

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Nemanja F. Rajčević

**Diferencijacija vrsta iz sekcije *Juniperus* roda  
*Juniperus* L. (Cupressaceae) sa Balkanskog  
poluostrva, korišćenjem fitohemijskih i  
molekularnih karaktera**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Nemanja F. Rajčević

**Differentiation of Species Within  
Section *Juniperus* of Genus *Juniperus* L.  
(Cupressaceae) from the Balkan Peninsula  
Using Phytochemical & Molecular  
Characters**

Doctoral Dissertatiton

Belgrade, 2015

## KOMISIJA

---

Prof. dr Petar D. Marin, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet  
**mentor**

---

Prof. dr Peđa Janačković, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet  
**mentor**

---

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

Datum odbrane:

Beograd,

Ova doktorska disertacija je urađena na:

Katedri za morfologiju i sistematiku biljaka, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Katedri za organsku hemiju, Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu,

Doktorska disertacija je realizovana u okviru dva projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. 173029 i 143079.

Izradom doktorske disertacije rukovodili su dr Petar D. Marin, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i dr Peđa Janačković, vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kojima dugujem najveću zahvalnost na nesebičnoj podršci, korisnim savetima i još korisnijim kritikama u svim etapama izrade ove disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem i dr Jeleni Aleksić, naučnom saradniku na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu, na izuzetnoj pomoći u realizaciji molekularnih analiza i interpretaciji dobijenih rezultata.

Od velikog značaja za izradu ove disertacije je i stručna pomoć prof. dr Veleta Teševića i svih članova Centra za instrumentalnu analizu Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kojima se ovom prilikom iskreno zahvaljujem.

Zahvalnost želim da izrazim i svim kolegama sa Katedre i Instituta koji su pomogli izradu ove doktorske disertacije, a posebno Tanji Dodoš i Jelici Novaković, na dragocenoj pomoći u sakupljanju materijala i svojoj pruženoj podršci i pomoći.

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

*Ovu tezu posvećujem jednog izuzetnoj osobi bez čijeg uticaja verovatno ne bih pisao ove redove danas, s kojom sam napravio svoje prve korake ka nauci, i čija me je ljubav prema knjigama i svetu oko nas inspirisala za ceo život - Mariji Raškov Teofanov.*

U Beogradu, 10. V 2015.

Nemanja F. Rajčević





## REZIME

U ovom radu analizirana je fitohemijska i molekularna varijabilnost i diferencijacija prirodnih populacija taksona sekcije *Juniperus* roda *Juniperus* L (Cupressaceae) sa Balkanskog poluostrva. Određen je relativni udeo pojedinačnih *n*-alkana u kutikularnim voskovima 523 individue iz 27 prirodnih populacija taksona sekcije *Juniperus* (*J. communis* var. *communis*, *J. communis* var. *saxatilis*, *J. deltooides* i *J. macrocarpa*). U kutikularnim voskovima *J. communis* var. *communis* detektovani su *n*-alkani dužine od 19 do 35 ugljenikovih atoma, dok su kod preostala tri taksona detektovani *n*-alkani dugi od 22 do 35 C atoma. U svim uzorcima dominantan alkan je tritriakontan (C<sub>33</sub>). U većim količinama su zastupljeni i alkani C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub>, C<sub>35</sub>. Relativni udeo alkana kratkog i srednjeg niza je bio jako nizak, i kretao se u opsegu od 0 do 1,9 % odnosno 0,6 - 5,6 %. U svim uzorcima utvrđena je dominacija alkana dugog niza. Iako je tritriakontan dominantan u svim uzorcima, u zavisnosti od druga dva dominantna alkana, srednja dužina ugljovodoničnih lanaca (*N*) je varira od 28,3 do 32,8. Po taksonima, srednja dužina ugljovodoničnih lanaca (*N*) je najmanja za *J. deltooides* (30,5) a najveća za *J. communis* (31,9), dok je disperzija oko *N* (*d*) varirala od 1,4 do čak 10,4. Primenjene univarijantne i multivarijantne statističke metode su pokazale diferencijaciju populacija svih taksona na zapadne (priobalne) i istočne (kontinentalne). Diskriminantna analiza (DA) je ukazala na jasnu diferencijaciju tri vrste (*J. communis*, *J. deltooides*, *J. macrocarpa*) na osnovu profila epikutikularnih alkana. Linearna regresija i Mantelov test su pokazali jaku korelaciju profila epikutikularnih alkana listova i aridnosti staništa.

Određen je sastav etarskog ulja izolovanog iz iglica 578 individua iz dvadesetšest prirodnih populacija kleke sa Balkana. Identifikovano je preko 200 jedinjenja, najviše u etarskom ulju iglica *J. deltooides* (208), a najmanje u ulju *J. macrocarpa* (103). Monoterpeni su dominantna grupa u sastavu etarskog ulja (61,6 – 75,2 %), što je karakteristika sekcije *Juniperus*. Od monoterpena najzastupljeniji su monoterpenski ugljovodonici (55,9 – 71,5 %), dok su oksigenisani monoterepeni pronađeni samo u malom ukupnom procentu. Seskviterpeni (18,2 – 31,9 %) su takođe dominantno predstavljeni seskviterpenskim ugljovodonicima (11,8 – 26,1 %). Etarsko ulje *J. communis* var. *communis* se karakteriše najvećim udelom monoterpena, dok se etarsko ulje *J. communis* var. *saxatilis* karakteriše izuzetno visokim udelom seskviterpena u odnosu na sva ostala ulja. S druge strane, etarska ulja *J. deltooides* su pokazala najveći udeo diterpena od svih ispitivanih grupa. Tri monoterepena,  $\alpha$ -pinen, limonen i sabinen, su dominantna jedinjenja u sastavu etarskog ulja. Zajedno, ova tri jedinjenja u proseku čine oko 51,5 % ukupnog

sastava etarskog ulja. U zavisnosti od vrste i lokaliteta, dominante komponente su se smenjivale:  $\alpha$ -pinen i/ili sabinen u etarskom ulju *J. communis* var. *communis*,  $\alpha$ -pinen i germakren D/sabinen kod *J. communis* var. *saxatilis*,  $\alpha$ -pinen i/ili limonen kod *J. deltoides*, dok je u ispitivanoj populaciji *J. macrocarpa* dominirao  $\alpha$ -pinen. Primenjene univarijantne i multivarijantne statističke metode su pokazale diferencijaciju populacija kod svih ispitivanih taksona duž pravca zapad-istog. Na osnovu sastava etarskog ulja moguće je razlikovati nekoliko hemotipova kod svakog taksona na Balkanskom poluostrvu. Multivarijantne statističke metode su pokazale jasno odvajanje *J. communis* s.l. od *J. deltoides* i *J. macrocarpa*. Štaviše, PCA i DA su pokazala i blago odvajanje *J. communis* var. *communis* od *J. communis* var. *saxatilis*.

U cilju utvrđivanja odnosa i diferencijacije ispitivanih taksona na nivou hloroplastnog genoma, šest nekodirajućih hloroplastnih regiona je testirano kod 129 individua iz dvadesetpet populacija vrsta roda *Juniperus* sa Balkanskog poluostrva, a kao autgrupa je korišćeno pet jedinki *J. sabina*. Kod vrsta roda *Juniperus*, čije individue se odlikuju odvojenim polovima, haploidni hloroplastni genomi se nasleđuju preko očinske linije. Uspešna PCR amplifikacija i utvrđivanje primarnog redosleda nukleotida amplifikovanih sekvenci je bilo moguća korišćenjem jednog do četiri prajmera u slučaju četiri regiona (*trnC*<sup>(GCA)</sup>-*trnD*<sup>(GUC)</sup>, *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup>, *trnG*<sup>(UUC)</sup>-*trnS*<sup>(GCU)</sup> i *psbA-trnH*<sup>(GUG)</sup>). PCR amplifikacija regiona *rpl32-trnL*<sup>(UAG)</sup> i *3'rps16-5'trnK* je bila neuspešna zbog rearanžmana gena, odnosno, gubitka mesta vezivanja jednog prajmera.

U matrici sastavljenoj od sva četiri regiona, čija je poravnata dužina 3400 bp, detektovane su 63 pozicije sa supstitucijama baza, 32 prosta i složena indela (insercija ili delecija) dužine 1-259 bp, kao i 10 mikrosatelita motiva (A)<sub>n</sub> ili (T)<sub>n</sub> (ne računajući mutacije u insercijama različite dužine koje su prisutne samo kod pojedinih taksona). Od četiri hloroplastna regiona koji su PCR amplifikovani i za koje je bilo moguće odrediti primarni redosled nukleotida, najinformativniji je bio *trnC*<sup>(GCA)</sup>-*trnD*<sup>(GUC)</sup>, sa 63 mutacije (substitucije baza i dužinske mutacije), a kao najmanje informativan se pokazao *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> sa svega sedam mutacija (supstitucija baza i dužinskih mutacija).

ML stablo konstruisano korišćenjem matrice sastavljene od četiri ispitivana regiona, čija je poravnata dužina kod 75 individua predstavnika sekcije *Juniperus* i tri individue autgrupe *J. sabina* iznosila 3400 bp, i GTR+G modela evolucije (*General Time Reversible* model sa gama korekcijom), pokazuje da je sekcija *Juniperus* monofiletskog porekla (*bootstrap support* - BS 100%). Uočene su dve statistički dobro podržane klade: *J. communis* s.l. (BS 100%) i klada koja obuhvata sve individue *J. deltoides* i *J. macrocarpa* (BS 78%), što odgovara neformal-

noj podeli na kleke sa plavim bobicama (u koje spada *J. communis*) i kleke sa crvenim ili mrkim bobicama (u koje spadaju *J. deltoides* i *J. macrocarpa*). Odnosi u okviru prve klade su ostali nerazjašnjeni, iako se može se uočiti trend grupisanja individua *J. communis* var. *communis* kao i jedinki *J. communis* var. *saxatilis* i *J. communis* var. *intermedia*, što ukazuje na to da bi uključivanje u analize dodatnih hloroplastnih regiona doprinelo razrešenju odnosa ovih taksona. U okviru druge klade, uočene su dve dobro podržane subklade, jedna koju čine predstavnici *J. deltoides* (BS 59%), i druga koju čine predstavnici *J. macrocarpa* (BS 79%). Odnosi unutar subklade sa individuama *J. deltoides* nisu razjašnjeni zbog male varijabilnosti ispitivanih hloroplastnih regiona kod individua uzorkovanih iz skoro celog areala ove vrste, što se podudara sa podacima dobijeni korišćenjem nuklearnih mikrosatelita, i ukazuje na istorijske procese, kao što su uska grla, fragmentacije areala i/ili rekolonizacije iz refugijuma, koji su tokom vremena doveli do smanjenja varijabilnosti u populacijama *J. deltoides*. Stoga bi dodatne analize, koje bi uključile dodatne hloroplastne regione, najverovatnije bile ograničenog uspeha. Nasuprot tome, u okviru subklade sa *J. macrocarpa*, uočena je statistički podržana diferencijacija ovog taksona na dve subklade, jednu koju čine individue iz populacije sa Krita (BS 79%) i drugu koju čine individue iz okoline Trogira (BS 68%), što ukazuje na duboku divergenciju i diferencijaciju populacija vrste *J. macrocarpa*, koja je u skladu sa očekivanjima vezanim za fragmentarnu distribuciju ove vrste u okviru areala rasprostranjenja.

Za razliku od fitohemijskih markera (alkana i etarskog ulja), koji ne samo da se slažu međusobno i omogućavaju jasnu diferencijaciju vrsta i divergenciju populacija na priobalne i kontinentalne, diferencijacija na tri jasno odvojena taksona – *J. communis*, *J. deltoides* i *J. macrocarpa* je uočena i na osnovu četiri ispitivana regiona hloroplastnog genoma, ali nije uočena divergencija populacija u okviru ovih taksona. Međutim, uočeni su karakteri koji su sinapomorfni za određene taksone te se mogu koristiti u svrhe barkodiranja - petnaest karaktera (substitucije baza i insercije/delecije) je sinapomorfno za *J. communis*, deset za *J. deltoides*, četiri za *J. macrocarpa* i dva za neformalnu grupu kleka sa crvenim/mrkim šišaricama.

**Ključne reči:** *Juniperus communis* s.l., *J. deltoides*, *J. macrocarpa*, Cupressaceae, *n*-alkani, terpeni, hemotaksonomija, hloroplastna DNK, genetička diferencijacija

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Morfologija, fitohemija i sistematika biljaka

**UDK:** [[57.088:[573.3:581.135.5]:[575.832+575.222/.224]]:582.477(497)(043.3)

## ABSTRACT

This thesis deals with phytochemical & molecular variability & differentiation of natural populations of taxa belonging to section *Juniperus* of the genus *Juniperus* L. (Cupressaceae) from the Balkan Peninsula. The composition of the epicuticular leaf *n*-alkanes of 523 individuals from 27 populations of taxa belonging to section *Juniperus* (*J. communis* var. *communis*, *J. communis* var. *saxatilis*, *J. deltoides* & *J. macrocarpa*) was characterized by GC-FID & GC/MS analyses. In the leaf waxes of *J. communis* var. *communis* 17 *n*-alkane homologs with chain lengths ranging from C<sub>19</sub> to C<sub>35</sub> were identified, while in other taxa *n*-alkane chain-lengths ranged from C<sub>21</sub> to C<sub>35</sub>. All samples were dominated by tritriacontane (C<sub>33</sub>). Several other *n*-alkanes were also present in higher abundances (C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub>, C<sub>35</sub>). Relative abundance of short-chain & mid-chain length *n*-alkanes was low, ranging for 0 to 1.9 % & 0.6 - 5.6 % respectively. All samples were dominated by long-chainlength *n*-alkanes. Even though tritriacontane was dominant in all samples, depending on the second two most abundant alkanes, average chain length (*N*) varied from 28.3 to 32.8. The smallest average chain length was found in *J. deltoides* (30.5) & biggest in *J. communis* (31.9). Dispersion around *N* (*d*) varied significantly, from 1.4 to 10.4. Univariate & multivariate statistical methods showed differentiation of populations of all taxa into western (coastal) & eastern (continental). Discriminant analysis (DA) showed clear differentiation of three species (*J. communis*, *J. deltoides*, *J. macrocarpa*) based on leaf *n*-alkanes. Linear regression & Mantel test showed strong correlation of *n*-alkane profile & aridity.

The leaf essential oil composition of 578 individuals from 26 natural populations of taxa belonging to section *Juniperus* from Balkans has been determined by GC/MS analysis. In total, just over 200 compounds were detected & identified, most in *J. deltoides* (208) & fewest in *J. macrocarpa* (103). The oils were dominated by monoterpenes (61.6 – 75.2 %), a characteristic of species belonging to section *Juniperus*. Monoterpene hydrocarbons represented 55.9 – 71.5 % of the total oil content, while oxygenated monoterpenes represented only a small percentage. Sesquiterpene fraction (18.2 – 31.9 %) was dominated by sesquiterpene hydrocarbons (11.8 – 26.1 %). Essential oil of *J. communis* var. *communis* was characterised with the highest abundance of monoterpenes, while essential oil of *J. communis* var. *saxatilis* was characterised with the highest abundance of sesquiterpenes, in respect to other oils. On the other hand, essential oil of *J. deltoides* had the highest abundance of diterpenes of

all analysed essential oils. Three monoterpenes,  $\alpha$ -pinene, limonene & sabinene were most abundant compounds in the composition of essential oils. Together, these three compounds represented, on average, 51.5% of the total oil. Depending on the taxa & the geographical origin of the population, the most abundant components varied:  $\alpha$ -pinene and/or sabinene were most abundant in essential oil of *J. communis* var. *communis*,  $\alpha$ -pinene & germacrene D/sabinene were most abundant in essential oil of *J. communis* var. *saxatilis*,  $\alpha$ -pinene and/or limonene were most abundant in essential oil of *J. deltoides*, while  $\alpha$ -pinene was the single most abundant compound in essential oil of *J. macrocarpa*. Univariate & multivariate statistical methods showed west-east differentiation of populations belonging to all four taxa. Based on the essential oil composition, it was possible to identify several chemotypes in each taxa in the Balkan Peninsula. Multivariate statistical methods showed clear separation of *J. communis* s.l. from *J. deltoides* & *J. macrocarpa*. Principle component analysis (PCA) & DA also showed separation of *J. communis* var. *communis* & *J. communis* var. *saxatilis*.

To infer relations & differentiation of taxa belonging to the section *Juniperus* at the molecular level, six potentially informative chloroplast regions were tested in 129 individuals from 25 populations from the Balkan Peninsula. Five individuals of *J. sabina* from Balkans were used as outgroup. In junipers, dioecious species, chloroplasts are inherited paternally. Four out of six plastome regions were successfully PCR amplified & sequenced using one to four primers (*trnC*<sup>(GCA)</sup>-*trnD*<sup>(GUC)</sup>, *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup>, *trnG*<sup>(UUC)</sup>-*trnS*<sup>(GCU)</sup> i *psbA*-*trnH*<sup>(GUG)</sup>). PCR amplification of *rpL32-trnL*<sup>(UAG)</sup> & 3'*rpL16-5'trnK* regions was unsuccessful due to gene re-arrangement & loss of primer binding site, respectively.

In matrix comprised of all four plastome regions whose aligned length was 3400 bp, 63 positions with base substitutions & 32 simple & complex indels (insertions or deletions) (1 – 259 bp) as well as 10 microsatellites with mononucleotide motif (A or T) were detected, not including mutations in insertions present only in certain taxa. Out of four plastome regions, most informative was *trnC*<sup>(GCA)</sup>-*trnD*<sup>(GUC)</sup>, with 63 detected mutations (base substitutions & length mutations), while the least informative one, with only seven mutations (base substitutions & length mutations) was *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> region.

Maximum likelihood (ML) tree constructed using matrix comprised of all four plastome regions (aligned length 3400 bp, 75 individuals of section *Juniperus* & three individuals of *J. sabina* used as outgroup), & GTR+G model (*General Time Reverse* model with gamma correction) of evolution revealed monophyly of representatives of the section *Juniperus* (bootstrap

support - BS 100%), & the their split into two well supported clades, which corresponded to informal division of junipers into blue seed-cone junipers (*J. communis s.l.*) & redish seed-cone junipers (*J. deltoides* & *J. macrocarpa*). Even though the relations among the individuals from clade I remained unresolved, certain trends in grouping of individuals belonging to infrageneric taxa of *J. communis* (*J. communis* var. *communis*, *J. communis* var. *saxatilis* & *J. communis* var. *intermedia*) were apperent, suggesting that further analyses using additional plastome regions would most likely contribute towards resolving their relations. Within the second clade, two well supported sister subclades were detected – *J. deltoides* (BS 59%) & *J. macrocarpa* (79%). Due to low variability of tested plastome regions in *J. deltoides* from the entire range, the relations within this subclade were not resolved. The observed pattern most likely reflects the complex history of this taxon characterised by past bottleneck events, as well as range fragmentation & re-colonizations from refugia, that lead to the decrease in genetic variation over time, as indicated previously based on nuclear microsatellites. Thus further analysis of additional chloroplast regions would most likely be of a limited success. On the other hand deep divergence of individuals belonging to *J. macrocarpa* was detected, as individuals belonging to populations from Crete (BS 79%) & Trogir (BS 68%), formed separate well supported subclades. This is in accordance with expectations based on fragmented distribution of this taxon within its natural range.

Used phytochemical markers, leaf *n*-alkanes & essential oils, showed concordance. Both phytochemical markers showed differentiation of taxa, but also differentiation of populations. Furthermore, populations from all taxa showed significant west-east differentiation. Molecular markers on the other hand, were able to depict differentiation of three taxa at the species level (*J. communis*, *J. deltoides* & *J. macrocarpa*), but failed to reveal differentiation at the infraspecific level. Non the less, within 3400 bp long matrix, several characters synapomorphic to certain taxa were observed, & they could be used for barcoding. Fifteen characters were synapomorphic for *J. communis*, ten for *J. deltoides*, four for *J. macrocarpa* & two for the informal group of redish seed-cone junipers.

**Key words:** *Juniperus communis s.l.*, *J. deltoides*, *J. macrocarpa*, Cupressaceae, *n*-alkanes, terpenes, chemotaxonomy, chloroplast DNA, genetic differentiation

**Scientific field:** Biology

**Specific scientific field:** Plant morphology, phytochemistry & systematics

**UDK:** [[57.088:[573.3:581.135.5]:[575.832+575.222/.224]]:582.477(497)(043.3)



## SADRŽAJ

<b>1 Uvod</b> .....	<b>1</b>
1.1. CUPRESSACEAE L. (ČEMPRESI) .....	5
1.1.1. Rod <i>Juniperus</i> L. (kleka) .....	9
1.1.2. Sekcija <i>Juniperus</i> L. (Syn. <i>Oxycedrus</i> Spach) .....	12
1.1.2.1. <i>Juniperus communis</i> L. – kleka, obična borovica .....	14
1.1.2.1.1 <i>Juniperus communis</i> L. var. <i>communis</i> - obična kleka .....	18
1.1.2.1.2 <i>Juniperus communis</i> L. var. <i>saxatilis</i> Pall. – klečica, klekuša .....	20
1.1.2.2 <i>Juniperus oxycedrus</i> s.l. – crvena kleka, šmrika .....	21
1.1.2.2.1 <i>Juniperus deltoides</i> R.P.Adams .....	23
1.1.2.2.2 <i>Juniperus macrocarpa</i> Sibth.&Sm. – pukinja, ljuskavac .....	25
1.1.3. Distribucija vrsta sekcije <i>Juniperus</i> L. na Balkanskom poluostrvu .....	26
1.2. ALKANI .....	27
1.2.1. Epikutikularni voskovi .....	27
1.2.2. Biološka uloga epikutikularnih voskova .....	30
1.2.3. Biosinteza (epi)kutikularnih voskova .....	35
1.2.4. Kontrola biosinteze lipidnih komponenti .....	37
1.2.5. Prethodna istraživanja alkana .....	39
1.2.6. Varijabilnost i upotreba alkana u taksonomskim istraživanjima .....	42
1.2.7. Prethodna istraživanja <i>n</i> -alkana kod vrsta roda <i>Juniperus</i> L. ....	47
1.3. TERPENI .....	48
1.3.1. Etarska ulja .....	48
1.3.2. Biološka uloga etarskih ulja .....	51
1.3.3. Biosinteza terpena .....	54
1.3.4. Kontrola biosinteze monoterpena .....	69
1.3.5. Dosadašnja istraživanja terpena .....	72
1.3.6. Varijabilnost i upotreba terpena u taksonomskim istraživanjima .....	73
1.3.7. Prethodna istraživanja terpena kod vrsta roda <i>Juniperus</i> L. ....	76
1.4. Hloroplastni GENOM (cpDNA) .....	78
1.4.1 Hloroplastni genom golosemenica .....	81
1.4.2 Hloroplastni genom u filogenetskim studijama .....	82
1.4.3 Molekularna istraživanja roda <i>Juniperus</i> .....	85
<b>2 Ciljevi doktorske disertacije</b> .....	<b>86</b>

<b>3 Materijal i Metode .....</b>	<b>89</b>
3.1 Uzorkovanje biljnog materijala .....	90
3.2 Fitohemijski markeri .....	94
3.2.1 Izolovanje n-alkana .....	94
3.2.2 Izolovanje etarskog ulja .....	94
3.2.3 GC-FID i GC-MS analiza etarskog ulja i alkana .....	95
3.2.4 Statistička obrada .....	96
3.3. Molekularni markeri .....	99
3.3.1 Izolovanje DNK .....	99
3.3.2 PCR amplifikacija hloroplastnih sekvenci .....	101
3.3.4 Statistička obrada .....	104
<b>4 Rezultati .....</b>	<b>106</b>
4.1 n-ALKANI .....	107
4.1.1 Hemijski sastav i varijabilnost <i>n</i> -alkana ispitivanih taksona .....	107
4.1.1.1 Hemijski sastav i varijabilnost <i>n</i> -alkana kod <i>Juniperus communis</i> var. <i>communis</i> .....	109
4.1.1.2 Hemijski sastav i varijabilnost <i>n</i> -alkana kod <i>Juniperus communis</i> var. <i>saxatilis</i> ... .....	111
4.1.1.3 Hemijski sastav i varijabilnost <i>n</i> -alkana kod <i>Juniperus deltooides</i> .....	114
4.1.1.4 Hemijski sastav i varijabilnost <i>n</i> -alkana kod <i>Juniperus macrocarpa</i> .....	117
4.1.2 Rezultati statističke obrada ispitivanja <i>n</i> -alkana .....	118
4.1.2.1 <i>Juniperus communis</i> var. <i>communis</i> .....	121
4.1.2.2 <i>Juniperus communis</i> var. <i>saxatilis</i> .....	124
4.1.2.3 <i>Juniperus deltooides</i> .....	131
4.2 TERPENI .....	134
4.2.1 Hemijski sastav i varijabilnost terpena ispitivanih taksona .....	134
4.2.1.1 Hemijski sastav i varijabilnost terpena etarskog ulja iglica <i>Juniperus communis</i> var. <i>communis</i> .....	136
4.2.1.2 Hemijski sastav i varijabilnost terpena etarskog ulja iglica <i>Juniperus communis</i> var. <i>saxatilis</i> .....	141
4.2.1.3 Hemijski sastav i varijabilnost terpena etarskog ulja iglica <i>Juniperus deltooides</i> .. .....	149
4.2.1.4 Hemijski sastav i varijabilnost terpena etarskog ulja iglica <i>Juniperus</i> <i>macrocarpa</i> .....	158
4.2.2 Rezultati statističke obrade ispitivanja terpena .....	162
4.2.2.1. <i>Juniperus communis</i> var. <i>communis</i> .....	165
4.2.2.2. <i>Juniperus communis</i> var. <i>saxatilis</i> .....	167
4.2.2.3. <i>Juniperus deltooides</i> .....	170



4.3 HLOOROPLASTNE SEKVENCE .....	175
4.3.1 PCR amplifikacija i sekvenciranje target regiona .....	175
4.3.2. Karakteristike sekvenciranih regiona .....	187
4.3.3. Filogenetska analiza .....	197
<b>5 Diskusija .....</b>	<b>211</b>
5.1 n-ALKANI .....	212
5.1.1 <i>Juniperus communis</i> var. <i>communis</i> .....	212
5.1.2 <i>Juniperus communis</i> var. <i>saxatilis</i> .....	214
5.1.3 <i>Juniperus deltoides</i> .....	217
5.1.4 Opšta diskusija .....	220
5.2 TERPENI .....	224
5.2.1 <i>Juniperus communis</i> var. <i>communis</i> .....	224
5.2.2 <i>Juniperus communis</i> var. <i>saxatilis</i> .....	229
5.2.3 <i>Juniperus deltoides</i> .....	233
5.2.4 <i>Juniperus macrocarpa</i> .....	239
5.2.5 Opšta diskusija .....	241
5.3. HLOOROPLASTNI REGIONI KOD ISPITIVANIH PREDSTAVNIKA RODA <i>JUNIPERUS</i> .....	244
5.3.1. Filogenetski odnosi ispitivanih predstavnika roda <i>Juniperus</i> .....	250
5.4 OPŠTA DISKUSIJA .....	254
<b>6 Zaključci .....</b>	<b>258</b>
<b>7 Literatura .....</b>	<b>266</b>
<b>8 Prilozi .....</b>	<b>316</b>

Ilustracija: *Juniperus oxycedrus* L., Jovanović, B. (1970). Flora SR Srbije I, M. Josifović, ed. (Belgrade, Serbia: SANU), pp. 159.



# 1

UVOD

Sa preko 80 taksona, rod *Juniperus* L. predstavlja najveći i najraznovrsniji rod Cupressaceae s.l. Prema Adamsu (2011a) ovaj rod broji 67 vrsta i 37 varijeteta. Svi taksoni (osim *J. procera* Hochst. ex Endl.) su rasprostranjeni na severnoj hemisferi. Rod je podeljen na tri sekcije: *Caryocedrus*, *Juniperus* (Syn. *Oxycedrus*) i *Sabina*. Na Balkanskom poluostrvu rastu dva taksona iz sekcije *Juniperus* u širem smislu (*J. communis* s.l. i *J. oxycedrus* s.l.).

*Juniperus communis* L. s.l. nastanjuje kserotermna otvorena staništa, od 600 do 2.400 m.n.v. u Evropi, Mediteranu, Rusiji, centralnoj i zapadnoj Aziji, Japanu, na Kamčatki i u Severnoj Americi. Ovo je vrsta vrlo velike klimatske i edafske amplitude, što se vidi iz njenog velikog areala kao i različitih tipova staništa koje nastanjuje. Taksonomski status ove vrste je veoma problematičan. Na osnovu morfološke varijabilnosti opisan je veliki broj podvrsta/varijeteta ovog taksona. Zbog izuzetno širokog areala i velike morfološke varijabilnosti, problem statusa ovog taksona i dalje postoji imajući u vidu da je u dosadašnjim studijama koje se bave ovom problematikom analiziran relativno mali broj jedinki sa njegovog celokupnog areala.

*J. oxycedrus* L. s.l. raste na suvim brdima i planinskim padinama Mediteranske obale. Nastanjuje staništa na visinama od nivoa mora do 2.500 m.n.v, a retko zalazi u kopno dublje od 100 km izuzev na Balkanskom i Pirinejskom poluostrvu. Iako su ranije morfološke studije pokazale da u okviru areala ova vrsta ispoljava neznatnu varijabilnost, novija fitohemijska i molekularna istraživanja su pokazala da se Mediteranske populacije značajno razlikuju u pogledu etarskih ulja izolovanih iz listova kao i na nivou RAPD profila, što je dovelo do podele ovog taksona na nekoliko vrsta: *J. navicularis* Grand., *J. brevifolia* (Seub.) Antoine, *J. cedrus* Webb & Berthel., *J. oxycedrus* L., *J. macrocarpa* Sibth.&Sm. i *J. deltoides* R.P. Adams. Na osnovu morfoloških, fitohemijskih i molekularnih analiza, zapadne populacije *J. oxycedrus* s.l. su izdvojene kao takson *J. oxycedrus* s.str., dok su populacije koje su rasprostranjene u istočnom Mediteranu (Apeninsko i Balkansko poluostrvo, ostrva istočnog Mediterana i mala Azija) izdvojene kao *J. deltoides*.

Kod velikog broja istraživanih biljnih vrsta kutikula i njen sastav imaju veoma bitan ekofiziološki i taksonomski značaj. Kutikula, koja služi kao poslednja barijera nekontrolisanom gubitku vode, je sačinjena iz rastvorljivih lipida (voskova) i poliestarskog matriksa sačinjenog uglavnom iz kutina. Kompleksna mešavina dugolančanih alifatičnih

i cikličnih jedinjenja formira intrakutikularni i epikutikularni sloj. U zavisnosti od sastava, epikutikularni sloj formira različite trodimenzionalne strukture koje imaju ulogu u refleksiji svetlosti, ali i drugim biotičkim i abiotičkim odnosima (kao što je odbijanje vode, čišćenje površine lista ili sprečavanje prodiranja patogena). Epikutikularni sloj je sačinjen od alkana normalnog lanca, alkil estara, karboksilnih kiselina, alkohola, aldehida, mono- i diketona. Zbog svoje izuzetno važne biološke uloge, ovaj sloj nalazi se pod strogom genetičkom kontrolom. Od svih komponenti epikutikularnih voskova, alkani su najviše proučavani kao hemotaksonomski markeri. Nekoliko autora je opisalo fundamentalne razlike u sastavu voskova kod golosemenica i skrivenosemenica, dok je Maffei (2004) pokazao značaj alkana kao hemotaksonomskih markera kod reda Pinales. Dodd i Afzal Rafii (2000) su analizirali voskove kod vrsta iz familije Cupressaceae i našli da sastav alkana predstavlja selekcionni odgovor na različite sredinske faktore, i da pokazaje jaku genetičku kontrolu.

S druge strane, kvalitativni i kvantitativni sastav etarskog ulja se u dosadašnjim istraživanjima pokazao kao značajan taksonomski marker. Terpeni (monoterpeni, seskviterpeni, diterpeni) predstavljaju glavne komponente u etarskom ulju. Terpeni su isparljiva jedinjenja sa ponavljajućom peto-ugljeničnom izoprenskom jedinicom u svojoj osnovi. Zbog svojih raznorodnih bioloških uloga (zaštita od preteranog zagrevanja biljaka, antimikrobna zaštita, antiherbivorna zaštita, insekticidna uloga, privlačenje insekata, alelopatija...) nalaze se pod strogom genetičkom kontrolom, pogotovu kod četinara. Terpeni izolovani iz iglica četinara su do sada korišćeni kao ekološki i hemotaksonomski markeri (na nivou familija, rodova, vrsta i populacija). Novije studije sastava etarskog ulja izolovanog iz različitih populacija *J. oxycedrus s.l.* pokazuju značajnu korelaciju sa geografskom distribucijom. Štaviše, sastav etarskog ulja izolovanog iz iglica se pokazao kao značajan taksonomski karakter na infraspecijskom nivou kod ovog roda. Iako postoje brojne studije koje se bave sastavom etarskog ulja kod vrsta roda *Juniperus*, ne postoji detaljna studija varijabilnosti sastava etarskog ulja kod vrsta ovog roda na Balkanskom poluostrvu.

Hloroplastni genom, jedan od tri biljna genoma, pokazao se kao izuzetno pogodan za filogenetska istraživanja kod biljaka (Taberlet et al., 1991). Ovaj genom je haploidan, te ne pokazuje klasično Mendelejevsko nasleđivanje. Hloroplastna DNK je relativno mali cirkularni molekul, dužine oko 200.000 baza, relativno stabilne stukure koji se kod familije Cupressaceae nasleđuje preko očinske linije. Zbog manje efektivne veličine populacije haploidnog genoma u odnosu na markere nuklearnog genoma, hloroplastni genom je osetljiviji na efekte genetičkog drifta. Pokazalo se da ovaj molekul ima visokokonzervirane regione, što

je omogućilo dizajniranje tzv. univerzalnih prajmera koji se mogu koristiti za amplifikaciju željenih potencijalno informativnih regiona kod većine viših biljaka. Nekodirajući regioni hloroplastne DNK (introni i intergenski spejseri) se ne nalaze pod uticajem prirodne selekcije i u dosadašnjim istraživanjima su pokazali izuzetnu varijabilnost kod velikog broja vrsta uključujući i predstavnike roda *Juniperus*. Hloroplastni markeri su se pokazali kao informativni za sticanje boljeg uvida u pitanja genetičkog diverziteta, diferencijacije populacija i istorijskih procesa koji su vodili formiranju današnjih areala različitih taksona. Istraživanja Adamsa i drugih istraživača su pokazala da su ovi markeri u velikoj meri specifični za svaku od ispitivanih vrsta roda *Juniperus*, te se u određenoj meri mogu smatrati informativni za utvrđivanje genetičkih granica između vrsta.

## 1.1. CUPRESSACEAE L. (ČEMPRESI)

Familija Cupressaceae (čempresi) sa oko 160 vrsta u 30 rodova predstavlja drugu po veličini porodicu u okviru četinara, odmah iza Pinaceae (10 rodova, 250 vrsta) (Hill, 2005).

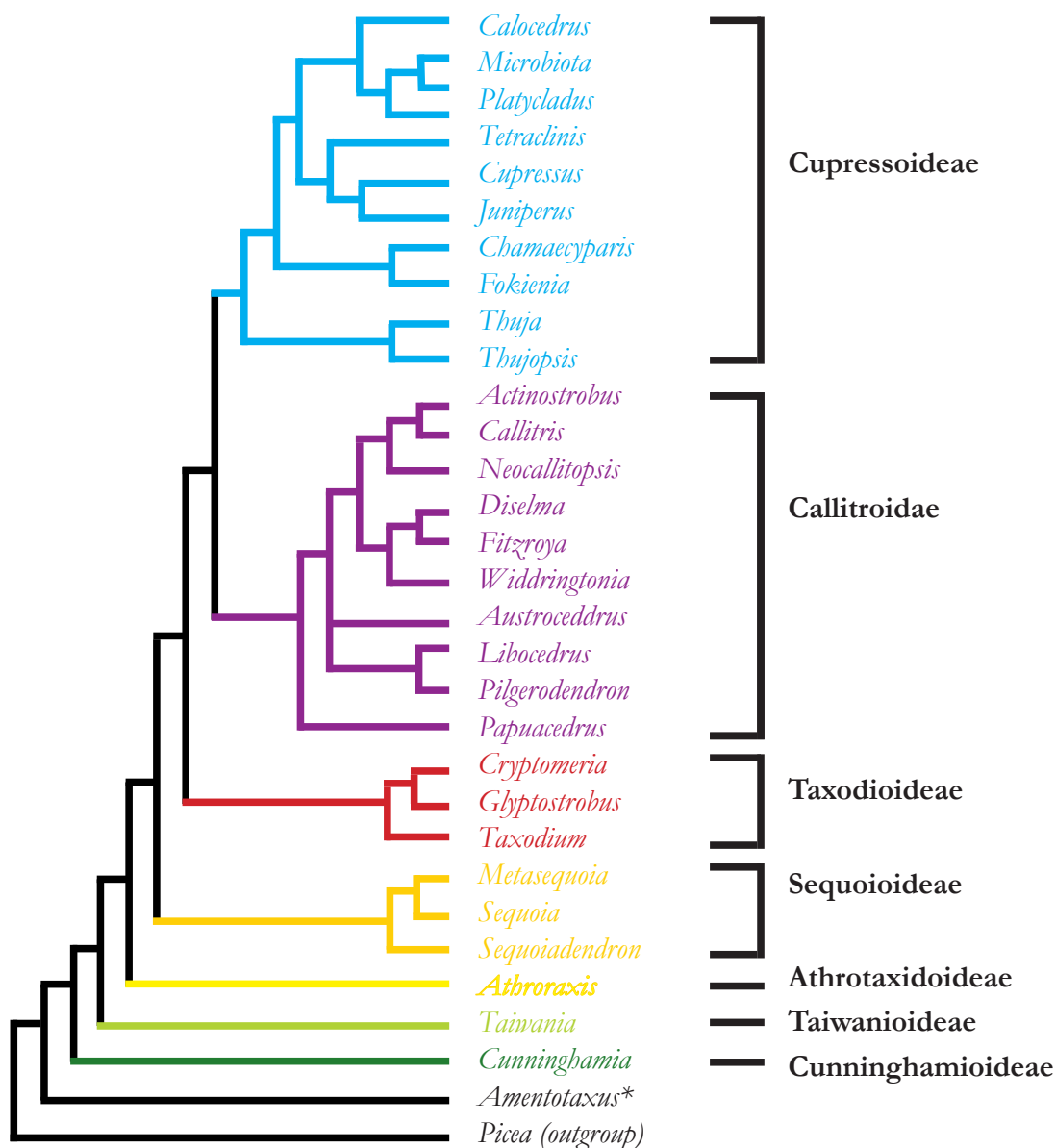
Istorija infrafamilijalne klasifikacije ove porodice je duga i komplikovana. Pilger (1926) je prvi definisao familije u okviru četinara opisavši, između ostalih, Cupressaceae *s.str.* (potfamilije: Cupressoideae, Juniperoideae, Thujoideae) i Taxodiaceae (Taxodoideae, Sciadopityoideae) (*cf.* Tabela 1.1). U Taxodiaceae je svrstao niz reliktnih rodova i vrsta koje nije mogao da smesti ni u jednu drugu porodicu. Potonja istraživanja su vodila opisivanju novih rodova unutar Cupressaceae (19) i Taxodiaceae (9) (Li, 1953; Pilger & Melchior, 1954). Međutim, ovako definisane Taxodiaceae su imale mali broj zajedničkih karakteristika koje su delile i sa drugim grupama, dok su, s druge strane, mnoge izvedene karakteristike delile sa Cupressaceae (npr. karakteristike megastrobilusa) (Farjon, 2001).

Slédeći rezultate izuzetno detaljne morfološke analize, Eckenwalder (1976) je doveo u pitanje opravdanost odvajanja ovih porodica, i predložio njihovo spajanje u Cupressaceae *s.l.* Dokazi za spajanje ove dve familije su bazirani na karakterima megastrobilusa, kao i vegetativnim karakteristikama (poput dimorfizma mladih i adultnih listova, te veoma slične anatomije kore i drveta). Polenova zrna kod svih predstavnika nemaju nastavke za letenje, dok je došlo do potpunog srastanja plodne i zaštitne ljuspe u megastrobilusima. Poslednja filogenetska istraživanja bazirana na molekularnim i nemolekularnim podacima su pokazala da su Taxodiaceae polifiletska grupa, koja je parafiletska sa Cupressaceae. Ova istraživanja su takođe pokazala da je rod *Sciadopitys* jedinstven u veoma bitnim sistematskim karakteristikama, i većina taksonoma je prihvatila odvajanje ovog roda u monotipsku porodicu Sciadopytaceae (Farjon, 2001).

Tabela 1.1 Poređenje različitih taksonomskih podela familije Cupressaceae od 1926. do danas

PILGER (1926)	LI (1953)	PILGER & MELCHIOR (1954)	ECKENWALDER (1976)	GADEK ET AL (2000)
<b>CUPRESSACEAE</b>	<b>CUPRESSACEAE s.s.</b>	<b>TAXODIACEAE</b>	<b>CUPRESSACEAE s.l.</b>	<b>SCIADOPITACEAE</b>
<b>Cupressaceae</b>	<b>Cupressaceae</b>	<b>Athrotaxaceae</b>	<b>Sciadopitoideae</b>	<i>Sciadopitys</i>
<i>Chamaecyparis, Cupressus</i>	<b>Cupresseae</b>	<b>Cryptomeriaceae</b>	<b>Cupressaceae</b>	<b>CUPRESSACEAE s.l.</b>
<b>Juniperoideae</b>	<i>Chamaecyparis, Cupressus</i>	<i>Cryptomeria</i>	<b>Cupresseae</b>	<b>Cupressaceae</b>
<i>Arceuthobium, Juniperus</i>	<i>Fokienia</i>	<b>Cunninghamiaceae</b>	<b>Subtribe 1</b>	<i>Cupressus, Calocedrus, Chamaecyparis, Fokienia, Juniperus, Microbiota, Platycladus, Tetractinopsis, Thuja, Thujiopsis</i>
<b>Thujoideae</b>	<b>Junipereae</b>	<i>Cunninghamia</i>	<b>Subtribe 2</b>	<b>Callitroideae</b>
<i>Actinostrobus, Callitropsis<sup>2</sup>, Callitris, Diselma, Fitzroya, Fokienia, Libocedrus<sup>3</sup>, Thuja, Thujiopsis</i>	<i>Arceuthobium, Juniperus</i>	<b>Metasequoieae</b>	<b>Subtribe 3</b>	<i>Callitris, Austrocedrus, Callitris, Diselma, Fitzroya, Libocedrus, Pilgerodendron, Neocallitropsis, Papanuacedrus, Widdringtonia</i>
<b>TAXODIACEAE</b>	<b>Callitroideae</b>	<b>Sequoieae</b>	<b>Subtribe 4</b>	<b>Taxodioideae</b>
<b>Taxodioideae</b>	<b>Actinostrobeae</b>	<i>Sequoia, Sequoiadendron</i>	<i>Actinostrobus, Callitris, Tetractinopsis, Austrocedrus, Diselma, Fitzroya, Libocedrus, Neocallitropsis, Widdringtonia</i>	<i>Taxodium, Cryptomeria, Glyptostrobus</i>
<i>Athrotaxis, Cryptomeria, Cunninghamia, Glyptostrobus, Sequoia<sup>4</sup>, Taiwania, Taxodium</i>	<i>Actinostrobus, Callitris, Fitzroya</i>	<b>Taiwanieae</b>		<b>Sequoioideae</b>
<b>Sciadopityoideae</b>	<b>Libocedreae</b>	<i>Taiwania</i>		<i>Sequoia, Metasequoia, Sequoiadendron</i>
<i>Sciadopitys</i>	<i>Diselma, Libocedrus<sup>5</sup>, Neocallitropsis, Octoclinis<sup>6</sup>, Papanuacedrus, Pilgerodendron, Widdringtonia</i>	<b>Taxodieae</b>		<b>Athrotaxidoideae</b>
	<b>Tetraclineae</b>	<i>Taxodium, Glyptostrobus</i>		<i>Athrotaxis</i>
	<i>Tetractinopsis</i>			<b>Taiwanioideae</b>
				<i>Taiwania</i>
				<b>Cunninghamioideae</b>
				<i>Cunninghamia, Taiwania</i>
				<b>Subtribe 2</b>
				<i>Athrotaxis</i>

1 - *Juniperus*2 - *Neocallitropsis*3 - uključujući i rodove *Austrocedrus, Thujiopsis* i *Calocedrus*4 - uključujući i *Sequoiadendron*5 - *Platycladus*6 - *Calocedrus*7 - uključujući i *Austrocedrus*8 - *Callitris*9 - uključujući i rodove *Papanuacedrus* i *Pilgerodendron*



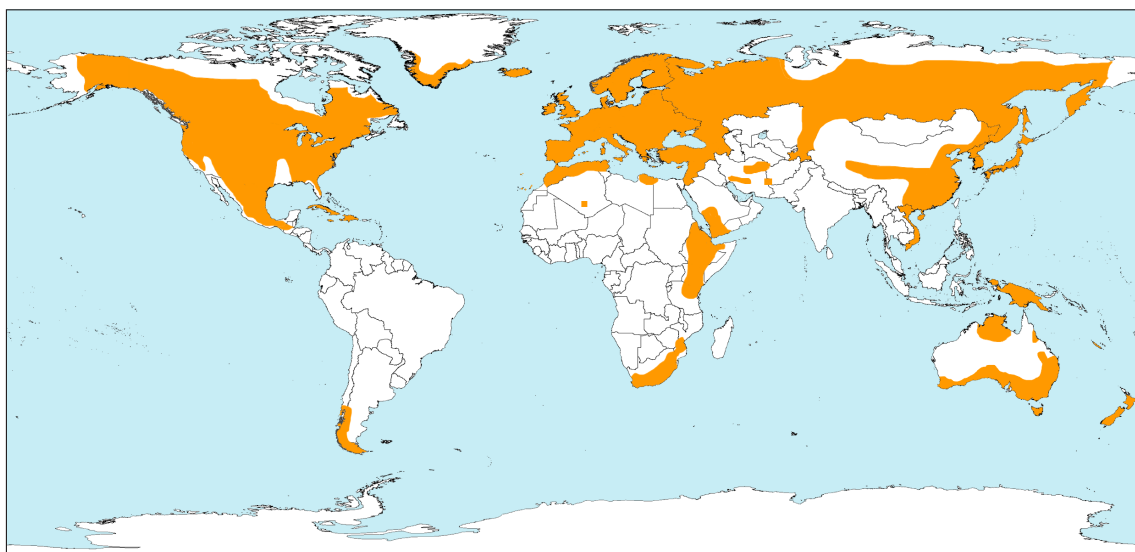
**Slika 1.1.1** Filogenetsko stablo Cupressaceae s.l. dobijeno na osnovu *matK* i *rbcL* sekvenci (nacrtano prema Gadek et al., 2000). \*: *Amentotaxus* i *Picea* su uzete kao autgrupe

Najveći rod je *Juniperus* L. sa 67 vrsta i 37 varijeteta (Adams, 2011a), slede *Cupressus* (16) i *Callitris* (15), dok ostali rodovi sadrže ne više od 7 vrsta, a većina ih je monotipska (Farjon, 2001).

Sve familije četinarara naseljavaju isključivo jednu, severnu ili južnu hemisferu, dok se jedino Cupressaceae sreću na obe (Slika 1.1.2). Najstariji fosilni nalazi čempresa datiraju iz kasnog Trijasa (Hill, 2005). Za razliku od ostalih porodica četinarara, kod čempresa ne postoji



toliko jasno odvajanje između taksona južne i severne hemisfere, na šta ukazuje distribucija recentnih populacija i fosilnih nalaza. Prateći distribuciju fosilnih nalaza recentnih vrsta (dostupnih već od Krede) i njihovih predaka, Farjon (2001) je došao do zaključka da se recentna distribucija taksona ove familije (pogotovu ekstremnih endemita poput *Fitzroya*, *Metasequoia*, *Sequoia* i *Sequoiadendron*) mora posmatrati kao reliktna nekada mnogo šireg areala. Međutim, nekoliko rodova, između njih i *Juniperus*, pokazuju dokaze skorije radijacije (Adams, 2011a; Farjon, 2001).



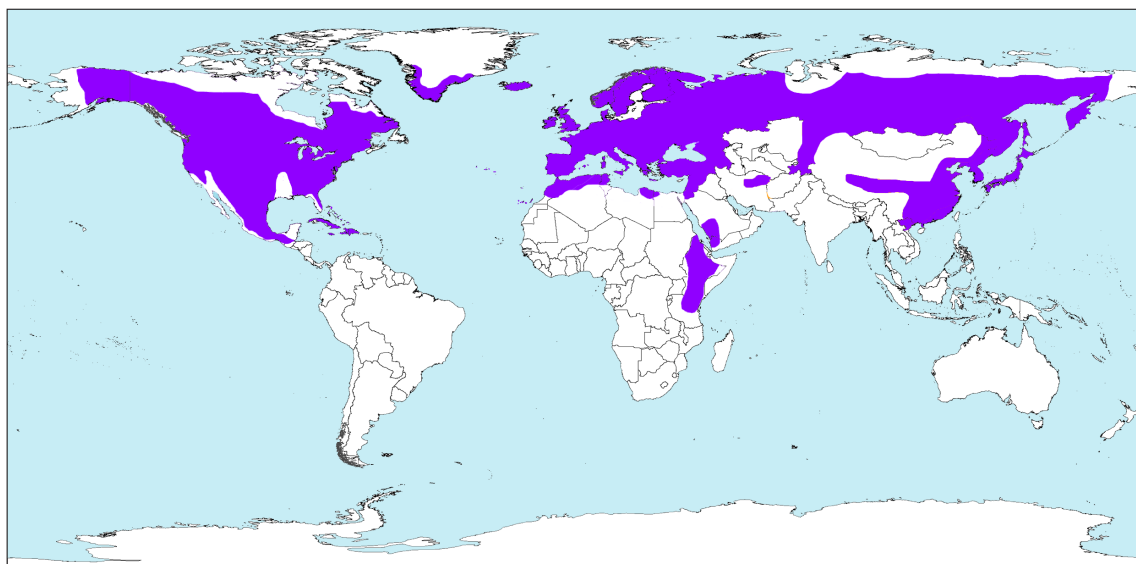
**Slika 1.1.2** Distribucija Cupressaceae s.l. (bazirano na podacima Farjon, 2001)

Cupressaceae s.l. pokazuju veoma veliku ekološku amplitudu. Mogu se naći od ekstremno vlažnih (kao što su monsunske šume i vlažne priobalne šume umerene zone) pa do semi-aridnih staništa na rubovima kontinentalnih pustinja. Na sever, vrste roda *Juniperus* idu do glečera Grenlanda, kao i većito zaleđenih vrhova visokih planina, daleko iznad gornje šumske granice, a spuštaju se do peščanih i kamenitih obala Mediterana (Adams, 2011a; Farjon, 2001; Vidaković, 1982).

Ovaj veliki diverzitet staništa je uticao na pojavu velikog broja vrsta i životnih formi, od patuljastih polegatih koje ne dostižu visinu veću od dvadesetak centimetara, do najvišeg drveta na svetu koje može imati preko 110 m visine. Većina ih živi na izuzetno siromašnoj podlozi (Adams, 2011a; Farjon, 2001; Vidaković, 1982).

### 1.1.1. Rod *Juniperus* L. (kleka)

Rod *Juniperus* L. predstavlja najveći i najraznovrsniji rod Cupressaceae *s.l.* sa preko 80 taksona (vrsta, podvrsta/varijeteta). Prema Adamsu (2011a) ovaj rod broji 67 vrsta i 37 varijeteta, dok Farjon (2001) zastupa konzervativniji pristup i prepoznaje 53 vrste, šest podvrsta, dvadesetpet varijeteta i jednu formu. Pregled taksonomskog tretmana roda dat je u Tabeli 1.2.



Slika 1.1.3 Distribucija vrsta roda *Juniperus* L. (bazirano na podacima Adams, 2011a)

Zahvaljujući izuzetno velikoj ekološkoj i edafskoj amplitudi, kao i razvoju mesnate šišarice, vrste roda *Juniperus* L. se mogu sresti na svim kontinentima (osim Antarktika), na obe hemisfere, gde naseljavaju različita staništa (Slika 1.1.3) (Adams, 2011a).

Kleke rastu od nivoa mora (npr. *J. deltoides*, *J. macrocarpa*, *J. foetidissima*) pa sve do iznad gornje granice šuma većine planina severne hemisfere (npr. *J. communis*, *J. monticola*, *J. przewalskii*). Iako se najveći broj vrsta može naći na krečnjaku, ne pokazuju jaku preferencu prema podlozi, štaviše, ista vrsta (*J. deltoides*, *J. communis*) se može naći i na krečnjačku i na serpentinitu. Neki taksoni se mogu pronaći na peščanim dinama (*J. communis* var. *communis*, *J. communis* var. *megistocarpa*, *J. horizontalis*), granitu (*J. communis* var. *depressa*), vulkanskim stenama (*J. madarensis*) i peščaru (*J. thurifera*) (Adams, 2011a; Vidaković, 1982; Zhang et al., 2005).

Vrste ovog roda se mogu naći na različitim staništima, od rubova pustinja (*J. californica*, *J. horizontalis*, *J. sabina* var. *arenaria*), preko mediteranskih staništa (*J. deltoides*, *J. oxycedrus*, *J. macrocarpa*, *J. foetidissima*), kamenjara (*J. sabina*) i visokoplaninskih livada i rudina (*J. communis*, *J. przewalskii*), do močvara (*J. barbadensis* var. *lucayana*, *J. blancoi*) ili čak na stenama na samoj obali mora gde su izloženi slanoj morskoj vodi (*J. chinensis* var. *sargentii*). Ipak, najčešće se javljaju na suvljim staništima i manje hranljivoj podlozi (Adams, 2011a).

Kleke su zimzelene poleglice ili uspravni grmovi ili omanje drveće. Kora se ljušti uglavnom uzdužnim ljuskama. Mlade grančice su trobride, 4-6 ugaone, izuzetno retko (*J. thurifera*) spljoštene. Listovi su dimorfni. Kod mladih biljaka i novih izdanaka listovi su najpre igličasti, da bi se kasnije razvijali igličasti ili ljuspasti listovi. Igličasti listovi su raspoređeni po 3 u pršljenu, na izuzetno kratkim drškama ili su sedeći. Ljuspasti listovi su naspramni, ne srastaju za izdanke. Na listovima se nekada mogu uočiti abaksijalne žlezde (Adams, 2011a; Jovanović, 1970; Tutin et al., 1976; Vidaković, 1982).

Muški strobilusi su jajoliki ili su u obliku dugih resa, izgrađeni iz 3 do 7 mikrosporofila (mikrosporofili naspramni ili u pršljenovima po 3), svaki nosi 2-8 polenovih kesica. Ženski strobilusi su loptasti ili jajoliki, 3-20 (-25) mm u prečniku, najčešće sjajne površine, izgrađeni iz 1 do 5 parova epimacijuma (karakteristika porodice, srasle zaštitne i plodne ljuspe). Epimacijumi ostaju zatvoreni. Svaki epimacijum razvija 1-3 semena koja su okrugla ili višestрана, bez krilaca ili drugih izraštaja. Kotiledona 2-6. Haploidni broj hromozoma je  $n=11$ , osim kod *J. chinensis* (tetraploid) gde je  $n=22$ . Vrste dvodome, ili retko jednodome. (Adams, 2011a; Jovanović, 1970; Vidaković, 1982).

Evolutivno gledano, razvojem sočnog megastrobilusa (često: bobičasta šišarica ili "bobica") koji je izuzetno privlačna hrana za ptice, kleka je uspela da naseli i Atlantska ostrva poput Azornih, Bermuda, Karipskih i Kanarskih ostrva, i da za vrlo kratko vreme uspe da rekolonizuje (*J. communis*) ne samo kontinentalne oblasti koje su bile pod glečerima tokom poslednjeg ledenog doba, već i ostrva poput Islanda i Grenlanda (Adams et al., 2003a).

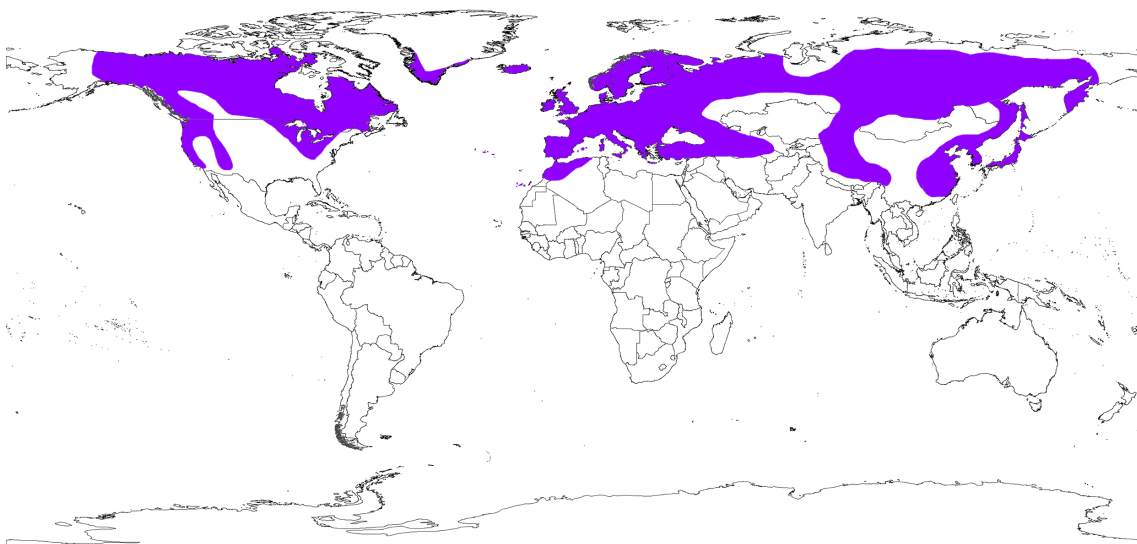
Prema poslednoj klasifikaciji, rod *Juniperus* L. se deli na tri sekcije:

- (1) Sekcija: *Caryocedrus* Endl. – tipska i jedina vrsta je *J. drupacea* Labill. (Syn. *Arcenthos* Antoine, cf. Tabela 1.1)
- (2) Sekcija: *Juniperus* L. (Syn. *Oxycedrus* Spach.) – sa 11 vrsta koje naseljavaju holarktik
- (3) Sekcija: *Sabina* Spach. – sa preostalih 55 vrsta koje naseljavaju severnu hemisferu i spuštaju se do ekvatora i južne hemisfere u Africi

*Juniperus drupacea*, jedina vrsta koja pripada sekciji *Caryocedrus* smatra se najprimitivnijom vrstom. Naseljava region od Grčke do Turske. Kao i vrste sekcije *Juniperus* ima adultne igličaste listove, a od njih se razlikuju po boji šišarica i distribuciji. Takođe je zanimljivo da kod ove vrste, tri semenke u šišarici srastaju u jednu veliku “košticu”. Vrste sekcije *Sabina* se smatraju najizvedenijim vrstama, na šta upućuju morfološki i biohemijski podaci (Adams, 2011a). Karakteri na osnovu kojih su vrste svrstane u tri sekcije su dati u Prilogu A.

### 1.1.2. Sekcija *Juniperus* L. (Syn. *Oxycedrus* Spach)

Tipična vrsta je *J. communis* L. Vrste ove sekcije su dvodomo drveće ili žbunje. Kako mladi, tako i adultni listovi su igličasti, 1,5 do 3,0 mm široki, raspoređeni u pršljenovima po 3. Muški i ženski strobilusi se nalaze na bočnim granama, na veoma kratkim drškama pa izgledaju sedeći (0,3 - 1,0 mm). Zrele ženske šišarice 6-15 mm u prečniku, izgrađene od po 3 epimacijuma sa uglavnom 3 semenke. Ženske šišarice sazrevaju za dve (kod *J. communis* za tri) godine (Adams, 2011a; Jovanović, 1970; Vidaković, 1982). Areal distribucije sekcije *Juniperus* prikazan je na Slici 1.1.4.



**Slika 1.1.4** Distribucija vrsta sekcije *Juniperus* L. (bazirano na podacima Adams, 2011a, Jalas & Souminen, 1988)

Bazirajući se na sastavu etarskog ulja listova, morfološkim i molekularnim podacima (hloroplastne sekvence *trnC-trnD*), Adams je sekciju podelio na dve grupe:

- (1) severne i dalekoistočne vrste, vezane za *J. communis* sa plavim ili plavičastocrnim šišaricama koje imaju jednu stominu liniju na adaksijalnoj strani lista (*J. communis*, *J. formosana*, *J. luthcuensis*, *J. rigida*, *J. taxifolia*);

(2) Mediteranske vrste, vezane za *J. oxycedrus* sa narandžastocrvenim do crvenomrkim ili crvenkastopurpurnim zrelim ženskim šišaricama, sa po 2 stomine linije na adaksijalnoj strani lista (*J. brevifolia*, *J. cedrus*, *J. deltoides*, *J. macrocarpa*, *J. madarensis*, *J. navicularis*, *J. oxycedrus*).

Ova podela dosta podseća na Gausenovu podelu (Vidaković, 1982), gde je (u ovom slučaju) podrod *Oxycedrus* (Spach) Gausen podeljen na tri sekcije: *Oxycedroides*, *Riggidoides*, *Recurvoides*. Vrste sekcije *Recurvoides* Gausen sada pripadaju sekciji *Sabina* Spach.

### 1.1.2.1. *Juniperus communis* L. – kleka, obična borovica

Obična kleka je dvodomi grm ili manje stablo 3-5 (-15) m visoko. Habitus je različit, ali je najčešće jajolik ili kupast. Kora je sivosmeđa do crvenkastosmeđa, u početku glatka, kasnije uzdužno ispucala. Mladi izdanci su trobiridi. Listovi su igličasti, raspoređeni po 3 u pršljenu, 7-16 (-30) mm dugi, 1-2 mm široki. Listovi se sužavaju od osnove prema vrhu, tvrdi su, bodljikavi, većinom sivozeleni, sa belom prugom; na poprečnom preseku trapezasti (Jovanović, 1970; Vidaković, 1982).

Muški strobilusi su žućkasti, retko zelenkasti, sitni. Sazrevaju u aprilu ili maju. Ženska šišarica je okruglasta, 6-9 mm u prečniku, na kratkoj dršci. Sazreva u drugoj ili trećoj godini. U prvoj je zelena, a kada sazri postaje plavo-crna, s nejasnim beličastim venčićem na vrhu. Semenke su zaobljene i smeđe, obično po tri u plodu (Jovanović, 1970; Vidaković, 1982).

Obična kleka je najrasprostranjenija od svih vrsta četinara (Vidaković, 1982). Ovo je vrsta izuzetno široke edafske i klimatske amplitude. Može se naći na svim tipovima podloge, od krečnjaka, preko serpentinita, magmatskih stena do peska. Naseljava različita staništa, od nivoa mora do 2800 m.n.v. Može se sresti na kamenitim padinama i liticama, visokoplaninskim livadama i rudinama iznad gornje granice šuma, peščarama i peščanim dinama, zaparloženim njivama i napuštenim imanjima, ali i močvarama; najčešća je na otvorenim staništima, ali ulazi i u sastav šumskih zajednica. Na severu se prostire do Grenlanda i Islanda, na jugu, do severne i centralne Grčke i severne Turske. Na istok ide do Kamčatke, a na zapad do Pacifičkih obala Severne Amerike (Slika 1.1.6) (Adams, 2011a; Farjon, 2001; Jalas & Suominen, 1988; Tutin et al., 1976).

Ovako velika klimatska i edafaska amplituda, gotovo holarktički areal kao i skorija istorija vrste (uglavnom pod uticajem glacijacija i interglacijacija koje su se dešavala na većem delu njenog areala) ogleda se i u postojanju velikog broja infraspecijskih taksona. *J. communis* je verovatno najistraživaniji i najmanje razjašnjen takson u okviru ovog roda. O tome svedoči preko 60 različitih sinonima i veliki broj različitih infraspecijskih klasifikacija. Infraspecijski taksoni koji pripadaju ovoj vrsti su tretirani kao posebne vrste (*J. sibirica*, *J. nana*, *J. montana*,

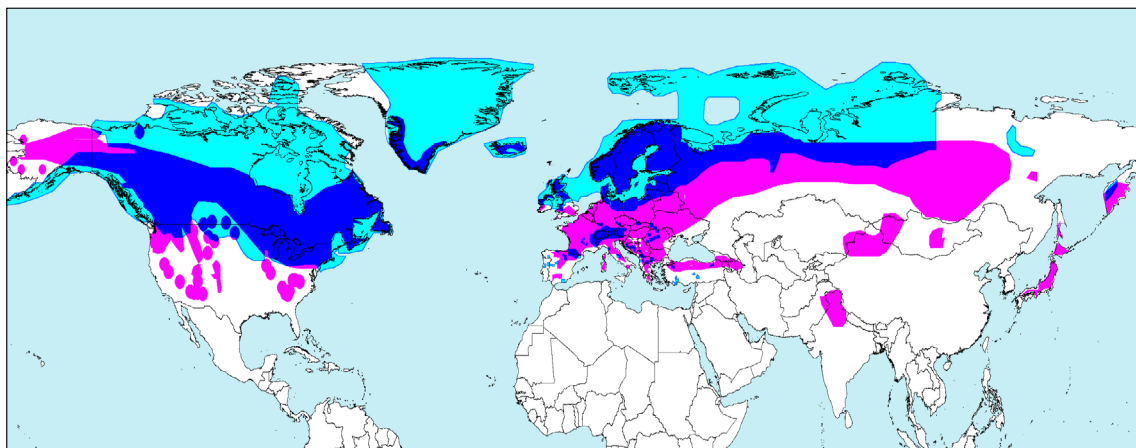
*J. microphylla*, *J. vulgaris*...), zatim podvrste (*J. communis* subsp. *depressa*, subsp. *alpina*, subsp. *nana*...), varijeteti (*J. communis* var. *saxatilis*, var. *nana*, var. *alpina*, var. *nipponica*...) ili čak forme (*J. communis* f. *crispa*).

Verovatno najšire prihvaćena infraspecijska klasifikacija taksona je podela na varijetete. Farjon (2001) opisuje: *J. communis* L. var. *communis* (kao tipsku vrstu), zatim var. *depressa*, var. *megistocarpa*, var. *nipponica* i var. *saxatilis*. Dok, Adams (2011a) uz njih opisuje još i *J. communis* var. *charlotensis* i *J. communis* var. *jackii*.

*J. communis* var. *depressa*, *J. communis* var. *megistocarpa*, *J. communis* var. *jackii*, *J. communis* var. *charlotensis* i *J. communis* var. *saxatilis* naseljavaju Severnu Ameriku; *J. communis* var. *communis* i *J. communis* var. *saxatilis* naseljavaju Grenland, Island, Evropu i Aziju do Mongolije, dok *J. communis* var. *nipponica* i *J. communis* var. *saxatilis* naseljavaju Kamčatku, Japan i daleki Istok.

Kada se upoređi današnji areal vrste sa distribucijom lednika tokom Pleistocena (Slika 1.1.5), dolazi se do zaključka da samo populacije sa Aljaske i Kamčatke nisu bile pod lednicima (Adams et al., 2003a). Da li su one preživjele glacijaciju, ili su kasnije rekolonizovale današnji areal, je i dalje otvoreno pitanje. Tokom poslednjeg glacijacionog maksimuma (pre 18.000 godina), lednici su prekrili gotovo celu Kanadu, spuštajući se na jug do Kolumbijskog platoa na zapadu i basena Ohajo-Misisipi na istoku. Na Aljasci lednici su bili ograničeni samo na južni deo i Aleutska ostrva dok su Grenland i Island bili potpuno prekriveni lednicima. U Evropi, lednici su se spuštali od krajnjeg severa na jug do centralne Evrope, a takođe i sa najviših planina (Alpa, Dinarida, Karpata) u južnijim delovima. Nivo mora je bio niži i za do 200 m, pa su biljke mogle da nasele nova područja na jugu. Nakon poslednjeg glacijalnog maksimuma, u periodu od pre oko 14.000 do 9.000 godina, led kreće polako da se povlači na sever i zauzima današnje granice, dok za njim ostaju manji glečeri na pojedinim visokim planinama, glacijalna jezera i nivo mora koji je porastao topljenjem leda. Pre oko 5.000 godina glečeri su se povukli sa obala Grenlanda i zauzimaju manje-više istu poziciju kao i danas. Prvi tragovi polena u fosilnim nalazima, javljaju se već pre oko 11.000 godina u Sibiru i Kanadi, i pre 9.500 godina na severu Britanskog ostrva (Bennett et al., 1992; Pisarić et al., 2001; Yu, 1997). Zanimljivo je istaći da se polenova zrna kleke nalaze u fosilnim nalazima starijim od 11.000 godina u Evropi i iznad pedesete paralele, što upućuje na mogućnost preživljavanja ove vrste u centralnoj Evropi i tokom poslednjeg glacijalnog maksimuma. Fosilni dokazi za preživljavanja ne postoje, ali poslednja istraživanja AFLP markera populacija *J. communis* iz centralne Evrope ukazuju na mogućnost preživljavanja ove vrste izuzetno široke ekološke amplitude i van južnih refugijuma kakav je bio i Balkan (Michalczyk et al., 2010).





**Slika 1.1.5** Recentna distribucija *J. communis* L. i glečera tokom poslednjeg glaciacionog maksimuma (LGM) (bazirano na podacima Adams, 2011a, Jalas & Souminen, 1988)

Koristeći populacije *J. communis* iz Severne Amerike (*J. communis* var. *depressa*, *J. communis* var. *megistocarpa*), sa Grenlanda i Islanda (*J. communis* var. *saxatilis*), iz Evrope i sa Urala (*J. communis* var. *communis*, *J. communis* var. *saxatilis*) i Kamčatke (*J. communis* var. *saxatilis*), Adams i saradnici (2003a) su konstruisali *Minimum Spanning Network* baziranu na 152 dobijena RAPD benda, na osnovu koje se vidi jaka geografska asocijacija između populacija, koje se grupišu prema kontinentu. Štaviše, dobili su da su populacije sa Grenlanda i Islanda genetički sličnije populacijama iz Evrope, dok se populacije sa Kamčatke jako odvajaju od svih ostalih (Adams et al., 2003a). Ovi rezultati se uklapaju u teoriju da je današnji areal *J. communis* najvećim delom nastao vrlo brzo po povlačenju lednika nakon poslednjeg ledenog doba. Štaviše, brzina i šablon rekolonizacije upućuje na izuzetno bitnu evolutivnu prednost koju su vrste kleke razvile – bobičasta šišarica koja je privlačna kao visokokalorična hrana za ptice, koje na putu svojih prolećnih migracija vrlo brzo prenose semena na velike distance, što su i pokazale studije migratornih ptica koje iz svojih Evropskih zimskih odmarališta, lete na Island (a neke potom i na Grenland) u proleće (Adams, 2011a). Početkom dvadesetog veka krenula su prva istraživanja o ulozi ptica u raznošenju šišarica kleke (Holthuijzen & Sharik, 1985; Holthuijzen et al., 1987; Phillips, 1910). Ukratko, rezultati ovih studija su potvrdili:

- (a) da se najveći broj semena raznosi pticama (65%), a potom i sitnijim sisarima i mravima,
- (b) da je prosečna distanca na koju se seme prenosi veća od 12 m,

- (c) da se klijavost semena kod nekih vrsta naglo povećava nakon prolaska kroz digestivni trakt ptice (pretpostavlja se da na ovaj način dolazi do skarifikacije semenjače i lakše klijanje semena) i
- (d) da je klijavost semena najmanja u neposrednoj blizini adultne biljke, mada nije utvrđeno da li je to posledica alelopatskih odnosa ili prosto kompeticija za resursima koji su izuzetno ograničeni na staništima na kojima ove vrste žive.

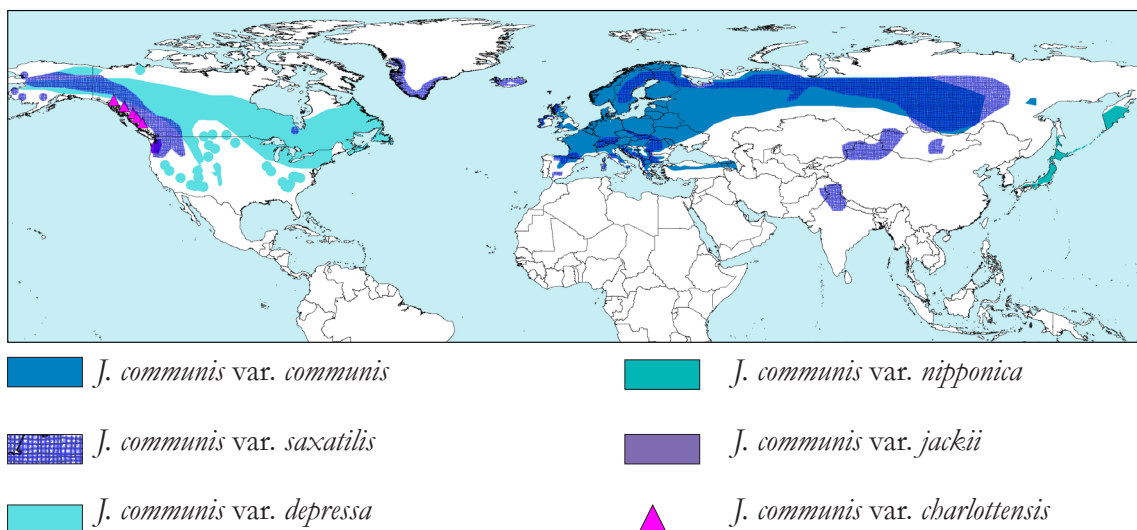
#### 1.1.2.1.1 *Juniperus communis* L. var. *communis* - obična kleka

(Syn. *J. suecica* Mill.; *J. communis* L. var. *vulgaris* Aiton; *J. communis* L. var. *suecica* (Mill.) Aiton; *J. communis* L. var. *montana* Neilr.; *J. difformis* Gilib.; *J. borealis* Salisb.; *J. communis* L. var. *typica* Fomin; *J. communis* L. var. *erecta* Pursh; *J. communis* L. var. *depressa* (Steven) Boiss.; *J. hemisphaerica* J&C.Presl; *J. communis* L. var. *arborescens* Gaudin; *J. depressa* Steven; *J. communis* L. var. *oblonga* hort. Ex Loudon; *J. occidentalis* hor. Ex Carriere; *J. communis* L. var. *hispanica* (J&C Presl) Parl.; *J. communis* L. subsp. *eucommunis* Syme; *J. communis* L. var. *fastigiata* Parl.; *J. cracovia* hort. ex K.Koch.; *J. communis* L. subsp. *hemisphaerica* (J&C Presl) Nyman; *J. communis* L. var. *genuina* Formanek; *J. vulgaris* Tragus ex Bubani; *J. niemanni* E.L.Wolff; *J. communis* L. var. *brevifolia* Sanio; *J. oxycedrus* L. subsp. *hemisphaerica* (J&C Presl) E.Schmid; *J. communis* L. subsp. *brevifolia* (Sanio) Penzes; *J. albanica* Penzes; *J. communis* L. subsp. *cupressiformis* Vict.&Sennen ex Penzes; *J. communis* L. subsp. *pannonica* (Penzes) Soo; *J. communis* L. f. *crispa* Borowicz&Zielinski)

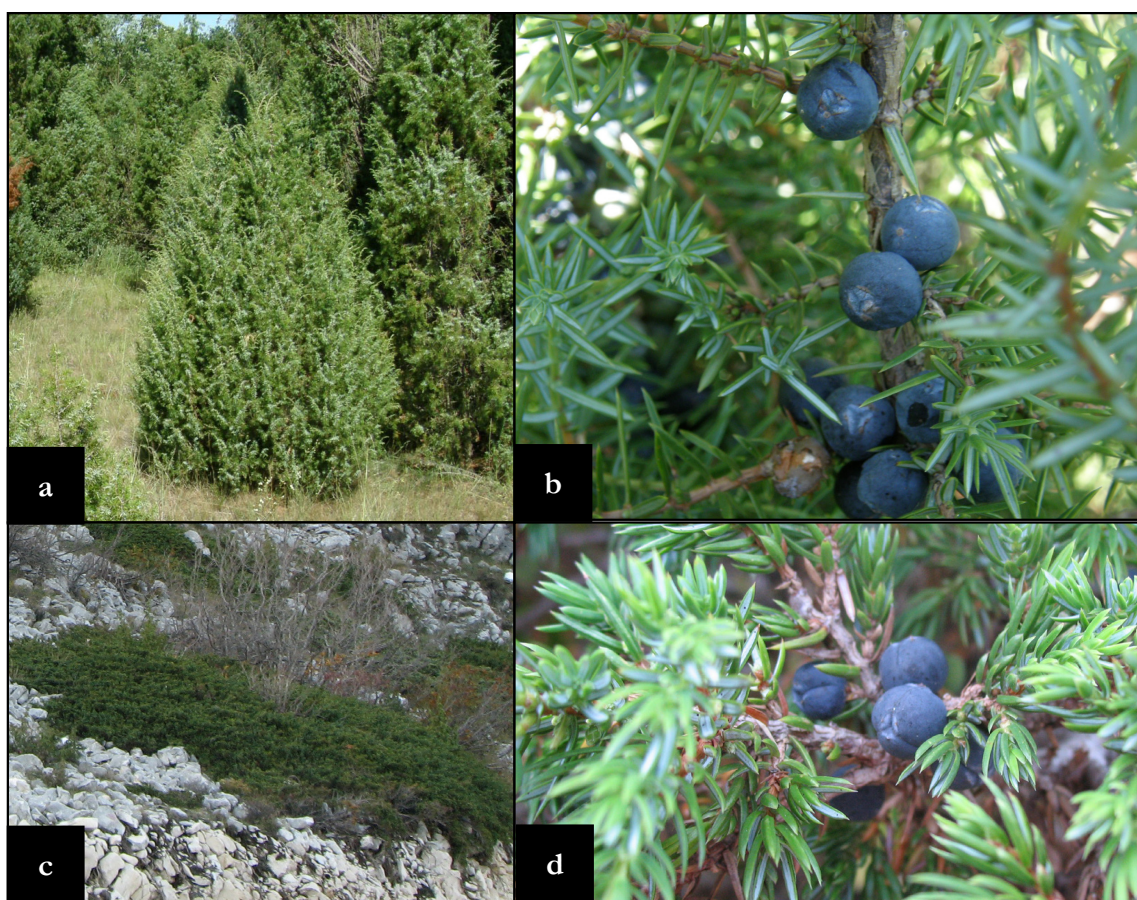
Žbun ili drvo visoko do 5 m (Slika 1.1.7a,b), jajaste ili kupaste krošnje. Kora trakasto uzdužno ispucala. Mlade grančice trouglaste. Četine raspoređene u pršljenovima po tri, krute, bodljikave, 15-20 (-25) mm duge, na poprečnom preseku trapezaste. Na licu lista nalazi se bela traka sa stomama i dve bočne zelene trake. Bela traka je samo u osnovi podeljena uzdužno na dve, mada se retko može desiti da bude cela podeljena. Muški strobilusi sazrevaju april-jun. Bobičaste šišarice zrele u drugoj ili trećoj godini, okruglaste, 6-9 mm u prečniku. Nezrele šišarice su zelene; kad sazreju postaju plave do plavičastocrne. Semena obično po 3 u šišarici.  $2n=22$ . (Adams, 2011a)

Vrsta izuzetno širokog areala. Naseljava isključivo istočnu hemisferu (Evroziju) (Slika 1.1.6). Na sever raste do krajnjeg severa Evropskog kontinenta i Sibira, na jug dolazi do Mediterana (centralna i severna Grčka, severna Turska), na zapadu se javlja na Britanskim ostrvima a na istok dolazi do Mongolije.

U Srbiji se javlja u kserotermnim, bazofilnim hrastovim šumama deliblatskog peska i Fruške gore, kao i acidofilnim vrištinama zapadne Srbije i devastiranim šumama bukovog i bukovo-jelovog pojasa. Rasprostranjena.



**Slika 1.1.6.** Distribucija *J. communis* L. var. *communis* i *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. (bazirano na podacima Adams, 2011a, Jalas & Souminen, 1988)



**Slika 1.1.7.** *J. communis* L. var. *communis* L. a) habitus, b) ženske šišarice i iglice; *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. c) habitus, d) ženske šišarice i iglice (photo N. Rajčević)



#### 1.1.2.1.2 *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. – klečica, klekuš

(Syn. *J. sibirica* Burgsd.; *J. nana* Willd.; *J. communis* L. var. *montana* Aiton.; *J. communis* L. var. *alpina* Sueter; *J. oblonga* M.B.; *J. communis* L. var. *nana* (Willd.) Baumg.; *J. alpina* S.F.Gray; *J. communis* L. var. *oblonga* (M.B.) Parl.; *J. communis* L. var. *caucasica* Endl.; *J. nana* Willd. var. *alpina* (Aiton) Endl.; *J. pygmaea* K.Koch; *J. montana* (Aiton) Lindl.&Gordon; *J. caesia* Regel.; *J. communis* L. subsp. *alpina* (Suter) Celak.; *J. communis* L. subsp. *nana* (Willd.) Syme; *J. communis* L. subsp. *alpina* (Smith) Celakosvky; *J. sibirica* Burgsd. var. *montana* (Aiton) Beck.; *J. rebunensis* Kudo&Suzaki; *J. communis* L. subsp. *oblonga* (M.B.) Galushko; *J. communis* L. subsp. *saxatilis* (Pall.) E. Murray; *J. communis* L. subsp. *pygmaea* (K.Koch) Imkhan.)

Nizak polegli žbun (Slika 1.1.7c,d), visine do 50 cm, sa gustim granama poleglim po zemlji. Kora tanka, guli se u širokim trakama. Grane su debele i kratke. Mladi izdanci trobridi, sa prošljenovima četina (po 3) međusobno udaljenim svega 1-4 mm. Četine su duge 5-10 mm, sabljasto savijene, manje-više prilegle uz grančicu, sa naglo zašiljenim vrhom. Četine su na licu udobljene, a na naličju zaobljene, tamnozeleno i sjajne. Dvodome vrste. Muške šišarice sazrevaju u maju. Bobičaste šišarice jajaste ili okrugle, 7-10 mm u prečniku. Semena obično 1-3 po šišarici. Nezrele su zelene boje, dok su zrele tamnoplave ili plavičasto crne sa kratkom peteljkom. Sazrevaju u drugoj godini. (Adams, 2011a; Jovanović, 1970; Vidaković, 1982).

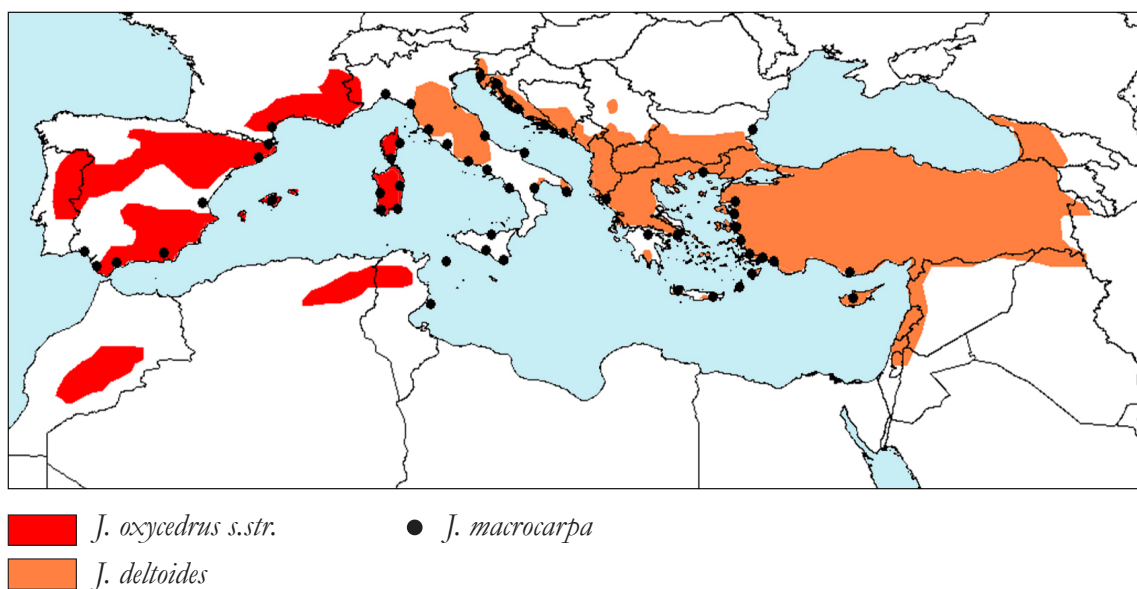
Vrsta je rasprostranjena u celom holarktiku, ali je ograničena na velike geografske širine i velike nadmorske visine od 600 do 2.400 m.n.v (Slika 1.1.6). Naseljava zapadnu obalu Severne Amerike (Oregon, Vašington, zapadna Kanada), Grenland, Island, Evropu (više planine Evrope, na nižim nadmorskim visinama na severu, uključujući i klifove Atlantske obale na severu), Kavkaz, Sibir i srednju Aziju, sever Indije, Pakistan, Nepal, severnoistočnu i severozapadnu Kinu, Japan, Kamčatku (Adams, 2011a; Farjon, 2001; Jalas & Suominen, 1988; Tutin et al., 1976).

U Srbiji se sreće na najvišim planinskim masivima (Stara planina, Suva planina, Besna Kobila, Golija, Kopaonik, Prokletije). Raste na kamenjarima ali i visokoplaninskim rudinama iznad gornje šumske granice. Na Kopaoniku u šumi *Vaccinieto-Junipereto-Picetum subalpinum*, na Suvoj planini u zajednici *Juniperetum nanae-intermediae*. Sreće se često u zajednici sa munikom, molikom, krivuljem, smrčom i drugim vrstama. Na Staroj planini u asocijaciji *Bruckenthalio-Juniperetum nanae* (Jovanović, 1970; Vidaković, 1982)

### 1.1.2.2 *Juniperus oxycedrus s.l.* – crvena kleka, šmrika

U morfološkom pogledu šmrika je jedan od najprepoznatljivijih taksona iz sekcije *Juniperus*. Šmrika je dvodomi žbun ili nisko drvo, do 6 m visine. Krošnja je kupasta, a u starosti dostiže amrelasti oblik. Mlade grančice su sa crvenkastožučkastom korom. Četine su raspoređene po tri u pršljenu, duge do 20 mm, ošto zašiljene, na poprečnom preseku manje-više trouglaste, odnosno sa istaknutim dorzalnim rebrom. Na licu četina se nalaze dve bele pruge stoma, rastavljene jednom zelenom prugom. Muški strobilusi sazrevaju rano, najkasnije do marta/aprila. Bobičaste šišarice smeđecrvenkaste, obično bez peteljke, okruglaste, 6-8 (-25) mm u prečniku, građene iz 3-6 epimacijuma. U šišarici obično 3 semenke (Jovanović, 1970; Vidaković, 1982).

Naseljava kserotermne hrastove i crnoborove šume do 800 m visine, odnosno preko 1100 m.n.v. Uglavnom na serpentinu. Kserofilna, heliofilna vrsta. U Mediteranu je široko rasprostranjena, od Azornih ostrva na zapadu, do Iračkih obala Crnog mora na istoku (Jovanović, 1970; Vidaković, 1982) (Slika 1.1.8).



**Slika 1.1.8** Distribucija *J. oxycedrus s.l.* (bazirano na podacima Adams, 2011a, Jalas & Souminen, 1988)

Farjon (2001) opisuje nekoliko podvrsta: *J. oxycedrus* L. subsp. *badia* (H. Gay) Debeaux, subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Neill, subsp. *oxycedrus* i subsp. *transtagana* Franco. Međutim, poslednja istraživanja morfoloških karaktera, biohemijskih i molekularnih markera dovela su do značajnih promena u tretmanu ovog taskona. Bazirajući se na ovim podacima, Adams (Adams, 2011a, 2014; Adams et al., 2005) je *J. oxycedrus* L. *s.l.* podelio na nekoliko morfološki razdvojenih i geografski vrlo udaljenih taksona:

*Juniperus navicularis* Gands. (*Syn. J. oxycedrus* L. subsp. *transtagana* Franco) – koja naseljava Atlantsku obalu Portugalije, na pliocenskim peskovima u blizini obale.

*Juniperus macrocarpa* Sibth. & Sm. (*Syn. J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Neill) – prava Mediteranska vrsta koja se može naći isključivo u oblaskoj zoni Mediterana, najčešće pomešana sa drugim vrstama mediteranske kleke. Karakteriše se krupnim bobičastim šišaricama (25 mm u prečniku) kao i nešto spljoštenijim iglicama (bez istaknutog centralnog rebra).

*Juniperus oxycedrus* L. *s.str.* (*Syn. J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus*) – ograničena na zapadni Mediteran, do Sardinije i Korzike i na sever Afrike. U sastavu etarskog ulja, kao i molekularnim markerima jako se razlikuje od njoj najbliže vrste *J. deltoides* R.P. Adams, dok na morfološkom nivou pokazuje diskretne razlike.

*J. deltoides* R.P. Adams – raltivno skoro novoopisani takson, kriptična vrsta, obuhvata populacije *J. oxycedrus* L. *s.l.* koje naseljavaju istočni deo Mediterana, do obala Crnog mora u Iranu. Istraživanja molekularnih podataka i etarskih ulja izolovanih iz listova su pokazala opravdanost odvajanja ovog kriptičnog taksona od tipične *J. oxycedrus* L. *s.str.*

### 1.1.2.2.1 *Juniperus deltoides* R.P.Adams

(Syn. *J. oxycedrus* f. *parvifolia* Novak; *J. oxycedrus* var. *microcarpa* Neill; *J. oxycedrus* var. *parvifolia* (Novak) Jovanč *J. oxycedrus* var. *fastigiata* Jovan)

*J. deltoides* (Slika 1.1.9) je dvodomi veliki žbun ili drvo visoko do 12 m, često piramidalne krošnje. Boja kore je žućkasto-bran do braon, ljušti se u tankim pločama. Mladi izdanci trobridi. Listovi igličasti, 9-17 mm dugi, 1,5-2,4 mm široki. Listovi sedeći, pri osnovi široki gotovo koliko i sama lisna ploča. Listovi sa adaksijalne strane imaju dve beličaste linije koje obično nisu ulegle. Muški strobilusi sitni, jajasti, crvenkastomrki, sazrevaju u kasno proleće. Ženski strobilusi 6-9 mm u prečniku, zreli narandžasto-braon ili narandžasto-mrki kada sazreju, sa izrazitim belim venčićem na vrhu. U šišaricama 3-5 semenki (Adams, 2011a).

Vrsta izuzetno otporna na sušu – tipčna heliofilna i kserotermna vrsta. U stanju je da podnese kako najveće žege istočnog Mediterana, tako i velike hladnoće (-25 °C). Uspeva na mnogim vrstama tla, raznih fizičkih i hemijskih svojstava, bazne do kisele reakcije. U kontinentalnom području je ima u nekim hrastovim, borovim i bukovim fitocenzama na serpentinitu. Naseljava kamenita staništa Italije, Balkana, mediteranskih ostrva istočno od Italije i mediteransku i crnomorsku obalu Male Azije na istok do Irana. U Srbiji se sreće u Župi (oko Aleksandrovca), na Goču, Stolovima, Ibarskoj klisuri, Kopaoniku, okolini Raške i Novog Pazara, i Pčinjskoj klisuri (Adams, 2011a; Jovanović, 1970; Tutin et al., 1976; Vidaković, 1982).





Slika 1.1.9. *J. deltooides* R.P. Adams a) habitus, b) ženske šišarice i iglice (photo. N. Rajčević)



Slika 1.1.10. *J. macrocarpa* Sibth.&Sm. a) habitus, b) ženske šišarice i iglice

#### 1.1.2.2.2 *Juniperus macrocarpa* Sibth.&Sm. – pukinja, ljuskavac

(Syn. *J. communis* L. *macrocarpa* (Sibth.&Sm.) Spach; *J. lobelii* Guss.; *J. biasoletti* Link; *J. umbilicata* Gordr.; *Sabina phoenicea* (L.) Antoine var. *lobelii* (Guss.) Antoine; *J. willkommii* Angoine; *J. sphaerocarpa* Antoine; *J. macrocarpa* Sibth.&Sm. var. *lobelii* (Guss.) Parl.; *J. oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth.&Sm.) Neilr.; *J. macrocarpa* Sibth.&Sm. var. *globosa* Neilr.; *J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa* (Sibth.&Sm.) Ball; *J. major* Dioscorides ex Bubani; *J. oxycedrus* var. *macrocarpa* (Sibth.&Sm.) Silba)

Dvodomi grm ili malo drvo, visoko 5-6 (-14) m (Slika 1.1.10). Krošnja piramidalna, koja se kasnije sve više zaokružuje. Grančice vitke, prema gore usmerene, ali im vrhovi vise. Listovi su igličasti, relativno mekani (u poređenju sa *J. oxycedrus*, *J. deltoides*), 20-30 mm dugi, 2-2,5 mm široki, oštro ušiljeni, često nešto svetliji. Listovi su na vrhu izdanka raspoređeni poput četkice, a sa donje strane su dosta zaobljeni, bez središnjeg rebra, sa 2 bele pruge. Abaksijalna strana lista je blago povijena na dole. Muški strobilusi sazrevaju u rano proleće. Ženske bobičaste šišarke izrazito krupne, 25 mm u prečniku, narandžasto-crvene do narandžasto-mrke; izgrađene iz 3, veoma retko 6 epimacijuma. Semenke po 3 u šišarici (Adams, 2011a; Vidaković, 1982).

Izrazito mediteranska vrsta. Naseljava kamenite obale Mediterana od jugoistočnog Portugala do Kipra. Veoma često raste sa drugim mediteranskim vrstama kleke. Na Balkanu se sreće u uskom primorskom pojasu, uglavnom u staništu *Quercetum ilicis* na degradiranim zemljištima, makiji i kamenjarima. Osetljiva na niske temperature. (Adams, 2011a; Jalas & Suominen, 1988; Tutin et al., 1976; Vidaković, 1982).

