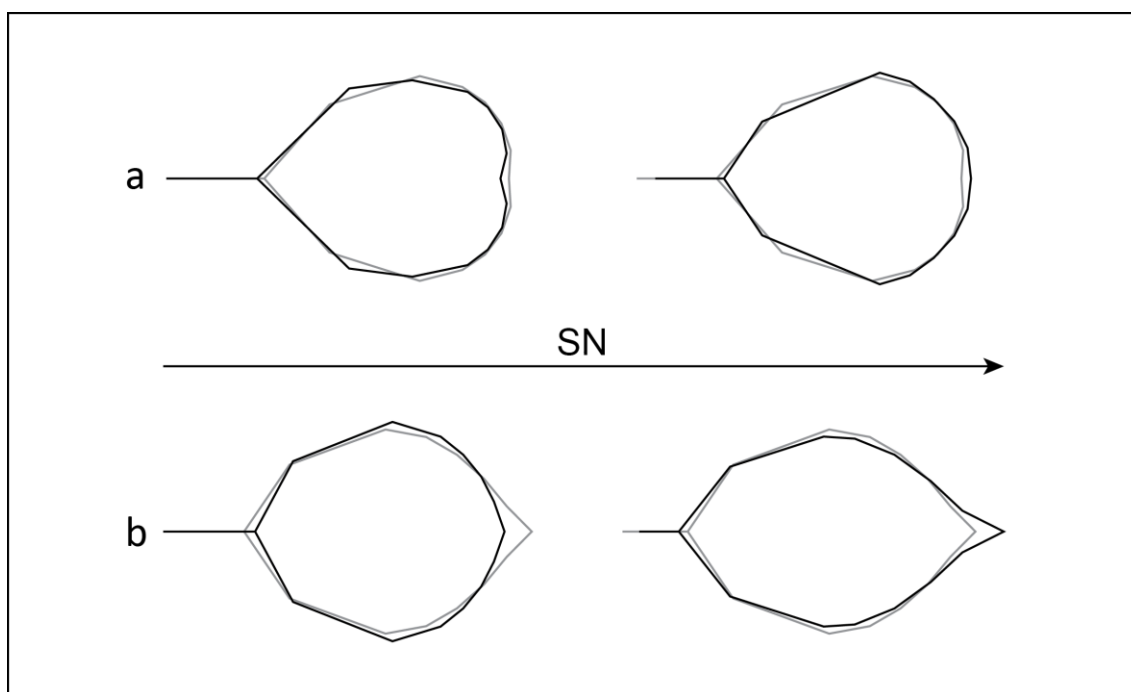
Referenca	Zemlja/Region	Veličina uzorka	<i>A. glutinosa</i>		<i>A. incana</i>		Hibrid	
			Opseg	Srednja vrednost	Opseg	Srednja vrednost	Opseg	Srednja vrednost
Naše istraživanje	Srbija	1315	4-9	6,90	7-15	10,70	-	-
Poljak i sar. (2014)	Hrvatska	2000	-	6,61	-	11,08	-	8,68
Bašić i sar. (2014)	Bosna i Hercegovina	55	6-8	7,30	9-13	11,10	6-10	8,90
Krauze-Michalska i Boratyńska (2013)	Balkan Alpi Divovske planine, Poljska Istočni i Zapadni Karpati Centralno-evropske nizije Skandinavija	-	-	-	5-18	11,15	-	-
Banaev i Bažant (2007)	Zapadni Sibir Rusija Češka	7500-10000	6-8	6,50	9-15	12,00	9-10	9,70
Parnell (1994)	Irska	≈ 1700	4-7	6,00	10-15	≈ 10	-	≈ 10



**Tabela 17.** Broj parova sekundarnih lisnih nerava (SN) i veličina centroida (CS) u proučavanim populacijama.

Populacija	Broj uzorkovanih listova	Opseg	SN (srednja vrednost)	CS (srednja vrednost)
Prilički kiseljak	367	4-9	6.93 <sup>d</sup>	134.70 <sup>a</sup>
Rimski most	321	5-10	6.87 <sup>d</sup>	131.56 <sup>a</sup>
Golijaska reka	306	7-14	10.46 <sup>b</sup>	135.16 <sup>a</sup>
Sastavci	303	8-15	11.03 <sup>a</sup>	124.79 <sup>b</sup>
Potencijalni hibridi	18	8-11	9.49 <sup>c</sup>	117.68 <sup>b</sup>

<sup>a, b, c, d</sup> Homogene grupe dobijene na osnovu Bonferoni *post hoc* testa na 95% nivou pouzdanosti.



**Slika 34.** Promena oblika listova (crna linija) u odnosu na broj parova sekundarnih nerava (SN). Srednji oblik lista za svaku vrstu (**a** – *A. glutinosa*, **b** – *A. incana*) opisan je sivom linijom.

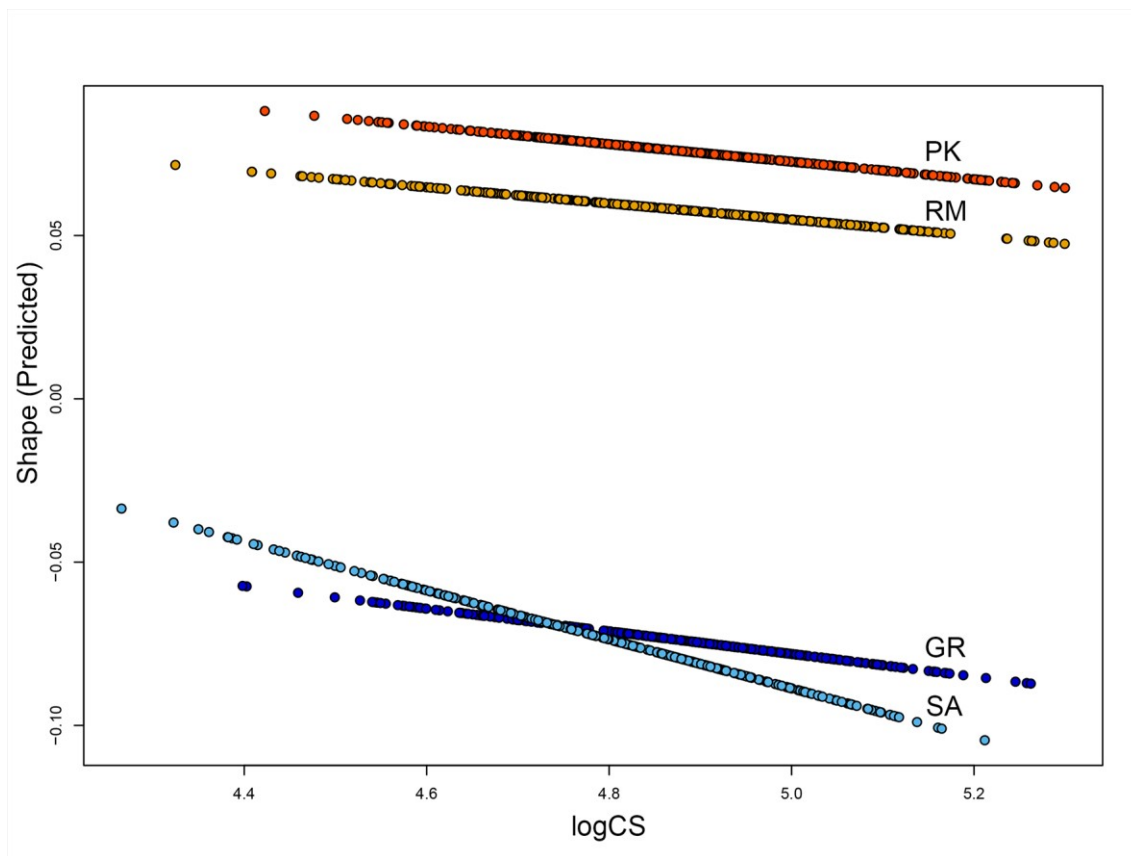
### 5.2.1.3. Varijabilnost veličine listova i alometrija

Vrste se nisu međusobno razlikovale prema CS ( $F = 1,34$ ,  $P = 0,25$ ), ali su populacija Sastavci i potencijalni hibridi imali značajno manji CS u poređenju sa populacijama Prilički kiseljak, Rimski most i Golijska reka (**Tabela 17**).

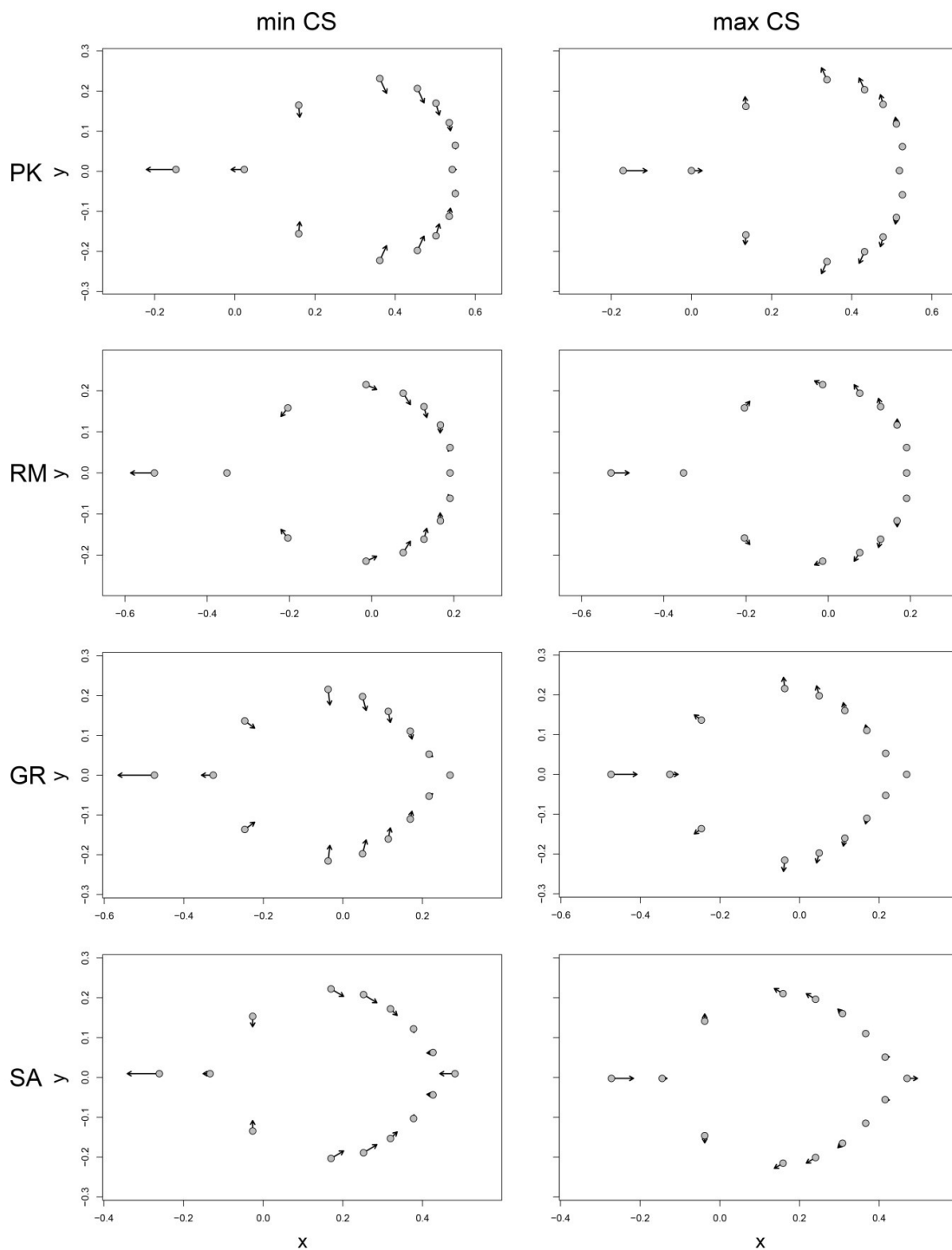
Multivarijaciona regresija simetrične komponente na CS je otkrila da su promene oblika značajno korelisane sa promenama u veličini u svim proučavanim populacijama ( $P < 0,0001$ ). Ipak, alometrija objašnjava mali procenat promene oblika u okviru svake populacije (Prilički kiseljak – 4,49%, Rimski most – 3,01%, Golijska reka – 6,61%, Sastavci – 6,02%).