### 1.1.3. Distribucija vrsta sekcije *Juniperus* L. na Balkanskom poluostrvu

Iz roda *Juniperus* na Balkanskom poluostrvu se može naći nekoliko vrsta iz sekcije *Juniperus*. Pregled vrsta i njihova distribucija je data u Tabeli 1.2.

**Tabela 1.2.** Pregled vrsta roda *Juniperus* sekcije *Juniperus* i njihova distribucija na Balkanskom poluostrvu (Jalas & Suominen, 1988; Tutin et al., 1976)

Takson	Distribucija
<i>J. communis</i> L. var. <i>communis</i> L.	Albanija, Bosna i Hercegovina, Bugarska, Crna Gora, Grčka, Hrvatska, Makedonija, Srbija
<i>J. communis</i> L. var. <i>saxatilis</i> L.	Albanija, Bosna i Hercegovina, Bugarska, Crna Gora, Grčka, Hrvatska, Makedonija, Srbija
<i>J. deltoides</i> R.P. Adams	Albanija, Bosna i Hercegovina, Bugarska, Crna Gora, Grčka, Hrvatska, Makedonija, Srbija
<i>J. macrocarpa</i> Sibth.&Sm.	Albanija, Bosna i Hercegovina, Bugarska, Grčka, Hrvatska



## 1.2. ALKANI

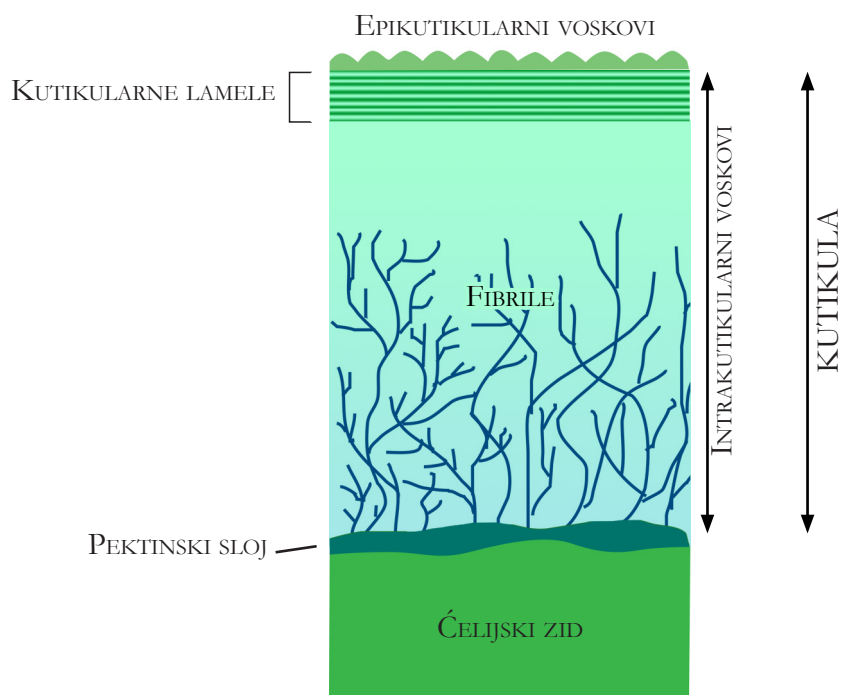
### 1.2.1. Epikutikularni voskovi

Kutikula prekriva gotovo svaki nadzemni biljni organ. Izdanci, listovi, krunični listići, žig tučka, polen, plodovi... svi su prekriveni voštanim slojem, koji, u zavisnosti od sastava, igra različitu ulogu (Eglinton & Hamilton, 1967).

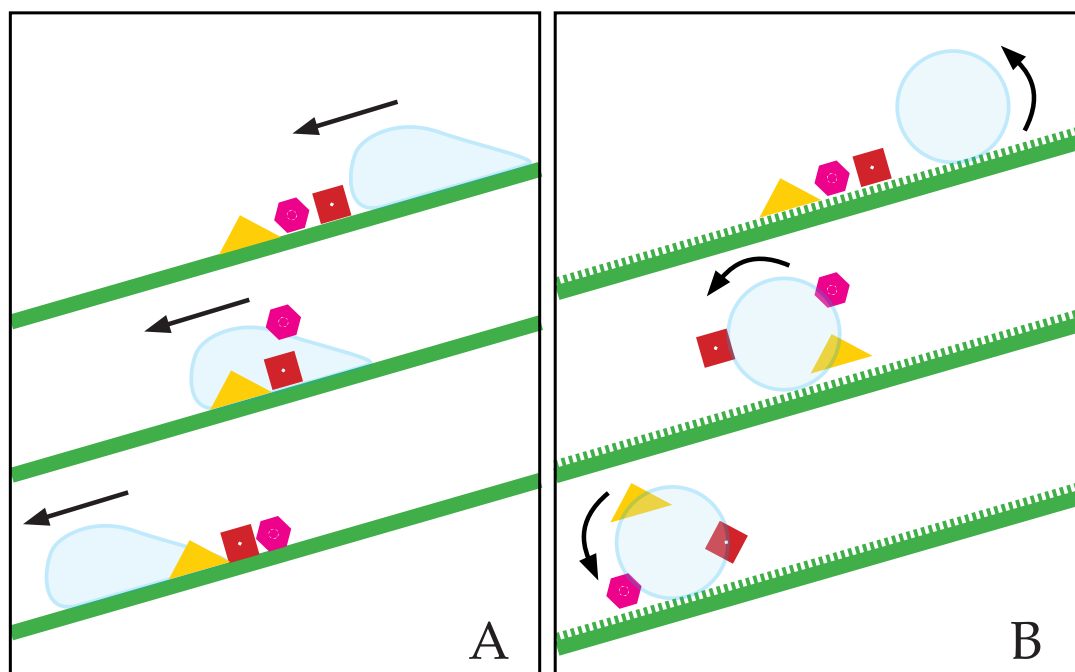
Na Slici 1.2.1 prikazana je šema građe kutikule na površini biljnog organa. Iznad celuloznog ćelijskog zida epidermisa nalazi se sloj pektina, na kome leži kutikula. Kutikula je tanak kontinuirani sloj koji se sastoji uglavnom iz (i) nerastvorljivih polimera i (ii) rastvorljivih lipida.

(i) Nerastvorljiv je uglavnom poliestarski matriks (kutin) sačinjen iz  $\alpha$ -hidroksi masnih kiselina sa dužinom lanca od C16 do C18 (Baker, 1982; Holloway, 1971, 1982; Neinhuis et al., 2001), kao i dodatni polimer (kutan). Oba su otporna na alkalnu hidrolizu (Nip et al., 1986). Oni čine osnovu kutikule. Debljina ovog sloja varira, od svega 0,1  $\mu\text{m}$  pa do više od 10,0  $\mu\text{m}$  kod plodova i kserofita (Holloway, 1994). Kutin je monomer izveden iz C16:0 i C18:1 masnih kiselina sintetisanih u plastidima. Nastaje kao proizvod porodice različitih oksidaza koje imaju aktivnosti slične onima u biosintetskim putevima u kojima nastaju komponente voskova, iako kutin-oksidaze najverovatnije ne koriste masne kiseline veoma dugog lanca (VLCFA) kao prekursore (Post-Beittenmiller, 1996).

(ii) Rastvorljivi polimeri predstavljaju složenu mešavinu alifatičnih i cikličnih komponenti koje se nazivaju voskovima. Oni mogu biti u amorfnom ili kristalnom obliku. U zavisnosti od toga da li se nalaze u matriksu kutina ili iznad njega, razlikuju se intrakutikularni i epikutikularni voskovi. Njihova količina varira od svega 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , pa do čak 500  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  kod nekih kserofita (Holloway, 1994). Sastav voskova zavisi od vrste, iako do promena u



Slika 1.2.1. Šema kutikularnog sloja (prilagođeno prema Holloway, 1994)



Slika 1.2.2. Šematski prikaz *lotusovog efekta*. **A** - glatka kutikula, **B** - hrapava kutikula (prilagođeno prema Barthlott & Neinhuis, 1997)

pojedininim komponentama i njihovim količinama može doći tokom ontogenetskog razvića (Baker, 1982). Glavne komponente uključuju *n*-alkane, alkil estre, karboksilne kiseline, primarne i sekundarne alkohole, aldehide, mono- i diketone (Kolattukudy et al., 1980; Bianchi, 1995). Pored *n*-alkana mogu se pronaći i granati alkani (uglavnom u znatno manjem procentu) kao i neka ciklična jedinjenja (najčešće triterpeni).

*Intrakutikularni voskovi* imaju drugačiji sastav od epikutikularnih. Kod njih često glavnu komponentu čine karboksilne kiseline veoma dugog lanca (Baker, 1982). Epikutikularni voskovi često imaju jednu dominantnu komponentu, a to su na primer alkani kod *Brassica* sp., *Rizophora* sp. (Holloway, 1994; Dodd et al., 1995), aldehidi kod *Saccharum officinarum* L. (Poaceae), primarni alkoholi kod *Pisum sativum* L. (Fabaceae) i mnogih trava (Tulloch & Hoffman, 1976; Tulloch, 1984), ketoni kod *Allium* sp. (Holloway, 1994), sekundarni alkoholi kod *Papaver* sp. i nekih četinarara (Nikolić et al., 2012a, 2012b, 2013a) i β-diketoni kod *Eucalyptus* sp. i *Dianthus* sp. (Holloway, 1994). Svaka klasa lipida u kutikularnom vosku je predstavljena homologom serijom ugljovodonika, u kojoj najčešće jedna dužina lanca dominira. Kada u najzastupljenijoj klasi lipida (> 40 %) dominira jedna komponenta (> 80 %), epikutikularni voskovi obrazuju trodimenzionalne strukture na površini. Oblik i izgled ovih kristala je uzrokovan fizičko-hemijskim karakteristikama komponenti epikutikularnog sloja, naročito njegove dominantne komponente (Eigenbrode & Espelie, 1995). Na primer, duge tanke tubule su karakteristične za β-diketone, dok se pločice vezuju za visoke količine C24 primarnih alkohola. Listovi vrste *Liriodendron* (Magnoliaceae) na površini imaju kristaloide u obliku trasverzno krutih štapića koje formira hentriakontan-16-on, listovi vrste roda *Tilia* (Tiliaceae) imaju četvorougane štapiće koje formira β-amirenil acetat, dok se kod listova vrsta roda *Quercus* (Fagaceae) sreću mikrostrukure u obliku listića koje formira tetrakozanol. Vrste roda *Fagus* i *Castanea* (Fagaceae) nemaju na listovima kristaloide, već samo oblikovani površinski sloj na gornjoj strani lista (Gülz, 1994). Zbog postojanja velikog diverziteta ovih trodimenzionih struktura, Barthlott i saradnici (1988) su izvršili njihovu klasifikaciju. Na osnovu podataka dobijenih skenjenjem elektronskom mikroskopijom (SEM) površina biljnih organa preko 13.000 taksona, predložili su klasifikaciju ovih struktura u čak 23 tipa, te dali pregled korelacija strukture i hemijskog sastava.

### 1.2.2. Biološka uloga epikutikularnih voskova

Kutikula na površini gotovo svih nadzemnih biljnih organa formira hidrofobni sloj koji ima raznovrsne uloge: sprečava nekontrolisanu transpiraciju (Post-Beittenmiller, 1996; Rowland et al., 2006; Schönherr, 1976, 1982) ali formira i vodonepropusan sloj koji sprečava zadržavanje vode na površini listova (Baker, 1982; Jeffrey, 1986), sprečava prodiranje patogena (Jenks et al., 1994a), predstavlja zaštitu od herbivornih insekata (Eigenbrode & Espelie, 1995; Podila et al., 1993; Städler et al., 1986; Thompson, 1963), vrši refleksiju svetlosti (Barnes et al., 1996; Reicosky & Hanover, 1978), sprečava prodiranje polutanata (Martin & Juniper, 1970; von Wettstein-Knowles, 1993) i ima važnu ulogu u interakciji polenovog zrna i žiga (Preuss et al., 1993). O njenom značaju govori i činjenica da se epikutikularni voskovi nalaze čak i na listovima koji su još uvek u pupoljku (Knight et al., 2004).

Jedna od važnijih uloga kutikularnih voskova je sprečavanje gubitka vode usled nekontrolisane transpiracije. Voskovi unutar kutikularnog matriksa formiraju mozaik različitih hemijskih jedinjenja, i što su ugljovodonični lanci duži, to se formira homogeniji sloj kroz koji molekuli vode teško mogu da difunduju. Zanimljiva je i korelacija visoke UV-B radijacije i veće količine granatih alkana i kraćih *n*-alkana kod *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) koju su utvrdili Barnes i saradnici (1996). Kod brojnih četinarskih vrsta koje žive na većim nadmorskim visinama uočeno je povećanje kutikularne transpiracije sa nadmorskom visinom. Postavlja se pitanje da li je povećanje UV-B radijacije direktno uticalo na smanjenje dužine ugljovodničnih lanaca (ometanjem njihove sinteze) i povećanje udela granatih alkana, ili je "krivac" kraći vegetacioni period (Kerstiens, 1996).

Propustljivost kutikule, dakle, zavisi više od sastava i organizacije samih ugljovodoničnih molekula unutar nje, nego od debljine kutikularnog sloja (Kerstiens, 1996; Dodd & Afzal-Rafii, 2000). Brojna istraživanja su pokazala značaj kutikularnih voskova na transpiraciju (Martin & Juniper, 1970; Schönherr, 1976; Reynhardt & Riederer, 1994; Jenks et al., 1994a; Kerstiens, 1996; Hauke & Schreiber, 1998). Martin-Smith i saradnici (1967) su pokazali da je količina voskova obrnuto srazmerna količini dostupne vode, a da raste sa porastom temperature kod pet vrsta roda *Cortaderia* (Poaceae). Schönherr (1976) je uklonio kutikulu sa

listova limuna (*Citrus aurantium* L., Rutaceae), kruške (*Pyrus communis* L., Rosaceae) i crnog luka (*Allium cepa* L., Liliaceae) i izmerio povećanje permeabilnosti vode za 300 do 500 puta. Propustljivost za vodu kod mladih listova, i onih koji nisu bili potpuno formirani, je nakon uklanjanja kutikule bila povećana nekoliko puta, što ukazuje na promenu u količini i/ili sastavu voskova tokom ontogenetskog razvića. Slične rezultate su dobili i drugi autori. Hauke i Schreiber (1998) su posmatrali kutikularnu transpiraciju listova bršljana (*Hedera helix* L., Araliaceae) tokom cele vegetacione periode. Kutikularna transpiracija je bila najviša nultog dana da bi se potom smanjivala sve do tridesetog. Nakon toga, do kraja vegetacione periode, transpiracija je ostala manje-više konstantna. Ovakva promena u nivou transpiracije je praćena i promenom u sastavu voskova. Naime, iako su se apsolutne količine voskova menjale tokom cele vegetacione sezone, nakon sazrevanja lista, udeo pojedinačnih komponentni je ostao manje-više nepromenjen, ukazujući na značaj sastava a ne debljine voštanog sloja. Čak i sa stanjenom kutikulom i manjom apsolutnom količinom voskova na površini listova, nije došlo do povećanja transpiracije. Zanimljivo je i to da je propustljivost kutikule kod submerzne biljke, *Potamogeton lucens* L. (Potamogetonaceae), oko 3 puta veća od listova ispitivanih kopnenih vrsta (Schönherr, 1976), što dodatno potvrđuje važnu ulogu kutikule u regulaciji transpiracije.

Druga značajna uloga kutikule je da deluje kao repelent vode. Ovo svojstvo je opisano pod terminom *lotusov efekat* (Barthlott & Neinhuis, 1997). Vazduh sadrži brojne kontaminante, poput prašine i čestica zemlje koji uglavnom imaju abrazivni karakter, zatim hemijskih polutanata, ali i spora patogenih gljiva. Ove čestice mogu povećati površinsku temperaturu listova ili ometati normalan rad stoma (Barthlott & Neinhuis, 1997). Osnova ovog efekta je u fizičkim karakteristikama hidrofobnog kutikularnog sloja i trodimenzionalnih epikutikularnih struktura i samih molekula vode. Naime, kada je površina lista glatka, kapljica vode će celom svojom površinom biti u kontaktu sa kutikulom. Što je veća količina polarnih grupa unutar voskova, to će se lakše nadvladati površinski napon kapljice vode i ona će zauzeti veću površinu, i samim tim će jače prijanjati za površinu lista (ili drugog biljnog organa). Međutim, kod površina koje su hrapave, između trodimenzionalnih struktura na površini se nalaze molekuli vazduha koji dodatno smanjuju kontakt između kapi vode i površine lista, odnosno sve su manje sile koje deluju nasuprot silama površinskog napona kapi vode. U tom slučaju, kâp vode će zauzeti najmanju moguću površinu i lako će skliznuti sa površine lista. Na svom putu će pri tom pokupiti sve čestice prljavštine koje se zadese. Da bi se kâp vode pokrenula, ona mora savladati adhezione sile koje je vezuju za površinu biljnog organa. Što



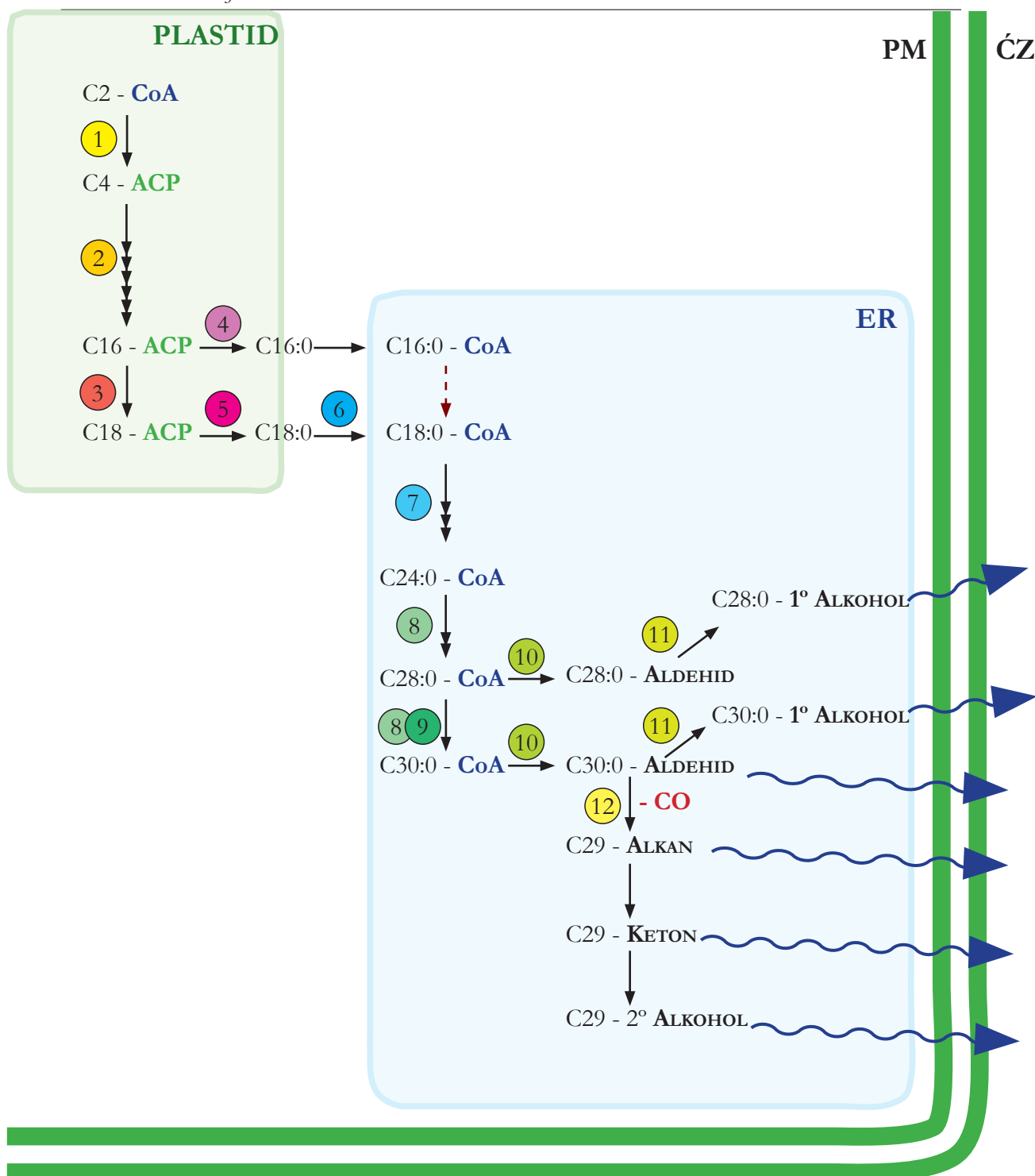
je površina grublja, to su ove sile slabije, te je i količina kinetičke energije za pokretanje kapi manja. Eksperimentalno je utvrđeno da kapi kiše imaju dovoljno kinetičke energije da se pokrenu sa površine lista (Barthlott & Neinhuis, 1997) Slika 1.2.2.

Pored mehaničkog uklanjanja (Barthlott & Neinhuis, 1997) ili sprečavanja prodiranja spora gljiva (Jenks et al., 1994a), epikutiklarni voskovi imaju raznovrsni uticaj i na herbivorne insekte. Sastav voskova i površinske trodimenzionalne strukture su pokazale direktan (kroz toksičnost) ili indirektan (pružanje ‘pogrešnih’ vizuelnih tragova) uticaj na ishranu insekata i polaganje jaja (Eigenbrode & Espelie, 1995).

Jedno od najviše proučavanih svojstava kutikule je refleksija (UV) svetlosti. Pojedine biljke odaju sivkast ili plavičast sjaj sa površine biljnih organa. Ovo je posebno uočljivo kod kseromorfni vrsta. Prve pretpostavke su bile da je količina voska odgovorna za ovaj sjaj. Da bi ispitili ovu teoriju, Tulloch i Hoffman (1976) su ekstrahovali voskove sa površine biljnih organa kod jedne ovakve vrste, *Agropyron intermedium* L. (Poaceae). Količina voskova se ni po čemu nije razlikovala od srodnih vrsta koje nemaju ovakav sjaj. Utvrđivanjem sastava došlo se do pretpostavke da je ovaj efekat najverovatnije vezan za visoki udeo  $\beta$ -diketona u voskovima kod ovih biljaka. Reicosky i Hanover (1978) su ispitivali razliku u refleksiji svetlosti kod sivkastih i “normalnih” listova kod *Picea pungens* Engel. (Pinaceae). Utvrdili su da oba tipa listova reflektuju svetlost u istom opsegu (od 350 do 800 nm). Najveća refleksija je bila u regionu 750 do 800 nm, a najniža oko 670 nm. Sivkasti listovi su pokazali veću refleksiju svetlosti na svim talasnim dužinama u poređenju sa “normalnim” listovima. Najveća razlika je bila u opsegu od 350 nm, sa tendencijom pada ka većim talasnim dužinama. Slične rezultate su dobili i drugi autori (Grant et al., 1995; Barnes et al., 1996).

Da bi se ostvarile sve ove uloge, očuvanje konzistencije strukture je presudno. Ukoliko bi došlo do topljenja voskova usled visokih temperatura, istopile bi se i trodimenzionalne strukture na površini listova i samim tim bi se i izgubio njihov značaj. Iz tog razloga, brojni autori su pokušali da pokažu korelaciju između dužine ugljovodoničnih lanaca i ekoloških uslova sredine. Kawamura i saradnici (2003) su izneli hipotezu da biljke koje rastu u tropskim regionima sintetišu veće količina dugolančanih ugljovodonika kako bi održale čvrstoću epikutikularnih voskova a samim tim i trodimenzionalne strukture koje oni formiraju. Topljenje voska bi, najpre, izazvalo povećanje permeabilnosti kutikule, a samim tim bi dovelo do povećanja kutikularne transpiracije (Gibbs, 2002). Tačke topljenja čistih *n*-alkana rastu za oko 4 °C za svaka dva ugljenikova atoma: C27: 59.2 °C; C29: 63.7 °C ... C35: 74.6 °C.

(Rommerskirchen et al., 2006). Nažalost, malo se zna o tačkama topljenja mešavine alkana. Iako se alkani najčešće koriste u istraživanjima sastava epikutikularnih voskova, oni nisu jedine komponente. Mešavina *n*-alkana različite dužne sa zasićenim i nezasićenim alifatičnim i aromatičnim jedinjenjima koje ulaze u sastav epikutikularnih voskova će svakako imati uticaj na konačnu tačku topljenja. Gibbs (1995) je ispitaio mešavinu dva *n*-alkana. I dok su se čisti alkani topili naglo u intervalu od svega 2-3 °C, mešavine su imale daleko širi opseg (5-20 °C). S druge strane, mešavina veštačkih estara i *n*-alkana je imala nižu tačku topljenja za nekoliko stepeni celzijusa od individualnih lipida (Patel et al., 2001).



**Slika 1.2.3.** Biosinteza voskova u bilnoj ćeliji: 1-3 su kompleksi enzima (FAS) koji deluju u procesu ekstenzije ugljovodoničnog lanca ( $\beta$ -ketoacil reduktaza,  $\beta$ -ketoacil-ACP-sintaza, dehidrataza, enoil-reduktaza), ova tri kompleksa se razlikuju po sintezama koje ulaze u njih: **1** - KAS III, **2** - KAS I, **3** - KAS II; **4** - palmitoil-ACP-tioesteraza, **5** - stearoil-ACP-tioesteraza, **6** - acil-CoA sintetaza; elongaze ( $\beta$ -ketoacil reduktaza,  $\beta$ -ketoacil-CoA-sintaza, dehidrataza, enoil-reduktaza), razlikuje se u samo jednom enzimu: **7**- KCS, **8** - CER6; **9** - CER2, **10** - CER10, **11** - CER4, **ER** - endoplazmatični retikulum, **PM** - plazma-membrana, **ĆZ** - ćelijski zid

### 1.2.3. Biosinteza (epi)kutikularnih voskova

Značajna uloga epikutikularnih voskova u životu biljaka ukazuje na jaku genetičku kontrolu njihove biosinteze. Biosinteza (epi)kutikularnih voskova se dešava u tri faze:

- (1) *de novo* biosinteza masnih kiselina u stromi plastida
- (2) biosinteza VLCFA (masnih kiselina veoma dugog lanca) – elongacija
- (3) transformacija VLCFA u komponente kutikularnih voskova kroz nekoliko paralelnih biosintetskih puteva

#### (1) *De novo* biosinteza masnih kiselina

Prekursori za biosintezu voskova su masne kiseline koje se sintetišu *de novo* u plastidima. Inicijacija sinteze masnih kiselina je kondenzacija manoil-ACP (*Acetyl Carrier Protein*) sa acetil-Koenzimom A (Ohlrogge et al., 1993). Nakon ovog koraka, sledeće reakcije se ponavljaju ciklično, gde se dodaju po 2 ugljenika na kraju svakog ciklusa. To su: redukcija  $\beta$ -ketoacil-ACP kompleksa, dehidratacija  $\beta$ -hidroksiacil-ACP i redukcija *trans*- $\Delta^2$ -enoil-ACP-a. Proizvod prvog ciklusa ostaje esterifikovan za ACP a potom se na njega dodaju po 2 ugljenikova atoma u svakom narednom ciklusu. Donor ta dva ugljenikova atoma je manoil-ACP, a NAD(P)H je donor vodonika za dve reduktaze. Za sintezu C18 masne kiseline u plastidu, neophodno je nekoliko različitih kondenzujućih enzima. Naime, oni se razlikuju prema strogoj asocijaciji sa određenom dužinom acil lanca. KASIII ( $C_2$ - $C_4$ ) (Clough et al., 1992), KASI ( $C_4$ - $C_{16}$ ) i KASII ( $C_{16}$ - $C_{18}$ ) (Shimakata & Stumpf, 1982). Dve reduktaze i dehidrataza nemaju specijalnu preferencu prema dužini acil lanca. Dugolančani proizvodi (C16 i C18) postaju prekursori u biosintezi više različitih lipidnih komponenti (Post-Beittenmiller, 1996).

#### (2) Biosinteza VLCFA

Druga faza je elongacija masnih kiselina, odnosno produženje ugljovodoničnog lanca osnovnih C16 i C18 masnih kiselina do VLCFA lanaca koji se koriste u sintezi alifatičnih voštanih komponenti. Ona je katalizovana ekstra-plastidnim membranskim multienzimskim kompleksima, poznatijim kao elongaze masnih kiselina (FAE) (von Wettstein-Knowles, 1982). Slično *de novo* sintezi masnih kiselina u plastidu, serija četiri enzimatske reakcije rezultuje

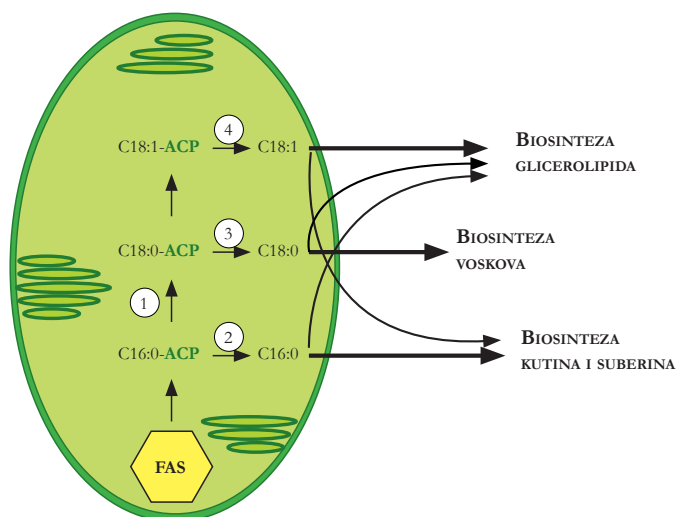
ekstenzijom lanca za dva ugljenikova atoma: kondenzacija, koju prati  $\beta$ -keto redukcija, potom dehidratacija i na kraju enoil redukcija (Fehling & Mukherjee, 1991). Više ciklusa elongacija je neophodno da bi se acil lanac produžio do željene dužine. Dužina VLCFA je najčešće između 20 i 32 ugljenikova atoma, dok masne kiseline koje esterifikacijom daju alkohole mogu biti i 40 do 60 ugljenikovih atoma duge (Post-Beittenmiller, 1996). NAD(P)H i ovde obezbeđuje vodonik za redukciju, međutim, postoje neke bitne razlike između *de novo* sinteze i elongacije: (a) elongacija VLCFA se ne dešava na ACP, a donor dva ugljenika je manoil-Koenzim A (umesto manoil-ACP), (b) elongaze su ekstraplastidne i vezane su za ćelijsku membranu, (c) elongaze imaju potrebu za ATPom (mada koliko troše ATP još uvek nije poznato (Post-Beittenmiller, 1996)).

### (3) Biosinteza voskova

Treći korak je biosinteza lipidnih komponenti voskova. Prekursori za ovaj korak su VLCFA. Kod većine biljaka, postoje dva osnovna puta biosinteze voskova: acil-redukциони put (čiji su proizvodi primarni alkoholi i estri) i put dekarboksilacije (koji vodi formiranju aldehida, alkana, sekundarnih alkohola i ketona) (Slika 1.2.3). Kod nekih taksona, oba biosintetska puta mogu imati zajedničke neke ili sve reakcije elongacije masnih kiselina, a razlikovati se samo u enzimima koji deluju na produženu masnu kiselinu ili njen proizvod. (Post-Beittenmiller, 1996). Na primer, *Arabidopsis cer4* mutanti se smatraju defektnim u aldehid reduktazi (Jenks et al., 1995). Kod ovih mutanata je karakteristična velika količina aldehida kao i pad u količinama primarnih alkohola (acil-redukujući biosintetski put) ali nema promena u produktima dekarboksilacionog puta. *Cer13* mutanti imaju veći udeo dugolančanih alkana i alkohola, a mutacija u ovom genu se pripisuje mutaciji koja vrši redukciju C30 masne kiseline u C30 aldehid (Rashotte et al., 2001). Rezultat takvog blokiranja u sintezi voskova je nagomilavanje C30 masne kiseline što za posledicu ima povećanu produkciju C30 primarnog alkohola ili elongaciju u C32 masnu kiselinu, praćenu redukcijom u C32 aldehid i dekarboksilacijom u hentriakontan ( $C_{31}$ ).

Biosintetski put dekarboksilacije započinje produkcijom aldehida od VLCFA uz pomoć membranskog proteina – acetil-CoA reduktaze. Ova reduktaza je izolovana iz listova graška. Pokazalo se da se na osnovu molekulske težine od 28 kDa i biohemijskih svojstava razlikuje od reduktaze uključene u produkciju primarnih alkohola (Vioque & Kolattukudy, 1997). Sintetisani aldehidi se potom dekarboksilišu do alkana neparnog niza uz oslobađanje ugljen-monoksida.

### 1.2.4. Kontrola biosinteze lipidnih komponenti



**Slika 1.2.4.** Šematski prikaz upućivanja masnih kiselina u tri osnovna biosintetska puta: **FAS** - kompleksi enzima koji deluju u procesu ekstenzije ugljovodoničnog lanca: **1** - KAS II, **2** - palmitoil-ACP-tioesteraza, **3** - stearoil-ACP-tioesteraza, **4** - oleoil-ACP-tioesteraza (prilagođeno prema Post-Beittenmiller, 1996)

*de novo* sintetisane masne kiseline C16:0 i C18:1 su prekursori za biosintezu glicerolipida membrane, dok su prekursori za sintezu kutikularnih voskova primarno zasićene masne kiseline, verovatno izvedene iz C18:0. Kutin i suberin su polimeri C16:0 i C18:1 masnih kiselina. Dakle, nakon *de novo* sinteze masnih kiselina, dešava se odvajanje koje usmerava C16:0 i C18:1 masne kiseline u glicerolipide ili kutin/suberin biosintezu, i C16:0 i C18:0 koje se prebacuju u endoplazmatični retikulum gde se dešavaju prvi koraci u biosintezi voskova. Trenutno nije poznat mehanizam koji reguliše ovo odvajanje (Post-Beittenmiller, 1996).

Mikrozomalne elongaze potom produžavaju ove masne kiseline do masnih kiselina veoma dugog lanca (VLCFA). Bliska fizička asocijacija između plastida i ER može olakšavati transfer masnih kiselina iz plastidne membrane u ER (Douce & Joyard, 1980). Za sada nije poznato kako molekuli tako dugih lanaca, alkoholi, aldehidi i alkani prelaze iz ER kroz plazma membranu. (Kunst & Samuels, 2003)

Masne kiseline se sintetizuju u plastidima *de novo* i koriste se u bar tri različita biosintetska puta koje vode do proizvodnje glicerolipida, voskova, i kutina/suberina (Slika 1.2.4).

Deljenje prekursora masnih kiselina između ovih biosintetskih puteva je najverovantije glavna tačka kontrole u kojoj se određuje količina i sastav kutikularnih lipida. U većini vegetativnih tkiva,

Ranije SEM studije su dovele do postavljanja dva moguća modela za ovaj transport: (1) prolazak kroz definisane pore i (2) difuzija kroz mikroskopske prostore u ćelijskom zidu (Jeffree et al., 1976). Prva hipoteza je bazirana na neravnomernoj distribuciji epikutikularnih voštanih struktura i prisustvu spornih pora na površini nekih biljnih vrsta. Druga hipoteza je bazirana na amorfnim voštanim slojevima koje se mogu naći u svim delovima kutikule što upućuje na kontinuirani ili veoma česti transport. Trodimenzionalne kristalne strukture koje obrazuju epikutikularni voskovi su posledica fizičko-hemijskih svojstava voskova, npr. koncentracije i tipa specifičnih komponentni (Barthlott & Neinhuis, 1997). Studije rekristalizacije voskova sa iglica smrče pokazuju da se voštane tubule ponovo formiraju čak i na iglicama kod kojih nema sinteze ili eksporta voskova (Bermadinger-Stabentheiner, 1995). SEM studije na vrstama roda *Sorghum* pokazuju da su voštani filament, koji se izlučuju na površinu epidermisa, u vezi sa intracelularnim vezikulama, čija gustina raste sa indukovanom produkcijom voskova. Ne postoje dokazi za umešanost kanala ili pora. Iako je sastav ovih vezikula nepoznat, pretpostavlja se da one mogu sadržati proteine specifično uključene u transport voskova na površinu ćelije (Jenks et al., 1994b).

### 1.2.5. Prethodna istraživanja alkana

Iako se epikutikularni sloj sastoji od brojnih komponenti (kao što su *n*-alkani, alkil estri, karboksilne kiseline, primarni i sekundarni alkoholi, aldehidi, mono- i diketoni (Kolattukudy et al., 1980; Bianchi, 1995)), *n*-alkani su najviše proučavane komponente kutikule. Jedan od glavnih razloga je njihova hemijska stabilnost. Zbog neposedovanja funkcionalnih grupa, alkani su izuzetno hemijski stabilni i postojani, mogu se pronaći čak i u fosilnim nalazima, lako se izoluju i identifikuju, a univerzalno su prisutni kod biljaka. Već šezdesetih godina prošlog veka krenula je primena alkana (i drugih komponentni epikutikularnih voskova) kao hemotaksonomskih markera (Eglinton et al., 1962a, 1962b; Eglinton & Hamilton, 1963; Martin-Smith et al., 1967; Del Castillo et al., 1967; Dyson & Herbin, 1968), ali i upotreba u geološkim studijama (Han et al., 1968; Han & Calvin, 1969).

Alkani su u početku korišćeni u geološkim studijama u pronalaženju tla za eksploataciju nafte i uglja. U takvim zemljištima je udeo alkana parnog niza veći od udela alkana neparnog niza. Naime, prva istraživanja alkana kod biljaka su pokazala da kod svih kopnenih biljaka alkani neparnog niza dominiraju u odnosu na alkane parnog niza. Taj odnos je često i preko 2 u korist alkana neparnog niza (Bush & McInerney, 2013). Novija istraživanja su, međutim, pokazala da šumski požari mogu da dovedu do raspadanja alkana u zemljištu, što dovodi do smanjenja dominacije alkana sa neparnim brojem ugljenika (Kuhn et al., 2010). No, alkani su veoma često korišćeni kao proksiji u paleohidrološkim i paleovegetacijskim studijama. Njihova upotreba je zasnovana na jedinstvenom ugljovodoničnom profilu epikutikularnih voskova oslobođenih iz listova različitih vrsta tokom njihove degradacije u zemljištu. Kao hemotaksonomski markeri, alkani nemaju veliku rezoluciju zbog svoje male varijabilnosti, te se slični profili mogu naći i kod evolutivno udaljenih taksona a koji naseljavaju ista ili slična staništa. Međutim, kao ekološki indikatori alkani mogu ukazati na tip vegetacije koji je (bio) prisutan na nekom staništu. Brojna istraživanja pokazuju vezu između dužine lanaca *n*-alkana koji dominiraju u epikutikularnom voskovima i suše (Dodd & Afzal-Rafii, 2000; Dodd & Poveda, 2003; Bush & McInerney, 2013)



Za usvajanje ugljen-dioksida, biljke su razvile tri mehanizma: C3 (Calvin-Benson), C4 (Hatch-Slack) i CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*). Dok u C3 biljke spada većina drveća, žbunja i trave hladnijih staništa, većina C4 biljaka su trave (Poaceae) i trave oštrice (Cyperaceae). C4 metabolizam omogućava biljkama efikasnije usvajanje CO<sub>2</sub> (i pri nižem pCO<sub>2</sub>) i efikasnije korišćenje vode. Efikasnost usvajanja vode i CO<sub>2</sub> je kod CAM biljaka još veća, pa su one i najčešće u vrelim i aridnim staništima (Boom et al., 2001).

Na osnovu sastava alkana epikutikularnih voskova, odnosno profila alkana, i udela stabilnih izotopa ugljenika donekle je moguće razlikovati ove biljke. Naime, pokazalo se da C3, C4 i CAM biljke imaju jaku dominaciju neparnih u odnosu na parne alkane, i generalno jaku dominaciju dugolančanih alkana. Dominantan alkan kod C3 biljaka je uglavnom C<sub>29</sub> dok je kod C4 biljaka to C<sub>31</sub> (Kuhn et al., 2010). Samo na osnovu alkanskih profila nije uvek moguće razlikovati tip vegetacije. Ipak, zbog razlike u metabolizmu C3 i C4 biljaka, one imaju i različite količine stabilnog ugljenikovog izotopa δ<sup>13</sup>C. Kako na otvorenim staništima dominiraju trave (koje imaju uglavnom C4 metabolizam), a šumskim ekosistemima dominiraju C3 biljke, relativno je lako razlikovati "potpis" koji ova vegetacija ostavlja u geološkim slojevima. Kod C3 biljaka je znatno veći udeo ovog ugljenikovog izotopa (27 ‰) nego kod C4 biljaka (12 ‰) (Boom et al., 2002). Boom i saradnici (2002) su na osnovu δ<sup>13</sup>C bili u mogućnosti da razliku C3 od C4 trave. Štaviše, detaljnije analize su pokazale da je pored udela ugljenikovog izotopa kao dobrog markera za razlikovanje C3 i C4 trave, to moguće uraditi i na osnovu višeg udela C<sub>31</sub> i C<sub>33</sub> alkana, kao i C<sub>32</sub> primarnog alkohola kod C4 vrsta (Rommerskirchen et al., 2006).

Dok kod većine golosemenica i cvetnica dominiraju C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub> i C<sub>33</sub> alkani, a kod paprati C<sub>27</sub> (Bush & McInerney, 2013), kod belih mahovina (*Sphagnum* sp., Sphagnaceae) detektovana je dominacija C<sub>25</sub> *n*-alkana u epikutukularnom sloju (Nichols et al., 2006). Pored brojnih paleontoloških, paleohidroloških i paleoekoloških studija (Cranwell, 1973; Cranwell et al., 1987; Ficken et al., 2000; Hinrichs et al., 1997; Huang et al., 1995; Nichols et al., 2006; Sachse et al., 2012; Zhang et al., 2003; Meyers, 2003; Zhao et al., 2003; Otto et al., 2005; Nichols et al., 2010; Bush & McInerney, 2013), *n*-alkani se koriste i kao proksiji u proučavanju promene vegetacije i klime danas (Conte et al., 2003; Kawamura et al., 2003; Schefuß et al., 2003a, 2003b; Sachse et al., 2004; Sicre & Peltzer, 2004; Bendle et al., 2007; Castañeda & Schouten, 2011).

Pored paleoekoloških, geoloških i klimatoloških istraživanja, *n*-alkani su našli primenu i u poljoprivredi, i to kao markeri za procenu kvaliteta ishrane kod domaćih životinja. Princip je isti – proučavaju se profili alkana kao i stabilni ugljenikov izotop  $\delta^{13}\text{C}$  u ekskrementu domaćih životinja i na osnovu toga procenjuje udeo trava (mahom C4 biljaka) i mahunarki i ostalih C3 biljaka (Laredo et al., 1991; Vulich et al., 1993; Dove & Mayes, 1991; Piasentier et al., 2000).

### 1.2.6. Varijabilnost i upotreba alkana u taksonomskim istraživanjima

Prve taksonomske studije na epikutikularnim voskovima su započete 60-ih godina prošlog veka. U početku su se bavile ukupnim voskovima, da bi se kasnije fokus prebacio na *n*-alkane. Vrlo brzo je utvrđeno da se unutrašnji ugljovodonici razlikuju drastično od površinskih, da imaju “ravnomernu distribuciju” odnosno da ne postoje razlike u količinama između komponenti, te da površinski voskovi pokazuju dominaciju onih sa neparnim brojem ugljenika u odnosu na one sa parnim (Herbin & Robins, 1969).

#### Varijabilnost *n*-alkana

Da bi *n*-alkani mogli koristiti kao hemotaksonomski markeri, neophodno je bilo utvrditi njihovu biološku ulogu kao i varijabilnost. Prve studije se ukazivale da su voskovi (pa samim tim i *n*-alkani) stabilni, tj. da ne variraju između listova jedne jedinke ili tokom starenja lista (Purdy & Truter, 1961; Eglinton et al., 1962b). *n*-Alkani su zbog svoje hemijske stabilnosti, jednostavne identifikacije i univerzalne prisutnosti odabrani kao najpogodniji za taksonomska istraživanja.

Iako su se u nekim istraživanjima pokazali kao izuzetno stabilni, veliki broj radova ukazuje na varijabilnost u sastavu voskova i samih *n*-alkana tokom vegetacione periôde. Kod pojedinih vrsta iz familija Zamiaceae (Osborne et al., 1989), Pinaceae (Günthardt-Goerg, 1986; Kerfourn & Garrec, 1992; Turunen et al., 1997), Fagaceae (Gülz et al., 1989; Lütz et al., 1990; Gülz & Boor, 1992; Gülz & Müller, 1992), Tiliaceae (Gülz et al., 1991), Rubiaceae (Stocker & Wanner, 1975) i Poaceae (Avato et al., 1984; Smith et al., 2001) pronađena je sezonska varijabilnost. Uočena sezonska varijabilnost se uglavnom ogleda u apsolutnim količinama pojedinih grupa jedinjenja, dok se odnos komponenti nije menjao. Štaviše, pokazano je da je uočena kvalitativna varijabilnost posledica:

(a) različitih faza ontogenetskog razvića organa, pa je tako na primer, kod bukve (*Fagus sylvatica* L., Fagaceae) detektovano dupliranje ukupne količine voskova, i pojava aldehida koji

prethodno nisu bili detektovani u pupoljku, dok se dužina dominantnog ugljovodoničnog lanca menjala (od kraćeg ka dužem). U ostatku sezone sastav se nije menjao (Prasad & Gulz, 1990). Epikutikularni voskovi bršljana (*Hedera helix* L., Araliaceae) su tokom prvih 30 dana razvoja lista prolazili kroz dramatične promene. Dok su u početku dominirali alkani srednje dužine lanca ( $C_{22}$ - $C_{26}$ ), nakon desetog dana dolazi do laganog pomeranja ka lancima veće dužine ( $C_{28}$  i  $C_{30}$ ). Nakon tridesetog dana, distribucija dužine lanca alkana, alkohola, aldehida i masnih kiselina se nije menjala, dok su se apsolutne količine ovih jedinjenja ponovno smanjile (Hauke & Schreiber, 1998). Kod četinara (*Pinus cembra* L., *Picea abies* (L.) H.Karst., Pinaceae) epikutikularni voskovi se nisu kvalitativno menjali sa starošću iglica, ali jesu kvantitativno što je za posledicu imalo promene u površinskim strukturama na listovima (Günthardt-Goerg, 1986).

(b) razlike između biljnih organa. Prilikom proučavanja ukupnih epikutikularnih voskova kod trava (Poaceae) iz različitih sezona, Smith i saradnici (2001) su uočili razliku između sušne i kišne sezone. Oni su predložili da je uočena razlika možda i posledica fenofaza. Detaljnije studije su pokazale da se alkani cvasti razlikuju od alkana ostatka biljke, odnosno da same cvasti obiluju kraćim alkanima ( $C_{29}$ ,  $C_{27}$  i kraćim), te da je prilikom izolovanja iz celih biljaka, značajan udeo imala i cvast onda kada je bila razvijena u odnosu na deo vegetacione periode kada još nije bila razvijena (Rommerskirchen et al., 2006).

Detaljna studija uticaja različitih faktora na sastav listova (listovi sunca i senke, vegetacione periode, senescencije) je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika između listova senke i sunca kod golosemenica i skrivenosemenica. Nakon perioda sazrevanja lista, nije pronađena statistički značajna razlika između uzoraka uzetih u leto i jesen, štaviše sastav alkana je ostao stabilan i tokom senescencije listova (Bush & McInerney, 2013).

### Taksonomski značaj

Prva zapažanja o potencijalnom značaju epikutikularnih voskova su izneli Purdy i Truter (1961). Oni su tokom svojih istraživanja površinskih lipida listova uočili razliku između različitih vrsta. Oni su proučavali 10 vrsta monokotila (*Festuca pratensis*, *F. ovina*, *F. rubra genuina*, *Dactylis glomerata*, *Agrostis tenuis*, *Alopecurus pratensis*, *Lolium italicum*, *L. perenne*, *Holcus mollis*) i 14 vrsta dikotila (*Rhododendron ponticum*, *Ilex aquifolium*, *Fraxinus excelsior*,

*Aesculus hippocastanum*, *Malus* spp., *Rosa* sp., *Brassica oleracea* subsp. *gemmifera*, *B. oleracea capitata*, *Chrysanthemum* sp., *Antirrhinum majus*, *Petunia* spp., *Beta vulgaris*, *Trifolium repens*). Njihova inicijalna zapažanja su pokazala da je sastav površinskih lipida species specifičan, da se ne menja tokom vremena (odnosno da su isti lipidi izolovani iz svežih i suvih listova), kao i da nije bilo razlike u odnosu na period uzorkovanja. Već naredne godine, Eglinton i saradnici (1962b) su proučavali *n*-alkane sa površine listova 37 vrsta iz potfamilije Sempervivoideae (Crassulaceae) sa Kanarskih ostrva, i došli do zaključka da alkani pokazuju species specifičnu distribuciju, te da su se pokazali stabilni i nezavisni od vremena uzorkovanja. Potom su usledila brojna istraživanja alkana kao hemotaksonomskih markera. Kod cvetnica su proučavani kod familija: Crassulaceae (Eglinton et al., 1962b; Stevens et al., 1994), Solanaceae (Mecklenburg, 1966; Zygadlo et al., 1994; Silva et al., 2012b), Onagraceae (Tin et al., 1971; Bowman, 1980), Oleaceae (Bianchi et al., 1992), Brassicaceae (Vioque et al., 1994; Maffei, 1996a), Fabaceae (Maffei, 1996a; Merino et al., 1999; Bush & McInerney, 2013), Salicaceae (Bush & McInerney, 2013; Cameron et al., 2002), Rutaceae (Skorupa et al., 1998), Rosaceae (Eglinton et al., 1962a; Wissemann, 2000; Wissemann et al., 2007), Lamiaceae (Maffei, 1994a), Asteraceae (Maffei, 1994b; Radulovic & Milojevic, 2012), Liliaceae (Herbin & Robins, 1968, 1969), Poaceae (Eglinton et al., 1962a; Kellogg & Watson, 1993; Li et al., 2012; Maffei, 1996b; Martin-Smith et al., 1967; Rommerskirchen et al., 2006; Tulloch, 1973, 1984) i brojnih drugih (Gülz, 1994; Knight et al., 2004; Li et al., 2013; Medina et al., 2006; Motta et al., 2009; Nguyen-Tu et al., 2007; Rocini et al., 2006; Salatino et al., 1989; Sonibare et al., 2005).

### **Taksonomski značaj alkana kod golosemenica**

Sa taksonomskog aspekta, *n*-alkani su proučavani kod velikog broja golosemenica. Prvu obuhvatniju studiju je uradio Del Castillo sa saradnicima (1967). Proučavali su epikutikularne voskove 54 taksona iz osam familija golosemenica, gde je najdetaljnije proučavana familija Podocarpaceae. Od dvadesetijedne proučavane vrste, samo tri nisu mogle da se grupišu sa ostalim na osnovu distribucije alkana. Njihov zaključak je bio da se alkani mogu koristiti u sistematici biljaka, ali samo kao pomoć a ne kao samostalni taksonomski marker. Gülz (1994) je dao pregled epikutikuarnih voskova kod viših biljaka. Došao je do zaključka da postoji fundamentalna razlika između epikutikularnih voskova listova golosemenica i skrivenosemenica, te da je njihov sastav kao i površinske strukture koje voskovi obrazuju

pod jakim selekcionim pritiskom. Gülz je proučavajući listove drvenastih vrsta golosemenica zapazio da voskovi kod *Ginkgo biloba* imaju intermedijarni karakter, tj. da slično kao kod listopadnih skrivenosemenica dominiraju alkani, estri aldehidi i alkoholi, ali se nalazi prisutan i nonakozan-10-ol koji je karakterističan za proučavane golosemenice.

Maffei i saradnici (2004) su proučavali *n*-alkane kao hemotaksonomske markere u okviru reda Pinales. Oni su pronašli *n*-alkane u opsegu od C<sub>18</sub> do C<sub>34</sub>, gde je C<sub>31</sub> bio dominantan u većini uzoraka. Araucariaceae su imale relativno nizak udeo C<sub>31</sub> (5.23%±1.58), dok su Cephalotaxaceae imale visok udeo C<sub>29</sub> (31.95%±2.05) i C<sub>27</sub> (28.00%±1.00). Kod Cupressaceae su se nalaze umerena količina C<sub>31</sub> (18.31%±2.32) i C<sub>33</sub> (5.36%±1.07), dok je kod Pinaceae C<sub>31</sub> bio dominantan *n*-alkan (25.40%±2.56). Kod Podocarpaceae su umereno zastupljeni bili neparni alkani od C<sub>27</sub> do C<sub>33</sub>, dok je C<sub>31</sub> bio najdominatniji kod Taxaceae (34.94%±7.85). Statističke analize (DA, PCA, CA) su pokazale odvajanje familija i potfamilija na osnovu profila *n*-alkana.

#### **Pregled taksonomskih istraživanja kod golosemenica:**

- (1) Rodovi *Ceratozamia*, *Dioon*, *Lepidozamia*, *Macrozamia*, *Zamia* iz familije Zamiaceae (Osborne et al., 1993)
- (2) *Ginkgo biloba*, familija Ginkgoaceae (Bush & McInerney, 2013; Gülz, 1994)
- (3) Rodovi *Podocarpus*, *Dacrydium*, *Phyllocladus* iz familije Podocarpaceae (Del Castillo et al., 1967; Maffei et al., 2004)
- (4) Rodovi *Araucaria* i *Agathis* iz familije Araucariaceae (Del Castillo et al., 1967; Maffei et al., 2004)
- (5) Rod *Sciadopitys* iz familije Sciadopitaceae (Del Castillo et al., 1967; Maffei et al., 2004)
- (6) Rod *Cephalotaxus* iz familije Cephalotaxaceae (Del Castillo et al., 1967; Maffei et al., 2004)

- 
- (7) Rodovi *Taxus*, *Torreya* iz familije Taxaceae (Del Castillo et al., 1967; Maffei et al., 2004)
- (8) Rodovi *Abies*, *Cedrus*, *Keteleeria*, *Larix*, *Pseudotsuga*, *Picea*, *Pinus*, *Tsuga* iz familije Pinaceae (Bojović et al., 2012, 2012; Bush & McInerney, 2013; Del Castillo et al., 1967; Corrigan et al., 1978; Gülz, 1994; Maffei et al., 2004; Nikolic et al., 2009; Nikolić et al., 2010, 2012a, 2012b, 2013a, 2013b; Oros et al., 1999)
- (9) Rodovi *Calocedrus*, *Chamaecyparis*, *Cryptomeria*, *Cunninghamia*, *Cupressus*, *Juniperus*, *Libocedrus*, *Metasequoia*, *Platycladus*, *Sequoia*, *Sequoiadendron*, *Taxodium*, *Thuja* iz familije Cupressaceae (Bush & McInerney, 2013; Del Castillo et al., 1967; Dyson & Herbin, 1968; Gülz, 1994; Kim, 2012; Maffei et al., 2004; Poveda et al., 2002)

### 1.2.7. Prethodna istraživanja *n*-alkana kod vrsta roda *Juniperus* L.

Za razliku od komercijalno značajnih predstavnika iz familija (Pinaceae, Poaceae, Fabaceae, Rosaceae, Solanaceae), vrste roda *Juniperus* su malo proučavane sa ovog aspekta. Prva istraživanja sastava epikutikularnih voskova kod vrsta roda *Juniperus* su počela 70-ih godina prošlog veka (Tulloch & Bergter, 1981 i citirane reference). Alkani su proučavani kod *J. scopolorum* (Gülz, 1994; Tulloch & Bergter, 1981), *J. alpina*, *J. chinensis*, *J. chinensis* var. *plumosa aurea*, *J. communis*, *J. communis* var. *aurea*, *J. horizontalis*, *J. indica*, *J. procumbens*, *J. procumbens* var. *nana*, *J. recurva*, *J. sabina*, *J. sabina* var. *tamariscifolia*, *J. squamata* var. *meyeri* (Maffei et al., 2004), *J. communis* subsp. *saxatilis* (Dodd & Poveda, 2003; Poveda et al., 2002).

Prema dostupnim literaturnim podacima, ne postoje istraživanja površinskih alkana kod vrsta sekcije *Juniperus* (*Syn. Oxycedrus*) sa Balkanskog poluostrva.



### 1.3. TERPENI

#### 1.3.1. Etarska ulja

Jedna od najviše proučavanih grupa sekundarnih metabolita biljaka su etarska ulja. Etarska ulja predstavljaju veoma složenu smešu isparljivih raznorodnih jedinjenja (aldehida, alkohola, estara masnih kiselina, sumpornih jedinjenja, terpena) koja ispoljava različita dejstva na mikroorganizme, životinje i druge biljke (Adorjan & Buchbauer, 2010; Baser & Buchbauer, 2009; Cseke et al., 2006).

Etarska ulja se sintetišu u specijalno razvijenim tkivima a zbog svoje izuzetne autotoksičnosti se čuvaju u posebnim strukturama (žlezdama, žlezdanim dlakama, smonim kanalima,...) (Cseke et al., 2006). Strukture za čuvanje etarskog ulja su strateški postavljene na biljci kako bi imale maksimalni učinak, na primer na površini organa u okviru žlezdanih dlaka ili u smonim kanalima listova i stabla. U zavisnosti od sastava, etarska ulja ispoljavaju različite fizičko-hemijske karakteristike, ali u osnovi su to viskozne nepolarne tečnosti, bezbojne, svetlo ili tamno obojene, manje specifične težine od vode (Langenheim, 1994). Količina etarskog ulja u jednoj biljci je relativno niska (najčešće je manja od 1%), a nije ni retko da se nalaze u izuzetno malim količinama (manje od 0,05%). Sastav etarskog ulja zavisi od taksona, iako može varirati u zavisnosti i od biljnog organa, ontogenetske faze, genetičkih i sredinskih faktora (Adams, 1970, 1994; Adams & Tashev, 2012; Adams et al., 2006a; Angioni et al., 2003; Cavaleiro et al., 2003; El-Sawi et al., 2008; Langenheim, 1994; Medini et al., 2009a; Powell & Adams, 1973; Tatro et al., 1973). Iako se u etarskom ulju sreću jedinjenja poput alifatičnih i aromatičnih ugljovodonika, fenilpropanoida i dr, glavni deo etarskog ulja čine terpeni.

**Terpeni** predstavljaju strukturalno najraznovrsniju grupu prirodnih proizvoda. Naziv terpenima dao je hemičar Kekule krajem XIX veka, na osnovu prvih jedinjenja koja su izolovana iz smole četinara (lat. *terebinth* - smola) (Baser & Buchbauer, 2009; Buchanan et al., 2009). Ova jedinjenja imaju jedinstvenu zajedničku karakteristiku pomoću koje se lako definišu i izdvajaju. Otto Wallach je 1887. postavio takozvano *izoprensko pravilo* prema kome su terpeni definisani kao jedinjenja koja u svojoj osnovi imaju ponavljajuću peto-ugljeničnu jedinicu (Buchanan et al., 2009; Cseke et al., 2006). Ovaj monomer terpena se naziva izoprenskom jedinicom ili izoprenom jer termička razgradnja većine terpena ima za proizvod gasoviti alken – izopren (Buchanan et al., 2009).

Terpeni se prema broju izoprenskih jedinica klasifikuju kao: hemiterpeni ( $C_5$ ), monoterpeni ( $C_{10}$ ), seskviterpeni ( $C_{15}$ ), diterpeni ( $C_{20}$ ), sesterterpeni ( $C_{25}$ ), triterpeni ( $C_{30}$ ), tetraterpeni ( $C_{40}$ ) i politerpeni ( $C_{45+}$ ) (Mazurek & Simoneit, 1997). U ovoj jednostavnoj klasifikaciji skrivena je ogromna strukturalna raznolikost koja doprinosi velikoj varijabilnosti terpenoidnih jedinjenja. Hemijske reakcije poput oksidacija, redukcija, izomerizacija i konjugacija dovode do promena u funkcionalnim grupama i osnovnom ugljovodničnom skeletu, što za posledicu ima veliki strukturalni diverzitet. Do sada je identifikovano preko 30.000 terpena (Bartram et al., 2006; Bohlmann et al., 1998a; Cordoba et al., 2009; Davis & Croteau, 2000; Phillips & Croteau, 1999; Phillips et al., 2006; Sacchettini & Poulter, 1997). Od terpena, u sastav etarskog ulja ulaze samo mono-, seskvi- i diterpeni (Slika 1.3.2), dok ostali terpeni nisu isparljivi i imaju drugačiju biološku ulogu.

**Monoterpeni** se sastoje iz dve izoprenske jedinice i imaju deset ugljenikovih atoma ( $C_{10}$ ). Prve monoterpene je izolovao francuski hemičar M. J. Dumas 1833. godine, ali tek je Otto Wallach shvatio da je nekoliko jedinjenja izolovanih iz različitih vrsta zapravo isto jedinjenje samo opisano pod drugačijim imenom. O. Wallach je sa kolegama krajem XIX veka (1872-1891) izolovao i okarakterisao nekoliko terpena (pinen, kamfen, limonen, felandren, terpinolen, fenhen...). U početku se smatralo da monoterpeni predstavljaju osnovne jedinice iz kojih su izvedeni drugi terpeni (Baser & Buchbauer, 2009; Buchanan et al., 2009). Ova jedinjenja predstavljaju najveći udeo u mnogim etarskim uljima, i kao takva, imaju veoma velik ekološki i ekonomski značaj. U odnosu na strukturu razlikujemo aciklične, monociklične i binociklične monoterpene.

**Seskviterpeni** ( $C_{15}$ ) se sastoje iz tri izoprenske jedinice, i mogu se naći u alifatičnom, bicikličnom i tricikličnom obliku. Poput monoterpena, većina seskviterpena su komponente etarskih ulja biljaka. Uz to, mnogi seskviterpeni se ponašaju kao fitoaleksini i antinutritivna jedinjenja. Interesantno je da, iako je apscisinska kiselina strukturalno seskviterpen, ona nastaje drugačije od većine seskviterpena, odnosno nesimetričnim cepanjem  $C_{40}$  prekursora (Buchanan et al., 2009; Cordoba et al., 2009; Cseke et al., 2006).

**Diterpeni** ( $C_{20}$ ) su raznolika grupa terpena koja se sastoji iz četiri izoprenske jedinice. Zbog visoke tačke ključanja, ulaze u sastav samo malog broja etarskih ulja. U diterpene spadaju i fitol, giberelini, smone kiseline četinara i mahunarki, fitoaleksini i drugi značajni metaboliti poput taksola (Buchanan et al., 2009).

### 1.3.2. Biološka uloga etarskih ulja

Funkcija terpena kod biljaka je i ekološka i fiziološka. Mnogi od njih inhibiraju rast drugih biljaka u bližem susedstvu (alelopatija). Neki su poznati kao insekticidi, drugi pak privlače oprašivače...

Da bi se u potpunosti razumela adaptivna funkcija etarskih ulja mora se razumeti cena proizvodnje, korist njihove produkcije, te njihova višestruka uloga (Thompson, 2005). Produkcija etarskih ulja zahteva upotrebu organski vezanog ugljenika, a različite strukture za čuvanje ovih smeša takođe zahtevaju energiju. Ovo izmeštanje resursa može se pokazati kao veoma značajan energetska trošak koji može dovesti do usporavanja rasta, što ukazuje na fundamentalan ekološki i evolucionarni značaj njihove produkcije (Langenheim, 1994; Thompson, 2005). Gershenzon (1993) smatra da je sinteza redukovanih terpena skuplja od oksigenisanih, što bi u neku ruku i objasnilo činjenicu da svi enzimi koji učestvuju u njihovoj sintezi kao finalni produkt imaju smešu mono- odnosno seskviterpena, a ne samo jedno jedinjenje.

Etarska ulja izolovana iz biljnih organa i celih biljaka, kao i jedinjenja izolovana iz etarskih ulja, su analizirani sa aspekta njihove funkcije u organizmu biljke. Monoterpeni su idealna jedinjenja za proučavanje sa aspekta uloge koju imaju u interakciji biljke sa biotičkim i abiotičkim faktorima spoljašnje sredine. Biosintetički put monoterpena je dosta dobro poznat, a oni pak mogu igrati višestruku ekološku ulogu usled različitog efekta na biološke procese u neposrednoj okolini (Thompson, 2005).

Sama uloga etarskog ulja određena je smešom komponenti koje ga čine. Ove složene smeše najčešće imaju 30-40 komponenti sa relativnim udelom većim od 1% (osim u retkim slučajevima gde jedna komponenta čini preko 50% sadržaja etarskog ulja, kao na primer kod citrusa (Espina et al., 2011)). Odnos ovih komponenti može značajno promeniti njegove karakteristike, kao i biološku aktivnost. Male promene u samom jedinjenju (npr. kariofilen/kariofilen oksid) mogu imati drastične promene u pogledu njihove aktivnosti (Arrhenius & Langenheim, 1983; Howard et al., 1989; Hubbell et al., 1983). Štaviše, strukturni izomeri jednog jedinjenja se mogu razlikovati u svojoj biološkoj aktivnosti, na primer (-)- $\alpha$ -pinen i (-)- $\beta$ -pinen enantiomeri nisu pokazali biološku aktivnost dok su (+)-enantiomeri pokazali jaku antimikrobnu aktivnost (Silva et al., 2012a).

### **Abiotički faktori**

Etarsko ulje može poboljšati toleranciju na sušu. Činjenica da se u Mediteranu (i sličnim klimatima) nalazi jako veliki broj predstavnika koji proizvode veliku količinu etarskog ulja govori u prilog ovoj tvrdnji. Ross & Sombrero (1991), kao i Joffre i saradnici (1999) su predložili da produkcija i akumulacija etarskih ulja može da ima ulogu da preusmeri višak sunčeve energije (kojom su izložene ove biljke tokom letnjih meseci) sa drugih enzimskih sistema koji bi mogli biti preopterećeni, poput fotosinteze. Istraživanja na putevima biosinteze terpena su pokazala da sunčeva svetlost stimuliše njihovu proizvodnju (Banerjee & Sharkey, 2014; Lewinsohn et al., 1993; Rodriguez-Concepcion, 2002). Etarsko ulje može povećati toleranciju biljke na visoke temperature i redukovati suvišan gubitak vode tako što će se naći “zarobljeno” između trihoma na površini lista i na taj način smanjiti transpiraciju (Audus & Cheetham, 1940) ili hladiti površinu biljnih organa svojim isparavanjem (Sharkey & Singsaas, 1995).

### **Biotički faktori**

Pored svega navedenog, najznačajnija uloga etarskih ulja je medijacija u biotičkim interakcijama. Mogu služiti u odbrani od insekata (Athanassiou et al., 2013; Croteau et al., 1987; Elango et al., 2012; Giatropoulos et al., 2012; Gijzen Mark et al., 1993; Mahmoudvand et al., 2011; Rattan & Sharma, 2011), ali i privlačenju odnosno selekciji oprašivača (Ackerman et al., 1997; Beker et al., 1989; Roy & Raguso, 1997; Williams et al., 1983). Pokazano je da pojedine komponente u etarskom ulju imaju značajnu ulogu i u odvrćanju herbivora (Adams et al., 2013a; Markó et al., 2008, 2011). Mehanizam delovanja još uvek nije dovoljno poznat, barem ne kada su u pitanju sve vrste kod kojih je utvrđen ovakav odnos. Osnova može biti različita, Langenheim (1994) kao moguće navodi inhibiciju formiranja ATP-a, građenje kompleksa sa slobodnim sterolima u gastrointestinalnom traktu biljojeda, uticaj na nervni sistem... Do sada je pokazano da seskviterpeni bazirani na skeletu bisabolena imitiraju juvenilne hormone insekata i na taj način ometaju njihov pravilan razvoj (Bohlmann et al., 1998b), dok s druge strane, pojedini terpeni privlače predatore ili parazite artropodnih

biljojeda, koji u tom slučaju indirektno štite biljku (Martin, 2004). Kod insekata, efekat odvracanja od ishrane je najverovatnije na nivou receptora, dok je kod sisara uticaj najčešće pripisan biheviornom odgovoru životinje na jak/oštar miris ili gorki ukus. Pored ovakvog efekta, izdvaja se i jedan poseban, gde insekti biraju jedinke koje upravo imaju određene terpena, kako bi ih akumulirali i koristili u odbrani od svojih predatora (Langenheim, 1994; Schuh & Benjamin, 1984) ili ih, pak, koristili kao prekursora u biosintezi drugih terpena koji imaju ulogu u komunikaciji sa ostalim jedinkama iste vrste (Phillips & Croteau, 1999).

Značajna je i uloga etarskih ulja u smanjenju kompeticije sprečavanjem klijanja ili razvoja drugih jedinki u neposrednoj blizini (Holthuijzen & Sharik, 1985; Katz et al., 1987; McPherson & Muller, 1967; Robles et al., 1999; Tarayre et al., 1995; Thompson, 2005; Vokou et al., 2003; Whittaker & Feeny, 1971). Ovo je posebno uočljivo u Mediteranu, gde se oko adultnih jedinki proučavanih vrsta nalazi zona u kojoj nema drugih biljaka. U tim slučajevima je pronađeno da se u zemljištu oko ispitanih individua nalazila izvesna količina etarskog ulja koje je tu dospelo najverovatnije oslobađanjem iz opalog lišća. Pored alelopatskog, etarska ulja imaju i autoalelopatsko dejstvo. Ovo je opaženo i kod *Juniperus monosperma*, gde je klijavost semena bila najveća na 3 m od odrasle jedinke, a u samom podnožju je bila i do 10 puta manja (Holthuijzen & Sharik, 1985). Kod biljka sušnih ekosistema, etarska ulja imaju ulogu u određivanju optimalnog perioda za klijanje semena (Margaris & Vokou, 1982; Thanos et al., 1995). Naime, semena ostaju neaktivna dok ne padne dovoljna količina vode koja će da spere etarsko ulje, ili dok se ne desi požar koji će da omogući klijanje.

I konačno, etarska ulja deluju kao svojevrsni “imuni sistem” same biljke, čuvajući je od različitih patogena – od virusa, preko bakterija do gljivica (Cavaleiro et al., 2006; El-Sawi et al., 2008; Milojević et al., 2010; Seca & Silva, 2006; Tabanca et al., 2007; Unlu et al., 2008).

### 1.3.3. Biosinteza terpena

Početakom XX veka, O. Wallach je formulisao »izoprensko pravilo« koje postulira da se većina terpena može dobiti repetitivnim spajanjem izoprenskih jedinica. Iako netačan, ovaj koncept je obezbedio konceptualni okvir za strukturalna istraživanja terpena. Leopold Ruzicka je kasnije formulisao »biogenetičko izoprensko pravilo« naglašavajući mehanicističke aspekte sinteze terpena (Buchanan et al., 2009).

Biosinteza svih terpena iz jednostavnih prekursora se može podeliti na četiri opšta koraka:

- (1) biosinteza fundamentalnog prekursora IPP (izopentenil difosfat),
- (2) repetitivno dodavanje IPP kako bi se formirali prenil difosfatni homolozi (koji služe kao neposredni prekursori različitih klasa terpenoida),
- (3) obrada ovih prenil difosfata od strane specifičnih terpen-sintaza do terpenoidnog skeleta,
- (4) sekundarne enzimatske modifikacije skeleta (uglavnom redoks reakcije) koje dodaju funkcionalne grupe i doprinose velikom hemijskom diverzitetu (Bohlmann et al., 2000; Buchanan et al., 2009).

## (1) Biosinteza IPP

Iako se biosinteza svih terpena dešava u specijalizovanim ćelijama, postoji jasna organizacija i na subćelijskom nivou. Monoterpeni ( $C_{10}$ ), diterpeni ( $C_{20}$ ) i tetraterpeni ( $C_{40}$ ), kao i određeni kinoni se proizvode isključivo u plastidima, dok se seskviterpeni ( $C_{15}$ ), triterpeni ( $C_{30}$ ) i politerpeni ( $C_{45+}$ ) proizvode u citosolu i endoplazmatičnom retikulumu (Banerjee & Sharkey, 2014; Bartram et al., 2006; Bohlmann et al., 2000; Cordoba et al., 2009; Phillips et al., 2006; Zulak & Bohlmann, 2010). Čak su i prekursori za ove biosintetske puteve odvojeni. Mevalonatni put (MVA) je aktivan u citosolu i ER, dok se u plastidima koristi metileritrol-fosfatni put (MEP) (Bick & Lange, 2003; Bohlmann et al., 2000; Buchanan et al., 2009; Cordoba et al., 2009; Eisenreich et al., 2004; Rodriguez-Concepcion, 2002). Iako postoji jasna kompartmentalizacija ovih procesa, razmena intermedijera (IPP i prenil difosfata) ipak postoji. U biosintezi seskviterpena kod kamilice (*Matricaria recutita*) pokazano je da izvestan broj seskviterpena sadrži molekule koji su bili sintetisani u hloroplastima (Adam & Zapp, 1998). Protok intermedijera između citosola i plastida Bartram i saradnici (2006) su pokazali na primeru indukovane biosinteze mono- i seskviterpena kod *Phaseolus lunatus*. Čak i kada su blokirali MVA put, dolazilo je do indukovane biosinteze seskviterpena u citosolu. IPP za njihovu sintezu obezbedio je MEP preko  $Ca^{2+}$  zavisne pumpe koja prebacuje IPP i prenil difosfate iz plastida u citosol. S druge strane, istraživanja su pokazala da je udeo deuterijum-obebeženog IPP nastalog kroz MVA put uvek manji od 20%, što govori da iako nije dominantan, ipak jedan deo IPP u biosintezi monoterpena potiče iz MVA puta. Za razliku od životinja i gljiva kojima je dostupan samo MVA biosintetski put, biljke koriste oba. Štaviše, pokazano je da u slučaju »otkazivanja« jednog biosintetskog puta, biljke preusmeravaju biosintezu na drugi (Adam & Zapp, 1998; Bartram et al., 2006; Bick & Lange, 2003). Iz svih navedenih razloga, bitno je upoznati oba puta biosinteze IPP prekursora (Slika 1.3.1).

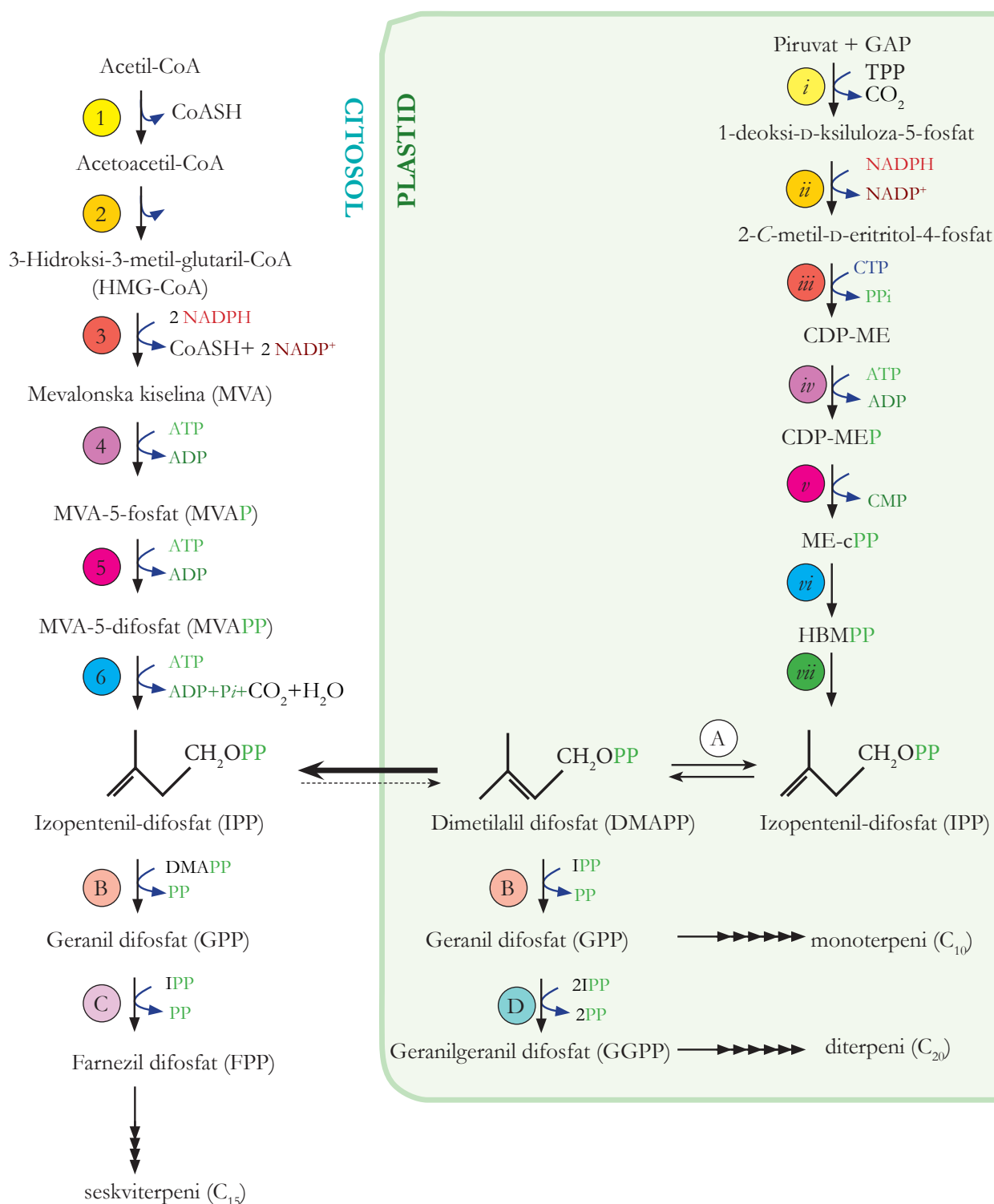


### **i. Mevalonatni put (MVA) biosinteze IPP (biosinteza u citosolu)**

Ovaj put biosinteze IPP uključuje nekoliko reakcija: (a) kondenzaciju tri molekula acetil-CoA u dva koraka uz pomoć enzima tiolaze i hidrosimetil-glutaril-CoA sintaze, (b) redukciju dobijenog 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA pomoću enzima HMG-CoA reduktaze u dve spojene reakcije koja za proizvod ima mevalonsku kiselinu (MVA), i (c) ATP zavisna fosforilacija i fosforilacija/dekarboksilacija mevalonske kiseline do IPP (Buchanan et al., 2009) (Slika 1.3.1)

### **ii. Metileritrolfosfatni put (MEP) biosinteze IPP (biosinteza u plastidima)**

Kada je prvi put otkriven pre 15-ak godina nazvan je nemevalonatni ili Rohmer-ov put (Rodriguez-Concepcion, 2002). Naziva se još i 1-deoksi-D-ksilulozni put ili DXO, pošto je jedan od početnih intermedijera ovog puta DXO. Shodno terminologiji korišćenoj za MVA put, 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat intermedijer je analog mevalonskoj kiselinu, pa se i sam put biosinteze naziva po njemu – MEP. Ovaj put biosinteze je pokazan kod mnogih zelenih algi, eubakterija i biljaka (Slika 1.3.1). Sastoji se iz sedam enzimatskih koraka: (a) biosinteza 1-deoksi-D-ksilulozo-5-fosfata (DXP) iz piruvata i gliceraldehid-3-fosfata (GAP) uz pomoć enzima DXP sintaze (DXS), (b) DXP reduktoizomeraza (DXR) kovertuje DXP u metil-D-eritritol-4-fosfat (MEP), (c) koji u se u tri uzastopne enzimatske reakcije transformiše u ciklodifosfatni intermedijer MeCDP, (d) enzim HMBPP sintaze (HDS) u narednom koraku konvertuje MeCDP u hidrosimetilbutenil difosfat (HMBPP), (e) da bi u poslednjem koraku HDR (HMBPP reduktaza) dala IPP (Banerjee & Sharkey, 2014; Bartram et al., 2006; Cordoba et al., 2009; Eisenreich et al., 2004; Phillips et al., 2006; Rodriguez-Concepcion, 2002; Zulak & Bohlmann, 2010).

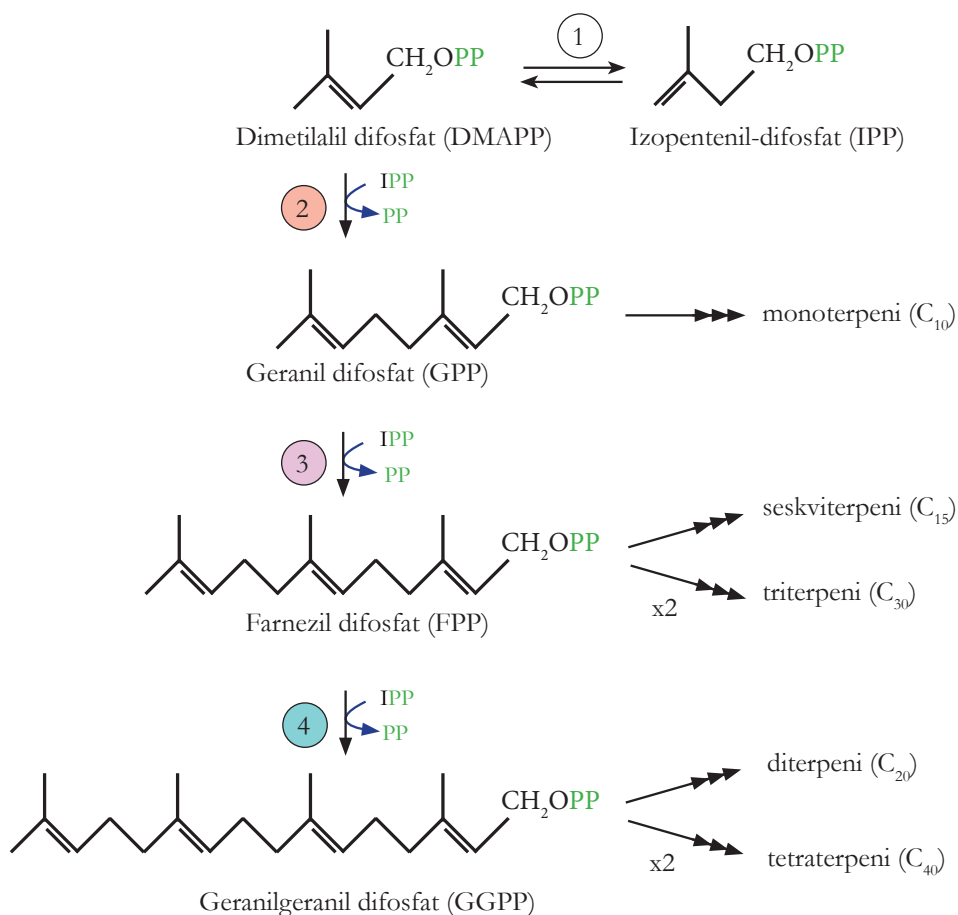


**Slika 1.3.1.** Biosinteza prekursora terpena u biljnoj ćeliji: (a) MVA: **1** - tiolaza, **2** - HMG-CoA sintaza, **3** - HMG-CoA reduktaza, **4** - MVA kinaza, **5** - MVAP kinaza, **6** - MVAPP dekarboksilaza; (b) MEP: *i* - DX sintaza (DXS), *ii* - DX reduktioizomeraza (DXR), *iii* - CDP-ME sintaza (MCT), *iv* - CDP-ME kinaza (CMK), *v* - MEcPP sintaza (MDS), *vi* - HMBPP sintaza (HDS), *vii* - HMBPP reduktaza (HDR); **A** - IPP izomeraza, **B** - GPP sintaza, **C** - FPP sintaza, **D** - GGPP sintaza

## (2) Formiranje prenil-difosfatnih homologa

Osnovni monomer u sintezi terpena je IPP. Polimerizacija IPP dovodi do nastanka prenil difosfatnih homologa koji služe kao intermedijerni prekursori za sintezu različitih klasa terpena (mono-, seskvi-, diterpena...) (Slika 1.3.1).

Prvi korak je izomerizacija IPP uz pomoć enzima **IPP-izomeraze**. Proizvod ove reakcije je dimetilalil difosfat (DMAPP). Zahvaljujući duploj vezi u DMAPP i prenil difosfatima, ova jedinjenja mogu da se jonizuju i stvore stabilne karbokacije. Tako formiran karbokation od  $n$  ugljenika može potom da prođe reakciju kondenzacije sa IPP i formira  $n+5$  terpen. Sintezu  $C_{10}$ ,  $C_{15}$  i  $C_{20}$  prenil-difosfata katalizuju **prenil transferaze**. Proizvodi ovih enzima su geranil difosfat (GPP,  $C_{10}$ ), farnezil difosfat (FPP,  $C_{15}$ ) i geranilgeranil difosfat (GGPP,  $C_{20}$ ) (Buchanan et al., 2009) (Slika 1.3.2).



**Slika 1.3.2.** Biosinteza prenil difosfata iz IPP i DMAPP u biljnoj ćeliji: **1-** IPP izomeraza, **2-** GPP sintaza, **3-** FPP sintaza, **4-** GGPP sintaza

### (3) Formiranje terpena

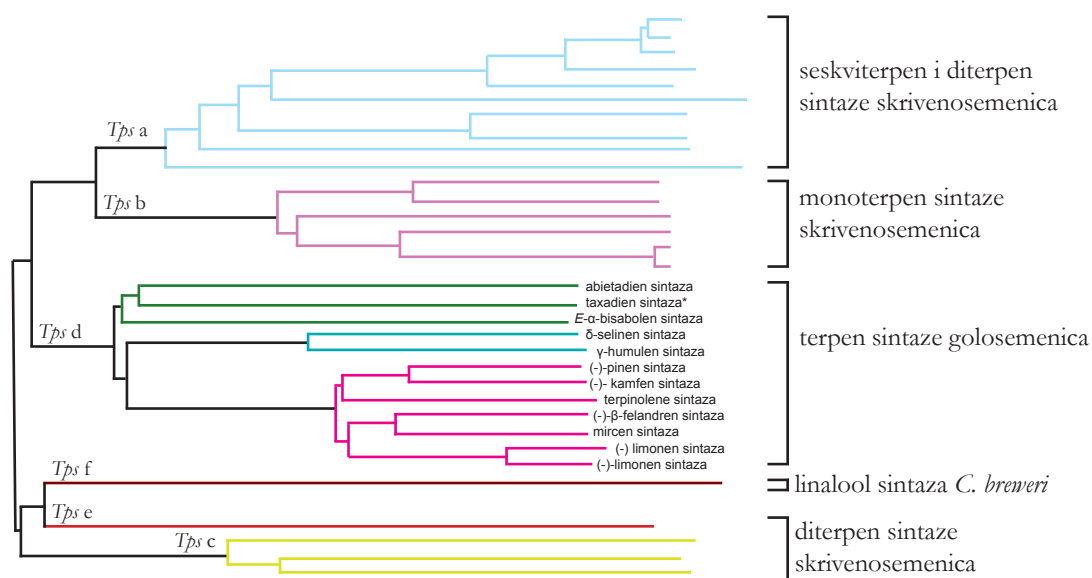
Reakcije kroz koje prolaze prenil difosfati (najčešće ciklizacije), a koje katalizuju sintaze terpena, produkuju veliki broj terpenoidnih jedinjenja. Enzimi prenil difosfataze i terpen sintaze (TPS) dele slična svojstva i sadrže konzervativne sekvence, pogotovu u regionima koji kodiraju mesta za vezivanje supstrata (Buchanan et al., 2009). Do sada su poznate sekvence za jedan broj mono-, seskvi- i diterpena. Na osnovu same sekvence nije moguće predvideti tačno proizvod enzima s obzirom na to da su razlike u njima izuzetno male (Zulak & Bohlmann, 2010). Tako, zamena samo jedne aminokiseline (arginina sa izoleucinom) u 1,8-cineol sintazi dolazi do promene glavnog proizvoda u sabinen, dok promena u tri aminokiseline na ključnom mestu dovodi do toga da enzim koji je sintetisao sabinen počne da sintetiše 3-karen. Svega 9% razlike u sekvenci aminokiselina je dovoljno da (-)-limonen sintaza “postane” drugi enzim - (-)-limonen/(-)- $\alpha$ -pinena sintaza koja uz (-)-limonen sintetiše i značajne količine (-)- $\alpha$ -pinena (Kampranis et al., 2007; Katoh et al., 2004; Roach et al., 2014).

Familije enzima odgovornih za sintezu terpena iz GPP, FPP i GGPP su poznate kao **monoterpen-, seskviterpen- i diterpensintaze**. Ove sintaze koriste odgovarajuće prenil difosfate kao supstrat za formiranje velikog broja različitih terpena. Većina terpena su ciklična, a mnoga sadrže multipne prstenove u sistemu, čiju osnovnu strukturu determinišu visoko specifične sintaze. Terpen sintaze koje produkuju ciklične proizvode se takođe nazivaju i ciklazama, iako postoje primeri onih koje proizvode aciklična jedinjenja (Buchanan et al., 2009). Sve TPS su sličnih svojstava (molekularna težina, potreba za kofaktorima i kinetički parametri) i sve obavljaju slične elektrofilne ciklizacije (koje uključuju iste korake poput stvaranja, modifikovanja i stabilizacije visokoreaktivnog karbokationa) i finalnim korakom deprotonacije ili zarobljavanja nukleofila (Bohlmann et al., 2000). Ova sličnost u funkciji ogleda se i u sličnosti u strukturi svih TPS izolovanih iz biljaka (Bohlmann et al., 1998a).

Dosadašnja istraživanja su pokazala da su se monoterpen sintaze pojavljivale više puta tokom evolucije biljaka. Na primer, limonen sintaza se javila nezavisno kod skrivenosemenica i golosemenica (Bohlmann et al., 1998a), Štaviše, dosadašnji radovi na golosemenicama su pokazali da se limonen-sintaza javila više puta nezavisno i unutar samih golosemenica (Martin, 2004). Zanimljivo je da sekvence TPS između golosemenica i skrivenosemenica pokazuju

svega 30-ak posto homologije, i da su razlike unutar golosemenica, čije su se familije odvojile pre više stotina miliona godina, manje nego razlike između porodica skrivenosemenica. Stopa mutacija ovih sintaza odgovara evoluciji 18S rRNK kod golosemenica (Bohlmann et al., 1998a). Sekvence amino-kiselina kod biljnih TPS su omogućile podjelu *Tps* genske porodice na 7 potporodica (Slika 1.3.4). Zanimljivo je da su terpen sintaze primarnog metabolizma (biosinteza prekursora biljnih hormona i pigmenata) filogenetski jako udaljene od terpen sintaza sekundarnog, i da se ovo odvajanje desilo pre odvajanja skrivenosemenica od golosemenica (Bohlmann et al., 1998a; Keeling & Bohlmann, 2006). ***Tps***-d potporodica se sastoji samo od TPS izolovanih iz golosemenica. Novija istraživanja su potvrdila ranije nalaze i pokazala da se ova grupa može podeliti na tri podgrupe – *Tps*-d1 (primarno monoterpen sintaze), *Tps*-d2 (primarno seskviterpen sintaze) i *Tps*-d3 (primarno diterpen sintaze) (Martin, 2004). Zanimljivo je da se seskviterpen sintaze javljaju u sve tri grupe, ukazujući na to da su evoluirale nezavisno više puta.

Za razliku od (-)-CDP sintaze (TPS primarnog metabolizma), čiji gen postoji samo u jednoj kopiji, mnoge TPS sekundarnog metabolizma su kodirane sa više kopija gena. Ovo umnožavanje *Tps* gena je omogućilo veliku diverzifikaciju unutar *Tps* porodice. Tako, u *Abies grandis* bar sedam veoma sličnih gena (65% i više sličnih sekvenci aminokiselina) kodiraju monoterpen sintaze koje sintetišu različite monoterpene (Bohlmann et al., 1998a).



**Slika 1.3.3.** Filogenetski odnosi terpen sintaza. Sve sintaze terpena kod golosemenica su iz *Abies grandis*, osim taxadien sintaze koja je izolovana iz *Taxus brevifolia* (\*). Linalool sintaza je izolovana iz cveta *Clarkia breweri*. Terpen sintaze koje pripadaju *Tps* e i *Tps* c kladama sintetišu prekursore primarnog metabolizma. (Prilagođeno prema Bohlmann et al., 1998a)

## Monoterpen sintaze

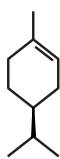
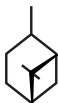

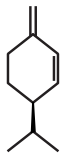

Veliki broj različitih monoterpen sintaza (MTS) je izolovan iz golosemenica i skrivenosemenica. Svi ovi enzimi pored sličnog mehanizma delovanja se odlikuju i drugim zajedničkim karakteristikama: molekulska masa je u opsegu od 50 do 100 kDa, zahtevaju dvovalentni metalni jon (i monovalentni kod četinara), gotovo neutralnu pH a proizvode smeše monoterpena (Bohlmann et al., 1998a). Kako se sinteza monoterpena odigrava u plastidima, a MTS su kodirane nuklearnim genima, svi ovi enzimi imaju tranzitni peptid na N-kraju koji omogućava transport u plastide (Davis & Croteau, 2000).

Reakcija sinteze monoterpena započinje jonizacijom GPP uz pomoć dvovalentnog jona metala kao kofaktora:  $Mn^{2+}$  kod četinara, dok je kod skrivenosemenica to najčešće  $Mg^{2+}$  (Bohlmann et al., 2000). Dvovalentni jon metala je neophodan za neutralizaciju negativnog naelektrisanja difosfata kako bi došlo do izomerizacije. Zanimljivo je da monoterpen sintaze kod četinara za razliku od onih kod skrivenosemenica, zahtevaju i prisustvo  $K^+$  za aktivaciju enzima i gotovo neutralnu pH (Bohlmann et al., 1997, 2000). Smatra se da monovalentni i dvovalentni jon direktno učestvuju u stabilizaciji fosfatnih grupa supstrata, što ukazuje na fundamentalnu razliku funkcionisanja MTS kod golosemenica u odnosu na skrivenosemenice (Bohlmann et al., 1997). Početna jonizacija je praćena vraćanjem difosfata ( $PP_i$ ) i izomerizacijom kako bi se formirao enzimski vezan intermedijer – linalil difosfat (LPP). U zavisnosti od monoterpen sintaze, formiraće se (3*R*)-LPP ili (3*S*)-LPP izomer, tako da je stereohemija finalnog proizvoda određena već u ovom koraku. Nakon rotacije oko C2-C3 (formiranje *cis* konformera), LPP prolazi kroz sekundarnu jonizaciju uklanjanjem difosfatne grupe, praćenu anti, endo-ciklizacijom u (4*R*)- odnosno (4*S*)- $\alpha$ -terpinil katjon, prvi ciklični intermedijer. Aciklični monoterpen (mircen) može nastati deprotonacijom bilo koja od dva prva karbokatjona. Ova izomerizacija je neophodna jer GPP ne može da ciklizuje direktno zbog prisustva duplih veza.  $\alpha$ -Terpinil katjon dalje prolazi kroz dodatne elektrofilne ciklizacije, pomeranje vodonika ili druge rearanžmane, pre nego što se reakcija završi deprotonacijom karbokatjona ili zarobljavanjem nukleofila (npr. vode). Varijacije ove jednostavne šeme, uključujući potonje reakcije  $\alpha$ -terpinil karbokatjona, su odgovorne za enzimatsku sintezu većine monoterpenskih skeleta (Bohlmann et al., 2000; Buchanan et al., 2009; Croteau et al., 1988; Gambliel & Croteau, 1984).