Test homogenosti nagiba alometrijskih krivih je otkrio da proučavane populacije imaju različite obrasce alometrije ( $Z = 3,877$ ,  $P < 0,01$ ): nagib za populaciju Sastavci je strmiji u odnosu na druge populacije (**Slika 35**). Između populacija Prilički kiseljak, Rimski most i Golijska reka nema značajnih razlika u nagibu odgovarajućih alometrijskih krivih (**Slika 35**), što znači da je trend promene oblika sa promenom veličine lista isti u ove tri populacije. U svim populacijama sa povećanjem veličine listovi postaju kraći i širi, sa kraćom peteljkom (**Slika 36**). Glavne promene položaja tačaka konfiguracija pri minimalnoj i maksimalnoj CS u odnosu na koncenzus konfiguraciju (srednji oblik lista) u vezi su sa početkom drške (tačka 1, **Slika 17**) i sa najširim delom liske (parovi tačaka 4-6 i 8-12, **Slika 17**), a za populaciju Sastavci takođe i sa vrhom liske (tačka 5, **Slika 17**).

Kod *A. glutinosa* nađena je slaba korelacija između SN i CS u populaciji Prilički kiseljak ( $r = 0,113$ ,  $P < 0,05$ ), dok u populaciji Rimski most SN i CS nisu bili korelisani ( $r = -0,043$ ,  $P = 0,443$ ). Slaba pozitivna korelacija između SN i CS zabeležena je kod *A. incana* (Golijska reka:  $r = 0,286$ ,  $P < 0,001$ ; Sastavci:  $r = 0,316$ ,  $P < 0,001$ ).



**Slika 35.** Statička alometrija između veličine i oblika lista za proučavane populacije *A. glutinosa* (Prilički kiseljak – PK, Rimski most – RM) i *A. incana* (Golijska reka – GR, Sastavci – SA).



**Slika 36.** Oblici listova za minimalnu i maksimalnu veličinu centroida u proučavanim populacijama *A. glutinosa* (Prilički kiseljak – PK, Rimski most – RM) i *A. incana* (Golijska reka – GR, Sastavci – SA).

### 5.2.2. Ispitivanje intra- i interspecijske varijabilnosti listova *A. glutinosa* i *A. incana* – Diskusija

U zoni kontinuirane distribucije vrsta, hibridi se javljaju sporadično, uglavnom usled odsustva podudaranja faza cvetanja. Porast učestalosti hibridizacije primećen je na severnoj granici areala, kao i u anomalističnim godinama koje karakterišu duže zimske sezone i hladna proleća, kada dolazi do preklapanja perioda cvetanja (Banaev i Bažant 2007). Bašić i sar. (2014) su zabeležili oko 10% hibridnih individua u simpatričkim populacijama na jugoistočnoj granici distribucije hibridnog kompleksa. Na osnovu analize pojedinačnih morfoloških karakteristika lista, hibridi se preklapaju sa jednim ili oba roditelja i uglavnom su bliži *A. incana*, zauzimaju intermedijarnu poziciju, ili se značajno razlikuju od oba roditelja (Parnell 1994). Multivarijantna analiza je pokazala da hibridi zauzimaju intermedijarnu poziciju između vrsta, ali su bliži *A. incana* (Banaev i Bažant 2007). Rezultati kontrolisanih eksperimenata Kundzinša (Kundziņš 1969) pokazali su uspešno klijanje semena hibrida samo u slučajevima kada je *A. incana* korišćena kao materinska biljka. Kada je *A. glutinosa* bila materinska, semena su bila sterilna. Analiza molekularnih markera je pokazala veću zastupljenost alela *A. incana* u hibridnim jedinkama (Voronova i sar. 2015), što znači da pretežno dolazi do povratnog ukrštanja hibrida sa ovom vrstom. Ovi rezultati su u saglasnosti sa Kundziņšom [Kundziņš (1968) prema Voronova i sar. (2015)], koji je zabeležio bolji rast F1 generacije hibrida, kao i *A. incana* × F1, u poređenju sa drugim hibridnim kombinacijama.

Zbog povratnog ukrštanja hibrida sa roditeljskim vrstama dolazi do introgresije, što dovodi do još veće varijabilnosti morfoloških karakteristika (Voronova i sar. 2015). Osim toga, na istoj grani se kod hibrida mogu naći listovi koji oblikom podsećaju na obe vrste (Banaev i Bažant 2007; Poljak i sar. 2014), kao i različiti intermedijarni oblici (Parnell 1994; Vander Mijnsbrugge 2015; Voronova i sar. 2015). Stoga bi u cilju detekcije potencijalnih hibridnih jedinki trebalo analizirati pojedinačne listove.

Uzimajući u obzir da je za uspešnost hibridizacije potrebno da *A. incana* bude materinska vrsta, najveći broj hibridnih jedinki se očekuje u populaciji Sastavci (populacija *A. incana* koja se nalazi u blizini populacije *A. glutinosa*). Analizom oblika listova podržana je ova hipoteza – u odnosu na geografski udaljene populacije, veći broj

listova *A. incana* pogrešno je klasifikovan kao *A. glutinosa* kod geografski bliskih populacija. Međutim, mali broj listova *A. incana* iz populacije Golijaska reka (četiri lista) pogrešno je klasifikovano kao *A. glutinosa*. S obzirom na to da se jove oprašuju vetrom, ovo takođe može biti dokaz spontane hibridizacije u populaciji Golijaska reka. Međutim, kako se radi o samo četiri od ukupno 61 lista koliko je uzorkovano sa četiri stabla na kojima su nađeni, vrlo je verovatno da je njihov oblik rezultat fenotipske plastičnosti.

Obrazac i gustina nervature lista predstavljaju varijabilno svojstvo koje je, na određenom ontogenetskom i evolutivnom stupnju, pod uticajem klimatskih i sredinskih faktora (temperature, vodnog režima, osvetljenja, brzine vetra, prisustva nutrijenata) (Uhl i Mosbrugger 1999; Zhu i sar. 2012). Plastičnost nervature se ispoljava u okviru krošnji i u različitim sredinama za datu vrstu, i odražava status razmene gasova i vode između listova i atmosfere (Sack i Scoffoni 2013; Zhu i sar. 2012). Gustina nerava je snažno pozitivno korelisana sa hidrauličnom provodljivošću listova (Brodrigg i sar. 2007). Listovi koji su prilagođeni na veći nivo zračenja, više temperature, dostupnost nutrijenata i slabiju snabdevenost vodom, imaju karakterističnu nervaturu koja obezbeđuje bolju hidrauličnu provodljivost i veću toleranciju na sušu (Sack i Scoffoni 2013).

Prema Zhu i sar. (2012), gustina glavnih nerava (primarnih i sekundarnih) kod *Quercus variabilis* je manje osetljiva na promene u sredini u odnosu na druge morfološke karakteristike lista, zbog čega se pretpostavlja da je pretežno genetički determinisana. Kod *A. glutinosa* i *A. incana*, u odnosu na druge karakteristike (dužina, širina, površina i obim lista, dužina lisne drške, itd.) SN pokazuje malu varijabilnost na nivou stabla (Banaev i Bažant 2007), zatim na intrapopulacionom nivou (Krauze-Michalska i Boratyńska 2013; Poljak i sar. 2014) i veću varijabilnost na interpopulacionom nivou (Krauze-Michalska i Boratyńska 2013). Ako se uzmu u obzir literaturni podaci i naša istraživanja, čini se da je SN konzervativnija karakteristika u odnosu na oblik lista, a intermedijarna vrednost SN kod potencijalnih hibrida ukazuje na to da je ovo svojstvo u značajnoj meri genetički određeno. Ipak, da bi se dobile detaljnije informacije o determinisanosti nervature lista kod vrsta iz roda *Alnus*, potrebno je sprovesti eksperimente u kontrolisanim uslovima.

Smatra se da je veličina lista jedna od najvarijabilnijih karakteristika kod mnogih biljnih vrsta (Givnish 1987; Navarro-Cerrillo i sar. 2018; Stojnić i sar. 2016), uključujući *A. glutinosa* i *A. incana* (Krauze-Michalska i Boratyńska 2013; Poljak i sar. 2014). Varijabilnost je uslovljena nizom biotičkih i abiotičkih faktora. Mejnartowicz (1999) je zabeležio da je površina lista kod hibrida veća u odnosu na roditeljska stabla, usled heterotičnog efekta. Međutim, u našoj studiji nisu nađeni dokazi heterozisa – potencijalni hibridi su imali manje listove. Manja veličina lista zabeležena u populaciji Sastavci mogla bi biti posledica manjih količina resursa, zbog čega bi formiranje većih listova predstavljalo preveliki trošak za biljku (Niinemets i sar. 2007). U mnogim studijama je pokazano da je manja veličina lista povezana sa manjom godišnjom količinom padavina (UGP) i nižom vlažnošću vazduha, što je u vezi sa manjim gubicima vode transpiracijom sa manje površine lista (Cordell i sar. 1998; Toivonen i sar. 2014; Wright i sar. 2017). Populacija Sastavci karakteriše se manjom vrednošću UGP i nižom vlažnošću vazduha u odnosu na populaciju Golijska reka (**Tabela 1**). Drugi uzrok redukcije veličine lista mogao bi biti plavljenje zemljišta i duže prisustvo stagnirajuće vode u populaciji Sastavci. Smanjenje transpiracione površine lista kao adaptacija na redukovan vodni status u uslovima poplava omogućava biljkama da održe visoku fotosintetičku aktivnost, kao što je pokazano kod *Senna reticulata* (Parolin 2002), *Populus angustifolia* i *Populus × jackii* (Rood i sar. 2010).

U slučaju *A. glutinosa*, premda su se populacije statistički razlikovale prema obliku lista, nisu nađene značajne razlike u SN i CS. Populacije crne jove rastu u sličnim klimatskim uslovima i samim tim imaju slične zahteve u pogledu transpiracije. Kod *A. incana*, nađene interpopulacione razlike u obliku lista, SN i CS mogle bi biti posledica različitih klimatskih karakteristika staništa. Lokalitet Golijska reka karakteriše se najvećom nadmorskom visinom, najnižom srednjom godišnjom temperaturom i najvišim UGP u odnosu na lokalitete sa kojih su uzorkovane ostale populacije. Širi, a kraći listovi sa manjim SN i većom CS u populaciji Golijska reka u odnosu na populaciju Sastavci verovatno predstavljaju rezultat adaptacije na niže zahteve u pogledu evaporacije u vlažnijoj sredini. S druge strane, različit nagib alometrijske krive za populaciju Sastavci bi mogao biti uzrokovan nekom vrstom stresora, s obzirom na to da se ova populacija karakteriše manjom veličinom lista u odnosu na ostale populacije.