Deprotonacija  $\alpha$ -terpinil katjona daje monociklične monoterpene (limonen, terpinolen). Ako se nakon ovog koraka desi pomeranje vodoničnih veza u 1,3- ili 1,2-položaj mogu nastati drugi monociklični ( $\beta$ -felandren) ili biciklični (sabinen) terpeni. Dodatne elektrofilne ciklizacije  $\alpha$ -terpinil katjona, preko preostale duple veze daje biciklične kabokatjon intermedijere koje će kao finalne proizvode dati biciklične monoterpene poput 3-karena, kamfena,  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinena. (Bohlmann et al., 2000; Croteau et al., 1988; Gambliel & Croteau, 1984) (Slika 1.3.4).

Monoterpen sintaze su proučavane i sa aspekta pronalaženja aktivnih mesta za vezivanje supstrata. Zanimljivo je da su kod četinara identifikovani samo arginin i cistein kao aminokiseline ključne za vezivanje supstrata, dok su kod skrivenosemenica to histidin i cistein. Istraživanja na mutantnim limonen sintazama upućuju da je His<sup>459</sup> zadužen za dalje transformacije  $\alpha$ -terpinil katjona i nastanak izvedenijih monoterpena, dok Leu na ovoj poziciji formira nedovoljno stabilni karbokation koji vrlo brzo gubi proton i daje kao proizvod jednostavnije terpene poput limonena (Kato et al., 2004). Inhibicija ciklaza difosfatnim analogima je pokazala tri glavne osobine koje supstrat mora posedovati da bi ga vezala odgovarajuća MTS: (1) stanje jonizacije na pH u kome je enzimatska reakcija optimalna, (2) strukturna fleksibilnost difosfata i (3) mogućnost vezivanja dvovalentnog metalnog jona (Davis & Croteau, 2000). Sve monoterpen sintaze su u stanju da katalizuju i izomerizaciju i ciklizaciju (Bohlmann et al., 1998a).

**Tabela 1.3.1.** Distribucija proizvoda nekoliko monoterpen sintaza izolovanih iz golosemenica (Podaci preuzeti iz Bohlmann et al., 1999, Kato et al., 2004, Roach et al., 2014).

MTS*	Monoterpen (%)				
					
	(-)-Limonen	(-)- $\alpha$ -Pinen	(-)- $\beta$ -Pinen	(-)- $\beta$ -Felandren	(-)-Sabinen
LS	72	4	12	11	1
LPS	35	24	11	20	10
PS	-	42	58	-	-
FS	6	9	34	52	-
SS	<1	5	2	3	45

\***MTS** - Monoterpen sintaza, **LS** - (-)-Limonen sintaza, **LPS** - (-)-Limonen/(-)- $\alpha$ -pinen sintaza, **PS** - (-)-Pinen-sintaza, **FS** - (-)- $\beta$ -Felandren-sintaza, **SS** - (-)-Sabinen sintaza

Mnoge MTS biosintetišu multipne produkte (aciklične, monociklične i biciklične) varijacijama u bazičnom mehanizmu. Tako, na primer, (-)-limonen sintaza proizvodi male količine mircena,  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinena, dok (-)-pinen sintaza kod *Abies grandis* sintetisuje (-)- $\beta$ - (60%) i (-)- $\alpha$ -pinen (40%) (Banthorpe & Le Patourel, 1972; Bohlmann et al., 1997; Colby et al., 1993; Gambliel & Croteau, 1984; Lewinsohn et al., 1992) (Tabela 1.3.1). Zanimljivo je da od taksona, odnos sintetisanih komponenti može drastično da varira, pa tako, (-)-pinen sintaza kod *Picea sitchensis* sintetisuje čak 78% (-)- $\alpha$ -pinena, i tek 22% (-)- $\beta$ -pinena, dok se kod *Pinus taeda* sintetisuje isključivo (-)- $\alpha$ -pinen (McKay, 2003; Phillips et al., 1999).

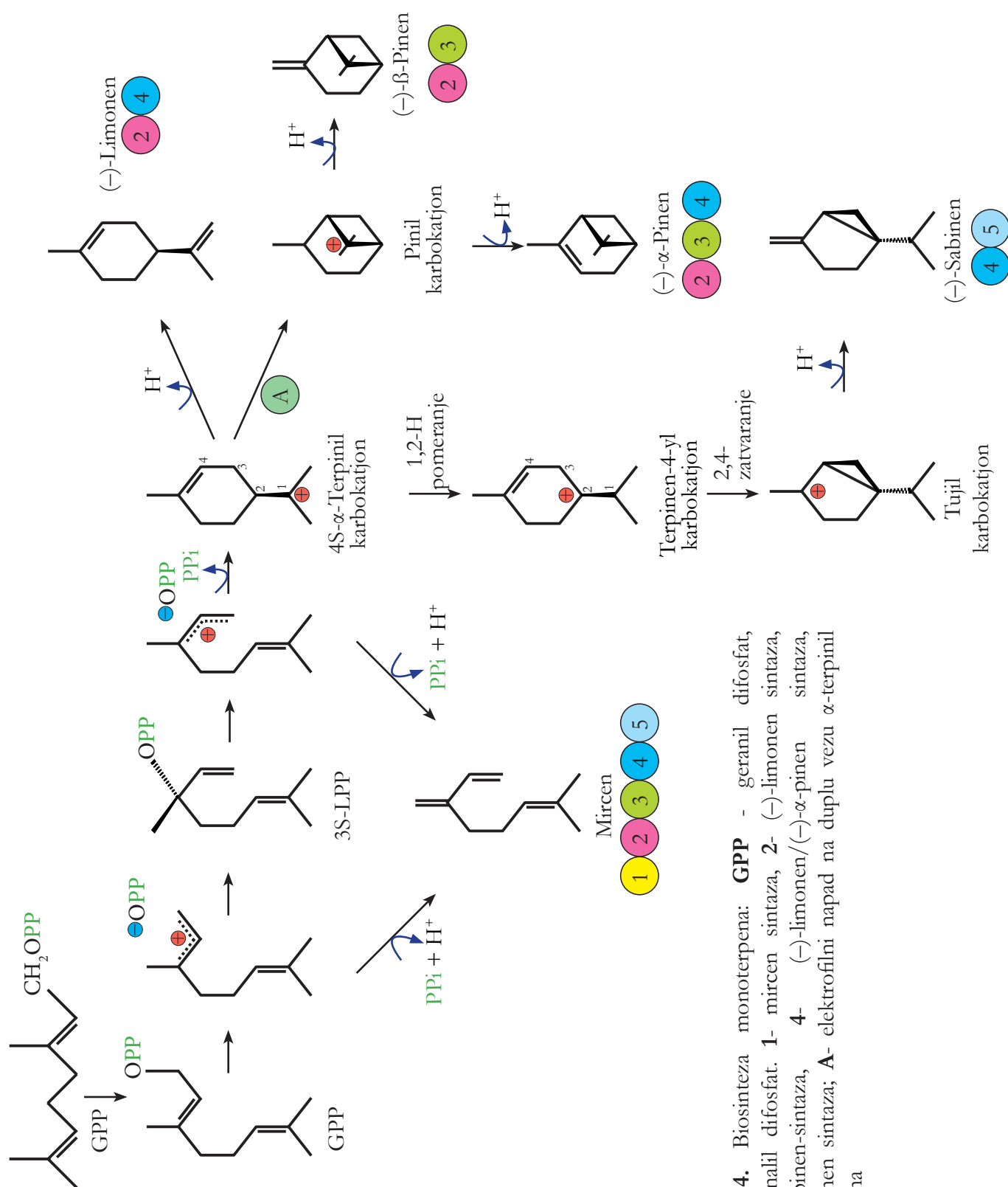
$\alpha$ - i  $\beta$ -Pinen su najčešće komponente etarskih ulja (Gambliel & Croteau, 1982). Dok se  $\alpha$ -pinen može javiti u oba optička stanja (+)- i (-)- $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen se javlja gotovo isključivo kao (-)- enantiomer (Gambliel & Croteau, 1982). Identifikovane su dve pinen-sintaze: **pinen-ciklaza I** i **pinen-ciklaza II**. Osnovna razlika je u stereochemiji dobijenih proizvoda. Pinen-ciklaza I ima za proizvod (+)- $\alpha$ -pinen, (+)-kamfen i (+)-limonen, dok pinen-ciklaza II daje (-)- $\alpha$ -pinen, (-)- $\beta$ -pinen, (-)-kamfen, (-)-limonen i mircen (Gambliel & Croteau, 1984).  $\alpha$ -Pinen nastaje gubitkom protona H<sup>6</sup>, dok  $\beta$ -pinen nastaje gubitkom protona H<sup>7</sup> (Dewick, 1995) (Slika 1.3.4)  $\alpha$ -Pinen je prekursor za biosintezu verbenola i verbenona, dva terpena koja igraju važnu ulogu u interakciji četinara sa insektima potkornjacima (Phillips & Croteau, 1999).

**Limonen sintaze** ( (+)- i (-)-limonen sintaza) uklanjaju proton iz iste metil grupe (4R)- odnosno (4S)- $\alpha$ -terpinil katjona, formirajući metilensku grupu limonena (Slika 1.3.4) Proizvod limonen sintaze kod *Mentha spicata* je 95% limonen i otprilike jednake količine mircena,  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinena. Zapravo, u oko 4% slučajeva  $\alpha$ -terpinil katjon se transformiše u pinil katjon koji ima 50% šanse da se transformiše u  $\alpha$ - odnosno  $\beta$ -pinen, a u oko 2% slučajeva GPP ili LPP ne uspeavaju da se ciklizuju i njihova deprotonacija dovodi do formiranja mircena (Davis & Croteau, 2000). Kod *Picea abies*, (-)-limonen sintaza daje 88% (-)-limonena, 5% mircena, 4% (-)- $\alpha$ -pinena, 2% (+)-limonena i manje od 1% (-)- $\beta$ -pinena. Slično je i kod *Abies grandis*, dok kod *Picea sitchensis* (-)-limonen sintaza daje isključivo (-)-limonen (Martin, 2004). Limonen je prekursor za niz drugih monoterpena, poput mentola, piperitona ili karvola (Buchanan et al., 2009; Dewick, 1995).



**(-)-Limonen/(-)- $\alpha$ -pinen sintaza** je enzim otkriven kod *Abies grandis*. U početku se smatralo da je gen koji kodira ovaj enzim alel gena za (-)-limonen sintazu, međutim, detaljnije proučavanje ovog enzima i njegovih produkata je pokazalo da iako postoji 91% preklapanja u sekvenci aminokiselina, odnos proizvoda je drastično različit. Dok (-)-limonen sintaza proizvodi gotovo isključivo(-)-limonen (najmanje 72%), ovaj enzim sintetizira 35% limonena, 24% (-)- $\alpha$ -pinena, 20% (-)- $\beta$ -felandrena i 10% sabinena kao glavne proizvode. Osnovna razlika između ova dva enzima, koja se pokazala odgovornom za smanjenje produkcije limonena u korist pinena i felandrena je u zamjeni Leu<sup>459</sup> sa His<sup>459</sup> (Bohlmann et al., 1999; Katoh et al., 2004).

**Sabinen sintaza** je do sada izolovana iz žalfije (*Salvia officinalis*) i smrče (*Picea sitchensis*) (Peters & Croteau, 2003; Roach et al., 2014; Wise et al., 1998). Proizvod ovog enzima je mešavina monoterpena i to (kod *Picea sitchensis*): 45% sabinena, 36%  $\alpha$ -terpinolena, 5%  $\alpha$ -pinena i po nekoliko procenata  $\beta$ -felandrena,  $\beta$ -pinena, limonena i drugih. Glavni proizvodi sabinen sintaze (sabinen) nastaje iz  $\alpha$ -terpinil karbokatjona 1,2-hidridnim pomeranjem (Slika 1.3.4) (Roach et al., 2014; Wise et al., 1998).



**Slika 1.3.4.** Biosinteza monoterpena: **GPP** - geranil difosfat, **LPP** - linalil difosfat. **1**- mircen sintaza, **2**- (-)-limonen sintaza, **3**- (-)-pinen-sintaza, **4**- (-)-limonen/(-)- $\alpha$ -pinen sintaza, **5**- (-)-sabinen sintaza; **A**- elektrofilni napad na duplu vezu  $\alpha$ -terpinil karbokatjona

## Seskviterpen sintaze

Mehanizam formiranja seskviterpena iz FPP je sličan sintezi monoterpena, iako povećana fleksibilnost  $C_{15}$  intermedijera eliminiše potrebu za početnom izomerizacijom i formiranja jedinjenja 3R- ili 3S-nerolidol difosfata (analog LPP). Nakon inicijalne izomerizacije dolazi do jonizacije i ciklizacije. Dodatna  $C_5$  jedinica i dupla veza FPP takođe dozvoljava formiranje ne samo 10- i 11-članih prstenova, već i daleko većeg broja strukturno različitih seskviterpena u odnosu na monoterpene. Osnovni mehanizmi MTS koriste i STS, s tim se da tokom biosinteze seskviterpena formira daleko veći broj početnih intermedijarnih karbokatjona (farnezil, nerolidil, germakradienil, humulil, bisabolil, cikloheptenil, eudezmanil katjon...) (Degenhardt et al., 2009). Jedna od glavnih posledica postojanja velikog broja intermedijarnih karbokatjona, pored mogućnosti biosinteze daleko većeg broja različitih seskviterpena, je i mogućnost biosinteze istog seskviterpena kroz nekoliko različitih mehanizama. Okarakteristan je veliki broj različitih seskviterpen sintaza (STS). Pojedine sintaze izolovane iz četinara su u stanju da proizvedu i do 52 različita seskviterpena, dok druge (pogotovu one koje su vezane za odgovor biljke na napad insekata poput (*E*)- $\alpha$ -bisabolen i  $\delta$ -cadinen sintaze) sintetišu isključivo po jedan proizvod (Buchanan et al., 2009; Phillips & Croteau, 1999).

Seskviterpen sintaze predstavljaju prilično zanimljivu grupu TPS. Naime, parcijalnom ekspresijom gena za MTS, pre svega odstranjivanjem polipeptida sa N-kraja proteina, uzrokuje zadržavanje ovih monoterpen sintaza unutar citosola, gde se susreću samo sa FPP. Iako se kod nekih vrsta biosinteza seskviterpena oslanja (makar u normalnim uslovima) isključivo na MVA put (*Ricciocarpos natans*, (Wurzel & Becker, 1990)), kod drugih pak dolazi do "pozajmljivanja" IPP/DMAPP prekursora iz MEP biosintetskog puta (*Matricaria recutita*, (Adam & Zapp, 1998)). Filogenetska analiza sekvenci STS ukazuje na grupisanje i sa diterpen sintazama ali i sa monoterpen sintazama. Tako je enzim za sintezu seskviterpena farnezena najverovatnije nastao iz gena za MTS kod golo- i skrivenosemenica (Martin, 2004). Slično MTS, tri STS su evoluirala nekoliko puta nezavisno kod četinara iz mono- i diterpen sintaza. (*E*)- $\alpha$ -bisabolen sintaza i (*E,E*)- $\alpha$ -farnezen sintaza su nastale gubitkom tranzitnog peptida na N-kraju proteina i specijalizacijom za FPP (Martin, 2004).

## Diterpen sintaze

Diterpen sintaze (DTS) koriste dva različita tipa enzimatskih reakcija ciklizacije da bi transformisale GGPP u diterpene. Prva ciklizacija podseća na ciklizaciju koju vrše MTS i STS – jonizacija difosfatnog supstrata i elektrofilni napad karbokatjona na jednu od duplih veza unutar GGPP (Buchanan et al., 2009).

Drugi tip ciklizacije se dešava drugačije. Naime, u ovoj ciklizaciji dolazi do protonacije duple veze i stvaranje prvog karbokatjona, koji se ciklizuje u biciklični intermedijer. Jonizacija difosfatnog estera promoviše drugu ciklizaciju kako bi se dobio triciklični proizvod (Buchanan et al., 2009).

Najviše izučavane diterpen sintaze četinara su abietadien sintaza iz *Abies grandis* (Bohlmann et al., 1997; Peters et al., 2000; Ravn et al., 2000; Wildung, 1996, 1996), odgovorna za sintezu abietadiena koji je jedan od najvažnijih komponenti smola, kao i taksadien sintaza iz različitih vrsta roda *Taxus* (Croteau et al., 2006; Hezari et al., 1997; Kai et al., 2005; Laskaris et al., 1999; Williams et al., 2000; Zamir et al., 1992a, 1992b), koja sintetisuje taksol, jedan od komercijalno najznačajnijih diterpena u tretmanu kancera.

#### (4) Obrada terpenskog skeleta

Velikoj raznovrsnosti terpena izolovanih iz biljaka doprinose zapravo modifikacije osnovnog skeleta kojeg su produkovale terpenoid sintaze. Ove sekundarne transformacije najčešće uključuju oksidacije, redukcije, izomerizacije i konjugacije koje menjaju funkcionalne grupe na osnovnom skeletu. Mnoge hidroksilacije ili epoksidacije uključene u uvođenje atoma kiseonika u terpenoidni skelet obavlja citohrom P450 oksidaze (Buchanan et al., 2009).

Citohrom P450 monooksidaze (CYP450) su izuzetno značajne za diverzifikaciju terpena kroz oksidaciju. Ovi proteini predstavljaju veliku klasu enzima koje koriste NAD(P)H kako bi oksidovali terpen. Do sada je identifikovan veliki broj CYP450 gena, preko 90 kod *Pinus taeda* (Keeling & Bohlmann, 2006). Kod četinarara, citohrom P450 oksidaze su odgovorne za oksidaciju abietadiena do abietadienola i drugih oksigenisanih jedinjenja, koje čine glavne diterpenske komponente smole (Zulak & Bohlmann, 2010).

### 1.3.4. Kontrola biosinteze monoterpena

Biosinteza terpena je kompartmentalizovana u ćeliji. Dok se monoterpeni i diterpeni sintetišu u plastidima preko MEP biosintetskog puta, seskviterpeni se sintetišu u citosolu preko MVA puta. Međutim, geni koji kodiraju enzime oba enzimatika puta, kao i prenil-difosfat sintaze i TPS se nalaze u okviru jedarnog genoma (Banerjee & Sharkey, 2014; Bartram et al., 2006; Bohlmann et al., 2000; Cordoba et al., 2009; Phillips et al., 2006; Zulak & Bohlmann, 2010). Terpeni se sintetišu i čuvaju u posebnim strukturama, metabolički su skupi produkti i od velikog značaja za samu biljku, te je i kontrola njihove biosinteze od izuzetnog značaja. Kontrola biosinteze se vrši na više različitih mesta.

**Regulacija MVA.** HMG-CoA reduktaza je jedan od najkonzerviranijih regulatornih enzima kod životinja, s obzirom na to da je većim delom zadružen za kontrolu biosinteze holesterola. Brojna istraživanja pokazuju da je isti slučaj i sa HMG-CoA izolovanog iz ER biljaka. U mnogim slučajevima, male genske familije koje sadrže nekoliko članova kodiraju ovaj enzim. Ove genske familije su eksprimiraju na složeni način, sa individualnim genima koji pokazuju konstitutivnu, tkivnu, ontogenetsku ili hormonski-indukovanu ekspresiju (Buchanan et al., 2009). Specifični geni za HMG-CoA reduktazu mogu biti pod uticajem postranslacione regulacije, npr. inaktivacijom enzima preko fosforilacije. Proteolitička degradacija HMG-CoA reduktaze i vek trajanja iRNK transkripta može takođe da ima uticaj na enzimatsku aktivnosti. Još uvek ne postoji unifikovana šema koja bi objasnila kako različiti mehanizmi koji regulišu HMG-CoA reduktazu usmeravaju produkciju različitih terpena (Buchanan et al., 2009).

**Regulacija MEP.** Metabolička regulacija ovog biosintetskog puta je preko dostupnosti organski vezanog ugljenika (piruvat i GAP) kao i NADPH, ATP i cATP. Piruvat je u plastidima dostupan i kroz Benson-Kalvinov ciklus, ali i kao intermedijer rubisko reakcije. Postoje dokazi da se piruvat unutar plastida može dobiti i transportom PEP (fosfo-*enol*-piruvata) iz citosola pomoću PPT (PEP fosfatnog translokatora) i njegovom daljom obradom u piruvat uz pomoć enzima piruvat kinaze koji se nalazi u plastidima. Drugi enzim u MEP je DXR koji je zavistan od NADPH. NADPH se najverovatnije dobija iz fotosintetičkog elektron-

transportnog lanca, što bi objasnilo zašto je sinteza terpena gotovo potpuno zaustavljena noću (Banerjee & Sharkey, 2014; Lewinsohn et al., 1993; Rodriguez-Concepcion, 2002). Pored DXR, i poslednja dva enzima MEP puta (HDS, HDR) imaju [4Fe– 4S] klaster koji uključuju duple transfere po jednog elektrona, koji su kod *A. thaliana* poreklom iz fotosintetičkog elektron-transportnog lanca preko ferodoksina (Banerjee & Sharkey, 2014). Za treći korak MEP puta (konverzija MEP u CDP-MEP) je neophodan po jedan molekul ATP i CTP. Eksperimentalno je utvrđeno da DMAPP funkcioniše preko negativne *feedback* petlje i na taj način upostavlja kontinuiranu proizvodnju IPP i DMAPP delujući na DXS.

Proučavanjem celog genoma *A. thaliana* je utvrđeno postojanje čak tri gena koja sintetišu DXS, da bi kasnije i kod *Picea abies* i *Oryza sativa* bilo otkriveno postojanje isto tri gena, odnosno dva kod *Ginkgo biloba*, *Medicago trunculata* i *Zea mays* čiji je proizvod DXS (Cordoba et al., 2009). Detaljnije proučavanjem se došlo do toga da je jedan DXS eksprimiran u fotosintetičkim tkivima kod svih vrsta. Drugi tip je bio eksprimiran kod pojedinih vrsta i to u korenu kada je dolazilo do uspostavljanja mikorize. Treći tip DXS gena je bio eksprimiran u specifičnim tkivima, ali još uvek nije otkrivena uloga ovog trećeg gena (Cordoba et al., 2009). Zanimljivo je da filogenetske analize sekvence ovih gena pokazuju da se oni grupišu u odvojenim kladama koje su se razvile pre odvajanja monokotila i dikotila, osim kod četinara i *A. thaliana* gde su se dva gena grupisala na istoj kladi (Cordoba et al., 2009). Za razliku od DXS gena, geni koji kodiraju za ostale proteine MEP biosintetskog puta se nalaze u jednoj kopiji, osim kod pojedinih vrsta gde je detektovano postojanje dva ili tri gena (npr DXR kod *Hevea brasiliensis* ili HDR kod *Pinus taeda* (dve kopije) i *Ginkgo biloba* (tri kopije)) (Cordoba et al., 2009; Kim et al., 2008). Svi ovi rezultati govore o mogućoj tkivno-zavisnoj regulaciji biosinteze IPP/DMAPP.

Zanimljiva osobina ovih gena je da reaguju na uticaje iz spoljašnje sredine. Svetlost je jedan od bitnih faktora koji utiče na povećanu transkripciju ovih gena, što bi bilo od velikog značaja kod klijanaca prilikom razvoja prvih fotosintetičkih tkiva (Cordoba et al., 2009). S druge strane, kod pojedinih četinara (*Abies grandis*, *Pinus taeda*, *Picea sitchensis*) ranjavanje tkiva ili prodiranje gljiva takođe ima za efekat povećanu transkripciju ovih gena, kao i gena odgovornih za biosintezu odbrambenih mono-, seskvi- i diterpena (Bohlmann et al., 1997; Hudgins et al., 2004; Keeling & Bohlmann, 2006; McKay, 2003; Phillips et al., 2006; Steele et al., 1998; Zulak & Bohlmann, 2010).

**Regulacija TPS.** U zavisnosti od taksona, mogu se pronaći jedan ili oba tipa terpena – konstitutivni i indukovani. Konstitutivni terpeni se sintetišu tokom celog ili određenog dela ontogenetskog razvića. Indukovani terpeni se sintetišu tek nakon mehaničkog oštećenja tkiva od strane herbivora ili prodiranjem patogenih organizama. Kod *Phaseolus lunatus* biosinteza terpena se dešava isključivo kada je biljka izložena određenom stresu (Bartram et al., 2006), dok kod vrsta roda *Pinus* se konstitutivno nalazi velika količina terpena u vidu smole (mešavina mono-, seskvi- i diterpena) koja se čuva u smonim kanalima (Bohlmann et al., 1998b; Gijzen Mark et al., 1993; Keeling & Bohlmann, 2006; Phillips & Croteau, 1999; Phillips et al., 2006). Svakako se većina vrsta nalazi negde na skali između ova dva ekstrema, gde postoji izvesna količina konstitutivnog i indukovanog etarskog ulja.

Količina monoterepen sintaza u listovima nekoliko četinarskih vrsta (*Pinus ponderosa*, *Abies conocolor*) naglo raste kada su pod napadom larve *Halisdota ingens* (Keeling & Bohlmann, 2006). Isti efekat je zabeležen i kod oštećenja stabla *Picea sitchensis* i *Abies grandis* gde je zabeležen porast u količini TPS, i to tačno određenim redosledom – najpre je povećana biosinteza limonena, nekoliko dana kasnije pinena, a još kasnije seskviterpena i diterpena. Ovakav, na prvi pogled, neadekvatan odgovor zapravo odgovara ciklusu potkornjaka i simbiotske gljive koja ga prati (Bohlmann et al., 1998b; Lewinsohn et al., 1993; McKay, 2003; Steele et al., 1998).

Kod ranjavanja stabla, dolazi do jake reakcije. Prvo se sintetišu velike količine monoterepena koja imaju ulogu da rastvore diterpene i prenesu ih lakše do mesta napada. Isparavanjem monoterepena ostaju samo diterpeni koji polimerizuju i formiraju gustu smolu koja će da zarobi insekta i zatvori ranu na stablu. Seskviterpeni bi mogli da služe kao druga linija odbrane, gde pojedini imitiraju juvenilne hormone insekta i na taj način ometaju normalan razvoj larve (McKay, 2003; Miller, 2005; Steele et al., 1998). Zanimljivo je da, bez obzira na to da je reakcija biljke jaka, ona je izuzetno lokalizovana, i promene u količini monoterepen sintaza i sastavu etarskog ulja nisu detektovne već na daljini od 10-ak centimetara od mesta napada. S druge strane, simulacija napada insekta na listove je dala daleko slabiju reakciju nego kod stabla. Došlo je do samo blage promene u aktivnosti TPS enzima kao i akumulacije terpena (Miller, 2005), a sastav etarskog ulja se gotovo nije uopšte promenio.

Dosadašnja istraživanja pokazuju da su jasmonska kiselina i metil jasmonat glavni signalni molekuli u odgovoru biljke na mehaničko ranjavanje, herbivoriju, ovipoziciju ili prodiranje patogenih gljiva (Miller, 2005; Zulak & Bohlmann, 2010).



### 1.3.5. Dosadašnja istraživanja terpena

Prvi pisani tragovi o upotrebi aromatičnih biljke i njihovih »smola« se javljaju u Starom Egiptu pre više od 5.000 godina (Dudareva et al., 2000). Još od ovog perioda, ljudi pokazuju izuzetno interesovanje za aromatične biljke i njihova etarska ulja. Jednostavnom pretragom Google Scholar sa ključnim rečima "essential oil" pojavljuje se preko 300.000 radova koji su do sada publikovani na temu terpena (Google scholar, mart 2014). Razlog tome leži u činjenici da su etarska ulja i njihovi glavni sastojci – terpeni, pokazali niz bioloških aktivnosti: od antioksidativne (Adorjan & Buchbauer, 2010; Asgary et al., 2013; Asili et al., 2013; Cantrell et al., 2013; Emami et al., 2007, 2011, 2012; Ennajar et al., 2009, 2011; Lešnjak et al., 2013, 2014; Loizzo et al., 2007; Misharina et al., 2009; Moein et al., 2010; Sacchetti et al., 2005; Shalaby et al., 2011; Yvon et al., 2012; Zheljazkov et al., 2012), preko antimikrobne (Abdel-Kader et al., 2011; Bahri et al., 2013; Derwich et al., 2010; Ehsani et al., 2012; Fouad et al., 2011; Glisić et al., 2007; Kloucek et al., 2012; Martz et al., 2009; Moein et al., 2010; Pepeljnjak et al., 2005), antiviralne (Adorjan & Buchbauer, 2010; Loizzo et al., 2008) i repelentne (Giatropoulos et al., 2012; Gijzen Mark et al., 1993; Hădărugă et al., 2011), do antitumor (Adorjan & Buchbauer, 2010; Saab et al., 2012) i antiinflamatorne (Hădărugă et al., 2011; Lešnjak et al., 2013, 2014; Loizzo et al., 2007; Salido et al., 2002; Tumen et al., 2011, 2013). Baza za ova istraživanja leži upravo u jakoj biološkoj odnosno ekološkoj ulozi koju ove komponente imaju u životu svake biljke, o čemu je već bilo reči.

### 1.3.6. Varijabilnost i upotreba tepena u taksonomskim istraživanjima

Etarska ulja su izučavana i sa taksonomskog aspekta. Prva istraživanja su eksperimentalno pokazala da se etarska ulja, zbog pojave konvergencije, mogu koristiti na nižim taksonomskim nivoima. Trenutna znanja o filogeniji terpen sintaza, i biosintezi terpena kod viših biljaka, samo su potvrdila ono što je prethodno i eksperimentalno utvrđeno. Na primer, limonen sintaza se javila više puta nezavisno kod skrivenosemenica i golosemenica (Bohlmann et al., 1998a), odnosno više puta nezavisno i unutar samih golosemenica (Martin, 2004).

Sa početkom razvoja biohemijske sistematike 60-ih godina prošlog veka, kreću i prva istraživanja etarskih ulja kao taksonomskih markera.

#### Varijabilnost terpena

Da bi etarska ulja mogla da se koriste kao hemotaksonomski markeri, Harborne (1967) je predložio četiri kriterijuma: (1) da jedinjenja poseduju dovoljno veliku hemijsku i strukturalnu kompleksnost, (2) da su fiziološki stabilna jedinjenja, (3) da su široko distribuirani kod biljnih vrsta i (4) da se svako jedinjenje može brzo i lako identifikovati.

Terpeni, već na prvi pogled zadovoljavaju tri kriterijuma: poseduju dovoljno veliku hemijsku i strukturalnu kompleksnost, široko su distribuirani i većina ako ne i sve komponente iz ovih kompleksnih smeša je jednostavno i brzo moguće identifikovati.

Ostaje pitanje fiziološke stabilnosti. Ako se izuzmu inherentni problemi bavljenja ovom grupom jedinjenja (njihova velika isparljivost stavlja određena ograničenja), terpeni su pokazali različiti stepen stabilnosti kod različitih vrsta i čak različitih biljnih organa (Von Rudloff, 1975). Terpeni imaju izuzetan biološki i ekološki značaj za samu biljku. Štaviše, sintetišu se u specijalizovanim tkivima koja su strateški locirana na biljnim organima. U zavisnosti od biljnog organa, zavisice i sastav etarskog ulja (Cavaleiro et al., 2003; El-Sawi et al., 2008; Salehi Shanjani et al., 2010). Eksperimentalno je utvrđeno da terpeni pokazuju različitost u produkciji između blisko srodnih vrsta i između populacija jedne vrste

(Buchanan et al., 2009). Emisija terpena prati cirkadijalni ritam, gde se najveći broj terpena oslobodi tokom dana u poređenju sa količinom u toku noći (Zulak & Bohlmann, 2010).

### Taksonomski značaj terpena kod golosemenica

Prvi značajniji rad koji se bavio proučavanje terpena kao hemotaksonomskih markera kod četinara je objavljen sredinom sedamdesetih godina prošlog veka. Ernst von Rudloff (1975) je nakon više godina intenzivnog bavljenja sastavom etarskog ulja kod brojnih četinara (Flake et al., 1969; Rudloff, 1963, 1968; Rudloff & Couchman, 1964; Rudloff & Sood, 1969; Vinutha & Rudloff, 1968) dao sveobuhvatni pregled hemotaksonomskog istraživanja terpena četinara severnoameričkog kontinenta. Njegova istraživanja su pokazala da postoje tri grupe četinara: (1) prva kod kojih je varijabilnost u sastavu toliko mala, da nije moguće utvrditi intra- i interspecijske odnose tih vrsta, (2) druga kod kojih je varijabilnost dovoljna da se mogu utvrđivati intra- i interspecijski odnosi, i (3) treća kod kojih je toliko velika varijabilnost da zahtevaju veliki broj jedinki kako bi se utvrdili njihovi odnosi.

Terpeni etarskih ulja su izuzetno isparljiva jedinjenja, tako da je samo uzorkovanje i čuvanje materijala od presudnog značaja za svaku dalju analizu. Neke vrste četinara, imaju izuzetno debeli epidermis zaštićen debelom kutikulom, a etarska ulja se nalaze “zarobljena” u smonim kanalima. Kod ovih vrsta, uzorkovanje i transport je izuzetno lak, jer ne postoji mogućnost gubitka etarskog ulja prostim isparavanjem (Adams, 2010; Von Rudloff, 1975). Adams je čak pokazao da se kod većina vrsta roda *Juniperus* biljni materijal može čuvati kao suv i do 8 meseci bez ikakve promene u sastavu i količini etarskog ulja (Adams, 2010). S druge strane, postoje one vrste četinara kod kojih se žlezde za lučenje etarskog ulja nalaze na površini listovi. Kod ovih vrsta dolazi do značajnog gubitka etarskog ulja prilikom transporta i čuvanja ukoliko se ne povede računa prilikom transporta i čuvanja (Adams, 2010; Von Rudloff, 1975).

Brojni radovi na sastavu etarskog ulja kod četinara su pokazali da: (1) postoji jasna geografski korelisana varijabilnost u sastavu etarskog ulja (Adams, 1986, 1990a, 1990b, 1994, 1997, 2001, 2011b, 2011c, 2012a, 2012b, 2013a; Adams & Tashev, 2012; Adams et al., 2003b, 2006a, 2008a, 2010a, 2012, 2013b; Bekhechi et al., 2012; Cavaleiro et al., 2001, 2002, 2003; Emami et al., 2012; Filipowicz et al., 2009; James, 2009; Kallio & Junger-Mannermaa, 1989;

Khajjak et al., 2012; Looman & Svendsen, 1992; Mao et al., 2010; Martz et al., 2009; Medini et al., 2009a, 2010; Nikolić et al., 2011; Ottavioli et al., 2009; Rezzi et al., 2001; Von Rudloff, 1975; Sela et al., 2011; Tatro et al., 1973; Unlu et al., 2008; Velasco-Negueruela et al., 2004), (2) proučavajući sezonsku varijabilnost, etarska ulja su pokazala, u zavisnosti od vrste i tkiva iz kojeg je izolovano ulje isključivo kvantitativnu varijabilnost (u smislu prinosa) dok je odnos komponenti ostajao konstantan, ili pak značajnu varijabilnost u odnosu komponenti u ulju (Adams, 1970, 2012c; Cavaleiro et al., 2003; Markó et al., 2008; Medini et al., 2009a, 2010; Powell & Adams, 1973; Salehi Shanjani et al., 2010; Salido et al., 2002; Tatro et al., 1973), (3) da postoji jasna razlika u sastavu etarskog ulja između drveta, iglica, nezrelih i zrelih ženskih šišarica (Angioni et al., 2003, 2003; Cavaleiro et al., 2003, 2003, 2006; El-Sawi et al., 2008; Emami et al., 2007; Gonny et al., 2006, 2006; Hădărugă et al., 2011; Lešjak et al., 2014; Loizzo et al., 2007; Marongiu et al., 2005; Milos & Radonic, 2000; Salido et al., 2002; Shahmir et al., 2003), te da se vrste mogu razlikovati na osnovu sastava etarskog ulja (Adams, 2011a).

Zbog postojanja razlika u sastavu etarskog ulja određenih biljnih tkiva u zavisnosti od ontogenetske faze razvića, u hemotaksonomiji kod četinara, a pogotovu kod roda *Juniperus* se najviše koriste iglice. Odnosi komponenti etarskog ulja u stablu variraju od starosti (Bernard-Dagan, 1988) i u zavisnosti od toga da li je mesto sa kojeg je uzorkovano tkivo bilo pod napadom (McKay, 2003). Kako je jako teško utvrditi preciznu starost uzorka drveta, a sastav etarskog ulja šišarica varira tokom perioda njihovog sazrevanja, dvogodišnje iglice koje se nakon prve godine intenzivnog razvoja, sve nalaze u manje-više istoj ontogenetskoj fazi su se pokazale kao izuzetno dobar izvor etarskog ulja koji ocrta genetičke razlike između individua iste i različitih populacija.

Biohemijska istraživanja biosinteze terpena su pokazala da samo TPS primarnog metabolizma imaju drastičan uticaj na rast i razvoj biljke i lako se uočavaju kroz morfološke promene fenotipa, dok mutacije u TPS sekundarnog metabolizma kao proizvod imaju pojavu različitih hemotipova, koje je moguće uočiti jedino analizom sastava etarskog ulja izolovanog iz takvih jedinki (Bohlmann et al., 1998a).

Postoji veliki broj taksonomskih istraživanja etarskih ulja kod golosemenica. Sa ovog aspekta, Adams (2011a) je dao najveći pojedinačni doprinos, proučavajući najviše etarska ulja iglica vrsta iz porodice Cupressaceae. Pored vrsta ove porodice, najviše su proučavane i komercijalno važne vrste roda *Pinus*, *Picea* i *Abies* (Adams et al., 2011a; Keeling & Bohlmann, 2006; Nikolic et al., 2008, 2014; Nikolić et al., 2007, 2011, 2011; Von Rudloff, 1975; Šarac et al., 2013)

### 1.3.7. Prethodna istraživanja terpena kod vrsta roda *Juniperus* L.

Svega nekoliko vrsta roda *Juniperus* su od komercijalnog značaja (*Juniperus communis*, *J. virginiana*, *J. ashei*, *J. procera*...) (Adams, 2011a). Robert P. Adams je uradio veliki posao na karakterizaciji etarskog ulja izolovanog iz vrsta ovog roda, tako da je najveći broj ovih radova posvećen etarskom ulju sa taksonomskog aspekta, međutim etarska ulja kod kleke su proučavana i sa aspekta sezonske i geografske varijabilnosti, uticaja ekoloških faktora, kao i sa aplikativnog aspekta (biološka aktivnost izolovanog etarskog ulja).

(1) Sekcija: *Caryocedrus* Endl. – *J. drupacea* Labill.: Adams, 1997; Adams et al., 2003c; Vourlioti-Arapi et al., 2011

(2) Sekcija: *Juniperus* L. (Syn. *Oxycedrus* Spach.)

*Juniperus communis* s.l.: Abbassy & Marei, 2013; Abdel-Maksouda & El-Aminb, 2011; Adams, 1998, 2000a; Adams et al., 2010b, 2014a; Angioni et al., 2003; Butkienė et al., 2009; Cabral et al., 2012; Caramiello et al., 1995; Chatzopoulou & Katsiotis, 1993; Damjanović et al., 2006; Filipowicz et al., 2009; Glisić et al., 2007; Gonny et al., 2006; Gordien et al., 2009; Hădărugă et al., 2011; Kallio & Junger-Mannermaa, 1989; Karlsen & Svendsen, 1965; Kloucek et al., 2012; Looman & Svendsen, 1992; Ložienė & Labokas, 2012; Marjanović-Balaban & Miletić, 2011; Markó et al., 2008, 2011; Marongiu et al., 2005; Martz et al., 2009; Mastelić et al., 2000; Milojević et al., 2010; Misharina et al., 2009; Ottavioli et al., 2009; Pepeljnjak et al., 2005; Pourmortazavi et al., 2004; Rudloff & Sood, 1969; Sela et al., 2011; Şerba et al., 2012; Shahmir et al., 2003; Tumen et al., 2011; Vourlioti-Arapi et al., 2011; Zyani et al., 2011

*Juniperus oxycedrus* s.l.: Achak et al., 2009; Adams, 1998; Adams & Mataraci, 2011; Adams & Tashev, 2012; Adams et al., 1999, 2003c, 2005, 2010a; Amri et al., 2013; Angioni et al., 2003; Athanassiou et al., 2013; Barrero et al., 1987, 1993; Cavaleiro et al., 2003, 2006; Djebaili et al., 2013; Dob et al., 2006; Giatropoulos et al., 2012; Koukos et al., 2002; Lešjak et al., 2012, 2014; Loizzo et al., 2007, 2008; Marongiu et al., 2003; Medini et al., 2009b, 2010, 2013; Milos & Radonic, 2000; Saab et al., 2012; Salido et al.,

2002; Sezik et al., 2005; Stassi et al., 1995, 1996; Tumen et al., 2011; Ucar & Balaban, 2002; Valentini et al., 2003; Velasco-Negueruela et al., 2004; Vourlioti-Arapi et al., 2011

(3) Sekcija: *Sabina* Spach. : Abbasipour et al., 2011; Adams, 1970, 1986, 1990a, 1990b, 1999, 2000b, 2000c, 2000d, 2001, 2009a, 2009b, 2010, 2011b, 2011c, 2012a, 2012b, 2013a, 2013b; Adams & Baker, 2007; Adams & Chaudhary, 1996; Adams & Nguyen, 2005; Adams & Turner, 1970; Adams et al., 1992, 1993, 1994a, 1994b, 1994c, 1995, 1998a, 1998b, 2003b, 2006a, 2006b, 2008a, 2008b, 2008c, 2008d, 2011b, 2012, 2013a, 2013b, 2013c; Alieva et al., 2012; Almaarri et al., 2010; Alqasoumi & Abdel-Kader, 2012; Asgary et al., 2013; Asili et al., 2013; Bahri et al., 2013; Bekhechi et al., 2012; Cantrell et al., 2013; Cavaleiro et al., 2001, 2003; Chandra et al., 2007; Derwich et al., 2010, 2011; Ehsani et al., 2012; Elango et al., 2012; El-Sawi et al., 2008; Emami et al., 2011, 2012; Ennajar et al., 2009, 2011; Flake et al., 1969; Fouad et al., 2011; Gawde et al., 2009; Ghazvin, 2007; Giatropoulos et al., 2012; James, 2009; Jo & Kim, 2005; Khajjak et al., 2012; Komeh-Nkrumah et al., 2011; Mahmoudvand et al., 2011; Mansouri et al., 2011; Medini et al., 2009a; Moein et al., 2010; Nishimura & Hirose, 1962; Powell & Adams, 1973; Purkayastha et al., 2012; Raina et al., 2005; Ramdani et al., 2013; Rattan & Sharma, 2011; Rezzi et al., 2001; Rudloff, 1963, 1968; Rudloff & Couchman, 1964; Von Rudloff, 1975; Salehi Shanjani et al., 2010; Samoylenko et al., 2008; Semen & Hiziroglu, 2005; Tanker & Sarer, 1975; Tatro et al., 1973; Tumen et al., 2012, 2013; Unlu et al., 2008; Vasek & Scora, 1967; Yvon et al., 2012; Zheljzakov et al., 2012

#### 1.4. HLOROPLASTNI GENOM (cpDNA)

Biljne ćelije sadrže tri genoma: nuklearni, mitohondrijalni i hloroplastni (plastidni genom ili plastom).

Opšte je prihvaćeno da je hloroplastni genom cirkularan, što je i dokumentovano prvim elektromikrografijama. Međutim, skorija istraživanja pokazuju da se hloroplastni genomi mogu naći i u kompleksnijem obliku, sa cirkularnim, linearnim, granatim i multimernim konfiguracijama (Jansen & Ruhlman, 2012).

Hloroplastni genom je manje-više konzervativne organizacije kod kopnenih biljaka. Obično se sastoji iz četiri dela: dva invertovana segmenta (IR) varijabilne dužine koji sadrže uglavnom ribozomalne RNK gene i koji razdvajaju ostatak genoma na mali (SSC) i veliki (LSC) unikatni (*single-copy*) region (Guo et al., 2014; Jansen & Ruhlman, 2012; Small et al., 2004; Wicke et al., 2011). Odstupanja od navedene organizacije su detektovana, i postoje npr. kod poluparazitskih i parazitskih taksona (Jansen & Ruhlman, 2012), Pinaceae (Lin et al., 2010), kod *Vicia faba* i drugih predstavnika Fabaceae (Duc et al., 2015), itd..

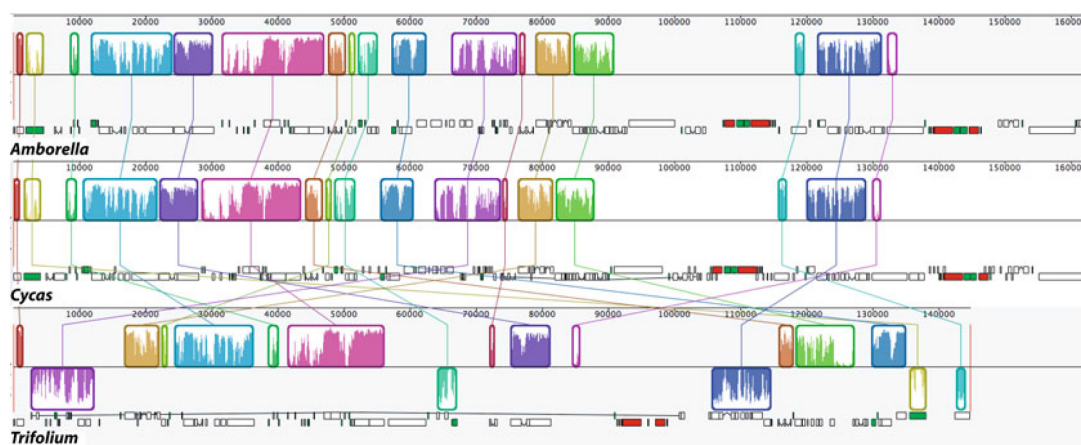
Veličina hloroplastnog genoma se obično kreće između 120 i 160 kb, ali može varirati kod različitih vrsta. Pokazano je da je najmanji hloroplastni genom prisutan kod parazitskih vrsta (59 – 85 kb), dok kod drugih može preći i 200 kb. Ova varijabilnost u veličini genoma je najčešće posledica varijabilne dužine IR regiona (koji kod pojedinih vrsta mogu biti svedeni i na tek nekoliko stotina baza), zatim duplikacija ili delecija gena ili većih ili manjih segmenata genoma, kao i insercija ili delecija introna (Jansen & Ruhlman, 2012).

Broj i raspored gena hloroplastog genoma je manje-više konzervativan, iako je u pojedinim grupama došlo do značajnijih rearanžmana, delecija i/ili insercija gena i većih ili manjih segmenata genoma. Na slici 1.4.1 se jasno vidi da je redosled gena kod *Amborella trichopoda* i *Cycas taitungensis* kolinearan (redosled gena u plastomu je isti). Međutim, kod

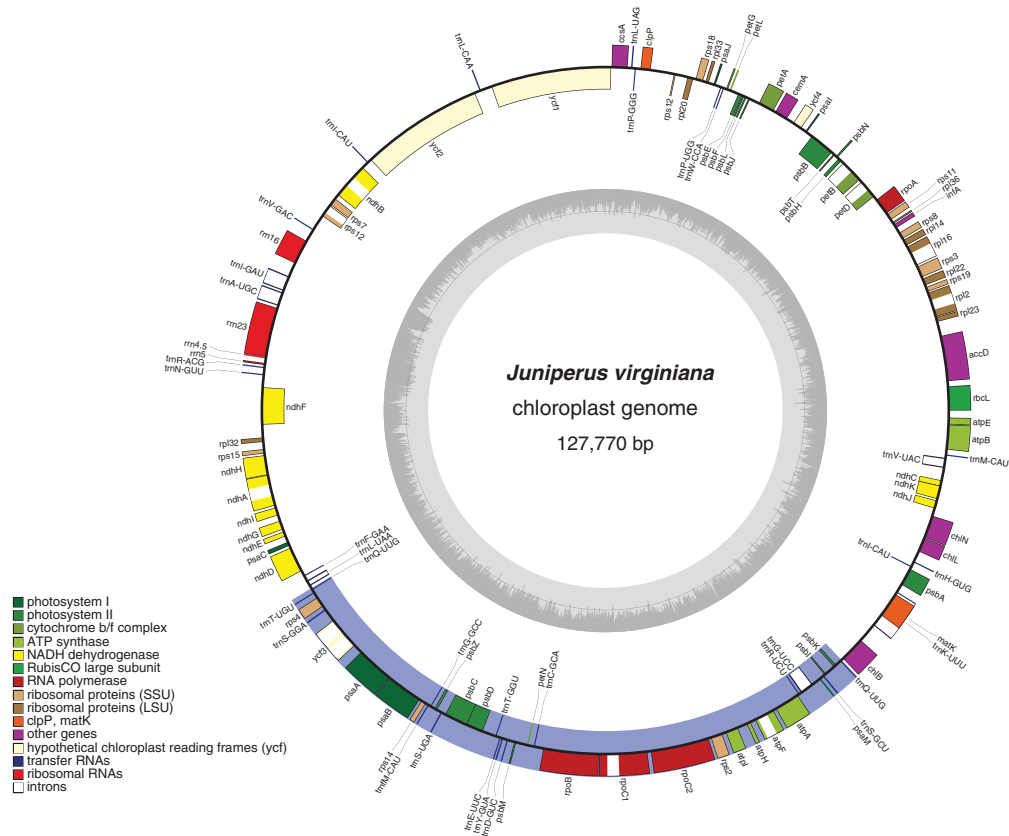
*Trifolium subterraneum* je došlo do rearanžmana gena. Broj gena u hloroplastnom genomu se obično kreće između 101 i 118, od kojih je daleko najveći broj odgovoran za sintezu proteina uključenih u fotosintezu (66-82), a manji broj (29-32) kodira tRNK kao i ribozomalne gene (4). Prisustvo introna u genima u hloroplastnom genomu je uglavnom visoko konzervirano kod semenih biljaka, i obično svega 18 gena sadrži introne. Isecanje introna iz primarnih transkripata je u gotovo u svim slučajevima *cis*-iscenje.

Smatra se da se hloroplastni genom kod skrivenosemenica nasleđuje gotovo isključivo preko majčinske linije (trenutna procena kod 80% taksona), dok se kod golosemenica nasleđuje preko očinske linije (Mogensen, 1996). Međutim, postoji relativno mali broj istraživanja koje to nedvosmisleno potvrđuje. I pored viđenja da je za sve golosemenice karakteristično nasleđivanje hloroplastnog genoma po muškoj liniji, postoje dokumentovani slučajevi materinskog nasleđivanja (Cycadophyta, *Ginkgo*, Gnetophyta) ili biparentalnog nasleđivanja (*Cryptomeria*, *Larix*) (Jansen & Ruhlman, 2012).





Slika 1.4.1. Redosled gena u hloroplastnim genomima *Amborella trichopoda* (NC\_005086), *Cycas taitungensis* (NC\_009618) i *Trifolium subterraneum* (NC\_011828) (Jansen & Ruhlman, 2012).



Slika 1.4.2. Mapa hloroplastnog genoma *J. virginiana*. Geni koji se transkribuju u smeru kazaljke na satu se nalaze sa unutrašnje strane kruga. Pozicija jedinog inverzionog regiona prisutnog kod *Juniperus* je označena svetloplavom pozadinom (Guo et al., 2014)

### 1.4.1 Hloroplastni genom golosemenica

Hloroplastni genom golosemenica se odlikuje određenim specifičnostima. Kod ove grupe su uočena velika variranja u prisustvu i organizaciji IR regiona, koji mogu biti izuzetno veliki ili čak odsutni. Kod Gnetales, Cycadales i Ginkgoales postoje dva IR regiona dužine između 17,7 i 25,1 kb (Lin et al., 2012; Wu et al., 2007), dok je kod Pinaceae došlo do gubitka jednog IR i znatne redukcije drugog IR regiona na svega nekoliko stotina nukleotida (236-495 bp, *trnI*<sup>(CAU)</sup> gen i deo *psbA-trnH* gena) (Lin et al., 2010). Međutim, kod Pinaceae je došlo do obrazovanja nekoliko novih, Pinaceae-specifičnih ponovaka koji su preuzeli ulogu IR u homolognim rekombinacijama (Lin et al., 2010; Wu et al., 2011). Kod Cupressaceae je takođe došlo do gubitka jednog IR regiona, a umesto njega postoji par kraćih dupliciranih regiona (*Cryptomeria japonica*, 280 bp (Hirao et al., 2008)).

Kod pojedinih grupa golosemenica došlo je i do redukcije broja gena. Najmanji broj gena je detektovan za sad kod predstavnika razdela Gnetophyta i porodice Pinaceae. Kod efedre je došlo i do najveće redukcije veličine hloroplastnog genoma (117 gena, 109 kb veličina plastoma) u odnosu na sve ostale golosemenice (Jansen & Ruhlman, 2012; Wu et al., 2009).

Bolji uvid u organizaciju i strukturu hloroplastnog genoma predstavnika roda *Juniperus* je bio omogućen nedavno, kada je publikovan primarni redosled nukleotida kompletnih hloroplastnih genoma četiri vrste ovog roda: *J. bermudiana*, *J. monosperma*, *J. scopolorum* i *J. virginiana* (Guo et al., 2014). Pokazano je da je veličina hloroplastnog genoma kod predstavnika ovog roda 127 kb, što odgovara prosečnoj veličini do sada publikovanih hloroplastnih genoma predstavnika porodice Cupressaceae (Guo et al., 2014; Wu & Chaw, 2014). Identifikovano je 82 gena koji kodiraju proteine, 4 ribozomalne RNK, 33 tRNK, a detektovano je ukupno 18 introna. U odnosu na ostale predstavnike Cupressaceae *s.l.*, kod roda *Juniperus* je detektovano da *rps16* gen sadrži nekoliko *frameshift* mutacija (mutacije pomeranja okvira čitanja). Ovaj nefunkcionalni gen je označen kao *ψrps16*. Kao i kod ostalih golosemenica, *ycf12* gen je odsutan (Guo et al., 2014). Pored ovoga, utvrđeni su i rearanžirani gena (Slika 1.4.2).

### 1.4.2 Hloroplastni genom u filogenetskim studijama

Zbog odlika hloroplastnog genoma, kao što su veći broj kopija po hloroplastu i broj hloroplasta po ćeliji, haploidna priroda, strukturalna stabilnost, odsustvo rekombinacija, pretežno uniparentalno nasleđivanje i organizacija u kojoj se smenjuju uglavnom visoko konzervativni kodirajući regioni (geni) sa varijabilnim nekodirajućim regionima (introni i intergenski spejseri), stope mutacije nekoliko puta više od stope mutacija mitohondrijanog i do 10 puta niže od stope mutacija jedarnog genoma, smatra se da je hloroplastni genom izuzetno pogodan za istraživanja u molekularnoj sistematici na različitim taksonomskim nivoima (Small et al., 2004; Wolfe et al., 1987). Odstupanja od navedenih odlika, naravno, postoje.

Svaki hloroplast u ćeliji sadrži veliki broj kopija hloroplastnog genoma. Kod mladih listova broj genoma po hloroplastu je oko 100, a broj hloroplasta po ćeliji mezofila je 20 do 50 (Hans-Walter, 2005). Imajući u vidu veliki broj (teorijski) identičnih hloroplastnih genoma po ćeliji, u tkivima i celom organizmu, smatra se da je relativno lako doći do veće količine hloroplastne DNK, i da ne bi trebalo da postoji veći broj alela na odabranim lokusima genoma unutar svake jedinice, čime su znatno olakšane analize na molekularnom nivou. Međutim, uočeno je da kod nekih individua mogu postojati hloroplasti koji se razlikuju po organizaciji i primarnom redosledu nukleotida hloroplastnog genoma. Do toga može doći iz više razloga, npr. usled relativno čestih interspecijskih hibridizacija praćenih introgresijom, curenja hloroplastnih genoma tokom oplodjenja i td, pa se može pronaći dva ili više različitih hloroplastnih genoma u jednoj jedinici (Small et al., 2004).

Redosled gena u plastomu semenih biljaka je visoko konzerviran, što se može videti poređenjem plastoma *Cycas* i *Amborella* (Slika 1.4.1). Međutim, kod Gnetophyta, Pinopsida, i nekoliko grupa skrivenosemenica je došlo do promena u redosledu gena. Ovo može nastati na različite načine: usled inverzija nastalih rekombinacijom između određenih regiona (npr. segmenata koji sadrže mikrosatelite, dupliranih regiona, itd.), ili kao posledica povećanja i/ili smanjenja dužine IR regiona, kao što je utvrđeno kod predstavnika porodica Fabaceae i Geraniaceae (Jansen & Ruhlman, 2012).

Iako se smatra da rekombinacije nisu prisutne kod hloroplastnog genoma, istraživanja pokazuju da se one ipak dešavaju. Naime, kada su prisutni IR, oni mogu dovesti do pojave homologih rekombinacija i čestih »flip-flop« inverzija unikatnih regiona. Posledica ovoga je da kod nekih taksona u istom hloroplastu postoje dve različite izoforme plastoma (Guo et al., 2014; Jansen & Ruhlman, 2012). Međutim, iako su kod ispitivanih plastoma *Juniperus* detektovane dve izoforme (označene kao A i B), one se javljaju kod različitih vrsta, i paralelno prisustvo obe izoforme u istoj individui nije potvrđeno (Guo et al., 2014). Do pojave rekombinacija u hloroplastnom genomu dolazi i usled prisustva dužih ili kraćih dupliranih regiona, regiona sa mikrosatelitima i td.

Bez obzira na to da li je hloroplastni genom cirkularan, linearan ili složenije strukture, on je, za razliku od nuklearnog, haploidne prirode. Usled nižih stopa mutacija u odnosu na nuklearni genom, kao i haploidne prirode hloroplastnog genoma, nivo intraspecijske i intrapopulacijske varijabilnosti je obično manji kod hloroplastnog nego kod nuklearnog genoma. To je zbog toga što se haploidni genomi odlikuju manjom efektivnom veličinom populacija nego nuklearni genomi i osetljiviji su na efekte genetičkog drifta i drugih procesa koji imaju uticaj na nivo genetičkog diverziteta u populacijama i vrstama.

Relativna učestalost mutacija (tačkastih mutacija i insercija/delecija koje se nazivaju indeli) u hloroplastnim genomima, koje se koriste za filogenetske rekonstrukcije, je ispitivana kod vrsta koje su u većem ili manjem stepenu srodstva. Pokazano je da stopa tačkastih mutacija, koje se najčešće koriste u filogenetskim studijama, znatno varira od regiona do regiona. Na primer, kod Astearace, prosečna p-distanca (proporcija mutacija između dve sekvence) u RNK genima je 0,008, u genima koji kodiraju proteine 0,022, intronima 0,030 dok je u intergenskim spejserima ona čak (Timme et al., 2007). Empirijski je pokazano da je stopa sinonimnih supstitucija u plastomu semenih biljaka  $1,01 \times 10^{-9}$  mutacija po mestu po godini (Graur & Li, 2000). Ta vrednost odgovara brzini supstitucija introna i nekodirajućih intergenskih spejsera genoma organela (Chiang et al., 2009). Sa druge strane, pokazano je da su indeli podjednako česti ili nešto češći od tačkastih mutacija pogotovu kod blisko srodnih vrsta. Najveći broj indela je detektovan u LSC (84%), dok se manji broj indela nalazi u SSC (12%) i IR (4%) (Jansen & Ruhlman, 2012). Pored toga, npr. kod Poaceae, najveći broj indela je prisutan u intergenskim spejserima (56 - 64%), zatim u intronima (25 - 26%), a najmanji broj indela se nalazi u kodirajućim regionima (10 - 19%). Najveći broj indela je dužine od jedan do nekoliko baznih parova. Smatra se da indeli mogu nastati "proklizavanjem" lanca tokom replikacije ali i drugim mehanizmima. Iako se indeli ranije nisu koristili za filogenetske

rekonstrukcije, novija istraživanja pokazuju da oni mogu nositi značajan filogenetski signal (Lockwood et al. 2013).

Dakle, kodirajući regioni su najkonzervativniji, potom introni pa intergenski spejseri. Upravo zahvaljujući ovoj karakteristici je bilo moguće dizajnirati “univerzalne prajmere”, u kodirajućim regionima, koji mogu amplifikovati odgovarajuće regione kod velikog broja taksona. To znatno pojeftinjuje i ubrzava proces utvrđivanja primarnog redosleda nukleotida određenih regiona kao i celog hloroplastnog genoma kod različitih vrsta (Demesure et al., 1995; Haider, 2011; Taberlet et al., 1991). U javnoj bazi podataka, GenBank, danas je dostupan veliki broj sekvenci gena, introna i intergenskih spejsera (preko 660.000) hloroplastnog genoma. Velika većina pripada svakako cvetnicama (>570.000 sekvenci iz 94.825 taksona) a znatno manji broj golosemenicama (~20.000 sekvenci iz 1172 taksona). Pored toga, danas je javno dostupan i veliki broj kompletnih hloroplastnih genoma različitih vrsta (skoro 600).

Filogenetska sistematika je naučna disciplina koja se bavi utvrđivanjem evolutivnih odnosa između taksona na osnovu homologije nukleotida odabranih regiona DNK koji se odlikuju adekvatnom stopom mutacija. Ona klasifikuje taksonu u grupe koje imaju zajedničko poreklo (Wiley & Lieberman, 2011).

Molekularne sistematike zasnovane na hloroplastnom genomu su najpre koristile filogenetske informacije sadržane u razlikama u dužini restrikcionih profila ovog genoma dobijenim tretiranjem kompletnog genoma restrikcionim enzimima. Sa razvojem tehnologija za utvrđivanja primarnog redosleda nukleotida, komparativne studije pojedinih regiona plastoma su postale sve brojnije. Jedan od načešće korišćenih regiona hloroplastnog genoma u ranim studijama na višim taksonomskim nivoima je svakako *rbL* gen (Clegg et al., 1994). I dok se jedan broj autora fokusirao na kodirajuće regione i rešavanje problema filogenetskih odnosa viših taksonomskih kategorija, drugi su se okrenuli ispitivanjima nekodirajućih regiona plastoma sa ciljem razrešavanja evolutivnih odnosa na nižim nivoima (Shaw et al., 2005).

Polje komparativne plastidne genomike je začeto sredinom '80-ih godina XX veka, kada je utvrđen primarni redosled nukleotida kompletnog genoma *Nicotiana tabacum* i *Marchantia polymorpha* (Ohyama et al., 1986; Shinozaki et al., 1986). Danas je broj kompletnih hloroplastnih genoma dostupnih u javnim bankama gena 587 za kopnene biljke (NCBI GenBank, 28-feb-2015). Ovakvi genomski resursi danas omogućavaju bolje razumevanje organizacije hloroplastnog genoma, brzine evolucije njegovih sekvenci, mehanizama evolucionih promena kao i filogenetskih odnosa između kopnenih biljaka (Jansen & Ruhlman, 2012).

### 1.4.3 Molekularna istraživanja roda *Juniperus*

Svakako najveći doprinos istraživanju kleke, pre svega sa molekularnog i fitohemijskog aspekta dao je R.P. Adams. Istraživanja roda *Juniperus* na molekularnom nivou su se pre svega odnosila na filogeografski aspekt i filogenetske odnose unutar roda, a pogotovu između veoma bliskih taksona. Na osnovu anatomske-morfoloških, fitohemijskih i molekularnih markera (odabrani intergenski spejseri hloroplastnog genoma i ITS sekvenci nuklearnog genoma), nekoliko novih vrsta roda *Juniperus* je opisano (Adams, 1999, 2000a, 2000b, 2000c, 2000d, 2008, 2009; Adams & Demeke, 1993; Adams & Hojjati, 2012; Adams & Kauffmann; Adams & Mataraci, 2011; Adams & Nguyen, 2005; Adams & Pandey, 2003; Adams & Schwarzbach, 2012a, 2012b, 2013a, 2013b; Adams et al., 2002, 2003a, 2003b, 2006, 2006, 2008a, 2008b, 2008c, 2010a, 2010b, 2011a, 2011b, 2012, 2014a, 2014b, 2014c, 2014d; James, 2009; Michalczyk, 2008; Sultangaziev et al., 2012; Terry et al., 2000; Wubet et al., 2006; Zhang et al., 2008, 2005).

U GenkBank bazi (28-feb-2015) postoji preko 2800 dostupnih sekvenci hloroplastnog (1392), nuklearnog (1206) i mitochondrijalnog (24) genoma 94 taksona roda *Juniperus*. Pojedinačno, najveći broj dostupnih sekvenci za sva tri genoma pripadaju *Juniperus blancoi* (543), *J. communis* (211), *J. virginiana* (151), *J. przewalskii* (140), *J. tibetica* (140) i *J. oxycedrus* (105). Neki od najčešće proučavanih regiona hloroplastnog genoma su geni: *rbcL*, *matK*, *trnV*, *rpoC1*, *ndbF*, *psbB*, *rpl2*, *psbD*, *psbC*, *atpB*, kao i intergenski spejseri: *trnL-trnF*, *trnS-trnG*, *trnD-trnT*, *rps4-trnS*, *petB-petD*, *psbK-psbI*, *psbA-trnH*, *atpF-atpH*, *petG-trnP*.

Pored primarnog redosleda nukleotida navedenih regiona hloroplastnog genoma, dostupni su i kompletni plastomi za četiri vrste ovog roda (Guo et al., 2014).

Ilustracija: *Juniperus sibirica* Lodd., Jovanović, B. (1970). Flora SR Srbije I, M. Josifović, ed. (Belgrade, Serbia: SANU), pp. 159.



# 2

## CILJEVI DOKTORSKE DISERTACIJE



Balkansko poluostrvo predstavlja floristički najraznovrsnije područje Evropskog kontinenta. Na ovom području, tokom vremena biljni svet je bio izložen najrazličitijim uticajima biotičkih i abiotičkih faktora, što je dovelo do toga da se na relativno malom prostoru nađe izuzetno veliki broj različitih taksona, čiji filogenetski i taksonomski odnosi još uvek nisu u potpunosti rasvetljeni.

Na Balkanskom poluostrvu, u okviru roda *Juniperus* L. (Cupressaceae) rastu tri vrste sekcije *Juniperus* sa nekoliko varijeteta (*J. communis*, *J. deltoides*, *J. macrocarpa*). Iako svi naseljavaju sušna staništa, distribucija ovih taksona je takva da se retko kad sva tri mogu naći na istom staništu: *Juniperus macrocarpa* i *J. deltoides* su mediteranske vrste, dok se varijeteti *J. communis* nalaze uvek duboko u kopnu (*J. communis* var. *communis*) ili pak na većim nadmorskim visinama na Balkanu (*J. communis* var. *saxatilis*). Kopaonik je jedini lokalitet, gde na istom staništu mogu da se nađu da rastu zajedno *J. communis* var. *communis*, *J. communis* var. *saxatilis* i *J. deltoides*.

Najveći areal u rodu *Juniperus* ima vrsta *J. communis* – prostire se od Severne Amerike, preko Grenlanda i Islanda, cele Evrope sve do Japana na istoku. Takođe, ovaj takson se u morfološkom pogledu odlikuje izuzetnom varijabilnošću. Najveći deo te varijabilnosti mogao bi se objasniti izuzetno komplikovanom istorijom ovog taksona, dodatno usloženom činjenicom, da se pre samo 10.000 godina, najveći deo njegovog areala nalazio pod glečerima. S druge strane, Balkan predstavlja gotovo najveći i geografski centralni deo areala *J. deltoides*, dok za *J. macrocarpa*, vrstu sa izuzetno fragmentisanim arealom, on predstavlja tek njen istočni deo.

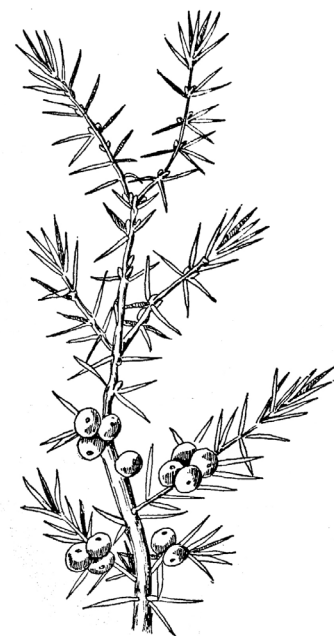
Ovi taksoni su izuzetno slabo istraženi sa taksonomskog i filogenetskog aspekta, a malo se zna i o njihovoj geografskoj i biološkoj distribuciji i diferencijaciji na prostoru Balkana. Svi dosadašnji dostupni podaci o ovim taksonima su ograničeni na relativno mali broj istraženih jedinki i populacija.



Imajući sve ovo u vidu, ciljevi ove disertacije se mogu sumirati u nekoliko teza:

1. Upoznavanje sastava, sadržaja i varijabilnosti alkana u kutikularnim voskovima četina prirodnih populacija vrsta sekcije *Juniperus* (*Juniperus* L., Cupressaceae) sa Balkanskog poluostrva
2. Upoznavanje sastava, sadržaja i varijabilnosti terpena u četinama (listovima) prirodnih populacija vrsta sekcije *Juniperus*
3. Utvrđivanje hemotaksonomskog značaja alkana i terpena kod prirodnih populacija istraživanih vrsta
4. Utvrđivanje diferencijacije i odnosa u okviru sekcije *Juniperus* sa Balkanskog poluostrva korišćenjem odabranih regiona hloroplastnog genoma
5. Utvrđivanje saglasnosti podataka dobijenih fitohemijskim i molekularnim markerima prirodnih populacija analizarnih taksona

Ilustracija: *Juniperus communis* L., Jovanović, B. (1970). Flora SR Srbije I, M. Josifović, ed. (Belgrade, Serbia: SANU), pp. 159.



# 3

## MATERIJAL I METODE

### 3.1 Uzorkovanje biljnog materijala

Biljni materijal (po 15 grana sa muškim odnosno ženskim strobilusima) je sakupljan tokom letnjih meseci u periodu od 2009. do 2012. godine sa šireg područja Balkanskog poluostrva, vodeći računa o što većem diverzitetu staništa. Pregled lokaliteta i njihovih karakteristika je dat u Tabeli 3.1. Prostorne distribucije uzorkovanih populacija *J. communis*, odnosno *J. deltooides* i *J. macrocarpa* date su na Slikama 3.1 i 3.2.

Biljni materijal za fitohemijska istraživanja (10-30 g) je na terenu odmah pakovan u PP zip kesice, i čuvan u terenskom frižideru do dolaska u laboratoriju. U laboratoriji je deo materijala za izolaciju *n*-alkana odvojen i osušen, dok je za izolaciju etarskog ulja čuvan na -20 °C do destilacije.

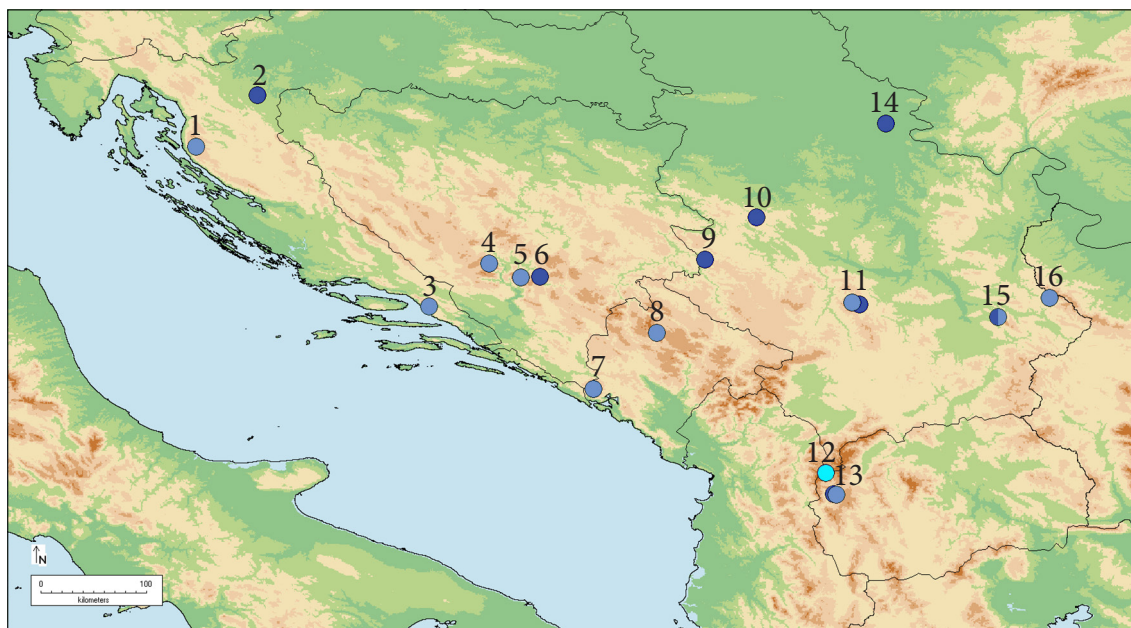
Za molekularne analize je uzorkovano ukupno 26 populacija, iz kojih je sakupljeno po pet jedinki po populaciji sa izuzetkom populacija *J. macrocarpa* sa Krita (10 jedinki po populaciji), i *J. deltooides* iz Raečke klisure (četiri jedinke po populaciji), tako da je uzorkovano ukupno 139 individua (Tabela 4.13). Uzorkovane adultne individue su bile međusobno udaljene najmanje 10 m, i ravnomerno raspoređene po populaciji. Zabeležen je pol svake individue. Na lokalitetu Resavska klisura (Srbija) je sakupljen i materijal (pet jedinki) *J. sabina* koje su korišćene kao autgrupa za molekularne analize. Materijal za DNK analize (grančice sa četinama) je na terenu pakovan u filter kesice sa silika gelom, i čuvan u mraku na sobnoj temperaturi do izolacije DNK. Detaljnije o jedinkama i populacijama je dato na Slikama 3.1 i 3.2, kao i u Tabeli 4.13

Eksikati za svaki lokalitet sa kojeg je sakupljen materijal za fitohemijske i molekularne analize su deponovani u Herbarijumu Instituta za botaniku i Botaničke bašte "Jevremovac" (BEOU).

**Tabela 3.1** Lokaliteti i karakteristike lokaliteta uzorkovanih populacija *J. communis*, *J. deltooides*, *J. macrocarpa*

Takson	Lokalitet	GPS koordinate		Alt (m)	Nagib (°)	Podloga	Analiza
		N (°)	E (°)				
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Neretva	43.554	18.071	350	30-40	krečnjak	c
	Slunj	45.168	15.562	270	< 10	krečnjak	c
	Galičnik (Mavrovo)	41.625	20.682	1600	10-20	krečnjak	a,b,c
	Deliblatska peščara	44.920	21.149	175	< 10	krečnjak	a,b,c
	Divčibare	44.087	19.998	880	20-40	krečnjak	a
	Kopaonik	43.312	20.914	850	30-60	silikat	a,b,c
	Stara planina	43.370	22.603	1600	< 10	krečnjak	a,b
	Suva planina	43.197	22.144	1300	5-20	krečnjak	a,b,c
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Zlatibor	43.707	19.540	850	< 10	krečnjak	a
	Čvrtnica	43.673	17.623	1460	10-20	krečnjak	a
	Prenj	43.549	17.904	1550	10-20	krečnjak	a,b,c
	Durmitor	43.059	19.110	1350	30-60	krečnjak	a,b
	Biokovo	43.293	17.087	1350	< 10	krečnjak	a,b,c
	Velebit	44.713	15.017	1500	30-60	krečnjak	a,b,c
	Mavrovo	41.622	20.708	1700	< 10	krečnjak	a,b,c
	Orjen	42.559	18.550	1550	30-60	krečnjak	a,c
	Kopaonik	43.326	20.845	1650	< 10	silikat	a,b,c
	Stara planina	43.371	22.604	1600	5-20	krečnjak	a,b
<i>J. communis</i> var. <i>intermedia</i>	Suva planina	43.197	22.144	1300	10-30	krečnjak	a,b,c
	Korab	41.816	20.612	1520	< 10	krečnjak	c
<i>J. macrocarpa</i>	Trogir	43.569	16.251	300	30-60	krečnjak	a,b,c
	Krit	35.330	25.091	30	< 10	krečnjak	c
<i>J. deltooides</i>	Benkovac	44.055	15.611	250	< 10	krečnjak	b,c
	Đevrske	43.941	15.837	230	30-45	krečnjak	a,b
	Konjevrate	43.780	15.987	170	< 10	krečnjak	b
	Kruševo	44.186	15.690	200	< 10	krečnjak	a,b,c
	Makarska	43.401	16.909	300	10-20	krečnjak	a,b
	Rovinj	45.086	13.781	100	< 10	krečnjak	a,b,c
	Senj	45.040	14.883	20	10-20	krečnjak	b
	Trogir	43.569	16.246	300	30-60	krečnjak	a,b,c
	Krit	35.342	24.843	300	30-40	krečnjak	c
	Raečka klisura	41.436	21.876	250	>40	krečnjak	c
	Valdanos	41.953	19.184	20	10-30	krečnjak	b,c
	Žanjice	42.401	18.580	10	10-20	krečnjak	b
	Kopaonik	43.312	20.908	850	30-40	silikat	a,b,c
Maglič	43.612	20.553	300	30-60	silikat	a,b	
Pčinja	42.358	21.884	750	30-60	krečnjak	a,b,c	

**a** - alkani, **b** - etarska ulja, **c** - cpDNA regioni

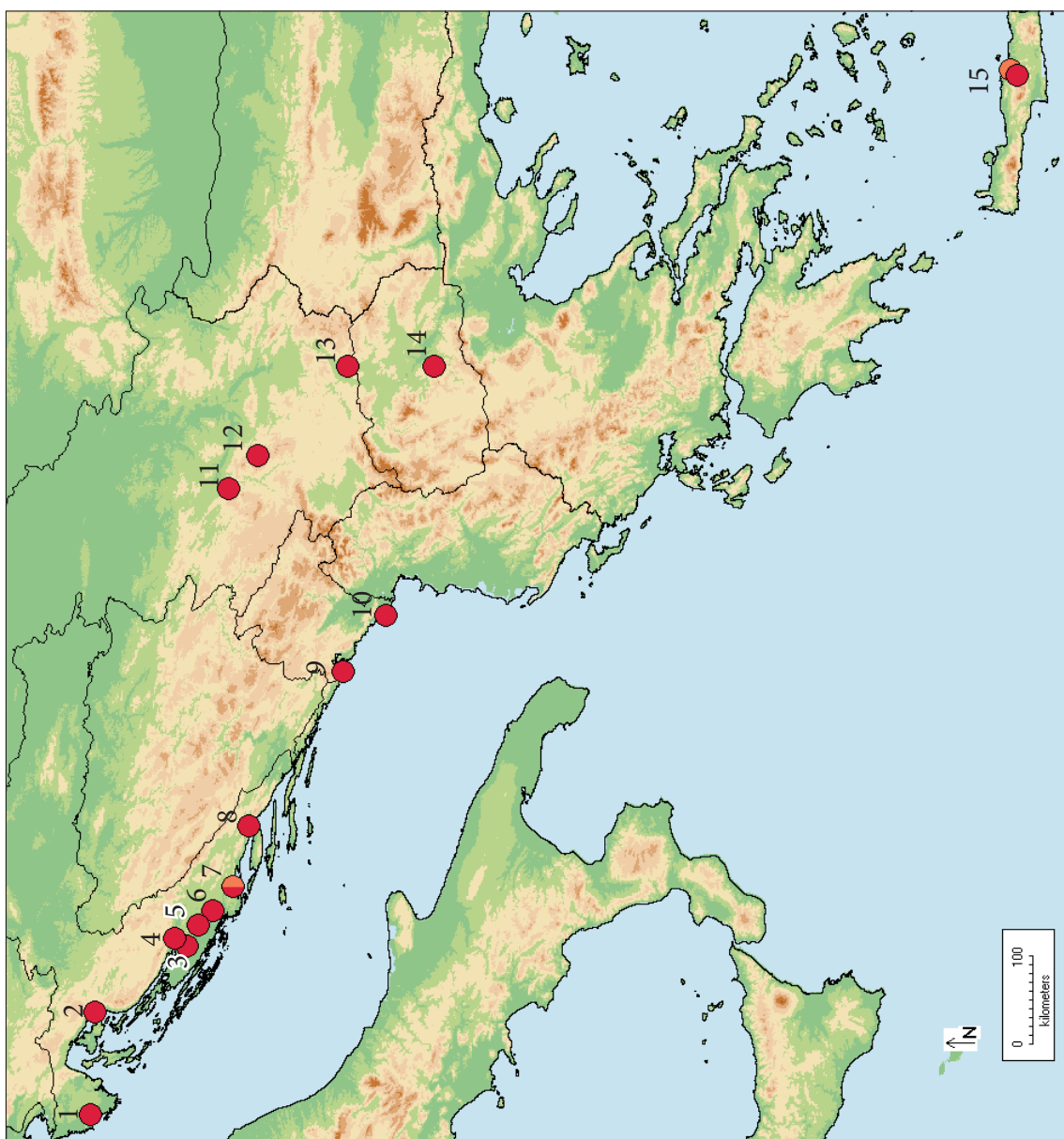


**Slika 3.1.** Prostorna distribucija odabranih populacija ● *J. communis* var. *communis*, ● *J. communis* var. *saxatilis*, ● *J. communis* var. *intermedia*. Karakteristike lokaliteta date u Tabeli 3.1. Analizirani: **a** - alkani, **b** - etarska ulja, **c** - cpDNA.

1	Velebit (a,b,c)	9	Zlatibor (a)
2	Slunj (c)	10	Divčibare (a)
3	Biokovo (a,b,c)	11	Kopaonik (a,b,c)
4	Čvrstica (a)	12	Korab (c)
5	Prenj (a,b,c)	13	Mavrovo (a,b,c)
6	Neretva (c)	14	Deliblatska peščara (a,b,c)
7	Orjen (a,c)	15	Suva planina (a,b,c)
8	Durmitor (a,b)	16	Stara planina (a,b)

**Slika 3.2.** Prostorna distribucija odabranih populacija *J. deltoides*, *J. macrocarpa*; Karakteristike lokaliteta date u Tabeli 3.1  
 Analizirani: **a** - alkani, **b** - etarska ulja, **c** - cpDNA.

- 1 Rovinj (a,b,c)
- 2 Senj (b)
- 3 Benkovac (b,c)
- 4 Kruševo (a,b,c)
- 5 Đevrske (a,b)
- 6 Konjevrate (b)
- 7 Trogir (a,b,c)
- 8 Makarska (a,b)
- 9 Žanjice (b)
- 10 Valdanos (b,c)
- 11 Maglič (a,b,c)
- 12 Kopaonik (a,b,c)
- 13 Pčinja (a,b,c)
- 14 Raečka klisura (c)
- 15 Krit (c)



## 3.2 Fitohemijski markeri

### 3.2.1 Izolovanje *n*-alkana

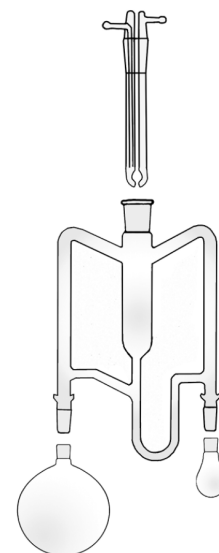
Za dobijanje površinskih alkana, celi listovi (1 g) su potapani u 10 ml *n*-heksana (HPLC grade, Promochem) na 60 sekundi. Nakon filtracije na kvalitativnom filter papiru (70 g/m<sup>2</sup>), ekstrakt je koncentrisan na sobnoj temperaturi i potom eluiran sa 5 ml *n*-heksana kroz mini-kolonu (pipeta po Pasteru napunjena silikom aktiviranom prethodno na 120 °C (Florisil® 50-100 mesh, Promochem) i anhidrovanim natrijum-sulfatom (Alkaloid, Skopje) (Slika 3.3). Dobijeni prečišćeni ekstrakt je koncentrovan na zapreminu od 0,5 ml i čuvan u tamnim vijalama u frižideru na +4 °C do dalje analize.



**Slika 3.3.** Mini kolona u pipeti po Pasteuru: **V** - vata, **S** - Florisil®, **N** - anhidrovani natrijum-sulfat

### 3.2.2 Izolovanje etarskog ulja

Proučavane vrste roda *Juniperus* čuvaju etarska ulja u žlezdanim kanalima u listovima. Iz toga razloga, biljni materijal za ekstrakciju etarskog ulja (6-20 g) je usitnjen u laboratorijskom blenderu (Waring 8010BU, USA) kako bi se dobio najveći mogući prinos. Usitnjen biljni materijal je potopljen u 250 ml destilovane vode, a izolacija etarskog ulja je vršena simultanom hidro-destilacijom i ekstrakcijom koristeći aparaturu po Likens-Nikersonu (Chaintreau, 2001) (Slika 3.4). Ekstrakcija je vršena dihlor-metanom (p.a., Alkaloid, Skopje). Dobijeno je etarsko ulje oštrog mirisa rastvoreno u 1,0-1,5 ml dihlor-metana, koje je čuvano u tamnim vijalama na +4 °C do GC-FID i GC/MS analize



**Slika 3.4.** Aparatura za simultanu destilaciju i ekstrakciju po Likens-Nikersonu

### 3.2.3 GC-FID i GC-MS analiza etarskog ulja i alkana

Za GC-FID i GC-MS analizu korišćen je GC sistem Agilent 7890A i MSD Agilent 5975C, FID detektorom i temperaturom od 250 °C. Razdvajanje je vršeno na koloni DB-5 Agilent 19091S - 433, dužine 30 m, unutrašnjeg prečnika 0,25 mm i debljine filma 0,25 µm. Temperatura kolone je linearno programirana od 60 °C do 300 °C sa promenom od 3 °C/min. Temperatura detektora bila je 230 °C. Kao noseći gas korišćen je helijum pod konstantnim pritiskom (1,0 ml/min, 210 °C). Injektovano je 1 µl uzorka u odnosu 10:1. Merenje masa (EI-MS; 70 eV) vršeno je u opsegu 33-550 m/z. Za injektovanje je korišćen injektor Agilent 7683B, injektovano je 1 µl, spilt odnos 1:10.

Pretraga biblioteke i masena spektralna dekonvolucija i ekstrakcija vršena je upoređivanjem retencionih vremena i masenih spektara pomoću ADAMS i NIST05 baza korišćenjem softvera MSD Chem Station E.01.00.237m sa retencionim indeksom (RI) kalibracione data analize podešenim na visok nivo i sa 10% greške za jedninja bez RI. RI su eksperimentalno utvrđene korišćenjem standardnih metoda uključujući retenciono vreme ( $t_R$ ) n-alkana, koje su injektovanje nakon uzoraka pod istim hromatografskim uslovima. Pretraga jedinjenja je vršena u sopstvenoj bazi sačinjenoj iz 4972 septra. Apsolutni udeo identifikovanih jedinjenja je izračunat iz površine GC pika na GC-FID spektru.



### 3.2.4 Statistička obrada

#### *n*-Alkani

Pre statističke obrade, relativni odnos kratko- ( $C_{18}$ - $C_{20}$ ), srednje- ( $C_{21}$ - $C_{24}$ ) i dugolančanih alkana ( $C_{25}$ - $C_{33}$ ) je izračunat (Nikolic et al., 2009). Izračunata je takođe i srednja dužina lanca ( $N$ ) kao i disperzija oko nje ( $d$ ), prema formulama koje su predložili Dodd et Afzal-Rafii (2000):

$$(1) N = \sum n_i p_i$$

$$(2) d = \sum p_i (n_i - N)^2$$

Gde je  $n_i$  broj ugljenika  $i$ -tog alkana, a  $p_i$  njegov procentualni udeo u epikutikularnim voskovima. Za izračunavanje  $N$  i  $d$  korišćeni su samo alkani sa relativnim udelom većim od 1%.

#### Etarska ulja

Sirovi podaci za etarska ulja nisu dodatno obrađivani. Određen je udeo pojedinih grupa terpena (monoterpena, oksigenisanih monoterepna, seskviterpena, oksigenisanih seskviterpena, diterpena), kao i drugih alifatičnih i aromatičnih ugljovodonika prisutnih u etarskom ulju. Za univarijantne i multivarijantne testove korišćeni su samo podaci koji su pokazali normalnu distribuciju na celom setu podataka, koji nisu bili visoko korelisani ( $r^2 < 0,7$ ) i koji su imali udeo veći od 0,1%.

## Bioklimatski i orogeografski podaci

Klimatske karakteristike lokaliteta uzorkovanih populacija su preuzeti iz WorldClim seta globalnih klimatskih lejera (Hijmans et al., 2005). Ekstrakcija bioklimatskih i orogeografskih parametara je izvršena u programu DIVA-GIS 7.5 (Hijmans et al., 2012).

Bioklimatski parametri su računati na osnovu vrednosti mesečnih temperatura i padavina da bi se dobile varijable sa biološkim značajem. Oni predstavljaju godišnje trendove (npr. srednja godišnja temperatura ili godišnja padavine), sezonalnost (npr. godišnji raspon temperature i padavina), kao i ekstremne ili ograničavajuće faktore (npr. najmanje i najviše temperature, najsuvlji i najvlažniji meseci itd). Pod pojmom kvartal ili perioda se označava period od 3 meseca.

Spisak bioklimatskih parametara:

- BIO1** – srednja godišnja temperatura
- BIO2** – srednji dnevni opseg (srednja vrednost razlike temperaturnih minimuma i maksimuma u toku meseca)
- BIO3** – izotermalnost  $(\text{BIO2}/\text{BIO7}) \cdot 100$
- BIO4** – temperaturna sezonalnost (standardna devijacija \* 100)
- BIO5** – najviša temperatura najtoplijeg meseca
- BIO6** – najmanja temperatura najhladnijeg meseca
- BIO7** – temperaturni opseg  $(\text{BIO5}-\text{BIO6})$
- BIO8** – srednja temperatura najvlažnijeg kvartala
- BIO9** – srednja temperatura najsuvljeg kvartala
- BIO10** – srednja temperatura najtoplijeg kvartala
- BIO11** – srednja temperatura najhladnijeg kvartala
- BIO12** – ukupne godišnje padavine
- BIO13** – ukupne padavine u najvlažnijem mesecu
- BIO14** – ukupne padavine u najsušnijem mesecu
- BIO15** – sezonalnost padavina (koeficijent varijacije)
- BIO16** – ukupne padavine u najvlažnijem kvartalu
- BIO17** – ukupne padavine u najsušnijem kvartalu
- BIO18** – ukupne padavine u najtoplijem kvartalu
- BIO19** – ukupne padavine u najhladnijem kvartalu

## Statistička obrada fitohemijskih markera

Urađena je osnovna statistika za svaki set podataka – srednja vrednost i standardne devijacije i histogrami, te provereno da li podaci imaju normalnu distribuciju (*Shapiro-Wilkinson*-ov koeficijent). ANOVA – univarijantna analiza varijanse kao i neparametarski testovi (*Mann-Whitney*, *Kruskal-Wallis*) su korišćeni za utvrđivanje parametara koji grupišu/razlikuju populacije. Gde je bilo neophodno, varijable su *log*-transformisane ( $\log_{10}(X+1)$ ) kako bi se dobila normalna distribucija. Linearna korelacija između parametara je takođe korišćena da bi se utvrdila potencijalna veza između različitih komponenti alkana odnosno etarskog ulja, kao i veza sa bioklimatskim i orogeografskim parametrima.

Korišćene su multivariacione metode: analiza glavnih komponenti (PCA), diskriminantna analiza (DA), hijerarhijska klaster analiza (HCA), kao testovi koji su u stanju da ukažu na tendenciju i struktuiranje skupa, kao i odnos individua i karaktera. Testirano je više klaster metoda (UPGMA, *nearest-neighbour*, *Ward*-ova metoda) i računanja distanci (*Euclidean*, *Sq. Euclidean*, *Mahalanobis*, *Sq. Mahalanobis...*), kako bi se izabrale najadekvatnije. Mantelov i Parcijalni mantelov test su korišćeni za utvrđivanje korelacije između variranja karaktera i bioklimatskih i orogeografskih karakteristika.

Za statističku obradu fitohemijskih markera korišćeni su Past v. 2.17b i 3.03 (Hammer et al., 2001) i SPSS Statistics 20 (IBM).

### 3.3. Molekularni markeri

#### 3.3.1 Izolovanje DNK

Izolacija DNK je rađena prema protokolu Aleksić et al. (2012) koji predstavlja modifikaciju standardnog CTAB protokola (Doyle & Doyle, 1987). Mlade suve iglice svake individue (30-60 mg) su stavljene u sterilne tubice od 2,0 ml i ostavljene preko noći na  $-70^{\circ}\text{C}$ , a potom homogenizivane korišćenjem TissueLyzer II (Quiagen) do finog praha. U svaki alikvot je pre ekstrakcije dodato po 1 mg PVP10 i aktivnog uglja koji predstavljaju adsorbente polifenola. Ekstrakcioni pufer, zagrejan na  $65^{\circ}\text{C}$ , se sastojao od 2% CTAB rastvora (1,4M NaCl, 20mM EDTA pH=8, 100mM Tris pH=8, 2% CTAB) sa 0,5%  $\beta$ -merkaptioetanolom dodatim neposredno pre ekstrakcije. Izolati su prečišćavani SEVAG-om (u cilju uklanjanja proteina) i dodatno tretirani visokim koncentracijama NaCl (4M, radi uklanjanja polisaharida). Precipitacija je izvršena izopropanolom a ispiranje 70% etanolom. Dobijeni pelati DNK su osušeni i zatim rastvoreni u 150  $\mu\text{l}$  dejonizovane sterilne vode. Narednog dana su izolati tretirani RNazom A radi uklanjanja RNK (0,5  $\mu\text{l}$  po uzorku, 30 min na  $37^{\circ}\text{C}$ ). Utvrđene su koncentracije i čistoće DNK izolata putem merenja absorbanci na 230, 260 i 280 nm. DNK ima maksimum apsorbcije na 260 nm, a vrednosti odnosa apsorbanci  $A_{260}/A_{280}$  ispod 1,7 i iznad 2,0 ukazuju na zagađenje proteinima ili RNK, respektivno, a vrednosti odnosa absorbanci  $A_{260}/A_{230}$  ispod 1,7 na zagađenje polisaharidima. Napravljeni su radni rastvori DNK koncentracija 200 ng/ $\mu\text{l}$ .

Hemikalije korišćene za ekstrakciju ukupne DNK: CTAB (Serva, Heidelberg, Germany); EDTA (VWR BDH Prolabo, Leicestershire, England); Tris-HCl (VWR BDH Prolabo, Leicestershire, England); NaCl (Alkaloid, Skopje);  $\beta$ -merkaptioetanol (Serva, Heidelberg, Nemačka), aktivni ugalj (Centrohem, Stara Pazova), polyvinylpyrrolidone 10 (PVP 10) (Sigma Aldrich), SEVAG [24:1 (v/v) hloroform (Centrohem, Stara Pazova): izoamil alkohol (Centrohem, Stara Pazova, Serbia)], izopropanol (VWR BDH Prolabo, Leicestershire, Engleska), 70 % etanol (Superlab, Beograd), RNase A (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija) i sterilna dejonizovana voda.

**Tabela 3.2** Karakteristike odabranih kloroplastnih regiona, prajmeri za njihovu amplifikaciju i sekvenciranje, i reference

Region	Tačan naziv prajmera <sup>a)</sup>	Lokacija prajmera	Sekvenca (5'-3')	Smer	Očekivana dužina <sup>c)</sup>	Referenca
<i>rpl32-trnL</i> <sup>(UAG)</sup>	rpL32-F	<i>rpl32</i>	CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT	F	543-1417	Shaw et al., 2007
	trnL <sup>(UAG)</sup>	<i>trnL</i> <sup>(UAG)</sup>	CAG TTC CAA AAA AAC GTA CTT C	R		Shaw et al., 2007
<i>3'rps16-5'trnK</i>	rpS16x2F2	<i>3'rps16</i>	AAA GTG GGT TTT TAT GAT CC	F	529-1008	Shaw et al., 2007
	trnK <sup>(UUU)</sup> x1	<i>5'trnK</i> <sup>(UUU)</sup>	TTA AAA GCC GAG TAC TCT ACC	R		Shaw et al., 2007
<i>trnG</i> <sup>(UUU)</sup> - <i>trnS</i> <sup>(GCC)</sup>	trnG <sup>(UUU)</sup>		<b>GAA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C</b>	F	844	Hamilton et al., 1999
	trnS <sup>(GCC)</sup>		GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC	R		Hamilton et al., 1999
<i>psbA-trnH</i> <sup>(GUG)</sup>	psbA3f	<i>3'psbA</i>	<b>GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C</b>	F	495	Tate & Simpson, 2003
	trnH_f05	trnH	<b>CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC</b>	R		Tate & Simpson, 2003
<i>trnL</i> <sup>(UAA)</sup> - <i>trnF</i> <sup>(GAA)</sup>	e	trnL <sup>(UAA)</sup> 3'exon	<b>GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC</b>	F	158-438	Taberlet et al., 1991
	f	trnF <sup>(GAA)</sup>	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	R		Taberlet et al., 1991
<i>trnC</i> <sup>(GCA)</sup> - <i>trnD</i> <sup>(GUC)</sup>	trnC	<i>3'trnC</i>	<b>CCA GTT CAA ATC TGG GTG TC</b>	F	3000	Demesure et al., 1995
	petNi1	<i>petN</i>	<b>GAG GGA TTC GTA TGG ATA TAG TCG</b>	F		Aleksić, J.M. <sup>b)</sup>
	psbMi2	<i>psbM</i>	<b>TGA GGC TTC GTT TGT GCG T</b>	F		Aleksić, J.M. <sup>b)</sup>
	trnD	<i>trnD</i>	GGG ATT GTA GTT CAA TTG GT	R		Demesure et al., 1995
	trnDiR2	<i>trnDiR</i>	<b>CCT GTC AAG ACG GAA GTT GC</b>	R		Aleksić, J.M. <sup>b)</sup>

Prajmeri obeleženi masnim slovima su korišćeni za sekvenciranje dobijenih PCR produkata;

<sup>a)</sup> Originalni naziv prajmera kako je nevedeno u referenci; <sup>b)</sup> primarna sekvencna nukleotida regiona *trnC*<sup>(GCA)</sup>-*trnD*<sup>(GUC)</sup> je utvrđena korišćenjem dodatnih internih prajmera dizajniranih na osnovu sekvenci kloroplastnog genoma 2 vrste roda *Juniperus* dostupnih u GenBank (*J. virginiana*, *J. scopolorum*); <sup>c)</sup> dužina regiona (bp) navedenih u referenci

### 3.3.2 PCR amplifikacija hloroplastnih sekvenci

Za inicijalno testiranje su izabrani regioni koji su do danas najčešće korišćeni kod različitih predstavnika roda *Juniperus* (*trnC*<sup>(GCA)</sup>-*trnD*<sup>(GUC)</sup>, *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup>, *trnG*<sup>(UUC)</sup>-*trnS*<sup>(GCU)</sup> i *psbA-trnH*<sup>(GUG)</sup>) i za koje je inicijalna pretraga sekvenci dostupnih u javnoj banci gena GenBank (07-feb-2013) pokazala da su varijabilni (*trnC*<sup>(GCA)</sup>-*trnD*<sup>(GUC)</sup>): ukupno 16 dostupnih sekvenci generisanih iz 3 vrste i 1 forme; *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup>: 57 sekvenci iz 3 vrste i 3 varijeteta; *trnG*<sup>(UUC)</sup>-*trnS*<sup>(GCU)</sup>: 206 sekvenci iz 50 vrsta i 3 varijeteta; *psbA-trnH*<sup>(GUG)</sup>: 19 sekvenci iz 10 vrsta). Korišćena su i dva regiona koja do sada nisu proučavana kod vrsta roda *Juniperus*, a pokazali su se kao izuzetno informativni na infraspecijskom nivou kod drugih vrsta: *rpl32-trnL*<sup>(UAG)</sup> i 3'*rps16*-5'*trnK*, informativni kod velikog broja familija cvetnica i golosemenica (Shaw et al., 2007). Korišćeni regioni, sekvence prajmera za njihovu amplifikaciju, njihovi autori i dužine regiona navedene u originalnim referencama su date u Tabeli 3.2.

Za PCR amplifikaciju je kao matrica korišćena ukupna genomska DNK u koncentraciji od 200 ng po reakciji. Reakcije su izvođene u ukupnoj zapremini od 25 µl po reakciji. Za master miks korišćene su sledeće hemikalije: 1xTaq DNK pufer (Fermentas UAB, Vilnius, Lituanija), 0,2 mM dNTP, 0,1 µM F i R prajmeri, 0,80% BSA (Bovine Serum Albumin, Germentas UAB, Lituanija) i 0,025 U *Taq* DNK polimeraze (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija). Za PCR amplifikaciju je korišćen peqStar 96 Universal Gradient Thermal Cycler (peqLab biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) prema protokolu datom u Tabeli 3.3:

**Tabela 3.3** Program PCR amplifikacije testiranih cpDNA regiona

	<i>rpl32-trnL</i> , <i>rps16-trnK</i>	<i>trnG-trnS</i>	<i>psbA-trnH</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnC-trnD</i>
1. Inicijalna denaturacija	94 °C, 10 min				
2. Denaturacija	94°C, 45s			94°C, 60s	
3. Annealing	53 °C, 60s	60 °C, 60s	61 °C, 60s	54,5 °C, 60s	50 °C, 60s
4. Ekstenzija	72 °C, 60s			72 °C, 120s	72 °C, 120s
<i>Koraci 2-4 su ponovljeni 39 puta</i>					
5. Finalna ekstenzija	72 °C, 10 min				

Uspešnost PCR reakcija kod svih testiranih regiona je proverena elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu. Po 3,5  $\mu$ l PCR produkta i Midori Green Direct Stain (NIPPON Genetics Europe GmbH, Dueren, Nemačka) je nanošeno na gel. Midori Green Direct Stain interkalira sa molekulom DNK i omogućava vizuelizaciju PCR produkta na UV transiluminatoru (Vilber, Lourmat ECX-F20.M transilluminator, Cedex, Francuska). Za dalju amplifikaciju kod preostalih individua su korišćeni regioni kod kojih su uočeni jasni bendovi na agaroznom gelu.

### 3.3.3 Utvrđivanje primarnog redosleda nukleotida PCR proizvoda

Utvrđivanje primarnog redosleda nukleotida dobijenih PCR produkata po Sanger metodi urađeno je komercijalno od strane MacroGen Europe (Amsterdam, Holandija, <http://dna.macrogen.com>). Kapilarna elektroforeza je obavljena na 96-kapilarnom 3730xl DNK automatskom kapilarnom sekvencioneru (Applied Biosystems Inc., SAD). U zavisnosti od dužine sekvence, sekvenciranje je rađeno samo u jednom smeru tj. korišćenjem F prajmera (dužina PCR produkata oko 300-800 bp, *trnL-trnF*, *trnG-trnS*), u oba smera odnosno korišćenjem F i R prajmera (dužina produkata oko 600 bp, *psbA-trnH*) i u oba smera uz korišćenje F, R i interno-dizajniranih prajmera (dužina produkata oko 1600 bp, *trnC-trnD*). Karakteristike interno dizajniranih prajmera su date u Tabeli 3.4.

**Tabela 3.4** Karakteristike interno-dizajniranih prajmera

Prajmer:	petNi1	psbMi2	trnDiR2
Dužina (bp)	24	19	20
T <sub>m</sub> (°C)	53,8	57,1	56,1
CG%	45,8	52,6	55,0
MW <sup>a)</sup>	7488	5857	6142
Kvalitet prajmera	70,0	87,0	84,0
Optimalna temperatura annealing-a	59,1-64,1	60,1-65,1	59,8-64,8

<sup>a)</sup> **MW** - molekulska masa; podaci dobijeni korišćenje programa Fast PCR (Kalendar et al., 2011)

Dobijene sekvence su najpre editovane korišćenjem Chromas Lite 2.0.1 (Technelysium, Australia). Za regione kod kojih je primarni redosled nukleotida utvrđen sekvencioniranjem sa više prajmera (npr. *psbA-trnH*, *trnC-trnD*), najpre su sklopljene koncenzus sekvence za svaku individuu. Sekvence svakog pojedinačnog regiona su zatim poravnate primenom programa MUSCLE (Edgar, 2004) implementiranog u program MEGA 5.04 (Tamura et al., 2011) radi utvrđivanja homologije nukleotida. Automatska poravnanja su potom proverena i manuelno korigovana. Na kraju je konstruisan matriks sa svim uspešno amplifikovanim i sekvenciranim regionima kod svih individua.



### 3.3.4 Statistička obrada

Za svaki pojedinačni region koji je uspešno amplifikovan i sekvencioniran kod ispitivanih predstavnika roda *Juniperus* je utvrđen optimalni model evolucije sekvenci na osnovu originalnih podataka korišćenjem programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011).

Optimalni model evolucije za dati set podataka se utvrđuje na osnovu vrednosti BIC (Bayesian Information Criterion) kriterijuma. Polazeći od pretpostavke da su svi modeli podjednako verovatni, utvrđuje se model koji ima najveću posteriornu verovatnoću. Drugim rečima, model koji će imati najmanju BIC vrednost će biti i najoptimalniji za objašnjavanje realnog procesa molekularne evolucije ispitivanog regiona.

Različiti modeli evolucije sekvenci uzimaju u obzir različite modele supstitucija nukleotida u DNK molekulu koji se razlikuju po tome da li su podjednake ili ne frekvencije četiri baze u ispitivanom delu genoma, zatim, da li su brzine zamene jedne baze drugom jednake ( $AC=AG=AT=CG=CT=GT$ ) ili se razlikuju po parovima ili u potpunosti. Pored toga, za svaki model, program izračunava BIC vrednosti u slučajevima kada se uzima u obzir i udeo invarijabilnih mesta (model +I), različite brzine supstitucija baza u zavisnosti od lokacije (model +G), ili oba (model +I +G).

Najjednostavniji od svih modela je JC ili Jukes-Cantor model koji pretpostavlja da se sve baze nalaze sa podjednakom učestalošću i mutiraju istom brzinom (Jukes & Cantor, 1969). Ostali modeli polaze od pretpostavke da postoje razlike u učestalosti sva četiri nukleotida. HKY (Hasegawa-Kishino-Yano) model pretpostavlja da postoji nejednaka učestalost između transverzija i tranzicija (Hasegawa et al., 1985). T92 (Tamura troparametarski) model je primenljiv u slučajevima kada postoji veći udeo G+C nukleotida i veći broj tranzicija od transverzija (Tamura, 1992). TN93 (Tamura-Nei) model dodatno razlikuje dva tipa tranzicija, dok se pretpostavlja da se sve transverzije dešavaju sa podjednakom učestalošću (Tamura & Nei, 1993). Najčešće korišćeni model evolucije sekvenci je GTR (General Time Reversible model) jer pretpostavlja različite verovatnoće zamena jednog nukleotida drugim ( $AC \neq AG \neq AT \neq CG \neq CT \neq GT$ ) (Tavaré, 1986).

Optimalni modeli evolucije, procenjeni na osnovu najnižih BIC vrednosti, su utvrđeni najpre za svaki ispitivani region a zatim i za matricu sastavljenu od svih regiona koji su uspešno amplifikovani i sekvencirani. Pored toga, testirani su modeli evolucije i za matrice sastavljene od kodirajućih odnosno nekodirajućih delova ispitivanih regiona.

Za procenu heterogenosti stopa mutacija korišćen je *Tajima's relative rate* test u okviru programa MEGA 5.04 (Tamura et al., 2011) koji procenjuje da li postoji razlika u stopama mutacija između ispitivanih sekvenci. Ukoliko je  $p < 0,05$  odbacuje se nulta hipoteza da ne postoji razlika u brzini mutacije između tri sekvence odabrane od strane korisnika (Tajima, 1993).

Za rekonstrukciju filogenetskih stabala svakog od pojedinačnih regiona, kao i za matricu sastavljenu od svih regiona, korišćen je RAxML (Silvestro & Michalak, 2011; Stamatakis, 2014). RAxML (Randomized Axelerated Maximum Likelihood) je program za rekonstrukciju filogenetskih stabala baziran na uzastopnim i paralelnim Maximum Likelihood distancama. Korišćena je osnovna postavka parametara (-f funkcija). Statistička podrška za noduse je bazirana na 100 neparametarskih bootstrap replikacija (BS). BS vrednosti veće ili jednake 75% su uzete kao dobra podrška, dok su vrednosti 50 do 75% smatrane umerenom podrškom. Kako RAxML program rekonstruiše filogenetska stabla koristeći GTR modele evolucije, za one regione gde je drugi model evolucije pokazan kao optimalan korišćen je program MEGA 5.04 (Tamura et al., 2011). Stabla su vizualizovana, ožiljena i editovana u programu Figtree 1.4.2 (Rambaut, 2014).

Ilustracija: *Juniperus macrocarpa* Sibith. et Sm., Vidaković, M. (1982)  
Četinjače, M. Mirić, & P. Vranicki, eds. (Zagreb: Biblioteka Znanstvenih  
Radova), pp. 227.



# 4

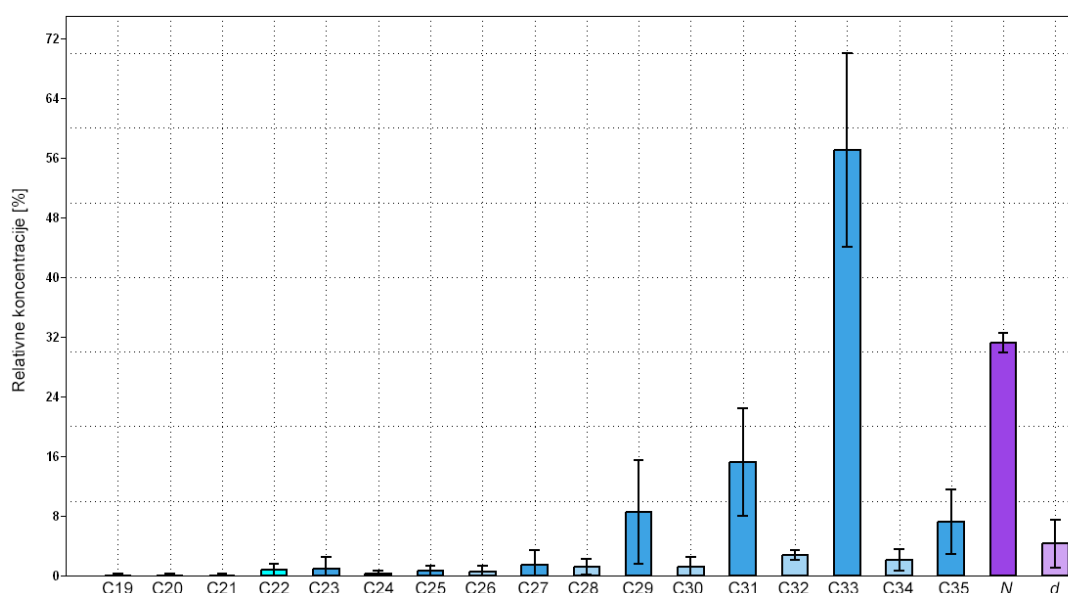
## REZULTATI

## 4.1 *n*-Alkani

### 4.1.1 Hemijski sastav i varijabilnost *n*-alkana ispitivanih taksona

Određen je relativni udeo pojedinačnih *n*-alkana u kutikularnim voskovima *J. communis* var. *communis*, *J. communis* var. *saxatilis*, *J. deltoides* i *J. macrocarpa*. Iz dobijenih podataka izračunate su prosečne dužine ugljovodoničnih lanaca (*N*) kao i distribucija oko njih (*d*), relativni udeo alkana kratkog ( $C_{16}$ - $C_{20}$ ), srednjeg ( $C_{21}$ - $C_{24}$ ) i dugog ( $C_{25}$ - $C_{35}$ ) niza.

U kutikularnim voskovima *J. communis* var. *communis* su detektovani *n*-alkani dugi od 19 do 35, dok su kod preostala tri taksona detektovani *n*-alkani dugi od 22 do 35 C atoma. U svim uzorcima dominantan alkan je tritriakontan ( $C_{33}$ ), što bi mogla biti karakteristika celog roda (Dodd & Poveda, 2003; Poveda et al., 2002; Tarasov et al., 2012; Tulloch & Bergter, 1981). U većim količinama su se nalazili i  $C_{29}$ ,  $C_{31}$ ,  $C_{35}$  (Slika 4.1.1). Relativni udeo alkana



**Slika 4.1.1.** Prosečna relativna količina alkana, *N* i *d* vrednost dobijene za Balkanske populacije odabranih vrsta sekcije *Juniperus* (srednja vrednost  $\pm$  SD)

kratkog i srednjeg niza je bio jako nizak, i kretao se od 0,0 do 1,9 % odnosno 0,6 - 5,6 % (Tabela 4.1), dok su svim uzorcima dominirali alkani dugog niza.

Iako je tritriakontan dominantan u svim uzorcima, u zavisnosti od druga dva dominantna alkana, srednja dužina ugljovodoničnih lanaca ( $N$ ) je varira od 28,3 do 32,8. Po taksonima, srednja dužina ugljovodoničnih lanaca ( $N$ ) je najmanja za *J. deltooides* (30,5) a najveća za *J. communis* (31,9), dok je disperzija oko  $N$  ( $d$ ) varirala od 1,4 do čak 10,4.

**Tabela 4.1** Količine alkana,  $N$  i  $d$  vrednosti uzorkovanih Balkanskih populacija vrsta sekcije *Juniperus* (srednja vrednost  $\pm$  SD)

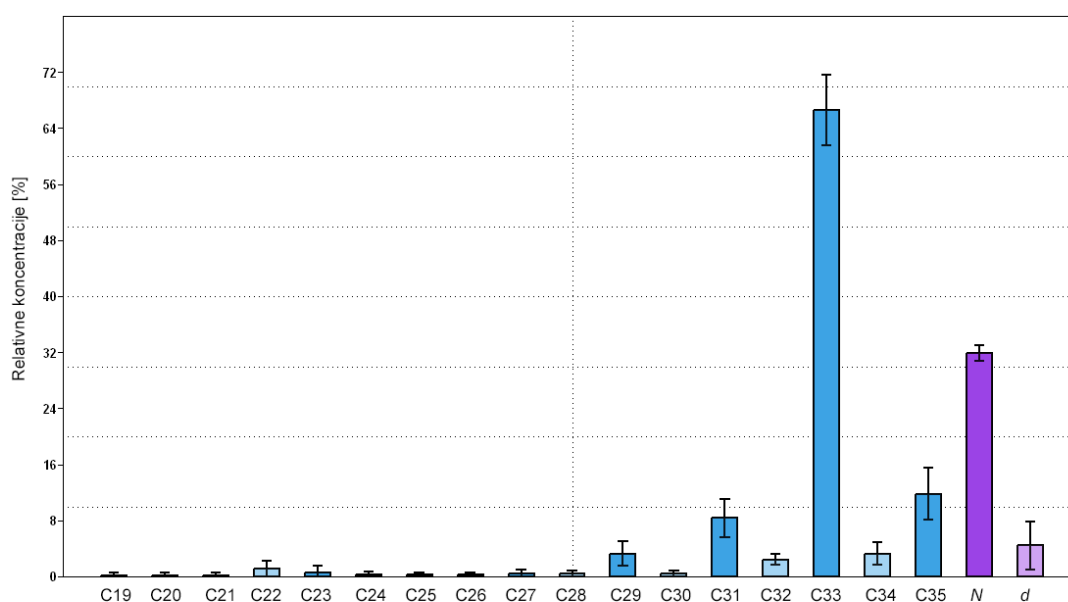
	$p$	<i>J. communis</i> var. <i>communis</i> n=118	<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i> n=210	<i>J. deltooides</i> n=175	<i>J. macrocarpa</i> n=20
C19	***	0.2 $\pm$ 0.4	– <sup>a</sup>	– <sup>a</sup>	– <sup>a</sup>
C20	***	0.2 $\pm$ 0.4	– <sup>a</sup>	– <sup>a</sup>	– <sup>a</sup>
C21	***	0.2 $\pm$ 0.4	– <sup>a</sup>	– <sup>a</sup>	– <sup>a</sup>
C22	***	1.2 $\pm$ 1.1	0.6 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	0.6 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	0.3 $\pm$ 0.1
C23	***	0.5 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	1.5 $\pm$ 2.1	0.3 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	0.6 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
C24	***	0.2 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	0.3 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	0.3 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.4
C25	***	0.2 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.7	2.6 $\pm$ 1.0
C26	***	0.3 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 1.1
C27	***	0.4 $\pm$ 0.6	1.1 $\pm$ 1.1	2.1 $\pm$ 2.3	5.4 $\pm$ 1.8
C28	***	0.5 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 1.0	3.8 $\pm$ 1.2
C29	***	3.3 $\pm$ 1.7	7.4 $\pm$ 5.0	13.4 $\pm$ 8.7 <sup>a</sup>	12.6 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>
C30	***	0.4 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 1.4	1.7 $\pm$ 1.0	3.2 $\pm$ 0.7
C31	***	8.3 $\pm$ 2.7	15.7 $\pm$ 7.4	19.1 $\pm$ 5.7 <sup>a</sup>	20.9 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup>
C32	***	2.4 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	3.1 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	2.5 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	3.0 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
C33	***	66.6 $\pm$ 5.1	59.1 $\pm$ 10.4	49.2 $\pm$ 14.0	41.2 $\pm$ 10.3
C34	***	3.2 $\pm$ 1.6	1.9 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	1.8 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	0.7 $\pm$ 0.3
C35	***	11.8 $\pm$ 3.7	6.3 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	5.9 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	2.3 $\pm$ 1.0
$N$	***	31.9 $\pm$ 1.1	31.4 $\pm$ 1.0	30.5 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	30.5 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
$d$	***	4.5 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	3.2 $\pm$ 1.8	5.6 $\pm$ 4.3 <sup>a</sup>	5.4 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>

$p$  - nivo značajnosti ANOVA (\*\*\*,  $p < 0,01$ ); <sup>a,b</sup> = grupe prema LSD testu ( $p < 0,05$ ); Količine alkana su date kao srednja vrednost  $\pm$  SD

#### 4.1.1.1 Hemijski sastav i varijabilnost *n*-alkana kod *Juniperus communis* var. *communis*

U kutikularnim voskovima izolovanim iz zrelih iglica *J. communis* var. *communis* su bili zastupljeni *n*-alkani dugi od 19 do 35 ugljenikovih atoma. Alkani kratkog niza su detektovani samo u dve populacije, gde su bili zastupljeni sa 1,2 odnosno 1,9 %, dok su alkani srednjeg niza detektovani u nešto većim količinama (1,2 - 4,7 %). Uzorcima su dominirali duži alkani, štaviše, gotovo svi alkani kraći od 29 ugljenikovih atoma su bili zastupljeni pojedinačno sa manje od 0,5 % (Tabela 4.2, Slika 4.1.2). U svim uzorcima je dominantan alkan tritriakontan. Pored njega se u svim uzorcima sreću i uvek ista druga dva dominantna alkana - hentriakontan ( $C_{31}$ ) i pentatriakontan ( $C_{35}$ ).

Prosečna dužina lanca ( $N$ ) je takođe varirala. Kod tri populacije (Deliblatska peščara, Kopaonik, Suva planina) kretala se između 32,3 i 32,8, dok je u kod ostalih populacijama uvek iznosila ispod 31,3. Visoka disperzija oko  $N$  ( $d$ ) je kod svih populacija velika, zbog često veoma visokog udela  $C_{22}$  ( $>2,0$  %). Najmanja je bila u populacijama sa Suve planine i iz Deliblatske peščare (2,5 i 2,9), dok je u ostalim populacijama varirala od 3,4 (Kopaonik) do čak 9,3 (Neretva).



**Slika 4.1.2.** Prosečna relativna količina alkana,  $N$  i  $d$  vrednost dobijene iz sedam populacija *J. communis* var. *communis* (srednja vrednost  $\pm$  SD)

Tabela 4.2 Količine alkana,  $N$  i  $d$  vrednosti uzorkovanih populacija *J. communis* var. *communis*

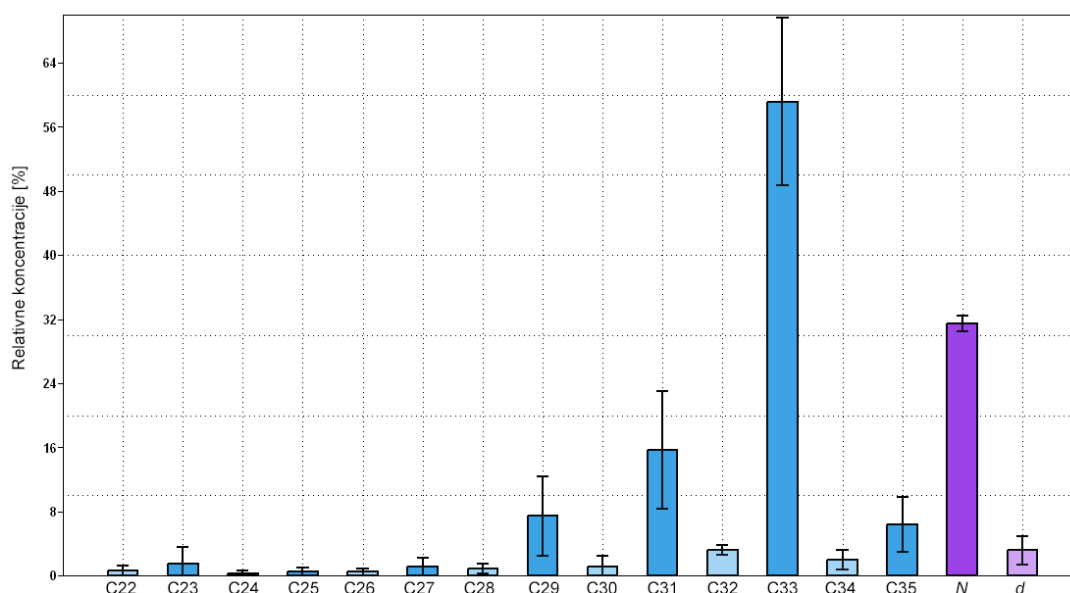
Komponente	K-W	$p$	Suva planina n=24	Deliblato n=30	Kopaonik n=21	Divčibare n=8	Zlatibor n=5	Neretva n=15	Mavrovo n=15
C19	114.12	***	-	-	-	-	-	1.0 ± 0.6 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.2 <sup>b</sup>
C20	114.66	***	-	-	-	-	-	0.9 ± 0.5	0.5 ± 0.2
C21	115.49	***	-	-	-	-	-	1.0 ± 0.5	0.5 ± 0.2
C22	19.93	**	0.8 ± 0.6 <sup>b</sup>	1.2 ± 1.2 <sup>a</sup>	1.8 ± 1.6 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.8	2.1 ± 1.0 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.4 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.6
C23	86.49	***	0.4 ± 0.4 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	-	2.0 ± 1.5 <sup>c</sup>	3.0 ± 2.5 <sup>c</sup>	1.0 ± 0.4	0.5 ± 0.2 <sup>b</sup>
C24	98.40	***	0.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	-	0.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.6 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.4 <sup>b</sup>	0.4 ± 0.1
C25	77.35	***	0.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.3	0.5 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.2 <sup>b</sup>
C26	52.23	***	0.3 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.4 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.4 ± 0.2 <sup>b</sup>
C27	79.05	***	0.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	-	0.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.3 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.3 <sup>b</sup>
C28	64.91	***	0.7 ± 0.3	0.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.6 ± 0.2 <sup>c</sup>
C29	84.52	***	2.9 ± 0.8	1.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	2.3 ± 1.3 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.6 <sup>b</sup>	3.5 ± 0.4 <sup>b</sup>	5.4 ± 1.1 <sup>c</sup>	5.9 ± 1.2 <sup>c</sup>
C30	61.93	***	0.6 ± 0.5 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.5 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.0 ± 0.2	0.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>b</sup>
C31	17.96	-	8.0 ± 2.3 <sup>a</sup>	8.0 ± 3.5 <sup>a</sup>	7.2 ± 2.8	8.2 ± 2.1 <sup>a</sup>	8.7 ± 1.0 <sup>a</sup>	9.2 ± 1.8 <sup>a</sup>	10.2 ± 2.2 <sup>a</sup>
C32	43.20	***	3.1 ± 0.6 <sup>b</sup>	2.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.4 <sup>b</sup>	2.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.4
C33	69.39	***	70.7 ± 1.7	67.7 ± 3.6	69.6 ± 4.4	66.1 ± 4.0	63.1 ± 2.8	58.6 ± 2.7	62.9 ± 1.9
C34	84.53	***	2.8 ± 0.8	4.3 ± 1.4 <sup>a</sup>	5.0 ± 1.5 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.7 <sup>b</sup>	1.4 ± 0.6 <sup>b</sup>	2.2 ± 0.3 <sup>b</sup>	2.1 ± 0.4 <sup>b</sup>
C35	31.32	***	9.5 ± 2.6 <sup>b</sup>	14.3 ± 3.7 <sup>a</sup>	11.6 ± 4.0 <sup>b</sup>	11.3 ± 2.4 <sup>b</sup>	11.0 ± 2.7 <sup>b</sup>	13.5 ± 2.8 <sup>a</sup>	9.8 ± 3.4 <sup>b</sup>
N	83.12	***	32.3 ± 0.4	32.8 ± 0.6 <sup>a</sup>	32.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	31.3 ± 0.9 <sup>b</sup>	30.6 ± 0.9 <sup>b</sup>	30.2 ± 1.0 <sup>b</sup>	30.9 ± 0.5 <sup>b</sup>
$d$	57.27	***	2.5 ± 0.8 <sup>a</sup>	2.9 ± 2.0 <sup>a</sup>	3.4 ± 1.8 <sup>a</sup>	5.5 ± 3.2 <sup>b</sup>	8.2 ± 4.0 <sup>c</sup>	9.3 ± 5.1 <sup>c</sup>	5.6 ± 1.8 <sup>b</sup>

**K-W** -  $\chi^2$  vrednosti *Kruskal-Wallis*-ovog testa;  $p$  - nivo značajnosti: \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ ; <sup>a,b,c</sup> - grupe prema *Mann-Whitney*-evom U testu; Količine alkana su date kao srednja vrednost ± SD

#### 4.1.1.2 Hemijski sastav i varijabilnost *n*-alkana kod *Juniperus communis* var. *saxatilis*

U kutikularnim voskovima izolovanim iz zrelih iglica *J. communis* var. *saxatilis* su bili zastupljeni *n*-alkani dugi od 22 do 35 ugljenikovih atoma. Alkani kratkog niza nisu detektovani u ovim uzorcima, dok su alkani srednjeg niza detektovani u manjim količinama (0,6 - 5,6 %). Štaviše, gotovo svi alkani kraći od 29 ugljenikovih atoma su bili zastupljeni pojedinačno sa manje od 1,0 % (Tabela 4.3, Slika 4.1.3). U svim uzorcima je dominantan alkan bio tritriakontan, dok su, u zavisnosti od lokaliteta druga dva dominantna alkana bila hentriakontan ( $C_{31}$ ) i pentatriakontan ( $C_{35}$ ) u kontinentalnim populacijama, odnosno nonakozan ( $C_{29}$ ) i hentriakontan ( $C_{31}$ ) u mediteranskim i submediteranskim populacijama.

Izolovani *n*-alkani pokazali su jasne kvantitativne razlike između istraživanih populacija *J. communis* var. *saxatilis*. Iako je tritriakontan bio dominantan u svim populacijama, u kontinentalnim populacijama (Kopaonik, Suva planina, Stara planina) su pored njega dominirali  $C_{31}$  (8,1 - 9,0 %) i  $C_{35}$  (6,2 - 10,2 %), dok su u mediteranskim i submediteranskim populacijama dominirali  $C_{29}$  (7,7 - 17,6 %) i  $C_{31}$  (15,3 - 25,3 %). Iako  $C_{35}$  nije bio među



**Slika 4.1.3.** Prosečna relativna količina alkana, *N* i *d* vrednost dobijene iz deset populacija *J. communis* var. *saxatilis* (srednja vrednost  $\pm$  SD)



tri dominantne komponente (sub)mediteranskih populacija, kod nekoliko populacija (Orjen, Durmitor i Čvrstica) bio je procentualno zastupljen isto kao i kod kontinentalnih (6,3 - 9,5 %), dok je u preostalim bio uvek niži od 3,6 %.

Prosečna dužina lanca ( $N$ ) je malo varirala – od submediteranskih populacija gde je detektovana najniža vrednost (30,3) do kontinentalnih kod kojih je detektovana najviša (32,6). Kontinentalne populacije imaju nešto veću  $N$  vrednost u odnosu na submediteranske, što je posledica prisustva veće relativne količine pentatriakontana u tim populacijama. Iako je kod ispitivanih populacija  $N$  malo varirala, populacije se ipak mogu podeliti na tri grupe:

(1) *Grupa I* koja obuhvata sve kontinentalne populacije (Kopaonik, Suva planina, Stara planina) sa  $N$  vrednošću između 32,1 i 32,6.

(2) *Grupa II* koja obuhvata populacije Velebit, Orjen i Durmitor koje su sve priobalne ili udaljene ne više od 90 km od obale, ali rastu na terenu sa velikim nagibom;  $N$  je kod ovih populacija između 31,1 i 31,5.

(3) *Grupa III* koja obuhvata preostale populacije (Biokovo, Čvrstica, Prenj, Mavrovo) koje su sve mediteranske i rastu na gotovo ravnim terenima, kod kojih je  $N$  vrednost i najniža (30,2 - 30,8).

Disperzija oko  $N$  ( $d$ ) je bila najmanja kod kontinentalnih populacija (1,4 - 2,0), a znatno veća kod (sub)mediteranskih (2,8 - 6,2).

Tabela 4.3 Količine alkana, N i d vrednosti uzorkovanih populacija *J. communis* var. *saxatilis*

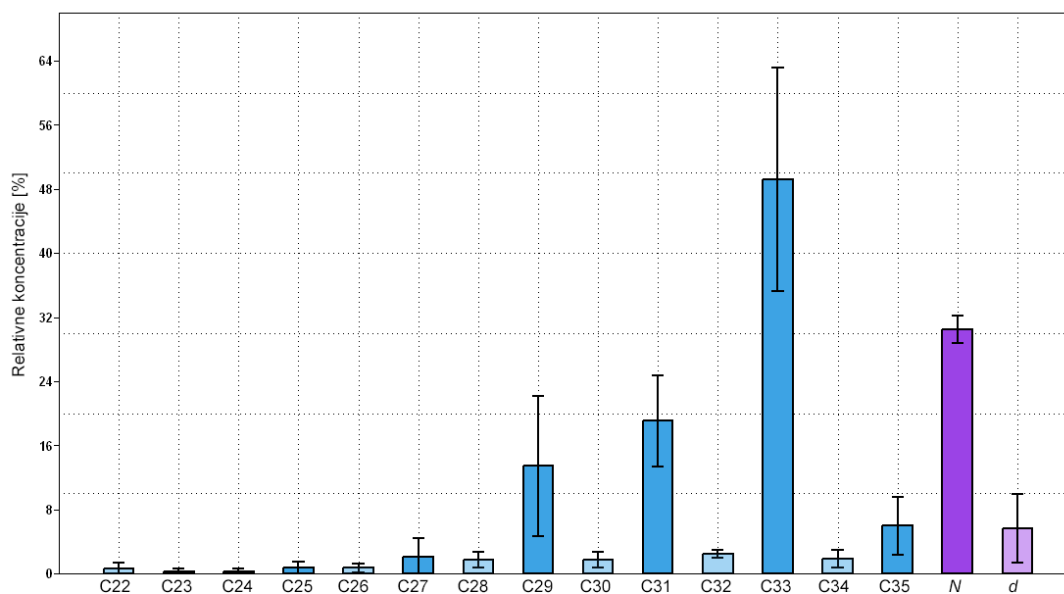
K-W	<i>p</i>	Centralni Balkan					Zapadni Balkana					
		Kopaonik n=30	Suva pl. n=30	Stara pl. n=30	Velebit n=30	Biokovo n=30	Orijen n=15	Durmitor n=15	Čvrstica n=15	Prenj n=15	Mavrovo n=15	
C22	107.01	***	1.2±0.9 <sup>a</sup>	0.9±0.7 <sup>a</sup>	0.8±0.6 <sup>a</sup>	0.2±0.1 <sup>c</sup>	0.2±0.1	0.1±0.0 <sup>c</sup>	0.6±0.2 <sup>a</sup>	0.5±0.3 <sup>b</sup>	0.9±0.2 <sup>a</sup>	0.4±0.1 <sup>b</sup>
C23	163.19	***	3.1±1.9 <sup>a</sup>	0.3±0.4 <sup>b</sup>	4.7±3.0 <sup>a</sup>	0.3±0.1 <sup>b</sup>	0.4±0.1	0.3±0.0 <sup>b</sup>	0.7±0.3 <sup>c</sup>	0.9±0.3 <sup>c</sup>	1.2±0.2	0.6±0.2 <sup>c</sup>
C24	184.06	***	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.1 <sup>a</sup>	0.1±0.2 <sup>a</sup>	0.3±0.1 <sup>c</sup>	0.5±0.2 <sup>b</sup>	0.2±0.1 <sup>c</sup>	0.6±0.2 <sup>b</sup>	0.5±0.2 <sup>b</sup>	1.0±0.2	0.5±0.2 <sup>b</sup>
C25	180.09	***	0.1±0.3 <sup>a</sup>	0.1±0.2 <sup>a</sup>	0.1±0.2 <sup>a</sup>	0.5±0.3 <sup>c</sup>	1.0±0.3	0.5±0.2 <sup>c</sup>	0.7±0.2 <sup>b</sup>	1.1±0.4 <sup>b</sup>	1.3±0.2	0.9±0.3 <sup>b</sup>
C26	140.92	***	0.1±0.6 <sup>a</sup>	0.2±0.3 <sup>a</sup>	0.2±0.6 <sup>a</sup>	0.4±0.3 <sup>c</sup>	0.9±0.3 <sup>d</sup>	0.4±0.2 <sup>c</sup>	0.5±0.1 <sup>b</sup>	0.6±0.2 <sup>b</sup>	0.9±0.2 <sup>d</sup>	0.6±0.2 <sup>b</sup>
C27	196.34	***	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.1 <sup>a</sup>	0.0±0.1 <sup>a</sup>	1.4±0.6 <sup>c</sup>	2.4±0.6 <sup>b</sup>	1.4±0.3 <sup>c</sup>	1.5±0.3 <sup>c</sup>	2.2±0.6 <sup>b</sup>	2.2±0.7 <sup>b</sup>	2.5±0.6 <sup>b</sup>
C28	144.01	***	0.1±0.3	0.6±0.3 <sup>a</sup>	0.6±0.6 <sup>a</sup>	0.9±0.5 <sup>b</sup>	1.9±0.5	0.7±0.2 <sup>a</sup>	0.8±0.2 <sup>b</sup>	0.8±0.2 <sup>b</sup>	1.1±0.3	1.4±0.3
C29	191.54	***	2.1±1.0	2.8±0.7 <sup>a</sup>	3.1±1.4 <sup>a</sup>	7.8±2.0 <sup>b</sup>	11.7±2.1	7.7±1.3 <sup>b</sup>	8.3±1.0	11.7±3.4	11.5±3.1 <sup>b</sup>	17.6±3.6 <sup>b</sup>
C30	143.56	***	0.2±0.6	0.5±0.4 <sup>a</sup>	1.6±3.4 <sup>a</sup>	1.0±0.3 <sup>b</sup>	1.8±0.3	1.0±0.2 <sup>b</sup>	1.2±0.2	0.8±0.2 <sup>b</sup>	1.0±0.2 <sup>b</sup>	1.6±0.3
C31	175.99	***	8.7±1.9 <sup>a</sup>	9.0±3.0 <sup>a</sup>	8.1±3.9 <sup>a</sup>	20.6±4.1 <sup>c</sup>	25.3±4.4 <sup>b</sup>	18.5±3.7 <sup>c</sup>	17.9±3.2 <sup>c</sup>	15.3±4.3 <sup>c</sup>	16.9±4.8 <sup>c</sup>	23.8±3.9 <sup>b</sup>
C32	97.72	***	2.9±0.4 <sup>a</sup>	3.3±0.7 <sup>b</sup>	2.9±0.5 <sup>a</sup>	3.5±0.7 <sup>b</sup>	3.5±0.3 <sup>b</sup>	3.4±0.5 <sup>b</sup>	3.1±0.2 <sup>b</sup>	2.4±0.4 <sup>c</sup>	2.5±0.3 <sup>c</sup>	3.3±0.4 <sup>b</sup>
C33	187.32	***	71.4±3.6	69.1±3.5 <sup>a</sup>	67.7±4.1 <sup>a</sup>	58.4±5.5 <sup>b</sup>	47.0±5.4 <sup>c</sup>	57.7±3.5 <sup>b</sup>	56.2±2.2 <sup>b</sup>	51.9±4.9 <sup>c</sup>	49.5±5.6 <sup>c</sup>	43.4±5.1
C34	186.85	***	3.9±1.1	3.0±1.0	2.0±0.7 <sup>a</sup>	1.0±0.2	0.8±0.2 <sup>b</sup>	1.7±0.4 <sup>a</sup>	1.5±0.2 <sup>a</sup>	1.8±0.4 <sup>a</sup>	1.6±0.5 <sup>a</sup>	0.7±0.2 <sup>b</sup>
C35	150.21	***	6.2±2.1 <sup>a</sup>	10.2±3.2 <sup>b</sup>	8.1±2.4 <sup>b</sup>	3.6±1.0	2.6±0.6 <sup>c</sup>	6.4±2.7 <sup>a</sup>	6.3±1.4 <sup>a</sup>	9.5±3.1 <sup>b</sup>	8.5±3.5 <sup>b</sup>	2.9±1.1 <sup>c</sup>
N	187.17	***	32.4±0.4	32.6±0.3	32.1±0.4	31.3±0.5 <sup>b</sup>	30.3±0.5 <sup>a</sup>	31.5±0.3 <sup>b</sup>	31.1±0.3	30.8±0.3	30.3±0.6 <sup>a</sup>	30.2±0.5 <sup>a</sup>
d	182.84	***	1.4±0.7	1.5±0.3	2.0±0.6	2.9±1.0 <sup>b</sup>	4.8±1.1 <sup>a</sup>	2.8±0.5 <sup>b</sup>	3.6±0.7	5.0±1.1 <sup>a</sup>	6.2±1.6	4.9±1.1 <sup>a</sup>

**K-W** -  $\chi^2$  vrednosti *Kruskal-Wallis*-ovog testa; *p* - nivo značajnosti: \*\*\*  $p < 0.001$ ; <sup>a,b,c,d</sup> - grupe prema *Mann-Whitney*-evom U testu; Količine alkana su date kao srednja vrednost ± SD

#### 4.1.1.3 Hemijski sastav i varijabilnost *n*-alkana kod *Juniperus deltoides*

U kutikularnim voskovima izolovanim iz zrelih iglica *J. deltoides* su bili zastupljeni *n*-alkani dugi od 22 do 35 ugljenikovih atoma. Alkani kratkog niza nisu detektovani u ovim uzorcima, dok su alkani srednjeg niza detektovani u manjim količinama (0,8 - 1,6 %). Štaviše, alkani kraći od 27 ugljenikovih atoma su bili zastupljeni pojedinačno sa manje od 0,5 %, a veoma često nisu bili čak ni detektovani (Tabela 4.4, Slika 4.1.4). U svim uzorcima je dominantan alkan bio tritriakontan, dok su, u zavisnosti od lokaliteta druga dva dominantna alkana bili hentriakontan ( $C_{31}$ ) i pentatriakontan ( $C_{33}$ ) za kontinentalne populacije, odnosno nonakoazan ( $C_{29}$ ) i hentriakontan ( $C_{31}$ ) za primorske.

Izolovani *n*-alkani pokazali su jasne kvantitativne razlike između istraživanih populacija *J. deltoides*. Iako je tritriakontan bio dominantan u svim populacijama (30,5 - 61,5 %), u kontinentalnim populacijama (Kopaonik, Maglič, Pčinja) su pored njega dominirali  $C_{31}$  (13,4 - 14,8 %) i  $C_{35}$  (7,8 - 9,9 %), dok su u primorskim populacijama dominantni bili  $C_{29}$  (9,1 - 25,5 %) i  $C_{31}$  (19,1 - 25,5 %). Štaviše, u primorskim populacijama dominacija tritriakontana je bila manje očigledna, pogotovu u populacijama Senj i Đevrske: gde su  $C_{33}$ ,  $C_{31}$  i  $C_{29}$  bili zastupljeni sa 31,9; 24,6 i 23,8 % odnosno 30,5; 25,2 i 25,5%.



**Slika 4.1.4.** Prosečna relativna količina alkana, N i d vrednost dobijene iz devet populacija *J. deltoides* (srednja vrednost  $\pm$  SD)

Prosečna dužina lanca ( $N$ ) je znatno varirala. U priobalnim populacijama, gde su dominantni alkani bili  $C_{29}$ ,  $C_{31}$  i  $C_{33}$ , prosečna dužina lanca je varirala između 28,3 i 30,4, dok je u kontinentalnim populacijama bila između 31,8 i 32,2.

Disperzija oko  $N(d)$  je bila najmanja kod kontinentalnih populacija (2,4 - 2,8), a znatno veća kod primorskih (4,2 - 10,4). Najvišu vrednost je  $d$  imala za populacije Senj (10,4) i Đevrske (8,8), što je tri do četiri puta viša vrednost u odnosu na kontinentalne populacije, a do dva puta viša u odnosu na ostale primorske. Uzrok ovako visokoj disperziji oko srednje vrednosti leži u činjenici da kod ovih populacija postoji ne jedan, već tri dominantna alkana, što nije slučaj kod drugih populacija.

Tabela 4.4 Količine alkana, *N* i *d* vrednosti uzorkovanih populacija *J. deltoides*

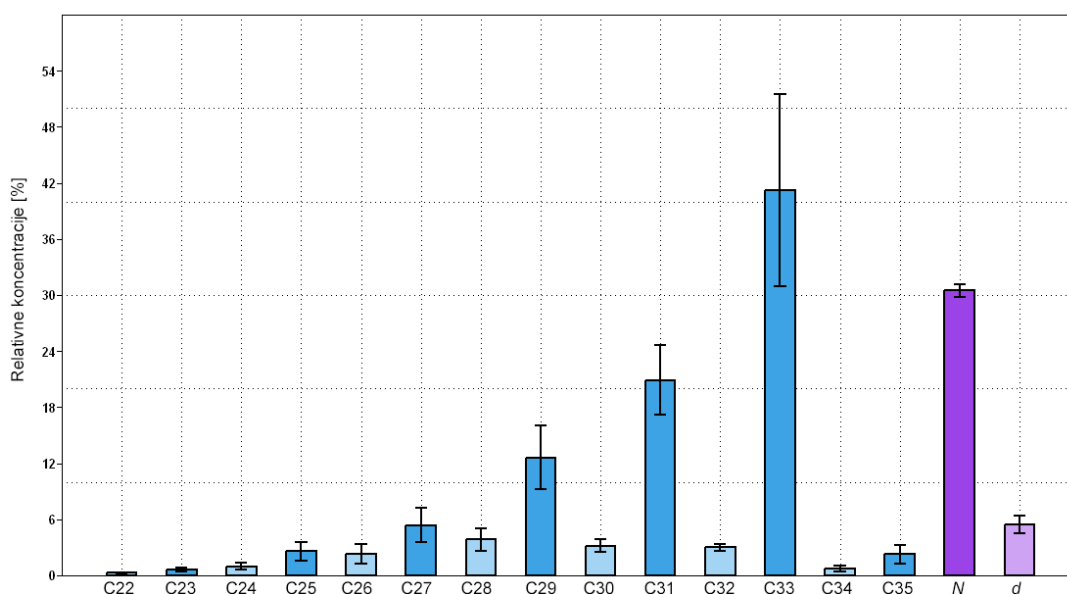
	Kopaonik n=37	Maglič n=29	Pčinja n=30	Rovinj n=9	Senj n=28	Kruševo n=8	Devske n=17	Trogir n=9	Makarska n=8
C22	1.4±0.8 <sup>d</sup>	1.1±1.1 <sup>c</sup>	0.9±0.5 <sup>c</sup>	0.6±0.4 <sup>a</sup>	0.2±0.1 <sup>a</sup>	0.1±0.1 <sup>a</sup>	0.2±0.1 <sup>a</sup>	0.3±0.2 <sup>ab</sup>	0.1±0.0 <sup>a</sup>
C23	0.0±0.1 <sup>a</sup>	0.5±1.0 <sup>b</sup>	0.5±0.6 <sup>bc</sup>	0.8±0.5 <sup>c</sup>	0.3±0.1 <sup>b</sup>	0.2±0.1 <sup>ab</sup>	0.3±0.1 <sup>b</sup>	0.4±0.2 <sup>bc</sup>	0.2±0.0 <sup>ab</sup>
C24	0.1±0.3 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.1 <sup>f</sup>	0.9±0.5 <sup>cd</sup>	0.4±0.2 <sup>bc</sup>	0.3±0.1 <sup>de</sup>	0.5±0.2 <sup>c</sup>	0.6±0.3 <sup>b</sup>
C25	0.0±0.2 <sup>ab</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.1±0.2 <sup>b</sup>	1.1±0.7 <sup>de</sup>	1.5±0.6 <sup>f</sup>	0.8±0.3 <sup>cd</sup>	1.3±0.5 <sup>ef</sup>	1.4±0.6 <sup>ef</sup>	0.6±0.1 <sup>c</sup>
C26	0.2±0.5 <sup>a</sup>	0.1±0.2 <sup>a</sup>	0.5±0.3 <sup>b</sup>	1.1±0.6 <sup>d</sup>	1.2±0.5 <sup>de</sup>	0.8±0.4 <sup>cd</sup>	1.2±0.5 <sup>c</sup>	1.9±2.1 <sup>e</sup>	0.6±0.2 <sup>bc</sup>
C27	0.2±0.6 <sup>ab</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.2±0.3 <sup>b</sup>	2.3±1.5 <sup>c</sup>	5.2±1.7 <sup>e</sup>	2.6±0.9 <sup>cd</sup>	4.5±1.0 <sup>e</sup>	3.1±0.7 <sup>d</sup>	2.5±0.4 <sup>cd</sup>
C28	1.0±0.6 <sup>a</sup>	1.1±0.4 <sup>ab</sup>	1.3±0.3 <sup>bc</sup>	1.1±0.5 <sup>ab</sup>	2.8±1.0 <sup>f</sup>	1.9±0.5 <sup>de</sup>	2.9±0.5 <sup>f</sup>	2.5±0.6 <sup>ef</sup>	1.6±0.2 <sup>cd</sup>
C29	6.4±1.6 <sup>a</sup>	6.7±0.9 <sup>a</sup>	6.5±1.1 <sup>a</sup>	9.1±1.8 <sup>b</sup>	23.8±6.7 <sup>e</sup>	14.4±2.8 <sup>cd</sup>	25.5±5.8 <sup>e</sup>	13.0±3.9 <sup>c</sup>	18.0±2.8 <sup>d</sup>
C30	15.2±3.2 <sup>b</sup>	1.1±0.4 <sup>b</sup>	0.9±0.2 <sup>a</sup>	1.4±0.2 <sup>b</sup>	2.6±0.6 <sup>cd</sup>	2.1±0.3 <sup>c</sup>	2.9±0.7 <sup>d</sup>	2.7±0.4 <sup>cd</sup>	2.1±0.2 <sup>c</sup>
C31	14.8±1.9 <sup>a</sup>	14.4±2.2 <sup>ab</sup>	13.4±2.0 <sup>a</sup>	19.1±3.3 <sup>c</sup>	24.6±3.2 <sup>de</sup>	22.6±2.9 <sup>de</sup>	25.2±2.6 <sup>e</sup>	22.0±2.8 <sup>d</sup>	25.5±2.6 <sup>e</sup>
C32	2.9±0.7 <sup>cd</sup>	2.7±0.5 <sup>cd</sup>	2.2±0.3 <sup>ab</sup>	2.5±0.4 <sup>abc</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.6±0.2 <sup>bcd</sup>	2.2±0.4 <sup>ab</sup>	3.0±0.5 <sup>d</sup>	2.8±0.2 <sup>cd</sup>
C33	60.3±3.4 <sup>d</sup>	60.0±2.1 <sup>d</sup>	61.5±2.1 <sup>d</sup>	54.1±2.9 <sup>c</sup>	31.9±9.3 <sup>a</sup>	47.0±4.8 <sup>b</sup>	30.5±5.9 <sup>a</sup>	44.9±5.4 <sup>b</sup>	42.3±4.4 <sup>b</sup>
C34	3.5±0.9 <sup>c</sup>	2.5±0.4 <sup>d</sup>	2.3±0.3 <sup>d</sup>	1.3±0.2 <sup>c</sup>	0.7±0.3 <sup>a</sup>	1.0±0.3 <sup>b</sup>	0.6±0.1 <sup>a</sup>	1.1±0.2 <sup>bc</sup>	1.0±0.2 <sup>b</sup>
C35	7.8±2.0 <sup>c</sup>	9.9±1.8 <sup>f</sup>	9.6±1.6 <sup>f</sup>	4.5±1.0 <sup>d</sup>	2.5±0.6 <sup>a</sup>	3.5±0.8 <sup>c</sup>	2.3±0.6 <sup>a</sup>	3.1±0.5 <sup>bc</sup>	2.7±0.5 <sup>ab</sup>
<i>N</i>	32.0±0.4 <sup>a</sup>	32.2±0.3 <sup>a</sup>	31.8±0.4 <sup>a</sup>	30.0±1.1 <sup>b</sup>	28.3±1.0 <sup>c</sup>	30.3±0.7 <sup>b</sup>	28.5±0.5 <sup>c</sup>	29.4±1.2 <sup>b</sup>	30.4±0.6 <sup>b</sup>
<i>d</i>	2.4±0.5 <sup>a</sup>	2.4±0.3 <sup>a</sup>	2.8±0.7 <sup>a</sup>	6.8±5.2 <sup>b</sup>	10.4±4.0 <sup>c</sup>	5.0±2.1 <sup>b</sup>	8.8±2.5 <sup>c</sup>	8.0±6.2 <sup>c</sup>	4.2±0.8 <sup>b</sup>

ANOVA i *post-hoc* test (LSD) su urađeni na log-transformiranim podacima; <sup>a,b,c,d,e,f</sup> = grupe prema LSD testu ( $p < 0.05$ ); Količine alkana su date kao srednja vrednost ± SD

#### 4.1.1.4 Hemijski sastav i varijabilnost *n*-alkana kod *Juniperus macrocarpa*

U kutikularnim voskovima izolovanim iz zrelih iglica *J. macrocarpa* su bili zastupljeni *n*-alkani dugi od 22 do 35 ugljenikovih atoma. Alkani kratkog niza nisu detektovani u uzorcima iz ispitivane populacije, dok su alkani srednjeg niza detektovani u manjim procentima (1,9 %) (Tabela 4.5). Za razliku od ostalih vrsta, alkani C<sub>25</sub>-C<sub>27</sub> su bili zastupljeni u relativnim količinama većim od 2,3 %. U svim uzorcima je dominantan alkan bio tritriakontan (41,3 %), dok su prateća druga dva dominantna alkana bili nonakozan (C<sub>29</sub>) i hentriakontan (C<sub>31</sub>) sa 12,6% odnosno 20,9%.

Prosečna dužina lanca (*N*) je  $30,5 \pm 0,7$ , dok je disperzija oko nje (*d*) bila  $5,4 \pm 1,0$ .



**Slika 4.1.5.** Prosečna relativna količina alkana, *N* i *d* vrednost dobijene iz populacije *J. macrocarpa* iz Trogira (srednja vrednost ± SD)

**Tabela 4.5** Količine alkana, *N* i *d* vrednosti populacije *J. macrocarpa* iz Trogira

C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	<i>N</i>
0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.4	2.6 ± 1.0	2.3 ± 1.1	5.4 ± 1.8	3.9 ± 1.2	30.5 ± 0.7
C29	C30	C31	C32	C33	C34	C35	<i>d</i>
12.6 ± 3.4	3.2 ± 0.7	20.9 ± 3.7	3.0 ± 0.4	41.3 ± 10.3	0.7 ± 0.3	2.3 ± 1.0	5.4 ± 1.0

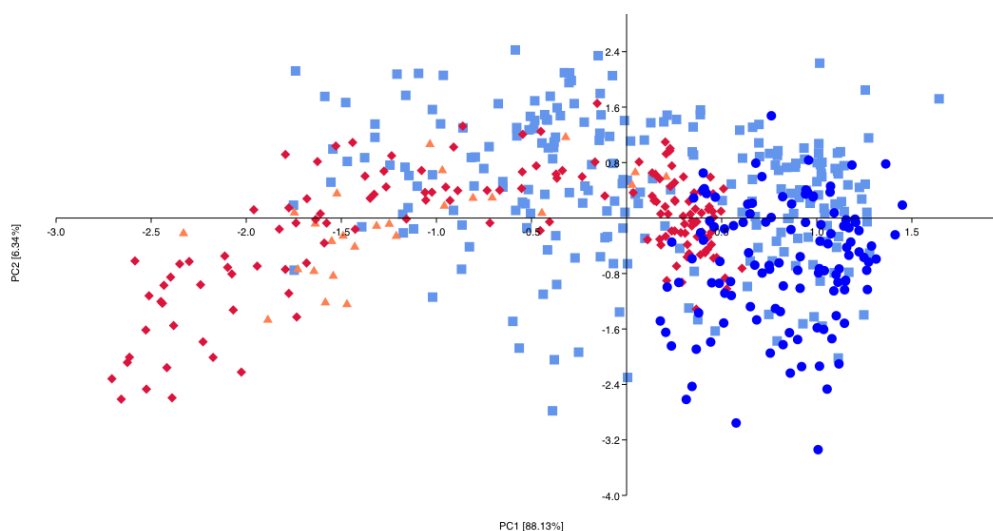
#### 4.1.2 Rezultati statističke obrada ispitivanja *n*-alkana

##### Univarijantne analize

Analiza varijanse (ANOVA) je urađena sa svih 28 populacija vrsta sekcije *Juniperus* sa Balkanskog poluostrva, uzimajući relativne količine svih 17 *n*-alkana kao i *N* i *d* vrednosti. Nađene su statistički značajne razlike za sve ispitane *n*-alkane, *N* i *d* vrednosti ( $p < 0,001$ ). Urađena je i *post-hoc* analiza (LSD test,  $p < 0,05$ ). Većina ispitanih alkana ( $C_{25}$ ,  $C_{26}$ ,  $C_{27}$ ,  $C_{28}$ ,  $C_{30}$ ,  $C_{31}$  i  $C_{33}$ ) jasno odvajaju sva četiri taksona (Tabela 4.1). *J. communis* var. *communis*, i *J. communis* var. *saxatilis* se ne razlikuju međusobno samo na osnovu udela  $C_{24}$ , dok se *J. macrocarpa* ne razlikuje od *J. deltoides* na osnovu udela  $C_{23}$ ,  $C_{29}$  i  $C_{31}$ .

##### Analiza glavnih komponentni (PCA)

Varijabilnost u sastavu detektovanih 17 *n*-alkana kod svih 523 individua je analizirana korišćenjem analize glavnih komponenti (PCA). Prve dve ose ove analize objašnjavaju 94,5 % ukupne varijabilnosti (Slika 4.1.6). PCA pokazuje jasno odvajanje između kontinentalnih i primorskih populacija svih taksona, sa prilično jakim preklapanjem kontinentalnih populacija



**Slika 4.1.6.** PCA scatter plot dobijen analizom relativnih količina 17 alkana iz epikutikularnih iglica odabranih vrsta sekcije *Juniperus* sa Balkanskog poluostrva: ● - *J. communis* var. *communis*, ■ - *J. communis* var. *saxatilis*, ◆ - *J. deltoides*, ▲ - *J. macrocarpa*.

sva četiri taksona. Znatno veću varijabilnost u profilu alkana pokazuju primorske u odnosu na kontinentalne populacije. Kontinentalne populacije se karakterišu znatno većom količinom najdužih detektovanih alkana ( $C_{33}$ - $C_{35}$ ) u odnosu na primorske koje su bogatije kraćim alkanima ( $C_{25}$ - $C_{29}$ ).

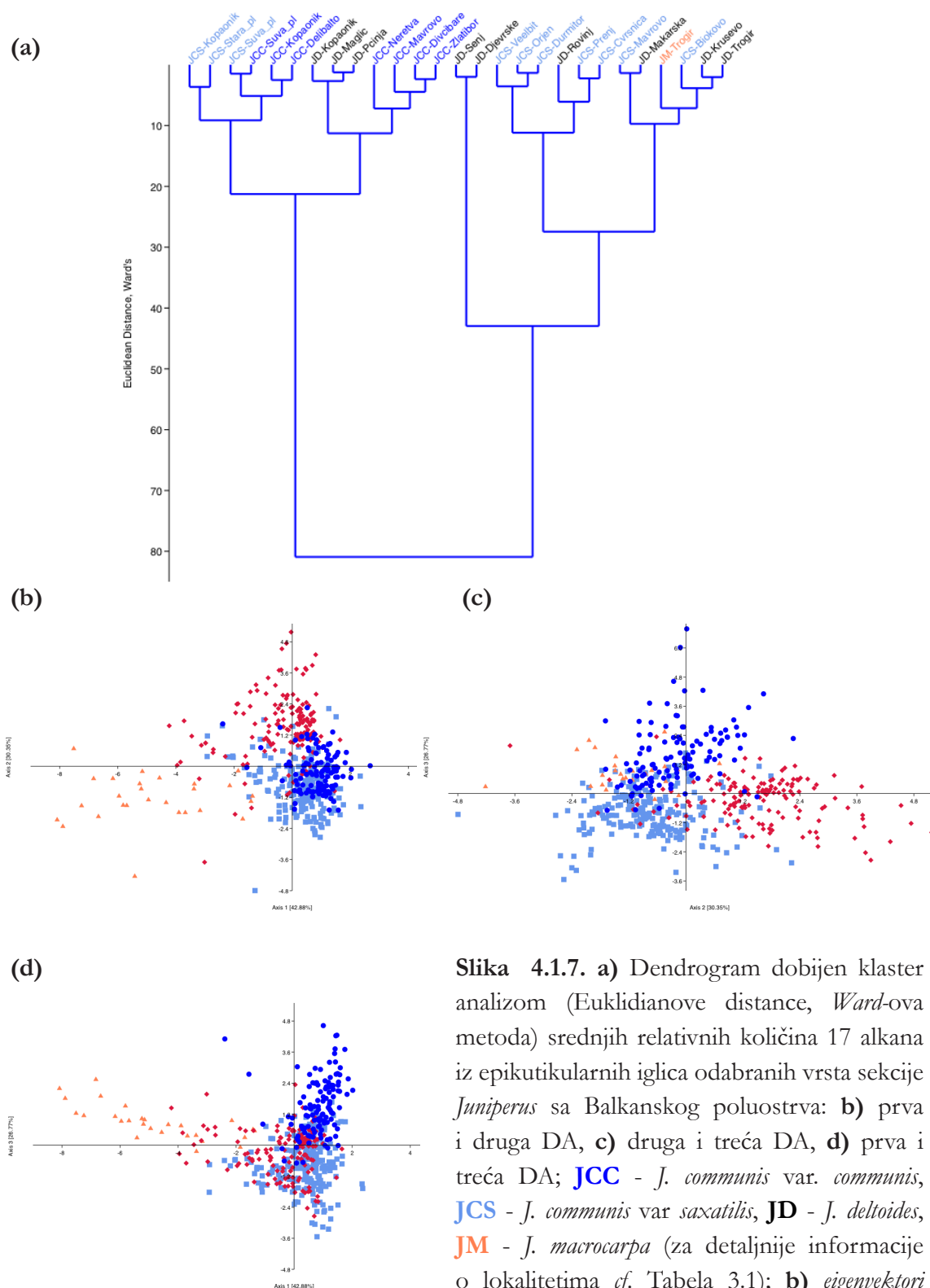
#### *Hijerarhijska klaster analiza (HCA)*

Dendogram dobijen HCA (Euklidianove distance, *Ward*-ov metod), baziranom na prosečnom udelu svih 17 *n*-alkana (Slika 4.1.7a) pokazuje formiranje dve grupe na otprilike četredestpetom nivou: jedna koju čine kontinentalne populacije *J. communis* i *J. deltoides* (**Klada A**), i drugu koju čine primorske populacije sva četiri taksona (**Klada B**). Iako je klaster analiza pokazala blisko grupisanje srodnih taksona, nekoliko populacija *J. deltoides* se grupisalo sa drugim taksonima, pre svega sa *J. communis* var. *saxatilis*.

#### *Diskriminantna analiza (DA)*

Urađena je diskriminantna analiza sa četiri grupe (Slika 4.1.7b, c, d). Svaka grupa je predstavljala jedan takson. Prve dve diskriminantne ose objašnjavaju 73,2 % ukupne varijabilnosti. Na jednoj strani, zastupljena sa samo jednom populacijom u ovoj analizi, se nalazi *J. macrocarpa*, jasno odvojena od svih ostalih taksona. S druge strane, blisko grupisane, ali i dalje jasno odvojene se nalaze *J. communis* i *J. deltoides*. Iako na prve dve ose diskriminantne analize nije bilo moguće jasno odvojiti *J. communis* var. *communis* od *J. communis* var. *saxatilis*, na trećoj osi DA se ova dva taksona mogu jasno razlikovati u odnosu na količine  $C_{33}$  i  $C_{35}$ , što se jasno vidi na *scatter plot*-u sa drugom i trećom, odnosno prvom i trećom diskriminantnom osom.





**Slika 4.1.7.** a) Dendrogram dobijen klaster analizom (Euklidianove distance, *Ward*-ova metoda) srednjih relativnih količina 17 alkana iz epikutikularnih iglica odabranih vrsta sekcije *Juniperus* sa Balkanskog poluostrva; b) prva i druga DA, c) druga i treća DA, d) prva i treća DA; **JCC** - *J. communis* var. *communis*, **JCS** - *J. communis* var. *saxatilis*, **JD** - *J. deltoides*, **JM** - *J. macrocarpa* (za detaljnije informacije o lokalitetima cf. Tabela 3.1); b) *eigenvektori* diskriminantne analize; c) ● - *J. communis* var. *communis*, ■ - *J. communis* var. *saxatilis*, ◆ - *J. deltoides*, ▲ - *J. macrocarpa*.

#### 4.1.2.1 *Juniperus communis* var. *communis*

##### *Univarijantne analize*

*Kruskal-Wallis*-ova univarijantna analiza je urađena sa svih sedam populacija *J. communis* var. *communis*, uzimajući relativne udele svih alkana, kao i *N* i *d* vrednosti. Analiza je pokazala da postoje značajne razlike između populacija u količinama svih alkana (sem hentriakontana), *N* i *d* vrednosti (*K-W*  $p < 0,001$ ). *Mann-Whitney*-ev test je takođe urađen, kako bi se identifikovale komponente koje se razlikuju između svakog para populacija. Samo tritriakontan se razlikovao po udelu između svih populacija. Populacije iz Deliblatske peščare i sa Kopaonika su se gotovo na svim komponentama grupisale u jednu grupu, dok su populacije sa Zlatibora i Divčibara formirale drugu grupu. Ostale populacije nisu pokazale jasno grupisanje unutar sebe ili sa bilo kojom drugom populacijom (Tabela 4.2).

##### *Analiza glavnih komponentni (PCA)*

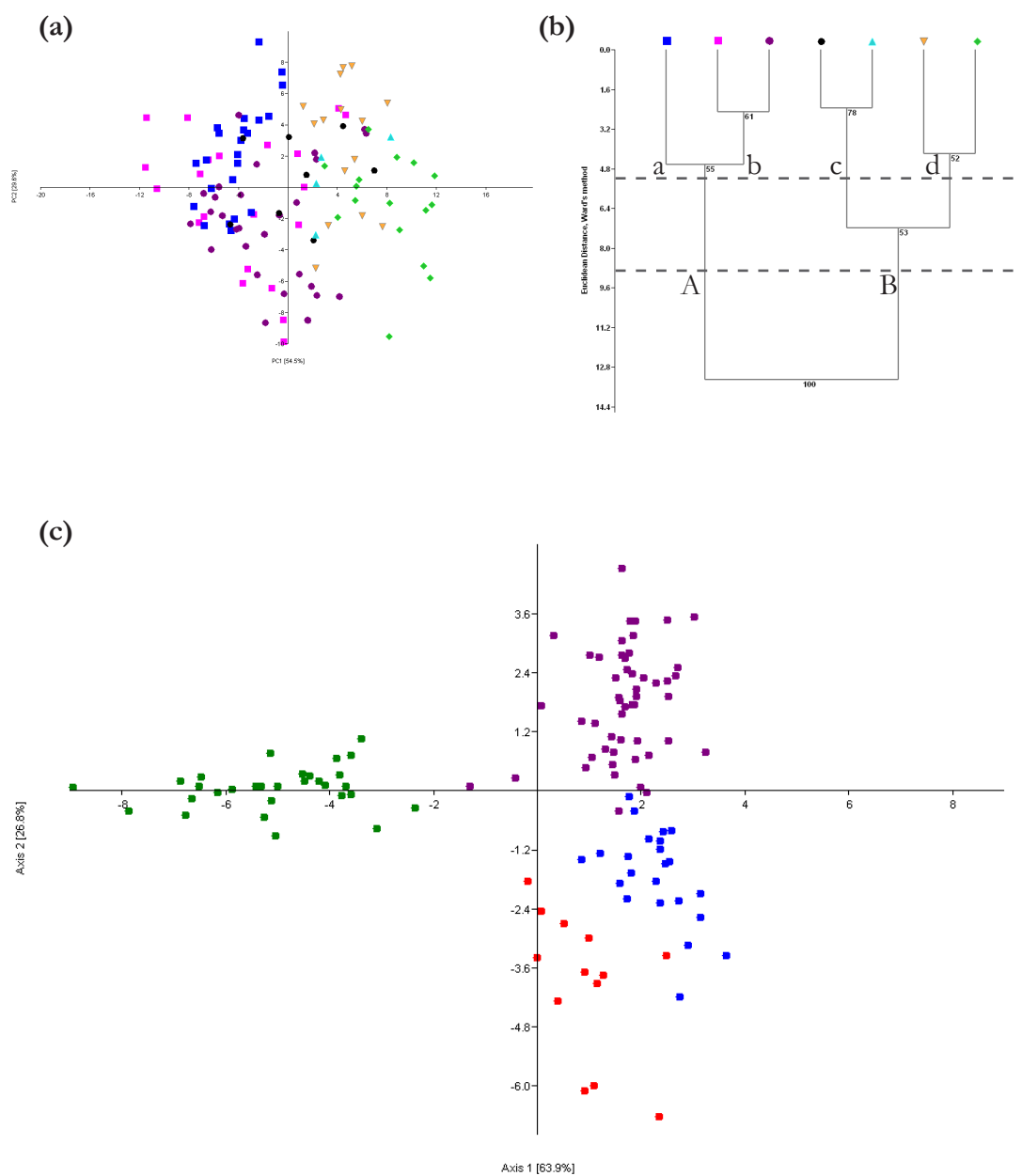
Varijabilnost u sastavu detektovanih 17 *n*-alkana kod svih 118 individua je analizirana korišćenjem analize glavnih komponenti (PCA). Prve dve ose ove analize objašnjavaju 84,1% ukupne varijabilnosti (Slika 4.1.8a). PCA pokazuje blago odvajanje populacija sa Kopaonika, Suve planine i iz Deliblatske peščare od ostalih populacija. Odvajanje po prvoj osi je na osnovu relativnih količina tritriakontana, hentriakontana i nonakozana, dok izdvajanju po drugoj osi najviše doprinose količine pentatriakontana, a u manjoj meri i hentriakontana i nonakozana. Uzrok odvajanja tri populacije od ostalih su veće količine  $C_{33}$ , a manje količine  $C_{29}$  i  $C_{31}$ . S druge strane, dolazi do blagog odvajanja jedinki iz Deliblatske peščare i sa Kopaonika, kao i pojedinih jedinki iz svih ostalih populacija (sem sa Divčibara i Suve planine) u treću grupu – jedinke koje imaju umerene količine  $C_{33}$ ,  $C_{29}$  i  $C_{31}$ , ali veće količine  $C_{35}$ .

*Hijerarhijska klaster analiza (HCA)*

Dendogram dobijen HCA, baziranom na prosečnom udelu svih 17 *n*-alkana (Slika 4.1.8b) (Euklidianove distance, *Ward*-ova metoda) pokazuje formiranje dve grupe na otprilike sedmom nivou (*bootstrap* podrška 100): jedna koju čine tri populacije: Deliblato, Kopaonik, Suva planina (**Klada A**) i jedna koju čine preostale populacije (**Klada B**). Na otprilike petom nivou četiri umereno podržane klade se mogu razlikovati: **Klada A**: *Subklada a* koja obuhvata samo populaciju sa Suve planine, i *subklada b* koja obuhvata populacije iz Deliblatske pešcare i sa Kopaonika; **Klada B**: *Subklada c* populacije Divčibare i Zlatibor; *Subklada d* populacije Mavrovo i Neretva. Ove četiri subklade jasno ocrtavaju matricu sličnosti dobijenu na osnovu *Mann-Whitney*-evog U testa.

*Diskriminantna analiza (DA)*

Urađeno je nekoliko diskriminativnih analiza. Grupe su bile bazirane na osnovu populacija, ili su populacije bile grupisane na osnovu rezultata dobijenih HCA. *Scatter plot* (Slika 4.1.8c) dobijen diskriminantnom analizom (DA) sa četiri grupe je bio najviše podržan. Prva diskriminativna funkcija objašnjava 63,9 %, dok druga objašnjava 26,8 % ukupne varijabilnosti. Najjače se odvajaju populacije sa Neretve i iz Mavrova, dok se populacije iz Srbije nešto manje odvajaju. Populacije sa Neretve i iz Mavrova se odvajaju na osnovu većih količina nonakozana i hentriakontana a manjih tritriakontana. S druge strane, populacije iz Srbije se odvajaju u tri grupe na osnovu količina  $C_{33}$ - $C_{35}$ . *Subklada b* (Deliblatska peščara i Kopaonik) se karakteriše većim količinama  $C_{33}$ - $C_{35}$ , *subklada c* (Divčibare, Zlatibor) malim količinama  $C_{35}$  i  $C_{34}$ , i manjim  $C_{33}$ , dok *subklada a* (Suva planina) ima intermedijarni karakter između ove dve grupe – umerene količine  $C_{35}$  i  $C_{34}$ , kao i veće količine  $C_{33}$ .



**Slika 4.1.8.** a) PCA scatter plot; b) Dendrogram dobijen klaster analizom (Euklidianove distance, *Ward*-ov metod) relativnih količina 17 alkana izolovanih iz epikutikularnih voskova sedam populacija *J. communis* var. *communis*; ■ - Suva planina, ■ - Kopaonik, ● - Deliblatska peščara, ● - Divčibare, ▲ - Zlatibor, ◆ - Neretva, ▼ - Mavrovo; c) *Scatter plot* dobijen diskriminantnom analizom 17 alkana izolovanih iz iglica *J. communis* var. *communis*. Grupe bazirane na grupama dobijenim iz HCA; ● - Suva planina, ● - Kopaonik i Deliblatska peščara, ● - Divčibare i Zlatibor, ● - Neretva i Mavrovo

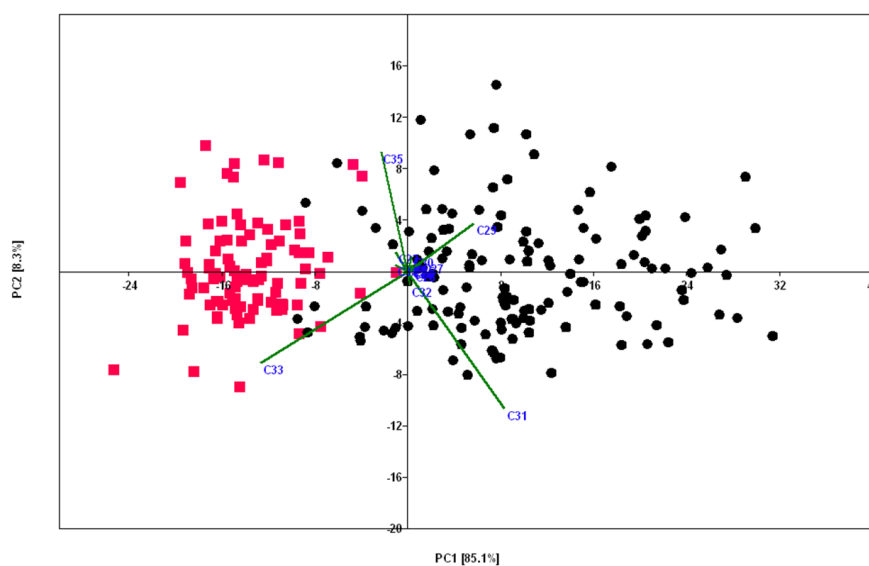
#### 4.1.2.2 *Juniperus communis* var. *saxatilis*

##### Univarijantne analize

Kruskal-Wallis-ova univarijantna analiza je urađena sa svih deset populacija *J. communis* var. *saxatilis*, uzimajući relativne udele svih alkana, kao i *N* i *d* vrednosti. Analiza je pokazala da postoje značajne razlike između populacija u količinama svih alkana, *N* i *d* vrednosti (K-W,  $p < 0,001$ ). Mann-Whitney-ev test je takođe urađen, kako bi se identifikovale komponente koje se razlikuju između svakog para populacija. Najveći broj alkana ( $C_{23}$ - $C_{27}$ ,  $C_{29}$ - $C_{33}$ ) jasno odvaja kontinentalne od (sub)mediteranskih populacija (Tabela 4.3).

##### Analiza glavnih komponentni (PCA)

Varijabilnost u sastavu detektovanih 14 alkana kod svih 240 individua je analizirana korišćenjem analize glavnih komponenti (PCA). Prve dve ose ove analize objašnjavaju 93,4 % ukupne varijabilnosti (Slika 4.1.9). PCA pokazuje jasno odvajanje između kontinentalnih i (sub)mediteranskih populacija. Kontinentalne populacije se karakterišu znatno većom količinom najdužih detektovanih alkana ( $C_{33}$ ,  $C_{35}$ ) u odnosu na (sub)mediteranske koje su bogatije nešto kraćim alkanima ( $C_{29}$ ,  $C_{31}$ ).



**Slika 4.1.9.** Scatter plot dobijen analizom glavnih komponenti relativnih količina 14 alkana kutikularnih voskova *J. communis* var. *saxatilis*; ● - mediteranske populacije, ■ - kontinentalne populacije (Rajčević et al., 2014)

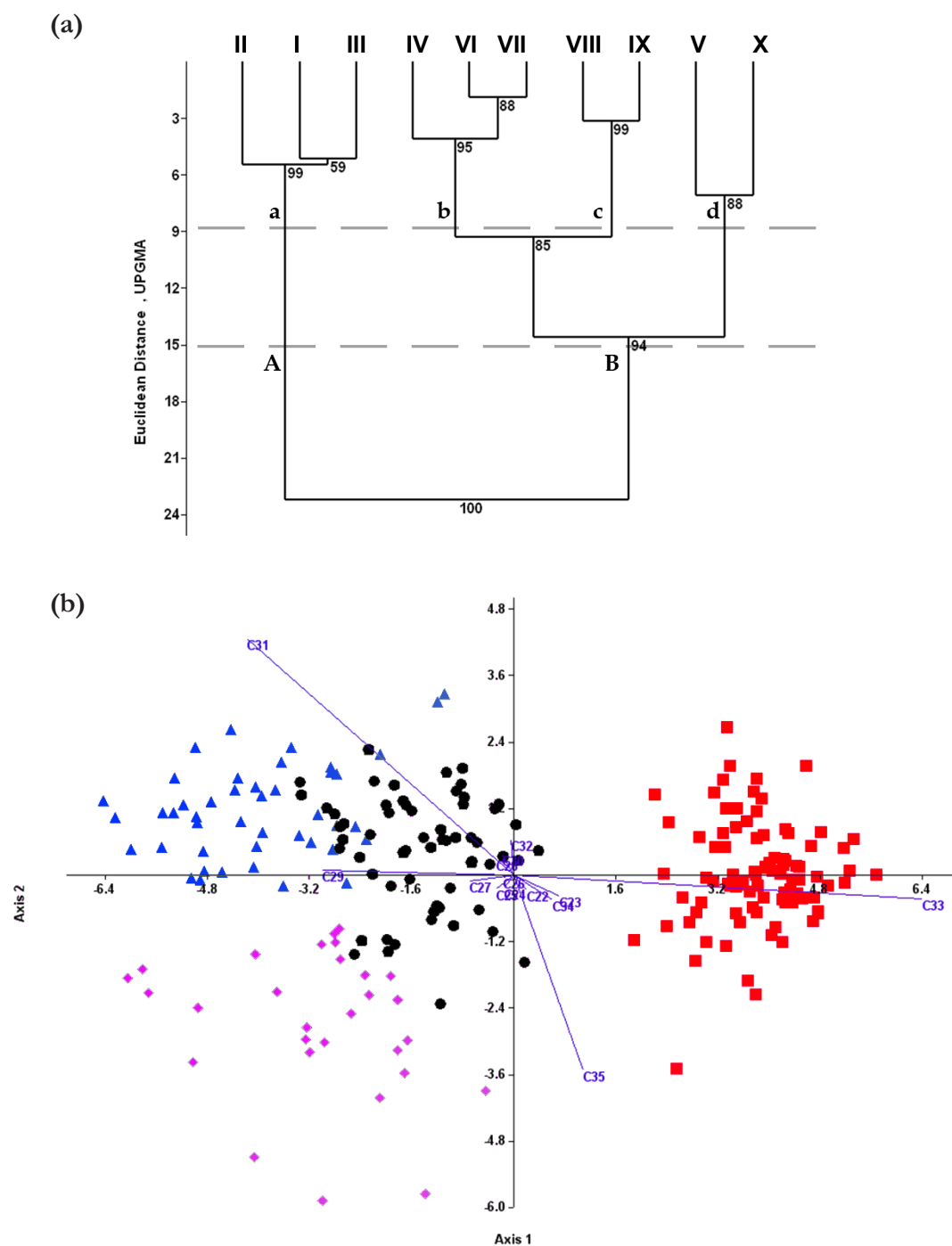
*Hijerarhijska klaster analiza (HCA)*

Dendrogram dobijen HCA (Euklidianove distance, UPGMA), baziranom na prosečnom udelu svih 14 alkana (Slika 4.1.10a) pokazuje formiranje dve grupe na otprilike petnaestom nivou (BS 100%): jedna koju čine sve kontinentalne populacije (**Klada A**) i ona koje čine (sub)mediteranske populacije (**Klada B**). Na otprilike devetom nivou četiri visokopodržane klade se mogu razlikovati: **Klada A** (kontinentalne populacije), *Subklada a* koja se na šestom nivou deli na dve visokopodržane klade: (Suva planina) i (Kopaonik-Stara planina). **Klada B** ((sub)mediteranske populacije): *Subklada b* populacije Velebit, Orjen, Durmitor; *Subklada c* populacije Čvrstica, Prenj; i *Subklada d* Biokovo, Mavrovo.

Ove četiri subklade pokazuju prelaz iz pravih kontinentalnih u prave primorske populacije, od onih sa dužom prosečnom dužinom lanca ( $N$ ) do onih sa kraćom. Epikutikularni voskovi populacija iz *subklade a* se karakterišu visokim količinama  $C_{33}$  i  $C_{35}$ , a niskom  $C_{29}$  i  $C_{31}$  alkana. Populacije *subklade b* se karakterišu relativno niskim količinama  $C_{35}$ , a umerenim  $C_{29}$ ,  $C_{31}$  i  $C_{33}$ . Epikutikularni voskovi kod populacija *subklade c* su pokazali velike količine  $C_{33}$  i  $C_{35}$  ali i umerene  $C_{29}$  i  $C_{31}$ . Konačno, *subkladu d* čine populacije sa najmanjim količinama  $C_{33}$  i veoma malim količinama  $C_{35}$ , ali velikim  $C_{29}$  i  $C_{31}$ , u poređenju sa drugim populacijama (Slika 4.1.11).

*Diskriminantna analiza (DA)*

Scatter plot (Slika 4.1.10b) dobijen diskriminantnom analizom (DA) je bio u saglasnosti sa HCA. Prva diskriminantna funkcija objašnjava čak 85,3 % ukupne varijabilnosti, dok druga objašnjava 9,7% ukupne varijabilnosti. Nonakozan i tritriakontan su odgovorni za najveći deo varijabilnosti po prvoj osi, dok su hentriakontan i pentatriakontan po drugoj. Diskriminacija sve četiri grupe je statistička značajna. DA je pokazala jasno odvajanje kontinentalnih populacija od (sub)mediteranskih. Sve kontinentalne populacije se grupišu na osnovu relativnih količina  $C_{23}$ ,  $C_{33}$ ,  $C_{34}$  i  $C_{35}$  dok se (sub)mediteranske grupišu na osnovu  $C_{27}$ ,  $C_{29}$  i  $C_{31}$ . Iako su sve (sub)mediteranske populacije imale relativno veliku količinu  $C_{31}$ , mogu se razlikovati tri grupe: *subklada b* pokazuje intermedijerni karakter između (sub)mediteranskih i kontinentalnih populacija. Šta više, pokazuje i inetermedijarni karakter između *subklade c* i *d*. Populacije iz *subklade c* su se tesno grupisale na scatter plot-u dok su populacije *subklade d* pokazale najveću varijabilnost, odnosno disperziju.



**Slika 4.1.10.** a) Dendrogram dobijen klaster analizom (Euklidianove distance, UPGMA) relativnih količina 14 alkana izolovanih iz kutikularnih voskova iglica *J. communis* var. *saxatilis*; I - Kopaonik, II - Suva planina, III - Stara planina, IV - Velebit, V - Biokovo, VI - Orjen, VII - Durmitor, VIII - Čvrstica, IX - Prenj, X - Mavrovo (Rajčević et al., 2014); b) Plot dobijen diskriminantnom analizom 14 alkana izolovanih iz kutikularnih voskova iglica *J. communis* var. *saxatilis*: ■ Subklada a, ● Subklada b, ▲ Subklada c, ◆ Subklada d (Rajčević et al., 2014)

### Regresiona analiza

Rezultati jednostavne linearne regresione analize (Tabela 4.7) pokazuju da dvanaest od devetnaest bioklimatskih parametara imaju statistički značajnu korelaciju sa relativnim količinama  $n$ -alkana kao i  $N$  i  $d$  vrednostima. S druge strane, nagib terena i nadmorska visina nisu pokazale statističku značajnu korelaciju ni sa jednim od pojedinačnih  $n$ -alkana.

Većina bioklimatskih karakteristika je pokazala statistički značajnu korelaciju sa svim  $n$ -alkanima,  $N$  i  $d$  vrednostima, ali samo nekoliko komponenti je bilo visoko korelisano sa pojedinim bioklimatskim parametrima. Većina bioklimatskih parametara vezanih za temperaturu (srednja godišnja temperatura, srednji dnevni opseg, izotermalnost i najmanje i najveće temperature) nisu pokazale visoku korelaciju sa distribucijom  $n$ -alkana u epikutiklarnim voskovima. Međutim, sezonalnost temperature (BIO4) je pokazala visoku pozitivnu korelaciju sa relativnim količinama  $C_{33}$  i  $C_{35}$ , odnosno visoku negativnu korelaciju sa svim kraćim alkanima. Drugačije rečeno, što je veća razlika između letnjih i zimskih temperatura, to su dominantniji duži alkani. Dalje, srednja temperatura najtoplijeg kvartala (BIO8) ima visoku pozitivnu korelaciju sa najdužim alkanima ( $C_{33}$ ,  $C_{35}$ ), i visoku negativnu korelaciju sa nešto kraćim alkanima ( $C_{31}$ ,  $C_{29}$  i kraćim). Dakle, što je viša srednja temperatura u najvlažnijem kvartalu, to je veća količina najdužih alkana u epikutiklarnim voskovima. Srednja temperatura najsušnijeg perioda (BIO9) i najtoplijeg perioda (BIO10) pokazuju suprotan trend.

S druge strane, sastav  $n$ -alkana je u visokoj korelaciji sa većinom bioklimatskih parametara vezanih za precipitaciju. Srednja godišnja količina padavina (BIO12) je imala visoku pozitivnu korelaciju sa kraćim alkanima ( $C_{29}$ ,  $C_{31}$ ) i negativnu korelaciju sa dužim alkanima (npr.  $C_{33}$ ). Sličan trend je evidentan i za količinu padavina u najtoplijem mesecu i periodu, kao i količinu padavina u najhladnijem periodu (BIO13, BIO16, BIO19).

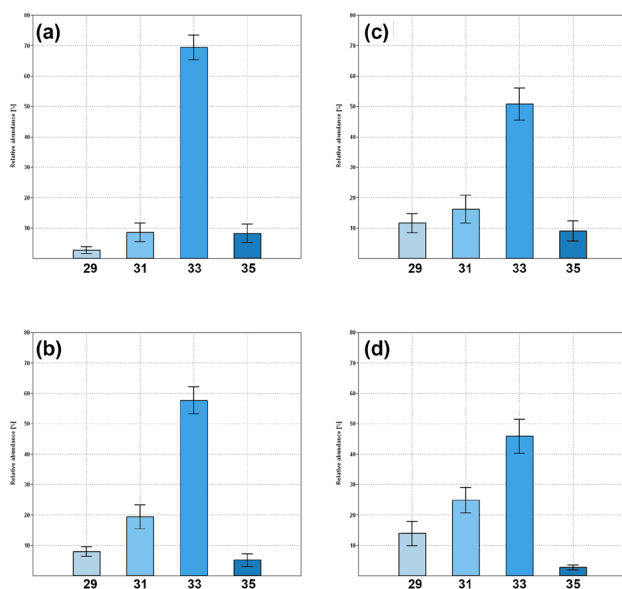
Za  $N$  i  $d$  vrednosti sličan trend može da se uoči.  $N$  vrednosti su pokazale visoku pozitivnu korelaciju sa rasponom godišnje temperature (BIO7) i srednjom temperaturom najsušnijeg perioda (BIO9) i visoku negativnu korelaciju sa temperaturom najvlažnijeg perioda (BIO8). Šta više, korelacija između precipitacije (BIO12, BIO15, BIO17) i  $N$  vrednosti je negativna. Ove korelacije ukazuju da aridnost igra važnu ulogu u prosečnoj dužini lanca alkana epikutikularnih voskova. Kako je korelacija  $N$  i  $d$  bila izuzetno visoka i negativna ( $R=-0,91$ ;  $p<0,001$ ), suprotni trend je uočen za  $d$  vrednost.



Statistički značajna ali veoma mala negativna korelacija je pronađena između srednje dužine lanca i nadmorske visine, što nije neočekivano s obzirom na to da populacije rastu na približno sličnim nadmorskim visinama.

Pored pojedinačnih alkana, kao i  $N$  i  $d$  vrednosti, testirana je linearna zavisnost prve ose analize glavnih komponenti (PC1), s obzirom na to da ona objašnjava diferencijaciju kontinentalnih i (sub)mediteranskih populacija. Rezultati ove analize su dati u Tabeli 4.6 kao i na Slici 4.1.12.