Zavisno od vrste, gustina nervature može (npr. kod *Acer monspessulanum*), a i ne mora (npr. kod *Quercus petraea*) da varira sa veličinom lista (Uhl i Mosbrugger 1999). U obe populacije *A. incana* SN je rastao sa povećanjem CS, što se može objasniti odnosom između biomehaničkih i fizioloških karakteristika – većim listovima potrebna je bogatija mreža nerava kako bi efektivno transportovali resurse (Niinemets i sar. 2007; Xu i sar. 2009).

### 5.3. Diskusija

Iako su sekundarni metaboliti nekada smatrani otpadnim proizvodima primarnog metabolizma biljaka, kasnije je prepoznata i opšteprihvaćena njihova uloga kao hemijskih signala u ekosistemu. Za razliku od primarnih metabolita koji su neophodni za rast i razvoj individua, univerzalno prisutni u biljnom svetu, uniformne strukture i konzervativni, sekundarni metaboliti nisu nužni za rast i razvoj, ali su neophodni za preživljavanje populacija. Raznolikih su, ali jedinstvenih struktura za odgovarajuće taksone i adaptibilni su. Postoje tri osnovne strategije hemijske odbrane biljaka: indukcija, odnosno sinteza odbrambenih jedinjenja kao odgovor na napad patogena ili herbivora, produkcija metabolički bezbednih protoksina čija je enzimaska aktivacija inicirana stimulusima sredine, odnosno napadom i konstitutivna akumulacija odbrambenih jedinjenja u koncentracijama neophodnim za zaštitu ciljnih tkiva. Naravno, ne postoje striktno granice između ovih strategija, pa je konstitutivna odbrana često ojačana indukcijom, tj. jedinjenja koja su konstitutivno prisutna u određenim tkivima se sintetišu u povećanim koncentracijama kao odgovor na spoljne stimulanse. Strukturna raznolikost i intraspecijska varijabilnost predstavljaju inherentno svojstvo sekundarnog metabolizma. Komponente primarnog metabolizma su neophodne za rast i razvoj, pa njihovo održavanje mora biti stabilno da bi se obezbedio strukturni i funkcionalni integritet ćelije i organizma. Za razliku od primarnih, sekundarni (specijalizovani) metaboliti variraju kvalitativno (strukturno) i kvantitativno (u koncentraciji), ili neki mogu čak prestati da se sintetišu bez ozbiljnih posledica na rast i razvoj organizma koji ih proizvodi. Ova prirodna varijabilnost sekundarnog metabolizma neophodan je preduslov za diverzifikaciju kao odgovor na selektivni pritisak okoline (herbivori, patogeni, fizička dejstva) koja je u stanju kontinuirane promene (Hartmann 1996).



Intraspecijska varijabilnost karakteristika odražava sposobnost vrste da odgovori na varijacije u okruženju putem dva mehanizma: adaptacije, koja dovodi do genetičke varijabilnosti i, posledično, fenotipske varijabilnosti između genotipova, i aklimatizacije, odnosno fenotipske plastičnosti, koja predstavlja potencijal svakog pojedinačnog genotipa da proizvede više različitih fenotipova pod uticajem različitih uslova sredine (Albert i sar. 2011). Efekat sredine može se ispoljiti kroz direktan uticaj na ekspresiju gena, ili kroz interakciju sa genotipom, što znači da će stepen indukcije, odnosno supresije odgovarajućih gena varirati između genotipova (Hamilton i sar. 2001).

U ovom radu je ispitana hemijska i morfološka varijabilnost vrsta *A. glutinosa* i *A. incana*. PCA i DA urađene na osnovu koncentracija diarilheptanoida u etanolnim ekstraktima kore su pokazale dobro razdvajanje vrsta u obe sezone uzorkovanja, čime je utvrđen hemotaksonomski karakter ovih jedinjenja. Varijabilnost diarilheptanoida je veoma izražena unutar populacija, što govori o velikoj fenotipskoj plastičnosti individua. Preklapajući se sa svim ostalim populacijama na PCA grafikonu, populacija Sastavci (*A. incana*) je pokazala najveću disperziju individua. Jedan od razloga moglo bi biti prisustvo hibridnih individua na ovom lokalitetu koji se nalazi u blizini lokaliteta Rimski most i populacije *A. glutinosa* (1,2 km). S obzirom na to da je u dosadašnjim ispitivanjima hibridizacije *A. glutinosa* i *A. incana* ustanovljeno da je uspešnost hibridizacije izuzetno niska kada se *A. glutinosa* koristi kao materinska vrsta, od četiri ispitane populacije u Sastavcima je najveća verovatnoća pojave hibrida. Hibridne jedinice imaju varijabilni genotip, a povratno ukrštanje sa roditeljskim vrstama dovodi do dodatnog povećanja genetičke varijabilnosti populacija koja se manifestuje kroz fenotipsku varijabilnost. U ovoj studiji su analizirani odabrani najzastupljeniji diarilheptanoidi crne i sive jove i oni su se pokazali kao pouzdani hemotaksonomski markeri na nivou vrste. Da bi se otkrila jedinjenja koja jasnije ukazuju na pojavu hibrida, trebalo bi uraditi potpuniji hemijski profil, a zatim odabrati ona jedinjenja koja pokazuju najveće razlike između ispitivanih grupa i koja bi u daljim analizama poslužila kao taksonomski karakteri, što bi povećalo rezoluciju diferencijacije taksona.

Prostorni i genetički obrasci koje pokazuju populacije unutar neke vrste rezultat su heterogenosti i različitih selektivnih pritisaka sredine. Drvenaste vrste koje poseduju

karakteristike koje pospešuju protok gena, kao što su veliko geografsko rasprostranjenje, stranooplodni sistem razmnožavanja i mogućnost prenošenja polena i semena na velike razdaljine, generalno pokazuju veći genetički diverzitet unutar vrsta i populacija nego između populacija (Loveless i Hamrick 1984). Ovakav obrazac genetičke varijabilnosti zapažen je kod *A. glutinosa* (Mejnartowicz 2008) i *A. incana* subsp. *rugosa* (Bousquet i sar., 1988; Huenneke, 1985). Polen jova se može preneti na velike razdaljine vetrom, što i predstavlja glavni vid oprašivanja *Alnus* spp. Seme jova nema prava krila za raznošenje, pa se vetrom može preneti na male razdaljine – oko 30-60 m od majčinskog stabla. Međutim, ono poseduje vazdušni mehur koji mu omogućava transport na velike razdaljine rekama, zahvaljujući periodičnom plavljenju područja na kojima se jove najčešće mogu sresti. Mejnartowicz (2008) je u svojim genetičkim studijama na populacijama crne jove u Poljskoj pokazao da je genetička varijabilnost populacija veća unutar nego između populacija i da je prostorna genetička struktura crne jove u vezi sa hidrološkim sistemom odgovarajućeg područja. Sličan scenario je moguć i u ovoj studiji u kojoj su populacije jova u istom rečnom slivu. PCA je pokazala delimično razdvajanje populacija unutar vrsta na osnovu koncentracije diarilheptanoida. Njihova varijabilnost je izraženija unutar, nego između populacija iste vrste. Ipak, delimično razdvajanje postoji, što govori o adaptaciji populacija u sredinama ispitanih lokaliteta i/ili fenotipskoj plastičnosti. Na grafikonu dobijenom nakon diskriminantne analize zapaženo je preklapanje grupa individua iz populacija Prilički kiseljak i Rimski most (*A. glutinosa*), ali su se populacije Golijska reka i Sastavci (*A. incana*) dobro razdvojile. Ovo ne čudi, s obzirom na to da populacije *A. glutinosa* rastu u sličnim klimatskim uslovima, dok stanište populacije Golijska reka odlikuje planinski areal značajno drugačijih klimatskih karakteristika od staništa populacije Sastavci koje se nalazi u dolinsko-brdskom rejonu.

Kao što je već istaknuto, ispitivane populacije pokazuju veliku disperziju individua, što znači da je varijabilnost svojstava u populacijama velika. Ako posmatramo pojedinačna svojstva, iz vrednosti koeficijenata varijacije (CV) posebno se ističe varijabilnost sadržaja hirsutanonola u individuama populacija uzorkovanih u junu 2015. godine, a naročito u individuama iz populacije Sastavci. Hirsutanonol je aglikon nekoliko diarilheptanoida izolovanih iz kore crne jove: hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozida, oregonina, 5-*O*-metilhirsutanonola (Novaković i sar. 2014b), i izvesno

je da dolazi do biosintetske interkonverzije sa ovim, ali i drugim derivatima koji iz hirsutanonola mogu biti izvedeni u enzimskim transformacijama kroz reakcije oksidacije, redukcije ili konjugacije sa drugim molekulima. Velike vrednosti CV za hirsutanonol u populacijama uzorkovanim u junu ukazuju na pojačanu biosintezu odgovarajućih derivata, o čemu svedoče i povišene koncentracije ovih jedinjenja u junu u odnosu na april. Sinteza diarilheptanoida mogla bi biti indukovana sezonskim promenama temperature, vlažnosti vazduha, a očekivano je da najveći uticaj imaju padavine i/ili plavljenje, s obzirom na to da populacije rastu na plavnim područjima. Izrazito niska koncentracija hirsutanonola u populaciji Sastavci u ovoj sezoni (SA15) ukazuje na dodatnu indukciju sinteze odgovarajućih derivata nekom vrstom stresora, poput patogena ili herbivora.

Geometrijska morfometrija predstavlja matematičku studiju oblika pomoću koje se mogu kvantifikovati i vizualizovati morfološke varijacije različitih biljnih organa, što vodi boljem razumevanju evolutivnih i ekoloških procesa koji su doveli do fenotipske diverzifikacije (Vander Mijnsbrugge 2015). Glavna prednost ove metode u odnosu na klasične morfometrijske studije je u tome što se oblik organa može proučavati nezavisno od njegove veličine, a kompleksni oblici se mogu razložiti na diskretne vrednosti varijacije oblika, tako da prelazne forme budu jasno uočljive. Rezultati ispitivanja varijabilnosti oblika listova u ovom radu pokazali su jasno razdvajanje vrsta na PCA, ali i prisustvo prelaznih formi listova u oblasti preklapanja, što govori o velikoj fenotipskoj plastičnosti populacija, kao i o mogućnosti postojanja hibrida. DA je izdvojila potencijalne hibridne jedinice u populacijama *A. incana* koje su prema obliku lista bile sličnije *A. glutinosa*. Broj parova nerava (SN) je jedna od najstabilnijih karakteristika hibrida između *A. glutinosa* i *A. incana* (Banaev i Bažant 2007). Kod potencijalnih hibridnih jedinki SN je bio intermedijaran između *A. glutinosa* i *A. incana*, što je u saglasnosti sa prethodnim studijama na hibridima crne i sive jove (Banaev i Bažant 2007; Mejnartowicz 1999; Poljak i sar. 2014). Populacija Sastavci se odlikuje manjom veličinom lista u odnosu na ostale populacije, što može biti pokazatelj da ova populacija raste u suboptimalnim uslovima.