Da bi se sa većom sigurnošću potvrdile dobijene korelacije urađeni su *Mantelov* i parcijalni *Mantelov* test. *Mantelov* test sa svim  $n$ -alkanima i svim bioklimatskim parametrima je pokazao statistički značajnu ali umerenu korelaciju ( $R=0,47$ ,  $p=0,0002$ ). Kako bi se isključio uticaj geografskog regiona i nadmorske visine, urađen je i parcijalni *Mantelov* test. Korelacija varijabilnosti sadržaja  $n$ -alkana i bioklimatskih parametara je testirana nakon uklanjanja geografskog regiona ( $R=0,32$ ;  $p=0,0002$ ), nadmorske visine ( $R=0,46$ ;  $p=0,0002$ ) i kombinacijom obe ( $R=0,45$ ;  $p=0,0002$ ). Testirana je i korelacija varijabilnosti  $N$  i  $d$  parametara sa bioklimatskim parametrima ( $R=0,32$ ;  $p=0,0002$ ). Nakon uklanjanja geografskog regiona ova vrednost je samo neznatno opala ( $R=0,30$ ;  $p=0,0002$ ).

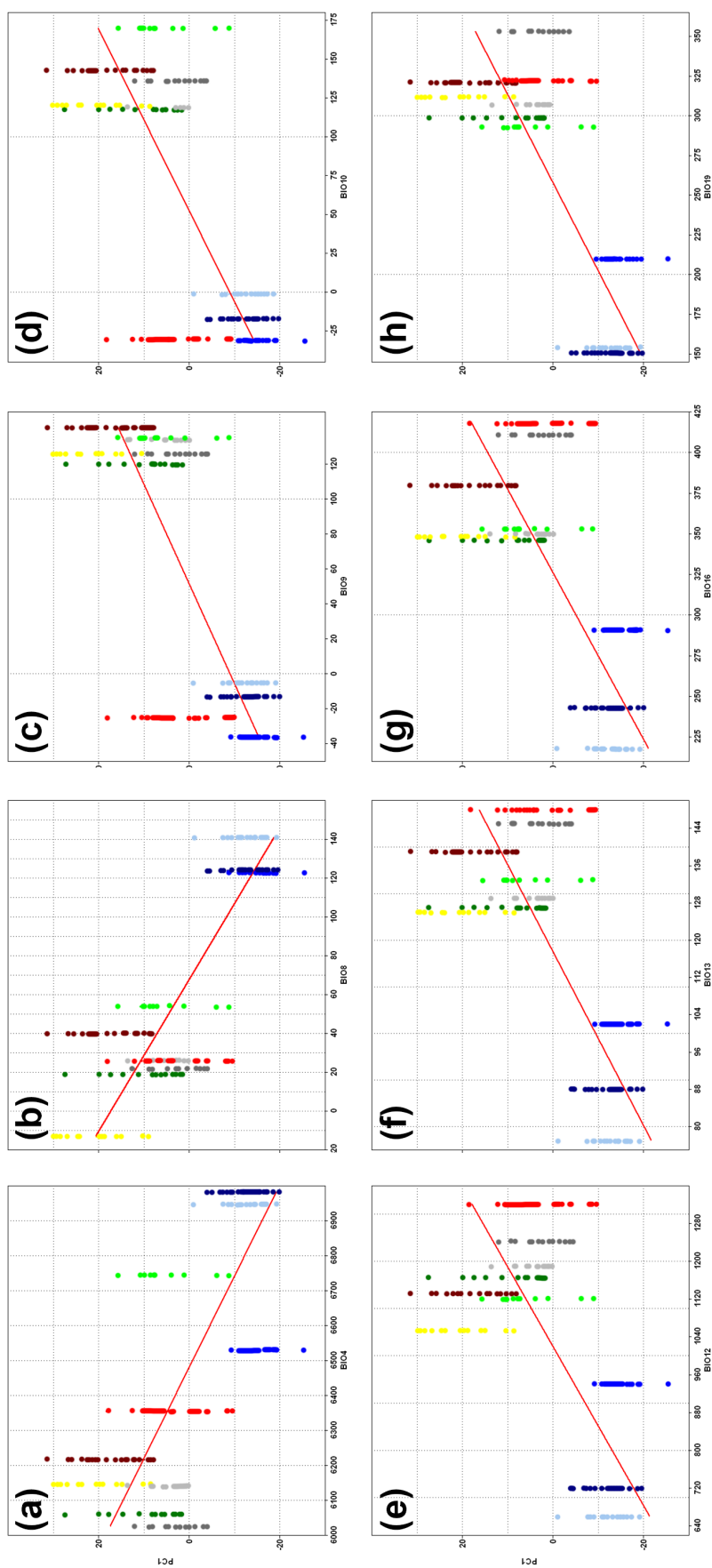


**Slika 4.1.11.** Prosečna količina četiri dominantna alkana epikutikularnih voskova iglica *J. communis* var. *saxatilis* a) subklada a, b) subklada b, c) subklada c, d) subklada d.

Tabela 4.6 Rezultati linearne regresije (R) relativnih količina alkana i bioklimatskih i orografskih karakteristika

	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33	C34	C35	PC1	N	d
Alt.	0.19*	0.34*	0.23*	0.14*	0.05*	0.10*	-0.08*	0.22*	0.02*	-0.08*	-0.31*	-0.14*	0.06*	-0.01*	0.09*	0.17*	-0.09
Nagib	-0.10	-0.32*	0.19*	0.05	-0.01	0.00	-0.11	-0.08	-0.08	0.01	0.09	0.04	-0.07	0.23*	0.00	0.09*	0.01*
BIO1	-0.04*	-0.03*	-0.20*	-0.08*	-0.02	-0.11	0.07	-0.15*	0.04	-0.17	-0.03*	0.09*	0.07	0.35	-0.13*	0.43*	-0.34*
BIO2	0.30	0.29	-0.36*	-0.41	-0.33	-0.46	-0.31	-0.27*	-0.03	-0.53*	-0.17	0.36	0.34	0.47*	-0.43*	0.29*	-0.19*
BIO3	0.26*	0.04*	-0.16*	-0.25*	-0.22*	-0.28*	-0.25*	-0.1*	-0.07	-0.36*	-0.09*	0.20*	0.29*	0.43*	-0.25*	<b>0.66*</b>	-0.56*
<b>BIO4</b>	<b>0.33*</b>	<b>0.41*</b>	<b>-0.58*</b>	<b>-0.60*</b>	<b>-0.40*</b>	<b>-0.70*</b>	<b>-0.39*</b>	<b>-0.63*</b>	<b>-0.08</b>	<b>-0.69*</b>	<b>-0.16</b>	<b>0.65*</b>	<b>0.45*</b>	<b>0.50*</b>	<b>-0.70*</b>	0.03	0.03
BIO5	-0.12*	0.03*	-0.1*	0.01*	-0.03*	0.00*	0.09*	0.04*	0.10	-0.10*	-0.10*	-0.03*	-0.14*	0.29*	-0.01*	-0.31*	0.30*
BIO6	-0.36	-0.37	0.24	0.35	0.35	0.37	0.50	0.19	0.15	0.41	0.22	-0.34	-0.4*	-0.12*	-0.36*	<b>0.58*</b>	-0.55*
<b>BIO7</b>	<b>0.38*</b>	<b>0.36*</b>	<b>-0.55*</b>	<b>-0.61*</b>	<b>-0.42*</b>	<b>-0.64*</b>	<b>-0.38*</b>	<b>-0.46*</b>	<b>-0.08*</b>	<b>-0.58*</b>	<b>-0.07*</b>	<b>0.55*</b>	<b>0.47*</b>	<b>0.32</b>	<b>-0.57*</b>	<b>0.79*</b>	<b>-0.69*</b>
BIO8	0.48*	0.45*	-0.66*	-0.72*	-0.44*	-0.84*	-0.50*	-0.81*	-0.17	-0.78*	-0.14	<b>0.80*</b>	<b>0.70*</b>	0.49*	<b>-0.83*</b>	<b>-0.74*</b>	<b>0.73*</b>
BIO9	-0.33*	-0.38*	0.67*	<b>0.73*</b>	0.49*	<b>0.77*</b>	0.54*	<b>0.74*</b>	0.19*	<b>0.60*</b>	0.00*	-0.77*	<b>-0.53*</b>	-0.19*	<b>0.75*</b>	<b>-0.72*</b>	<b>0.72*</b>
BIO10	-0.32*	-0.38*	0.64*	<b>0.72*</b>	0.47*	<b>0.76*</b>	0.51*	<b>0.72*</b>	0.16*	<b>0.57*</b>	-0.03	-0.75*	<b>-0.48*</b>	-0.15*	<b>0.72*</b>	-0.18*	0.11
BIO11	-0.25*	-0.02*	-0.11*	0.08*	0.21*	0.17*	0.45*	0.13*	0.23*	0.24*	0.20	-0.22*	-0.28*	-0.17*	0.28*	-0.62*	0.51*
<b>BIO12</b>	<b>-0.43*</b>	<b>-0.42</b>	<b>0.52</b>	<b>0.60</b>	0.35*	<b>0.69*</b>	0.33*	<b>0.57*</b>	0.06*	<b>0.68*</b>	0.13*	<b>-0.59*</b>	<b>-0.52*</b>	<b>-0.49*</b>	<b>0.65*</b>	<b>-0.69*</b>	0.57*
<b>BIO13</b>	<b>-0.5*</b>	<b>-0.43*</b>	<b>0.52*</b>	<b>0.64*</b>	0.4*	<b>0.76*</b>	0.45*	<b>0.65*</b>	0.12	<b>0.75*</b>	0.17*	<b>-0.68*</b>	<b>-0.62*</b>	-0.53*	<b>0.73*</b>	-0.50*	0.43*
BIO14	-0.36*	-0.4*	0.52*	0.52*	0.29*	0.56*	0.23*	0.41*	0.02	0.56*	0.10*	-0.45*	-0.45*	-0.37*	0.50*	-0.35*	0.22*
BIO15	-0.31*	-0.06*	-0.02*	0.16*	0.26*	0.32*	0.58*	0.38*	0.29	0.42*	0.29	-0.41*	-0.44*	-0.38*	0.43*	<b>-0.65*</b>	0.51*
<b>BIO16</b>	<b>-0.50*</b>	<b>-0.43</b>	0.47	<b>0.59*</b>	0.37*	<b>0.72*</b>	0.41*	<b>0.60*</b>	0.11*	<b>0.74*</b>	0.20*	<b>-0.63*</b>	<b>-0.59*</b>	-0.55*	<b>0.69*</b>	-0.45*	0.36*
BIO17	-0.32*	-0.30*	0.45*	0.46*	0.26*	0.5*	0.18*	0.35*	0.01	0.52*	0.08*	-0.39*	-0.38*	-0.42*	0.44*	-0.21*	0.15*
BIO18	-0.14*	-0.17*	0.30*	0.25*	0.12*	0.23*	0.00*	0.06*	-0.06	0.27*	0.02	-0.11*	-0.17*	-0.28*	0.16*	<b>-0.73*</b>	<b>0.61*</b>
BIO19	-0.48*	-0.5*	0.58*	<b>0.68*</b>	0.43	<b>0.81*</b>	0.47	<b>0.71</b>	0.11	<b>0.78*</b>	0.18	<b>-0.73</b>	-0.60*	-0.51*	<b>0.78*</b>	-0.21*	0.24*

Alt - Nadmorska visina, Nagib - nagib terena uzorkovane populacije, BIO1-BIO19 - bioklimatske karakteristike, \* -  $p < 0.001$ , PC1 - prvi vektor analize glavnih komponenti, N - prosečna dužina alkana epikutikularnog voska, d - distribucija oko N



**Slika 4.1.12.** Odnos između prvog vektora analize glavnih komponenti (PC1) i bioklimatskih parametara: **a)** BIO4, **b)** BIO8, **c)** BIO9, **d)** BIO10, **e)** BIO12, **f)** BIO13, **g)** BIO16, **h)** BIO19. R vrednosti se nalaze u tabeli 4.6 (Rajčević et al., 2014)

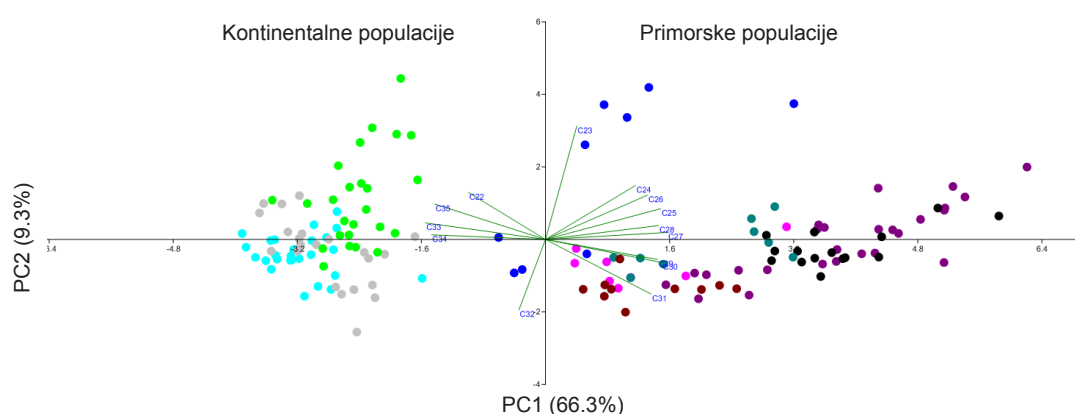
### 4.1.2.3 *Juniperus deltooides*

#### Univarijantne analize

Analiza varijanse (ANOVA) je urađena sa svih devet populacija *J. deltooides* uzimajući relativne količine svih 14 *n*-alkana kao i *N* i *d* vrednosti. Za one alkane kod kojih nije bila normalna distribucija, korišćene su log-transformisane vrednosti. Nađene su statistički značajne razlike za sve ispitane *n*-alkane ( $p < 0,005$ ). Većina ispitanih alkana ( $C_{24}$ ,  $C_{25}$ ,  $C_{27}$ ,  $C_{29}$ ,  $C_{31}$  i  $C_{33}$ ) jasno odvajaju kontinentalne od primorskih populacija (Tabela 4.4).

#### Analiza glavnih komponentni (PCA)

Varijabilnost u sastavu detektovanih 14 *n*-alkana kod svih 175 individua je analizirana korišćenjem analize glavnih komponenti (PCA). Prve dve ose ove analize objašnjavaju 75,6 % ukupne varijabilnosti (Slika 4.13). PCA pokazuje jasno odvajanje između kontinentalnih i primorskih populacija *J. deltooides*. Kontinentalne populacije se karakterišu znatno većom količinom najdužih detektovanih alkana ( $C_{33}$ - $C_{35}$ ) u odnosu na primorske koje su bogatije kraćim alkanima ( $C_{25}$ - $C_{29}$ ).



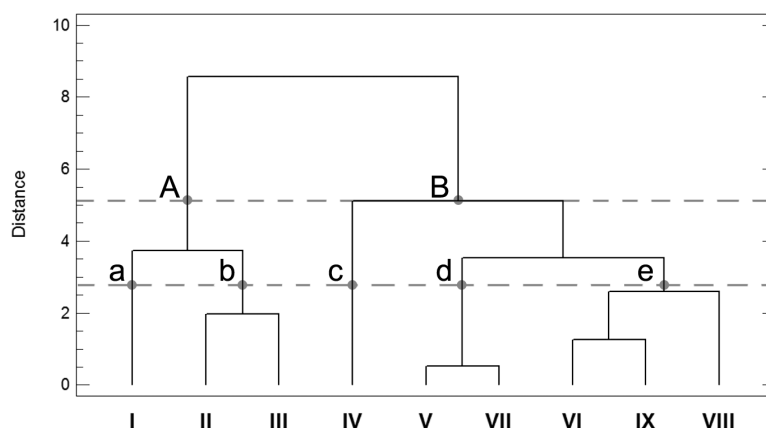
**Slika 4.1.13.** Scatter plot dobijen analizom glavnih komponenti (PCA) relativnih količina 14 alkana izolovanih iz epikutikularnih voskova *J. deltooides*: ● Kopaonik, ● Maglič, ● Pčinja, ● Rovinj, ● Senj, ● Kruševo, ● Đevrske, ● Trogir, ● Makarska.

*Hijerarhijska klaster analiza (HCA)*

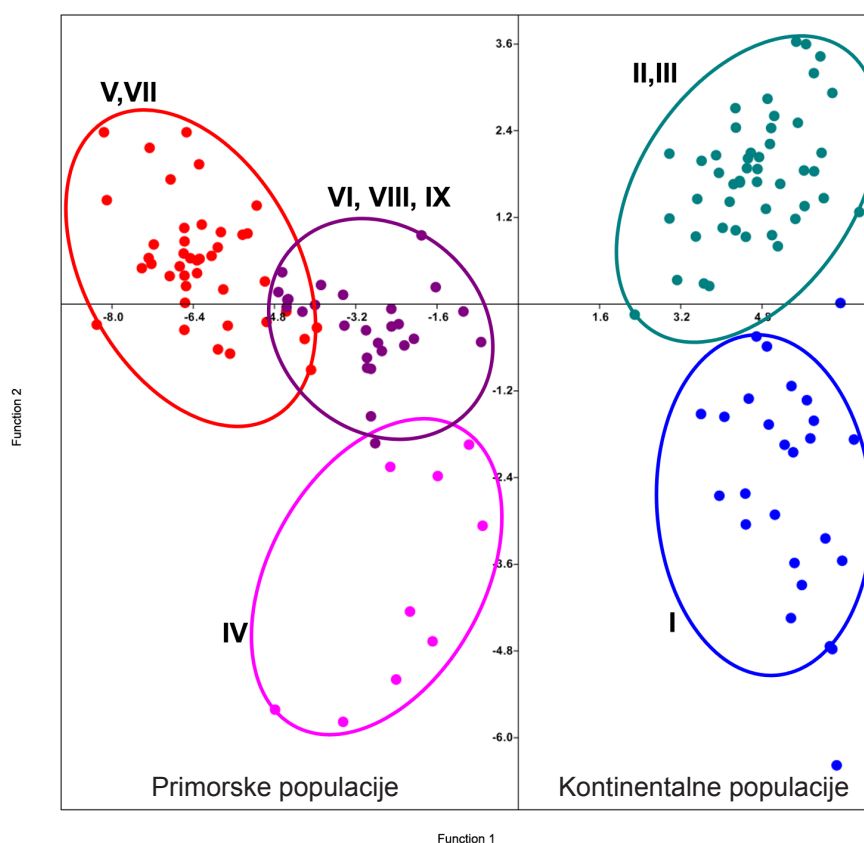
Dendogram dobijen HCA (kvadrirane Euklidianove distance, UPGMA), baziranom na prosečnom udelu svih 14 *n*-alkana (Slika 4.14) pokazuje formiranje dve grupe na otprilike petom nivou: jedna koju čine sve kontinentalne populacije (**Klada A**) i jedna koje čine primorske populacije (**Klada B**). Na otprilike trećem nivou pet visokopodržanih klada se mogu razlikovati: **Klada A** (kontinentalne populacije), *Subklada a* koju čini populacija sa Kopaonika i *Subklada b* koju čine populacija sa Magliča i iz Pčinje. **Klada B** (primorske populacije): *Subklada c* populacija Rovinj; *Subklada d* populacije Senj i Đevrske; i *Subklada e* populacije Kruševo, Trogir, Makarska.

*Diskriminantna analiza (DA)*

*Scatter plot* (Slika 4.14) dobijen diskriminantnom analizom (DA) je u saglasnosti sa HCA. Prva diskriminanta funkcija objašnjava čak 87,4 % ukupne varijabilnosti i odvaja sve individue u dve velike grupe: kontinentalne i primorske. Prva diskriminanta osa je pod najvećim uticajem heptakozana i tritriakontana, dok je druga pod najvećim uticajem pentatriakontana. Svih pet grupa u DA su statistički visoko podržane ( $p < 0,05$ ). Relativne količine  $C_{33}$ - $C_{35}$  su odgovorne za grupisanje kontinentalnih populacija na jednu stranu, a  $C_{29}$  i  $C_{31}$  za grupisanje primorskih na drugu. Na *scatter plot*-u se populacija sa Kopaonika odvaja od populacija sa Magliča i iz Pčinje. S druge strane, primorske populacije su se grupisale u tri klastera: populacije Senj i Đevrske s jedne strane, i populacija iz Rovinja sa druge. Populacije Kruševo, Trogir i Makarska se nalaze grupisane između ova dva klastera. Populacija iz Rovinja pokazuje najveću varijabilnost odnosno ima najveću distribuciju na *scatter plot*-u.



**Slika 4.1.14.** Dendrogram dobijen klaster analizom (kvadrirane Euklidianove distance, UPGMA) relativnih količina 14 alkana izolovanih iz kutikularnih voskova iglica *J. deltoides*; **Klada A** (kontinentalne): **I** - Kopaonik, **II** - Maglič, **III** - Pčinja; **Klada B** (primorske): **IV** - Rovinj, **V** - Senj, **VI** - Kruševo, **VII** - Đevrske, **VIII** - Trogir, **IX** - Makarska (Rajčević et al., 2014);



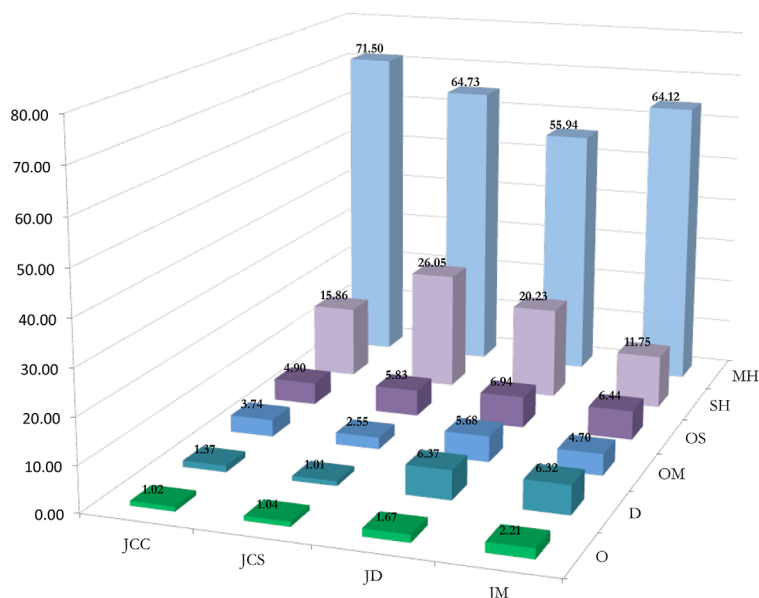
**Slika 4.1.15.** Scatter plod dobijen diskriminantnom analizom 14 alkana izolovanih iz iglica *J. deltoides*. Grupe bazirane na grupama dobijenim iz HCA. **Klada A** (kontinentalne): **I** - Kopaonik, **II** - Maglič, **III** - Pčinja; **Klada B** (primorske): **IV** - Rovinj, **V** - Senj, **VI** - Kruševo, **VII** - Đevrske, **VIII** - Trogir, **IX** - Makarska (Rajčević et al., 2014)

## 4.2 Terpeni

### 4.2.1 Hemijski sastav i varijabilnost terpena ispitivanih taksona

U etarskom ulju izabranih vrsta sekcije *Juniperus* sa Balkanskog poluostrva identifikovano je preko 200 jedinjenja. Najviše jedinjenja je identifikovano u etarskom ulju iglica *J. deltooides* (208), a najmanje kod *J. macrocarpa* (103).

Monoterpeni su dominantna grupa u sastavu etarskog ulja (61,6 – 75,2 %), što je karakteristika vrsta sekcije *Juniperus* (Otto & Wilde, 2001). Od monoterpena najzastupljeniji su monoterpenski ugljovodonici (55,9 – 71,5 %), dok su oksigenisani monoterepeni pronađeni samo u malom ukupnom procentu. Seskviterpeni (18,2 – 31,88 %) su takođe dominantno predstavljeni seskviterpenskim ugljovodonicima (11,8 – 26,1 %) (Tabela 4.7, Slika 4.2.2). Etarsko ulje *J. communis* var. *communis* se karakteriše najvećim udelom monoterpena, i to pre svega monoterpenskih ugljovodonika, dok se etarsko ulje *J. communis* var. *saxatilis* karakteriše izuzetno visokim udelom seskviterpena u odnosu na sva ostala ulja. S druge strane, etarska ulja *J. deltooides* su pokazala najveći udeo diterpena od svih ispitivanih grupa.



**Slika 4.2.1.** Procentualna zastupljenost grupa jedinjenja u etarskom ulju iglica odabranih vrsta sekcije *Juniperus* sa Balkanskog poluostrva: **JCC** - *J. communis* var. *communis*, **JCS** - *J. communis* var. *saxatilis*, **JD** - *J. deltooides*, **JM** - *J. macrocarpa*; **MH** - Monoterpenski ugljovodonici, **OM** - Oksigenisani monoterpeni, **SH** - Seskviterpenski ugljovodonici, **OS** - Oksigenisani seskviterpeni, **D** - Diterpeni, **O** - Ostala jedinjenja (cf. Tabela 4.7)

Tri monoterepena,  $\alpha$ -pinen, limonen i sabinen, su dominantna jedinjenja u sastavu etarskog ulja. Zajedno, ova tri jedinjenja u proseku čine oko 51,5 % ukupnog sastava etarskog ulja. U zavisnosti od vrste i lokaliteta, dominante komponente su se smenjivale. Pa tako, kod etarskog ulja iglica *J. communis* var. *communis* dominantna komponenta je bila ili  $\alpha$ -pinen, ili sabinen, ili su pak obe komponente bile podjednako zastupljene. Kod *J. communis* var. *saxatilis* je to uvek bio  $\alpha$ -pinen, dok su se na drugom mestu smenjivali germakren D i sabinen, u zavisnosti od lokaliteta. Kod *J. deltoides* su to bili  $\alpha$ -pinen ili limonen, dok je u ispitivanoj populaciji *J. macrocarpa* dominirao  $\alpha$ -pinen.

Pored ovih jedinjenja, još 24 jedinjenja ima srednje visok udeo (0,5 – 10 %) (*sensu* Von Rudloff, 1975): (2*E*)-heksenal,  $\alpha$ -tujen, kamfen,  $\beta$ -pinen, mircen,  $\delta$ -kar-2-en, *p*-cimen,  $\delta$ -kar-3-en, terpinolen,  $\alpha$ -kopaen, (*E*)-kariofilen,  $\gamma$ -murolen, germakren D,  $\alpha$ -murolen,  $\gamma$ -kadinen, germakren B, kariofilen oksid,  $\alpha$ -kadinol, manoil oksid, abietadien, 4-*epi*-abiteal i abietal. Značajan broj komponenti (73 - 90) je pronađen u tragovima ( $x < 0,1\%$ ), i predstavlja u proseku oko 2,2 % sastava etarskog ulja.

**Tabela 4.7** Procentualna zastupljenost grupa jedinjenja u sastavu etarskog ulja iglica odabranih vrsta sekcije *Juniperus* sa Balkanskog poluostrva

	JCC n=72	JCS n=218	JD n=254	JM n=34
Broj detektovanih terpena	117	141	208	103
Zastupljenost <sup>a)</sup>				
<b>Ukupno monoterepena</b>	<b>75.24</b>	<b>67.28</b>	<b>61.62</b>	<b>68.82</b>
<i>monoterpenski ugljovodonici</i>	71.50	64.73	55.94	64.12
<i>oksisgenisani monoterpenni</i>	3.74	2.55	5.68	4.70
<b>Ukupno seskviterpena</b>	<b>20.76</b>	<b>31.88</b>	<b>27.16</b>	<b>18.19</b>
<i>seskviterpenski ugljovodonici</i>	15.86	26.05	20.23	11.75
<i>oksisgenisani seskviterpeni</i>	4.90	5.83	6.94	6.44
<b>Ukupno diterpena</b>	<b>1.37</b>	<b>1.01</b>	<b>6.37</b>	<b>6.32</b>
<i>diterpenski ugljovodonici</i>	0.93	0.75	2.20	3.71
<i>oksisgenisani diterpeni</i>	0.44	0.26	4.17	2.60
<b>Druga jedinjenja<sup>b)</sup></b>	<b>1.02</b>	<b>1.04</b>	<b>1.67</b>	<b>2.21</b>
<b>Neidentifikovano</b>	<b>0.00</b>	<b>0.04</b>	<b>0.14</b>	<b>1.08</b>
<b>UKUPNO</b>	<b>98.39</b>	<b>99.16</b>	<b>96.96</b>	<b>96.62</b>

JCC - *J. communis* var. *communis*, JCS - *J. communis* var. *saxatilis*, JD - *J. deltoides*, JM - *J. macrocarpa*;

<sup>a)</sup> Sadržaj svake grupe jedinjenja komponente je dat kao procenat (srednja vrednost) ukupnog sastava etarskog ulja

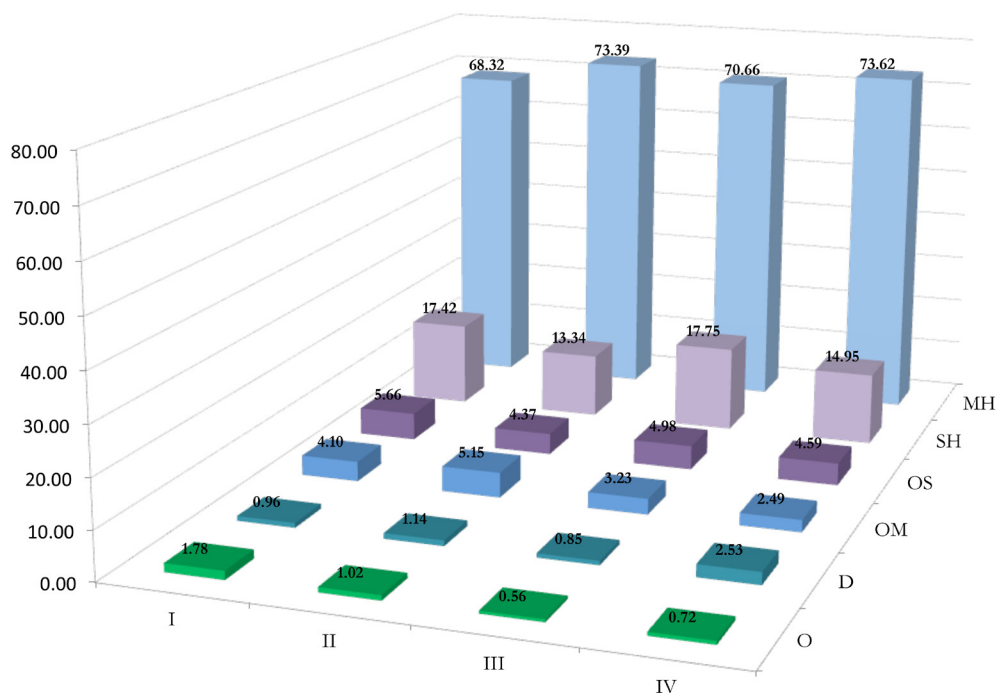
<sup>b)</sup> alifatični ugljovodonici, alifatični aldehidi i alkoholi, alifatične kiseline i njihovi estri i aldehidi, aromatični estri, alil aromatični alkoholi, aril estri i aromatične kiseline



#### 4.2.1.1 Hemijski sastav i varijabilnost terpena etarskog ulja iglica *Juniperus communis* var. *communis*

U etarskom ulju *J. communis* var. *communis* je detektovano 117 jedinjenja, od kojih je 116 identifikovano. U tabeli 4.8 je prikazano 75 jedinjenja, što predstavlja 98,0 – 98,9 % ukupnog sastava etarskog ulja. Komponente koje su bile prisutne sa manje od 0,05% nisu prikazane u tabeli.

Monoterpeni su dominantna grupa u sastavu etarskog ulja (75,2 %), što je karakteristika vrsta sekcije *Juniperus* (Otto & Wilde, 2001). Od monoterpena najzastupljeniji su monoterpeni ugljovodonici (71,5 %), dok su oksigenisani monotereni pronađeni samo u malom ukupnom procentu. Seskviterpeni (20,8 %) su takođe dominantno predstavljeni seskviterpenskim ugljovodonicima (15,9 %) (Slika 4.2.2).



**Slika 4.2.2.** Procentualna zastupljenost grupa jedinjenja u etarskom ulju iglica *J. communis* var. *communis*: **I** - Deliblatska peščara, **II** - Kopaonik, **III** - Suva planina, **IV** - Stara planina; **MH** - Monoterpeni ugljovodonici, **OM** - Oksigenisani monotereni, **SH** - Seskviterpenski ugljovodonici, **OS** - Oksigenisani seskviterpeni, **D** - Diterpeni, **O** - Ostala jedinjenja (cf. Tabela 4.8)

Dva monoterepena,  $\alpha$ -pinen i sabinen, su dominantna jedinjenja u sastavu etarskog ulja *J. communis* var. *communis*. Zajedno, ova dva jedinjenja su u proseku činila oko 55,0 % ukupnog sastava etarskog ulja. Ove dve komponente su se smenjivale u zavisnosti od jedinke i populacije, ( $R^2=-0.9$ ). Iako je odnos  $\alpha$ -pinena i sabinena varirao od jedinke do jedinke, populacije su pokazale trend ka dominaciji jednog od ova dva jedinjenja. Pored ovih jedinjenja, još 25 ima srednje visok sadržaj (0,5 – 10 %) *sensu* Von Rudloff (1975): (2*E*)-heksenal,  $\alpha$ -tujen,  $\beta$ -pinen, mircen,  $\delta$ -kar-3-en,  $\alpha$ -terpinen, limonen,  $\gamma$ -terpinen, terpinolen, terpinen-4-ol,  $\beta$ -elemen, (*E*)-kariofilen,  $\beta$ -kopaen,  $\alpha$ -humulen, germakren D,  $\beta$ -selinen, biciklogermakren, germakren A,  $\gamma$ -kadinen,  $\delta$ -kadinen, germakren B, germakren D-4-ol,  $\tau$  kadinol,  $\alpha$ -kadinol i abietadien. Značajan broj komponenti (73) je pronađen u tragovima ( $x < 0,1\%$ ), i predstavlja u proseku oko 4,6% sastava etarskog ulja.

Profil glavnih komponenti u etarskom ulju osam populacija *J. communis* var. *communis* je bio sledeći:

**Deliblatska peščara:**  $\alpha$ -pinen = sabinen >> limonen = mircen = germakren D > germakren B = terpinen-4-ol >  $\delta$ -kadinen;

**Kopaonik:** sabinen >>  $\alpha$ -pinen >> limonen = mircen > germakren D = terpinen-4-ol >  $\alpha$ -tujen > germakren B = terpinolen;

**Suva planina:**  $\alpha$ -pinen > sabinen >> limonen = germakren D > germakren B =  $\delta$ -kadinen = terpinen-4-ol =  $\beta$ -pinen;

**Stara planina:**  $\alpha$ -pinen >> sabinen > limonen > germakren D > germakren B = mircen >  $\beta$ -pinen =  $\alpha$ -tujen;

**Tabela 4.8** Sastav etarskog ulja izolovanog iz iglica *J. communis* var. *communis*

No	Jedinjenje	I <sup>a)</sup> n=30	II n=20	III n=22	IV n=3
<b>1</b>	<b>Hexanal</b>	<b>0.4 ± 0.3</b>	<b>0.2 ± 0.1</b>	<b>0.1 ± 0.1</b>	<b>tr</b>
2	(2 <i>E</i> )-Hexenal	1.3 ± 0.7	0.7 ± 0.3	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.2
3	Tricyclene	tr	-	tr	-
4	α-Thujene	1.8 ± 0.9	2.6 ± 0.7	1.5 ± 1.0	1.7 ± 0.9
<b>5</b>	<b>α-Pinene</b>	<b>27.6 ± 15</b>	<b>17.4 ± 8.1</b>	<b>31.0 ± 17.3</b>	<b>38.8 ± 8.7</b>
<b>6</b>	<b>Camphene</b>	<b>0.2 ± 0.1</b>	<b>0.2 ± 0.3</b>	<b>0.2 ± 0.1</b>	<b>0.2 ± 0</b>
7	Verbenene	tr	tr	0.1 ± 0.2	-
8	Sabinene	24.4 ± 12.6	37.8 ± 9.9	23.2 ± 15.6	19.6 ± 4.2
<b>9</b>	<b>β-Pinene</b>	<b>1.4 ± 0.3</b>	<b>1.2 ± 0.3</b>	<b>1.7 ± 0.3</b>	<b>1.7 ± 0.3</b>
10	Myrcene	3.8 ± 0.8	4.1 ± 0.7	3.2 ± 0.8	2.6 ± 0.9
<b>11</b>	<b>δ-Car-2-ene</b>	<b>0.1 ± 0.1</b>	<b>0.1 ± 0.1</b>	<b>0.2 ± 0.2</b>	<b>0.1 ± 0.1</b>
<b>12</b>	<b>α-Phelandrene</b>	<b>0.4 ± 0.3</b>	<b>0.5 ± 0.5</b>	<b>0.5 ± 0.4</b>	<b>0.2 ± 0.2</b>
<b>13</b>	<b>δ-Car-3-ene</b>	<b>0.3 ± 0.6</b>	<b>0.1 ± 0.1</b>	<b>0.7 ± 1.2</b>	<b>0.4 ± 0.5</b>
14	α-Terpinene	0.7 ± 0.3	0.9 ± 0.3	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.3
<b>15</b>	<b><i>p</i>-Cymene</b>	<b>0.4 ± 0.2</b>	<b>0.3 ± 0.1</b>	<b>0.2 ± 0.2</b>	<b>tr</b>
<b>16</b>	<b>Limonene</b>	<b>4.0 ± 2.0</b>	<b>4.3 ± 1.8</b>	<b>5.3 ± 4.1</b>	<b>5.4 ± 6.3</b>
<b>17</b>	<b>(<i>E</i>)-β-Ocimene</b>	<b>0.2 ± 0.2</b>	<b>tr</b>	<b>0.1 ± 0.1</b>	<b>-</b>
18	γ-Terpinene	1.4 ± 0.7	1.7 ± 0.6	0.9 ± 0.6	1.0 ± 0.5
19	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1
20	Terpinolene	1.5 ± 0.6	2.0 ± 0.4	1.3 ± 0.6	1.1 ± 0.3
<b>21</b>	<b>Linalool</b>	<b>0.3 ± 0.1</b>	<b>0.4 ± 0.2</b>	<b>0.3 ± 0.2</b>	<b>0.2 ± 0.1</b>
22	<i>cis</i> -Thujone	-	tr	-	-
23	<i>cis-p</i> -Menth-2-en-1-ol	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	tr	-
24	<i>trans</i> -Pinocarveol	0.1 ± 0	0.1 ± 0.1	-	-
25	<i>trans</i> -Verbenol	tr	tr	tr	-
26	Terpinen-4-ol	2.6 ± 1.3	3.2 ± 1.2	1.8 ± 1.2	1.4 ± 0.2
<b>27</b>	<b>α-Terpineol</b>	<b>0.2 ± 0.1</b>	<b>0.3 ± 0.1</b>	<b>0.2 ± 0.2</b>	<b>tr</b>
28	Myrtenol	tr	tr	tr	-
29	Thymol, methyl ether	-	tr	tr	-
30	Bornyl acetate	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.4
<b>31</b>	<b>Myrtenyl acetate</b>	<b>-</b>	<b>tr</b>	<b>0.2 ± 0.2</b>	<b>0.4 ± 0.4</b>
<b>32</b>	<b>α-Cubebene</b>	<b>0.2 ± 0.4</b>	<b>0.3 ± 0.4</b>	<b>0.3 ± 0.7</b>	<b>0.2 ± 0.2</b>
<b>33</b>	<b>α-Copaene</b>	<b>0.2 ± 0.3</b>	<b>0.2 ± 0.2</b>	<b>0.5 ± 0.5</b>	<b>0.1 ± 0.1</b>
34	β-Bourbonene	tr	tr	0.1 ± 0.1	tr
<b>35</b>	<b>β-Elemene</b>	<b>0.5 ± 0.2</b>	<b>0.3 ± 0.2</b>	<b>0.7 ± 0.6</b>	<b>0.7 ± 0.1</b>
36	( <i>E</i> )-Caryophyllene	1.1 ± 1.2	1.0 ± 1.2	1.2 ± 1.1	0.5 ± 0.3

nastavak tabele 4.8

No	Jedinjenje	I <sup>a)</sup> n=30	II n=20	III n=22	IV n=3
37	$\beta$ -Copaene	1.0 $\pm$ 2.4	-	-	tr
38	$\gamma$ -Elemene	-	-	0.1 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.1
<b>39</b>	<b><math>\alpha</math>-Humulene</b>	<b>0.9 <math>\pm</math> 0.8</b>	<b>0.8 <math>\pm</math> 0.7</b>	<b>1.0 <math>\pm</math> 0.6</b>	<b>0.6 <math>\pm</math> 0.3</b>
40	<i>cis</i> -Cadina-1(6),4-diene	0.1 $\pm$ 0.1	tr	tr	-
41	<i>trans</i> -Cadina-1(6),4-diene	tr	tr	0.1 $\pm$ 0.1	-
<b>42</b>	<b><math>\gamma</math>-Muurolene</b>	<b>0.3 <math>\pm</math> 0.3</b>	<b>0.1 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>0.2 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>tr</b>
<b>43</b>	<b>Germacrene D</b>	<b>3.6 <math>\pm</math> 2.5</b>	<b>3.3 <math>\pm</math> 2.0</b>	<b>5.2 <math>\pm</math> 2.4</b>	<b>4.1 <math>\pm</math> 4.2</b>
<b>44</b>	<b><math>\beta</math>-Selinene</b>	<b>0.4 <math>\pm</math> 0.6</b>	<b>0.2 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>0.2 <math>\pm</math> 0.2</b>	<b>0.5 <math>\pm</math> 0.6</b>
<b>45</b>	<b><i>trans</i>-Muurola-4(14),5-diene</b>	<b>0.1 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>0.2 <math>\pm</math> 0.2</b>	<b>0.1 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>0.2 <math>\pm</math> 0.1</b>
46	Bicyclogermacrene	1.1 $\pm$ 0.6	0.8 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.7
<b>47</b>	<b><math>\alpha</math>-Muurolene</b>	<b>0.5 <math>\pm</math> 0.3</b>	<b>0.4 <math>\pm</math> 0.2</b>	<b>0.5 <math>\pm</math> 0.7</b>	<b>0.3 <math>\pm</math> 0.1</b>
<b>48</b>	<b>Germacrene A</b>	<b>1.2 <math>\pm</math> 0.7</b>	<b>0.9 <math>\pm</math> 0.5</b>	<b>1.1 <math>\pm</math> 0.7</b>	<b>0.8 <math>\pm</math> 0.6</b>
49	$\beta$ -Curcumene	-	0.3 $\pm$ 0.4	-	-
<b>50</b>	<b><math>\gamma</math>-Cadinene</b>	<b>0.8 <math>\pm</math> 0.7</b>	<b>0.6 <math>\pm</math> 0.9</b>	<b>0.7 <math>\pm</math> 0.7</b>	<b>0.3 <math>\pm</math> 0.1</b>
<b>51</b>	<b><math>\delta</math>-Cadinene</b>	<b>2.1 <math>\pm</math> 1.2</b>	<b>1.6 <math>\pm</math> 1.1</b>	<b>2.1 <math>\pm</math> 1.2</b>	<b>1.5 <math>\pm</math> 0.4</b>
52	<i>trans</i> -Cadina-1,4-diene	0.2 $\pm$ 0.3	-	-	-
53	$\alpha$ -Cadinene	0.1 $\pm$ 0.1	-	-	-
54	Elemol	tr	-	tr	tr
<b>55</b>	<b>Germacrene B</b>	<b>2.8 <math>\pm</math> 2.6</b>	<b>2.0 <math>\pm</math> 1.5</b>	<b>2.3 <math>\pm</math> 2.8</b>	<b>3.6 <math>\pm</math> 5.0</b>
<b>56</b>	<b><i>E</i>-Nerolidol</b>	<b>tr</b>	<b>0.1 <math>\pm</math> 0.3</b>	<b>0.2 <math>\pm</math> 0.3</b>	<b>tr</b>
<b>57</b>	<b>Germacrene D-4-ol</b>	<b>1.4 <math>\pm</math> 1.0</b>	<b>1.0 <math>\pm</math> 0.6</b>	<b>1.7 <math>\pm</math> 2.2</b>	<b>1.1 <math>\pm</math> 1.0</b>
<b>58</b>	<b>Spathulenol</b>	<b>0.2 <math>\pm</math> 0.2</b>	<b>0.3 <math>\pm</math> 0.3</b>	<b>0.1 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>0.2 <math>\pm</math> 0.1</b>
<b>59</b>	<b>Caryophyllene oxide</b>	<b>0.2 <math>\pm</math> 0.3</b>	<b>0.2 <math>\pm</math> 0.4</b>	<b>tr</b>	<b>tr</b>
60	$\beta$ -Oplopenone	tr	tr	tr	tr
61	1- <i>epi</i> -Cubenol	tr	tr	0.3 $\pm$ 0.5	tr
62	$\tau$ Cadinol	1.1 $\pm$ 0.6	0.8 $\pm$ 0.6	0.7 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 0.4
<b>63</b>	<b><math>\alpha</math>-Muurolol (=Torreyol)</b>	<b>0.2 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>0.1 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>0.2 <math>\pm</math> 0.2</b>	<b>0.1 <math>\pm</math> 0.0</b>
64	$\alpha$ -Cadinol	1.8 $\pm$ 1.0	1.4 $\pm$ 1.2	1.1 $\pm$ 0.9	1.5 $\pm$ 0.5
65	$\alpha$ -Bisabolol	tr	tr	-	-
<b>66</b>	<b>Shyobunol</b>	<b>0.3 <math>\pm</math> 0.2</b>	<b>0.2 <math>\pm</math> 0.2</b>	<b>0.2 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>0.3 <math>\pm</math> 0.2</b>
67	(2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i> )-Farnesol	tr	tr	0.1 $\pm$ 0.2	-
68	Manoyl oxide	0.1 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.5	0.1 $\pm$ 0.1	tr
69	Abieta-8,12-diene	tr	tr	tr	0.2 $\pm$ 0.1
<b>70</b>	<b>Abietatriene</b>	<b>0.2 <math>\pm</math> 0.2</b>	<b>0.1 <math>\pm</math> 0.2</b>	<b>tr</b>	<b>0.4 <math>\pm</math> 0.1</b>
<b>71</b>	<b>Abietadiene</b>	<b>0.2 <math>\pm</math> 0.3</b>	<b>0.3 <math>\pm</math> 0.5</b>	<b>0.3 <math>\pm</math> 0.4</b>	<b>1.5 <math>\pm</math> 0.9</b>
72	Sandracopimarinal	tr	tr	tr	-

nastavak tabele 4.8

No	Jedinjenje	I <sup>a)</sup> n=30	II n=20	III n=22	IV n=3
73	<b>4-<i>epi</i>-Abietal</b>	<b>0.2 ± 0.1</b>	<b>0.1 ± 0.1</b>	<b>tr</b>	<b>tr</b>
74	dehydro-Abietal	tr	-	-	tr
75	<b>Abietal</b>	<b>0.1 ± 0.1</b>	<b>0.2 ± 0.3</b>	<b>tr</b>	<b>0.2 ± 0.2</b>
	<b>Monoterpenes</b>	<b>72.4</b>	<b>78.5</b>	<b>73.9</b>	<b>76.1</b>
	<i>monoterpene hydrocarbons</i>	68.3	73.4	70.7	73.6
	<i>monoterpenes oxygenated</i>	4.1	5.2	3.2	2.5
	<b>Sesquiterpenes</b>	<b>23.1</b>	<b>17.7</b>	<b>22.7</b>	<b>19.5</b>
	<i>sesquiterpene hydrocarbons</i>	17.4	13.3	17.7	15.0
	<i>sesquiterpene oxygenated</i>	5.7	4.4	5.0	4.6
	<b>Diterpenes</b>	<b>1.0</b>	<b>1.1</b>	<b>0.8</b>	<b>2.5</b>
	<i>diterpene hydrocarbons</i>	0.5	0.5	0.5	2.2
	<i>diterpene oxygenated</i>	0.5	0.6	0.3	0.3
	<b>other<sup>b)</sup></b>	<b>1.8</b>	<b>1.0</b>	<b>0.6</b>	<b>0.7</b>
	<b>TOTAL</b>	<b>98.2</b>	<b>98.4</b>	<b>98.0</b>	<b>98.9</b>

**I** - Deliblatska pešćara, **II** - Kopaonik, **III** - Suva planina, **IV** - Stara planina;

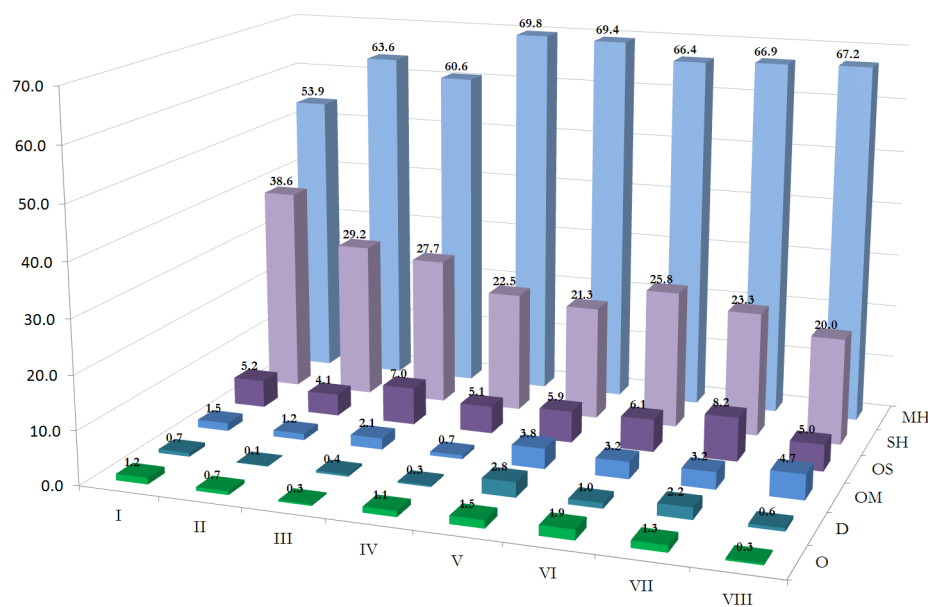
<sup>a)</sup> Sadržaj svake komponente je dat kao procenat (srednja vrednost ± SD) ukupnog sastava etarskog ulja, **tr** - tragovi (0.05 < tr < 0.10%); – nije detektovano jedinjenje; jedinjenja koja su bila zastupljena sa manje od 0.05% nisu predstavljena u tabeli; jedinjenja korišćena za statističku obradu su data masnim slovima;

<sup>b)</sup> alifatični ugljovodonici, alifatični aldehidi i alkoholi, alifatične kiseline i njihovi estri i aldehidi, aromatični estri, alil aromatični alkoholi, aril estri i aromatične kiseline

#### 4.2.1.2 Hemijski sastav i varijabilnost terpena etarskog ulja iglica *Juniperus communis* var. *saxatilis*

U etarskom ulju *J. communis* var. *saxatilis* je detektovano 141 jedinjenja, od kojih je 140 identifikovano. U tabeli 4.9 je prikazano 121 jedinjenje, što predstavlja 98,5 – 99,6% ukupnog sastava etarskog ulja. Komponente koje su bile prisutne sa manje od 0,05% nisu prikazane u tabeli.

Monoterpeni su dominantna grupa u sastavu etarskog ulja *J. communis* var. *saxatilis* (67,3 %), što je karakteristika vrsta sekcije *Juniperus* (Otto & Wilde, 2001). Od monoterpena najzastupljeniji su monoterpeni ugljovodoni (64,7 %), dok su oksigenisani monoterpeni pronađeni samo u malom ukupnom procentu. Seskviterpeni (31,9 %) su takođe dominantno predstavljeni seskviterpenskim ugljovodonicima (26,1 %) (Slika 4.2.3).



**Slika 4.2.3.** Procentualna zastupljenost grupa jedinjenja u etarskom ulju iglica *J. communis* var. *saxatilis*: **I** - Velebit, **II** - Biokovo, **III** - Prenj, **IV** - Durmitor, **V** - Kopaonik, **VI** - Suva planina, **VII** - Stara planina, **VIII** - Mavrovo; **MH** - Monoterpeni ugljovodoni, **OM** - Oksigenisani monoterpeni, **SH** - Seskviterpenski ugljovodoni, **OS** - Oksigenisani seskviterpeni, **D** - Diterpeni, **O** - Ostala jedinjenja (cf. Tabela 4.9)

Dominantno jedinjenje u sastavu etarskog ulja je  $\alpha$ -pinen, koji u proseku čini oko 50,4 % etarskog ulja. Druga dominantna komponenta je varirala između populacija. U submediteranskim populacijama germakren D (seskviterpen) je drugo najzastupljenije jedinjenje (7,0 %), dok je u kontinentalnim populacijama to sabinen (17,2 %). Pored ovih jedinjenja, još 22 ima srednje visok udeo (0,5 – 10 %) *sensu* Von Rudloff (1975):  $\alpha$ -tujen, mircen,  $\alpha$ -felandren,  $\delta$ -kar-3-en, limonen, terpinolen, terpinen-4-ol,  $\beta$ -elemen, sibiren, (*E*)-kariofilen,  $\alpha$ -humulen,  $\beta$ -selinen,  $\alpha$ -selinen, biciklogermakren,  $\alpha$ -murolen, germakren A,  $\gamma$ -kadinen,  $\delta$ -kadinen, germakren B, germakren D-4-ol,  $\tau$ -kadinol i  $\alpha$ -kadinol. Značajan broj komponenti (82) je pronađen u tragovima ( $x < 0,1\%$ ), i predstavlja u proseku oko 2,6% sastava etarskog ulja.

Profil glavnih komponenti u etarskom ulju osam populacija *J. communis* var. *saxatilis* je bio sledeći:

**Velebit:**  $\alpha$ -pinen >> germakren D = germakren A >  $\beta$ -elemen > limonen >  $\beta$ -selinen;

**Biokovo:**  $\alpha$ -pinen >> germakren D >  $\delta$ -kar-3-en = limonen >  $\delta$ -kadinen >  $\beta$ -pinen;

**Prenj:**  $\alpha$ -pinen >> germakren D >  $\delta$ -kar-3-en >  $\delta$ -kadinene > limonen >  $\beta$ -pinen;

**Durmitor:**  $\alpha$ -pinen >>  $\delta$ -kar-3-en > germakren D >  $\delta$ -kadinen = limonen =  $\beta$ -pinen;

**Kopanik:**  $\alpha$ -pinen > sabinen >> germakren D > mircene > limonen > germakren B;

**Suva planina:**  $\alpha$ -pinen > sabinen >> germakren D > germakren B = mircen > limonen;

**Stara planina:**  $\alpha$ -pinen > sabinen >> germakren D > germakren D-4-ol = mircen >  $\delta$ -kadinene = limonen;

**Mavrovo:**  $\alpha$ -pinen > sabinen >> germakren D > limonen > germakren B >  $\delta$ -kadinene.

Tabela 4.9 Sastav etarskog ulja izolovanog iz iglica *J. communis* var. *saxatilis*

No.	Jedinjenje	I <sup>a)</sup> n=29	II n=27	III n=29	IV n=30	V n=29	VI n=28	VII n=31	VIII n=16
1	Hexanal	0.2±0.1	-	-	-	tr	tr	tr	tr
2	(2E)-Hexenal	0.6±0.3	tr	-	-	0.3±0.3	0.2±0.2	0.2±0.2	-
3	Tricyclene	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
4	α-Thujene	-	-	tr	-	1.4±0.8	0.9±0.8	1.2±0.8	1.5±1.2
5	<b>α-Pinene</b>	<b>42.3±7.1</b>	<b>46±7.5</b>	<b>43±8.9</b>	<b>46.5±11.1</b>	<b>33±13.2</b>	<b>40.7±16.2</b>	<b>35.7±14</b>	<b>38±13.6</b>
6	Fenchene	tr	0.2±0.2	0.2±0.3	0.4±0.3	tr	tr	-	tr
7	Camphene	0.2±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1
8	Verbenene	-	-	-	-	tr	0.2±0.3	tr	tr
9	<b>Sabinene</b>	<b>0.2±0</b>	<b>0.2±0.1</b>	<b>0.7±1.6</b>	<b>tr</b>	<b>22±12.8</b>	<b>12.9±12.9</b>	<b>18.8±13</b>	<b>15.2±11.5</b>
10	<b>β-Pinene</b>	<b>2±0.5</b>	<b>3±0.5</b>	<b>3.1±0.7</b>	<b>3.3±0.8</b>	<b>1.9±0.5</b>	<b>2±0.7</b>	<b>1.7±0.4</b>	<b>2.1±0.5</b>
11	Myrcene	1.7±0.2	2.4±0.4	1.9±0.5	2.1±0.4	3.1±0.7	2.8±0.8	3±0.9	2.2±0.7
12	<b>δ-Car-2-ene</b>	<b>0.2±0.3</b>	<b>0.3±0.2</b>	<b>0.2±0.2</b>	<b>0.3±0.2</b>	<b>0.2±0.1</b>	<b>tr</b>	<b>0.2±0.2</b>	<b>tr</b>
13	<b>α-Phelandrene</b>	<b>0.5±0.3</b>	<b>1±0.7</b>	<b>0.6±0.4</b>	<b>0.5±0.7</b>	<b>0.4±0.3</b>	<b>0.3±0.5</b>	<b>0.4±0.4</b>	<b>0.3±0.3</b>
14	<b>δ-Car-3-ene</b>	<b>2.3±2.2</b>	<b>4.7±6.2</b>	<b>5.3±7.4</b>	<b>11.7±9.1</b>	<b>1.1±1.9</b>	<b>1.2±1.8</b>	<b>0.6±1</b>	<b>1.4±3.3</b>
15	α-Terpinene	-	-	0.5±2.6	-	0.5±0.3	0.4±0.7	0.3±0.2	0.5±0.4
16	<b>p-Cymene</b>	<b>0.2±0.1</b>	<b>0.2±0.1</b>	<b>0.4±0.3</b>	<b>tr</b>	<b>tr</b>	<b>tr</b>	<b>tr</b>	<b>0.7±0.3</b>
17	<b>Limonene</b>	<b>3.2±1.4</b>	<b>4.6±1.9</b>	<b>3.6±1.9</b>	<b>3.3±2.5</b>	<b>3±1.1</b>	<b>2.6±2</b>	<b>2.7±1.7</b>	<b>3.3±2.1</b>
18	(E)-β-Ocimene	0.2±0.1	-	-	-	tr	0.2±0.1	tr	-
19	Pentyl isobutanoate	-	-	-	-	tr	tr	tr	-
20	γ-Terpinene	-	-	-	-	0.9±0.6	0.5±0.5	0.7±0.4	0.9±0.7
21	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	-	-	-	-	0.2±0.1	0.2±0.2	0.3±0.2	0.3±0.2
22	Terpinolene	0.4±0.1	0.6±0.4	0.4±0.3	0.9±0.5	1.2±0.5	1±0.6	1.1±0.5	0.6±0.3
23	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	tr	-	-	-	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	-



nastavak tabele 4.9

No.	Jedinjenje	I <sup>a)</sup> n=29	II n=27	III n=29	IV n=30	V n=29	VI n=28	VII n=31	VIII n=16
24	Linalool	tr	tr	-	-	0.2±0.2	0.3±0.2	0.2±0.1	-
25	<i>cis</i> -Thujone	-	-	-	-	tr	tr	-	-
26	<i>trans</i> -Thujone	-	-	-	-	tr	tr	tr	-
27	<i>cis-p</i> -Menth-2-en-1-ol	-	-	-	-	tr	tr	tr	tr
28	$\alpha$ -Campholenal	-	-	-	-	tr	tr	tr	tr
29	<i>trans-p</i> -Menth-2-en-1-ol	-	-	tr	-	tr	-	-	0.3±0.3
30	<i>trans</i> -Verbenol	-	-	-	-	tr	tr	tr	tr
31	Camphore	tr	-	tr	-	-	-	-	0.4±0.4
32	Borneol	-	-	0.2±0.1	-	tr	tr	tr	0.2±0.1
33	Terpinen-4-ol	tr	tr	0.2±0.2	-	1.8±1.1	1±0.9	1.2±0.8	2±1.5
34	<i>p</i> -Cymen-8-ol	0.2±0	-	tr	-	-	-	-	0.2±0.1
35	$\alpha$ -Terpineol	0.2±0.2	0.3±0.2	0.3±0.2	0.2±0.2	0.2±0.1	tr	tr	0.2±0.1
36	Myrtenol	tr	tr	0.6±0.4	tr	tr	tr	-	0.3±0.2
37	Citronellol	0.2±0.3	0.2±0.2	0.3±0.2	-	-	0.2±0	-	-
38	Thymol, methyl ether	tr	-	tr	-	tr	0.2±0.3	tr	tr
39	Piperitone	tr	-	-	-	tr	tr	tr	-
40	<i>trans</i> -Sabinene hydrate acetate	-	-	-	-	tr	tr	-	-
41	Methyl citronellate	-	-	-	-	tr	tr	tr	-
42	<b>Bornyl acetate</b>	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.2	0.4±0.1	0.5±0.2	0.3±0.2
43	<i>trans</i> -Sabinyl acetate	-	-	-	-	tr	tr	-	-
44	3-Thujanol acetate	-	-	-	-	tr	tr	tr	-
45	<i>trans</i> -Pinocarvyl acetate	-	-	-	-	tr	-	tr	-
46	Terpinen-4-ol-acetate	-	-	-	-	tr	-	tr	-

nastavak tabele 4.9

No.	Jedinjenje	I <sup>a)</sup> n=29	II n=27	III n=29	IV n=30	V n=29	VI n=28	VII n=31	VIII n=16
<b>47</b>	<b>Myrtenyl acetate</b>	<b>0.2±0.2</b>	<b>0.4±0.3</b>	<b>0.3±0.2</b>	<b>0.8±0.6</b>	<b>tr</b>	<b>0.2±0.2</b>	<b>0.3±0.3</b>	<b>tr</b>
48	δ-Elemene	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	-
49	Linalool propanoate	-	-	-	-	tr	tr	tr	-
50	α-Terpinyl acetate	-	-	-	-	0.2±0.2	0.6±0.7	-	-
51	α-Cubebene	-	tr	0.2±0.5	tr	0.2±0.3	0.2±0.3	0.3±0.4	0.5±0.8
52	Citronellyl acetate	tr	tr	tr	0.2±0.3	tr	0.2±0.2	tr	-
53	Carvyl acetate	-	-	-	-	tr	-	-	-
54	α-Copaene	-	0.4±0.4	0.5±0.3	0.3±0.2	0.3±0.2	0.8±0.5	0.2±0.2	0.4±0.4
55	β-Bourbonene	0.2±0.1	0.3±0.1	0.2±0.1	0.3±0.3	tr	0.2±0.1	tr	0.2±0.1
56	β-Cubebene	-	-	-	-	-	0.2±0.1	tr	-
57	β-Elemene	3.6±1.4	2.4±1.5	2.1±1.2	1.3±0.8	0.5±0.3	0.9±0.6	0.8±0.5	1.9±0.9
58	α-Camphinenene	-	-	-	-	tr	-	0.2±0.2	-
59	Sibirene	-	-	-	-	0.4±0.6	1.5±2.1	0.9±0.8	0.7±1.6
60	β-Cederene	-	-	-	-	tr	-	0.2±0	-
<b>61</b>	<b>(E)-Caryophyllene</b>	<b>2.4±0.8</b>	<b>1.3±0.4</b>	<b>1.3±0.4</b>	<b>1.2±0.6</b>	<b>1.8±2.2</b>	<b>1.8±1.8</b>	<b>1.2±1.8</b>	<b>1.4±1.1</b>
62	<i>cis</i> -Thujopsene	-	-	-	-	1.5±1.9	tr	2.3±0	-
63	β-Copaene	tr	tr	tr	-	-	tr	-	tr
64	γ-Elemene	tr	-	-	-	tr	0.3±0.7	tr	-
65	Aromadendrene	0.2±0.1	-	-	-	tr	-	tr	-
66	<i>cis</i> -Murolo-3,5-diene	tr	tr	-	-	tr	tr	tr	-
67	<i>trans</i> -Murolo-3,5-diene	0.2±0.1	tr	-	-	tr	tr	tr	-
68	α-Humulene	2.4±0.6	1.4±0.4	1.3±0.5	1.1±0.4	1.4±1.4	1.4±1.1	1.1±1	1.2±0.6
69	(E)-β-Farnesene	-	-	0.2±0.3	tr	tr	tr	tr	-
70	<i>cis</i> -Cadina-1(6),4-diene	0.3±0.1	tr	tr	0.2±0.1	tr	tr	tr	tr

nastavak tabele 4.9

No.	Jedinjenje	I <sup>a)</sup> n=29	II n=27	III n=29	IV n=30	V n=29	VI n=28	VII n=31	VIII n=16
71	<i>cis</i> -Muuroala-4(14),5-diene	0.3±0.2	0.2±0.1	-	tr	tr	tr	tr	-
72	<i>trans</i> -Cadina-1(6),4-diene	0.5±0.3	tr	tr	tr	tr	0.2±0.1	0.2±0.1	tr
73	$\gamma$ -Muurolene	1.2±0.4	0.9±0.3	0.7±0.3	0.5±0.2	0.2±0.1	0.3±0.2	0.2±0.1	0.4±0.1
74	<b>Germacrene D</b>	<b>6.6±3.7</b>	<b>7±3</b>	<b>8.1±3.5</b>	<b>6.4±2.8</b>	<b>4.9±2.1</b>	<b>6±3</b>	<b>4.6±2</b>	<b>3.9±3.4</b>
75	$\beta$ -Selinene	3.1±1.4	1.9±1.3	1.4±0.8	0.8±0.5	0.2±0.1	0.3±0.2	0.3±0.1	0.9±0.5
76	<i>trans</i> -Muuroala-4(14),5-diene	0.3±0.1	0.2±0.1	0.2±0.2	0.2±0.1	tr	0.2±0.1	0.2±0.1	tr
77	$\alpha$ -Selinene	2.8±1.1	1.8±1.1	1.1±0.7	0.4±0.5	-	-	-	0.7±0.4
78	<b>Bicyclogermacrene</b>	<b>1.6±0.8</b>	<b>0.9±0.6</b>	<b>1.1±0.8</b>	<b>1±0.7</b>	<b>1±0.4</b>	<b>1.1±0.6</b>	<b>1.1±0.4</b>	<b>0.5±0.4</b>
79	<b><math>\alpha</math>-Muurolene</b>	<b>0.8±0.2</b>	<b>0.7±0.3</b>	<b>0.9±0.6</b>	<b>0.7±0.2</b>	<b>0.4±0.2</b>	<b>0.4±0.2</b>	<b>0.5±0.2</b>	<b>0.4±0.2</b>
80	Germacrene A	6.5±1.9	2.4±1.4	1.2±0.8	2.3±1.4	1.3±0.6	1.6±1.2	1.6±0.7	0.7±0.5
81	$\beta$ -Bisabolene	0.2±0.1	tr	tr	-	-	0.3±0.2	-	-
82	$\beta$ -Curcumene	-	-	-	-	0.4±0.3	0.5±0.7	tr	-
83	<b><math>\gamma</math>-Cadinene</b>	<b>1.5±1.1</b>	<b>1.2±1.3</b>	<b>1.1±0.4</b>	<b>1.1±0.9</b>	<b>0.7±0.9</b>	<b>1.6±1.9</b>	<b>0.9±1.8</b>	<b>0.6±0.4</b>
84	<b><math>\delta</math>-Cadinene</b>	<b>1.5±0.6</b>	<b>3.4±1.7</b>	<b>3.8±1.6</b>	<b>3.5±1.3</b>	<b>2.3±1.1</b>	<b>2.4±1.1</b>	<b>2.9±1</b>	<b>2.4±1.5</b>
85	<i>trans</i> -Cadina-1,4-diene	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-
86	$\alpha$ -Cadinene	0.2±0.1	0.2±0.1	tr	0.2±0.1	tr	0.2±0.1	tr	tr
87	$\alpha$ -Calacorene	-	-	tr	-	-	tr	tr	-
88	Elemol	tr	-	-	-	tr	tr	tr	-
89	<b>Germacrene B</b>	<b>1.8±2.6</b>	<b>2±2.3</b>	<b>1.8±2.5</b>	<b>0.6±0.9</b>	<b>2.5±2.5</b>	<b>2.8±2.8</b>	<b>2.4±2.2</b>	<b>2.6±2.8</b>
90	E-Nerolidol	0.4±0.2	tr	0.2±0.3	0.5±0.4	0.2±0.2	0.6±1	tr	0.3±0.4
91	<b>Germacrene D-4-ol</b>	<b>1.3±0.8</b>	<b>1±0.7</b>	<b>1.6±1.4</b>	<b>1.7±0.8</b>	<b>1.7±1</b>	<b>1.6±1.5</b>	<b>3.2±1.7</b>	<b>0.8±0.7</b>
92	Spathulenol	0.3±0.2	0.6±0.9	0.6±0.5	-	0.2±0.1	0.2±0.1	tr	0.5±0.4
93	Caryophyllene oxide	tr	tr	0.2±0.1	-	tr	tr	tr	0.3±0.4
94	Cedrol	-	-	-	-	0.3±0.2	tr	0.3±0.2	-

nastavak tabele 4.9

No.	Jedinjenje	I <sup>a)</sup> n=29	II n=27	III n=29	IV n=30	V n=29	VI n=28	VII n=31	VIII n=16
95	Humulene epoxide II	-	-	-	tr	tr	-	-	tr
96	$\beta$ -Oplopenone	tr	tr	0.2 $\pm$ 0.1	-	tr	tr	tr	0.3 $\pm$ 0.2
97	$\alpha$ -Colocalene	-	-	-	-	tr	tr	tr	-
98	1- <i>epi</i> -Cubenol	-	tr	tr	tr	tr	0.3 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.9
99	$\gamma$ -Eudesmol	0.2 $\pm$ 0.2	-	-	-	tr	tr	tr	-
100	$\tau$ -Cadinol	0.6 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.4	1 $\pm$ 0.6	0.8 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.4	1 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.6	0.6 $\pm$ 0.6
101	$\alpha$ -Muurolol (=Torreyol)	tr	tr	0.2 $\pm$ 0.1	tr	0.2 $\pm$ 0.1	tr	0.2 $\pm$ 0.1	tr
102	$\alpha$ -Cadinol	0.8 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 0.9	1.1 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.7	1.1 $\pm$ 0.7	1.8 $\pm$ 0.8	1.1 $\pm$ 1
103	Cadalene	-	-	tr	-	tr	-	-	tr
104	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- $\alpha$ -ol	-	-	0.2 $\pm$ 0.5	-	tr	tr	-	-
105	$\alpha$ -Bisabolol	0.2 $\pm$ 0.1	-	-	-	-	tr	-	-
106	<b>Shyobunol</b>	<b>0.3<math>\pm</math>0.3</b>	<b>tr</b>	<b>0.3<math>\pm</math>0.2</b>	<b>tr</b>	<b>0.2<math>\pm</math>0.1</b>	<b>0.2<math>\pm</math>0.1</b>	<b>0.2<math>\pm</math>0.1</b>	<b>tr</b>
107	Eudesm-7(11)-en-4-ol	tr	-	-	-	tr	-	-	-
108	Unknown 1	tr	-	tr	-	-	-	-	tr
109	(2Z,6E)-Farnesol	0.7 $\pm$ 0.7	0.3 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.5	-	0.3 $\pm$ 0.5	0.2 $\pm$ 0.5	tr
110	Sandracopimara-8(14),15-diene	-	-	-	-	tr	tr	0.2 $\pm$ 0.2	-
111	Manool oxide	-	-	tr	-	tr	0.2 $\pm$ 0.3	tr	0.2 $\pm$ 0.2
112	<i>ent</i> -Rosa-1,5-diene	-	-	-	-	tr	tr	tr	-
113	Abieta-8,12-diene	-	-	-	-	tr	-	tr	-
114	Abietatriene	0.2 $\pm$ 0.2	-	tr	0.2 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.4	tr	0.3 $\pm$ 0.4	tr
115	Abietadiene	-	-	-	-	1.3 $\pm$ 0.9	tr	1 $\pm$ 0.6	tr
116	Abieta-8(14),13(15)-diene	tr	-	-	-	tr	tr	tr	-
117	Sandracopimarinal	0.2 $\pm$ 0	-	-	-	tr	tr	tr	-
118	4- <i>epi</i> -Abietal	tr	-	tr	-	tr	tr	tr	tr

nastavak tabele 4.9

No.	Jedinjenje	I <sup>a)</sup> n=29	II n=27	III n=29	IV n=30	V n=29	VI n=28	VII n=31	VIII n=16
119	Methyl sandracopimarate	-	-	-	-	tr	tr	tr	-
120	dehydro-Abietal	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
121	Abietal	-	-	-	-	0.2±0.2	tr	tr	-
	<b>Monoterpenes</b>	<b>55.4</b>	<b>64.8</b>	<b>62.7</b>	<b>70.5</b>	<b>73.2</b>	<b>69.6</b>	<b>70.1</b>	<b>71.9</b>
	<i>monoterpene hydrocarbone</i>	53.9	63.6	60.6	69.8	69.4	66.4	66.9	67.2
	<i>monoterpene oxygenated</i>	1.5	1.2	2.1	0.7	3.8	3.2	3.2	4.7
	<b>Sesquiterpenes</b>	<b>43.8</b>	<b>33.3</b>	<b>34.7</b>	<b>27.6</b>	<b>27.2</b>	<b>31.9</b>	<b>31.5</b>	<b>25.0</b>
	<i>sesquiterpene hydrocarbons</i>	38.6	29.2	27.7	22.5	21.3	25.8	23.3	20.0
	<i>sesquiterpene oxygenated</i>	5.2	4.1	7.0	5.1	5.9	6.1	8.2	5.0
	<b>Diterpenes</b>	0.7	0.1	0.4	0.3	2.8	1.0	2.2	0.6
	<i>diterpene hydrocarbons</i>	0.4	0.1	0.3	0.3	2.3	0.5	1.8	0.3
	<i>diterpene oxygenated</i>	0.3	0.0	0.1	0.0	0.5	0.5	0.4	0.3
	<b>Other<sup>b)</sup></b>	<b>1.2</b>	<b>0.7</b>	<b>0.3</b>	<b>1.1</b>	<b>1.5</b>	<b>1.9</b>	<b>1.3</b>	<b>0.3</b>
	<b>Unknown</b>	<b>0.1</b>	<b>0.0</b>	<b>0.1</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.1</b>
	<b>TOTAL</b>	<b>98.6±0.5</b>	<b>98.8±0.8</b>	<b>98.7±0.6</b>	<b>99.5±0.2</b>	<b>99.6±0.2</b>	<b>99.9±0.3</b>	<b>99.7±0.2</b>	<b>98.5±0.6</b>

I - Velebit, II - Biokovo, III - Prenj, IV - Durmitor, V - Kopaonik, VI - Stara planina, VII - Suva planina, VIII - Mavrovo;

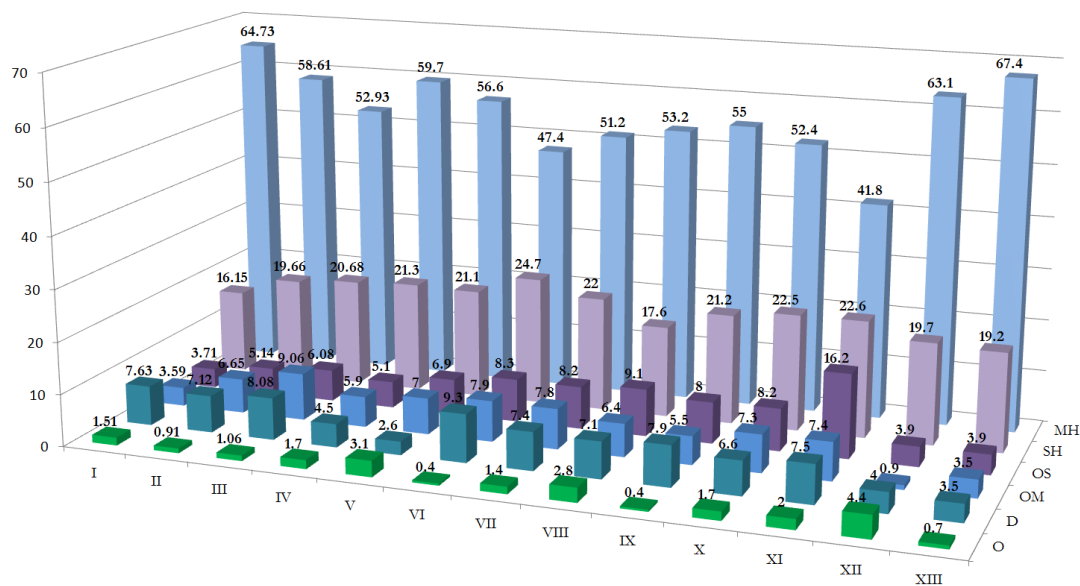
<sup>a)</sup> Sadržaj svake komponente je dat kao procenat (srednja vrednost± SD) ukupnog sastava etarskog ulja, tr - tragovi (0.05 < tr < 0.10%); - nije detektovano jedinjenje; jedinjenja koja su bila zastupljena sa manje od 0.05% nisu predstavljena u tabeli; jedinjenja korišćena za statističku obradu su data masnim slovima;

<sup>b)</sup> alifatični ugljovodonici, alifatični aldehidi i alkoholi, alifatične kiseline i njihovi estri i aldehidi, aromatični estri, alil aromatični alkoholi, aril estri i aromatične kiseline

#### 4.2.1.3 Hemijski sastav i varijabilnost terpena etarskog ulja iglica *Juniperus deltoides*

U etarskom ulju *J. deltoides* je detektovano 208 jedinjenja, od kojih je 206 identifikovano. U tabeli 4.10 je prikazano 116 jedinjenja, što predstavlja 95,4 – 98,7% ukupnog sastava etarskog ulja. Komponente koje su bile prisutne sa manje od 0,05% nisu prikazane u tabeli.

Monoterpeni su dominantna grupa u sastavu etarskog ulja *J. deltoides* (61,6%), što je karakteristika vrsta sekcije *Juniperus* (Otto & Wilde, 2001). Od monoterpena najzastupljeniji su monoterpeni ugljovodonici (55,9 %), dok su oksigenisani monoterpeni pronađeni samo u relativno malom ukupnom procentu. Seskviterpeni (27,2 %) su takođe dominantno predstavljeni seskviterpenskim ugljovodonicima (20,2 %) (Slika 4.2.4).



**Slika 4.2.4.** Procentualna zastupljenost grupa jedinjenja u etarskom ulju iglica *J. deltoides*: **I** - Kopaonik, **II** - Maglič, **III** - Pčinja, **IV** - Rovinj, **V** - Senj, **VI** - Kruševo, **VII** - Benkovac, **VIII** - Đevrske, **IX** - Konjevrate, **X** - Trogir, **XI** - Makarska, **XII** - Žanjice, **XIII** - Valdanos, **MH** - Monoterpeni ugljovodonici, **OM** - Oksigenisani monoterpeni, **SH** - Seskviterpenski ugljovodonici, **OS** - Oksigenisani seskviterpeni, **D** - Diterpeni, **O** - Ostala jedinjenja (cf. Tabela 4.10)

Dva monoterepena,  $\alpha$ -pinen i limonen, su dominantna jedinjenja u sastavu etarskog ulja. Zajedno, ova dva jedinjenja su u proseku činila oko 46,7 % ukupnog sastava etarskog ulja. Pored ovih jedinjenja, još 24 ima srednje visok udeo (0,5 – 10 %) *sensu* Von Rudloff (1975): (2*E*)-heksanal,  $\beta$ -pinen, mircen,  $\delta$ -kar-3-en, *p*-cimen, *trans*-verbenol, verbenon, *trans*-karveol,  $\alpha$ -kopaen, (*E*)-kariofilen,  $\alpha$ -humulen, germakren D, *ar*-kurkumen,  $\alpha$ -murolen,  $\gamma$ -kadinen,  $\delta$ -kadinen,  $\alpha$ -kalakoren, kariofilen oksid, humulen epoksid II,  $\tau$ -kadinol, manoil oksid, abietatrien, abietadien, abietal. Značajan broj komponenti (90) je pronađen u tragovima ( $0,05 < x < 0,1\%$ ), i predstavlja u proseku oko 3,0% sastava etarskog ulja

Profil glavnih komponenti u etarskom ulju trinaest populacija *J. deltoides* je bio sledeći:

**Kopaonik:** pinen >> limonen >>  $\delta$ -kar-3-en > (*E*)-kariofilen =  $\delta$ -kadinen > abietadien = manoil oksid =  $\beta$ -pinen

**Maglič:**  $\alpha$ -pinen >> limonen >> germakren D > (*E*)-kariofilen =  $\delta$ -kadinen > manoil oksid =  $\alpha$ -humulen

**Pčinja:**  $\alpha$ -pinen >> limonen >> germakren D = manoil oksid > (*E*)-kariofilen =  $\delta$ -kadinen >  $\alpha$ -humulen =  $\delta$ -kar-3-en = kariofilen oksid

**Rovinj:**  $\alpha$ -pinen = limonen >> germakren D >  $\delta$ -kadinen > mircen =  $\beta$ -pinen

**Senj:**  $\alpha$ -pinen = limonen >>  $\delta$ -kadinen > germakren D =  $\delta$ -kar-3-en > (*E*)-kariofilen

**Kruševo:** limonen >>  $\alpha$ -pinen >>  $\delta$ -kadinen = manoil oksid > germakren D >  $\alpha$ -kalakoren

**Benkovac:** limonen >>  $\alpha$ -pinen >>  $\delta$ -kadinen = germakren D > kariofilen oksid = manoil oksid >  $\gamma$ -kadinen

**Đevrske:** :  $\alpha$ -pinen = limonen >> kariofilen oksid = manoil oksid > (*E*)-kariofilen =  $\delta$ -kadinen = germakren D =  $\gamma$ -kadinen

**Konjevrate:**  $\alpha$ -pinen > limonen >> germakren D >  $\delta$ -kadinen = (*E*)-kariofilen = kariofilen oksid = manoil oksid

**Trogir:** :  $\alpha$ -pinen = limonen >>  $\delta$ -kadinen > germakren D > (*E*)-kariofilen =  $\gamma$ -kadinen = kariofilen oksid = manoil oksid

**Makarska:** limonen >  $\alpha$ -pinen >> kariofilen oksid > (*E*)-kariofilen > manoil oksid =  $\delta$ -kadinen > germakren D = *ar*-kurkumen

**Žanjice:**  $\alpha$ -pinen >> germakren D > limonen >> mircen =  $\beta$ -pinen

**Valdanos:**  $\alpha$ -pinen = limonen >>  $\delta$ -kar-3-en > germakren D >  $\delta$ -kadinen = (*E*)-kariofilen > mircen =  $\beta$ -pinen