Intraspecijski diverzitet, bez obzira na to radi li se o genetičkom diverzitetu ili plastičnosti, ili kombinaciji oba faktora, mogao bi biti važan faktor u oblikovanju

diverziteta i strukture zajednica (Moore i sar., 2014; Whitham i sar., 2003). Osim toga, on može biti od izuzetnog značaja u kontekstu globalnih klimatskih promena koje menjaju životnu sredinu (Moore i sar., 2014). Odgovori biljnih vrsta na ove promene mogu biti fenotipska plastičnost, adaptacija putem prirodne selekcije ili migracija na staništa na kojima vladaju uslovi na koje su već adaptirane (Nicotra i sar. 2010). Međutim, zbog male brzine rasejavanja ili kolonizacionih kapaciteta, ovo nije moguće za većinu vrsta. Zato, da bi se predvidela distribucija vrsta pri ovim promenama, neophodno je ispitati njihovu sposobnost opstanka na prirodnim staništima, koja je u određenoj meri determinisana fenotipskom plastičnošću (Lemke i sar. 2012). Visok nivo genetičke varijabilnosti u populacijama pomaže biljkama da se odupru promenama i prilagode na nove biotičke i abiotičke faktore. Deo ove genetičke varijabilnosti određuje sposobnost biljaka da reaguju na promene u okruženju putem plastičnog odgovora. Na taj način plastičnost može da obezbedi bolju prilagođenost biljaka na klimatske promene i da doprinese njihovoj brznoj adaptaciji na novonastale uslove.

Primenjene metode u ovom radu pokazale su veliku varijabilnost hemijskih i morfoloških karakteristika ispitivanih populacija *A. glutinosa* i *A. incana*. Dve metode analize – hemijska i morfometrijska, dale su slične rezultate u pogledu razdvajanja vrsta i detekcije potencijalnih hibrida. Za definitivnu potvrdu hibridnih jedinki, neophodno je analizirati molekularno-genetičke markere. U cilju ispitivanja uticaja sredine na fenotipsku varijabilnost, trebalo bi sprovesti eksperimente u kontrolisanim uslovima.

Ispitivane populacije se ne nalaze na velikoj međusobnoj udaljenosti (rastojanje između dve najudaljenije populacije je oko 30 km), pa je za očekivati da je genetička distanca između njih mala, što znači da su razlike koje su primećene između njih pretežno rezultat adaptacije na uslove koji vladaju na odgovarajućim lokalitetima. Poređenje fenotipske varijabilnosti populacija sa različitim lokalitetima daje nam uvid u odgovore biljaka na različite sredinske uslove. Ukoliko postoje razlike u varijabilnosti fenotipskih karakteristika između populacija, kao što je ovom studijom pokazano, vrste će se verovatno uspešnije prilagoditi na buduće promene sredine većih razmera. Stoga, rezultati ovih istraživanja sprovedenih na području izuzetnog prirodnog i kulturnog nasleđa (Rezervat biosfere „Golija-Studenica“, UNESCO–MAB) predstavljaju stabilnu

naučnu osnovu očuvanja biodiverziteta i direktnu podršku sprovođenju međunarodnih obaveza o zaštiti biodiverziteta na lokalnom i globalnom nivou.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Kvantifikacija najzastupljenijih diarilheptanoida u etanolnim ekstraktima kore *Alnus glutinosa* i *A. incana* je primenjena sa ciljem utvrđivanja diferencijacije populacija i delimitacije ovih vrsta. U poređnim testovima utvrđene su statistički značajne razlike u koncentraciji diarilheptanoida između ispitivanih vrsta. Multivarijantne metode (PCA i DA) pokazale su formiranje grupa populacija na osnovu pripadnosti odgovarajućim vrstama. Na taj način utvrđen je hemotaksonomski značaj diarilheptanoida na interspecijskom nivou i mogućnost njihove upotrebe u diferencijaciji vrsta.
2. Poređenjem populacija Rimski most (*A. glutinosa*) i Sastavci (*A. incana*) u prvoj godini uzorkovanja, četiri jedinke (po dve iz obe populacije) su se izdvojile kao zasebna grupa na PCA. Ove jedinke su bile bliže *A. glutinosa* prema koncentraciji alnuzida A i B i platifilozida, dok se prema koncentraciji oregonina, hirsutanonola i prinosu ekstrakta nisu razlikovale od *A. incana*. Koncentracija hirsutanonol-5-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozida pokazala je intermedijarnu vrednost između vrsta, dok je koncentracija rubranozida A bila izrazito viša u odnosu na jedinke iz obe vrste. Ovi rezultati se podudaraju sa ranije zabeleženim efektima hibridizacije na koncentraciju sekundarnih metabolita. DA je takođe izdvojila ove jedinke kao zasebnu grupu. Na osnovu ovih rezultata, izdvojene jedinke bi mogle predstavljati spontane hibride između *A. glutinosa* i *A. incana*.
3. U drugoj godini uzorkovanja, PCA je pokazala dobro razdvajanje geografski udaljenih populacija *A. glutinosa* (Prilički kiseljak) i *A. incana* (Golijaska reka) i delimično preklapanje geografski bliskih populacija Rimski most i Sastavci. Opšti utisak je da geografska bliskost populacija Rimski most i Sastavci povećava njihovu hemijsku sličnost. Populacija vrste *A. incana* sa lokaliteta Sastavci je ispoljila najvarijabilniji hemijski sastav u pogledu koncentracije odabranih diarilheptanoida, preklapajući se sa svim ostalim populacijama na grafikonu PCA. Pretpostavlja se da je uzrok ovako velike varijabilnosti populacije Sastavci postojanje hibridnih jedinki.
4. PCA je delimično razdvojila populacije unutar vrsta. S obzirom na to da se populacije nalaze na relativno maloj međusobnoj udaljenosti, može se

- pretpostaviti da je genetička distanca između populacija unutar vrsta mala i da uzrok njihovog delimičnog razdvajanja leži u adaptaciji na različite biotičke i abiotičke faktore koji karakterišu njihova staništa i/ili fenotipskoj plastičnosti.
5. DA je najviše izdvojila populaciju Golijska reka od ostalih populacija, što može biti posledica razlike u klimatskim faktorima, jer se nalazi na najvećoj nadmorskoj visini u odnosu na ostale populacije, na lokalitetu koji karakterišu najniže godišnje temperature i najveće količine padavina.
  6. Populacije Rimski most (*A. glutinosa*) i Sastavci (*A. incana*) pokazale su značajne razlike u koncentracijama diarilheptanoida u dve sezone sakupljanja kore. Značajna varijabilnost koncentracije diarilheptanoida između sezona ukazuje na mogućnost različitih plastičnih odgovora u različitim sezonama, u prvom redu na veću količinu padavina u određenom delu godine koja uslovljava veću podložnost biljaka razvoju bakterijskih i gljivičnih infekcija, pa bi veća koncentracija diarilheptanoida u junu mogla biti i znak indukovane odbrane.
  7. Morfometrijske analize su pokazale da je oblik lista specifična karakteristika za vrstu kod *A. glutinosa* i *A. incana*. Osim toga, ovim analizama su utvrđene suptilne razlike oblika listova između populacija unutar vrsta, što može biti rezultat genetičkih i/ili sredinskih efekata. Otkrivene su i potencijalne hibridne jedinke na osnovu listova uzorkovanih u populacijama *A. incana* koji oblikom podsećaju na *A. glutinosa*. Prilikom ispitivanja varijabilnosti oblika listova, jedinke su se grupisale na osnovu pripadnosti odgovarajućim vrstama po PC1 osi. U ekstremnim segmentima grafikona grupisale su se jedinke koje imaju oblike listova tipične za svaku vrstu. U središnjem segmentu grafikona zapažene su prelazne forme između ovih ekstrema, što govori o velikoj fenotipskoj plastičnosti ispitanih populacija i/ili prisustvu hibrida.
  8. CVA je pokazala jasno odvajanje vrsta duž CV1 i delimično odvajanje populacija unutar vrsta duž CV2 na osnovu varijacija oblika listova. Odvajanje po CV2 je vezano za izduživanje listova: duži i uži listovi su više vezani za populacije Rimski most (*A. glutinosa*) i Sastavci (*A. incana*), a kraći i širi listovi preovlađuju u populacijama Prilički kiseljak (*A. glutinosa*) i Golijska reka (*A. incana*). Geografski bliske populacije vrsta *A. glutinosa* (Rimski most) i *A. incana* (Sastavci) su manje razdvojene duž CV1 i stiče se utisak da su po obliku

lista međusobno sličnije u odnosu na geografski udaljene populacije ovih vrsta. DA je ukupno 18 listova iz obe populacije *A. incana* (14 iz populacije Sastavci i četiri iz populacije Golijaska reka) pogrešno klasifikovala kao *A. glutinosa*, što bi moglo ukazivati na hibridno poreklo jedinki sa kojih su uzorkovani. Alternativno, njihov oblik može biti rezultat fenotipske plastičnosti. SN je potvrdio mogućnost da te jedinke predstavljaju potencijalne hibride, pokazavši intermedijarne vrednosti između *A. glutinosa* i *A. incana*.

9. Ispitivanje veličine centroida (CS) ukazuje na to da se populacija Sastavci i potencijalni hibridi karakterišu manjom veličinom lista u odnosu na ostale populacije, što može biti indikacija nedovoljnih resursa, dužih perioda plavljenja ili nekih drugih stresnih uticaja u ovoj populaciji.
10. Kod obe vrste postoji značajna korelacija između broja parova nerava (SN) i veličine lista (CS). Kod *A. glutinosa* nema značajnih razlika u SN i CS između populacija, dok razlike između populacija *A. incana* postoje. Na osnovu odnosa ovih parametara, može se zaključiti da se pojedine populacije (Golijaska reka) putem morfoloških adaptacija lista prilagođavaju specifičnim uslovima staništa (niža srednja godišnja temperatura i veća količina padavina). Takođe, pokazano je da odnos parametara SN i CS može biti pouzdan indikator delovanja sredinskih faktora, naročito dostupnosti vode.
11. Obrasci alometrije bi mogli biti odraz heterogenosti sredinskih faktora u različitim populacijama vrsta roda *Alnus*. Različit nagib alometrijske krive za populaciju Sastavci bi mogao biti uzrokovan nekom vrstom stresa, s obzirom na to da se ova populacija karakteriše manjom veličinom lista u odnosu na ostale populacije.
12. Na osnovu rezultata hemijskih i morfometrijskih analiza može se zaključiti da populacija vrste *A. incana* sa lokaliteta Sastavci raste u suboptimalnim uslovima. Međutim, velika varijabilnost fenotipskih karakteristika omogućava joj adaptaciju i opstanak u datim uslovima.



## LITERATURA

- Abedini, A., Chollet, S., Angelis, A., Borie, N., Nuzillard, J.-M., Skaltsounis, A.-L., Reynaud, R., Gangloff, S.C., Renault, J.-H., Hubert, J. (2016) Bioactivity-guided identification of antimicrobial metabolites in *Alnus glutinosa* bark and optimization of oregonin purification by Centrifugal Partition Chromatography. *J. Chromatogr. B* 1029–1030:121–127.
- Abyshev, A.Z., Agaev, É.M., Guseinov, A.B. (2007) Studies of the chemical composition of birch bark extracts (*Cortex betula*) from the *Betulaceae* family. *Pharm. Chem. J.* 41:419–423.
- Adams, D.C., Otárola-Castillo, E. (2013) Geomorph: an r package for the collection and analysis of geometric morphometric shape data. *Methods Ecol. Evol.* 4:393–399.
- Akbarian, M.R., Tabari, M., Akbarinia, M., Zarafshar, M., Meave, J.A., Yousefzadeh, H., Sattarian, A. (2011) Effects of elevational gradient on leaf and stomatal morphology of Caucasian alder (*Alnus subcordata*) in the Hyrcanian forest, Iran. *Folia Oecologica* 38:203–224.
- Albert, C.H., Grassein, F., Schurr, F.M., Vieilledent, G., Violle, C. (2011) When and how should intraspecific variability be considered in trait-based plant ecology? *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 13:217–225.
- Alberti, Á., Riethmüller, E., Béni, S. (2018) Characterization of diarylheptanoids: An emerging class of bioactive natural products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147:13–34.
- Almeida, A.M., Castel-Branco, M.M., Falcão, A.C. (2002) Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *J. Chromatogr. B* 774:215–222.
- Anderson, A.B., Riffer, R., Wong, A. (1970) Chemistry of Genus *Pinus*. VII. Monoterpenes, Fatty and Resin Acids of *Pinus monophylla* and *Pinus quadrifolia*. *Holzforschung* 24:182–184.