Tabela 4.10 Sastav etarskog ulja izolovanog iz iglica *J. detoides*

No.	Jedinjenje	I <sup>o</sup> n=18	II n=24	III n=6	IV n=30	V n=13	VI n=21	VII n=9	VIII n=6	IX n=13	X n=12	XI n=35	XII n=36	XIII n=31
1	Hexanal	0.4±0.4	0.8±0.4	0.2±0.1	0.3±0.2	0.8±0.5	tr	0.4±0.4	tr	1.5±1.0	tr	0.3±0.2	0.4±0.3	0.2±0.2
2	(2E)-Hexanal	1.1±1.0	1.8±1.0	tr	0.9±0.8	1.6±1.2	0.2±0.2	1.1±1.4	tr	2.2±1.2	0.5±0.2	0.6±0.7	1.1±0.8	0.7±0.7
3	Tricyclene	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.2±0.3	tr	tr	tr	0.1±0.0	tr
4	$\alpha$ -thujene	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-	-	tr	1.1±5.8
5	$\alpha$ -pinene	28.9±14.0	24.9±14.3	14.0±7.2	19.7±10.3	22.5±13.1	29.7±12.1	19.9±10.4	11.6±9	46.4±13.1	29.5±8.1	30.4±11.4	33.4±10.8	35.2±14.1
6	Fenchene	tr	0.3±0.3	0.2±0.1	tr	0.2±0.3	0.2±0.2	0.3±0.4	tr	tr	0.5±0.4	tr	0.3±0.3	0.2±0.3
7	Camphene	0.3±0.2	0.3±0.1	tr	0.2±0.1	0.4±0.3	0.3±0.1	0.2±0.0	tr	0.3±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.3±0.2	0.2±0.1
8	Thuja-2,4(10)-diene	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	-	tr	tr	tr
9	Sabinene	tr	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	tr	tr	0.2±0.2	0.2±0.1	tr	0.3±0.1	0.2±0.1	1.4±6.6	0.2±0.1
10	$\beta$ -Pinene	2.0±0.8	1.5±0.7	0.9±0.3	1.3±0.6	1.9±2.2	1.9±0.9	1.3±0.2	0.9±0.7	2.6±0.8	2.4±0.7	1.4±0.6	2.0±0.6	1.8±0.8
11	Myrcene	2.0±1.3	1.2±0.5	1.1±0.4	1.6±3.0	1.3±2.0	2.0±2.3	1.3±0.4	1.0±0.6	2.4±0.9	2.3±0.5	1.2±0.5	1.7±0.9	1.3±0.6
12	$\delta$ -Car-2-ene	0.2±0.1	tr	tr	tr	0.2±0.2	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	tr	0.2±0.1	tr	tr	tr
13	$\alpha$ -phelandrene	0.7±0.5	0.4±0.3	0.4±0.2	0.4±0.4	0.5±0.4	0.4±0.3	0.5±0.3	0.5±0.3	0.4±0.5	0.8±0.4	0.4±0.4	0.7±0.5	0.4±0.4
14	$\delta$ -car-3-ene	1.4±2.8	3.4±4.6	2.9±2.7	1.8±2.9	3.4±3.8	1.9±3.4	2.7±4.7	1.2±1.8	1.6±3.7	7.2±8.2	2.1±4.1	3.6±5.1	1.6±3.5
15	$\alpha$ -terpinene	tr	-	tr	-	0.3±0.4	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	-
16	<i>p</i> -cymene	0.7±0.4	0.6±0.6	0.7±0.5	0.5±0.3	0.9±0.6	0.5±0.3	1.4±1.0	1.1±0.8	0.3±0.5	0.7±0.4	0.5±0.6	0.4±0.3	0.6±0.6
17	Limonene	22.4±10.8	22.8±12.2	26.6±8.9	24.5±10.6	20.6±8.2	17.2±5.2	23.2±9.7	23.7±9.2	8.2±8.7	22.2±9.9	15.4±7.1	19.7±9.1	14.9±8.3
18	$\gamma$ -terpinene	-	-	tr	-	-	-	tr	tr	-	tr	-	tr	-
19	<i>p</i> -mentha-2,4(8)-diene	tr	-	-	tr	-	-	tr	-	-	-	tr	-	tr
20	Terpinolene	0.6±0.2	0.5±0.3	0.5±0.3	0.5±0.2	0.5±0.2	0.4±0.2	0.5±0.2	0.4±0.3	0.3±0.2	0.9±0.4	0.5±0.3	0.6±0.4	0.4±0.2
21	Cymene	-	tr	tr	-	-	0±0.2	tr	tr	-	-	tr	-	-
22	Linalool	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr
23	<i>n</i> -Nonanal	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	tr	-	-	tr	-	tr
24	1,3,8- <i>p</i> -Menthatriene	tr	tr	0.2±0.3	-	tr	-	0.3±0.2	0.4±0.3	-	-	-	tr	-

nastavak tabele 4.10

No.	Jedimjenje	I <sup>0</sup> n=18	II n=24	III n=6	IV n=30	V n=13	VI n=21	VII n=9	VIII n=6	IX n=13	X n=12	XI n=35	XII n=36	XIII n=31
25	<b>trans-p-mentha-2,8-dien-1-ol</b>	tr	0.2±0.2	0.3±0.4	0.3±0.2	0.2±0.1	0.2±0.1	tr	-	-	tr	0.3±0.2	tr	0.2±0.2
26	$\alpha$ -Campholenal	0.4±0.2	0.3±0.2	0.3±0.3	0.4±0.3	0.4±0.4	0.4±0.4	0.4±0.2	0.3±0.1	tr	tr	0.5±0.4	0.2±0.2	0.4±0.4
27	<i>allo</i> -Ocimene	0.2±0.2	tr	0.3±0.1	0.3±0.1	tr	0.2±0.3	0.2±0.1	0.3±0.2	-	tr	0.2±0.2	tr	tr
28	<b>trans-Pinocarveol</b>	0.4±0.2	0.5±0.3	0.4±0.3	0.5±0.3	0.6±0.5	0.5±0.4	0.5±0.2	0.4±0.2	tr	tr	0.6±0.4	0.2±0.2	0.4±0.3
29	<i>cis</i> -Verbenol	tr	tr	tr	0.2±0.2	-	tr	tr	tr	-	-	0.3±0.2	tr	0.3±0.2
30	<b>trans-Verbenol</b>	0.5±0.5	0.3±0.3	0.7±0.6	1.0±0.8	tr	0.8±0.8	0.5±0.5	0.6±0.3	-	tr	1.5±1.1	0.5±0.5	1.3±1.1
31	<b>Camphor</b>	0.5±0.4	0.5±0.4	0.4±0.4	tr	0.9±0.8	0.2±0.2	0.2±0.2	0.3±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	tr	tr
32	<i>trans</i> -Pinocamphone	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	0.2±0.3	tr	tr
33	<b>Pinocarvone</b>	tr	0.2±0.1	0.4±0.2	0.2±0.1	0.3±0.3	0.2±0.2	0.2±0.2	0.2±0.1	-	0.3±0.3	0.2±0.2	tr	0.2±0.2
34	Borneol	tr	tr	0.2±0.5	-	0.2±0.2	-	0.3±0.3	0.2±0.1	tr	tr	-	-	tr
35	<i>p</i> -mentha-1,5-dien-8-ol	0.2±0.2	0.3±0.2	0.3±0.3	0.2±0.2	tr	0.2±0.3	tr	0.2±0.2	-	0.3±0.1	0.5±0.4	0.2±0.3	0.4±0.4
36	<b>Terpinen-4-ol</b>	0.2±0.1	0.4±0.3	0.5±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.5±0.4	0.5±0.1	-	0.2±0.1	0.2±0.1	0.3±0.4	0.2±0.1
37	<b>Cymen-8-ol</b>	tr	0.7±0.8	0.5±0.5	0.4±0.5	0.5±0.4	tr	0.3±0.4	tr	-	0.2±0.3	0.3±0.3	0.2±0.2	0.3±0.3
38	<b>Cryptone</b>	0.3±0.3	tr	0.4±0.5	0.3±0.3	-	0.3±0.3	0.7±0.8	0.9±0.6	-	0.3±0.2	0.3±0.3	tr	0.2±0.3
39	$\alpha$ -terpineol	0.4±0.4	0.4±0.4	0.4±0.1	0.2±0.3	0.4±0.2	0.2±0.1	0.4±0.4	0.4±0.2	tr	0.3±0.1	0.2±0.2	0.2±0.2	0.2±0.3
40	<b>Myrtenol</b>	0.3±0.2	0.4±0.2	0.3±0.1	0.3±0.2	0.4±0.3	0.3±0.2	0.3±0.2	0.3±0.1	tr	tr	0.5±0.2	0.2±0.2	0.4±0.2
41	<i>trans</i> -Piperitol	tr	tr	tr	0.2±0.1	tr	tr	-	tr	-	-	0.2±0.1	tr	tr
42	Verbenone	0.6±0.4	0.5±0.3	0.7±0.4	0.6±0.4	0.5±0.4	0.6±0.5	0.5±0.4	0.5±0.1	tr	0.2±0.1	0.7±0.6	0.3±0.3	0.6±0.5
43	<i>trans</i> -Carveol	0.3±0.4	0.9±0.7	0.7±0.3	0.8±0.4	0.4±0.4	0.4±0.5	0.5±0.3	0.7±0.6	-	0.2±0.1	0.8±0.6	0.3±0.5	0.5±0.5
44	Carvone	0.2±0.3	0.6±0.6	0.7±0.1	0.6±0.3	0.3±0.3	0.2±0.3	0.5±0.5	0.7±0.5	-	tr	0.4±0.4	0.2±0.4	0.2±0.3
45	<b>Bornyl acetate</b>	tr	0.2±0.2	0.3±0.3	0.2±0.2	0.4±0.2	tr	0.2±0.2	0.2±0.1	tr	0.2±0.1	0.3±0.2	tr	0.2±0.2
46	Methyl myrtenate	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3±0.6	tr	tr
47	$\alpha$ -Cubebene	tr	tr	-	tr	tr	tr	-	tr	0.3±0.4	tr	tr	-	-
48	$\alpha$ -Copaene	0.6±0.4	0.7±0.9	0.9±0.4	0.7±0.4	0.5±0.4	0.6±0.4	0.8±0.3	0.5±0.3	0.2±0.2	0.5±0.2	0.6±0.4	0.3±0.3	0.3±0.2
49	<b><math>\beta</math>-Bourbonene</b>	0.2±0.2	0.2±0.1	0.2±0.0	0.2±0.1	0.2±0.2	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.3±0.2	tr	0.4±0.4	0.2±0.1	0.4±0.4
50	7- <i>epi</i> -Sesquithujene	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.1±0.0	tr	-	-	-	-	-

nastavak tabele 4.10

No.	Jedinjenje	I <sup>0</sup> n=18	II n=24	III n=6	IV n=30	V n=13	VI n=21	VII n=9	VIII n=6	IX n=13	X n=12	XI n=35	XII n=36	XIII n=31
51	Sibirene	-	-	-	-	-	-	tr	-	0.3±0.3	-	-	-	-
52	Sesquithijene	tr	tr	0.2±0.1	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	tr
53	<b>(E)-Caryophyllene</b>	<b>1.8±2.7</b>	<b>2.9±4.1</b>	<b>0.7±0.1</b>	<b>2.4±2.7</b>	<b>2.9±3.5</b>	<b>3.5±3.4</b>	<b>2.7±4</b>	<b>4.0±3.9</b>	<b>2.1±2.6</b>	<b>3.4±3.7</b>	<b>3.8±4.5</b>	<b>2.9±3.4</b>	<b>3.4±3.8</b>
54	β-Copaene	-	-	-	tr	-	tr	tr	-	tr	-	tr	tr	tr
55	α-Humulene	1.1±1.5	1.7±2.2	0.4±0.2	1.5±1.6	1.7±2.1	2.1±1.9	1.6±2.3	2.5±2.2	1.4±1.3	2.0±2.0	2.3±2.6	1.8±1.9	2.1±2.2
56	α-Muuroloa-4(14),5-diene	tr	tr	-	-	tr	-	tr	-	-	-	tr	tr	tr
57	γ-muuroloene	0.3±0.2	0.4±0.5	0.4±0.7	0.2±0.2	0.2±0.1	0.3±0.1	0.3±0.2	0.2±0.1	0.6±0.6	0.2±0.0	0.2±0.2	tr	0.2±0.1
58	Germairene D	5.7±3.4	3.4±2.1	3.7±2.7	4.7±4.1	2.5±2.0	4.8±3.1	3.3±2.3	2.0±1.3	9.8±7.8	6.2±2	4.8±3.1	6.0±2.3	6.4±4.1
59	ar-Curcumene	1.5±1.8	1.1±2.0	1.7±1.8	0.8±1.6	1.2±1.6	0.6±1.3	1.3±1.3	2.1±2.5	tr	tr	0.7±1.4	0.2±0.7	0.4±1.0
60	β-Selinene	tr	0.2±0.2	tr	0.2±0.2	0.2±0.2	tr	0.2±0.2	tr	0.2±0.4	-	tr	tr	-
61	β-Alaskene	0.3±0.2	tr	0.4±0.1	0.3±0.3	0.3±0.2	0.3±0.2	0.3±0.2	0.3±0.2	-	tr	0.2±0.2	tr	tr
62	α-Muuroloene	0.5±0.3	0.5±0.4	0.3±0.1	0.5±0.4	0.6±0.5	0.6±0.3	0.6±0.5	0.9±0.6	0.3±0.2	0.4±0.3	0.9±1.6	0.4±0.3	0.5±0.8
63	Cuparene	0.2±0.2	0.2±0.2	0.3±0.2	0.2±0.2	0.2±0.2	tr	0.2±0.2	0.2±0.2	-	tr	tr	tr	tr
64	Germairene A	tr	tr	-	tr	-	-	-	-	tr	tr	tr	tr	tr
65	β-Bisabolene	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	-	tr
66	β-Curcumene	0.8±1.3	0.2±0.6	0.8±1.3	0.8±1.8	-	0.4±1.4	0.6±1.0	tr	-	0.4±0.7	0.2±0.8	tr	tr
67	γ-Cadinene	1.8±0.9	2.4±1.6	2.7±1.5	2.2±1.4	2.3±1.1	2.0±1.4	2.2±0.5	2.4±1.4	1.6±1.1	1.2±0.3	1.8±1.2	1.1±0.8	1.5±0.8
68	δ-Cadinene	3.8±2.1	4.2±4.3	5.8±2.0	4.8±3.4	2.7±2.5	3.7±2.8	4.7±1.8	3.8±2.5	1.6±1.4	3.6±1.8	3.7±2.4	2.4±2.2	2.9±1.8
69	α-Cadinene	tr	tr	tr	tr	-	tr	0.4±0.7	tr	tr	tr	tr	tr	tr
70	α-Copaen-11-ol	0.2±0.3	0.2±0.3	0.3±0.5	0.5±0.4	0.2±0.2	0.3±0.4	0.3±0.5	0.3±0.5	-	0.2±0.2	0.4±0.5	0.3±0.4	0.3±0.4
71	α-Calacorene	0.6±0.4	0.8±1.1	2.5±1.1	0.7±0.5	0.5±0.5	0.6±0.6	1.1±0.8	1.2±0.5	tr	0.3±0.2	0.4±0.3	0.3±0.4	0.3±0.3
72	Germairene B	tr	tr	-	tr	-	tr	tr	-	0.3±0.1	tr	0.2±0.1	0.2±0.3	0.2±0.1
73	β-Calacorene	0.4±0.3	0.6±0.8	0.8±0.3	0.5±0.6	0.3±0.3	0.2±0.2	0.4±0.2	0.4±0.1	-	tr	0.2±0.1	tr	tr
74	1-α,10-α-epoxy-amorph-4-ene	0.2±0.1	0.2±0.2	0.5±0.3	0.2±0.2	0.2±0.2	tr	0.3±0.2	0.3±0.1	-	tr	tr	tr	tr

nastanak tabele 4.10

No.	Jedinjenje	I <sup>0</sup> n=18	II n=24	III n=6	IV n=30	V n=13	VI n=21	VII n=9	VIII n=6	IX n=13	X n=12	XI n=35	XII n=36	XIII n=31
75	Germairene D-4-ol	-	tr	0.2±0.4	-	-	-	-	-	tr	-	tr	tr	tr
76	<i>ar</i> -Tumerol	tr	0.9±1.7	1.1±1.1	0.3±0.7	tr	tr	0.3±0.4	tr	-	-	tr	tr	tr
77	Caryophyllene oxide	1.1±1.0	1.6±3.1	0.8±0.6	2.6±4.1	4.1±5.6	3.2±3.6	2.5±3.3	7.7±5.9	0.6±0.7	1.3±1.9	2.1±2.4	1.2±1.3	1.9±2.6
78	$\beta$ -Copaen-4- $\alpha$ -ol	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	-	tr	0.1±0.0	tr
79	Salvial-4(14)-en-1-one	0.2±0.2	0.2±0.1	0.2±0.2	tr	0.2±0.1	tr	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	-	tr	-	tr
80	Cedrol	0.5±0.4	0.4±0.4	0.7±0.4	0.4±0.4	0.5±0.4	0.4±0.5	0.7±0.4	0.6±0.6	tr	tr	0.2±0.2	tr	tr
81	Humulene epoxide II	0.5±0.4	0.9±1.0	0.6±0.3	1.2±2.1	1.6±2.2	1.3±1.2	1.2±1.4	3.3±2.6	-	0.5±0.8	0.9±1.0	0.5±0.6	0.9±1.2
82	$\beta$ -Oplopenone	tr	-	0.2±0.1	tr	-	tr	tr	tr	0.2±0.3	-	tr	tr	tr
83	1,10-di- <i>phi</i> -cubenol	tr	0.2±0.2	0.2±0.1	-	tr	-	tr	-	0.3±0.1	-	-	-	-
84	Unknown 1	-	tr	-	-	tr	-	-	-	0.5±0.7	tr	-	-	-
85	$\alpha$ -Colocalene	tr	tr	0.2±0.1	tr	0.3±0.5	tr	tr	tr	-	tr	-	tr	-
86	Muurola-4,10(14)-dien-beta-ol	0.2±0.1	tr	0.4±0.2	0.3±0.2	-	0.4±0.3	0.4±0.2	0.4±0.3	-	0.2±0.2	0.2±0.1	tr	tr
87	$\tau$ -Cadinol	0.6±0.3	0.5±0.3	0.6±0.4	0.5±0.3	0.6±0.4	0.6±0.3	0.6±0.3	0.8±0.4	0.4±0.3	0.4±0.1	0.5±0.3	0.4±0.3	0.5±0.2
88	$\alpha$ -Muuroiol (=Torreyol)	tr	tr	0.3±0.3	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
89	$\alpha$ -Cadinol	0.3±0.3	0.3±0.2	0.3±0.2	0.3±0.2	0.2±0.1	0.2±0.2	0.2±0.2	0.2±0.1	0.6±0.3	0.3±0.1	0.2±0.2	0.3±0.4	0.2±0.1
90	<i>cis</i> -Calamene-10-ol	tr	tr	0.3±0.4	0.2±0.2	-	tr	0.2±0.2	0.4±0.2	-	-	0.2±0.1	tr	tr
91	<i>trans</i> -Calamene-10-ol	0.2±0.2	0.2±0.2	0.6±0.3	0.3±0.3	0.3±0.3	0.2±0.2	0.2±0.2	0.4±0.2	-	tr	0.3±0.2	tr	0.2±0.3
92	(6 <i>Z</i> )-Pentadecen-2-one	tr	0.3±0.2	-	-	0.3±0.3	-	-	1.4±3.4	0.2±0.3	-	-	-	-
93	14-hydroxy-9- <i>phi</i> ( <i>E</i> )-Caryophyllene	-	-	-	tr	-	tr	-	-	-	tr	0.2±0.4	tr	tr
94	Cadalene	0.3±0.3	0.3±0.4	0.5±0.2	0.4±0.9	0.6±0.7	0.3±0.4	0.5±0.3	0.9±0.6	-	tr	0.2±0.2	tr	tr
95	Germairene-4(15),5,10(14)-trien-1- $\alpha$ -ol	tr	0.2±0.4	tr	0.2±0.2	-	0.3±0.3	tr	0.2±0.3	tr	tr	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.2
96	Unknown 2	-	0.2±0.2	-	-	0.2±0.4	-	-	-	0.5±0.2	-	-	-	-
97	2,3-dihidro Farnesol	tr	-	-	-	-	-	-	-	0.5±0.7	-	-	-	-

nastavak tabele 4.10

No.	Jedinjenje	I <sup>o</sup> n=18	II n=24	III n=6	IV n=30	V n=13	VI n=21	VII n=9	VIII n=6	IX n=13	X n=12	XI n=35	XII n=36	XIII n=31
98	10- <i>nor</i> -Calamene-10-one	tr	tr	0.2±0.2	tr	tr	tr	tr	0.3±0.4	-	tr	tr	-	-
99	Unknown 3	-	tr	-	tr	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
100	(2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i> )-Farnesol	tr	-	tr	tr	-	0.1±0.2	tr	tr	0.4±0.5	0.3±0.4	0.4±0.5	0.4±0.9	0.2±0.2
101	Cryptomerione	tr	tr	-	0.2±0.4	-	tr	tr	0.3±0.5	-	-	-	tr	-
102	Oplonanone	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	-
103	Sclarene	-	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	tr
104	Sandracopimar-8(14),15-diene	tr	tr	tr	tr	-	0.2±0.1	0.2±0.2	tr	0.2±0.2	tr	tr	0.2±0.2	0.2±0.1
105	Manoyl oxide	1.5±1.5	1.0±1.4	4.7±5	2.4±2.5	4.1±5.0	3.5±3.2	2.9±1.6	3.0±1.5	1.4±2.0	1.4±0.7	4.6±2.3	2.0±1.5	2.3±1.8
106	<i>ent</i> -Rosa-1,5-diene	0.2±0.2	tr	0.3±0.2	0.2±0.2	-	tr	tr	0.4±0.2	-	tr	0.2±0.1	0.2±0.2	0.3±0.2
107	Abieta-8,12-diene	tr	tr	0.2±0.1	tr	0.3±0.4	0.2±0.2	0.2±0.1	0.2±0.1	tr	-	tr	0.2±0.1	0.2±0.1
108	Abietatriene	0.3±0.3	0.3±0.4	0.6±0.3	0.8±0.7	0.6±0.4	0.7±0.7	0.8±0.6	0.8±0.3	0.3±0.2	0.2±0.2	0.3±0.3	0.6±0.5	0.5±0.4
109	Abietadiene	0.7±0.7	0.2±0.5	1.2±0.3	1.4±1.4	0.9±0.9	1.0±0.8	0.9±0.4	1.3±1.0	0.6±0.6	0.4±0.4	0.8±1.1	2.1±2.0	1.7±1.6
110	Abieta-8(14),13(15)-diene	tr	tr	-	tr	tr	tr	-	tr	0.3±0.4	-	tr	tr	tr
111	Sanadracopimarinal	0.2±0.2	tr	0.2±0.0	0.3±0.3	0.2±0.2	0.5±0.3	0.3±0.2	0.3±0.1	0.4±0.6	0.3±0.3	0.2±0.1	0.5±0.4	0.3±0.2
112	4- <i>epi</i> -Abietal	0.2±0.2	tr	tr	0.3±0.3	tr	0.4±0.4	0.2±0.3	0.2±0.1	0.4±0.7	0.3±0.4	0.2±0.1	0.6±0.4	0.3±0.2
113	Methyl Sanadracopimarate	tr	tr	0.2±0.1	0.3±0.1	tr	0.2±0.1	tr	0.2±0.1	tr	tr	0.3±0.2	0.2±0.2	0.2±0.2
114	dehydro-Abietal	tr	tr	tr	0.2±0.1	-	0.2±0.2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
115	<i>trans</i> -Totarol	-	tr	-	0.2±0.2	-	0.2±0.2	tr	tr	-	-	tr	0.2±0.2	tr
116	Abietal	0.9±0.8	0.4±0.6	0.8±0.2	1.1±0.6	0.8±0.7	0.7±0.4	0.6±0.2	0.9±0.3	0.2±0.4	0.5±0.3	1.0±0.5	0.8±0.7	0.7±0.5
	Monoterpenes	65.2	63.4	56.5	58.5	59.3	60.4	59.0	48.8	64.0	70.6	61.6	68.5	65.1
	monoterpene hydrocarbons	59.9	56.7	48.7	51.4	53.3	55.2	52.6	42.1	63.1	67.5	53.1	64.7	58.7

nastanak tabele 4.10

No.	Jedinjenje	I <sup>a)</sup> n=18	II n=24	III n=6	IV n=30	V n=13	VI n=21	VII n=9	VIII n=6	IX n=13	X n=12	XI n=35	XII n=36	XIII n=31
	monoterpenes oxygenated	5.3	6.7	7.8	7.1	6.0	5.2	6.3	6.6	0.9	3.2	8.5	3.7	6.5
	<b>Sesquiterpenes</b>	<b>25.4</b>	<b>26.9</b>	<b>30.5</b>	<b>29.5</b>	<b>25.8</b>	<b>28.5</b>	<b>29.4</b>	<b>37.8</b>	<b>23.2</b>	<b>22.9</b>	<b>27.4</b>	<b>20.9</b>	<b>25.0</b>
	sesquiterpene hydrocarbons	20.5	20.5	22.8	21.6	17.2	20.8	21.8	22.1	19.3	19.2	21.1	16.6	19.6
	sesquiterpene oxygenated	4.9	6.4	7.7	8.0	8.6	7.7	7.6	15.7	3.8	3.7	6.3	4.3	5.4
	<b>Diterpenes</b>	<b>4.5</b>	<b>2.6</b>	<b>8.8</b>	<b>7.4</b>	<b>7.1</b>	<b>8.0</b>	<b>6.7</b>	<b>7.6</b>	<b>4.0</b>	<b>3.5</b>	<b>8.1</b>	<b>7.7</b>	<b>7.0</b>
	diterpene hydrocarbons	1.5	0.8	2.7	2.9	1.9	2.4	2.4	3.0	1.5	0.9	1.8	3.6	3.1
	diterpene oxygenated	3.0	1.8	6.0	4.5	5.2	5.5	4.2	4.6	2.4	2.6	6.3	4.2	3.9
	<b>Other<sup>b)</sup></b>	<b>1.7</b>	<b>2.9</b>	<b>0.6</b>	<b>1.4</b>	<b>2.9</b>	<b>0.4</b>	<b>1.7</b>	<b>1.9</b>	<b>3.9</b>	<b>0.7</b>	<b>1.1</b>	<b>1.5</b>	<b>1.0</b>
	<b>Unknown</b>	<b>0.0</b>	<b>0.3</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.4</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>1.0</b>	<b>0.1</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>
	<b>TOTAL</b>	<b>96.8</b>	<b>96.1</b>	<b>96.4</b>	<b>96.8</b>	<b>95.4</b>	<b>97.3</b>	<b>96.8</b>	<b>96.1</b>	<b>96.1</b>	<b>97.8</b>	<b>98.1</b>	<b>98.7</b>	<b>98.1</b>

**I** - Rovinj **II** - Senj, **III** - Kruševo, **IV** - Benkovac, **V** - Đevrske, **VI** - Konjeverate, **VII** - Trogir, **VIII** - Makarska, **IX** - Žanjiće, **X** - Valdanos, **XI** - Pčinja, **XII** - Kopaonik, **XIII** - Maglič;

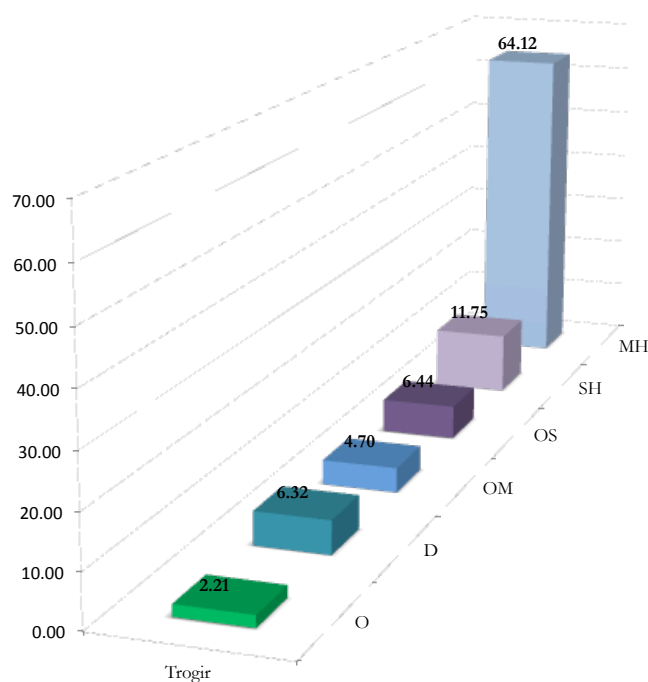
<sup>a)</sup> Sadržaj svake komponente je dat kao procenat (srednja vrednost  $\pm$  SD) ukupnog sastava etarskog ulja, **tr** - tragovi ( $0.05 < \text{tr} < 0.10\%$ ); – nije detektovano jedinjenje; jedinjenja koja su bila zastupljena sa manje od 0.05% nisu predstavljena u tabeli; jedinjenja korišćena za statističku obradu su data masnim slovima;

<sup>b)</sup> alifatični ugljovodonići, alifatični aldehidi i alkoholi, alifatične kiseline i njihovi estri i aldehidi, aromatični estri, aromatični alkoholi, aril estri i aromatične kiseline

#### 4.2.1.4 Hemijski sastav i varijabilnost terpena etarskog ulja iglica *Juniperus macrocarpa*

U etarskom ulju *J. macrocarpa* je detektovano 103 jedinjenja, od kojih je 101 identifikovano. U tabeli 4.11 je prikazano 93 jedinjenja, što predstavlja 96,6 % ukupnog sastava etarskog ulja. Komponente koje su bile prisutne sa manje od 0,05% nisu prikazane u tabeli.

Monoterpeni su dominantna grupa u sastavu etarskog ulja (68,8 %) *J. macrocarpa*, što je karakteristika vrsta sekcije *Juniperus* (Otto & Wilde, 2001). Od monoterpena najzastupljeniji su monoterpeni ugljovodoni (64,1 %), dok su oksigenisani monoterepeni pronađeni samo u relativno malom ukupnom procentu. Seskviterpeni (18,2 %) su takođe dominantno predstavljeni seskviterpenskim ugljovodonicima (11,8 %) (Slika 4.2.5).



**Slika 4.2.5.** Procentualna zastupljenost grupa jedinjenja u etarskom ulju iglica *J. macrocarpa* (Trogir): **MH** - Monoterpeni ugljovodoni, **OM** - Oksigenisani monoterepeni, **SH** - Seskviterpenski ugljovodoni, **OS** - Oksigenisani seskviterpeni, **D** - Diterpeni, **O** - Ostala jedinjenja (cf. Tabela 4.11)

Dominantno jedinjenje u sastavu etarskog ulja je  $\alpha$ -pinen, koji u proseku čini oko 55,5 % etarskog ulja. Druga dominantna komponenta je Germakren D. Pored ovih jedinjenja, još 25 ima srednje visok udeo (0,5 – 10 %) *sensu* Von Rudloff (1975):  $\beta$ -pinen, mircen,  $\delta$ -kar-3-en,  $\beta$ -felandren,  $\alpha$ -kamfolenal, *trans*-pinokarveol, *trans*-verbenol, verbenon, (*E*)-kariofilen,  $\alpha$ -humulen, germakren D,  $\gamma$ -kadinen,  $\delta$ -kadinen, kariofilen oksid,  $\beta$ -oploopenon, murola-4,10(14)-dien- $\beta$ -ol,  $\alpha$ -cadinol, (*6Z*)-pentadecen-2-on, 2,3-dihidro-farnezol, (*2E,6Z*)-farnezol, (*2Z,6E*)-farnezol, manoil oksid, abietatrien, abietadien i abienol. Značajan broj komponenti (76) je pronađen u tragovima ( $x < 0,1\%$ ), i predstavlja u proseku oko 3,7% sastava etarskog ulja. Za razliku od etarskog ulja izolovanog iz *J. communis* i *J. deltoides* etarsko ulje populacije *J. macrocarpa* iz Trogira se karakteriše manjim udelom seskviterpena, i nešto jednostavnijim sastavom. Dalje, nekoliko jedinjenja je do sada identifikovano samo kod ove vrste: 2,3-dihidro-farnezol, (*2E,6Z*)-farnezol i abienol. Zanimljivo je da se limonen nalazi u izuzetno malim količinama ( $0,2 \pm 0,5\%$ ) za razliku od *J. deltoides* sa istog lokaliteta ( $23,2 \pm 9,7\%$ )

Profil glavnih komponenti u etarskom ulju populacije *J. macrocarpa* iz Trogira:  $\alpha$ -pinen >> germakren D >  $\beta$ -felandren > abietadien > (*6Z*)-pentadecen-2-on =  $\beta$ -pinen



Tabela 4.11 Sastav etarskog ulja izolovanog iz iglica *J. macrocarpa*

	Jedinjenje	Trogir <sup>a)</sup>		Jedinjenje	Trogir <sup>a)</sup>
1	Hexanal	0.2±0.1	39	Cryptone	0.1±0.2
2	(2 <i>E</i> )-Hexanal	0.3±0.4	40	α-Terpineol	0.2±0.3
3	Tricyclene	0.2±0.0	41	Myrtenol	0.3±0.2
4	α-thujene	tr	42	Verbenone	0.6±0.7
5	α-pinene	55.5±13.6	43	Bornyl acetate	0.2±0.2
6	Fenchene	tr	44	α-Cubebene	0.2±0.3
7	Camphene	0.3±0.1	45	α-Copaene	0.2±0.2
8	Thuja-2,4(10)-diene	0.2±0.1	46	β-Bourbonene	0.4±0.3
9	Sabinene	0.2±0.1	47	7- <i>epi</i> -Sesquithujene	tr
10	β-Pinene	1.6±0.5	48	Sibirene	0.4±0.6
11	Myrcene	1.1±0.6	49	( <i>E</i> )-Caryophyllene	0.6±0.3
12	δ-Car-2-ene	0.2±0.1	50	β-Copaene	tr
13	α-Phelandrene	0.3±0.3	51	α-Humulene	0.5±0.3
14	δ-Car-3-ene	0.9±2.3	52	<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-diene	tr
15	α-Terpinene	tr	53	γ-Muurolole	0.4±0.3
16	<i>p</i> -Cymene	0.3±0.4	54	Germacrene D	6.0±4.0
17	Limonene	0.2±0.5	55	α-Muurolole	0.2±0.1
18	β-Phelandrene	2.8±2.5	56	Cuparene	1.2±1.0
19	γ-Terpinene	tr	57	δ-Cadinene	0.9±0.6
20	<i>p</i> -Mentha-2,4(8)-diene	tr	58	α-Cadinene	tr
21	Terpinolene	tr	59	α-Copaen-11-ol	tr
22	Cymenene	tr	60	Germacrene B	0.4±0.4
23	Linalool	tr	61	β-Calacorene	0.1±0.2
24	<i>n</i> -Nonanal	tr	62	1-α, 10-α-epoxy-amorph-4-ene	tr
25	1,3,8- <i>p</i> -Menthatriene	tr	63	Caryophyllene oxide	0.5±0.4
26	<i>trans-p</i> -mentha-2,8-dien-1-ol	tr	64	β-Copaen-4-α-ol	0.1±0.2
27	α-Campholenal	0.6±0.4	65	Salvial-4(14)-en-1-one	0.2±0.2
28	<i>cis-p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	0.1±0.3	66	Humulene epoxide II	0.3±0.2
29	<i>trans</i> -Pinocarveol	0.5±0.3	67	β-Oplophenone	0.5±0.6
30	<i>cis</i> -Verbenol	0.1±0.2	68	Unknown 1	0.9±1.0
31	<i>trans</i> -Verbenol	0.9±0.7	69	Muurolo-4,10(14)-dien-β-ol	0.5±0.5
32	Camphor	0.3±0.3	70	τ-Cadinol	0.4±0.4
33	<i>trans</i> -Pinocamphone	tr	71	α-Muurolol (=Torreyol)	0.2±0.1
34	Pinocarvone	tr	72	α-Cadinol	0.7±0.4
35	Borneol	tr	73	<i>cis</i> -Calamenen-10-ol	tr
36	<i>p</i> -Mentha-1,5-dien-8-ol	0.2±0.3	74	<i>trans</i> -Calamenen-10-ol	0.1±0.2
37	Terpinen-4-ol	0.2±0.2	75	(6 <i>Z</i> )-Pentadecen-2-one	1.7±1.4
38	Cymen-8-ol	tr	76	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-α-ol	0.4±0.3

nastavak tabele 4.11

	Jedinjenje	Trogir <sup>a)</sup>
77	2,3-dihidro Farnesol	0.7±0.7
78	(2E,6Z)-Farnesol	0.5±0.6
79	Unknown 2	0.2±0.2
80	(2Z,6E)-Farnesol	1.2±1.2
81	Sandracopimara-8(14),15-diene	tr
82	Manoyl oxide	1.5±1.7
83	<i>ent</i> -Rosa-,15-diene	0.2±0.2
84	Abieta-8,12-diene	tr
85	Abietatriene	0.9±0.7
86	Abietadiene	2.1±1.8
87	Abieta-8(14),13(15)-diene	0.2±0.2
88	Abienol	0.7±0.5
89	Sanadracopimarinal	0.2±0.1
90	4- <i>epi</i> -Abietal	tr
91	Methyl sanadracopimarate	tr
92	dehydro-Abietal	tr
93	<i>trans</i> -Totarol	tr
	<b>Monoterpenes</b>	<b>66.0</b>
	<i>monoterpene hydrocarbons</i>	64.1
	<i>monoterpenes oxygenated</i>	4.7
	<b>Sesquiterpenes</b>	<b>18.2</b>
	<i>sesquiterpene hydrocarbons</i>	11.8
	<i>sesquiterpene oxygenated</i>	6.4
	<b>Diterpenes</b>	<b>6.3</b>
	<i>diterpene hydrocarbons</i>	3.7
	<i>diterpene oxygenated</i>	2.6
	<b>other<sup>b)</sup></b>	<b>2.2</b>
	<b>unknown</b>	<b>1.1</b>
	<b>TOTAL</b>	<b>96.6</b>

<sup>a)</sup> Sadržaj svake komponente je dat kao procenat (srednja vrednost ± SD) ukupnog sastava etarskog ulja, **tr** - tragovi (0.05 < tr < 0.10%); – nije detektovano jedinjenje; jedinjenja koja su bila zastupljena sa manje od 0.05% nisu predstavljena u tabeli;

<sup>b)</sup> alifatični ugljovodonici, alifatični aldehidi i alkoholi, alifatične kiseline i njihovi estri i aldehidi, aromatični estri, aromatični alkoholi, aril estri i aromatične kiseline

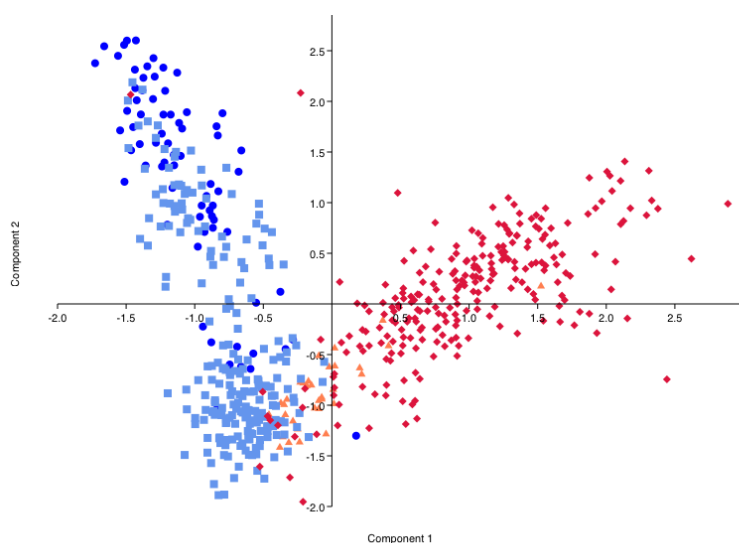
#### 4.2.2 Rezultati statističke obrade ispitivanja terpena

Tokom statičke obrade, većina komponenti je pokazala odstupanje od normalne distribucije. Komponente koje su bile zastupljene u tragovima ( $x < 0,1\%$ ), koji nisu imale normalnu distribuciju i koje su bile međusobno visoko korelisane ( $r^2 < 0,7$ ) nisu korišćene u daljoj statističkoj analizi.

Za statističku analizu poređenja sastava etarskog ulja između sva četiri taksona korišćeno je 27 jedinjenja: (2E)-heksenal,  $\alpha$ -tujen,  $\alpha$ -pinen, kamfen, sabinen,  $\beta$ -pinen, mircen,  $\delta$ -kar-2-en,  $\alpha$ -felandren,  $\delta$ -kar-2-en, *p*-cimen, limonen, terpinolen,  $\alpha$ -kopaen, (E)-kariofilen,  $\gamma$ -murolen, germakren D,  $\alpha$ -murolen,  $\gamma$ -kadinen,  $\delta$ -kadinen, germakren B, kariofilen oksid,  $\alpha$ -kadinol, manoil oksid, abietadien, 4-*epi*-abietal i abietal.

##### *Analiza glavnih komponenti (PCA)*

Analiza glavnih komponenti je pokazala jasno odvajanje *J. communis s.l.* od *J. oxycedrus s.l.* Štaviše, PCA analiza je pokazala i blago odvajanje *J. communis var. communis* od *J. communis var. saxatilis*. Šire uzorkovanje na Balkanskom polustrvu *J. communis var. communis* bi svakako doprinelo boljoj rezoluciji. S druge strane, *J. deltoides* se takođe nešto slabije odvaja od



**Slika 4.2.6.** Scatter plot do-  
bijen analizom glavnih kom-  
ponenti (PCA) relativnih količina 27 terpena izolova-  
naih iz etarskog ulja iglica:  
● - *J. communis var. communis*,  
■ - *J. communis var. saxatilis*,  
◆ - *J. deltoides*,  
▲ - *J. macrocarpa*

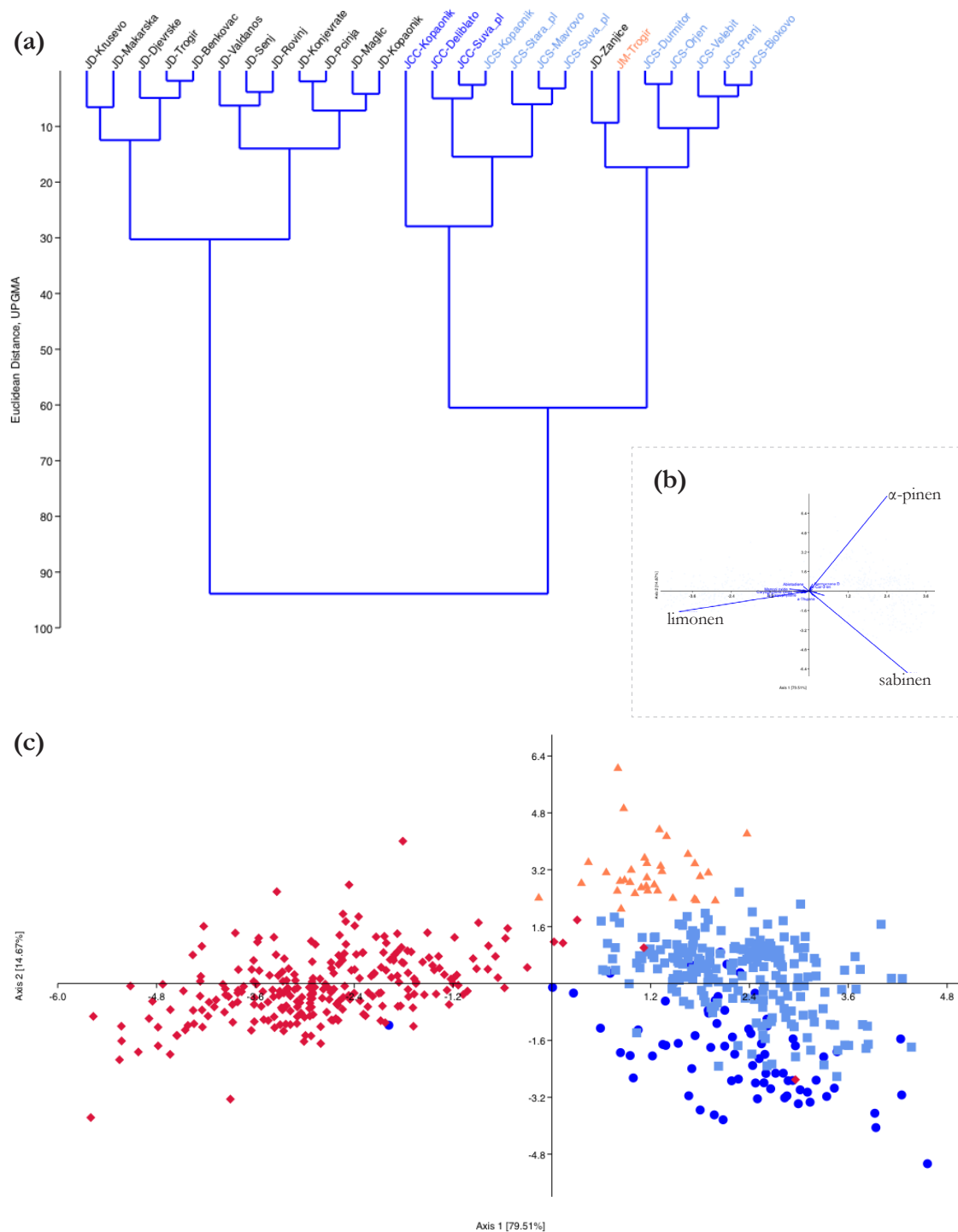
*J. macrocarpa*, iako je po sastavu etarskog ulja *J. macrocarpa* bliža *J. communis* var. *saxatilis* nego *J. deltoides*. Svakako treba voditi računa da su za analizu glavnih komponenti korišćene samo one komponente koje su bile zastupljene sa prosečno najmanje 0,1% u svakoj od ispitivanih grupa, tako da veliki broj jedinjenja koji se nalazi ekskluzivno samo kod jedne grupe nije uziman u obzir u ovoj analizi.

#### *Hijerarhijska klaster analiza (HCA)*

Klaster analiza (Slika 4.2.7a) je pokazala prilično konzistentno grupisanje, gde su gotovo sve populacije *J. deltoides* (izuzev populacije Žanjice) grupisane u jednu kladu, **Kladu A**. Takođe, došlo je do grupisanja svih populacija *J. communis* u jednu kladu, **Kladu B**. Zanimljivo je da se *J. macrocarpa* i u ovoj analizi grupiše sa primorskim populacijama *J. communis* var. *saxatilis*. Razdvajanje na ove dve klade je u skladu sa relativnim količinama  $\alpha$ -pinena, sabinena i limonena. **Klada A** je bogata limonenom i ima umerene količine  $\alpha$ -pinena. **Klada B**, se u odnosu na relativne količine sabinena deli na dve subklade: *subkladu a* (>15%) i *subkladu b* (<1%).

#### *Diskriminantna analiza (DA)*

Diskriminantna analiza je pokazala odvajanja svih taksona u četiri diskretne grupe (Slika 4.2.7b, c). Na jednoj strani se odvajaju *J. deltoides*, čije se etarsko ulje karakteriše visokim udelom limonena, dok se na drugoj mogu razlikovati *J. macrocarpa* ( $\alpha$ -pinen), kao i klaster koju čini *J. communis* s.l. (sabinen). Iako se *J. communis* var. *communis* i *J. communis* var. *saxatilis* nalaze blisko jedna u odnosu na drugu, ipak postoji jasno grupisanje jednog i drugog taksona, pre svega na osnovu količina sabinena, kojeg u proseku ima znatno manje kod *J. communis* var. *saxatilis*.



**Slika 4.2.7. a)** Dendrogram dobijen klaster analizom (Euklidianove distance, *Ward*-ova metoda) srednjih relativnih količina 27 terpena etarskog ulja iglica odabranih vrsta sekcije *Juniperus* sa Balkanskog poluostrva: **JCC** - *J. communis* var. *communis*, **JCS** - *J. communis* var. *saxatilis*, **JD** - *J. deltooides*, **JM** - *J. macrocarpa* (za detaljnije informacije o lokalitetima *cf.* Tabela 3.1); **b)** *eigenvectori* diskriminantne analize; **c)** ● - *J. communis* var. *communis*, ■ - *J. communis* var. *saxatilis*, ◆ - *J. deltooides*, ▲ - *J. macrocarpa*.

#### 4.2.2.1. *Juniperus communis* var. *communis*

Većina komponenti iz etarskog ulja *J. communis* var. *communis* je pokazala odstupanje od normalne distribucije. Komponente koje su bile zastupljene u tragovima ( $x < 0,1\%$ ), koji nisu imale normalnu distribuciju i koje su bile međusobno visoko korelisane ( $r^2 < 0,7$ ) nisu korišćene u daljoj statističkoj analizi. Jedinjenja koja su korišćena u statističkoj analizi su označena masnim slovima u Tabeli 4.8.

##### *Analiza glavnih komponenti (PCA)*

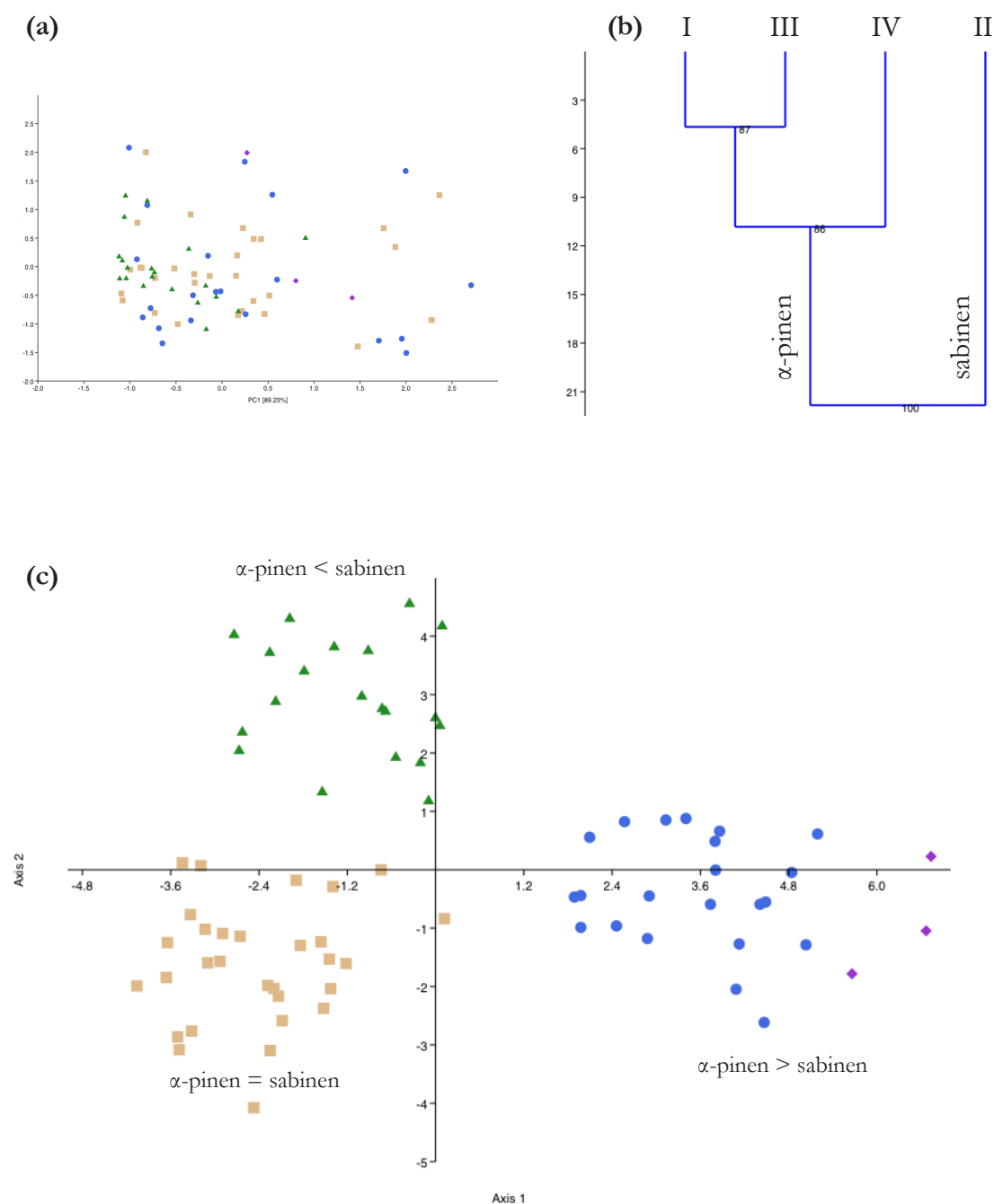
Analiza glavnih komponenti je pokazala preklapanje svih populacija (Slika 4.2.8a). Samo dve komponente opisuju gotovo sveukupnu varijabilnost uzorka:  $\alpha$ -pinen na prvoj osi (99,7 %) i limonen (85,6 %) na drugoj. Nekoliko drugih komponenti je pokazalo izuzetno slab uticaj na prvu i drugu osu glavnih komponenti (germakren D, germakren B, germakren D-4-ol,  $\delta$ -kadinen). Prve dve ose objašnjavaju 93,0 % ukupne varijabilnosti.

##### *Hijerarhijska klaster analiza (HCA)*

Klaster analiza (Slika 4.2.8b) je pokazala grupisanje u odnosu na dominantu komponentu (BS 100%), i relativnu geografsku korelaciju, odvajajući mezijske populacije od Kopaonika. Iako PC analiza nije ukazala na odvajanje diskretnih grupa, klaster analiza, za koju su korišćene srednje vrednosti relativne zastupljenosti svake komponente, je pokazala bliže grupisanje populacija sa prosečno većim udelom  $\alpha$ -pinena u odnosu na sabinen, pa samim tim i jako odvajanje populacije sa Kopaonika od ostalih populacija.

##### *Diskriminantna analiza (DA)*

Diskriminantna analiza je pokazala odvajanja svih jedinki u tri diskretne grupe (Slika 4.2.8c). Na jednoj strani nalazi se populacija sa Kopaonika koja se karakteriše visokim udelom sabinena u etarskom ulju i niskim udelom  $\alpha$ -pinena, na drugoj populacija sa Deliblatske peščare koja imaju gotovo podjednake količine  $\alpha$ -pinena i sabinena, i na trećoj strani populacije sa Suve i Stare planine, sa jedinkama čije je ulje bogato  $\alpha$ -pinenom a siromašno sabinenom.



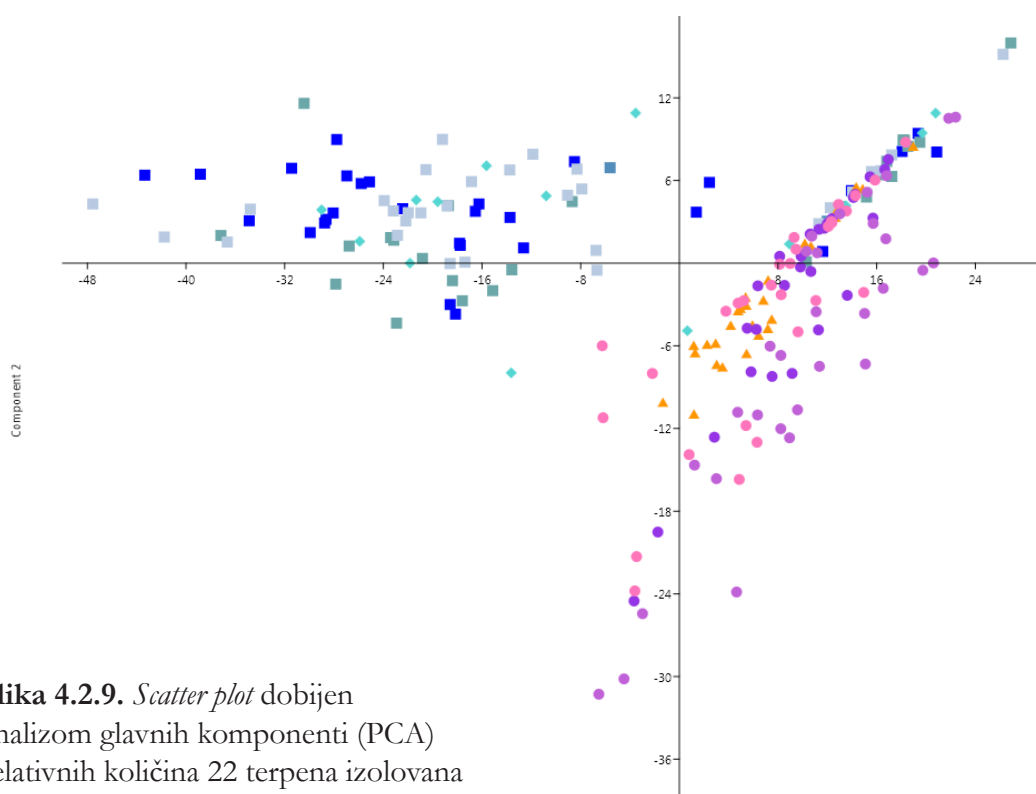
**Slika 4.2.8.** a) *Scatter plot* dobijen analizom glavnih komponenti (PCA) relativnih količina 36 terpena izolovana iz etarskog ulja iglica *J. communis* var. *communis*. ■ - Deliblatska peščara, ▲ - Kopaonik, ● - Suva planina, ◆ - Stara planina, (cf. Tabela 4.8); b) Dendrogram dobijen klaster analizom (Euklidianove distance, UPGMA) količina 36 terpena etarskog ulja iglica *J. communis* var. *communis*; I - Deliblatska peščara, II - Kopaonik, III - Suva planina, IV - Stara planina; c) Plot dobijen diskriminantnom analizom 36 terpena izolovana iz etarskog ulja iglica *J. communis* var. *communis*; ■ - Deliblatska peščara, ▲ - Kopaonik, ● - Suva i Stara planina;

#### 4.2.2.2. *Juniperus communis* var. *saxatilis*

Većina komponenti iz etarskog ulja *J. communis* var. *saxatilis* je pokazala odstupanje od normalne distribucije. Komponente koje su bile zastupljene u tragovima ( $x < 0,1\%$ ), koji nisu imale normalnu distribuciju i koje su bile međusobno visoko korelisane ( $r^2 < 0,7$ ) nisu korišćene u daljoj statističkoj analizi. Jedinjenja koja su korišćena u statističkoj analizi su označena masnim slovima u Tabeli 4.9.

##### *Analiza glavnih komponenti (PCA)*

Analiza glavnih komponenti je pokazala odvajanje dve grupe: submediteranske (Velebit, Biokovo, Prenj, Durmitor) i kontinentalne (Kopaonik, Suva planina, Stara planina, Mavrovo) (Slika 4.2.9). Submediteranske populacije su imale etarska ulja kojima dominiraju



**Slika 4.2.9.** *Scatter plot* dobijen analizom glavnih komponenti (PCA) relativnih količina 22 terpena izolovana iz etarskog ulja iglica *J. communis* var. *saxatilis*: ▲ - Velebit, ● - Biokovo, ● - Prenj, ● - Durmitor, ■ - Kopaonik, ■ - Stara planina, ■ - Suva planina, ◆ - Mavrovo (cf. Tabela 4.9)



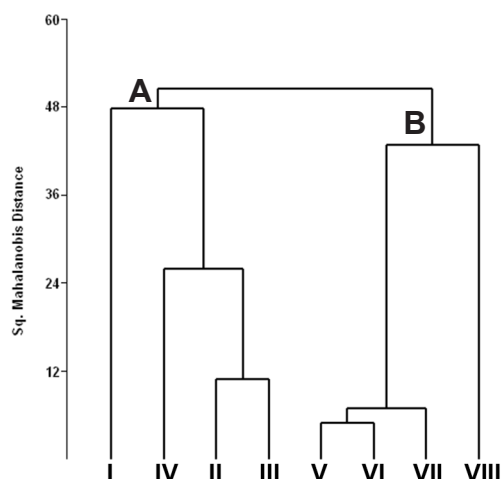
$\alpha$ -pinen i  $\delta$ -kar-3-en, dok je sabinen kod svih kontinentalnih populacija bio visok. Prve dve ose objašnjavaju 87,1 % ukupne varijabilnosti. Najveći uticaj na prve dve ose analize glavnih komponenti imaju tri dominantne komponente: sabinen,  $\alpha$ -pinen i  $\delta$ -kar-3-en.

#### *Hijerarhijska klaster analiza (HCA)*

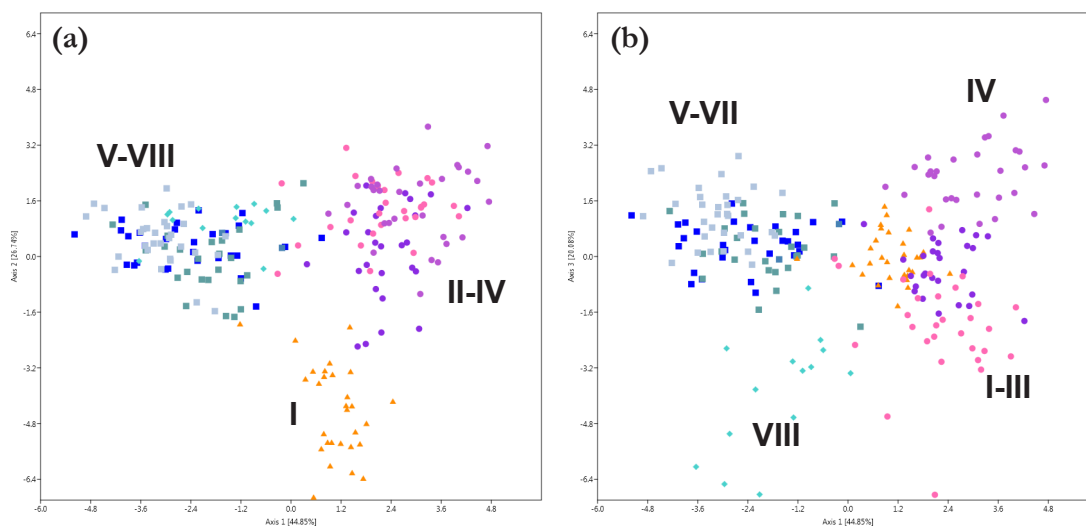
Klaster analiza (Slika 4.2.10) je pokazala visoku geografsku korelaciju, odvajajući submediteranske (zapadne) i kontinentalne (centralne) populacije na Balkanu. Šta više, populacije koje su geografski bliže pokazuju sličniji profil terpena, pa se i grupišu u iste subklade.

#### *Diskriminantna analiza (DA)*

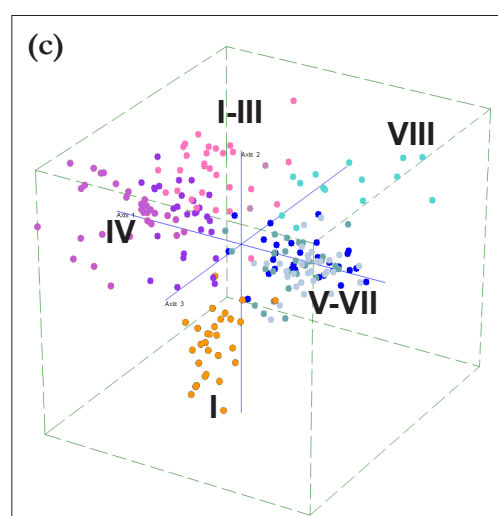
Diskriminantna analiza je pokazala odvajanje svih jedinki u tri grupe (Slik 4.2.11). Na jednoj strani nalaze se populacije sa jedinkama čije je ulje bogato sabinenom (Kopaonik, Suva planina, Stara planina, Mavrovo), a na drugoj dve grupe kojima je zajedničko nizak relativni udeo sabinena i visok udeo  $\alpha$ -pinena (42,3 – 46,5 %). Poslednje dve grupe su se odvojile na populacije bogate  $\delta$ -kar-3-enom (Biokovo, Prenj, Orjen) i populaciju sa Velebita čije je ulje bogatom germakrenom A. Populacija sa Durmitora je imala najveću relativnu količinu  $\delta$ -kar-3-ena (11,7 %) i na osnovu ove komponente moguće je odvojiti je na trećoj diskriminantnoj osi. S druge strane, etarska ulja populacija centralnog dela Balkanskog poluostrva se karakterišu nešto nižim udelom  $\alpha$ -pinena (33,0 – 40,7 %) ali većim udelom sabinena (12,9 – 22,0 %). Iako analiza glavnih komponenti nije uspela da diferencira individue iz ove četiri populacije, DA je pokazala odvajanje populacija iz Mavrova na trećoj diskriminantnoj osi. Izdvajanje po trećoj osi ove populacije je najvećim delom bazirano na količinama terpinen-4-ola.



**Slika 4.2.10.** Dendrogram dobijen klaster analizom (kvadrirane Mahalanobijeve distance, UPGMA) količina 22 terpena etarskog ulja iglica *J. communis* var. *saxatilis*; **Klada A** (submediteranske): **I** - Velebit, **II** - Biokovo, **III** - Durmitor, **IV** - Prenj; **Klada B** (kontinentalne): **V** - Kopaonik, **VI** - Suva planina, **VII** - Stara planina, **VIII** - Mavrovo



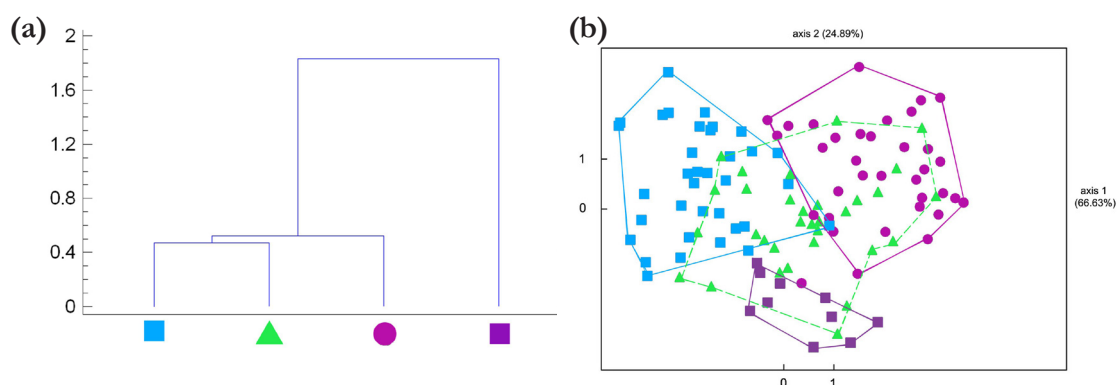
**Slika 4.2.11.** Plot dobijen diskriminantnom analizom 22 terpena izolovana iz etarskog ulja iglica *J. communis* var. *saxatilis* ▲ - Velebit, ● - Biokovo, ● - Durmitor, ● - Prenj; ■ - Kopaonik, ■ - Suva planina, ■ - Stara planina, ◆ - Mavrovo; **a)** prva i druga diskriminantna osa (71,6%), **b)** prva i treća diskriminantna osa (64,9%), **c)** prva, druga i treća diskriminantna osa (91,7%)



### 4.2.2.3. *Juniperus deltooides*

Većina komponenti etarskog ulja *J. deltooides* je pokazala odstupanje od normalne distribucije. Komponente koje su bile zastupljene u tragovima ( $x < 0,1\%$ ), koji nisu imale normalnu distribuciju i koje su bile međusobno visoko korelisane ( $r^2 < 0,7$ ) nisu korišćene u daljoj statističkoj analizi. Jedinjenja koja su korišćena u statističkoj analizi su označena masnim slovima u Tabeli 4.10.

Inicijalna PCA analiza sa 21 terpenom i četiri populacije (Kopanić, Maglič, Pčinja, Benkovac) je pokazala preklapanje između svih lokaliteta, pa su urađene klaster analiza (kvadratne Euklidianove distance, *nearest-neighbour* metod) i diskriminantna analiza (Rajčević et al., 2013). Rezultati su pokazali odvajanje populacije iz Benkovca od populacija iz Srbije, i visoku geografsku korelaciju (Slika 4.2.12). Rezultati inicijalnih testova su poslužili kao osnova za dalje istraživanje, koje je obuhvatilo dodatnih 7 populacija na Jadranu, od Rovinja do Valdanosa (Rajčević et al., 2015).

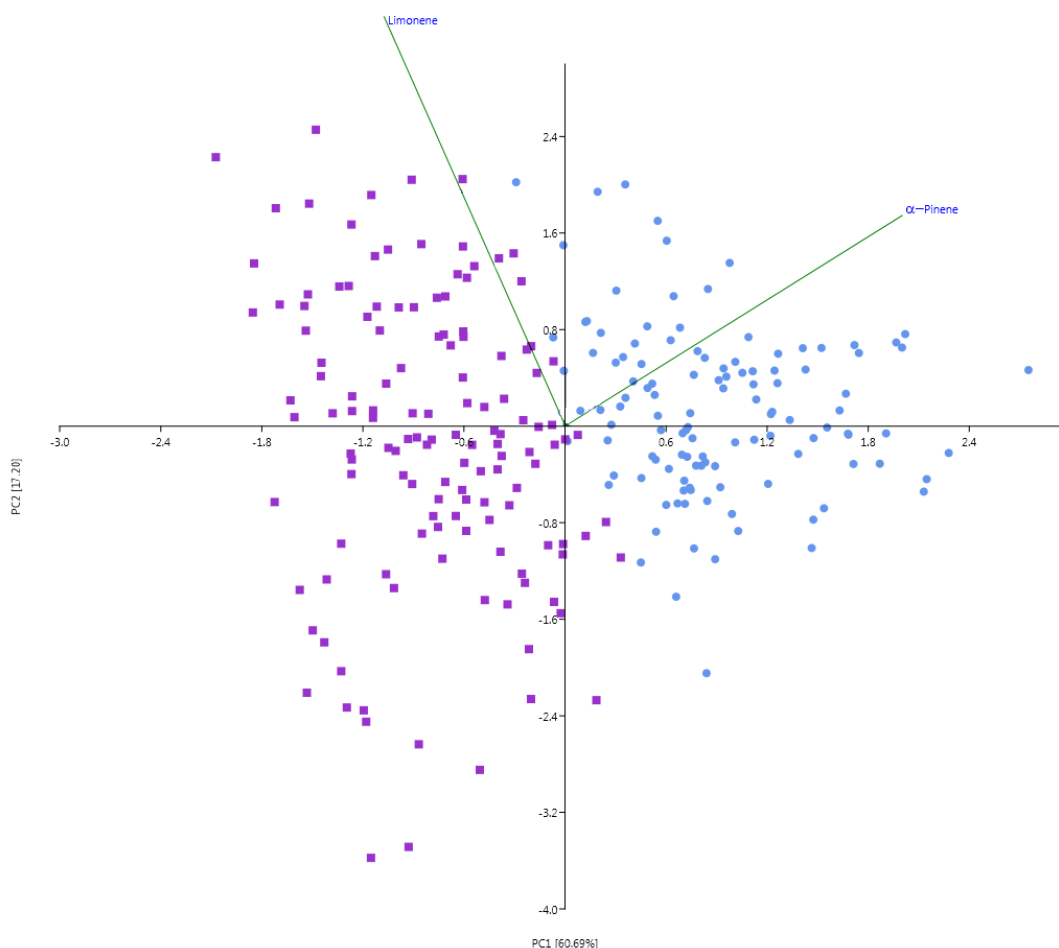


**Slika 4.2.12.** **a)** Dendrogram dobijen klaster analizom (*nearest-neighbor* metod, kvadrirane Euklidianove distance) sadržaja 21 terpena iz četiri populacije *J. deltooides*; **b)** Diskriminantna analiza sastava etarskog ulja četiri populacije *J. deltooides*; ■ - Kopaonik, ▲ - Maglič, ● - Pčinja, ■ - Benkovac (Rajčević et al., 2013)

#### *Analiza glavnih komponenti*

Analiza glavnih komponenti je pokazala preklapanje svih lokaliteta. Prve dve ose objašnjavaju 77,9 % ukupne varijabilnosti. Iako nije pokazala odvajanje lokaliteta, analiza

glavnih komponenti je pokazala odvajanje svih jedinki u dve grupe na bazi količina  $\alpha$ -pinena i limonena (Slika 4.2.13). Pored ove dve komponente, još nekoliko je pokazalo umereni uticaj na odvajanje uzoraka na prve dve ose: ((E)-kariofilen, germakren D,  $\delta$ -kadinen, kariofilen oksid).



**Slika 4.2.13.** Scatter plod analize glavnih komponenti (PCA) izabranih terpena etarskog ulja iglica *J. deltoides*: ■ - bogate limonenom, ● - bogate  $\alpha$ -pinenom.

#### *Hijerarhijska klaster analiza (HCA)*

Hijerarhijska klaster analiza sa svim jedinkama (nije prikazana) je pokazala formiranje dve klade u zavisnosti od količine  $\alpha$ -pinena. **Klada A** sa većim količinama  $\alpha$ -pinena je obuhvatila većinu jedinki sa centralnog dela Balkanskog poluostrva i do ¼ istočno-jadranskih populacija. **Klada B**, (sa jedinkama kod kojih je količina  $\alpha$ -pinena bila manja od 25,0 %) se dalje deli na dve subklade, u zavisnosti od količine limonena, *subklada a* (limonen < 30,0 %) i *subklada b* (limonen > 30,0 %). Na osnovu klaster analize, sve jedinke su podeljene u tri grupe (potencijalna hemotipa).

Za razliku od inicijalne klaster analize (Slika 4.2.12a) koja je pokazala visoku geografsku korelaciju, odvajajući jednu primorsku populaciju od tri populacije sa kontinentalnog dela Balkanskog poluostrva, klaster analiza koja je obuhvatila svih trinaest lokaliteta je pokazala nešto manju geografsku korelaciju, i formiranje četiri klastera. Populacije sa sličnim profilom (koje su imale sličan udeo jedinki sva tri predložena hemotipa) su se grupisale u iste klade. Detaljniji prikaz rezultata klaster analize biće dat kasnije (Slika 4.2.14).

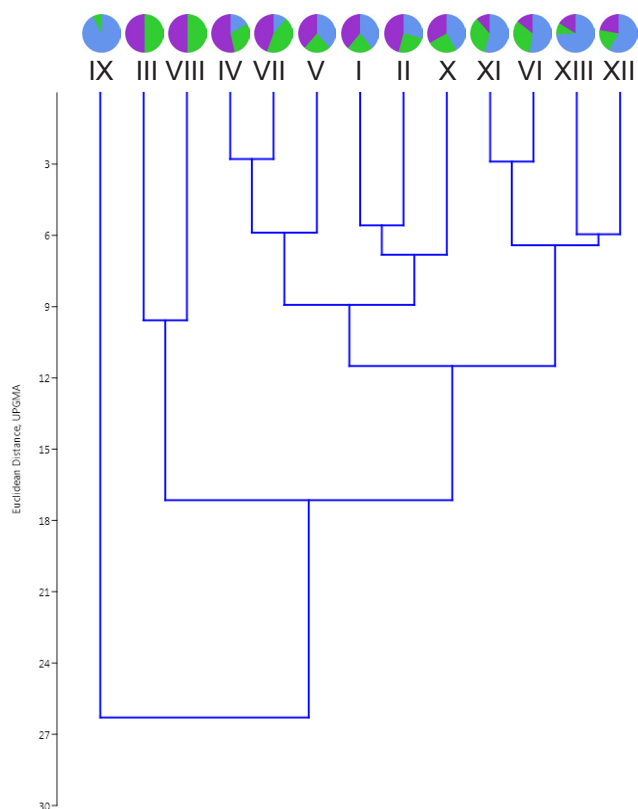
#### *Analiza varijanse (ANOVA)*

Bazirajući se na rezultatima PCA i HCA, urađena je analiza varijanse (ANOVA) sa *post-hoc* testom (LSD,  $p < 0,05$ ) kako bi se utvrdilo postojanje razlika između ovih grupa. Grupe su definisane u odnosu na količinu  $\alpha$ -pinena i limonena. Formirane su tri grupe (hemotipa):  $\alpha$ -pinenski,  $\alpha$ -pinen/limonenski i limonenski (Tabela 4.12).

Za ovu analizu korišćene su samo komponente srednje i visoke zastupljenosti ( $x > 0,1\%$ ). ANOVA je pokazala statistički značajno odvajanje između sve tri grupe u odnosu na većinu komponenti (31 od 35). Urađen je i LSD test da bi se testirala razlika između svakog para grupa. Ona je pokazala statistički značajno odvajanje sva tri hemotipa:  $\alpha$ -pinenski i  $\alpha$ -pinen/limonenski tip se razlikuju u odnosu na udeo veći deo jedinjenja, od kojih su  $\alpha$ -pinen, limonen, (*E*)-kariofilen,  $\delta$ -kadinen, kariofilen oksid, monil oksid i abietal najznačajniji.  $\alpha$ -pinen/limonenski tip se od limonenskog razlikuje takođe u većem broju jedinjenja, od kojih su najznačajniji limonen, (*E*)-kariofilen, germakren D, kariofilen oksid i monil oksid. Dok se  $\alpha$ -pinenski i limonenski tip razlikuju, između ostalih, i na osnovu  $\alpha$ -pinena, limonena, (*E*)-kariofilena, germakrena D,  $\delta$ -kadinena i abietala.

#### *Diskriminantna analiza (DA)*

Diskriminantna analiza bazirana na tri predložena hemotipa je takođe urađena. Rezultati DA su potvrdili jasno odvajanje tri predložena hemotipa (Slika 4.2.15). Prva osa objašnjava 74,8 % ukupne varijabilnosti. Pored dve komponente koje najviše utiču na odvajanje ove tri grupe, izdvaja se još šest komponentni koji doprinose njihovom odvajanju: kariofilen oksid,  $\delta$ -kar-3-en,  $\delta$ -kadinen, monil oksid, germakren D.

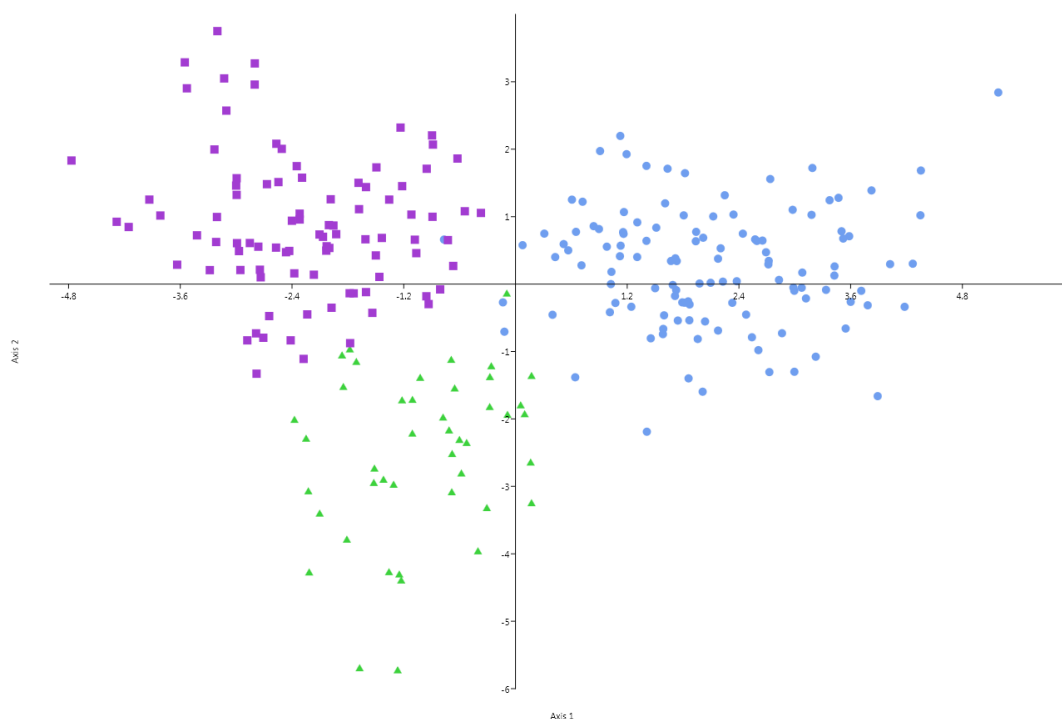


**Slika 4.2.14.** Dendrogram dobijen klaster analizom (Euklidianove distance, UPGMA) sadržaja terpena trinaest populacija *J. deltooides*:

■ - limonenski tip,  
 ■ -  $\alpha$ -pinenski tip,  
 ■ -  $\alpha$ -pinen/limonenski tip;

**I** - Rovinj, **II** - Senj, **III** - Kruševo,  
**IV** - Benkovac, **V** - Đevrske, **VI** -  
 Konjevrate, **VII** - Trogir, **VIII** -  
 Makarska, **IX** - Žanjice, **X** - Valdanos,  
**XI** - Pčinja, **XII** - Kopaonik, **XIII** -  
 Maglič;

*Pie chart* učestalosti tri hemotipa po populaciji je dat iznad dendrograma



**Slika 4.2.15.** Scatter plod diskriminantne analize sastava etarskog ulja iglica *J. deltooides*:  
 ■ - limonenski tip, ● -  $\alpha$ -pinenski tip, ▲ -  $\alpha$ -pinen/limonenski tip.

**Tabela 4.12** Poređenje 35 izabranih jedinjenja između tri hemotipa etarskog ulja *J. deltooides*

No.	Jedinjenje	<i>p</i>	$\alpha$ -pinenski tip	$\alpha$ -pinenski/ limonenski tip	limonenski tip
1	Hexanal	*	0.5±0.5	0.3±0.4 <sup>a</sup>	0.4±0.3 <sup>a</sup>
<b>2</b>	<b><math>\alpha</math>-Pinene</b>	<b>***</b>	<b>41.3±7.5</b>	<b>17.3±8.0<sup>a</sup></b>	<b>18.7±7.1<sup>a</sup></b>
3	Camphene	***	0.3±0.1	0.2±0.2 <sup>a</sup>	0.2±0.1 <sup>a</sup>
4	$\beta$ -Pinene	***	2.0±0.9	1.3±0.6 <sup>a</sup>	1.6±1.0 <sup>a</sup>
5	Myrcene	**	1.6±0.8 <sup>a,b</sup>	1.2±0.7 <sup>b</sup>	1.9±2.4 <sup>a</sup>
6	$\alpha$ -Phelandrene	**	0.4±0.4 <sup>b</sup>	0.5±0.4 <sup>a,b</sup>	0.6±0.5 <sup>a</sup>
7	$\delta$ -Car-3-ene	*	2.1±3.8 <sup>b</sup>	3.7±5.4 <sup>a</sup>	2.3±3.7 <sup>a,b</sup>
8	<i>p</i> -Cymene	***	0.4±0.4	0.7±0.6 <sup>a</sup>	0.8±0.6 <sup>a</sup>
<b>9</b>	<b>Limonene</b>	<b>***</b>	<b>13.2±6.3</b>	<b>16.4±5.5</b>	<b>31.6±6.0</b>
10	<i>trans</i> -Pinocarveol	-	0.5±0.4 <sup>a</sup>	0.4±0.3 <sup>a</sup>	0.4±0.2 <sup>a</sup>
11	<i>trans</i> -Verbenol	***	1.0±1.1	0.6±0.7 <sup>a</sup>	0.5±0.5 <sup>a</sup>
12	Pinocarvone	**	0.2±0.2 <sup>b</sup>	0.2±0.2 <sup>a,b</sup>	0.1±0.1 <sup>a</sup>
13	Terpinen-4-ol	***	0.2±0.1	0.3±0.3 <sup>a</sup>	0.3±0.2 <sup>a</sup>
14	Cymen-8-ol	***	0.2±0.3	0.4±0.5 <sup>a</sup>	0.3±0.5 <sup>a</sup>
15	( <i>E</i> )-Caryophyllene	***	2.8±3.6	4.4±4.2	1.8±2.2
<b>16</b>	<b>Germacrene D</b>	<b>***</b>	<b>5.9±4.2<sup>a</sup></b>	<b>5.2±3.9<sup>a</sup></b>	<b>3.9±2.3</b>
17	<i>ar</i> -Curcumene	-	0.6±1.4 <sup>a</sup>	1.0±1.5 <sup>a</sup>	0.7±1.5 <sup>a</sup>
18	$\beta$ -Alaskene	***	0.1±0.2 <sup>a</sup>	0.3±0.3	0.2±0.2 <sup>a</sup>
19	$\alpha$ -Muurolene	***	0.4±0.5 <sup>a</sup>	1.0±1.2	0.4±0.2 <sup>a</sup>
20	$\beta$ -Curcumene	-	0.2±0.7 <sup>a</sup>	0.4±1.3 <sup>a</sup>	0.3±1.0 <sup>a</sup>
21	$\gamma$ -Cadinene	***	1.6±1.0 <sup>a</sup>	2.3±1.6	1.8±0.8 <sup>a</sup>
<b>22</b>	<b><math>\delta</math>-Cadinene</b>	<b>***</b>	<b>2.6±1.8</b>	<b>4.4±3.8<sup>a</sup></b>	<b>4.2±2.2<sup>a</sup></b>
23	$\alpha$ -Copaen-11-ol	***	0.2±0.3	0.4±0.5 <sup>a</sup>	0.4±0.4 <sup>a</sup>
24	$\alpha$ -Calacorene	***	0.3±0.3	0.8±0.9 <sup>a</sup>	0.7±0.6 <sup>a</sup>
25	$\beta$ -Calacorene	***	0.1±0.2	0.4±0.4 <sup>a</sup>	0.4±0.5 <sup>a</sup>
<b>26</b>	<b>Caryophyllene oxide</b>	<b>***</b>	<b>1.2±1.6<sup>a</sup></b>	<b>4.2±4.7</b>	<b>1.6±2.4<sup>a</sup></b>
27	Cedrol	***	0.2±0.3 <sup>a</sup>	0.5±0.5	0.3±0.3 <sup>a</sup>
28	$\tau$ Cadinol	***	0.4±0.2 <sup>a</sup>	0.7±0.4	0.5±0.2 <sup>a</sup>
29	$\alpha$ -Cadinol	***	0.3±0.2 <sup>a</sup>	0.4±0.3	0.2±0.1 <sup>a</sup>
30	Cadalene	***	0.1±0.2 <sup>a</sup>	0.5±0.7	0.3±0.3 <sup>a</sup>
<b>31</b>	<b>Manoyl oxide</b>	<b>***</b>	<b>2.1±1.7<sup>a</sup></b>	<b>3.7±3.4</b>	<b>2.5±2.6<sup>a</sup></b>
32	Abietatriene	***	0.4±0.4	0.7±0.7	0.5±0.4
33	Abietadiene	-	1.0±1.2 <sup>b</sup>	1.4±1.5 <sup>a</sup>	1.1±1.2 <sup>a,b</sup>
34	4- <i>epi</i> -Abietal	***	0.3±0.4 <sup>a</sup>	0.3±0.4 <sup>a</sup>	0.2±0.2
35	Abietal	***	0.6±0.5	1.0±0.7 <sup>a</sup>	0.9±0.6 <sup>a</sup>

*p*: nivo značajnosti ANOVA (\*\*\*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.02$ , \*  $p < 0.05$ ); <sup>a,b</sup> - grupe prema LSD testu koje se statistički ne razlikuju; količine jedinjenja su date kao srednje vrednosti  $\pm$  SD; jedinjenja koja su uvek bila ispod 0,5% i nisu pokazala statistički značajnu razliku nisu prikazana u tabeli

### 4.3 Hloroplastne sekvence

#### 4.3.1 PCR amplifikacija i sekvenciranje target regiona

Četiri od šest testiranih hloroplastnih regiona je uspešno PCR amplifikovano kod ispitivanih predstavnika roda *Juniperus*. Regioni  $trnC^{(GCA)}-trnD^{(GUC)}$ ,  $trnL^{(UAA)}-trnF^{(GAA)}$ ,  $trnG^{(UUC)}-trnS^{(GCU)}$  i  $psbA-trnH^{(GUG)}$ , koji su i ranije ispitivani kod ovog roda, su uspešno PCR amplifikovani, dok je amplifikacija regiona  $rpl32-trnL^{(UAG)}$  i  $3'rps16-5'trnK$  bila neuspešna.

Kompletne sekvence regiona  $trnL^{(UAA)}-trnF^{(GAA)}$  su generisane kod 46 od 49 individua (94%), regiona  $psbA-trnH^{(GUG)}$  kod 121 individue od 134 (90%), regiona  $trnG^{(UUC)}-trnS^{(GCU)}$  kod 113 individua od 129 (88%), dok su kompletne (64) ili parcijalne (5) sekvence regiona  $trnC^{(GCA)}-trnD^{(GUC)}$  generisane kod 69 od 86 individua (80%), što je predstavljeno u Tabeli 4.13.

**Tabela 4.13** Spisak individua i taksona, sa rezultatima utvrđivanja primarnog redosleda nukleotida za 129 individua sekcije *Juniperus* i 5 individua *J. sabina* sa Balkanskog poluostrva.

Takson	Lokalitet	a)	b)	$trnC-trnD$				$psbA-trnH$		$trnG-trnS$	$trnL-trnF$
				F	Fi1	Fi2	R	F	R <sup>e</sup>		
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Deliblato	2	f	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Deliblato	3	m	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Deliblato	4	f	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Deliblato	5	m	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Deliblato	6	m	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Kopaonik	1	f	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Kopaonik	2	f	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Kopaonik	3	m	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Kopaonik	4	m	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Kopaonik	5	m	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Kopaonik	6	m	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Mavrovo	1	m	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Mavrovo	2	m	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Mavrovo	3	m	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Mavrovo	5	m	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Mavrovo	6	m	-	-	-	-	-	-	+	-



nastavak tabele 4.13

Takson	Lokalitet	a)	b)	<i>trnC-trnD</i>				<i>psbA-trnH</i>		<i>trnG-trnS</i>	<i>trnL-trnF</i>
				F	Fi1	Fi2	R	F	R <sup>e)</sup>		
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Neretva	1	m	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Neretva	2	m	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Neretva	3	m	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Neretva	4	m	+	+	-	-	+	-	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Neretva	5	f	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Slunj	1	/	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Slunj	2	/	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Slunj	3	/	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Slunj	5	/	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Slunj	6	/	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Suva planina	1	f	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Suva planina	2	f	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Suva planina	3	f	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Suva planina	4	f	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>J. communis</i> var. <i>communis</i>	Suva planina	5	f	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>intermedia</i>	Mavrovo	1	m	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. communis</i> var. <i>intermedia</i>	Mavrovo	2	m	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. communis</i> var. <i>intermedia</i>	Mavrovo	3	m	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. communis</i> var. <i>intermedia</i>	Mavrovo	4	m	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>intermedia</i>	Mavrovo	5	m	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Biokovo	1	f	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Biokovo	2	f	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Biokovo	3	f	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Biokovo	4	m	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Biokovo	5	m	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Kopaonik	1	m	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Kopaonik	2	f	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Kopaonik	4	m	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Kopaonik	5	m	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Kopaonik	6	m	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Mavrovo	1	m	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Mavrovo	2	m	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Mavrovo	3	m	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Mavrovo	5	m	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Mavrovo	6	m	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Prenj	1	m	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Prenj	2	f	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Prenj	3	m	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Prenj	4	f	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Prenj	5	f	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Orjen	1	/	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Orjen	2	/	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Orjen	3	/	-	-	-	-	+	+	+	-

nastavak tabele 4.13

Takson	Lokalitet	a)	b)	<i>trnC-trnD</i>				<i>psbA-trnH</i>		<i>trnG-trnS</i>	<i>trnL-trnF</i>
				F	Fi1	Fi2	R	F	R <sup>e)</sup>		
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Orjen	4	/	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Orjen	5	/	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Suva planina	1	m	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Suva planina	2	m	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Suva planina	3	m	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Suva planina	4	m	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Suva planina	5	m	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Suva planina	6	f	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Velebit	2	m	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Velebit	3	f	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Velebit	4	f	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Velebit	5	f	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	Velebit	6	f	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>J. macrocarpa</i>	Krit	10	m	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>J. macrocarpa</i>	Krit	2	m	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>J. macrocarpa</i>	Krit	3	f	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>J. macrocarpa</i>	Krit	4	m	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>J. macrocarpa</i>	Krit	5	m	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>J. macrocarpa</i>	Krit	7	m	+	-	-	+	+	-	-	+
<i>J. macrocarpa</i>	Krit	8	m	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>J. macrocarpa</i>	Krit	9	f	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>J. macrocarpa</i>	Trogir	1	f	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>J. macrocarpa</i>	Trogir	2	f	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>J. macrocarpa</i>	Trogir	3	f	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>J. macrocarpa</i>	Trogir	4	f	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>J. macrocarpa</i>	Trogir	5	f	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>J. deltooides</i>	Benkovac	1	/	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. deltooides</i>	Benkovac	2	/	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. deltooides</i>	Benkovac	3	/	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>J. deltooides</i>	Benkovac	4	/	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. deltooides</i>	Benkovac	5	/	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>J. deltooides</i>	Krit	1	m	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. deltooides</i>	Krit	2	m	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. deltooides</i>	Krit	3	m	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>J. deltooides</i>	Krit	4	m	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>J. deltooides</i>	Krit	5	m	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>J. deltooides</i>	Kopaonik	1	m	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>J. deltooides</i>	Kopaonik	2	m	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>J. deltooides</i>	Kopaonik	3	f	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>J. deltooides</i>	Kopaonik	4	f	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>J. deltooides</i>	Kopaonik	5	m	-	-	-	-	+	+	-	-

nastavak tabele 4.13

Takson	Lokalitet	a)	b)	<i>trnC-trnD</i>				<i>psbA-trnH</i>		<i>trnG-trnS</i>	<i>trnL-trnF</i>
				F	Fi1	Fi2	R	F	R <sup>c)</sup>		
<i>J. deltooides</i>	Maglic	1	m	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. deltooides</i>	Maglic	2	f	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. deltooides</i>	Maglic	5	m	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. deltooides</i>	Maglic	8	m	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>J. deltooides</i>	Pcinja	1	m	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>J. deltooides</i>	Pcinja	2	m	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>J. deltooides</i>	Pcinja	3	f	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>J. deltooides</i>	Pcinja	4	f	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>J. deltooides</i>	Pcinja	5	f	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>J. deltooides</i>	Raec	1	m	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>J. deltooides</i>	Raec	3	m	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>J. deltooides</i>	Raec	4	f	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>J. deltooides</i>	Raec	7	m	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>J. deltooides</i>	Raec	8	f	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>J. deltooides</i>	Rovinj	1	m	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>J. deltooides</i>	Rovinj	2	m	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>J. deltooides</i>	Rovinj	3	m	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>J. deltooides</i>	Rovinj	4	m	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>J. deltooides</i>	Rovinj	5	m	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>J. deltooides</i>	Trogir	1	/	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>J. deltooides</i>	Trogir	2	/	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>J. deltooides</i>	Trogir	3	/	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>J. deltooides</i>	Trogir	4	/	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>J. deltooides</i>	Valdanos	1	f	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>J. deltooides</i>	Valdanos	2	f	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>J. deltooides</i>	Valdanos	3	f	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>J. deltooides</i>	Valdanos	5	f	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>J. deltooides</i>	Valdanos	6	f	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>J. deltooides</i>	Valdanos	7	f	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>J. sabina</i>	Resava	1	m	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>J. sabina</i>	Resava	2	/	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>J. sabina</i>	Resava	3	m	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>J. sabina</i>	Resava	4	/	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>J. sabina</i>	Resava	5	m	+	+	-	+	+	-	+	-
<b>Ukupno</b>				71	69	62	68	123	97	113	46

a) broj individue; b) pol individue: **m** - muški, **f** - ženski; **Fi1**, **Fi2** - interni prajmeri; c) kod individua *J. deltooides* iz Rovinja, Trogira, Valdanosa, kao i kod *J. macrocarpa* i *J. sabina* utvrđen je primarni redosled nukleotida sa F prajmerom

Najduži ispitivani region je  $trnC^{(GCA)}-trnD^{(GUC)}$ , kod kojeg je primarna sekvenca nukleotida kod predstavnika roda *Juniperus* utvrđena sekvenciranjem sa 4 prajmera zbog izuzetne dužine regiona (jedan F, jedan R i dva interna prajmera). Kod individua kod kojih je sekvenciranje uspelo sa svim prajmerima (64) dužina sekvence je varirala od 1251 do 1594 bp, dok su kod 5 individua dobijene parcijalne sekvence duge od 1084 do 1407 bp (sekvenciranje sa 3 prajmera). Kod *J. communis* (37 individua) dužina dobijenih sekvenci je varirala od 1251 do 1289 bp, osim za dve individue kod kojih su dobijene kraće parcijalne sekvence (*J. communis* var. *communis*, Mavrovo1 i Neretva2). Kod *J. deltooides* (18 individua) dužina dobijenih sekvenci je varirala od 1546 do 1594 bp, osim kod individua Pčinja5, Raec1 i Valdanos6 kod kojih su dobijene kraće parcijalne sekvence. Kod *J. macrocarpa* (6 individua) dobijene su sekvence dužine 1559-1579 bp, dok su kod autgrupe *J. sabina* (3 individue) dobijene sekvence duge 1548-1552 bp.

Dužina poravnatog  $trnC^{(GCA)}-trnD^{(GUC)}$  regiona kod 69 individua predstavnika roda *Juniperus* je 1684 bp. U regionu postoji 42 pozicije sa supstitucijama baza (36 u nekodirajućim regionima, 7 u kodirajućim regionima) kao i 21 dužinske mutacije (16 indela i 4 mikrosatelita sa mononukleotidnim motivima, kao i jedan složeni hipervarijabilni region sa poli-T regionima na početku i kraju regiona, koji su imali varijabilni broj T nukleotida, i insercije varijabilne dužine kod različitih taksona). Detektovano je 32 *parsimony informative site* mutacija (20 tranzicija i 12 transverzija), kao i 10 *singleton* mutacija (2 tranzicije i 8 transverzija). U regionu postoji 12 jednostavnih indela dužine 1 do 5 bp, kao i 5 složenih indela čija dužina se kretala od 5 do 259 bp a koji obuhvataju i navedeni hipervarijabilni region (u okviru složenih indela i hipervarijabilnog regiona postoje dodatni indeli, kao i dodatni mikrosateliti i tačkaste mutacije u delovima sa insercijama, tako da je broj mutacija u ovom regionu zapravo veći od navedenog kod pojedinih taksona). Pored toga, u regionu je detektovano i 4 mikrosatelita monukleotidnih motiva  $(A)_n$  i  $(T)_n$ , kod kojih se broj ponovaka motiva kretao od 6 do 21.

Dužina  $psbA-trnH^{(GUG)}$  regiona, sekvenciranog sa dva prajmera (F i R), je varirala od 424 do 538 bp kod 121 individue predstavnika roda *Juniperus*. Kod *J. communis*, dužina generisanih sekvenci se kretala od 453 do 457 bp kod 115 individua. Kod jedne individue je zbog nešto lošijeg kvaliteta sekvence (*J. communis* var. *saxatilis*, Mavrovo3) dobijena nešto kraća sekvenca (424 bp). Kod 40 individua *J. deltooides* dužina  $psbA-trnH^{(GUG)}$  regiona se kretala od 447 do 454 bp, kod 13 individua *J. macrocarpa* od 448 do 465 bp, dok je dužina navedenog regiona kod 5 individua *J. sabina* bila najveća i iznosila je 538 bp.

Dužina poravnatog *psbA-trnH*<sup>(GUG)</sup> regiona kod 121 individue predstavnika roda *Juniperus* je 570 bp. U regionu postoji 10 pozicija sa supstitucijama baza i 8 dužinskih mutacija (4 indela i 4 mikrosatelita sa mononukleotidnim motivom). Detektovana je jedna *singleton* tačkasta mutacija (tranzicija) kao i devet *parsimony informative site* mutacija (6 tranzicija i 3 transverzije). Takođe, detektovana su 4 indela (6-65 bp) kao i 4 mikrosatelita sa mononukleotidnim motivom (A)<sub>n</sub>, kod kojih se broj ponovaka motiva kretao 6 do 14.

Dužina dobijenih sekvenci za region *trnG*<sup>(UUC)</sup>-*trnS*<sup>(GCU)</sup>, sekvenciran korišćenjem F prajmera, je varirala od 746 do 796 bp kod 113 ispitivanih individua. Najkraće sekvence su dobijene kod 69 individua *J. communis* (746-763 bp), a nešto duže kod 6 individua *J. macrocarpa* (779-784 bp), 33 individue *J. deltoides* (773-796 bp) i 5 individua *J. sabina* (786-787 bp) koja je korišćena kao autgrupa.

Dužina poravnatog regiona *trnG*<sup>(UUC)</sup>-*trnS*<sup>(GCU)</sup> kod 113 individua predstavnika roda *Juniperus* je 804 bp. U regionu postoji sedam pozicija sa supstitucijama baza i sedam dužinskih mutacija (5 indela i 2 mikrosatelita sa mononukleotidnim motivom). Detektovane su tri *singleton* tačkaste mutacije (sve tri transverzije) kao i četiri *parsimony informative site* tačkaste mutacije (po dve tranzicije i transverzije). Detektovano je pet indela dužine 1 do 39 bp, i dva slabo varijabilna mikrosatelita motiva (T)<sub>n</sub> i (A)<sub>n</sub> kod kojih se broj ponovaka motiva kretao od 6 do 7.

Najkraći ispitivani region je *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup>, čija je dužina varirala od 285 do 311 bp kod 46 individua. Najkraće sekvence su dobijene kod 3 jedinke *J. communis* var. *intermedia* sa Koraba (Mavrovo) (285 bp), dok su kod 8 jedinki *J. communis* var. *communis* i 5 jedinki var. *saxatilis* sekvence bile 286 bp duge. Kod 22 individue *J. deltoides* je dužina ispitivanog regiona varirala od 287 do 291 bp, dok su najduže sekvence dobijene kod 8 individua *J. macrocarpa* (Trogir, 300 bp; Krit, 301 bp). Kod jedinke *J. macrocarpa* Krit8 sekvenca je bila duga 311 bp.

Dužina poravnatog regiona *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> kod 46 individua predstavnika sekcije *Juniperus* je 344 bp. U celom regionu postoje samo 3 pozicije sa supstitucijama baza (2 tranzicije i 1 transverzija) kao i 6 dužinskih mutacija koje obuhvataju 4 insercije (1 do 29 bp), poziciju sa insercijama različitih motiva, i poziciju sa multiplikacijama motiva od 10 nukleotida (ponovljen 1 do 3 puta).

Za dalji rad su korišćene sekvence sva 4 ispitivana regiona kod 75 jedinki sekcije *Juniperus* kao i 3 jedinke *J. sabina* (autgrupa), koje su spojene u jednu zajedničku matricu i poravnate. Dužina poravnate matrice je 3400 bp, sa 63 pozicija sa supstitucijama baza (kada se uzimaju





nastanak tabele 4.14

Region	intergenički spajanje pN-pubM		pubM		intergenički spajanje pubM-trnD	
	pozicija	inercija (bp)	pozicija	inercija (bp)	pozicija	inercija (bp)
Uzorci	703	1256..1514	703	1256..1514	703	1256..1514
JCC_Deblblato2	T	1246	T	1246	T	1246
JCC_Deblblato3	T	1244	T	1244	T	1244
JCC_Deblblato4	T	1222	T	1222	T	1222
JCC_Kopaonik1	T	1215..1220	T	1215..1220	T	1215..1220
JCC_Kopaonik4	T	1196	T	1196	T	1196
JCC_Kopaonik5	T	1172	T	1172	T	1172
JCC_Mavrov1	T	1168	T	1168	T	1168
JCC_Mavrov3	T	1122	T	1122	T	1122
JCC_Mavrov5	T	1090	T	1090	T	1090
JCC_Neretva1	T	1081	T	1081	T	1081
JCC_Neretva2	T	1070	T	1070	T	1070
JCC_Neretva3	T	1050	T	1050	T	1050
JCC_Slanj1	T	1038..1044	T	1038..1044	T	1038..1044
JCC_Suva1	T	1010..1019	T	1010..1019	T	1010..1019
JCC_Suva2	T	996..1005	T	996..1005	T	996..1005
JCC_Suva5	T	990..995	T	990..995	T	990..995
JCL_Mavrov1	T	983..989	T	983..989	T	983..989
JCL_Mavrov2	T	966..982	T	966..982	T	966..982
JCL_Mavrov3	T	953	T	953	T	953
JCS_Birkovo2	T	944	T	944	T	944
JCS_Birkovo4	T	909..914	T	909..914	T	909..914
JCS_Birkovo5	T	902	T	902	T	902
JCS_Kopaonik1	T	885	T	885	T	885
JCS_Kopaonik2	T	877	T	877	T	877
JCS_Kopaonik6	T	852	T	852	T	852
JCS_Mavrov1	T	851	T	851	T	851
JCS_Mavrov6	T	736..849	T	736..849	T	736..849
JCS_Prenj3	T	730	T	730	T	730
JCS_Prenj4	T	703	T	703	T	703
JCS_Prenj5	T	703	T	703	T	703
JCS_Orieni1	T	703	T	703	T	703
JCS_Orieni4	T	703	T	703	T	703
JCS_Suva2	T	703	T	703	T	703
JCS_Suva4	T	703	T	703	T	703
JCS_Velebit2	T	703	T	703	T	703
JCS_Velebit3	T	703	T	703	T	703
JCS_Velebit4	T	703	T	703	T	703
JCS_Velebit5	T	703	T	703	T	703
JML_Krit3	T	703	T	703	T	703
JML_Krit5	T	703	T	703	T	703
JML_Krit7	T	703	T	703	T	703
JML_Krit8	T	703	T	703	T	703
JML_Trogir1	T	703	T	703	T	703
JML_Trogir2	T	703	T	703	T	703
JML_Trogir3	T	703	T	703	T	703
JML_Trogir4	T	703	T	703	T	703
JD_Benkovae1	T	703	T	703	T	703
JD_Benkovae2	T	703	T	703	T	703
JD_Benkovae3	T	703	T	703	T	703
JD_Benkovae4	T	703	T	703	T	703
JD_Krit1	T	703	T	703	T	703
JD_Krit2	T	703	T	703	T	703
JD_Krit3	T	703	T	703	T	703
JD_Krit4	T	703	T	703	T	703
JD_Krit5	T	703	T	703	T	703
JD_Maglic1	T	703	T	703	T	703
JD_Maglic2	T	703	T	703	T	703
JD_Maglic5	T	703	T	703	T	703
JD_Pcinja1	T	703	T	703	T	703
JD_Pcinja2	T	703	T	703	T	703
JD_Pcinja3	T	703	T	703	T	703
JD_Pcinja5	T	703	T	703	T	703
JD_Race1	T	703	T	703	T	703
JD_Race3	T	703	T	703	T	703
JD_Race4	T	703	T	703	T	703
JD_Rovinj1	T	703	T	703	T	703
JD_Rovinj2	T	703	T	703	T	703
JD_Rovinj3	T	703	T	703	T	703
JD_Rovinj4	T	703	T	703	T	703
JD_Trogir1	T	703	T	703	T	703
JD_Trogir2	T	703	T	703	T	703
JD_Trogir3	T	703	T	703	T	703
JD_Valdaros3	T	703	T	703	T	703
JD_Valdaros6	T	703	T	703	T	703
JS_Resava2	T	703	T	703	T	703
JS_Resava3	T	703	T	703	T	703
JS_Resava5	T	703	T	703	T	703







**Tabela 4.14a** Pregled insercija/delecija prisutnih u matrici 4 hloroplastnog regiona sekvenciranih kod individua sekcije *Juniperus* sa Balkanskog poluostrva i autgrupe *J. sabina*.