- Ansari, M.A., Anurag, A., Fatima, Z., Hameed, S. (2013) Natural Phenolic Compounds: A Potential Antifungal Agent. In A. Méndez-Vilas, Ed., *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*, Microbiology Book Series, Vol. 2, pp. 1189–1195. Formatex Research Center, Spain.
- Aosaar, J., Uri, V. (2008) Biomass production of grey alder, hybrid alder and silver birch stands on abandoned agricultural land. *For. Stud.* 48:53–66.
- Backhaus, R.A. (1985) Rubber Formation in Plants—a Mini-Review. *Isr. J. Bot.* 34:283–293.
- Bailie, A., Renaut, S., Ubalijoro, E., Guerrero-Analco, J.A., Saleem, A., Haddad, P., Arnason, J.T., Johns, T., Cuerrier, A. (2016) Phytogeographic and genetic variation in *Sorbus*, a traditional antidiabetic medicine—adaptation in action in both a plant and a discipline. *PeerJ* 4:e2645.
- Banaev, E.V. (2009) On the effect of climate on the morphological structure of *Alnus hirsuta* (Betulaceae). *Russ. J. Ecol.* 40:18–23.
- Banaev, E.V., Bažant, V. (2007) Study of natural hybridization between *Alnus incana* (L.) Moench. and *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *J. For. Sci.* 53:66–73.
- Barlow, P. (2005) From Cambium to Early Cell Differentiation Within the Secondary Vascular System. In N.M. Holbrook and M.A. Zwieniecki, Eds., *Vascular Transport in Plants*, pp. 279–306. Academic Press, Burlington.
- Bašić, N., Selimović, E., Pustahija, F. (2014) Morphological identification of nothospecies *Alnus* × *pubescens* Tausch. and their new localities in central Bosnia. *Works Fac. For. Univ. Sarajevo* 44:15–24.
- Bellis, D.J., Satake, K., Noda, M., Nishimura, N., McLeod, C.W. (2002) Evaluation of the historical records of lead pollution in the annual growth rings and bark pockets of a 250-year-old *Quercus crispula* in Nikko, Japan. *Sci. Total Environ.* 295:91–100.

- Berlizov, A.N., Blum, O.B., Filby, R.H., Malyuk, I.A., Tryshyn, V.V. (2007) Testing applicability of black poplar (*Populus nigra* L.) bark to heavy metal air pollution monitoring in urban and industrial regions. *Sci. Total Environ.* 372:693–706.
- Bojovic, S., Jurc, M., Drazic, D., Pavlovic, P., Mitrovic, M., Djurdjevic, L., Dodd, R.S., Afzal-Rafii, Z., Barbero, M. (2005) Origin identification of *Pinus nigra* populations in southwestern Europe using terpene composition variations. *Trees* 19:531–538.
- Bojović, S., Jurc, M., Ristić, M., Popović, Z., Matić, R., Vidaković, V., Stefanović, M., Jurc, D. (2016) Essential-Oil Variability in Natural Populations of *Pinus mugo* Turra from the Julian Alps. *Chem. Biodivers.* 13:181–187.
- Bousquet, J., Cheliak, W.M., Lalonde, M. (1988) Allozyme Variation Within and Among Mature Populations of Speckled Alder (*Alnus rugosa*) and Relationships with Green Alder (*A. crispa*). *Am. J. Bot.* 75:1678–1686.
- Brodribb, T.J., Feild, T.S., Jordan, G.J. (2007) Leaf Maximum Photosynthetic Rate and Venation Are Linked by Hydraulics. *Plant Physiol.* 144:1890–1898.
- Caseys, C., Stritt, C., Glauser, G., Blanchard, T., Lexer, C. (2015) Effects of Hybridization and Evolutionary Constraints on Secondary Metabolites: The Genetic Architecture of Phenylpropanoids in European *Populus* Species. *PLOS ONE* 10:e0128200.
- Caudullo, G., Welk, E., San-Miguel-Ayanz, J. (2017) Chorological maps for the main European woody species. *Data Brief* 12:662–666.
- Changkija, S. (1999) Folk Medicinal Plants of the Nagas in India. *Asian Folk. Stud.* 58:205–230.
- Charlesworth, D. (1995) Hybrid Speciation: Evolution under the microscope. *Curr. Biol.* 5:835–836.

- Chen, Z., Li, J. (2004) Phylogenetics and Biogeography of *Alnus* (Betulaceae) Inferred from Sequences of Nuclear Ribosomal DNA ITS Region. *Int. J. Plant Sci.* 165:325–335.
- Chen, Z.D., Manchester, S.R., Sun, H.Y. (1999) Phylogeny and evolution of the Betulaceae as inferred from DNA sequences, morphology, and paleobotany. *Am. J. Bot.* 86:1168–1181.
- Cheng, D., Vrieling, K., Klinkhamer, P.G.L. (2011) The effect of hybridization on secondary metabolites and herbivore resistance: implications for the evolution of chemical diversity in plants. *Phytochem. Rev.* 10:107–117.
- Cheong, L.Y., Suk, S., Thimmegowda, N.R., Chung, M.-Y., Yang, H., Seo, S.G., Shwetha, B., Kim, J.-E., Kwon, J.Y., Kim, B.Y., Lee, K.W. (2015) Hirsutenone Directly Targets PI3K and ERK to Inhibit Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes. *J. Cell. Biochem.* 116:1361–1370.
- Choi, J.G., Lee, M.W., Choi, S.E., Kim, M.H., Kang, O.H., Lee, Y.S., Chae, H.S., Obiang-Obounou, B., Oh, Y.C., Kim, M.R., Shin, D.W., Lee, J.H., Kwon, D.Y. (2012) Antibacterial activity of bark of *Alnus pendula* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 16:853–859.
- Choi, S.E. (2013) Chemotaxonomic Significance of Oregonin in *Alnus* Species. *Asian J. Chem.* 25:6989–6990.
- Choi, S.E., Jeong, M.S., Kang, M.J., Lee, D.I., Joo, S.S., Lee, C.S., Bang, H., Lee, M.-K., Myung, S.-C., Choi, Y.W., Lee, K., Seo, S.W., Lee, M.W. (2010) Effect of topical application and intraperitoneal injection of oregonin on atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Exp. Dermatol.* 19:e37–e43.
- Claeson, P., Claeson, U.P., Tuchinda, P., Reutrakul, V. (2002) Occurrence, structure and bioactivity of 1,7-diarylheptanoids. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 26:881–908.
- Claessens, H., Oosterbaan, A., Savill, P., Rondeux, J. (2010) A review of the characteristics of black alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) and their implications for silvicultural practices. *For. Int. J. For. Res.* 83:163–175.

- Conkova, M., Kubiznakova, J. (2008) Lead isotope ratios in tree bark pockets: An indicator of past air pollution in the Czech Republic. *Sci. Total Environ.* 404:440–445.
- Cordell, S., Goldstein, G., Mueller-Dombois, D., Webb, D., Vitousek, P.M. (1998) Physiological and morphological variation in *Metrosideros polymorpha*, a dominant Hawaiian tree species, along an altitudinal gradient: the role of phenotypic plasticity. *Oecologia* 113:188–196.
- Da Silva, C.P., Emídio, E.S., De Marchi, M.R.R. (2015) Method validation using weighted linear regression models for quantification of UV filters in water samples. *Talanta* 131:221–227.
- Demasi, S., Caser, M., Lonati, M., Cioni, P.L., Pistelli, L., Najar, B., Scariot, V. (2018) Latitude and Altitude Influence Secondary Metabolite Production in Peripheral Alpine Populations of the Mediterranean Species *Lavandula angustifolia* Mill. *Front. Plant Sci.* 9.
- Dinić, J., Novaković, M., Podolski-Renić, A., Stojković, S., Mandić, B., Tešević, V., Vajs, V., Isaković, A., Pešić, M. (2014) Antioxidative Activity of Diarylheptanoids from the Bark of Black Alder (*Alnus glutinosa*) and Their Interaction with Anticancer Drugs. *Planta Med.* 80:1088–1096.
- Dinić, J., Randelović, T., Stanković, T., Dragoj, M., Isaković, A., Novaković, M., Pešić, M. (2015) Chemo-protective and regenerative effects of diarylheptanoids from the bark of black alder (*Alnus glutinosa*) in human normal keratinocytes. *Fitoterapia* 105:169–176.
- Duminil, J., Michele, M.D. (2009) Plant species delimitation: A comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosyst.* 143:528–542.
- Fernandes, A., Sousa, A., Mateus, N., Cabral, M., de Freitas, V. (2011) Analysis of phenolic compounds in cork from *Quercus suber* L. by HPLC–DAD/ESI–MS. *Food Chem.* 125:1398–1405.

- Fontoura, F.M., Matias, R., Ludwig, J., Oliveira, A.K.M. de, Bono, J.A.M., Martins, P. de F.R.B., Corsino, J., Guedes, N.M.R. (2015) Seasonal effects and antifungal activity from bark chemical constituents of *Sterculia apetala* (Malvaceae) at Pantanal of Miranda, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Amaz.* 45:283–292.
- Förster, N., Ulrichs, C., Zander, M., Kätzel, R., Mewis, I. (2008) Influence of the season on the salicylate and phenolic glycoside contents in the bark of *Salix daphnoides*, *Salix pentandra*, and *Salix purpurea*. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 82:99–102.
- Fraenkel, G.S. (1959) The Raison d'Être of Secondary Plant Substances: These odd chemicals arose as a means of protecting plants from insects and now guide insects to food. *Science* 129:1466–1470.
- Franceschi, V.R., Krekling, T., Berryman, A.A., Christiansen, E. (1998) Specialized phloem parenchyma cells in Norway spruce (Pinaceae) bark are an important site of defense reactions. *Am. J. Bot.* 85:601–615.
- Furlow, J. (1979) The systematics of the American species of *Alnus* (Betulaceae). *Rhodora* 81:1–121.
- Gachon, C.M.M., Langlois-Meurinne, M., Saindrenan, P. (2005) Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci.* 10:542–549.
- Gajić, M. (1989) Flora i vegetacija Golije i Javora, 592 p. Šumarski fakultet - Beograd, OOUR Šumarstvo „Golija” - Ivanjica, Ivanjica.
- Gange, A.C. (1995) Aphid Performance in An Alder (*Alnus*) Hybrid Zone. *Ecology* 76:2074–2083.
- Ghalambor, C.K., McKAY, J.K., Carroll, S.P., Reznick, D.N. (2007) Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Funct. Ecol.* 21:394–407.

- Givnish, T.J. (1987) Comparative Studies of Leaf Form: Assessing the Relative Roles of Selective Pressures and Phylogenetic Constraints. *New Phytol.* 106:131–160.
- Givnish, T.J. (2010) Ecology of plant speciation. *Taxon* 59:1326–1366.
- Gömöry, D., Paule, L. (2002) Spatial and microgeographical genetic differentiation of black alder (*Alnus glutinosa* Gaertn.) populations. *For. Ecol. Manag.* 160:3–9.
- Grimm, G.W., Renner, S.S. (2013) Harvesting Betulaceae sequences from GenBank to generate a new chronogram for the family. *Bot. J. Linn. Soc.* 172:465–477.
- Guchelaar, H.-J., Ten Napel, C.H.H., de Vries, E.G.E., Mulder, N.H. (1994) Clinical, toxicological and pharmaceutical aspects of the antineoplastic drug taxol: A review. *Clin. Oncol.* 6:40–48.
- Gupta, S.C., Patchva, S., Koh, W., Aggarwal, B.B. (2012) Discovery of Curcumin, a Component of the Golden Spice, and Its Miraculous Biological Activities. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 39:283–299.
- Hamilton, J.G., Zangerl, A.R., DeLucia, E.H., Berenbaum, M.R. (2001) The carbon–nutrient balance hypothesis: its rise and fall. *Ecol. Lett.* 4:86–95.
- Hammond, G.B., Fernández, I.D., Villegas, L.F., Vaisberg, A.J. (1998) A survey of traditional medicinal plants from the Callejón de Huaylas, Department of Ancash, Perú. *J. Ethnopharmacol.* 61:17–30.
- Harborne, J.B. (2000) Arsenal for Survival: Secondary Plant Products. *Taxon* 49:435–449.
- Hartmann, T. (1996) Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomol. Exp. Appl.* 80:177–188.
- Hartmann, T. (2007) From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68:2831–2846.

- Heuvel, B.D.V. (2011) *Alnus*. In C. Kole, Ed., Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources - Forest Trees, pp. 1–14. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Holeski, L.M., Hillstrom, M.L., Whitham, T.G., Lindroth, R.L. (2012) Relative importance of genetic, ontogenetic, induction, and seasonal variation in producing a multivariate defense phenotype in a foundation tree species. *Oecologia* 170:695–707.
- Huenneke, L.F. (1985) Spatial Distribution of Genetic Individuals in Thickets of *Alnus incana* ssp. *Rugosa*, a Clonal Shrub. *Am. J. Bot.* 72:152–158.
- Hunter, M.D., Malcolm, S.B., Hartley, S.E. (1996) Population-level variation in plant secondary chemistry, and the population biology of herbivores. *Chemoecology* 7:45–56.
- Ilic-Tomic, T., Sokovic, M., Vojnovic, S., Ciric, A., Veljic, M., Nikodinovic-Runic, J., Novakovic, M. (2017) Diarylheptanoids from *Alnus viridis* ssp. *viridis* and *Alnus glutinosa*: Modulation of Quorum Sensing Activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Planta Med.* 83:117–125.
- Izawa, K., Amino, Y., Kohmura, M., Ueda, Y., Kuroda, M. (2010) Human–Environment Interactions – Taste. In *Comprehensive Natural Products II*, pp. 631–671. Elsevier, Oxford.
- Jensen, R.J., Hokanson, S.C., Isebrands, J.G., Hancock, J.F. (1993) Morphometric Variation in Oaks of the Apostle Islands in Wisconsin: Evidence of Hybridization Between *Quercus rubra* and *Q. ellipsoidalis* (Fagaceae). *Am. J. Bot.* 80:1358–1366.
- Jensen, R.J., Ciofani, K.M., Miramontes, L.C. (2002) Lines, Outlines, and Landmarks: Morphometric Analyses of Leaves of *Acer rubrum*, *Acer saccharinum* (Aceraceae) and Their Hybrid. *Taxon* 51:475–492.



- Joo, S.-S., Kim, M.-S., Oh, W.-S., Lee, D.-I. (2002) Enhancement of NK Cytotoxicity, Antimetastasis and Elongation Effect of Survival Time in B16-F10 Melanoma Cells by Oregonin. *Arch. Pharm. Res.* 25:493–499.
- Jovanović, B. (1970) Rod ALNUS Hill. In M. Josifović, Ed., *Flora SR Srbije*, Vol. II, pp. 102–105. Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd.
- Jovanović, B. (2007) *Dendrologija*, 536 p. Šumarski fakultet, Beograd.
- Jovanović, B., Mišić, V., Dinić, A., Diklić, N., Vukićević, E. (1997) *Vegetacija Srbije II, Šumske zajednice 1*, 474 p. Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd.
- Kaiser, H.F. (1960) The Application of Electronic Computers to Factor Analysis. *Educ. Psychol. Meas.* 20:141–151.
- Katsuyama, Y., Kita, T., Funa, N., Horinouchi, S. (2009) Curcuminoid Biosynthesis by Two Type III Polyketide Synthases in the Herb *Curcuma longa*. *J. Biol. Chem.* 284:11160–11170.
- Keinänen, M., Julkunen-Tiitto, R., Mutikainen, P., Walls, M., Ovaska, J., Vapaavuori, E. (1999) Trade-Offs in Phenolic Metabolism of Silver Birch: Effects of Fertilization, Defoliation, and Genotype. *Ecology* 80:1970–1986.
- Keserü, G.M., Nógrádi, M. (1995) The chemistry of natural diarylheptanoids. In Attar-Rahman, Ed., *Studies in Natural Products Chemistry, Series D*, Vol. 17, pp. 357–394. Elsevier.
- Khatoon, S. (2017) A Novel Histological Approach for Identification of Alkaloid Bearing Plants. *Int. J. Bot.* 13:28–36.
- Kim, S.T., Kim, J.D., Ahn, S.H., Ahn, G.S., Lee, Y.I., Jeong, Y.S. (2005) Hepatoprotective and antioxidant effects of *Alnus japonica* extracts on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother. Res.* 18:971–975.

- Kita, T., Imai, S., Sawada, H., Kumagai, H., Seto, H. (2008) The Biosynthetic Pathway of Curcuminoid in Turmeric (*Curcuma longa*) as Revealed by <sup>13</sup>C-Labeled Precursors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72:1789–1798.
- Klingenberg, C.P. (2011) MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Resour.* 11:353–357.
- Klingenberg, C.P. (2015) Analyzing Fluctuating Asymmetry with Geometric Morphometrics: Concepts, Methods, and Applications. *Symmetry* 7:843–934.
- Klingenberg, C.P. (2016) Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. *Dev. Genes Evol.* 226:113–137.
- Klingenberg, C.P., McIntyre, G.S. (1998) Geometric Morphometrics of Developmental Instability: Analyzing Patterns of Fluctuating Asymmetry with Procrustes Methods. *Evolution* 52:1363–1375.
- Klingenberg, C.P., Barluenga, M., Meyer, A. (2002) Shape Analysis of Symmetric Structures: Quantifying Variation among Individuals and Asymmetry. *Evolution* 56:1909–1920.
- Klingenberg, C.P., Duttke, S., Whelan, S., Kim, M. (2012) Developmental plasticity, morphological variation and evolvability: a multilevel analysis of morphometric integration in the shape of compound leaves. *J. Evol. Biol.* 25:115–129.
- Kojić, M., Pekić, S., Dajić, Z. (2001) *Botanika*, 7th ed., 516 p. Romanov, Banja Luka, Beograd.
- Krauze-Michalska, E., Boratyńska, K. (2013) European geography of *Alnus incana* leaf variation. *Plant Biosyst.* 147:601–610.
- Krstinic, A., Gracan, J., Kajba, D. (2002) *Alnus* spp. genetic resources conservation strategy. In Noble Hardwoods Network, pp. 44–49. Presented at the Fourth and Fifth EUFORGEN Noble Hardwoods Network meetings.

- Kundziņš, A.V. (1969) Study of the genus *Alnus* in Latvian SSR. Thesis, Elgava: Latvian Agricultural Academy.
- Lai, Y.-C., Chen, C.-K., Lin, W.-W., Lee, S.-S. (2012) A comprehensive investigation of anti-inflammatory diarylheptanoids from the leaves of *Alnus formosana*. *Phytochemistry* 73:84–94.
- Laitinen, J., Julkunen-Tiitto, R., Rousi, M., Heinonen, J., Tahvanainen, J. (2005) Ontogeny and Environment as Determinants of the Secondary Chemistry of Three Species of White Birch. *J. Chem. Ecol.* 31:2243–2262.
- Laitinen, M.-L., Julkunen-Tiitto, R., Yamaji, K., Heinonen, J., Rousi, M. (2004) Variation in birch bark secondary chemistry between and within clones: implications for herbivory by hares. *Oikos* 104:316–326.
- Lauberts, M., Telysheva, G., Venskutonis, P.R., Lauberte, L., Dizhbite, T., Kazernavičiūte, R., Pukalskas, A. (2017) Diarylheptanoid-rich extract of grey and black alder barks: an effective dietary antioxidant in mayonnaise. *Chem. Pap.* 71:1007–1012.
- Le Roy, J., Huss, B., Creach, A., Hawkins, S., Neutelings, G. (2016) Glycosylation Is a Major Regulator of Phenylpropanoid Availability and Biological Activity in Plants. *Front. Plant Sci.* 7.
- Lee, K.K., Bahler, B.D., Hofmann, G.A., Mattern, M.R., Johnson, R.K., Kingston, D.G.I. (1998) Isolation and structure elucidation of new PKC $\alpha$  inhibitors from *Pinus flexilis*. *J. Nat. Prod.* 61:1407–1409.
- Lemke, I.H., Kolb, A., Diekmann, M.R. (2012) Region and site conditions affect phenotypic trait variation in five forest herbs. *Acta Oecologica* 39:18–24.
- Lev-Yadun, S. (2011) Bark. In John Wiley & Sons, Ltd, Ed., eLS. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.

- Li, H., Webster, D., Johnson, J.A., Gray, C.A. (2015) Anti-mycobacterial triterpenes from the Canadian medicinal plant *Alnus incana*. J. Ethnopharmacol. 165:148–151.
- Li, L., Braiteh, F.S., Kurzrock, R. (2005) Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis. Cancer 104:1322–1331.
- Liimatainen, J., Karonen, M., Sinkkonen, J., Helander, M., Salminen, J.-P. (2012) Phenolic Compounds of the Inner Bark of *Betula pendula*: Seasonal and Genetic Variation and Induction by Wounding. J. Chem. Ecol. 38:1410–1418.
- Lim, H.-W., Kim, M.-K., Kim, H.-J., Shim, J.-G., Kim, G.-H., Choi, H.-K., Lee, M.-W. (2004) Quantitative determination of diarylheptanoid compounds from Korean *Alnus*. Korean J. Pharmacogn. 35:384–387.
- Lindroth, R.L., Hsia, M.T.S., Scriber, J.M. (1987) Seasonal patterns in the phytochemistry of three *Populus* species. Biochem. Syst. Ecol. 15:681–686.
- Liu, A., Lou, H., Zhao, L., Fan, P. (2006) Validated LC/MS/MS assay for curcumin and tetrahydrocurcumin in rat plasma and application to pharmacokinetic study of phospholipid complex of curcumin. J. Pharm. Biomed. Anal. 40:720–727.
- Loveless, M.D., Hamrick, J.L. (1984) Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. Annu. Rev. Ecol. Syst. 15:65–95.
- Lundqvist, A., Magnusson, L.U., Ullström, C., Krasilnikova, J., Telysheva, G., Dizhbite, T., Hultén, L.M. (2015) Oregonin reduces lipid accumulation and proinflammatory responses in primary human macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. 458:693–699.
- Lv, H., She, G. (2012) Naturally Occurring Diarylheptanoids - A Supplementary Version. Rec. Nat. Prod. 6:321–333.
- Mahdi, J.G. (2010) Medicinal potential of willow: A chemical perspective of aspirin discovery. J. Saudi Chem. Soc. 14:317–322.