Pozicija	Oznaka	Sekvenca
28..32	*	AACTT
130..144	*	TATCTCTAGTAATTA
506..520	*	ATTCATTAATTATTT
626..630	*	ATTTT
736..849	<i>a</i>	GCCTTTACAATTGACAATTTTGTATATTACTATGGAATAGTAAA- CAATGCGTATTCGTATTATCAATATTTTTTTGAGATATTAATAAAAAA- TATTGATAACACCTA
	<i>b</i>	GCCTTTACAATTGACAATTTTGTATATTACTATGGAATAGTAAA- CAATGCGTATTCGTATTATCAATATTTTTTTGAGATATTAATAAAAAATATT- GATAACACCTA
	<i>c</i>	GCCTTTACAATTGACAATTTTGTATATTACTATGGAATAGTAAA- CAATGCGTATTATCAATATTTTTT
	<i>d</i>	GCCTTTACAATTGACAATTTTGTATATTACTATGGAATAGTAAA- CAATGCGTATTCGTATTATCAATATTTTTTTGAGATATTAATAAAAAA- TATTGATAACACCTATGTTTTTTTT
909..914	*	GAATTA
966..982	<i>e</i>	TTTCITTTTTTCTTTTT
	<i>f</i>	TTTCITTTTTCTTTTT
	<i>g</i>	TTTCITTTT
	<i>b</i>	TTTCITTTTTCTTTA
	<i>i</i>	TTTCITTTTTCTTTA
983..989	*	GTAATTA
990..995	*	CTATTA
996..1005	<i>j</i>	CTTCT
1215..1220	*	CATTTG
1540..1544	*	GGATC
1903..1990	*	TTTTACCATTTCAGCCATGGATAATGAATACTAATTATTAATTAGTATT- GAGTATTGGCTCAGATCTTTTTTTTTGAATACCCAAAACAA
1999..2004	*	GTATTT
2086..2104	*	AAATTAATAACTAAACTAA
2134..2139	*	GTTGGT
2463..2468	*	CAATAT
2495..2533	<i>k</i>	CITTAGTAACTAGTCTAATTATAGAATGTTGTTATGATT
	<i>l</i>	CITTAGTAACTAGTCTAATTATAGATAGTTGTTATGATTATT
2878..2882	*	CAATT
3141..3160	<i>m</i>	TGTATATAAC
3193..3221	*	ATATATTGTGTATTATTTAATGCACAATA
3241..3258	<i>n</i>	AATGTTTTTAGTTGTAT
	<i>o</i>	ATTGTAT
	<i>p</i>	AATGCTTTTTAGTTGTAT
3278..3299	*	AATGCTGTCITTTTACCCTTTTT

### 4.3.2. Karakteristike sekvenciranih regiona

Anotacija matrice nastale kombinovanjem sva četiri sekvencirana hloroplastna regiona ispitivanih predstavnika sekcije *Juniperus* kao i *J. sabina* (autgrupa) je data u Tabeli 4.15 (anotacija regiona i njihovih kodirajućih i nekodirajućih regiona) i Tabeli 4.14 (anotacija regiona sa pozicijama mutacija), a u Tabeli 4.16 su sumirane mutacije u regionima (substitucije baza, dužinske mutacije i mikrosateliti) sa navođenjem mutacija koje su sinapomorfne za određene taksone.

**Tabela 4.15** – Anotacija matrice sastavljene kombinovanjem sekvenci sva 4 generisana hloroplastna regiona odabranih populacija vrsta sekcije *Juniperus* sa Balkanskog poluostrva

Region	Lokacija	Opis	Produkt
<i>trnC</i> <sup>(GCA)</sup> - <i>trnD</i> <sup>(GUC)</sup>	1..318	intergenski spejser <i>trnC</i> - <i>pefN</i>	
	319..408	gen <i>pefN</i>	subjedinica VIII citohrom B6/F kompleksa
	409..1082	intergenski spejser <i>pefN</i> - <i>psbM</i>	
	1083..1193	gen <i>psbM</i>	protein M fotosistema II
<i>psbA</i> - <i>trnH</i> <sup>(GUG)</sup>	1194..1682	intergenski spejser <i>psbM</i> - <i>trnD</i>	
	1683..1684	3' deo gena <i>trnD</i> <sup>(GUC)</sup>	tRNA - asparaginska kis.
	1685..1722	3' deo gena <i>psbA</i>	protein D1, fotosistem II
	1723..1852	intergenski spejser <i>psbA</i> - <i>trnI</i> <sup>(CAU)</sup>	
<i>trnG</i> <sup>(UUC)</sup> - <i>trnS</i> <sup>(GCU)</sup>	1853..1925	nefunkcionalni gen <i>trnI</i> <sup>(CAU)</sup>	tRNA - izoleucin
	1926..2207	intergenski spejser <i>trnI</i> <sup>(CAU)</sup> - <i>trnH</i>	
	2208..2254	5' deo gena <i>trnH</i> <sup>(GUG)</sup>	tRNA - histidin
	2255..2770	intergenski spejser <i>trnG</i> - <i>psaM</i>	
<i>trnL</i> <sup>(UAA)</sup> - <i>trnF</i> <sup>(GAA)</sup>	2770..2871	gen <i>psaM</i>	protein M, fotosistem I
	2872..3041	intergenski spejser <i>psaM</i> - <i>trnS</i>	
	3042..3058	deo gena <i>trnS</i> <sup>(GCU)</sup>	tRNA - serin
	3059..3350	intergenski spejser <i>trnL</i> - <i>trnF</i>	
	3351..3400	3' deo gena <i>trnF</i> <sup>(GAA)</sup>	tRNA - fenilalanin

Generisane hloroplastne sekvence sva 4 regiona su upoređene sa odgovarajućim referentnim sekvencama. Kao referentne sekvence korišćene su odgovarajuće sekvence hloroplastnog genoma *J. virginiana* čiji kompletan hloroplastni genom je dostupan u javnoj banci gena GenBank (accession KF866300.1, (Guo et al., 2014)). *J. virginiana* je odabrana kao referentni takson zbog toga što se radi o vrsti široko rasprostranjenoj u Severnoj Americi dok su preostale tri vrste, za koje su takođe dostupni kompletni plastomi, endemiti. Pored toga, proverena je komplementarnost nukleotida matrice (referentni takson) na mestima vezivanja prajmera korišćenih za amplifikaciju svih regiona (*rpl32-trnL*<sup>(UAG)</sup>, 3'*rps16-5'trnK*, *trnC*<sup>(GCA)</sup>-*trnD*<sup>(GUC)</sup>, *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup>, *trnG*<sup>(UUC)</sup>-*trnS*<sup>(GCU)</sup> i *psbA-trnH*<sup>(GUG)</sup>). Potrebno je napomenuti da je orijentacija generisanih sekvenci 2 regiona (*trnG*<sup>(UUC)</sup>-*trnS*<sup>(GCU)</sup> i *psbA-trnH*<sup>(GUG)</sup>) u odnosu na referentnu sekvencu bila identična, dok su sekvence 2 regiona (*trnC*<sup>(GCA)</sup>-*trnD*<sup>(GUC)</sup> i *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup>) bile u *antisense-reverse* orijentaciji u odnosu na referentnu sekvencu.

#### ***trnC*<sup>(GCA)</sup>-*trnD*<sup>(GUC)</sup>**

Prajmeri korišćeni za amplifikaciju ovog regiona se vezuju u 5' kraju *trnC*<sup>(GCA)</sup> (F) odnosno *trnD*<sup>(GUC)</sup> (R) gena referentnog taksona. Nisu uočene mutacije u mestima vezivanja ovih prajmera. Generisani *trnC*<sup>(GCA)</sup>-*trnD*<sup>(GUC)</sup> region obuhvata tri intergenska spejsera (*trnC-pefN*, *pefN-psbM*, *psbM-trnD*), dva kompletna gena (*pefN*, *psbM*) kao i 3' kraj *trnD* gena. Kod referentne sekvence, dužine intergenskih spejsera su bile, redom: 324, 644 i 387 bp, dok su geni dugi 90, 111 odnosno 74 bp.

Primarni redosled nukleotida *pefN* gena, čija dužina kod referentnog taksona iznosi 90 bp, je bio identičan kod gotovo svih ispitivanih taksona kao i kod referentnog taksona. Međutim, kod dve individue (*J. communis* var. *saxatilis*, Kopaonik1 i *J. macrocarpa* Krit3) su detektovane četiri mutacije. Kod spomenute individue *J. communis* var. *saxatilis* je detektovana jedna tačkasta mutacija: A → G, na poziciji 76 u genu (s obzirom da je navedeni region u antisense-reverse orijentaciji u odnosu na referentnu sekvencu, u matrici postoji mutacija T → C na poziciji 333), što za posledicu ima zamenu jedne aminokiseline drugom (treonin → alanin). Kod individue 3 *J. macrocarpa* sa Krita su detekovane tri mutacije: A → T, na poziciji 16 u genu (pozicija 393 u matrici, mutacija T → A), koja za posledicu ima zamenu jedne aminokiseline (treonin → serin); A → T na poziciji 76 u genu (pozicija 333 u matrici, mutacija T → A), koja za posledicu ima zamenu takođe zamenu treonin → serin; T → G na poziciji 82 u genu (pozicija 327 u matrici, mutacija A → C), koja za posledicu ima zamenu

aminokiseline tirozin → aspartat. Proizvod ovog gena je subjedinica VIII citohrom B6/F kompleksa.

Kod *psbM* gena, koji kodira protein M fotosistema II i čija dužina kod referentnog taksona iznosi 111 bp, su detektovane četiri tačkaste mutacije. Kod jedinke *J. macrocarpa* Krit8 postoji jedna *silent* mutacija na poziciji 71 u genu (ne dolazi do zamene aminokiseline u proteinu, T → C), a u matrici se ova mutacija nalazi na poziciji 1122 (mutacija A → G). Kod svih ispitivanih jedinki postoji mutacija na poziciji 58 u genu (T → G) (pozicija 1135 u matrici, mutacija A → C) koja za posledicu ima zamenu jedne aminokiseline u proteinu koji je kodiran ovim genom (valin → alanin). I konačno, kod svih ispitivanih individua sekcije *Juniperus* postoji mutacija na poziciji 104 u genu (C → T) odnosno 1090 u matrici (G → A) koja za posledicu ima zamenu treonina izoleucinom. Kod individue *J. communis* var. *communis* Deliblato4 su detektovane dve mutacije (A → T) na pozicijama 21 i 25 u genu, odnosno mutacije T → A na pozicijama 1168 i 1172 u matrici, respektivno, međutim zbog lošeg kvaliteta sekvence nije moguće utvrditi da li je došlo do zamene aminokiselina.

Intergenski spejser *trnC<sup>(GCA)</sup>-petN*, čija dužina kod referentnog taskona iznosi 324 bp, je samo delimično amplifikovan (5' kraj dužine 318 bp). U generisanim sekvencama ovog spejsera je detektovano 6 pozicija sa supstitucijama baza, 4 indela (1 do 15 bp) i jedan mikrosatelit sa mononukleotidnim motivom T (10 do 21 ponovaka, 271..291). Međutim, navedeni mikrosatelit sadrži dodatne mutacije timina u citozin na dve pozicije kod ingrupe, i na jednoj poziciji (T → A) kod autgrupe, što čini 9 pozicija supstitucija baza u ovom regionu. Od toga, 3 mutacije odvajaju autgrupu od ingrupe i mogu smatrati sinapomorfne za predstavnike sekcije *Juniperus*: nukleotidni karakter G na poziciji 47, delecija jednog nukleotida (A) na poziciji 61, i T na poziciji 281 (u okviru mikrosatelita sa motivom T, koji se proteže od pozicije 271 do 291 i u okviru kojeg na navedenoj poziciji *J. sabina* sadrži C). Kod ingrupe je u okviru ovog spejsera detektovano 5 pozicija sa supstitucijama baza, 3 indela (dužine 1 do 15 bp) kao i navedeni mikrosatelit koji sadrži dodatne mutacije T → C na 2 pozicije kod pojedinih taksona, što ukupno čini 7 pozicija sa supstitucijama baza. Od navedenih mutacija, neke su sinapomorfne za pojedine taksone. Dva karaktera su sinapomorfna za *J. communis*: nukleotidni karakter A na poziciji 45 i jedna insercija od 5 bp (28..32). Pored toga, mikrosatelit (271..291) sa motivom T kod *J. communis* sadrži 12 do 13 ponovaka, dok je broj ponovaka kod *J. deltoides* i *J. sabina* konstantan, 14 i 21, respektivno, a kod *J. macrocarpa* broj ponovaka se kreće od 10 do 13. Dva nukleotidna karaktera su sinapomorfna za *J. deltoides*: C

na poziciji 118, kao i C na poziciji 273 u okviru mikrosatelita (271..291). U okviru navedenog mikrosatelita (271..291), C na poziciji 282 je sinapomorfan za *J. deltoides* i *J. macrocarpa*, a za ova 2 taksona, sinapomorfan je i nukleotidni karakter T na poziciji 12. Jedan nukleotidni karakter, T na poziciji 6, je sinapomorfan za individue *J. macrocarpa* iz populacije sa Krita, dok je za individue iste vrste iz populacije iz okoline Trogira sinapomorfna insercija jednog nukleotida (A) na poziciji 112.

Intergenski spejser *pefN-psbM*, čija dužina kod referentnog taskona iznosi 644 bp a poravnata dužina kod ispitivanih individua 674 bp, je bio najvarijabilniji deo generisanog *trnC<sup>(GCA)</sup>-trnD<sup>(GUC)</sup>* regiona, koji sadrži 22 pozicije sa supstitucijama baza, 10 pozicija sa indelima i 2 mikrosatelita sa mononukleotidnim motivima, (A)<sub>n</sub> i (T)<sub>n</sub>. Od toga, 12 karaktera odvaja autgrupu od ingrupe i može se smatrati sinapomorfim za ingrupu. Ovi karakteri obuhvataju 10 nukleotidnih karaktera: G na pozicijama 465, 679 i 877, A na pozicijama 603, 605 i 1081, i T na pozicijama 604, 673, 730 i 1050, kao i 1 inserciju (6 bp, 626..631). Pored toga, na poziciji 736..849 su uočene insercije motiva *d* kod *J. sabina*, dok kod *J. macrocarpa* postoje motivi *a* i *b*, kod *J. deltoides* motiv *c*, a kod *J. communis* na ovoj poziciji nema nikakvih insercija. Jedan nukleotidni karakter, A na poziciji 625, je sinapomorfan za *J. sabina* i *J. macrocarpa*. U okviru ovog intergenskog spejsera kod ingrupe je detektovano 11 pozicija sa supstitucijama baza, 7 pozicija sa indelima (dužine 1 do 15 bp) ili duplikacijama određenih motiva, kao i 2 mikrosatelita motiva (A)<sub>n</sub> i (T)<sub>n</sub>. Većina ovih karaktera je sinapomorfna za određene taksone. Četiri karaktera su sinapomorfna za *J. communis*: nukleotidni karakter T na pozicijama 525 i 703, C na poziciji 944, kao i insercija od 6 bp (990..995). Pet nukleotidnih karaktera je sinapomorfno za *J. deltoides*: T na pozicijama 662 i 902, A na pozicijama 885 i 953, i C na poziciji 687. Dva nukleotidna karaktera su sinapomorfna za *J. macrocarpa*: C na poziciji 851 i A na poziciji 852, dok su kod ovog taksona na poziciji 736..849 prisutne insercije motiva *a* i *b* (na ovoj poziciji kod *J. deltoides* postoji motiv *c*, a kod autgrupe motiv *d*). Za individue *J. macrocarpa* sa Krita su sinapomorfna 3 karaktera, 2 nukleotidna karaktera, A na poziciji 631 i T na poziciji 885, i 7 bp delecija na poziciji 983..989, kao i motivi *b* i *i* na poziciji 966..982, na kojoj individue iz Trogira sadrže motiv *g*. Na navedenoj poziciji, *J. communis*, *J. deltoides* i 2 individue *J. sabina* sadrže motiv *f*. Na poziciji 996..1005 je uočeno prisustvo motiva *j* koji je prisutan u dve kopije samo kod *J. communis* var. *intermedia* i 2 individue *J. communis* var. *communis*.

Intergenski spejser *psbM-trnD<sup>(GUC)</sup>*, čija dužina kod referentnog taksona iznosi 387 bp a poravnata dužina kod ispitivanih individua 489 bp, sadrži 8 pozicija sa supstitucijama baza, 2 pozicije sa indelima (5 do 6 bp), 1 mikrosatlit sa motivom (T)<sub>n</sub>, i jedan hipervarijabilni region

(1256..1514). Od toga, svega 1 karakter, insercija od 5 bp (1540..1544), odvaja autgrupu od ingrupe i može se smatrati sinapomorfim za ingrupu. Stoga kod ingrupe postoji 8 pozicija sa supstitucijama baza, 1 pozicija sa indelom od 6 bp, 1 mikrosatlit sa motivom (T)<sub>n</sub>, i jedan hipervarijabilni region (1256..1514) koji započinje i završava se poli-T regionom kod svih ispitivanih individua, a kod *J. macrocarpa*, *J. deltoides* i *J. sabina* sadrži insercije dužine 204 i 212 bp (kod *J. macrocarpa*), 231 bp (kod *J. deltoides*) i 161 bp (kod *J. sabina*). Kod *J. sabina*, ova insercija je bila identična kod svih individua, dok je kod *J. deltoides* u okviru navedene insercije uočeno i nekoliko *singleton* mutacija. Od navedenih mutacija koje se javljaju kod ingrupe, 3 karaktera su sinapomorfni za *J. communis*, 2 nukleotidna karaktera, T na poziciji 1634 i C na poziciji 1653, i insercija od 6 bp (1215..1220), a 1 nukleotidni karakter, T na poziciji 1568, je sinapomorfan za *J. deltoides*.

### ***psbA-trnH*<sup>(GUG)</sup>**

Tokom provere komplementarnosti nukleotida referentne sekvence u mestima vezivanja prajmera i prajmera korišćenih za amplifikaciju navedenog regiona, uočene su dve mutacije u mestu vezivanja prajmera *psbA-3f* (Tate & Simpson, 2003), koji se vezuje pri 3' kraju *psbA* gena. Mutacije T → C i A → G su uočene na pozicijama prajmera 9 i 12, respektivno (sekvenca matrice na mestu vezivanja *psbA-3f* prajmera sa označenim mutacijama je GTTATGCACCGAGGCGTAATGCTC). Međutim, u pitanju su *silent* mutacije, koje ne dovode do promene redosleda aminokiselina u proteinu koji nastaje kao proizvod ovog gena (produkt *psbA* gena je protein D fotosistema II).

Prajmer *trnHf\_05* (Tate & Simpson, 2003) se vezuje pri sredini *trnH*<sup>(GUG)</sup> gena, koji je kod referentne sekvence dug 76 bp, i kodira tRNA za histidin (antikodon GUG). Detektovana je jedna mutacija u mestu vezivanja ovog prajmera na poziciji 6 prajmera (A → G, sekvenca matrice na mestu vezivanja *trnHf\_05* prajmera sa označenom mutacijom je CGCGCGTGGTGGATTCACAATCC). S obzirom da tokom sekvenciranja kod ispitivanih individua predstavnika roda *Juniperus* nije generisan deo *trnH*<sup>(GUG)</sup> gena za koji se vezuje prajmer *trnHf\_05*, ostaje nepoznato da li ispitivane individue sadrže navedenu mutaciju u mestu vezivanja ovog prajmera. I pored prisustva mutacija u mestima vezivanja oba prajmera korišćena za amplifikaciju regiona *psbA-trnH*<sup>(GUG)</sup>, sekvence ovog regiona su uspešno generisane kod 121 individue predstavnika roda *Juniperus*.



Generisani *psbA-trnH*<sup>(GUG)</sup> region obuhvata dva intergenska spejsera (*psbA-trnI*, *trnI-trnH*), *trnI* gen kao i 5' početak *trnH* gena. *TrnI*<sup>(CAU)</sup> gen, čija dužina kod referentnog taksona iznosi 73 bp, kodira tRNA za izoleucin (antikodon CAU). Međutim, poređenjem sekvence ovog gena kod ispitivanih predstavnika roda *Juniperus* sa sekvencom referentnog taksona, uočeno je da je kod autgrupe (*J. sabina*) došlo do mutacije poslednjeg nukleotida u genu (C → A, na poziciji 73 u genu, pozicija 1925 u matrici), dok je kod svih ostalih individua došlo do delecije 23 nuleotida sa 3' kraja gena.

U intergneskom spejseru *psbA-trnI*<sup>(CAU)</sup>, čija dužina kod referentnog taksona iznosi 115 bp a poravnata dužina kod ispitivanih individua 130 bp, detekovane su tri pozicije sa supstitucijama baza i jedan mikrosatelit (A)<sub>n</sub>. Od toga, 2 nukleotidna karaktera, G na poziciji 1763 i T na poziciji 1792, su sinapomorfni za ingrupu, dok mikrosatelit sa motivom A kod autgrupe sadrži 6 ponovaka a kod ingrupe 9 ponovaka navedenog motiva. Kod ingrupe postoji jedna pozicija sa supstitucijom baze. Taj nukleotidni karakter, G na poziciji 1755, je sinapomorfan za *J. deltoides*.

U intergneskom spejseru *trnI*<sup>(CAU)</sup>-*trnH*<sup>(GUG)</sup>, čija dužina kod referentnog taskona iznosi 245 bp, a poravnata dužina kod ispitivanih individua 282 bp, detektovano je sedam pozicija sa supstitucijama baza, 4 indela (6 do 88 bp) i 1 mikrosatelit motiva (A)<sub>n</sub>. Od toga, 6 karaktera je sinapomorfno za ingrupu, i to 4 nukleotidna karaktera: A na poziciji 2029, C na poziciji 2066, G na poziciji 2166 i T na poziciji 2196, kao dve delecije, jedna na poziciji 1903..1990 (88 bp) i druga na poziciji 1999..2004 (6bp). U okviru ingrupe, uočeno je 3 varijabilna mesta sa supstitucijama baza, 2 indela (6 do 19 bp) i jedan mikrosatelit motiva (A)<sub>n</sub>, od kojih je 4 karaktera sinapomorfno za određene taksone. Dva karaktera, nukleotidni karakter A na poziciji 2025, i 6 bp insercija (2134..2139), su sinapomorfni za *J. communis*. Jedan nukleotidni karakter, A na poziciji 2152, je sinapomorfan za individue *J. macrocarpa* sa Krita i za *J. deltoides*, dok je 19 bp insercija (2086..2104) sinapomorfna za individue *J. macrocarpa* iz Trogira.

***trnG*<sup>(UUC)</sup>-*trnS*<sup>(GCU)</sup>**

Kod *J. virginiana* u mestu vezivanja *trnS*<sup>(GCU)</sup> prajmera (Hamilton, 1999), koji se vezuje za 5' kraj gena, postoje dve mutacije (G → A, A → G) na pozicijama 1 i 14, respektivno (sekvenca matrice na mestu vezivanja *trnS*<sup>(GCU)</sup> prajmera sa označenim mutacijama je ACCGCTTTAGTCCGCTCAGC). Kod ispitivanih taksona, uočena je samo jedna mutacija (na poziciji 1), pošto dobijene sekvence obuhvataju samo poslednjih 17 nukleotida *trnS*<sup>(GCU)</sup> gena. Međutim, i pored prisustva potencijalno dve mutacije u mestu vezivanja prajmera *trnS*<sup>(GCU)</sup>, region *trnG*<sup>(UUC)</sup>-*trnS*<sup>(GCU)</sup> je uspešno amplifikovan kod 113 individua.

Generisani *trnG*<sup>(UUC)</sup>-*trnS*<sup>(GCU)</sup> region obuhvata dva intergenska spejsera (*trnG-psaM*, *psaM-trnS*), gen *psaM*, i 5' kraj *trnS* gena. Kod ispitivanih taksona u okviru *psaM* gena, čija dužina kod referentnog taksona iznosi 96 bp, postoji insercija od šest nukleotida, što ukazuje na to da je najverovatnije došlo do insercije dve aminokiseline (izoleucin i alanin) u protein koji je kodiran ovim genom (protein M fotosistema I, redosled aminokiselina kod ispitivanih predstavnika roda *Juniperus* sa označenim mutacijama je MISQGQILIALFIAVTFLIMILAFRLGRALYSS\*).

U intergenskom spejseru *trnG*<sup>(UUC)</sup>-*psaM*, čija dužina kod referentnog taksona iznosi 512 bp a poravnata dužina kod ispitivanih individua 516 bp, detektovano je 5 pozicija sa supstitucijama baza, 4 insercije (1 do 39 bp) kao i dva slabo varijabilna mikrosatelita motiva (A)<sub>n</sub> i (I)<sub>n</sub>, oba sa 6 do 7 ponovaka. Od toga, samo 1 nukleotidni karakter, A na poziciji 2703, je sinapomorfan za ingrupu, u okviru koje je detektovano 4 tačkaste mutacije, 4 insercije (1 do 39 bp) kao i dva mikrosatelita motiva (A)<sub>n</sub> i (I)<sub>n</sub>, od kojih su 4 karaktera sinapomorfna za određene taksone. Dva karaktera, nukleotidni karakter G na poziciji 2314 kao i 1 bp insercija (G) na poziciji 2578, su sinapomorfni za *J. communis*. Slabo polimorfni mikrosatelit sa motivom A (2306..2312) sadrži 7 ponovaka motiva kod *J. macrocarpa* sa Krita i kod *J. deltoides* dok kod ostalih individua sadrži 6 ponovaka, a za navedene taksone je sinapomorfna i 6 bp delecija (2463..2468), kao i insercija motiva *k* na poziciji 2495..2533. Na navedenoj poziciji kod *J. macrocarpa* iz Trogira i kod *J. sabina* postoji motiv *l* dok kod *J. communis* na ovoj poziciji postoji delecija.

U intergenskom spejseru *psaM-trnS*<sup>(GCU)</sup>, čija dužina kod referentnog taksona iznosi 169 bp a poravnata dužina kod ispitivanih individua 170 bp, detektovane su dve tačkaste

mutacije i jedan indel od 5 bp, od kojih ni jedan karakter nije sinapomorfan za ingrupu, a 2 karaktera su sinapomorfna za određene taksone. Nukleotidni karakter C na poziciji 2941 je sinapomorfan za *J. macrocarpa* sa Krita i *J. deltoides* dok, dok je nukleotidni karakter T na poziciji 2983 sinapomorfan za *J. communis*.

### *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup>

Za amplifikaciju regiona *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> su korišćeni prajmeri **e** (mesto vezivanja u prvom egozonu *trnL*<sup>(UAA)</sup> gena) i **f** (mesto vezivanja u blizini 5' kraja *trnF*<sup>(GAA)</sup> gena) preuzeti iz Taberlet et al. (1991). Kod *J. virginiana*, uočena je jedna mutacija u mestu vezivanja **e** prajmera, G → A, na poziciji prajmera 6 (sekvenca matrice na mestu vezivanja prajmera **e** sa označenom mutacijom je GGTTCAAGTCCCTCTATCCC). Produkt ovog gena, čija dužina kod referentnog taksona iznosi 373 bp, je tRNA za leucin (antikodon UAA). S obzirom da tokom sekvenciranja kod ispitivanih individua predstavnika roda *Juniperus* nije generisan deo *trnL*<sup>(UAA)</sup> gena za koji se vezuje prajmer **e**, ostaje nepoznato da li ispitivane individue sadrže navedenu mutaciju u mestu vezivanja ovog prajmera. Jedna mutacija, G → A, pozicija prajmera 18, je uočena i u mestu vezivanja prajmera **f** kod referentnog taksona (sekvenca matrice na mestu vezivanja prajmera **f** sa označenom mutacijom je 5'-ATTTGAAGTGGTGACACAAG-3'). Proizvod *trnF*<sup>(GAA)</sup> gena je tRNA za fenilalanin (antikodon GAA). Prema dostupnim podacima (Koch, 2005) mutacija se desila u regionu gena odgovornim za formiranje antikodon petlje. Međutim, ova mutacija nije uočena kod ispitivanih individua predstavnika roda *Juniperus*.

Generisani *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> region obuhvata deo intergenskog spejsera *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup>, čija dužina kod referentnog taksona iznosi 285 bp, kao i najveći deo *trnF* gena, čija dužina kod referentnog taksona iznosi 73 bp.

U intergenskom spejseru *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup>, čija dužina kod referentnog taksona iznosi 285 bp a poravnata dužina kod ispitivanih individua 292 bp, su detektovane 3 pozicije sa supstitucijama baza i 6 pozicija sa dužinskim mutacijama (4 insercije dužine 1 do 29 bp, jedan region sa različitim brojem ponovaka motiva od 20 bp (1 do 2 ponovka), kao i 1 region sa insercijama različitih motiva. S obzirom da nisu generisane sekvence ovog spejsera za autgrupu, ostaje nepoznato da li u ovom spejseru postoje mutacije sinapomorfne za ingrupu. Pored toga, nije bilo moguće pouzdano utvrditi koji karakteri su sinapomorfni za koje taksone.

Što se tiče nukleotidnih karaktera, na poziciji 3223 kod *J. macrocarpa* i *J. deltooides* postoji A (C kod *J. communis*), a na poziciji 3259, kod *J. communis* var. *intermedia* postoji G, kod *J. macrocarpa* iz Trogira A, a kod ostalih individua C. Na poziciji 3141..3160 je uočeno ponavljanje motiva *m*, koji je ponovljen 2 puta kod *J. communis* i 2 individue *J. macrocarpa* sa Krita, 3 puta kod jedne individue *J. macrocarpa* sa Krita, i samo jednom kod *J. macrocarpa* iz Trogira i *J. deltooides*. Jedino kod *J. macrocarpa* iz Trogira je uočena insercija od 29 bp na poziciji 3193..3221 kao i delecija od 22 bp na poziciji 3278..3299. Na poziciji 3222 je uočena 1 bp insercija (I) kod svih individua osim kod *J. macrocarpa* sa Krita i *J. deltooides*. Na poziciji 3241..3258 su uočene insercije motiva *n* kod *J. macrocarpa* sa Krita, motiva *o* kod *J. macrocarpa* iz Trogira, i motiva *p* kod *J. deltooides*. Na poziciji 3258 uočena je insercija jedne baze (G) kod *J. communis* odnosno A kod *J. macrocarpa* sa Krita.

Dva ispitivana regiona (*rps16-trnK*<sup>(UUU)</sup> i *rpl32-trnL*<sup>(UAG)</sup>) nisu uspešno amplifikovani kod ispitivanih predstavnika *Juniperus*. Na osnovu pretrage mesta vezivanja prajmera za amplifikaciju ovih regiona u okviru referentnog genoma utvrđen je i razlog zbog kojeg nije došlo do amplifikacije. Naime, u slučaju regiona *rps16-trnK*<sup>(UUU)</sup>, pronađeno je mesto vezivanja prajmera *trnK*<sup>(UUU)</sup>x1 u okviru *trnK*<sup>(UUU)</sup> gena, i nisu uočene mutacije u mestu vezivanja ovog prajmera. Međutim, nije pronađeno mesto vezivanja *rpS16x2F2* prajmera u plastomu *J. virginiana*. Prema navodima (Guo et al., 2014), kod rodova *Juniperus*, *Taxus* i *Podocarpus* *rps16* gen postoji kao pseudogen usled prisustva *frameshift* mutacija, te je u navedenom pseudogenu najverovatnije došlo i do gubitka mesta vezivanja navedenog prajmera. U slučaju regiona *rpl32-trnL*<sup>(UAG)</sup>, pronađena su mesta vezivanja i *trnL*<sup>(UAG)</sup> i *rpl32-F* prajmera za amplifikaciju ovog regiona. U mestu vezivanja prajmera *trnL*<sup>(UAG)</sup> su uočene 2 mutacije: C → G i G → A (na pozicijama prajmera 6 i 13), a u mestu vezivanja prajmera *rpl32-F* tri mutacije A → T, T → A i T → C (na pozicijama 2, 5 i 17 prajmera). Međutim, usled re-aranžmana gena u hloroplastnom genomu *Juniperus*, ovi geni su udaljeni više od 30 kb baza, pošto je pozicija *trnL*<sup>(UAG)</sup> gena u genomu *J. virginiana* 30339..30418, a gena *rpl32* 65479..65745.

**Tabela 4.16** – Pregled sinapomorfnih molekularnih karaktera u matrici sastavljene kombinovanjem sekvenci sva 4 generisana hloroplastna regiona odabranih populacija vrsta roda *Juniperus* sa Balkanskog poluostrva

		OUT	IN	JC	JCC	JCI	JCS	JOX	JD	JM	JM_K	JM_T	JS+JM	JM_K+JD	Σ	
<i>trnC-pefN</i>	SB	2	7	1	-	-	-	1	2	-	1	-	-	-	5	
	Indel	1	3	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2	
	SSR	-	1 <sup>a)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	<i>pefN</i>	SB	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
		Indel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
		SSR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	<i>trnC-trnD</i>	<i>pefN-psbM</i>	SB	10	11	3	-	-	-	5	2	2	-	1	-	13
			Indel	2	7	1	-	-	-	-	1	2	3	1	-	8
			SSR	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>psbM</i>		SB	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
		Indel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
		SSR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>psbM-trnD</i>	SB	-	8	2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	3	
	Indel	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
	SSR	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
<i>psbA-trnI</i>	SB	2	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	
	Indel	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	SSR	-	1 <sup>b)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
<i>psbA-trnH</i>	<i>trnI</i>	SB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
		Indel	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
		SSR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
<i>trnI-trnH</i>	SB	4	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	
	Indel	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	3	
	SSR	-	1 <sup>c)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
<i>trnG-psaM</i>	SB	1	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
	Indel	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	
	SSR	-	2 <sup>d)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	
<i>trnG-trnS</i>	<i>psaM</i>	SB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
		Indel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
		SSR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
<i>psaM-trnS</i>	SB	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	
	Indel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	SSR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	

**SB** - broj supstitucija baza, **Indel** - broj indela, **SSR** - broj mikrosatelita, **OUT** - broj sinapomorfnih karaktera koji odvaja ingrupu od autgrupe, **IN** - ukupan broj varijabilnih pozicija u ingrupi, **JC** - *J. communis* s.l., **JCC** - *J. communis* var. *communis*, **JCI** - *J. communis* var. *intermedia*, **JCS** - *J. communis* var. *saxatilis*, **JOX** - *J. oxycedrus* s.l., **JD** - *J. deltoides*, **JM** - *J. macrocarpa*, **JM\_K** - *J. macrocarpa* Krit, **JM\_T** - *J. macrocarpa* Trogir; <sup>a,b,c</sup> - broj ponovaka mikrosatelita je karakterističan za određene taksone/populacije; <sup>d</sup> - broj ponovaka jednog mikrosatelita je karakterističan za *J. deltoides*; **Σ** - ukupan broj sinapomorfnih karaktera unutar ingrupe; zbog postojanja dve različite mutacije na istoj poziciji, ukupan broj sinapomorfnih karaktera je u pojedinim slučajevima veći od ukupnog broja detektovanih varijabilnih mesta

### 4.3.3. Filogenetska analiza

#### *Modeli evolucije sekvenciranih regiona*

Optimalni modeli evolucije, procenjeni na osnovu najnižih BIC vrednosti generisanih korišćenjem programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011), su utvrđeni za svaki region ponaosob, zatim za matricu sastavljenu od sva četiri regiona (redosledom *trnC-trnD*, *psbA-trnH*, *trnG-trnS*, *trnL-trnF*), kao i za matrice sastavljene od kodirajućih odnosno nekodirajućih sekvenci svih ispitivanih regiona.

Za pojedinačne regione, optimalni modeli evolucije su bili različiti (Tabela 4.17). Za region *trnC-trnD*, najniža BIC vrednost je dobijena za model T92+G (6933,3), ali su BIC vrednosti bile niske i za modele T92+G+I, T92, T92+I i GTR+G (6991,4). Za *psbA-trnH*, najniža BIC vrednost je dobijena za model TN93 (4055,2), ali su BIC vrednosti bile niske i za modele TN93+G, HKY+G+I, TN93+I i TN93+G+I, dok je BIC vrednost za model GTR+G bila 4400,5. Za *trnG-trnS*, najniža BIC vrednost je dobijena za model T92 (4790,1), ali su BIC vrednosti bile niske i za modele T92+G, T92+I, HKY i T92+G+I, dok je BIC vrednost za model GTR+G bila 4868,1. Za *trnL-trnF*, najniža BIC vrednost je dobijena za model HKY (1843,9), ali su BIC vrednosti bile niske i za modele TN93, HKY+G i HKY+I, dok je BIC vrednost za model GTR+G bila 1891,8. Optimalni modeli evolucije za matricu sastavljenu od sva četiri regiona kao i za matricu nekodirajućih regiona su bili isti. Najniže BIC vrednosti su dobijene za model T92+G+I (12305, 10582 respektivno), ali su BIC vrednosti bile niske i za modele T92+G, T92, T92+I, GTR+G+I, GTR+G, GTR i GTR+I za obe matrice. BIC vrednosti za model GTR+G su bile 12.368 i 10.639 za navedene matrice. Za matricu sastavljenu od kodirajućih regiona, najniža BIC vrednost je dobijena za model HKY+I (3173,5), ali su BIC vrednosti bile niske i za druge modele kao što su JC, T92, JC+G, K2 i td, dok je BIC vrednost za model GTR+G bila 3288,3.

Za testiranje heterogenosti stopa mutacija korišćene su tri arbitrarno odabrane sekvence matriksa sastavljenog od svih ispitivanih hloroplastnih regiona, *J. communis* (*J. communis* var. *saxatilis* – Biokovo2), *J. deltooides* (Benkovac2), *J. sabina* (Resava5). Korišćen je Tajima's relative

**Tabela 4.17.** BIC vrednosti modela evolucije testiranih za četiri kloroplastna regiona, njihove matrice, nekodirajućih i kodirajućih i kodirajućih regiona matrice

<i>trnC-trnD</i>		<i>psbA-trnH</i>		<i>trnG-trnS</i>		<i>trnL-trnF</i>		Matrica		Nekodirajući		Kodirajući	
Model	BIC	Model	BIC	Model	BIC	Model	BIC	Model	BIC	Model	BIC	Model	BIC
T92+G	6933.3	TN93	4055.2	T92	4790.1	HKY	1843.9	T92+G+I	12305	T92+G+I	10582	HKY+I	3173.5
T92+G+I	6939.3	TN93+G	4059.5	T92+G	4801.5	TN93	1853.4	T92+G	12306	T92+G	10582	JC	3219.3
T92	6946.6	HKY+G+I	4060.3	T92+I	4801.5	HKY+G	1853.4	T92	12335	T92	10608	T92	3225.6
T92+I	6956.7	TN93+I	4066.1	HKY	4809.6	HKY+I	1853.4	T92+I	12346	T92+I	10620	JC+G	3226.9
GTR+G	6991.4	TN93+G+I	4070.4	T92+G+I	4812.9	JC	1861.5	GTR+G+I	12367	GTR+G	10639	K2	3229.7
GTR+G+I	7002.3	T92	4332.0	TN93	4820.5	T92+G	1862.5	GTR+G	12368	GTR+G+I	10651	JC+I	3229.7
GTR	7004.3	T92+G	4337.6	HKY+Y	4820.9	HKY+G+I	1862.9	GTR	12397	GTR	10665	T92+G	3233.1
GTR+I	7015.1	T92+I	4342.4	HKY+G	4820.9	TN93+G	1862.9	GTR+I	12409	GTR+I	10677	T92+I	3235.9
JC+G	7259.5	T92+G+I	4347.0	TN93+I	4831.8	TN93+I	1862.9	JC+G	12872	JC+G	11178	JC+G+I	3236.3
JC+G+I	7267.6	JC	4378.4	TN93+G	4831.8	JC+I	1863.4	JC+G+I	12872	JC+G+I	11179	K2+G	3237.3
JC	7272.8	K2	4382.4	HKY+G+I	4832.3	T92	1866.7	K2+G+I	12898	JC	11205	K2+I	3240.1
JC+I	7283.8	JC+G	4383.6	TN93+G+I	4843.2	T92+G+I	1867.6	JC	12901	K2+G+I	11205	T92+G+I	3242.5
K2+G	2787.1	K2+G	4387.7	GTR	4856.7	JC+G	1867.8	K2+G	12901	K2+G	11205	K2+G+I	3246.8
K2+G+I	7292.3	JC+I	4389.3	GTR+G	4868.1	TN93+G+I	1872.4	JC+I	12913	K2+I	11209	GTR	3280.5
K2	7300.2	K2+I	4392.5	GTR+I	4868.1	JC+G+I	1876.0	K2	12931	JC+I	112016	GTR+G	3288.3
K2+I	7310.1	JC+G+I	4392.8	GTR+G+I	4879.4	T92+I	1876.1	K2+I	12943	K2	11232	GTR+I	3290.7
TN93+G+I	29668	GTR	4394.9	JC	4927.9	GTR	1885.4	TN93+G+I	194193	TN93+I	33369	GTR+G+I	3298.7
HKY+G+I	52225	K2+G+I	4396.9	K2	4939.2	GTR+G	1891.8	HKY+G+I	262508	TN93+G	192463	HKY+G	48371
TN93+I	52417	GTR+G	4400.5	JC+I	4939.3	K2+G	1894.2	TN93+G	284922	HKY+G+I	192654	HKY+G+I	48382
TN93+G	74750	GTR+I	4405.6	JC+G	4939.3	GTR+I	1894.5	HKY+G	330476	TN93+G+I	192665	TN93+G+I	48392
TN93	74778	GTR+G+I	4411.3	K2	4950.6	K2	1896.0	HKY	353269	HKY	215255	TN93+I	48393
HKY+G	97517	HKY	26825	K2+G	4950.6	K2+G+I	1896.9	HKY+I	353280	TN93	215267	HKY	71129
HKY	97543	HKY+G	26830	JC+G+I	4950.6	GTR+G+I	1901.2	TN93	398814	HKY+I	215267	TN93	71140
HKY+I	97555	HKY+I	26836	K2+G+I	4962.0	K2+I	1905.5	HKY+G	398824	HKY+G	260779	TN93+G	71150

Model sa najmanjom BIC vrednošću se smatra najadekvatnijim modelom za evolucije datog regiona. **GTR** - General Time Reversible, **HKY** - Hasegawa-Kishino-Yano, **TN93** - Tamura-Nei, **T92** - Tamura 3-parametarski, **K2** - Kimura 2-parametarski, **JC** - Jukes-Cantor; **+G** - gamma korekcija koja uzima u obzir heterogenost stopa mutacija nukleotida u datoj sekvenci; **+I** - korekcija koja uzima u obzir invarijabilna mesta; analiza je obuhvatila različiti broj individua po regionu, matrici, kodirajućim i nekodirajućim sekvencama (*cf.* Tabela 4.13). Analiza urađena u MEGA5 (Tamura et al., 2011)

*rate* test (Tadžimin test relativnih stopa mutacija) koji je dao vrednost  $\chi^2=0,73$  ( $p=0,39377$ ;  $df=1$ ). Kako je  $p$  vrednost bila veća od 0,05, nije moguće odbaciti nultu hipotezu da ne postoji razlika u brzini evolucije između tri izabrane sekvence (Tajima, 1993; Tamura et al., 2011). Međutim, kako sve 3 sekvence sadrže i kodirajuće i nekodirajuće regione, za koje je poznato da evoluiraju različitim brzinama, testirane su i stope mutacija odvojeno samo za kodirajuće odnosno nekodirajuće regione matrice. U oba ova slučaja je utvrđeno da je stopa mutacija između sekvenci ista.



*Filogenetska stabla*

Za izradu ML (*maximum likelihood*) filogenetskih stabala za pojedinačne regione su korišćeni optimalni modeli evolucije sekvenci (Tabela 4.15). Za ožiljavanje svih stabala, osim za *trnL-trnF* region, su korišćene generisane odgovarajuće sekvence autgrupe - *J. sabina*.

Za izradu ML filogenetskog stabla na osnovu najdužeg ispitivanog regiona, *trnC*<sup>(GCA)</sup>-*trnD*<sup>(GUC)</sup>, matrice sastavljene od sva 4 hloroplastna regiona kao i nekodirajućih regiona matrice je odabran GTR+G model evolucije sekvenci. Za konstrukciju stabla na osnovu kodirajućih regiona matrice korišćen HKY+I model, dok su za ostale ispitivane regione korišćeni sledeći modeli: TN93 za *psbA-trnH*<sup>(GUG)</sup>, T92 za *trnG*<sup>(UUC)</sup>-*trnS*<sup>(GCU)</sup> i HKY za *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup>.

*ML stablo konstruisano na osnovu trnC<sup>(GCA)</sup>-trnD<sup>(GUC)</sup> regiona*

ML stablo konstruisano korišćenjem GTR+G modela evolucije ovog regiona, čija je poravnata dužina kod 66 individua predstavnika sekcije *Juniperus* i 3 individue autgrupe *J. sabina* bila 1684 bp, pokazuje da je sekcija *Juniperus* monofiletskog porekla (BS 100%) (Slika 4.3.1). Uočene su dve visokopodržane klade. **Klada I** (BS 100%) obuhvata sve individue *J. communis*, međutim, njihovi odnosi nisu razjašnjeni iako se uočavaju pojedine subklade koje su umereno podržane i koje obuhvataju manji broj individua. **Klada II** (BS 72%) obuhvata sve individue *J. deltoides* i *J. macrocarpa*, koje su grupisane u dve subklade. *Subklada IIa* (BS 100%) obuhvata sve individue *J. deltoides*, a *subklada IIb* (BS 93%) sve individue *J. macrocarpa*. Odnosi unutar subklade *IIa* nisu razjašnjeni, dok *J. macrocarpa (IIb)* pokazuje diferencijaciju populacija iz Trogira i sa Krita, jer se *subklada IIb* dalje deli na dve visoko podržane subklade, *IIb1* (BS 91%), koja obuhvata individue iz populacije *J. macrocarpa* iz Trogira, i *IIb2* (BS 100%), koja obuhvata individue iz populacije *J. macrocarpa* sa Krita.

*ML stablo konstruisano na osnovu psbA-trnH<sup>(GUG)</sup> regiona*

ML stablo konstruisano korišćenjem TN93 modela evolucije ovog regiona, čija je poravnata dužina kod 113 individua predstavnika sekcije *Juniperus* i 5 individua autgrupe *J. sabina* bila 570 bp, takođe pokazuje da je sekcija *Juniperus* monofiletskog porekla (BS 89%)

(Slika 4.3.2). Međutim, imajući u vidu malu filogenetsku informativnost ovog regiona (10 pozicija sa supstitucijama baza od kojih je 8 sinapomorfno za ingrupu, Tabela 4.16) nije iznenađujuće da su odnosi u okviru ingrupe u najvećoj meri ostali nerazjašnjeni. Samo je subklada koja obuhvata sve individue *J. deltooides* osim jedne (Kopaonik4) umereno podržana (BS 65%).

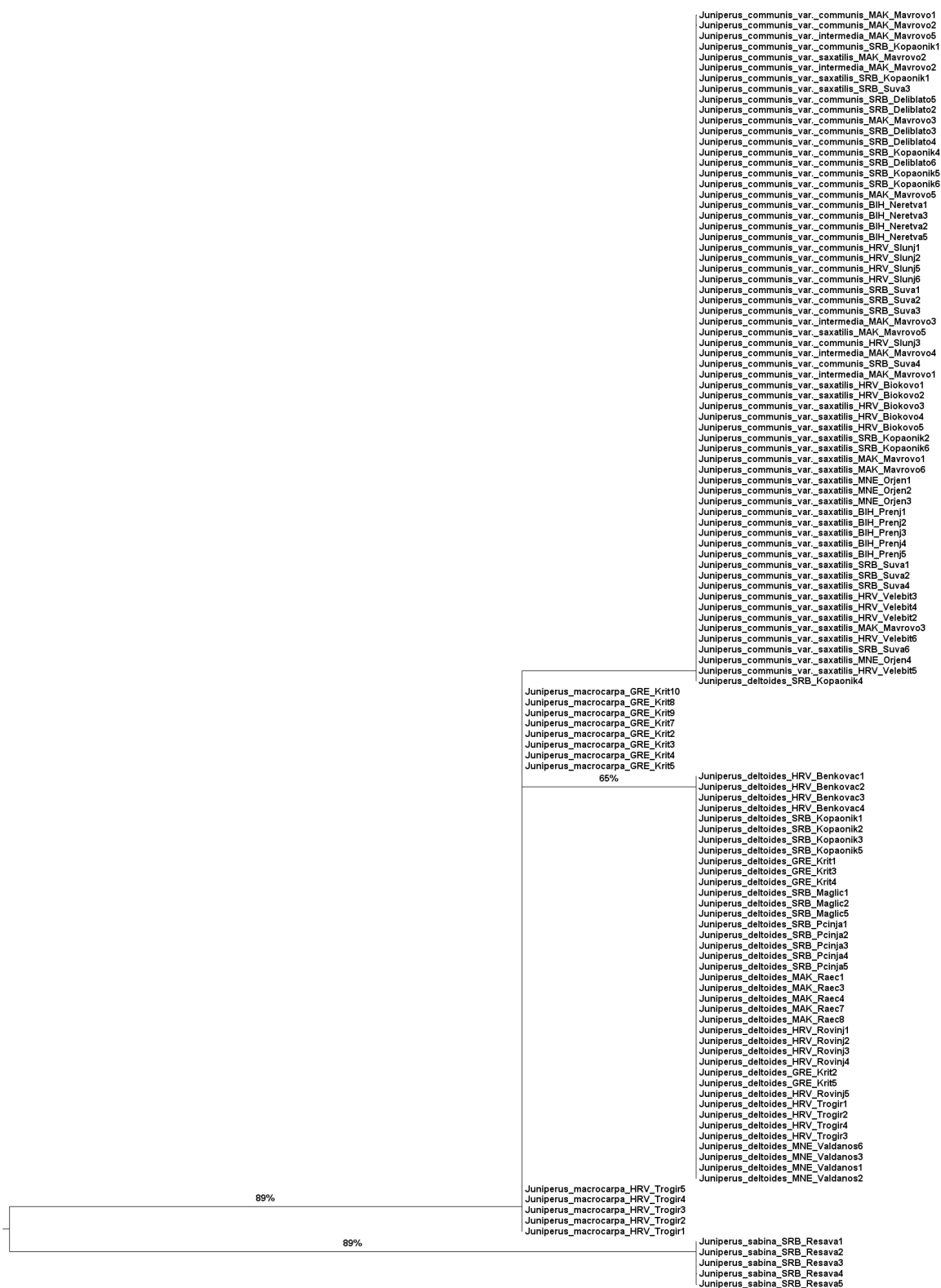
*ML stablo konstruisano na osnovu trnG<sup>(UUC)</sup>-trnS<sup>(GCU)</sup> regiona*

ML stablo konstruisano korišćenjem T92 modela evolucije ovog regiona, čija je poravnata dužina kod 105 individua predstavnika sekcije *Juniperus* i 5 individua autgrupe *J. sabina* bila 804 bp, nije ožiljeno kao i ostala stabla (*midpoint* ožiljavanje) već sa granom koju čini *J. sabina*, zbog toga što u okviru ovog regiona postoje mutacije koje su deljene između autgrupe i ingrupe (Tabela 4.16), te se prilikom *midpoint* ožiljavanja autgrupa javlja u ingrupi. Statistička podrška za ingrupu je bila umerena (BS 68%) (Slika 4.3.3). U ovom stablu, individue *J. communis* su grupisane zajedno i ta grupa, koja je umereno do visoko podržana (BS 79%), sadrži i umereno podržanu grupu (BS 64%) koja obuhvata jedinke iz različitih populacija sva tri varijeteta *J. communis* uglavnom sa istočnog dela Balkanskog poluostrva. Individue *J. deltooides* kao i dve individue *J. macrocarpa* sa Krita (Krit3, Krit6) su grupisane zajedno, i ta grupa je takođe umereno podržana (BS 69%). U ovom stablu, individue *J. macrocarpa* nisu grupisane zajedno. Nerazrešeni odnosi u ovom stablu su posledica male filogenetske informativnosti ovog regiona (7 pozicija sa supstitucijama baza od kojih je 1 sinapomorfna za ingrupu, a 2 su *singleton* mutacije, Tabela 4.16).

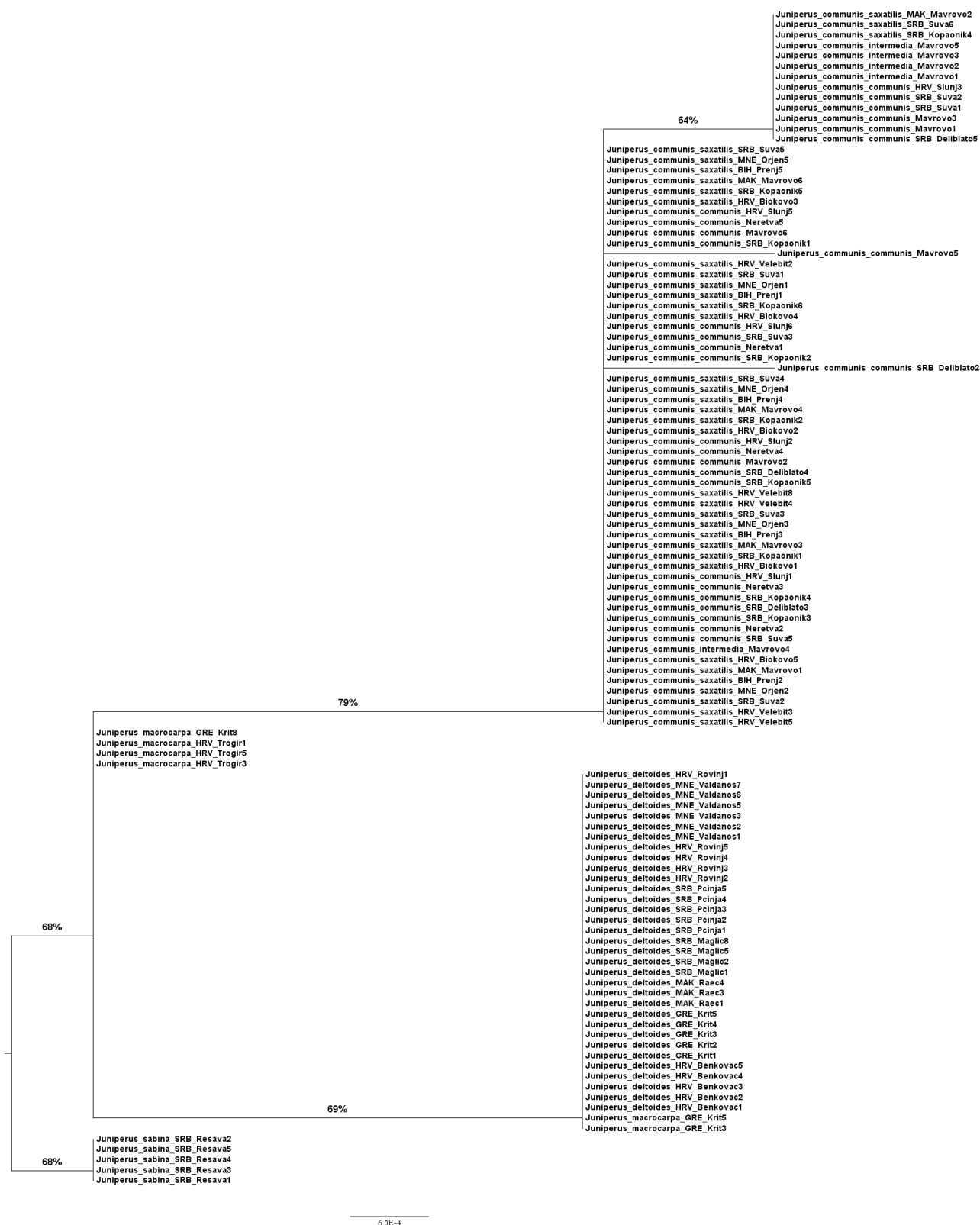
*ML stablo konstruisano na osnovu trnL<sup>(UAA)</sup>-trnF<sup>(GAA)</sup> regiona*

ML stablo konstruisano korišćenjem HKY modela evolucije ovog regiona, čija je poravnata dužina kod 46 individua predstavnika sekcije *Juniperus* bila 344 bp, nije ožiljeno sa autgrupom pošto nisu bile dostupne sekvence ovog regiona kod *J. sabina* (Slika 4.3.4). Primenjeno je ožiljavanje stabla na sredini (*midpoint root*). Imajući u vidu izuzetno malu filogenetsku informativnost ovog regiona (svega 3 pozicije sa supstitucijama baza, Tabela 4.16), nije iznenađujuće što se na ovom stablu uočava samo slabo podržano grupisanje *J. deltooides* i *J. macrocarpa* (BS 62%). Međutim, uočena je i slabo podržana grupa (BS 63%) koja obuhvata tri individue *J. communis* var. *intermedia* sa lokaliteta Korab (Mavrovo).

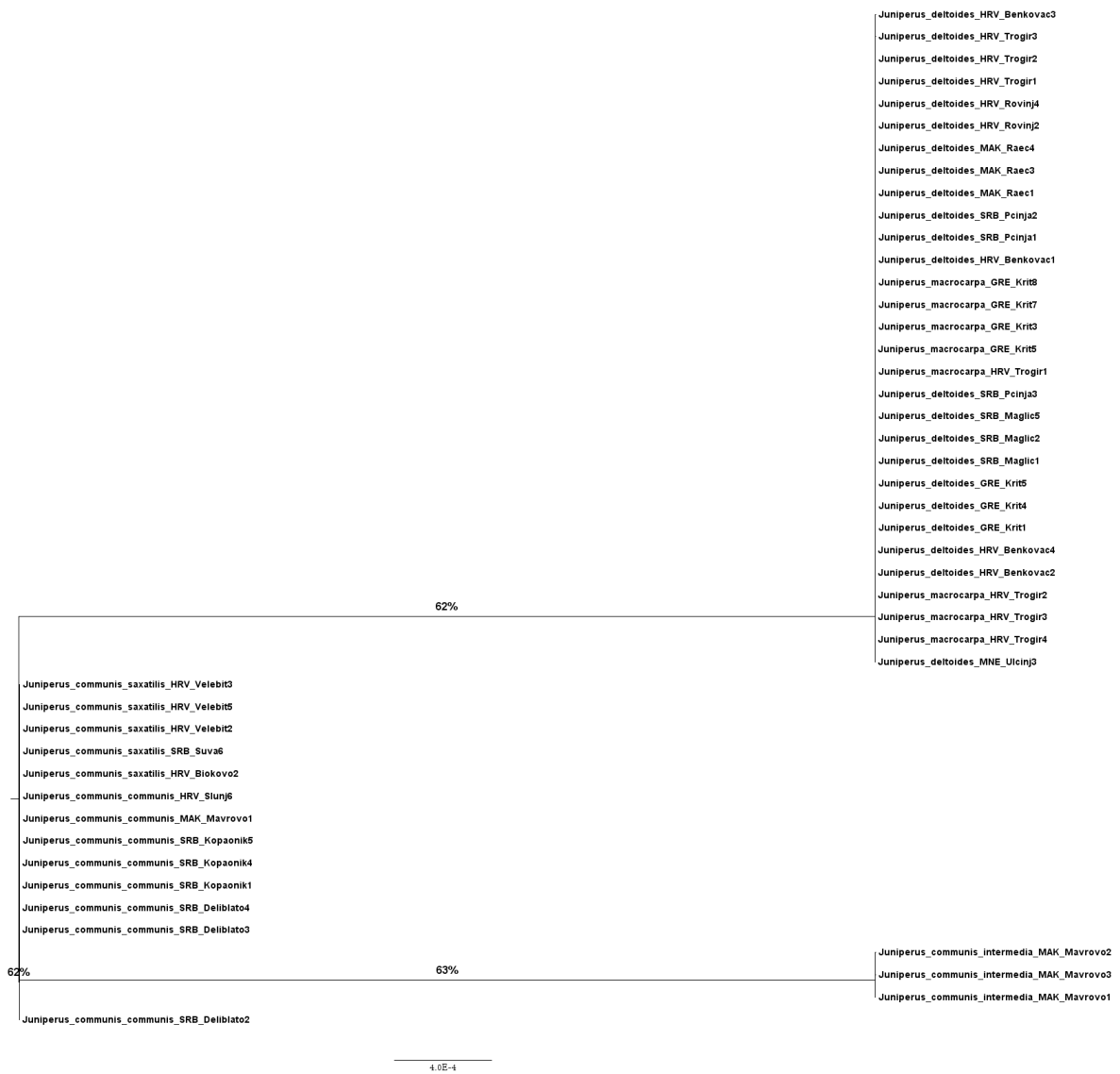




**Slika 4.3.2.** ML stablo konstruisano korišćenjem TN93 modela evolucije *psbA-trnH*<sup>(GUG)</sup> regiona, čija je poravnata dužina kod 113 individua predstavnika sekcije *Juniperus* i 5 individua autgrupe *J. sabina* 570bp. Prikazane su samo BS vrednost i  $\geq 60\%$



Slika 4.3.3. ML stablo konstruisano korišćenjem T92 modela evolucije  $trnG^{(UUC)}$ - $trnS^{(GCU)}$ , čija je poravnata dužina kod 105 individua predstavnika sekcije *Juniperus* i 5 individua autgrupe *J. sabina* 804 bp. Prikazana je samo BS vrednost  $\geq 60\%$ .



**Slika 4.3.4.** ML stablo konstruisano korišćenjem HKY modela evolucije  $trnL^{(UAA)}-trnT^{(GAA)}$  regiona pastidnog genoma, čija je poravnata dužina kod 46 individua predstavnika sekcije *Juniperus* 344 bp. Prikazane su samo BS vrednosti  $\geq 60\%$ .

*ML stablo konstruisano na osnovu matrice sastavljene od sva četiri hloroplastna regiona*

ML stablo konstruisano korišćenjem GTR+G modela evolucije ovog regiona, čija je poravnata dužina kod 75 individua predstavnika sekcije *Juniperus* i tri individue autgrupe *J. sabina* bila 3400 bp, pokazuje da je sekcija *Juniperus* monofiletskog porekla (BS 100%) (Slika 4.3.5). Dobijeno stablo pokazuje topološku sličnost sa ML stablom konstruisanim na osnovu *trnC<sup>(GCA)</sup>-trnD<sup>(GUC)</sup>* regiona. Naime, dobijene su dve visoko podržane klade. **Klada I** (BS 100%) obuhvata sve individue *J. communis*, dok **Klada II** (BS 78%) obuhvata sve individue *J. deltooides* i *J. macrocarpa*, koje čine dve subklade, i to *J. deltooides* čini *subkladu IIa* (BS 100%), a *J. macrocarpa* *subkladu IIb* (BS 46%).

Kao i u slučaju ML stabla konstruisanog na osnovu *trnC<sup>(GCA)</sup>-trnD<sup>(GUC)</sup>* regiona, odnosi u okviru **klade I** nisu razjašnjeni, međutim, može se uočiti trend grupisanja individua *J. communis* var. *communis* kao i jedinki *J. communis* var. *saxatilis* i *J. communis* var. *intermedia*. Npr., jedinke *J. communis* var. *intermedia* se sa nekoliko jedinki *J. communis* var. *communis* (Suva1, Suva2, Mavrovo3,) grupišu zajedno i zauzimaju terminalni položaj u **kladi I** (BS 53%), jedinke *J. communis* var. *saxatilis* uglavnom zauzimaju središnji položaj u ovoj kladi, dok jedinke *J. communis* var. *communis* uglavnom zauzimaju bazalni položaj u okviru **klade I**.

Odnosi unutar *subklade IIa* (*J. deltooides*) takođe ostaju razjašnjeni, dok se *subklada IIb* dalje deli na dve nove subklade, *IIB1* (BS 59%) koju čine jedinke sa Krita i *IIB2* (BS 79%) koju čine jedinke iz Trogira, kao i u slučaju ML stabla dobijenog na osnovu *trnC-trnD* regiona.

*ML stablo konstruisano na osnovu matrice sastavljene od nekodirajućih regiona*

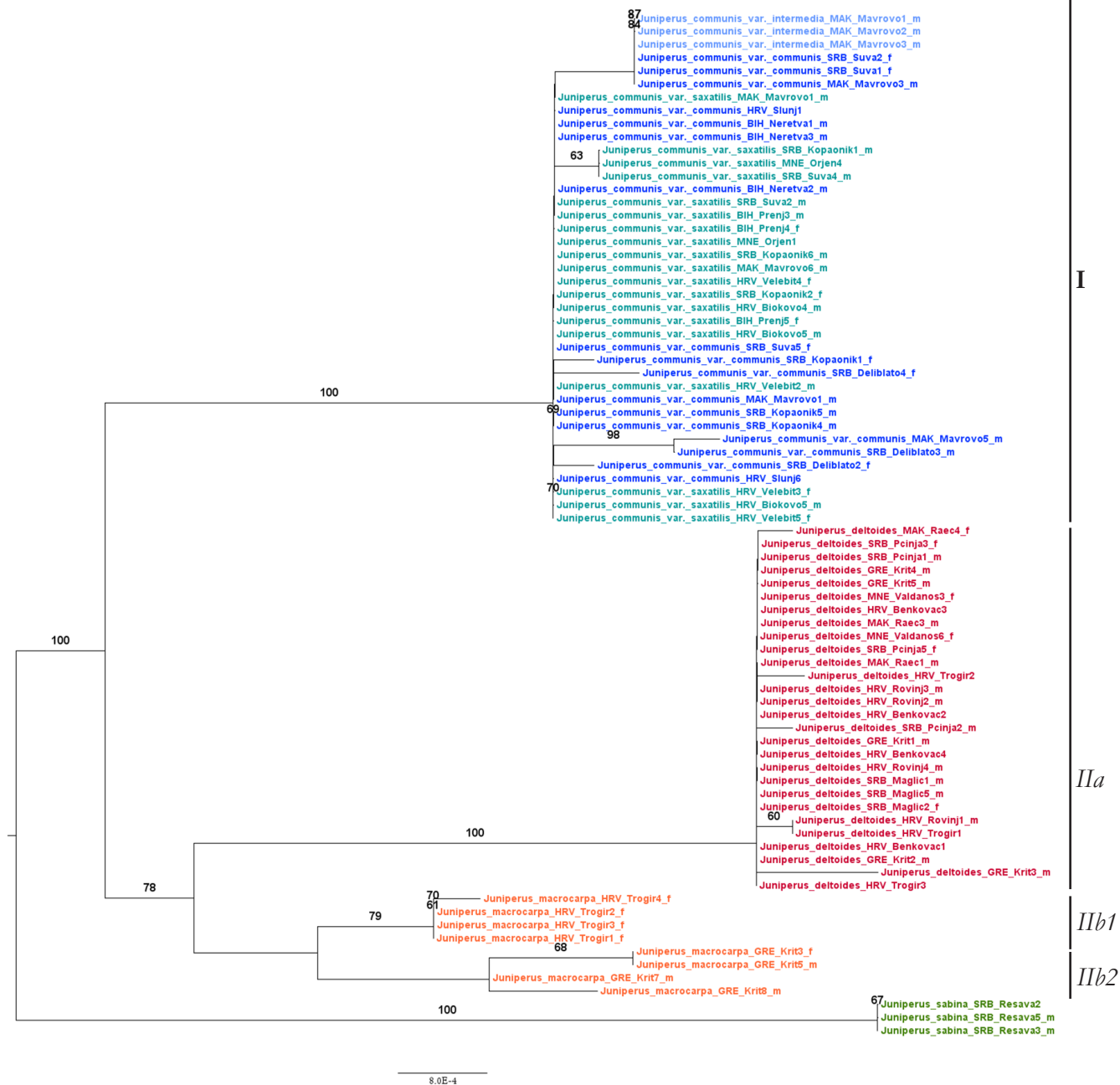
ML stablo konstruisano korišćenjem GTR+G modela evolucije ovog regiona, čija je poravnata dužina kod 75 individua predstavnika sekcije *Juniperus* i tri individue autgrupe *J. sabina* bila 2862 bp, takođe pokazuje da je sekcija *Juniperus* monofiletskog porekla (BS 100%), i pokazuje topološku sličnost sa ML stablima konstruisanim na osnovu *trnC<sup>(GCA)</sup>-trnD<sup>(GUC)</sup>* regiona i matrice sastavljene od svih ispitivanih hloroplastnih regiona. Međutim, statistička podrška za pojedine klade je niža u ovom stablu (Slika 4.3.6). I u ovim stablu se uočavaju slabo podržani trendovi grupisanja taksona u okviru **klade I**.

---

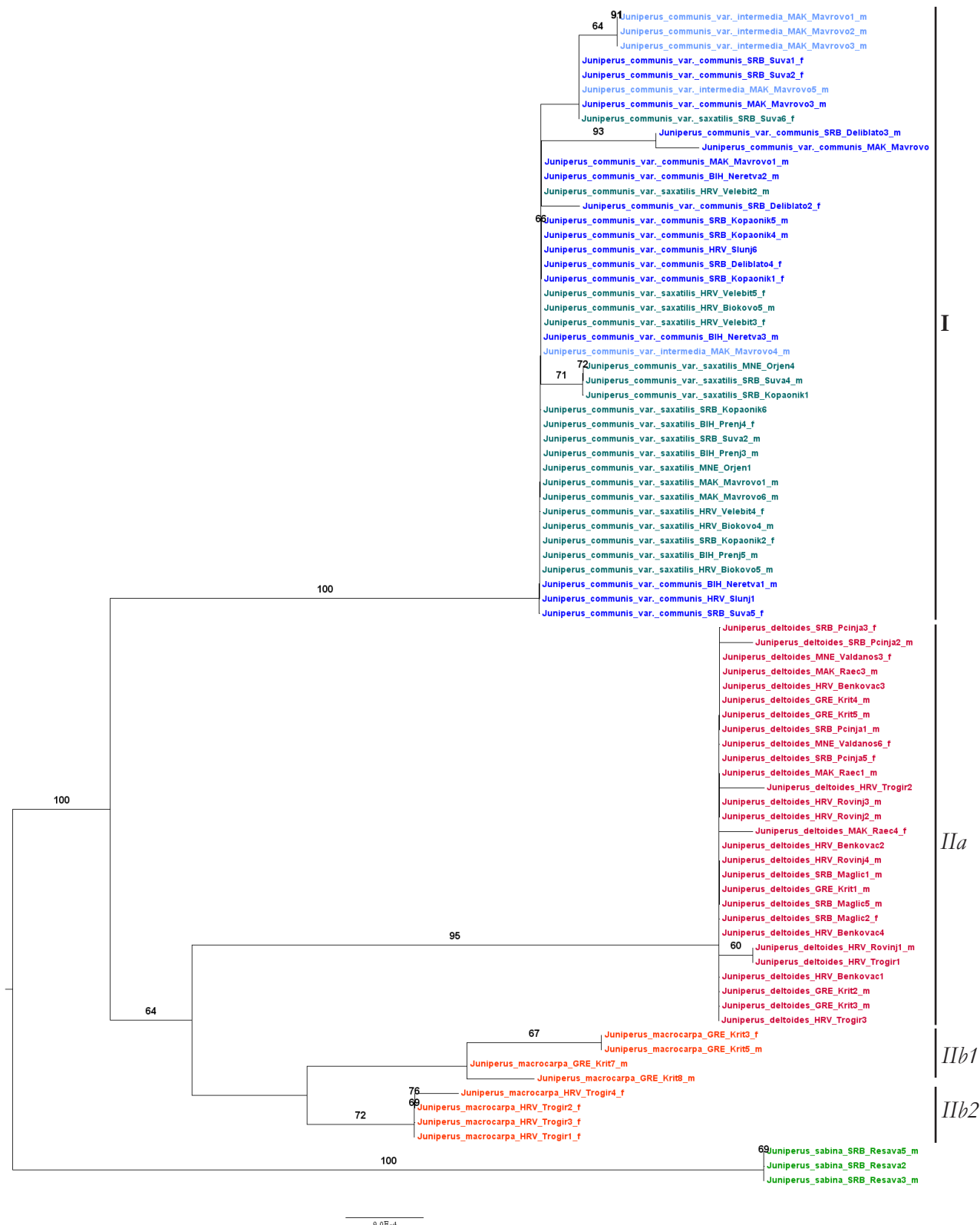
*ML stablo konstruisano na osnovu matrice sastavljene od kodirajućih regiona*

ML stablo konstruisano korišćenjem HKY+I modela evolucije ove matrice, čija je poravnata dužina kod 75 individua predstavnika sekcije *Juniperus* i tri individue autgrupe *J. sabina* bila 526 bp, je neinformativno pošto se radi o izuzetno konzervativnim regionima u kojima je detektovano 6 singleton mutacija i jedna *parsimony informative site* mutacija koja odvaja sekciju *Sabina* od sekcije *Juniperus*. (Tabela 4.16, Slika 4.3.7).

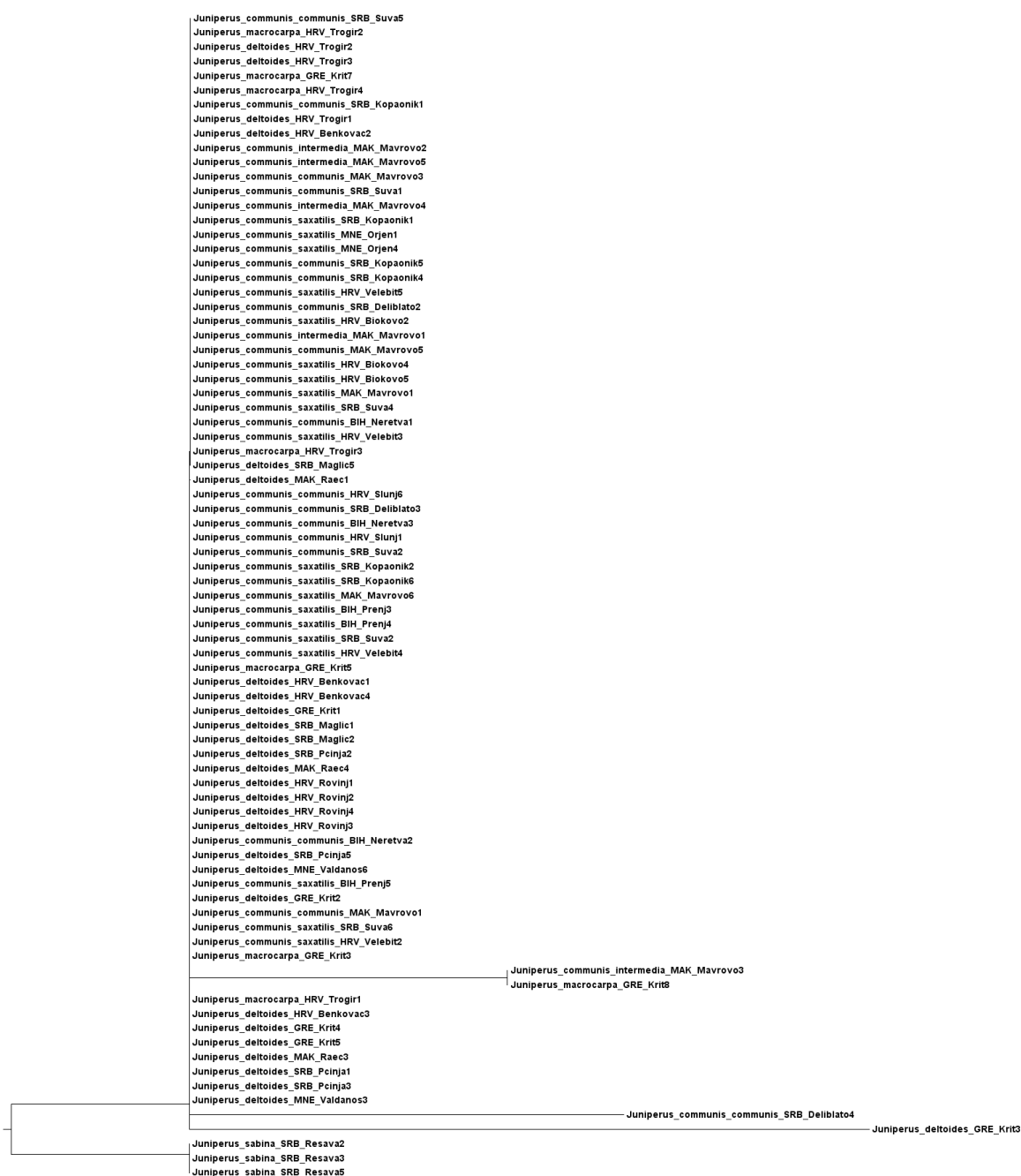




**Slika 4.3.5.** ML stablo konstruisano korišćenjem GTR+G modela evolucije  $trnC^{(GCA)}$ - $trnD^{(GUC)}$ ,  $psbA-trnH^{(GUG)}$ ,  $trnG^{(UUC)-trnS^{(GCU)}}$ ,  $trnL^{(UAA)-trnF^{(GAA)}}$  regiona pastidnog genoma, čija je poravnata dužina kod 75 individua predstavnika sekcije *Juniperus* i tri individue autgrupe *J. sabina* 3400 bp. Prikazane su samo BS vrednosti  $\geq 60\%$ .



Slika 4.3.6. ML stablo konstruisano korišćenjem GTR+G modela evolucije nekodirajućih sekvenci *trnC*<sup>(GCA)</sup>-*trnD*<sup>(GUC)</sup>, *psbA-trnH*<sup>(GUG)</sup>, *trnG*<sup>(UUC)</sup>-*trnS*<sup>(GCU)</sup>, *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> regiona pastidnog genoma, čija je poravnata dužina kod 75 individua predstavnika sekcije *Juniperus* i tri individue autgrupe *J. sabina* 2862 bp. Prikazane su samo BS vrednosti  $\geq 60\%$ .



6.0E-4

**Slika 4.3.6.** ML stablo konstruisano korišćenjem HKY+I modela evolucije kodirajućih sekvenci  $trnC^{(GCA)}-trnD^{(GUC)}$ ,  $psbA-trnH^{(GUG)}$ ,  $trnG^{(UUC)}-trnS^{(GCU)}$ ,  $trnL^{(UAA)}-trnF^{(GAA)}$  regiona pastidnog genoma, čija je poravnata dužina kod 75 individua predstavnika sekcije *Juniperus* i tri individue autgrupe *J. sabina* bila 526 bp. Prikazane su samo BS vrednosti  $\geq 60\%$ .

Ilustracija: *Juniperus communis* L., Krüssmann, G. (1972). Handbuch der Nadelgehölze (Berlin: Paul Parey), pp. 137.



5

DISKUSIJA

## 5.1 *n*-Alkani

### 5.1.1 *Juniperus communis* var. *communis*

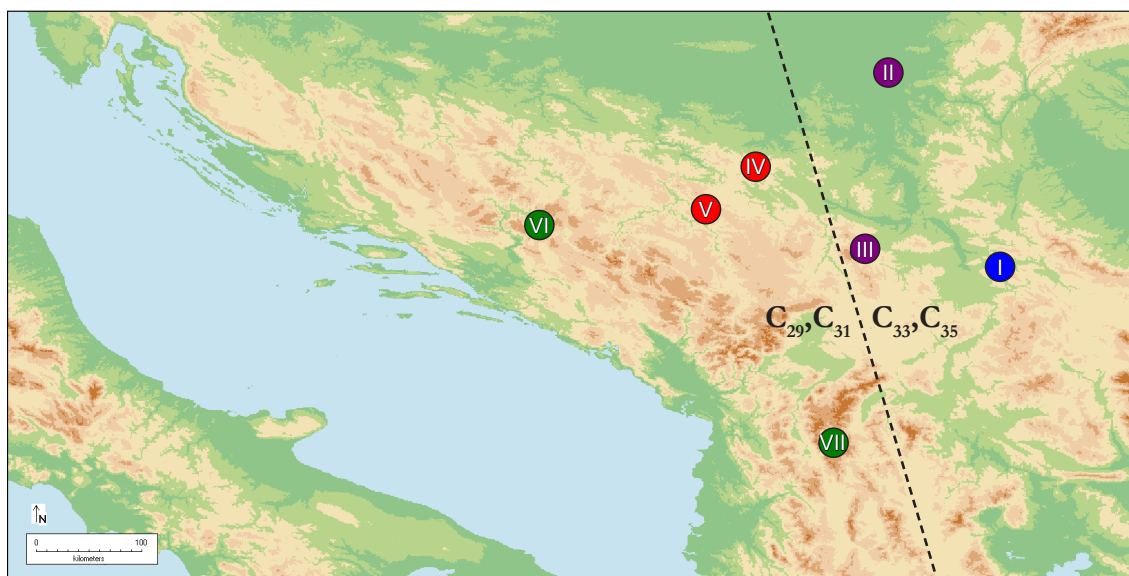
U svim uzorcima je dominirao tritriakontan, dok su druga dva uvek bila ista ( $C_{31}$ ,  $C_{35}$ ), međutim, zanimljivo je da su u dve populacije detektovani i alkani kraći od 21 C atoma. (Tabela 4.2, Slika 4.1.2). Prosečna dužina lanca ( $N$ ) je znatno varirala od 30,2 do 32,8, a sa njom i disperzija oko nje ( $d$ ).

Univarijantna analiza je pokazala diskriminaciju svih sedam populacija na osnovu sastava alkana, osim hentriakontana. Rezultati univarijante analize su pokazali da se sve populacije razlikuju u odnosu na relativni udeo tritriakontana, dok se na osnovu ostalih komponentni pojedini parovi populacija sličniji u odnosu na druge (Tabela 4.2). Multivarijantna analiza je pokazala odvajanje populacija u odnosu na geografsko poreklo – populacije iz Deliblatske peščare i sa centralnog/istočnog dela Balkanskog poluostrva (Kopaonik, Suva planina) su se grupisale u jednu kladu, dok su se populacije zapadno od Kopaonika (Divčibare, Zlatibor, Mavrovo, Neretva) grupisale u drugu kladu (Slika 4.1.2). Diskriminantna analiza je pokazala odvajanje svih jedinki u četiri grupe: najudaljenija grupa obuhvata populacije sa najzapadnijih lokaliteta (Mavrovo, Neretva), potom odvajanje populacija Kopaonik i Deliblato na jednu stranu, Suva planina na treću i četvrtu grupu koju su činile Zlatibor i Divčibare (Slika 5.1).

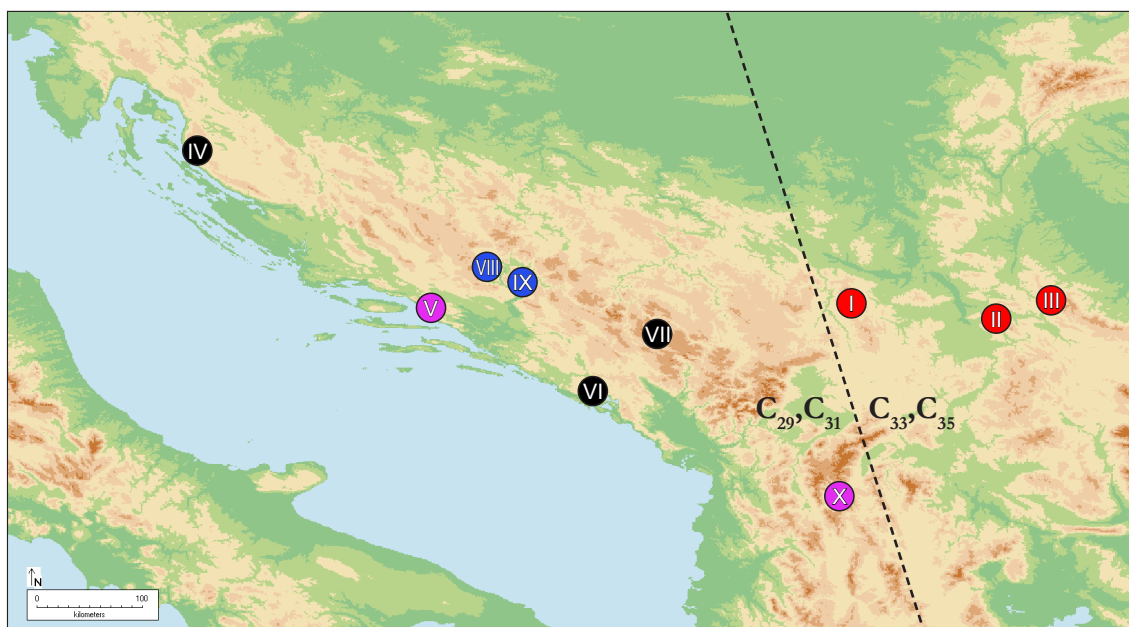
Bez obzira na relativno mali broj populacija (pogotovu kada se uzme areal ovog taksona), profili alkana izolovanih iz epikutikularnih voskova kod *J. communis* var. *communis* su pokazali tendenciju odvajanja u odnosu na geografsko rasprostranjenje. S druge strane, zanimljivo je da je kod svih populacija disperzija oko srednje vrednosti ( $d$ ) bila izuzetno visoka (2,5 - 9,3). Za tri kontinentalne populacije,  $d$  je bila najmanja (2,5 - 3,4).

Dodd i Poveda (2003) su, proučavajući sastav alkana kod *J. communis* var. *saxatilis* sa Pirineja, uočili složen odnos  $N$  vrednosti i nadmorske visine (gde su populacije na najmanjim i najvećim nadmorskim visinama imale istu prosečnu dužinu lanca). S druge strane, pokazali su da je disperzija oko  $N$  ( $d$ ) rasla sa nadmorskom visinom. To nije bio slučaj sa našim setom podataka. Tako, najveću prosečnu dužinu lanca pokazuju jedinice iz populacije sa Deliblatske peščare koje su rasle ujedno i na najmanjoj nadmorskoj visini, a nešto manju vrednost su

imale jedinke iz populacije sa Kopaonika, koje su rasle na oko 800 m.n.v. Iako populacija sa Kopaonika raste na gotovo istoj nadmorskoj visini kao populacije na Divčibarama i Zlatiboru, po profilu alkana, prosečnoj dužini lanca i disperziji oko nje, ove tri populacije se prilično razlikuju.



**Slika 5.1.** Geografska distribucija populacija i dominantnih alkana epikutikularnih voskova *J. communis* var. *communis* sa Balkanskog poluostrva; **I** - Suva planina, **II** - Deliblato, **III** - Kopaonik, **IV** - Divčibare, **V** - Zlatibor, **VI** - Neretva, **VII** - Mavrovo. Različitim bojama su označene grupe prema DA (cf. Slika 4.1.2)



**Slika 5.2.** Geografska distribucija populacija i dominantnih alkana epikutikularnih voskova *J. communis* var. *saxatilis* sa Balkanskog poluostrva **I** - Kopaonik, **II** - Suva planina, **III** - Stara planina, **IV** - Velebit, **V** - Biokovo, **VI** - Orjen, **VII** - Durmitor, **VIII** - Čvrsnica, **IX** - Prenj, **X** - Mavrovo. Različitim bojama su označene grupe prema DA (cf. Slika 4.1.10)

### 5.1.2 *Juniperus communis* var. *saxatilis*

U kutikularnim voskovima *J. communis* var. *saxatilis* su bili zastupljeni alkani dugi od 22 do 35 ugljenikovih atoma, gde su alkani dugog niza dominirali (>93 %). U svim uzorcima je dominantan alkan bio tritriakontan, dok su u zavisnosti od lokaliteta druga dva dominantna alkana bili hentriakontan i pentatriakontan (kontinentalne populacije), odnosno nonakozan i hentriakontan (submediteranske populacije). Izolovani alkani su pokazali kvantitativne razlike između istraživanih populacija.

Relativne količine alkana iz svih individua su korišćene za računanje prosečne dužine lanca ( $N$ ) i disperzije oko nje ( $d$ ). Iako je  $N$  varirala od 30,2 do 32,6, bilo je moguće grupisati populacije u odnosu na nju: **I** ( $N=32,1-32,6$ ) – kontinentalne populacije, **II** ( $N=31,1-31,5$ ) – submediteranske populacije koje su rasle na relativno velikom nagibu i **III** ( $N=30,2-30,8$ ) – submediteranske populacije koje su rasle na blagom nagibu. Dakle, razlikuju se kontinentalne populacije od submediteranskih, ali i submediteranske su se podelile u zavisnosti od nagiba terena. *Pirsonov* koeficijent korelacije za kontinentalne ( $R=0,42$   $p=3,26 \times 10^{-5}$ ) i submediteranske populacije ( $R=0,51$   $p=2,34 \times 10^{-10}$ ) je, iako statistički značajan, bio relativno umeren, što govori da odnos ova dva parametra nešto komplikovaniji (odnosno nije linearan). Samo jako slaba korelacija između nagiba terena i prosečne dužine lanca je pronađena na celom setu podataka ( $R=0,29$   $p=10^{-5}$ ). Pored srednje dužine lanca, disperzija oko nje ( $d$ ) je bila najmanja kod kontinentalnih populacija (1,4 - 2,0), a znatno viša kod submediteranskih (2,8 – 6,2).

Kod ispitivanih populacija *J. communis* var. *saxatilis* sa zapada Evrope su dobijeni drugačiji rezultati (Poveda et al., 2002).  $N$  vrednost je izuzeno malo varirala (32,9-33,0), dok je  $d$  bila između 1,2 i 1,4. Na osnovu sastava alkana, ispitane kontinentalne populacije sa Balkana su najslabije podacima do kojih su došli Poveda i saradnici. Nešto niže  $N$  vrednosti i malo veći opseg variranja  $d$  može se objasniti i nešto klimatski surovijim uslovima kojima su izložene populacije na Alpima i Pirinejima u odnosu na populacije na Balkanskom poluostrvu.

Multivarijantne statističke metode su pokazale grupisanje kontinentalnih populacija na jednu stranu, i submediteranskih na drugu, a u zavisnosti od količine četiri alkana ( $C_{29}$ ,  $C_{31}$ ,  $C_{33}$ ,  $C_{35}$ ). Dendrogram klaster analize je pokazao tranziciju od pravih kontinentalnih ka



pravim primorskim (submediteranskim) populacijama (Slika 5.2), odnosno od veće ka manjoj prosečnoj dužini lanca.

Regresiona analiza je pokazala da dvanaest od devetnaest bioklimatskih parametara imaju statistički značajnu korelaciju sa relativnim udelom alkana kao i  $N$  i  $d$  vrednostima. Ovi parametri bi mogli imati značajan uticaj na selekciju genotipova koji su više adaptirani na različite lokalne uslove, pa bi samim tim mogao značajno doprineti uočenoj diferencijaciji populacija. Zanimljivo je da, iako je  $N$  vrednost pokazala statistički značajnu korelaciju sa nagibom terena, ona nije pronađena ni za jedan pojedinačni alkan.

Većina bioklimatskih karakteristika je pokazala statistički značajnu korelaciju, mada je svega nekoliko bilo visoko korelisano. I dok većina bioklimatskih parametara vezanih za temperaturu nisu pokazali statistički značajnu korelaciju sa alkanima ili  $N$  i  $d$  vrednostima, temperaturna sezonalnost (BIO4) je pokazala visoku pozitivnu korelaciju sa dužim alkanima, a negativnu sa kraćim, odnosno, duži alkani su bili povezani sa onim populacijama u kojima su razlike između najviših i najnižih temperatura u toku godine bile najveće. S druge strane, većina bioklimatskih parametara vezanih za precipitaciju je pokazala statistički značajnu korelaciju. Svi ovi parametri pokazuju tendenciju da što je manja količina padavina, to su dominantniji duži alkani.

Iako mnogi autori smatraju da biljke tropskih regiona sintetišu alkane dužeg lanca u odnosu na vrste koje žive u umerenim područjima, skorija istraživanja pokazuju da je vlažnost zapravo bitan faktor koji utiče na distribuciju alkana kod viših biljaka (Rommerskirchen et al., 2006). Prema modelu koju su predložili Riederer i Schneider (1990), kutikularna permeabilnost bi trebalo da opada sa povećanjem udela alkana dugog niza. Ovo je i u saglasnosti sa našim podacima, gde populacije koje naseljavaju kontinentalna područja na kojima trpe kako letnju sušu, tako i zimsku fiziološku sušu, imaju veću prosečnu dužinu lanca, odnosno njihovim epikutikularnim voskovima dominiraju duži alkani. Sadržaj tritriakontana i pentatriakontana je pozitivno korelisan sa temperaturnom sezonalnošću, i višim temperaturama najhladnijeg perioda u godini, i visoko negativno korelisani sa precipitacijom.