- Maimoona, A., Naeem, I., Saddiqe, Z., Jameel, K. (2011) A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *J. Ethnopharmacol.* 133:261–277.
- Mandiwana, K.L., Resane, T., Panichev, N., Ngobeni, P. (2006) The application of tree bark as bio-indicator for the assessment of Cr(VI) in air pollution. *J. Hazard. Mater.* 137:1241–1245.
- Martin, N.H., Willis, J.H. (2007) Ecological divergence associated with mating system causes nearly complete reproductive isolation between sympatric *Mimulus* species. *Evolution* 61:68–82.
- Martineau, L.C., Hervé, J., Muhamad, A., Saleem, A., Harris, C.S., Arnason, J.T., Haddad, P.S. (2010) Anti-adipogenic activities of *Alnus incana* and *Populus balsamifera* bark extracts, part I: sites and mechanisms of action. *Planta Med.* 76:1439–1446.
- McCune, L.M., Johns, T. (2007) Antioxidant activity relates to plant part, life form and growing condition in some diabetes remedies. *J. Ethnopharmacol.* 112:461–469.
- Mejnartowicz, L. (1999) Evidence for long-term heterosis phenomenon in the *Alnus incana* × *glutinosa* F-1 hybrids. *Silvae Genet. Ger.* 48.
- Mejnartowicz, L. (2008) Genetic variation within and among naturally regenerating populations of alder (*Alnus glutinosa*). *Acta Soc. Bot. Pol.* 77:105–110.
- Mikola, P., Uomala, P., Mälkönen, E. (1983) Application of biological nitrogen fixation in European silviculture. In *Biological nitrogen fixation in forest ecosystems: foundations and applications*, Forestry Sciences Series, pp. 279–294. Springer, Dordrecht.
- Milanović, A., Milovanović, B. (2010) Prikaz klimatskih karakteristika Golije u funkciji evaluacije prostora. *Zb. Rad. - Geogr. Fak. Univ. u Beogr.* 58:29–46.
- Moore, B.D., Foley, W.J. (2005) Tree use by koalas in a chemically complex landscape. *Nature* 435:488–490.

- Moore, B.D., Andrew, R.L., Külheim, C., Foley, W.J. (2014) Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytol.* 201:733–750.
- Mshvildadze, V., Legault, J., Lavoie, S., Gauthier, C., Pichette, A. (2007) Anticancer diarylheptanoid glycosides from the inner bark of *Betula papyrifera*. *Phytochemistry* 68:2531–2536.
- Muilenburg, V.L., Phelan, P.L., Bonello, P., Herms, D.A. (2011) Inter- and Intra-Specific Variation in Stem Phloem Phenolics of Paper Birch (*Betula papyrifera*) and European White Birch (*Betula pendula*). *J. Chem. Ecol.* 37:1193–1202.
- Navarro-Cerrillo, R.M., Ruiz Gómez, F.J., Cabrera-Puerto, R.J., Sánchez-Cuesta, R., Palacios Rodriguez, G., Quero Pérez, J.L. (2018) Growth and physiological sapling responses of eleven *Quercus ilex* ecotypes under identical environmental conditions. *For. Ecol. Manag.* 415–416:58–69.
- Nicotra, A.B., Atkin, O.K., Bonser, S.P., Davidson, A.M., Finnegan, E.J., Mathesius, U., Poot, P., Purugganan, M.D., Richards, C.L., Valladares, F., van Kleunen, M. (2010) Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends Plant Sci.* 15:684–692.
- Niinemets, Ü., Portsmouth, A., Tobias, M. (2007) Leaf shape and venation pattern alter the support investments within leaf lamina in temperate species: a neglected source of leaf physiological differentiation? *Funct. Ecol.* 21:28–40.
- Nikolić, B., Ristić, M., Tešević, V., Marin, P.D., Bojović, S. (2011) Terpene chemodiversity of relict conifers *Picea omorika*, *Pinus heldreichii*, and *Pinus peuce*, endemic to Balkan. *Chem. Biodivers.* 8:2247–2260.
- Novaković, M. (2014, July 4) Izolovanje i identifikacija diarilheptanoida iz biljnih vrsta crna jova (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) i zelena jova (*Alnus viridis* (Chaix) DC. subsp. *viridis*) i njihova biološka aktivnost. Thesis, Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet.

- Novaković, M., Stanković, M., Vučković, I., Todorović, N., Trifunović, S., Tešević, V., Vajs, V., Milosavljević, S. (2013) Diarylheptanoids from *Alnus glutinosa* Bark and Their Chemoprotective Effect on Human Lymphocytes DNA. *Planta Med.* 79:499–505.
- Novaković, M., Stanković, M., Vučković, I., Todorović, N., Trifunović, S., Apostolović, D., Mandić, B., Veljić, M., Marin, P., Tešević, V., Vajs, V., Milosavljević, S. (2014a) Diarylheptanoids from green alder bark and their potential for DNA protection. *Chem. Biodivers.* 11:872–885.
- Novaković, M., Pešić, M., Trifunović, S., Vučković, I., Todorović, N., Podolski-Renić, A., Dinić, J., Stojković, S., Tešević, V., Vajs, V., Milosavljević, S. (2014b) Diarylheptanoids from the bark of black alder inhibit the growth of sensitive and multi-drug resistant non-small cell lung carcinoma cells. *Phytochemistry* 97:46–54.
- Novaković, M., Novaković, I., Cvetković, M., Sladić, D., Tešević, V. (2015) Antimicrobial activity of the diarylheptanoids from the black and green alder. *Braz. J. Bot.* 38:441–446.
- Novakovic, M., Nikodinovic-Runic, J., Veselinovic, J., Ilic-Tomic, T., Vidakovic, V., Tesevic, V., Milosavljevic, S. (2017) Bioactive Pentacyclic Triterpene Ester Derivatives from *Alnus viridis* ssp. *viridis* Bark. *J. Nat. Prod.* 80:1255–1263.
- Obst, J.R. (1997) Special (Secondary) Metabolites from Wood. In A. Bruce and J. Palfreyman, Eds., *Forest Products Biotechnology*, pp. 151-165. CRC Press, London.
- Ohori, H., Yamakoshi, H., Tomizawa, M., Shibuya, M., Kakudo, Y., Takahashi, A., Takahashi, S., Kato, S., Suzuki, T., Ishioka, C., Iwabuchi, Y., Shibata, H. (2006) Synthesis and biological analysis of new curcumin analogues bearing an enhanced potential for the medicinal treatment of cancer. *Mol. Cancer Ther.* 5:2563–2571.

- Orians, C.M. (2000) The effects of hybridization in plants on secondary chemistry: implications for the ecology and evolution of plant–herbivore interactions. *Am. J. Bot.* 87:1749–1756.
- Ossipov, V., Haukioja, E., Ossipova, S., Hanhimäki, S., Pihlaja, K. (2001) Phenolic and phenolic-related factors as determinants of suitability of mountain birch leaves to an herbivorous insect. *Biochem. Syst. Ecol.* 29:223–240.
- Ou, P., Hasegawa, S., Herman, Z., Fong, C.H. (1988) Limonoid biosynthesis in the stem of *Citrus limon*. *Phytochemistry* 27:115–118.
- Parnell, J.A.N. (1994) Variation and hybridisation of *Alnus* Miller in Ireland. *Watsonia* 20:67–70.
- Parolin, P. (2002) Seasonal Changes of Specific Leaf Mass and Leaf Size in Trees of Amazonian Floodplains. *Phyton Ann. Rei Bot.* 42:169–185.
- Pásztor, Z., Mohácsiné, I.R., Gorbacheva, G., Börcsök, Z. (2016) The Utilization of Tree Bark. *BioResources* 11:7859–7888.
- Patočka, J. (2003) Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J. Appl. Biomed.* 1:7–12.
- Perović, M. (2014, April 4) Taksonomija i uticaji staništa na karakteristike planinskog javora (*Acer heldreichii* Orph.) u Srbiji. Thesis, Univerzitet u Beogradu, Šumarski fakultet.
- Piedra-Malagón, E.M., Albarrán-Lara, A.L., Rull, J., Piñero, D., Sosa, V. (2016) Using multiple sources of characters to delimit species in the genus *Crataegus* (Rosaceae): the case of the *Crataegus rosei* complex. *Syst. Biodivers.* 14:244–260.
- Pierpoint, W.S. (1994) Salicylic Acid and its Derivatives in Plants: Medicines, Metabolites and Messenger Molecules. *Adv. Bot. Res.* 20:163–235.



- Poljak, I., Idžojtić, M., Šapić, I., Vukelić, J., Zebec, M. (2014) Varijabilnost populacija bijele (*Alnus incana* /L./ Moench) i crne joha (*A. glutinosa* /L./ Gaertn.) na području Mure i Drave prema morfološkim obilježjima listova. Šumar. list 138:7–17.
- Popović, Z., Matic, R., Bajić-Ljubičić, J., Tešević, V., Bojović, S. (2018) Geographic variability of selected phenolic compounds in fresh berries of two *Cornus* species. *Trees* 32:203–214.
- Prus-Gowacki, W., Mejnartowicz, L. (1992) Serological investigation of *Alnus incana* × *glutinosa* hybrids and their parental species. *Silvae Genet.* 41:65–70.
- Quattrocchi, U. (2012) CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology, 3960 p.
- Rai, D., Singh, J.K., Roy, N., Panda, D. (2008) Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochem. J.* 410:147–155.
- Rajan, K., Nelson, A., Adams, J.P., Carrier, D.J. (2017) Phytochemical Recovery for Valorization of Loblolly Pine and Sweetgum Bark Residues. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5:4258–4266.
- Reynolds, T. (2007) The evolution of chemosystematics. *Phytochemistry* 68:2887–2895.
- Rieseberg, L.H. (1997) Hybrid Origins of Plant Species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28:359–389.
- Rieseberg, L.H., Ellstrand, N.C., Arnold, M. (1993) What Can Molecular and Morphological Markers Tell Us About Plant Hybridization? *Crit. Rev. Plant Sci.* 12:213–241.
- Riethmüller, E., Könczöl, A., Szakál, D., Végh, K., Balogh, G.T., Kéry, Á. (2016) HPLC-DPPH Screening Method for Evaluation of Antioxidant Compounds in *Corylus* Species. *Nat. Prod. Commun.* 11:641–644.

- Riipi, M., Ossipov, V., Lempa, K., Haukioja, E., Koricheva, J., Ossipova, S., Pihlaja, K. (2002) Seasonal changes in birch leaf chemistry: are there trade-offs between leaf growth and accumulation of phenolics? *Oecologia* 130:380–390.
- Rohlf J (2016a) tpsUtil v 1.70 (computer program). Stony Brook University, New York.
- Rohlf J (2016b) tpsDig2. v 2.26 (computer program). Stony Brook University, New York.
- Rood, S.B., Nielsen, J.L., Shenton, L., Gill, K.M., Letts, M.G. (2010) Effects of flooding on leaf development, transpiration, and photosynthesis in narrowleaf cottonwood, a willow-like poplar. *Photosynth. Res.* 104:31–39.
- Rühling, Å., Tyler, G. (1984) Recent changes in the deposition of heavy metals in northern Europe. *Water. Air. Soil Pollut.* 22:173–180.
- Ruohomaki, K., Chapin, F.S., Haukioja, E., Neuvonen, S., Suomela, J. (1996) Delayed Inducible Resistance in Mountain Birch in Response to Fertilization and Shade. *Ecology* 77:2302–2311.
- Sack, L., Scoffoni, C. (2013) Leaf venation: structure, function, development, evolution, ecology and applications in the past, present and future. *New Phytol.* 198:983–1000.
- Sati, S.C., Sati, N., Sati, O.P. (2011) Bioactive constituents and medicinal importance of genus *Alnus*. *Pharmacogn. Rev.* 5:174–183.
- Sawidis, T., Breuste, J., Mitrovic, M., Pavlovic, P., Tsigaridas, K. (2011) Trees as bioindicator of heavy metal pollution in three European cities. *Environ. Pollut.* 159:3560–3570.
- Saxena, G., Farmer, S., Hancock, R.E.W., Towers, G.H.N. (1995) Antimicrobial Compounds from *Alnus rubra*. *Int. J. Pharmacogn.* 33:33–36.
- Schlag, E.M., McIntosh, M.S. (2013) The relationship between genetic and chemotypic diversity in American ginseng (*Panax quinquefolius* L.). *Phytochemistry* 93:96–104.

- Sekulić, G., Ostojić, D., Radosavljević, M., Panić, N. (2014) Rezervat biosfere Golija-Studenica: Život s planinom. Zavod za zaštitu prirode Srbije, Beograd, Srbija.
- Sengupta, S., Toh, S.-A., Sellers, L.A., Skepper, J.N., Koolwijk, P., Leung, H.W., Yeung, H.-W., Wong, R.N.S., Sasisekharan, R., Fan, T.-P.D. (2004) Modulating Angiogenesis. The Yin and the Yang in Ginseng. *Circulation* 110:1219-1225.
- Shaw, K., Roy, S., Wilson, B. (2014) *Alnus glutinosa*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014:e.T63517A3125479.
- Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R., Srinivas, P.S.S.R. (1998) Influence of Piperine on the Pharmacokinetics of Curcumin in Animals and Human Volunteers. *Planta Med.* 64:353–356.
- Silva, B.J.C., Seca, A.M.L., Barreto, M.D.C., Pinto, D.C.G.A. (2015) Recent Breakthroughs in the Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of *Morella* and *Myrica* Species. *Int. J. Mol. Sci.* 16:17160–17180.
- Soltis, P.S., Soltis, D.E. (2009) The role of hybridization in plant speciation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:561–588.
- Soni, U., Brar, S., Gauttam, V.K. (2015) Effect of seasonal variation on secondary metabolites of medicinal plants. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 6:3654–3662.
- Stojnić, S., Orlović, S., Miljković, D., Von Wuehlisch, G. (2016) Intra- and interprovenance variations in leaf morphometric traits in European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Arch. Biol. Sci.* 68:781–788.
- Sunnerheim, K., Palo, R.T., Theander, O., Knutsson, P.-G. (1988) Chemical defense in birch. Platyphylloside: A phenol from *Betula pendula* inhibiting digestibility. *J. Chem. Ecol.* 14:549–560.
- Suresh, D., Srinivasan, K. (2007) Studies on the in vitro absorption of spice principles – Curcumin, capsaicin and piperine in rat intestines. *Food Chem. Toxicol.* 45:1437–1442.

- Szakiel, A., Pączkowski, C., Henry, M. (2011) Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochem. Rev.* 10:471–491.
- Šarac, Z., Bojović, S., Nikolić, B., Tešević, V., Đorđević, I., Marin, P.D. (2013) Chemotaxonomic Significance of the Terpene Composition in Natural Populations of *Pinus nigra* J.F.Arnold from Serbia. *Chem. Biodivers.* 10:1507–1520.
- Telysheva, G., Dizhbite, T., Bikovens, O., Ponomarenko, J., Janceva, S., Krasilnikova, J. (2011) Structure and antioxidant activity of diarylheptanoids extracted from bark of grey alder (*Alnus incana*) and potential of biorefinery-based bark processing of European trees. *Holzforschung* 65:623–629.
- Tiyaboonchai, W., Tungpradit, W., Plianbangchang, P. (2007) Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 337:299–306.
- Toivonen, J.M., Horna, V., Kessler, M., Ruokolainen, K., Hertel, D. (2014) Interspecific variation in functional traits in relation to species climatic niche optima in Andean *Polylepis* (Rosaceae) tree species: evidence for climatic adaptations. *Funct. Plant Biol.* 41:301–312.
- Turner, N.J., Hebda, R.J. (1990) Contemporary use of bark for medicine by two salishan native elders of Southeast Vancouver Island, Canada. *J. Ethnopharmacol.* 29:59–72.
- Uhl, D., Mosbrugger, V. (1999) Leaf venation density as a climate and environmental proxy: a critical review and new data. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 149:15–26.
- Uri, V., Tullus, H., Lõhmus, K. (2003) Nutrient allocation, accumulation and above-ground biomass in grey alder and hybrid alder plantations. *Silva Fenn.* 37:301–311.
- Uto, T., Tung, N.H., Appiah-Opong, R., Aning, A., Morinaga, O., Edoh, D., Nyarko, A.K., Shoyama, Y. (2015) Antiproliferative and Pro-Apoptotic Activity of

Diarylheptanoids Isolated from the Bark of *Alnus japonica* in Human Leukemia Cell Lines. *Am. J. Chin. Med.* 43:757–767.

- Vander Mijnsbrugge, K. (2015) Morphological dissection of leaf, bud and infructescence traits of the interfertile native *A. glutinosa* and non-native *A. incana* in Flanders (northern part of Belgium). *Trees* 29:1661–1672.
- Vassão, D.G., Kim, K.-W., Davin, L.B., Lewis, N.G. (2010) Lignans (Neolignans) and Allyl/Propenyl Phenols: Biogenesis, Structural Biology, and Biological/Human Health Considerations. In H.-W. (Ben) Liu and L. Mander, Eds., *Comprehensive Natural Products II*, pp. 815–928. Elsevier, Oxford.
- Vidaković, V., Novaković, M., Popović, Z., Janković, M., Matić, R., Tešević, V., Bojović, S. (2018a) Significance of diarylheptanoids for chemotaxonomical distinguishing between *Alnus glutinosa* and *Alnus incana*. *Holzforschung* 72:9–16.
- Vidaković, V., Stefanović, M., Novaković, M., Jadranin, M., Popović, Z., Matić, R., Tešević, V., Bojović, S. (2018b) Inter- and intraspecific variability of selected diarylheptanoid compounds and leaf morphometric traits in *Alnus glutinosa* and *Alnus incana*. *Holzforschung*, u štampi, DOI: 10.1515/hf-2018-0019.
- Viscosi, V. (2015) Geometric morphometrics and leaf phenotypic plasticity: assessing fluctuating asymmetry and allometry in European white oaks (*Quercus*). *Bot. J. Linn. Soc.* 179:335–348.
- Viscosi, V., Lepais, O., Gerber, S., Fortini, P. (2009) Leaf morphological analyses in four European oak species (*Quercus*) and their hybrids: A comparison of traditional and geometric morphometric methods. *Plant Biosyst. - Int. J. Deal. Asp. Plant Biol.* 143:564–574.
- Vít, P., Lepší, M., Lepší, P. (2012) There is no diploid apomict among Czech *Sorbus* species: a biosystematic revision of *S. eximia* and discovery of *S. barrandienica*. *Preslia* 84:71–96.

- Voronova, A., Lazdina, D., Korica, A., Veinberga, I., Liepins, K., Rungis, D. (2015) Evaluation of allelic content in an experimental alder (*Alnus* spp.) plantation. *Acta Biol. Univ. Daugavp.* 15:227–240.
- Vukićević, E., Jovanović, B. (1983) Prilog taksonomskom proučavanju crne i bele jove u okolini Sjenice. *Glas. Šumar. Fak. Univ. U Beogr.* 61:1–14.
- Wang, J., Hou, B. (2009) Glycosyltransferases: key players involved in the modification of plant secondary metabolites. *Front. Biol. China* 4:39–46.
- Waterman, P.G. (2007) The current status of chemical systematics. *Phytochemistry* 68:2896–2903.
- Weckwerth, W. (2011) Green systems biology - From single genomes, proteomes and metabolomes to ecosystems research and biotechnology. *J. Proteomics* 75:284–305.
- Whitham, T.G., Martinsen, G.D., Keim, P., Floate, K.D., Dungey, H.S., Potts, B.M., Keim, P. (1999) Plant Hybrid Zones Affect Biodiversity: Tools for a Genetic-Based Understanding of Community Structure. *Ecology* 80:416–428.
- Whitham, T.G., Young, W.P., Martinsen, G.D., Gehring, C.A., Schweitzer, J.A., Shuster, S.M., Wimp, G.M., Fischer, D.G., Bailey, J.K., Lindroth, R.L., Woolbright, S., Kuske, C.R. (2003) Community and Ecosystem Genetics: A Consequence of the Extended Phenotype. *Ecology* 84:559–573.
- Williams, C.A., Harborne, J.B., Colasante, M. (1997) Flavonoid and xanthone patterns in bearded *Iris* species and the pathway of chemical evolution in the genus. *Biochem. Syst. Ecol.* 25:309–325.
- Wink, M. (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64:3–19.
- Wink, M. (2010) Introduction: Biochemistry, Physiology and Ecological Functions of Secondary Metabolites. In M. Wink, Ed., *Annual Plant Reviews: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism Series*, Vol. 40, pp. 1–19. Wiley-Blackwell.

- Wright, I.J., Dong, N., Maire, V., Prentice, I.C., Westoby, M., Díaz, S., Gallagher, R.V., Jacobs, B.F., Kooyman, R., Law, E.A., Leishman, M.R., Niinemets, Ü., Reich, P.B., Sack, L., Villar, R., Wang, H., Wilf, P. (2017) Global climatic drivers of leaf size. *Science* 357:917–921.
- Wu, C.-C., Chu, F.-H., Ho, C.-K., Sung, C.-H., Chang, S.-H. (2017) Comparative analysis of the complete chloroplast genomic sequence and chemical components of *Cinnamomum micranthum* and *Cinnamomum kanehirae*. *Holzforschung* 71:189–197.
- Xu, F., Guo, W., Xu, W., Wei, Y., Wang, R. (2009) Leaf morphology correlates with water and light availability: What consequences for simple and compound leaves? *Prog. Nat. Sci.* 19:1789–1798.
- Yesil-Celiktas, O., Ganzera, M., Akgun, I., Sevimli, C., Korkmaz, K.S., Bedir, E. (2009) Determination of polyphenolic constituents and biological activities of bark extracts from different *Pinus* species. *J. Sci. Food Agric.* 89:1339–1345.
- Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D. (2012) *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*, 2nd ed., 488 p. Elsevier Inc., USA.
- Zhu, Y., Kang, H., Xie, Q., Wang, Z., Yin, S., Liu, C. (2012) Pattern of leaf vein density and climate relationship of *Quercus variabilis* populations remains unchanged with environmental changes. *Trees* 26:597–607.

## BIOGRAFIJA

Vera B. Vidaković je rođena 09.11.1980. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne studije biohemije završila je 2011. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu sa prosečnom ocenom 8,68. Iste godine je upisala doktorske studije na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta, pod mentorstvom dr Srđana Bojovića i prof. dr Veleta Teševića. Eksperimentalni deo doktorske teze radila je na Odeljenju za ekologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i na Odeljenju za instrumentalnu analizu pri Katedri za organsku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Od 01.10.2011. godine zaposlena je na Odeljenju za ekologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Njeni naučni interesi vezani su za očuvanje biodiverziteta prirodne sredine, održivi razvoj društva i primenu hemijskih i biohemijskih metoda u proučavanju biodiverziteta. Svoj dosadašnji naučnoistraživački rad realizovala je u okviru projekta osnovnih istraživanja finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: „Procena ekofiziološkog i genetičkog diverziteta biljaka u šumskim ekosistemima“ (ev. br. 173011), pod rukovodstvom dr Srđana Bojovića. Autor je i koautor 10 naučnih radova sa SCI liste.