$N$  i  $d$  vrednosti si pokazali sličan trend. Visoka pozitivna korelacija sa godišnjim temperaturnim rasponom (BIO7) i srednjom temperaturom najsušnijeg perioda (BIO9), kao i negativne korelacije sa bioklimatskim parametrima precipitacije (npr. BIO12, BIO15, BIO17) sugerišu da aridnost igra važnu ulogu. Kako je korelacija  $N$  i  $d$  bila visoka i negativna ( $R=-0,91$   $p<0,0001$ ), suprotan trend je uočen za  $d$ . Odnosno, što je veća razlika između



temperatura, to je manja disperzija oko  $N$  – trend koji je i “golim okom” uočljiv na celom setu podataka, gde su populacije sa Alpa i Pirineja, kao i ispitivane kontinentalne populacije imale najmanju disperziju.

Dodd i Poveda (2003) su predložili da kompleksna veza  $N$  i nadmorske visine zapravo ocrta slične uslove u pogledu dostupnosti vode, gde bi se (po njima) populacije sa manjih nadmorskih visina suočavala sa letnjom sušom, dok bi se populacije sa većih nadmorskih visina suočavale sa problemima fiziološke suše. S druge strane, jednostavniju korelaciju su pronašli između nadmorske visine i disperzije oko  $N$ . Oni su pretpostavili da je veća vrednost  $d$  na većim nadmorskim visinama posledica različitih ekoloških faktora, kao što bi moglo biti povećanje UV-B radijacije koje bi promovisalo biosintezu alkana kraćeg lanca i granatih alkana (Barnes et al., 1996; Dodd & Poveda, 2003).

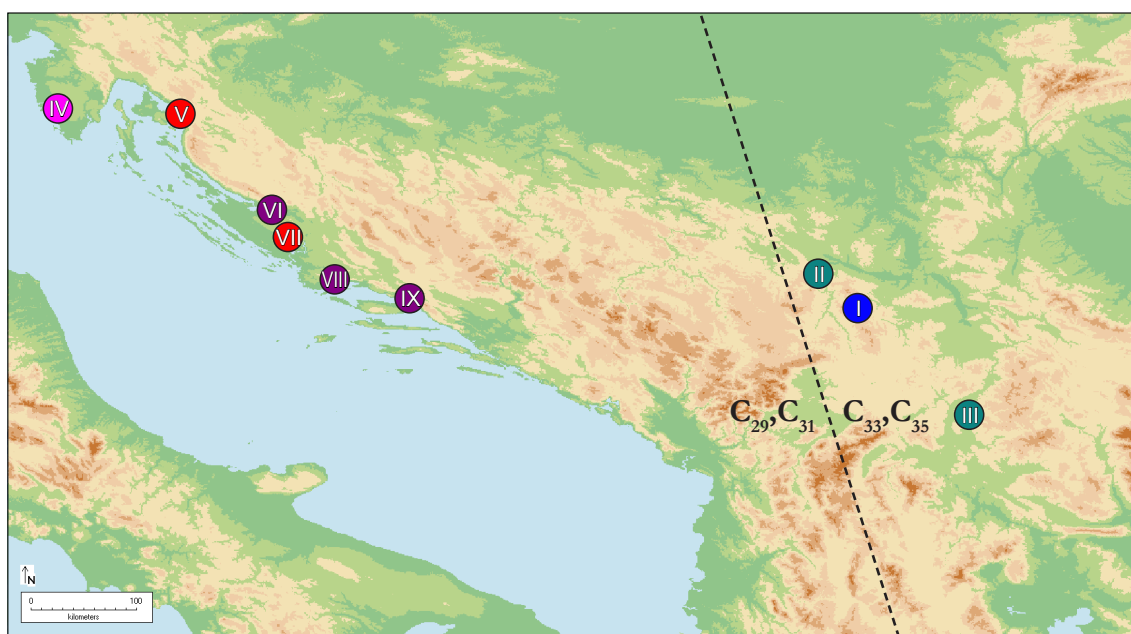
Međutim, podaci za *J. communis* var. *saxatilis* dobijeni u ovom istraživanju jasno ukazuju da je prosečna dužina alkana (odnosno dominacija dužih alkana) visoko korelisana sa ekstremnim klimatskim uslovima (velikim temperaturnim oscilacijama i sušom). Štaviše, nagib terena takođe pokazuje izvesni uticaj, doprinoseći nešto aridnijim lokalnim uslovima. S druge strane, nadmorska visina je pokazala samo slabu negativnu korelaciju ( $R=-0,17$   $p=0,002$ ), što i nije čudno s obzirom na to da su sve populacije rasle na manje-više istoj nadmorskoj visini. Mantelov i Parcijalni Mantelov test su na celom setu podataka pokazali statistički značajnu korelaciju sa celim setom bioklimatskih parametara, ali je ta veza bila nešto slabija, ukazujući na isto tako jaku ulogu genetičkih faktora.

### 5.1.3 *Juniperus deltoides*

Alkani epikutikularnih voskova izolovanih iz dvogodišnjih iglica *J. deltoides* su pokazali značajnu kvantitativnu varijabilnost između svih populacija. Najveće razlike postoje između kontinentalnih i primorskih populacija. Kod kontinentalnih, dominiraju alkani dugog niza, dok su alkani srednjeg niza zastupljeni sa najviše 0,5%. S druge strane, kod primorskih populacija, udeo pojedinačnih alkana srednjeg niza nikada nije bio manji od 1,0%. Pored toga, jasna razlika je uočljiva i u dominantnim komponentama alkana dugog niza između kontinentalnih i primorskih populacija. Dok u kontinentalnim dominiraju uz tritriakontan i hentriakontan i pentatriakontan, potpuno je drugačija situacija kod primorskih. Kod njih značajan udeo ima hentriakontan i nonakozan, a kod nekih je odnos ova tri gotovo izjednačen (Senj, Đevrske). Dobijeni rezultati su u saglasnosti i sa rezultatima dobijenim za druga dva taksona (*J. communis* var. *communis*, *J. communis* var. *saxatilis*) kao i predloženim modelom Riederer i Schneider (1990) koji predviđa da će jedinke koje žive u aridnijim uslovima imati alkane dužeg lanca, koji će svojom prostornom organizacijom dati homogeniji epikutikularni sloj, sa manjim brojem otvora, i omogućiti efikasniju zaštitu od nekontrolisanog gubitka vode. I zaista, kontinentalne populacije koje trpe i letnju sušu ali i zimsku fiziološku sušu, pokazuju veći procentualni udeo dužih alkana u odnosu na primorske populacije, koje zimi imaju nešto blaže uslove, sa temperaturama koje ne padaju nikada ispod nule i sa obiljem padavina. Takođe, značajno je napomenuti, da sve ispitivane kontinentalne populacije rastu na terenu sa relativno velikim nagibom, dok su sve primorske populacije uzorkovane sa terena koji gotovo da nemaju nagib, što može doprineti uočenim velikim razlikama u dominantnim alkanima epikutikularnih voskova ovih populacija.

Prosečna dužina lanca ( $N$ ) je znatno varirala između populacija. Najniže su bile kod primorskih populacija, pogotovu kod populacija Senj i Đevrske (28,3 i 28,5), što se pripisuje gotovo jednakoj dominaciji  $C_{29}$ ,  $C_{31}$  i  $C_{33}$ , dok je kod ostalih primorskih populacija,  $N$  bila između 29,4 i 30,4. S druge strane, kontinentalne populacije su imale prosečnu dužinu lanca za čak dva C atoma dužu. Ovolika varijacija u prosečnoj dužini lanca za čak četiri C atoma nije pronađena kod *J. communis* var. *communis* i *J. communis* var. *saxatilis*. S druge strane, razlika u sredinskim faktorima, između kontinentalnih i primorskih populacija je kod ove vrste i najveća.

Disperzija oko  $N$  ( $d$ ) je znatno varirala. Bez obzira na to, pokazala je isti trend kao i kod prethodna dva taksona – kod kontinentalnih populacija koje rastu u ekstremnijim uslovima ona je relativno mala, i kreće se od 2,4 do 2,8 dok kod primorskih populacija ona može znatno da varira – do čak 10,4 (u populaciji iz Senja). Ovako velika disperzija oko srednje dužine kod populacije iz Senja je gotovo 4 puta veća od disperzija kod kontinentalnih populacija, a dva do tri puta veća u odnosu na ostale primorske populacije. Visoka pozitivna korelacija je pronađena između  $N$  i nadmorske visine ( $R=0,69$   $p=1,03 \times 10^{-22}$ ) i još veća za nagib terena ( $R=0,76$   $p=3,21 \times 10^{-29}$ ), ovo ukazuje na značaj bioklimatskih parametara za diferencijaciju profila alkana kod ove vrste. Međutim, tendencije koje su uočene kod populacije *J. communis* var. *saxatilis* (Dodd & Poveda, 2003; Poveda et al., 2002) sa Pirineja, nisu uočene ni u ovom setu podataka, pošto je  $d$  bila najviša kod primorskih populacija, koje sve rastu na znatno manjim nadmorskim visinama nego kontinentalne.



**Slika 5.3.** Geografska distribucija populacija i dominantnih alkana epikutikularnih voskova *J. deltooides* sa Balkanskog poluostrva I - Kopaonik, II - Maglič, III - Pčinja, IV - Rovinj, V - Senj, VI - Kruševo, VII - Đevrske, VIII - Trogir, IX - Makarska. Različitim bojama su označene grupe prema DA (cf. Slika 4.1.15)

ANOVA i multivarijantne analize su takođe pokazale jasno razdvajanje populacija na osnovu sastava većine alkana, ali i jasno grupisanje populacija sa sličnim profilima alkana epikutikularnih voskova. Klaster analiza je pokazala bliže grupisanje populacija sa Magliča

i iz kanjona Pčinje, s jedne strane, i donekle izdvajanje populacije sa Kopaonika u kladi kontinentalnih populacija (A), dok klada primorskih populacija pokazuje tri subklade: Rovinj (c), Senj i Đevrske (d), kao i Kruševo, Trogir, Makarska (e).

Odvajanje populacije sa Kopaonika od ostalih kontinentalnih populacija se može objasniti prilično ekstremnim vremenskim uslovima kojima je ova populacija izložena: najviša nadmorska visina, izuzetno veliki nagib terena, izloženost jakim vetrovima, gde prosečna dnevna temperatura zimi može pasti ispod  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ . S druge strane, klima Magliča i kanjona Pčinje najviše podseća na Mediteransku klimu, sa suvim, vrelim letima i nešto blažim zimama (gde temperatura može da se spusti do tačke mržnjenja). Zanimljivo je da podloga na kojoj su ove populacije rasle nije imala nikakav uticaj na sastav alkana epikutikularnih voskova.

Postavlja se pitanje da li su ove razlike posledica velikih genetičkih razlika ili su prosto odgovor biljke na lokalne sredinske faktore. Iako postoji jako geografski utemeljeno odvajanje između kontinentalnih i primorskih populacija, subklade ove dve glavne klade ne pokazuju geografsku korelaciju, ali ukazuju na sličnost u lokalnim klimatskim uslovima, pa se tako populacije koje se međusobno udaljene (npr. Pčinja i Maglič, Senj i Đevrske) grupišu zajedno.

Kako je rađena samo jedna populacija *J. macrocarpa* sa Balkanskog poluostrva, diskusija o alkanima epikutikularnih voskova listova ove vrste će biti u kontekstu ostalih vrsta u opštoj diskusiji.

### 5.1.4 Opšta diskusija

Kutikula predstavlja prvu barijeru prodiranju patogenih organizama u biljku, kao i poslednju barijeru nekontrolisanom gubitku vode (Holloway, 1994). Da bi kutikularni voskovi mogli da obavljaju ovako važnu ulogu neophodno je da u uslovima u kojima živi vrsta, ovaj sloj zadržava i svoj oblik i strukturu.

I jedno i drugo je direktno zavisno od sastava – trodimenzione strukture koje formiraju epikutikularni voskovi su direktno zavisne od jedinjenja koja ulaze u sastav epikutikularnih voskova kao i od njihovog relativnog udela (Eigenbrode & Espelie, 1995), dok je očuvanje ovih struktura (npr. sprečavanje njihovog topljenja) direktno vezano za njihov sastav. Čista jedinjenja koja ulaze u sastav epikutikularnih voskova imaju temperaturu topljenja koja je veoma često i niža od temperature topljenja za kompleksnu smešu (Gibbs, 2002). Sve ovo ukazuje na jaku genetičku kontrolu i izuzetno bitnu ulogu koju, pre svega alkani, ali i druga jedinjenja koja ulaze u sastav epikutikularnih voskova, imaju za bolju adaptaciju jedinke na uslove životne sredine.

Podaci o promenljivom sastavu epikutikularnih voskova tokom života jedne jedinke postoje, međutim, ove promene su ograničene na period razvoja samog lista (ili nekog drugog organa), gde nakon potpunog razvoja lista sastav alkana ostaje stabilan, čak i tokom njegovog sušenja i opadanja (Purdy & Truter, 1961; Eglinton et al., 1962; Bush & McInerney, 2013). S druge strane, postoji veliki broj radova koji govori o upotrebi alkana kao hemotaksonomskih markera, kako za razlikovanje golosemenica od skrivenosemenica, tako i na nižim taksonomskim nivoima (cf. 1.2 – Alkani). Štaviše, Dodd i Afzal-Rafi (2000) su, analizirajući alkane epikutikularnih voskova vrsta familije Cupressaceae, uočili da alkani pokazuju jak genetički uticaj kao odgovor na adaptaciju na uslove životne sredine.

U svim uzorcima istraživanih taksona je tritriakontan ( $C_{33}$ ) bio dominantan alkan, što je najverovatnije karakteristika celog roda. Ista dominantna komponenta je detektovana kod uzoraka *J. communis* var. *saxatilis* sa Prineja, Alpa i Korzike, kao i kod azijskih i severnoameričkih populacija *J. scopolorum*, *J. davurica*, *J. rigida* (Dodd & Poveda, 2003; Poveda et al., 2002; Tarasov et al., 2012; Tulloch & Bergter, 1981). U svim dostupnim podacima, tritriakontan je

činio preko 70 % alkanskog profila epikutikularnih voskova. Pored tritriakontana, u većim količinama su se nalazili i  $C_{29}$ ,  $C_{31}$ ,  $C_{35}$  (Slika 4.1.1).

U uzorcima dominiraju alkani dužeg niza, što i odgovara generalno kseromorfnjoj prirodi ovih taksona. Ujedno, jedinke koje su pokazale i najmanju kseromorfnost (široke, relativno mekane iglice, *J. macrocarpa* iz okoline Trogira) su imale i najveći udeo alkana srednjeg niza. Štaviše, po opštem profilu alkana, najviše se ističu alkani izolovani iz epikutikularnih voskova *J. macrocarpa*.

Univarijantne analize su pokazale odvajanje sva četiri taksona na osnovu gotovo svakog alkana. Zanimljivo je da, kada su pojedinačne komponente u pitanju, *J. communis* var. *saxatilis* pokazuje veću sličnost sa *J. deltoides* i *J. macrocarpa* nego sa *J. communis* ( $C_{22}$ ,  $C_{24}$ ,  $C_{34}$ ,  $C_{35}$ ). *J. macrocarpa* i *J. deltoides* pokazuju nešto veći broj karaktera na osnovu kojih nije bilo moguće razlikovati ove dve grupe ( $C_{23}$ ,  $C_{29}$ ,  $C_{31}$ ). Međutim, ne smemo izgubiti iz vida činjenicu da je veliki broj jedinki *J. communis* var. *saxatilis* poreklom sa zapadnog dela Balkanskog poluostrva, kao i većina populacija *J. deltoides* kao i ispitana populacija *J. macrocarpa*.

Multivarijantna statistička obrada rezultata ispitivanih alkana na celokupnom uzorku je pokazala manje-više iste tendencije kao i rezultati statističke obrade po pojedinim vrstama. Naime, analiza glavnih komponenti i klaster analiza su pokazale jako odvajanje (sub)mediteranskih i kontinentalnih populacija, bez obzira na takson, grupišući na taj način u istu kladu jedinke različitih taksona. Iako su ove dve analize dale prednost geografskoj asocijaciji, pre nego taksonomskoj, jedinke istog taksona su se ipak unutar svakog od ta dva geografska regiona grupisale zajedno. Štaviše, diskriminantna analiza je ipak uspela da odvoji i grupiše taksone na osnovu sastava epikutikularnih voskova. Najslabije se odvajaju (tek na trećoj diskriminantnoj osi) *J. communis* var. *saxatilis* od *J. communis* var. *communis*. S druge strane, *J. macrocarpa* se izuzetno jako odvaja od svih ostalih taksona na osnovu sastava alkana, dodatno potvrđujući odvajanje ovog taksona kao posebne vrste.

Jedinke *J. communis* se grupišu međusobno pre svega na osnovu visokog relativnog udela  $C_{33}$  i  $C_{35}$  alkana, dok kod *J. deltoides* i *J. macrocarpa* (koje su dominantno mediteranske populacije) dominiraju  $C_{33}$  i  $C_{31}$ , a kod pojedinih populacija i  $C_{29}$ . Prosečna dužina lanca ( $N$ ) je bila jako bliska kod *J. communis* var. *communis* i var. *saxatilis*, dok je za otprilike jedan niža kod *J. deltoides* i *J. macrocarpa*.

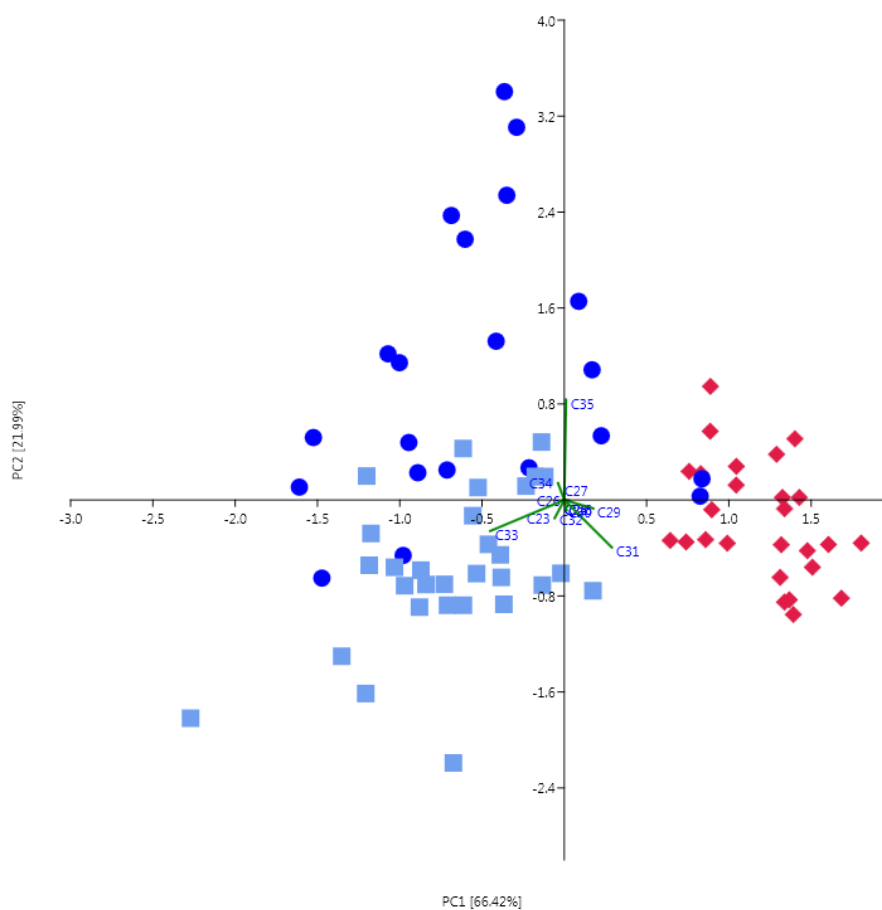
Prosečna dužina lanca ( $N$ ) i disperzija oko nje ( $d$ ) pokazuje u svim populacijam sličnu tendenciju – što su uslovi aridniji, to je prosečna dužina lanca veća, i što su uslovi “suroviji” (veće promene u temperaturi tokom godine, temperature ispod tačke mrženjenja, letnja suša i fiziološka zimska suša...), to je disperzija oko prosečne dužine lanca manja, odnosno dominacija jednog alkana je izraženija.

Nakon svega, postavlja se pitanje koliki uticaj imaju ekološki, a koliki genetički faktori? I, da li je odvajanje između zapadnih i centralnih/istočnih populacija posledica genetičkih razlika uzrokovanih adaptacijama tih populacija na različite uslove životne sredine, ili su uočene razlike posledica “plastičnosti” voskova odnosno akomodacije na uslove životne sredine? Osnovni profili koji su uočeni kod sva tri proučavana taksona, da dominira tritriakontan, te da uz njega visoki udeo imaju hentriakontan i nonakozan ili pentatriakontan, poklapa se sa dostupnim podacima za ostale vrste roda *Juniperus*. Uočene razlike u zastupljenosti druge dve komponente se do izvesnog stepena može objasniti razlikama koje postoje u bioklimatskim faktorima.

Prikazane analize govore o velikom uticaju bioklimatskih faktora, pre svega aridnosti, na diferencijaciju ovih populacija. I zaista, najveće razlike su uočene kod *J. deltoides*, s obzirom na to da se istočne i zapadne populacije nalaze u potpuno drugačijim klimatskim uslovima, i međusobno su daleko više udaljene u odnosu na ispitivane populacije druga dva taksona. To što su statističke analize pokazale nešto slabiju korelaciju (tj. neznatno manju od 0,7) može biti posledica “nepreciznosti” korišćenih bioklimatskih parametara, s jedne strane, (pošto su podaci za WorldClim data set dobijeni interpolacijom na osnovu podataka dostupnih mernih mesta), ali u drugih faktora koji su mogli da “unesu šum” u samu sliku. Na primer, jedan broj populacija, pre svega Senj i Đevrske, rastu tik uz Jadransku magistralu, i izloženost velikim količinama zagađenja, naročito teškim metalima iz izduvnih gasova saobraćaja, mogli su da utiču na to da se zaustavi biosinteza alkana i da dođe do “gomilanja” nešto kraćih alkana, što bi moglo objasniti da u ovim populacijama, inače uočena jaka dominacija tritriakontana gotovo da izostaje.

Međutim, ono što daje dodatnu sigurnost u jaku genetičku podlogu je i podudaranje sa rezultatima dostupnim iz literature (Dodd & Poveda, 2003; Poveda et al., 2002) s jedne strane, ali i analiza glavnih komponenti urađena za jedini lokalitet gde se sva tri taksona mogu

naći (*J. deltooides* i *J. communis* var. *communis* simpatrički, i *J. communis* var. *saxatilis* na jako maloj udaljenosti) – Kopaonik (Slika 5.4), s druge strane. Iako su rasli pod identičnim klimatskim uslovima, ova tri taksona se jako lako razlikuju već na analizi glavnih komponenti, što ukazuje na izuzetno bitnu ulogu genetičkih faktora u definisanju osnovnog profila alkana kod ova tri taksona.



**Slika 5.4.** Scatter plot analize glavnih komponentni bazirana na udelu 17 alkana izolovanih iz epikutikularnih voskova dvogodišnjih iglica ● - *J. communis* var. *communis*, ■ - *J. communis* var. *saxatilis* i ♦ - *J. deltooides* sa lokaliteta Kopaonik



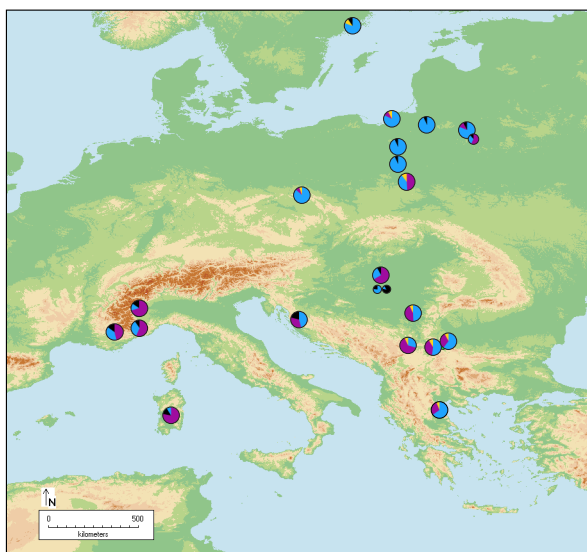
## 5.2 Terpeni

### 5.2.1 *Juniperus communis* var. *communis*

U etarskom ulju izolovanom iz listova *J. communis* var. *saxatilis* detektovano je 117 jedinjenja. U etarskom ulju, kao i kod drugih ispitanih vrsta sekcije *Juniperus*, dominiraju monoterpeni (75,2%) što je karakteristika sekcije (Otto & Wilde, 2001). Dva monoterepena,  $\alpha$ -pinen i sabinen, su dominantna jedinjenja u sastavu etarskog ulja. Zajedno, ova dva jedinjenja su, u proseku, činila oko 55,0 % ukupnog sastava etarskog ulja.

Sastav etarskog ulja je pokazao geografsku diferencijaciju ispitivanih populacija. U populaciji iz Deliblatske peščare etarsko ulje se odlikovalo gotovo istim odnosom  $\alpha$ -pinena i sabinena; kod populacije sa Kopaonika u etarskom ulju dominira sabinen, koga ima duplo više u odnosu na  $\alpha$ -pinen. Kod populacija sa Suve i Stare planine  $\alpha$ -pinen dominira u etarskom ulju, dok sabinena ima 30 odnosno 50% manje u pravcu zapad-istok.

Analiza glavnih komponenti je pokazala preklapanje svih populacija. Čak i samo dve komponente opisuju gotovo sveukupnu varijabilnost uzorka:  $\alpha$ -pinen na prvoj osi (99,7 %) i limonen (85,6 %) na drugoj. Sabinen, zbog izuzetno velike i statistički značajne korelacije sa  $\alpha$ -pinenom ( $r=-0,9$ ), nije korišćen u multivariacionim statističkim analizama. Klaster analiza je pokazala formiranje dve klade u odnosu na količinu  $\alpha$ -pinena odnosno sabinena.



**Slika 5.5.** Distribucija dominantnih komponenti etarskog ulja iglica *J. communis* var. *communis* u Evropi dostupnih iz literature (cf. Tabela 5.1). Veličina "pitice" govori o relativnoj zastupljenosti hemotipa tamo gde je bio dostupan podatak.   
■ -  $\alpha$ -pinen; ■ - limonen ; ■ - sabinen;   
■ - druge komponente (mircen,  $\gamma$ -terpinen,  $\beta$ -felandren i dr.)

Poređenje dobijenih rezultata sa dostupnim rezultatima iz literature (Tabela 5.1, Slika 5.5) je pokazalo da etarsko ulje *J. communis* var. *communis* širom areala pokazuje veliku varijabilnost. Broj identifikovanih komponenti je varirao od nekoliko desetina do dve stotine. Međutim, opšti profil je bio sličan – jedna do dve komponente koje su bile zastupljene preko 15%, i do 20 komponenti prisutnih između 1 i 15%. Dominante komponente su varirale u zavisnosti od regiona. Pa tako, u regionu severne Italije, Sardinije i južne Francuske u etarskom ulju dominiraju sabinen i  $\alpha$ -pinen, dok je treća komponenta varirala (Angioni et al., 2003; Caramiello et al., 1995; Ochocka et al., 1997). S druge strane, kod populacija sa severa Evrope snažno dominira  $\alpha$ -pinen, dok se sabinen kao dominantna komponenta javlja u pojedinim populacijama ili kod manjeg broja jedinki (Adams, 1998; Butkienė et al., 2009; Filipowicz et al., 2009; Ochocka et al., 1997). U regionu centralne Evrope i Balkanskog poluostrva etarska ulja pokazuju “intermedijarni” karakter u odnosu na druga dva regiona (dominiraju obe komponente) – zapadnim populacijama dominira sabinen, dok  $\alpha$ -pinen čini nešto manji udeo (Markó et al., 2011; Mastelić et al., 2000), a istočnim dominira  $\alpha$ -pinen (podaci iz ovog rada i (Chatzopoulou & Katsiotis, 1993)). Dobijeni podaci se uklapaju u opštu klinu, gde u pravcu zapad-istok dolazi do smanjenja udela sabinena u dominantnim komponentama, odnosno povećanja udela  $\alpha$ -pinena u etarskom ulju. Izuzetno je zanimljivo, posebno u kontekstu gena odgovornih za biosintezu, da se limonen nalazi među dominantnim komponentama isključivo na transektu Grčka-Švedska, dok se kod populacija istočno i zapadno od ove linije javlja u znatno manjim količinama (veoma često ispod 1,0%).

U nekoliko radova, autori su uspeali da uoče dva do tri hemotipa -  $\alpha$ -pinenski, sabinenski i  $\delta$ -kar-3-enski (Butkienė et al., 2009; Markó et al., 2011). Međutim, zbog oskudnih podataka detaljnija analiza i ustanovljavanje tri pretpostavljena hemotipa nije izvesna. Detaljnija analiza podataka dostupnih iz literature je potvrdila prisustvo “skrivenih” manje zastupljenih hemotipova. U populacijama sa Balkana, mogla su da se detektuju tri osnovna profila -  $\alpha$ -pinenski ( $\alpha$ -pinen 53,9%), intermedijarni ( $\alpha$ -pinen 28,5%; sabinen 25,%) i sabinenski (sabinen 38,1;  $\alpha$ -pinen 14,8). Nije detektovana nijedna jedinka koja bi odgovarala  $\delta$ -kar-3-enskom hemotipu. Stoga, neophodne su dalje analize sa većim brojem jedinki i širim arealom za dalje tumačenje rezultata, i eventualno razlikovanje hemotipova.

Markó i saradnici (2008) su uočili potencijalnu vezu između sastava etarskog ulja i preference herbivora, međutim dizajn eksperimenta im je onemogućio da dođu do konkretnijih rezultata. Na osnovu dostupnih podataka,  $\delta$ -kar-3-enski hemotip je najmanje primamljiv

za herbivore, dok je  $\alpha$ -pinenski hemotip najprimamljiviji. Sabinenski hemotip je pokazao karakteristike oba hemotipa, barem kada je preferenca herbivora u pitanju. Ustanovljena je veza između količine etarskog ulja i intenziteta ispaše, gde su jedinke koje su imale veći prinos etarskog ulja herbivori više izbegavali.

Svakako da je neophodna detaljnija studija odnosa pojedinačnih komponenti i smeše nekoliko komponenti da bi se utvrdio odnos između herbivora i kleke, kao i detaljnija bioklimatska studija, koja bi, takođe, mogla da objasni distribuciju hemotipova širom areala.

Iako su u tabeli navedeni rezultati sastava etarskog ulja populacija iz Kanade, Finske i Irana, upitno je koliko su date jedinke dobro determinisane. Naime, prema svim dostupnim podacima o distribuciji ovog varijeteta, on ne naseljava Kanadu, dok se u Evropi javlja do 59-te paralele (uz izuzetak jedne populacije na zapadu Norveške). U Iranu se ovaj varijetet javlja na severozapadu zemlje (Farjon & Filer, 2013).

**Tabela 5.1.** Pregled literaturnih podataka o dominantim komponentama etarskog ulja iglica *J. communis* var. *communis*

Lokalitet	Glavne komponente <sup>a)</sup>	Referenca
Kanada*	$\alpha$ -Pinene (79.1) $\beta$ -Pinene (4.6) Myrcene (4.0)	Rudloff & Sood, 1969
Grčka (sever)	$\alpha$ -Pinene (41.3) Sabinene (17.4) Limonene (4.2)	Chatzopoulou & Katsiotis, 1993
Italija <sup>b)</sup>	Sabinene (41.4) $\alpha$ -Pinene (13.4) Terpinen-4-ol (8.7)	Caramiello et al., 1995
Poljska <sup>c)</sup>	$\alpha$ -Pinene (72.2) Limonene (6.7) $\beta$ -Phellandrene (4.9)	Ochocka et al., 1997
Poland <sup>d)</sup>	$\alpha$ -Pinene (86.2) Myrcene (3.4) $\beta$ -Pinene (2.7)	Ochocka et al., 1997
Poland <sup>e)</sup>	$\alpha$ -Pinene (38.3) Sabinene (31.5) Limonene (8.1)	Ochocka et al., 1997
Francuska	Sabinene (32.7) $\alpha$ -Pinene (27.8) $\gamma$ -Terpinene (10.7)	Ochocka et al., 1997
Švedska	$\alpha$ -Pinene (56.8) Limonene (6.9) $\beta$ -Phellandrene (6.9)	Adams, 1998
Hrvatska	$\alpha$ -Pinene (16.9) Sabinene (12.1) Terpinen-4-ol (7.7)	Mastelić et al., 2000
Sardinija	Sabinene (61.1) Terpinen-4-ol (10.7) $\alpha$ -Pinene (6.4)	Angioni et al., 2003
Iran	Sabinene (40.7) $\alpha$ -Pinene (12.5) Terpinen-4-ol (12.3)	Shahmir et al., 2003
Iran <sup>f)</sup>	$\delta$ -Car-3-ene (39.4) $\beta$ -Phellandrene (25.1) $\alpha$ -Pinene (24.5)	Pourmortazavi et al., 2004

nastavak Tabele 5.1.

Lokalitet	Glavne komponente <sup>a)</sup>	Referenca
Poljska <sup>g)</sup>	$\alpha$ -Pinene (63.7) Sabinene (7.5) Limonene (6.1)	Filipowicz et al., 2009
Finska	Germacrene D-ol (20.3) Germacrene D (20.3) $\alpha$ -Pinene (14.3)	Martz et al., 2009
Litvanija <sup>j)</sup>	$\alpha$ -Pinene (53.9) $\beta$ -Phellandrene (7.4) Sabinene (5.0)	Butkienė et al., 2009
Litvanija <sup>j)</sup>	Sabinene (37.5) $\alpha$ -Pinene (19.4) Terpinen-4-ol (8.1)	Butkienė et al., 2009
Srbija (Kopaonik)	$\alpha$ -Pinene (40.5) Sabinene (18.0) Myrcene (13.5)	Milojević et al., 2010
Mađarska <sup>k)</sup>	$\delta$ -Car-3-ene (55.6) $\alpha$ -Pinene (9.6) Myrcene (5.6)	Markó et al., 2011
Mađarska <sup>l)</sup>	Sabinene (42.8) $\alpha$ -Pinene (16.4) $\gamma$ -Terpinene (5.2)	Markó et al., 2011
Mađarska <sup>m)</sup>	$\alpha$ -Pinene (67.1) $\gamma$ -Terpinene (17.3) Myrcene (3.1)	Markó et al., 2011

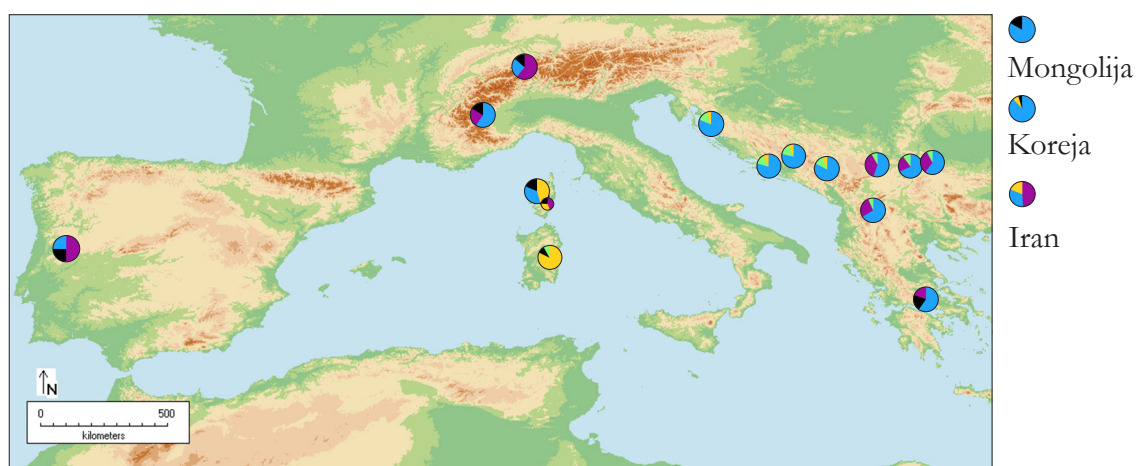
\* *J. communis* var. *communis* ne raste u Severnoj Americi, tako da se podatak najverovatnije odnosi na *J. communis* var. *saxatilis* ali u radu je takson definisan samo kao *J. communis*; <sup>a)</sup> relativni udeo glavnih komponenti je dat u zagradama (%); <sup>b)</sup> procenti su dati kao srednja vrednost za pet lokaliteta sa severa Italije; <sup>c)</sup> podaci su dati po lokalitetima - lokalitet Piechowice; <sup>d)</sup> Wegorzewo, Mława, NP Kampinos - mlada šuma; <sup>e)</sup> NP Kampinos - strogi rezervat Niepust, Swidno ; <sup>f)</sup> Botanička bašta u Teheranu; <sup>g)</sup> podaci dobijeni pomoću *headspace*; <sup>i)</sup> određen kao pinenski hemotip (n=45); <sup>j)</sup> određen kao sabinenski hemotip (n=4); <sup>k)</sup>  $\delta$ -kar-3-ene hemotip (n=4); <sup>l)</sup> sabinenski hemotip (n=13); <sup>m)</sup> pinenski hemotip (n=1).

### 5.2.2 *Juniperus communis* var. *saxatilis*

U etarskom ulju izolovanom iz listova *J. communis* var. *saxatilis* detektovano je 141 jedinjenje. U etarskom ulju, kao i kod drugih ispitanih vrsta sekcije *Juniperus*, dominiraju monoterpeni (67,3%), što je karakteristika sekcije (Otto & Wilde, 2001). Dominantno jedinjenje je  $\alpha$ -pinen, koji u proseku čini 50,4 % sastava etarskog ulja.

Sastav etarskog ulja je pokazao geografsku diferencijaciju. U submediteranskim populacijama, seskviterpenski ugljovodonik, germakren D, je po svom udelu činio drugo najzastupljenije jedinjenje (7,0 %), dok je u kontinentalnim populacijama to bio sabinen (17,2 %). Analiza glavnih komponentni je pokazala odvajanje submediteranskih od kontinentalnih populacija, dok je klaster analiza pokazala da populacije koje su geografski bliže pokazuju i sličniji sastav etarskog ulja, te se grupišu u odvojene subklade. Diskriminantna analiza je uspela da potvrdi odvajanje četiri grupe.

Poređenje dobijenih rezultata sa dostupnim rezultatima iz literature (Tabela 5.2) je pokazalo sličnost sastava etarskog ulja sa drugim populacijama *J. communis* var. *saxatilis* (Iran (Emami et al., 2007), Švajcarske (Adams, 2000), Korzike (Ottavioli et al., 2009),



**Slika 5.6.** Distribucija dominantnih komponenti etarskog ulja iglica *J. communis* var. *saxatilis* u Evropi (i Aziji) dostupnih iz literature (cf. Tabela 5.2). Veličina “pitice” govori o relativnoj zastupljenosti hemotipa tamo gde je bio dostupan podatak. ■ -  $\alpha$ -pinen; ■ - limonen; ■ - sabinen; ■ - germakren D; ■ - druge komponente (mircen,  $\beta$ -pinen, i dr.)

Grčke (Vourlioti-Arapi et al., 2011) i Italije (Caramiello et al., 1995)), ali manju sličnost sa populacijama iz Portugala (Cabral et al., 2012), Korzike (Ottavioli et al., 2009) i Sardinije (Marongiu et al., 2005). Etarska ulja populacija iz Švajcarske, Irana i Korzike se odlikuju visokim udelom sabinena, što ih po sastavu čini nešto bližim kontinentalnim populacijama. Populacije iz Koreje (Jo & Kim, 2005) i Mongolije (Adams, 1998, 2000), pak, pokazuju sastav etarskog ulja mnogo sličniji submediteranskim populacijama (Slika 5.6). U etarskom ulju populacija iz Portugala, sa Korzike i Sardinije dominira limonen.

Ottavioli i saradnici (2009) su identifikovali dva hemotipa kod populacija *Juniperus communis* var. *saxatilis* sa Korzike. Pronašli su da 92% individua ima etarsko ulje u kojem dominira limonen, dok je kod 8% to bio sabinen. S druge strane, podaci iz ovog rada su pokazali da je  $\alpha$ -pinen gotovo uvek bio dominantna komponenta. Devetnaest individua iz kontinentalnih populacija (10 iz populacije Kopaonik, 4 iz populacija Suva i Stara plaina i jedna iz populacije iz Mavrova) je imala dominantan sabinen, ali je odnos sabinen/ $\alpha$ -pinen bio daleko manji nego kod populacija sa Korzike. S druge strane, limonen ni u jednom uzorku nije bio dominantna komponenta (0,5 – 11 %). Zanimljivo je i da se kod 30 individua iz kontinentalnih populacija, kao druga dominantna komponenta etarskog ulja, ne javlja sabinen već germakren D.

Pregled literaturnih podataka je pokazao da kod populacija *J. communis* var. *saxatilis* iz Evrope postoji još veća varijabilnost nego što je uočena kod *J. communis* var. *communis*. Naime, dominantne komponente su se oštro razlikovale između regiona. Pa tako, (1) na Pirinejskom poluostrvu, dominiraju (redom) sabinen, terpinen-4-ol i  $\alpha$ -pinen (Cabral et al., 2012); (2) na Korzici i Sardiniji dominiraju ili limonen ili sabinen i limonen (Gonny et al., 2006; Ottavioli et al., 2009); (3) na severu Italije su dominirali  $\alpha$ -pinen i sabinen (Caramiello et al., 1995) dok u Švajcarskoj dominiraju sabinen i  $\alpha$ -pinen (Adams, 2000); (4) na zapadnom delu Balkana dominira  $\alpha$ -pinen (i germakren D), dok na istočnom delu Balkana dominiraju  $\alpha$ -pinen i sabinen (Vourlioti-Arapi et al., 2011). Na dalekom istoku, u Koreji i Mongoliji u etarskom ulju dominira  $\alpha$ -pinen (Adams, 1998; Jo & Kim, 2005), dok u Iranu dominira sabinen uz  $\alpha$ -pinen i limonen (Emami et al., 2007). Ovako velika varijabilnost u sastavu etarskog ulja se donekle preklapa i sa izuzetno disjunktним arealom ovog taksona. Naime, ispod 50-te paralele ovaj varijetet se javlja isključivo na velikim nadmorskim visinama (>1.000 m.n.v.), tako da je njegov areal izuzetno fragmentisan (Slika 2.1.6). Za ovaj takson, periodi glacijacija su mogli da znače spajanje areala u manje-više kontinuiran, da bi u interglacijacijama dolazilo do ponovnog odvajanja.

**Tabela 5.2.** Pregled literaturnih podataka o dominantim komponentama etarskog ulja iglica *J. communis* var. *saxatilis*

Lokalitet	Glavne komponente <sup>a)</sup>	Referenca
Portugal	Sabinene (26.2) TerPinene-4-ol (13.0) $\alpha$ -Pinene (12.9) Myrcene (8.9)	Cabral et al., 2012
Švajcarska	Sabinene (32.8) $\alpha$ -Pinene (14.1) Terpinen-4-ol (7.3) Limonene (6.7)	Adams, 2000c
Sardinija	Limonene (44.4) $\alpha$ -Terpinil acetat (5.2) germakren D (4.4) germakren B (3.7)	Marongiu et al., 2005
Korzika	Limonene (30.9) $\alpha$ -Pinene (24.4) $\beta$ -felandren (12.6) $\alpha$ -Terpinil acetat (6.0)	Gonny et al., 2006
Korzika	Limonene (34.5) $\beta$ -felandren (17.0) $\alpha$ -Terpinil acetat (9.7) $\alpha$ -Pinene (7.7)	Ottavioli et al., 2009
Korzika	Sabinene (19.1) Limonene (13.8) $\beta$ -felandren (10.4) $\alpha$ -Pinene (7.3)	Ottavioli et al., 2009
Italija	$\alpha$ -Pinene (30.5) Sabinene (12.4) Terpinen-4-ol (8.3) $\beta$ -Eudesmol (4.1)	Caramiello et al., 1995
Grčka	$\alpha$ -Pinene (35.1) $\delta$ -Car-3-en (12.1) Sabinene (11.5) Myrtenil acetate (5.0)	Vourlioti-Arapi et al., 2011
Iran	Sabinene (21.1) <sup>b)</sup> $\alpha$ -Pinene (13.7) <sup>b)</sup> Limonene (8.2) <sup>b)</sup> $\alpha$ -Terpineol (5.6) <sup>b)</sup>	Emami et al., 2007



nastavak Tabele 5.2.

Lokalitet	Glavne komponente <sup>a)</sup>	Referenca
Mongolija	$\alpha$ -Pinene (58.2) Germacrene D-4-ol (6.8) $\beta$ -Pinene (4.7) Myrcene (4.5)	Adams, 1998, 2000c
Korea	$\alpha$ -Pinene (26.1) Limonene (2.1) $\beta$ -Pinene (1.3) Myrcene (1.3)	Jo & Kim, 2005

<sup>a)</sup> relativni udeo glavnih komponenti je dat u zagradama (%); <sup>b)</sup> relativni udeo je dat kao prosečna vrednost

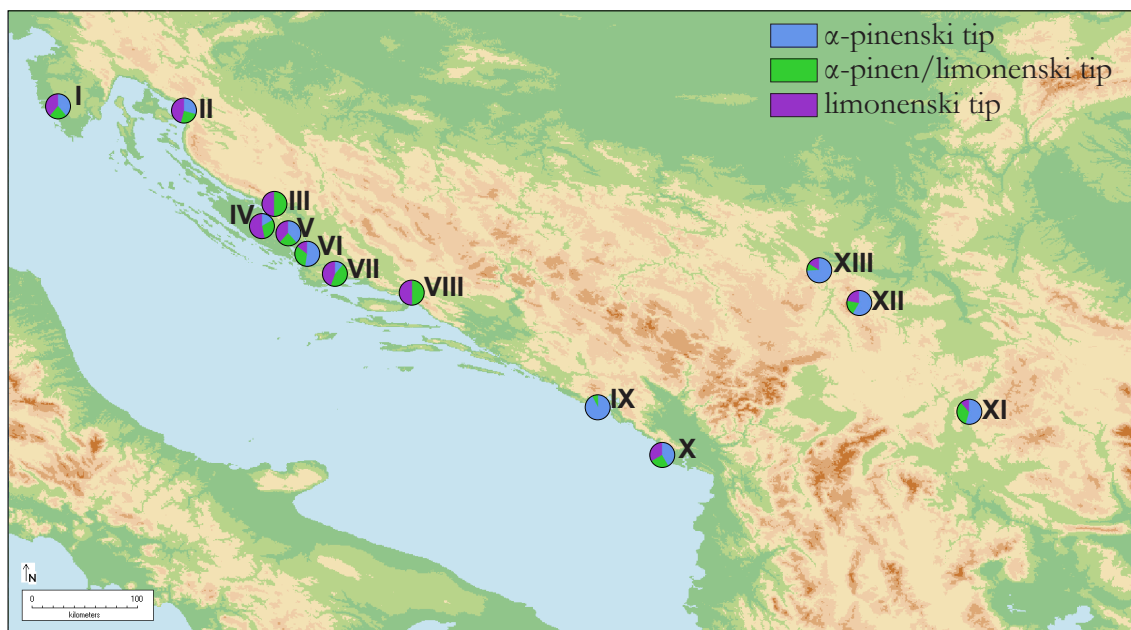
### 5.2.3 *Juniperus deltooides*

U etarskom ulju *J. deltooides* je detektovano 208 jedinjenja. Monoterpeni su dominantna grupa u sastavu etarskog ulja (61,6%), što je karakteristika vrsta sekcije *Juniperus* (Otto & Wilde, 2001). Dva monoterepena,  $\alpha$ -pinen i limonen, su dominantna jedinjenja. Zajedno, ova dva jedinjenja su u proseku činila oko 46,7 % ukupnog etarskog ulja.

Inicijalne analize rađene na četiri populacije (tri kontinentalne i jedne mediteranske) su pokazale jako odvajanje između kontinentalnih i mediteranskih populacija (Rajčević et al., 2013). Dalje istraživanje koje je uključilo dodatne populacije sa Jadranske obale je potvrdilo ovo odvajanje, ali je dalo i bolji uvid u razloge ovog odvajanja. Posmatrano odvojeno samo populacije sa Jadrana, statističke analize nisu uspele da pronađu statistički značajnu korelaciju sastava etarskog ulja i lokaliteta (Rajčević et al., 2015).

Analiza glavnih komponenti urađena sa svih 212 jedinki iz 13 populacija je pokazala odvajanje jedinki na dve grupe u zavisnosti od dominantne komponente – jedinke u čijem etarskom ulju dominira limonen, odnosno  $\alpha$ -pinen. Dalje statističke analize su pokazale odvajanje tri grupe jedinki, na osnovu sastava etarskog ulja – pored prethodne dve identifikovane u analizi glavnih komponenti, izdvaja se i treća grupa – jedinke čije etarsko ulje ima podjednake količine  $\alpha$ -pinena i limonena.

Poređenje učestalosti tri predložena hemotipa između svih trinaest populacija pokazalo je dominaciju limonenskog i intermedijarnog ( $\alpha$ -pinen/limonenskog) hemotipa kod submediteranskih populacija, i pinenskog tipa kod kontinentalnih populacija (Slika 5.7). Populacije iz Kruševa i Makarske su imale samo dva hemotipa, što je najverovatnije posledica malog uzorka iz ovih populacija (po 6 jedinki iz svake). S druge strane, populacija iz Žanjica je imala etarsko ulje prilično različitog karaktera u odnosu na sve ostale populacije, i dominaciju  $\alpha$ -pinenskog hemotipa. Ovo može biti posledica potpuno različitog staništa u odnosu na sve ostale ispitivane populacije – ostrvska populacija, locirana na svega nekoliko metara od otvorenog mora, izložena jakim zapadnim vetrovima.



**Slika 5.7.** Distribucija detektovanih hemotipova po lokalitetima na Balkanu. I - Rovinj, II - Senj, III - Kruševo, IV - Benkovac, V - Đevrske, VI - Konjevrate, VII - Trogir, VIII - Makarska, IX - Žanjice, X - Valdanos, XI - Pčinja, XII - Kopaonik, XIII - Maglič.

Poređenje sa literaturnim podacima (Tabela 5.3) pokazuje jaku sličnost sa sastavom etarskog ulja drugih populacija *J. deltoides* iz Mediterana. Na osnovu sastava etarskog ulja, populacije iz Italije i severne Grčke (Adams et al., 2005) su slične Jadranskim populacijama, dok su populacije iz južne Grčke (Adams et al., 2005) i Turske (Adams & Mataraci, 2011) slične kontinentalnim populacijama (Rajčević et al., 2013).

Ispitivanjem odnosa između komponenti etarskog ulja i bioklimatskih parametara nisu pronađene statistički značajne korelacije. Nije pronađena ni korelacija između relativnih količina  $\alpha$ -pinena i limonena u ispitivanim uzorcima, što je i očekivano s obzirom na to da je biosinteza limonena kontrolisana jednim genom, dok je kontrola biosinteze  $\alpha$ -pinena poligenetska (Adams & Stoehr, 2013; Banthorpe & Le Patourel, 1972; Bernard-Dagan, 1988; Squillace et al., 1980). Sastav etarskog ulja populacija na celom arealu ove vrste, od Italije do Turske je varirala neznatno, što ukazuje na značaj terpena kao hemotaksonomskih markera kod ovog taksona.

Prisustvo različitih hemotipova može biti posledica nekativnosti enzima odgovornih za biosintezu komponenti (npr.  $\alpha$ -pinenski tip se može objasniti ili inaktivacijom ili nefunkcionalnim genom za limonen sintazu, i obratno). Postojanje trećeg intermedijarnog ( $\alpha$ -pinen/limonenskog) hemotipa se može objasniti podjednakom aktivnošću limonen i pinen sintaza, ili pak postojanjem trećeg enzima limonen/ $\alpha$ -pinen sintaze. Naime, kod *Abies*

*grandis* (Bohlmann et al., 1999; Katoh et al., 2004) pored (-)-limonen i (-)-pinen sintaze, postoji i treći enzim nastao najverovatnije mutacijom gena za limonen sintazu: (-)-limonen/(-)- $\alpha$ -pinen sintaza. Proizvod ovog enzima je smeša monoterpena, i to: 35% limonena, 24% (-)- $\alpha$ -pinena, 20% (-)- $\beta$ -felandrena i 10% sabinena. U ispitivanim uzorcima *J. deltoides* sa Balkanskog poluostrva, u intermedijarnom hemotipu, ne samo što je odnos ove dve komponente gotovo jednak, već je došlo i do pada ukupne zastupljenosti obe komponente u sastavu etarskog ulja. Tako, kod  $\alpha$ -pinenskog i limonenskog hemotipa, ove dve komponente čine ukupno 54,5 % odnosno 50,3 % sastava etarskog ulja, dok je kod intermedijarnog zbirni tipa udeo ove dve komponente nešto manji do 34 % (Tabela 4.12).

Zanimljivo je uporediti dobijen sastav etarskog ulja *J. deltoides* ispitivanih populacija i literaturnih podataka sa podacima dostupnim za *J. oxycedrus s.l* (Tabela 5.3). Literaturni podaci pokazuju da je etarsko ulje *J. oxycedrus* var. *oxycedrus* populacija iz Maroka (Adams et al., 2005), Portugala (Adams et al., 2005; Cavaleiro et al., 2006) i Španije (Adams et al., 1999, 2005) pokazalo veoma sličan sastav etarskog ulja. Naime, u ovim populacijama  $\alpha$ -pinen je bio dominantna komponenta (40 – 47 %), dok je količina limonena bila uvek izuzetno niska (0,3 – 1,1 %). S druge strane, populacije označene kao *J. oxycedrus* ali koje rastu u Grčkoj (Adams et al., 1999) su pokazale sličnost sa ispitivanim populacijama kao i literaturnim podacima dostupnim za populacije *J. deltoides* iz Grčke. Pored toga, populacija označena kao *J. oxycedrus* iz Hrvatske (Miloš & Radonić, 2000) ne pokazuje sličnost ni sa *J. oxycedrus* sa zapada Mediterana, ali ni sličnost sa ostalim *J. deltoides* populacijama iz Hrvatske. U etarskom ulju koje su Miloš i Radonić dobili dominiraju  $\alpha$ -pinen i manoil oksid, dok je limonen detektovan samo u tragovima.

**Tabela 5.3.** Pregled literaturnij podataka o dominantim komponentama etarskog ulja iglica *Juniperus oxycedrus* s.l.

Takson <sup>a)</sup>	Lokalitet	Glavne komponente <sup>b)</sup>	Referenca
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	Maroko	13-epimanoyl oxide (13.2) (Z)-6-pentadecen-2-one (12.4) $\alpha$ -Pinene (8.5)	Achak et al., 2009
	Maroko	$\alpha$ -Pinene (31.3) Sabinene (5.2) Limonene (5.0)	Ismail et al., 2011
	Tunis	$\alpha$ -Pinene (40.9) <sup>c)</sup> $\alpha$ -Terpinene (3.8) <sup>c)</sup> 13- <i>epi</i> -Manoyl oxide (5.7) <sup>c)</sup>	Medini et al., 2010
	Francuska	$\alpha$ -Pinene (53.2) $\delta$ -Car-3-ene (5.1) Limonene (3.5)	Adams et Matarci, 2011
	Alžir	<i>trans</i> -Pinocarveol (7) <i>cis</i> -Verbenol (6.3) Manoyl oxide (6.0)	Dob et al., 2006
	Hrvatska	$\alpha$ -Pinene (41.37) Manoyl oxide (12.29) Farnesol (8.6)	Miloš et Radonić, 2000
	<i>Juniperus oxycedrus</i> L. ssp. <i>oxycedrus</i>	Maroko	$\alpha$ -Pinene (45.3) $\delta$ -Car-3-ene (13.9) C10-dienol acetate (5.8)
Portugal		$\alpha$ -Pinene (47.3) Manoyl oxide (7.3) $\beta$ -Phellandrene (6.3)	Adams et al., 2005
Portugal		$\alpha$ -Pinene (65.5) $\delta$ -Car-3-ene (5.7) $\beta$ -Phellandrene (3.2)	Cavaleiro et al., 2006
Španija		$\alpha$ -Pinene (40.9) $\alpha$ -Phellandrene (9.2) $\beta$ -Phellandrene (9.0)	Adams et al., 2005
Španija		$\alpha$ -Pinene (41.3) $\alpha$ -Phellandrene (8.2) <i>p</i> -Cymene (6.2)	Adams et al., 1999
Italija		Germacrene D (15.9) Manoyl oxide (10.2) 1- <i>epi</i> -Cubenol (5.4)	Marongiu et al., 2003

nastavak Tabele 5.3.

Takson <sup>a)</sup>	Lokalitet	Glavne komponente <sup>b)</sup>	Referenca
<i>Juniperus oxycedrus</i> L. ssp. <i>oxycedrus</i>	Grčka	$\alpha$ -Pinene (36.4) <sup>c)</sup> Limonene (16.2) <sup>c)</sup> Myrcene (4.0) <sup>c)</sup>	Adams et al., 1999
	Grčka	$\alpha$ -Pinene (58.0) $\alpha$ -Cedrol (7.3) Manoyl oxide (5.5)	Vourlioti-Arapi et al., 2012
	Liban	$\alpha$ -Pinene (27.4) $\beta$ -Myrcene (18.9) $\alpha$ -Phellandrene (7.1)	Loizzo et al., 2008
<i>Juniperus oxycedrus</i> ssp. <i>badia</i> (H.Gay) Debaux	Španija	$\alpha$ -Pinene (20.7) <sup>c)</sup> Manoyl oxide (10.9) <sup>c)</sup> Germacrene D (8.5) <sup>c)</sup>	Adams et al., 1999
	Španija	$\alpha$ -Pinene (47.0) Manoyl oxide (4.8) Germacrene D (2.6)	Salido et al., 2002
<i>Juniperus brevifolia</i> (Seub.) Antoine	Azori	Limonene (79.0) <sup>c)</sup> $\alpha$ -Pinene (16.6) <sup>c)</sup> $\beta$ -Myrcene (4.6) <sup>c)</sup>	da Silva et al., 2000
<i>Juniperus cedrus</i> Webb. & Berth.	Madeira	$\alpha$ -Pinene (30.1) <sup>c)</sup> Limonene (23.3) <sup>c)</sup> $\delta$ -Car-3-ene (9.0) <sup>c)</sup>	Cavaleiro et al., 2002
<i>Juniperus navicularis</i> Gand.	Portugal	Limonene (22.3) $\alpha$ -Pinene (18.0) $\alpha$ -Phellandrene (8.9)	Cavaleiro et al., 2003
<i>Juniperus deltooides</i> R.P. Adams	Italija	Limonene (27.3) $\alpha$ -Pinene (19.3) $\delta$ -Car-3-ene (13.6)	Adams et al., 2005
	Grčka	Limonene (20.0) $\alpha$ -Pinene (19.3) Manoyl oxide (9.9)	Adams et al., 2005
	Grčka	$\alpha$ -Pinene (27.4) Limonene (26.9) $\beta$ -Phellandrene (5.0)	Adams et al., 2005

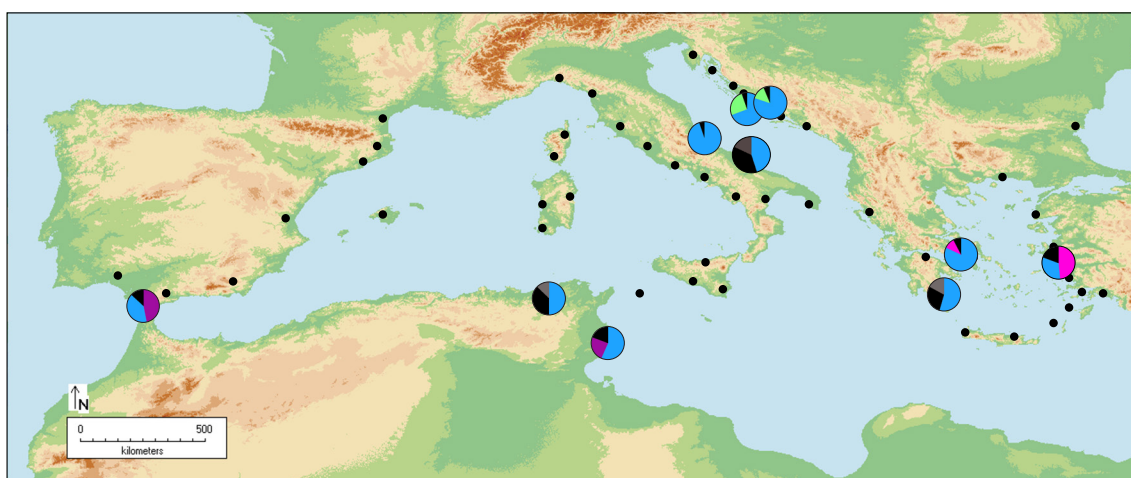
nastavak Tabele 5.3.

Takson <sup>a)</sup>	Lokalitet	Glavne komponente <sup>b)</sup>	Referenca
<i>Juniperus deltooides</i> R.P. Adams	Turska	$\alpha$ -Pinene (32.7) $\beta$ -Phellandrene (11.5) Limonene (6)	Adams et Matarci, 2001

a) Takson kako je definisano u radu iz kojeg su preuzeti podaci; b) relativni udeo glavnih komponenti je dat u zagradama (%); c) date su kao prosečne vrednosti; *J. oxycedrus* var. *badia* H.Gay (Syn. *Juniperus oxycedrus* ssp. *badia* (H.Gay) Debauux); *Juniperus brevifolia* (Seub.) Antoine (Syn. *J. oxycedrus* L. var. *brevifolia*), *Juniperus cedrus* Webb. & Berth. (Syn. *J. oxycedrus* L. var. *grandifolia* Link in Buch; *J. webbii* Car.), *Juniperus navicularis* Gand. (Syn. *J. oxycedrus* ssp. *transtagana* Franco)

### 5.2.4 *Juniperus macrocarpa*

U etarskom ulju *J. macrocarpa* je detektovano 103 jedinjenja. I kod ovog taksona, monoterpeni predstavljaju dominantnu grupu u sastavu etarskog ulja (68,8 %), što je karakteristika vrsta sekcije *Juniperus* (Otto & Wilde, 2001). Dominantno jedinjenje u sastavu etarskog ulja je  $\alpha$ -pinen, koji u proseku čini oko 55,5 % etarskog ulja. Druga dominantna komponenta je germakren D.



**Slika 5.6.** Distribucija dominantnih komponenti etarskog ulja iglica *J. macrocarpa* u Mediteranu dostupnih iz literature (cf. Tabela 5.4). ■ -  $\alpha$ -pinen; ■ - sabinen; ■ - germakren D; ■ - manojl oksid; ■ - druge komponente (mircen,  $\beta$ -felandren, i dr.)

Poređenjem dobijenih podataka sa literaturnim podacima (Tabela 5.4, Slika 5.6) uočava se da, iako je fragmentisan areal, u svim dostupnim populacijama, izuzev jedne sa Pirinejskog poluostrva, dominira  $\alpha$ -pinen. Međutim, sastav etarskog ulja je pokazao znatne razlike između ovih populacija, već kada su dominantne komponente u pitanju. U populacijama iz Hrvatske, Trogir (podaci iz ovog rada) i Hvar (Lešnjak et al., 2014), dobijen je sličan profil (dominiraju  $\alpha$ -pinen i germakren D). Kod populacije sa Pirenijskog poluostrva, dominiraju sabinen i  $\alpha$ -pinen (Adams et al., 1999), u populacijama iz Tunisa su to bili  $\alpha$ -pinen i sabinen odnosno sandarakopimara-8(14)-15-dien (Medini et al., 2009, 2013),  $\alpha$ -pinen odnosno  $\alpha$ -pinen i  $\alpha$ -terpineol kod dve populacije iz Italije (Valentini et al., 2003), i manoil oksid i  $\alpha$ -pinen u populacijama iz Turske (Sezik et al., 2005). U dvema populacijama iz Grčke dominiraju  $\alpha$ -pinen i  $\alpha$ -cedrol (Stassi et al., 1995; Vourlioti-Arapi et al., 2011).



**Tabela 5.4.** Pregled literaturni podataka o dominantim komponentama etarskog ulja iglica *J. macrocarpa*

Lokalitet	Glavne komponente <sup>a)</sup>	Referenca
Španija	Sabinene (26.5) $\alpha$ -Pinene (22.6) Terpinen-4-ol (7.4)	Adams et al., 1999
Tunis	$\alpha$ -Pinene (23.8) Sandaracopimara-8(14)-15-diene (17.6) $\beta$ -Phellandrene (6.1)	Medini et al., 2009
Tunis	$\alpha$ -Pinene (25.3) Sabinene (10.7) <i>p</i> -Cymene (8.6)	Medini et al., 2013
Italija <sup>b)</sup>	$\alpha$ -Pinene (77.4) $\beta$ -Pinene (2.1) $\alpha$ -Terpineol (2.1)	Valentini et al., 2003
Italija	$\alpha$ -Pinene (22.8) $\alpha$ -Terpineol (18.7) 1,8-Cineole (9.1)	Valentini et al., 2003
Hrvatska (Hvar)	$\alpha$ -Pinene (49.4) Germacrene D (18.1) $\beta$ -Phellandrene (3.8)	Lešjak et al., 2014
Grčka	$\alpha$ -Pinene (58.0) $\alpha$ -Cedrol (7.3) 13- <i>epi</i> -manoyl oxide (5.6)	Vourlioti-Arapi et al., 2011
Grčka	$\alpha$ -Pinene (26.9) $\alpha$ -Cedrol (13.9) Cymen-8-ol (8.5)	Stassi et al., 1995
Turska	Manoyl oxide (12.9) $\alpha$ -Pinene (8.6) $\alpha$ -Cedrol (5.1)	Sezik et al., 2005

<sup>a)</sup> relativni udeo glavnih komponenti je dat u zagradama (%); <sup>b)</sup> relativni udeo je dat kao prosečna vrednost

### 5.2.5 Opšta diskusija

Etarska ulja imaju veoma raznovrsnu i značajnu biološku ulogu. Povećavaju otpornost biljke na sušu, učestvuju u odbrani od insekata ali i njihovom privlačenju, imaju alelopatsko i autoalelopatsko dejstvo, deluju kao imuni sistem biljke, i td. (Ackerman et al., 1997; Athanassiou et al., 2013; Audus & Cheetham, 1940; Banerjee & Sharkey, 2014; Beker et al., 1989; Cavaleiro et al., 2006; Croteau et al., 1987; El-Sawi et al., 2008; Elango et al., 2012; Giatropoulos et al., 2012; Gijzen Mark et al., 1993; Holthuijzen & Sharik, 1985; Katz et al., 1987; Lewinsohn et al., 1993; Mahmoudvand et al., 2011; Margaris & Vokou, 1982; McPherson & Muller, 1967; Milojević et al., 2010; Rattan & Sharma, 2011; Robles et al., 1999; Rodriguez-Concepcion, 2002; Roy & Raguso, 1997; Seca & Silva, 2006; Sharkey & Singaas, 1995; Tabanca et al., 2007; Tarayre et al., 1995; Thanos et al., 1995; Thompson, 2005; Unlu et al., 2008; Vokou et al., 2003; Williams et al., 1983; Whittaker & Feeny, 1971)... Ovako značajna uloga govori o jakoj selekciji ka onim profilima koji će biti najbolje prilagođeni lokalnim uslovima životne sredine, ali i o jakoj genetičkoj kontroli njihove biosinteze.

Etarska ulja su pokazala izuzetno veliku varijabilnost kod svih ispitivanih taksona. Podaci dostupni iz literature ukazuju na veliku raznolikost u sastavu terpena kod ispitivanih taksona na celom arealu. Između populacija je varirala i složenost etarskog ulja (odnosno broj detekovanih komponenti), kao i odnos nekoliko glavnih komponenti. Veliki deo te varijabilnosti (pogotovu kada je broj detektovanih jedinjenja u pitanju) svakako se može pripisati korišćenju različitih metoda za ekstrakciju etarskog ulja (u dužini trajanja destilacije kao i upotrebi različitih aparatura za hidroddestilaciju), kao i samim instrumentima za razdvajanje i analizu sastava etarskog ulja, te dostupnim bazama. Ova šarolikost korišćenih metoda je svakako doprinela velikoj varijabilnosti u detektovanom sastavu etarskog ulja, ali nije mogla da izmeni njihovu prirodu – odnosno dominantne komponente.

U etarskom ulju odabranih vrsta sekcije *Juniperus* sa Balkanskog poluostrva identifikovano je preko 200 jedinjenja. Najviše jedinjenja je identifikovano u etarskom ulju iglica *J. deltoides* (208), a najmanje kod *J. macrocarpa* (103). Monoterpeni su dominantna grupa u ulju (61,6 – 75,2 %), što je karakteristika vrsta sekcije *Juniperus* (Otto & Wilde, 2001). Od monoterpena najzastupljeniji su monoterpenski ugljovodonici (55,9 – 71,5 %), dok su oksigenisani monoterepeni pronađeni samo u malom ukupnom procentu. Seskviterpeni

(18,2 – 31,88 %) su, takođe, dominantno predstavljeni seskviterpenskim ugljovodonicima (11,8 – 26,1 %). Etarsko ulje *J. communis* var. *communis* se karakteriše najvećim udelom monoterpena, i to, pre svega, monoterpenskih ugljovodonika, dok se etarsko ulje *J. communis* var. *saxatilis* karakteriše izuzetno visokim udelom seskviterpena u odnosu na sva ostala ulja. S druge strane, etarska ulja *J. deltooides* su pokazala najveći udeo diterpena od svih ispitivanih grupa.

Tri monoterepena,  $\alpha$ -pinen, limonen i sabinen, su dominantna jedinjenja u etarskom ulju. Zajedno, ova tri jedinjenja u proseku čine oko 51,5 % ukupnog sastava etarskog ulja. U zavisnosti od vrste i lokaliteta, dominante komponente su se smenjivale. Pa tako, kod etarskog ulja iglica *J. communis* var. *communis* dominantna komponenta je bila ili  $\alpha$ -pinen, ili sabinen, ili su pak obe komponente bile podjednako zastupljene. Kod *J. communis* var. *saxatilis* je to uvek bio  $\alpha$ -pinen, dok su se na drugom mestu smenjivali germakren D i sabinen, u zavisnosti od lokaliteta. Kod *J. deltooides* su to bili  $\alpha$ -pinen ili limonen, dok je u ispitivanoj populaciji *J. macrocarpa* dominirao  $\alpha$ -pinen. Ova tri terpena su proizvod barem tri različita enzima. Razlika u njihovim količinama može biti posledica različitog nivoa ekspresije, ali i nefunkcionalnosti nekog enzima. Monoterpen sintaze, zbog svojih specifičnosti, proizvode nekoliko monoterpena. Pa tako, (-)-limonen sintaza pored limonena (72%) sintetise i  $\alpha$ -pinen (4%) i sabinen (1%), (-)-limonen/(-)- $\alpha$ -pinen sintaza pored limonena i  $\alpha$ -pinena (35 i 25%), sintetise i 10% sabinena, dok (-)-sabinen sintaza sintetise svega 45% sabinena, ali sintetise i limonen i  $\alpha$ -pinen (<1 i 5%) (Bohlmann et al., 1999; Katoh et al., 2004; Roach et al., 2014).

Bez obzira na veliku varijabilnost, poređenje sastava etarskog ulja između svih ispitivanih taksona sa Balkanskog poluostrva je potvrdila da je sastav etarskog ulja pod jakom genetičkom kontrolom. Već na analizi glavnih komponenti je došlo do jakog odvajanja tri vrste – *J. macrocarpa*, *J. deltooides* i *J. communis*. Štaviše, dolazi i do odvajanja između dva ispitivana varijeteta vrste *J. communis*. Ovo odvajanje je dalje potvrđeno klaster i diskriminantnom analizom. Prema Hanoveru (1988) monoterpeni izolovani iz četinara su raznovrsni i stabilni. On dalje kaže da će genetički drift i protok gena imati najveći uticaj na varijabilnosti terpena, gde bi mutacija u regulatornim genima uzrokovala razlike u količinama pojedinih komponenti. Nekoliko autora (Cavaleiro et al., 2001; Ottavioli et al., 2009) je ispitivalo stabilnost komponentni etarskog ulja u zavisnosti od sezone. Oni su pronašli da je sastav etarskog ulja nekoliko vrsta roda *Juniperus* bio isti bez obzira na sezonu, što dalje potvrđuje značaj terpena u sistematici ovog roda.

Zanimljivo je i to da sastav etarskog ulja pokazuje korelaciju sa distribucijom taksona. Pa tako, etarsko ulje *J. deltoides*, vrste koja ima najmanji areal (istočni deo Mediterana, od Italije do Turske i dalje na istok do severnog Irana), pokazuje najmanju varijabilnost u sastavu etarskog ulja – kod ovog taksona se javljaju tri hemotipa ( $\alpha$ -pinenski,  $\alpha$ -pinen/limonenski i limonenski). Takođe, postoji jasna geografska distinkcija između kontinentalnih i priobalnih populacija, u smislu dominacije hemotipova. Ova podela se preklapa sa podelom između kontinentalnih i priobalnih populacija na osnovu kutikularnih alkana. S druge strane, *J. communis* var. *communis*, takson koji ima manje-više kontinuiranu distribuciju kroz najveći deo Evrope i deo Azije, pokazuje znatno veću varijabilnost – iz literature su dostupna tri hemotipa ( $\alpha$ -pinenski, sabinenski,  $\delta$ -kar-3-enski), gde podaci iz ovog rada upućuju na eventualno postojanje i četvrtog, koji bi bio intermedijaran između  $\alpha$ -pinenskog i sabinenskog. I kod ovog taksona postoji jasna geografska podela između severnih i južnih, odnosno istočnih i zapadnih populacija u Evropi. Štaviše, kod severno-evropskih populacija dominira  $\alpha$ -pinen kao glavna komponenta, dok je broj dominantnih komponenti znatno veći kod centralno- i južnoevropskih populacija.

Za razliku od *J. deltoides* i *J. communis* var. *communis*, druga dva ispitivana taksona imaju znatno fragmentisaniji areal. *J. communis* var. *saxatilis* u južnom delu Evrope naseljava staništa na većim nadmorskim visinama (>1000 m.n.v), pa mu je areal ograničen na visoke planine. Kod ovog taksona razlike u profilu etarskog ulja (odnosno dominantnim komponentama) su izuzetno velike; moglo bi se izdvojiti nekoliko prilično jasno odvojenih hemotipova (limonenski,  $\alpha$ -pinenski i sabinenski), sa prelaznim hemotipovima između svakog para. Uz to, jedino kod ovog taksona, u okviru sekcije *Juniperus*, postoje jedinke u čijem ulju dominira seskviterpen (germakren D). Na Balkanskom poluostrvu postoji jasna granica između zapadnih (submediteranskih) i kontinentalnih populacija. S druge strane, *J. macrocarpa* ima isključivo Mediteranski areal, naseljava samo priobalna područja, nedaleko od obale, ali (iz, za sada, nepoznatih razloga) areal je izuzetno fragmenitsan i predstavljen izolovanim populacijama. Iako je dominantna komponenta u svim do sada ispitanim populacijama *J. macrocarpa* širom njenog arela bila  $\alpha$ -pinen (izuzev jedne populacije sa Pirinejskog poluostrva), druge dve komponente su bile potpuno drugačije u svakoj populaciji. Od svih ispitivanih taksona, ovaj je imao najjednostavnije ulje (po broju komponenti). Poređenjem sastava etarskog ulja *J. macrocarpa* (dobijeni podaci kao i literaturni navodi) sa etarskim uljem *J. deltoides* i *J. oxycedrus* s.str. potvrđuje se izdvajanje ovog taksona kao zasebne vrste. Pored drugačijeg profila etarskog ulja, i zastupljenosti pojedinih grupa terpena, u etarskom ulju *J. macrocarpa* su detektovane komponente kojih nema u etarskom ulju *J. deltoides* (kao npr. abienol i (2E,6Z) farnezol).

### 5.3. Hloroplastni regioni kod ispitivanih predstavnika roda *Juniperus*

Od šest hloroplastnih regiona testiranih kod ispitivanih predstavnika roda *Juniperus*, uspešna PCR amplifikacija i utvrđivanje primarnog redosleda nukleotida amplifikovanih sekvenci je bila moguća u slučaju četiri regiona ( $trnC^{(GCA)}-trnD^{(GUC)}$ ,  $trnL^{(UAA)}-trnF^{(GAA)}$ ,  $trnG^{(UUC)}-trnS^{(GCU)}$  i  $psbA-trnH^{(GUG)}$ ). Ovi regioni, amplifikovani korišćenjem tzv. univerzalnih prajmera (Tabela 3.2), su i ranije korišćeni kod ovih ali i drugih predstavnika ovog roda i familije Cupressaceae, i pokazali su se kao više ili manje informativni u različitim studijama (Adams & Hojjati, 2012; Adams & Schwarzbach, 2011, 2013c; Adams & Wingate, 2008; Adams et al., 2007, 2008b, 2008d, 2009, 2010d; Mao et al., 2010; Rumeu et al., 2011; Terry et al., 2000; Zhang et al., 2005). Međutim, u daljim istraživanjima u kojima će biti korišćena varijabilnost navedenih hloroplastnih regiona kod predstavnika roda *Juniperus*, preporučuje se korišćenje modifikovanih prajmera za amplifikaciju tri regiona ( $trnL^{(UAA)}-trnF^{(GAA)}$ ,  $trnG^{(UUC)}-trnS^{(GCU)}$  i  $psbA-trnH^{(GUG)}$ ). Naime, s obzirom da su od 2014. godine u javnoj banci gena GenBank dostupni kompletni hloroplastni genomi 4 vrste roda *Juniperus* (*J. bermudiana*, *J. monosperma*, *J. scopolorum* i *J. virginiana* (Guo et al., 2014)), bilo je moguće proveriti komplementarnost nukleotida matrice i prajmera u mestima vezivanja prajmera koji su korišćeni za amplifikaciju navedenih regiona. Uočeno je da u mestima vezivanja pet prajmera, koji su korišćeni za amplifikaciju navedenih regiona, postoje do dve mutacije u genomu *Juniperus*, što dovodi do smanjenja specifičnosti vezivanja prajmera za matricu, i može uticati na uspešnost amplifikacije. Stoga je pet prajmera za amplifikaciju tri regiona ( $trnL^{(UAA)}-trnF^{(GAA)}$ ,  $trnG^{(UUC)}-trnS^{(GCU)}$  i  $psbA-trnH^{(GUG)}$ ) modifikovano putem zamene do dva nukleotida (Tabela 5.5), čime su prajmeri prilagođeni za amplifikaciju navedenih regiona kod predstavnika roda *Juniperus*.

Sa druge strane, dostupni genomske resursi su od velikog značaja za dalja istraživanja na molekularnom nivou u okviru roda *Juniperus*, zato što, između ostalog, omogućavaju pronalaženje potencijalno informativnih, ali do danas nekorisćenih regiona, kao i dizajniranje prajmera za njihovu amplifikaciju. Pored toga, oni omogućavaju i dizajniranje internih prajmera za sekvenciranje dužih regiona amplifikovanih korišćenjem publikovanih prajmera. Pa tako, usled velike dužine  $trnC^{(GCA)}-trnD^{(GUC)}$  kod predstavnika roda *Juniperus* (oko 1600 bp), amplifikovanog korišćenjem prajmera trnC i trnD (Demasure et al., 1995), bilo je

**Tabela 5.5.** Pregled originalnih i modifikovanih prajmera za amplifikaciju *trnG*<sup>(UUC)</sup>-*trnS*<sup>(GCU)</sup>, *psbA-trnH*<sup>(GUG)</sup> i *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> regiona hloroplastnog genoma kod roda *Juniperus*

Region	Smer	Tačan naziv prajmera <sup>a)</sup>	Sekvenca (5'-3')	Naziv novog prajmera	Sekvenca (5'-3')
<i>trnG</i> <sup>(UUC)</sup> - <i>trnS</i> <sup>(GCU)</sup>	R	<i>trnS</i> <sup>(GCU)</sup>	GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC	<i>trnS_m</i>	<b>A</b> CC GCT TTA GTC <b>C</b> GC TCA GC
	F	<i>psbA3f</i>	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C	<i>psbA3f_m</i>	GTT ATG C <b>A</b> C <b>G</b> AG <b>C</b> GT AAT GCT C
	R	<i>trnH_f05</i>	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC	<i>trnH_f05_m</i>	CGC <b>G</b> CC TGG TGG ATT CAC AAT CC
<i>trnL</i> <sup>(UAA)</sup> - <i>trnF</i> <sup>(GAA)</sup>	F	<i>e</i>	GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC	<i>e_m</i>	GGT <b>T</b> CG AGT CCC TCT ATC CC
	R	<i>f</i>	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	<i>f_m</i>	ATT TGA ACT GGT GAC <b>A</b> CA AG

<sup>a)</sup> reference date u Tabeli 3.2; masnim podvučenim slovima su označeni zamenjeni nukleotidi

neophodno dizajnirati interne prajmere za utvrđivanje primarnog redosleda nukleotida kompletnog regiona (Tabela 3.2).

Pored toga, korišćenje dostupnih genomskih resursa je omogućilo i utvrđivanje uzroka neuspešne PCR amplifikacije regiona *rp132-trnL*<sup>(UAG)</sup> i *3'rps16-5'trnK*, koji su se do danas pokazali kao veoma informativni kod većeg broja veoma raznovrsnih i nesrodnih taksona (Alarcón et al., 2013; Shaw et al., 2005, 2007; Stojanović et al., 2015). Za amplifikaciju ovih regiona su korišćeni univerzalni prajmeri Shaw et al. (2007). Međutim, za razliku od drugih taksona kod kojih su ovi prajmeri generisali željene produkte dužine oko 529-1008 bp (*3'rps16-5'trnK*) i 543-1417 bp (*rp132-trnL*<sup>(UAG)</sup>), uočeno je da, u slučaju regiona *3'rps16-5'trnK*, ne postoji mesto vezivanja jednog prajmera. Naime, mesto vezivanja prajmera *trnK*<sup>(UUU)</sup><sub>x1</sub> u okviru *trnK*<sup>(UUU)</sup> gena je detektovano, i u njemu nisu pronađene mutacije u odnosu na matricu. Međutim, ne postoji mesto vezivanja prajmera *rpS16x2F2* u okviru *rps16* gena. Prema navodima (Guo et al., 2014), *rps16* gen je kod rodova *Juniperus*, ali i *Taxus* i *Podocarpus* izgubio funkciju usled

*frameshift* mutacija, i postoji kao pseudogen (*ψrps16*). U takvom pseudogenu je najverovatnije došlo i do gubitka mesta vezivanja navedenog prajmera.

Neuspešnost amplifikacije drugog regiona, *rpl32-trnL<sup>(UAG)</sup>*, je drugačije prirode. Naime, u hloroplastnom genomu *J. virginiana* postoje mesta vezivanja oba prajmera (*trnL<sup>(UAG)</sup>* i *rpl32*) za amplifikaciju ovog regiona, i u okviru njih su uočene dve mutacije (*trnL<sup>(UAG)</sup>*) i tri mutacije (*rpl32*). Iako umanjena specifičnost vezivanja prajmera u mestima vezivanja može uticati na uspešnost amplifikacije ovog regiona, nedostatak produkata amplifikacije ovog regiona je zapravo posledica izmenjenog položaja gena *trnL<sup>(UAG)</sup>* i *rpl32* u hloroplastnom genomu *Juniperus* u odnosu na druge taksone. Naime, *trnL<sup>(UAG)</sup>* gen se nalazi na poziciji 30339..30418, a *rpl32* gena na poziciji 65479..65745 u hloroplastnom genomu *J. virginiana*, tako da su oni udaljeni više od 30 kb baza. To znači da je re-aranžman gena u hloroplastnom genomu predstavnika roda *Juniperus* osnovni uzrok neuspešne amplifikacije ovog regiona kod predstavnika ovog roda.

Pored navedenog, poznavanje primarnog redosleda nukleotida kompletnog hloroplastnog genoma *Juniperus* je omogućilo utvrđivanje još nekih specifičnosti ovog genoma, kao što su veličina genoma od oko 127 kb, prisustvo 82 gena koji kodiraju proteine, 4 ribozomalne RNK, 33 tRNK, 18 introna, potom odsustvo *ycf12* gen, kao i kod ostalih golosemenica.

Potrebno je spomenuti da je tokom utvrđivanja primarnog redosleda nukleotida ispitivanih hloroplastnih regiona uočeno prisustvo tzv. višeznačnih (*ambiguous*) pozicija, najviše u regionu *trnC<sup>(GCA)</sup>-trnD<sup>(GUC)</sup>* (Tabela 4.14), na kojima nije bilo moguće jednoznačno utvrditi da li je na toj poziciji prisutan jedan, dva ili više nukleotida. Navedeni fenomen se obično javlja usled nešto lošijeg kvaliteta sekvenciranja te može predstavljati njegov artefakt, ali, sa druge strane, može ukazivati i na prisustvo heterogene populacije hloroplastnih genoma u ispitivanim individuama roda *Juniperus*. Dodatne provere su neophodne za razrešenje navedenog problema.

S obzirom da su ispitivani hloroplastni regioni sadržavali i kodirajuće i nekodirajuće regione (intergenske spejsere: *trnC<sup>(GCA)</sup>-petN*, *petN-psbM*, *psbM-trnD<sup>(GUC)</sup>*, *psbA-trnI<sup>(CAU)</sup>*, *trnI<sup>(CAU)</sup>-trnH<sup>(GUG)</sup>*, *trnG<sup>(UUC)</sup>-psaM*, *psaM-trnS<sup>(GCU)</sup>*, *trnL<sup>(UAA)</sup>-trnF<sup>(GAA)</sup>* i gene: *petN*, *psbM*, *trnI<sup>(CAU)</sup>*, *psaM*, kao i delove gena *trnD<sup>(GUC)</sup>*, *trnH<sup>(GUG)</sup>*, *trnS<sup>(GCU)</sup>*, *trnF<sup>(GAA)</sup>*), važno je spomenuti da je shodno očekivanjima (Jansen & Ruhlman, 2012), najveći broj mutacija pronađen u nekodirajućim regionima hloroplastnog genoma - 56 pozicija sa supstitucijama baza u okviru



matrice čija je poravnata dužina 2.862 bp (ne računajući dodatne mutacije u okviru insercija različite dužine koje se javljaju samo kod pojedinih taksona), naspram svega sedam pozicija sa supstitucijama baza pronađenih u kodirajućim regionima (dužina poravnate matrice 526 bp). *Silent* supstitucije su detektovane u *psbM* i *psbA*, međutim, češće su bile substitucije koje za posledicu imaju zamenu aminokiselina u proteinima kodiranim odgovarajućim genima koji sadrže mutacije (*petN*, *psbM*). Kod nekoliko gena koji kodiraju tRNK su detektovane supstitucija baza (*trnH*, *trnG*, *trnS*, *trnL*, *trnI*), dok je kod *trnI* gena došlo do delecije 23 bp sa 3' kraja kod svih individua sekcije *Juniperus*. U okviru *psaM* gena, kod svih ispitivanih individua došlo je do insercije 6 nukleotida što bi za posledicu imalo inserciju aminokiselina izoleucina i alanina u proteinu kodiranim ovim genom.

Od ukupno 63 pozicije na kojima su detektovane substitucije baza u matrici dužine 3400 bp koja je sastavljena od sva četiri ispitivana hloroplastna regiona (ne računajući dodatne mutacije u okviru insercija različite dužine koje se javljaju samo kod pojedinih taksona), 25 mutacija odvaja autgrupu od ingrupe te se one mogu smatrati sinapomornim za sekciju *Juniperus*. Međutim, potrebno je spomenuti da je za nedvosmisleno karakterisanje navedenih mutacija kao sinapomornih za sekciju *Juniperus* potrebno uključiti u analize i dodatne taksone kao autgrupe. Kod 75 individua predstavnika ove sekcije, detektovano je 38 pozicija sa supstitucijama baza (*parsimony informative sites* i *singleton* mutacije, ne računajući dodatne mutacije u okviru insercija različite dužine koje se javljaju samo kod pojedinih taksona). Sa druge strane, u matrici je uočen i veliki broj dužinskih mutacija, 32 indela i 10 mikrosatelita sa mononukleotidnim motivom (A)<sub>n</sub> ili (T)<sub>n</sub>. Međutim, s obzirom da navedeni indeli obuhvataju proste ali i složene indele, koji sadrže dodatane indele i substitucije baza, broj dužinskih i tačkastih mutacija u nekodirajućim regionima je realno veći od navedenog.

Zanimljivo je spomenuti i prisustvo jednog hipervarijabilnog regiona u okviru *trnC*<sup>(GCA)</sup>-*trnD*<sup>(GUC)</sup> regiona (intergenski spejser *psbM-trnD*<sup>(GUC)</sup>, pozicija 1256..1514 u matrici) koji počinje i završava se poli-T regionom kod svih ispitivanih individua, a kod *J. macrocarpa*, *J. deltoides* i *J. sabina* sadrži insercije dužine 204 i 212 bp (kod *J. macrocarpa*), 231 bp (kod *J. deltoides*) i 161 bp (kod *J. sabina*) u navedenom poli-T regionu. Kod *J. communis*, međutim, postoji samo poli-T region bez dodatnih insercija, dok kod *J. virginiana* i ostale 3 vrste roda *Juniperus* čiji kompletni hloroplastni genomi su dostupni u GenBank (*J. bermudiana*, *J. monosperma* i *J. scopolorum* (Guo et al., 2014)), takođe postoji insercija duga 79-193 bp. S obzirom da je pokazano da dugi monotoni regioni, sačinjeni iz velikog broja ponovaka jednog nukleotida, mogu da formiraju petlje prilikom replikacije, može doći do delecije ili insercije cele petlje



(David, 2005), što ukazuje na to da prisustvo/odsustvo navedene insercije u okviru datog hipervarijabilnog regiona kod ispitivanih taksona najverovatnije može biti objašnjeno na ovaj način, odnosno, delecijom kod predaka *J. communis* ili insercijom kod zajedničkog pretka ostalih taksona koji sadrže inserciju.

Od 4 ispitivana hloroplastna regiona, kao najinformativniji se pokazao *trnC<sup>(GCA)</sup>-trnD<sup>(GUC)</sup>*, i to *pefN-psbM* spejser poravnate dužine 674 bp (22 pozicije sa supstitucijama baza, 10 indela, 2 mikrosatelita sa mononukleotidnim motivima, ne računajući dodatne mutacije u okviru insercija različite dužine koje se javljaju u ovom regionu samo kod pojedinih taksona). Stoga nije iznenađujuće da je ovaj region do danas intenzivno korišćen kod predstavnika roda *Juniperus* (Adams, 2011a). Kao najmanje informativan se pokazao *trnL<sup>(UAA)</sup>-trnF<sup>(GAA)</sup>* region poravnate dužine 292 bp, sa svega 3 pozicije sa supstitucijama baza, 4 indela i jednim regionom sa različitim brojem ponovaka motiva od 20 bp. Ovaj region, sa druge strane, sadrži i jedinu mutaciju koja je najverovatnije sinapomorfna za *J. communis* var. *intermedia*. Potrebno je spomenuti da je u ovom, ali i u ostalim regionima, detektovan veliki broj tačkastih mutacija koje su sinapomorfne za određene taksone, te se mogu koristiti kao tzv. "DNK barkodovi" za njihovu distinkciju (CBOL Plant Working Group, 2009). Iako je do danas predloženo nekoliko markera za "barkoding" kod biljaka, sve veći broj studija pokazuje da je pored standardnih barkoding fragmenata, kao što su *matK* i *rbcL*, potrebno koristiti dodatne regione da bi se obezbedila dovoljna količina informacija za razdvajanje blisko srodnih vrsta u taksonomskom kontekstu (González-Gutiérrez et al., 2013; Korotkova et al., 2011; Ran et al., 2010; Seberg & Petersen, 2009). Važno je napomenuti da su se kod predstavnika sekcije *Juniperus* kao sinapomorfni karakteri pokazali i indeli, kao i specifični brojevi ponovaka mononukleotidnih motiva na određenim mikrosatelitnim lokusima koji se, prema važećem shvatanju, ne koriste u svrhe DNK barkodinga (CBOL Plant Working Group, 2009)

U matrici dužine 3400 bp, detektovao je 15 karaktera koji su sinapomorfni za *J. communis*, od toga šest nukleotidnih karaktera u regionu *trnC<sup>(GCA)</sup>-trnD<sup>(GUC)</sup>*, jedan u regionu *psbA-trnH<sup>(GUG)</sup>*, tri u regionu *trnG<sup>(UUC)</sup>-trnS<sup>(GCU)</sup>*, tri insercije/delecije u regionu *trnC<sup>(GCA)</sup>-trnD<sup>(GUC)</sup>*, i po jedna insercija/delecija u regionima *psbA-trnH<sup>(GUG)</sup>* i *trnG<sup>(UUC)</sup>-trnS<sup>(GCU)</sup>*. Na jednom mikrosatelitnom lokusu u regionu *trnC<sup>(GCA)</sup>-pefN* kod ove vrste je broj ponovaka motiva (I) bio 12 do 13, dok je broj ponovaka kod drugih ispitivanih taksona drugačiji.

U matrici je detektovano 10 karaktera koji su sinapomorfni za *J. deltoides*, i to 8

nukleotidnih karaktera u regionu  $trnC^{(GCA)}-trnD^{(GUC)}$  i jedan u regionu  $psbA-trnH^{(GUG)}$ , kao i jedan indel u regionu  $trnC^{(GCA)}-trnD^{(GUC)}$ .

Detektovana su i četiri karaktera koja su sinapomorfna za *J. macrocarpa*, od toga, dva nukleotidna karaktera i dve insercije u regionu  $trnC^{(GCA)}-trnD^{(GUC)}$ . Na mikrosatelitnom lokusu regiona  $trnI^{(CAU)}-trnH^{(GUG)}$  sa motivom (A), broj ponovaka je bio karakterističan za populaciju sa Krita (9), dok je kod ostalih populacija *J. macrocarpa* i drugih taksona bio (10-14). Pored ovih, detektovani su i sinapomorfni karakteri za pojedine populacije *J. macrocarpa*. Detektovano je 5 karaktera koji su sinapomorfni za individue *J. macrocarpa* sa Krita, i to dva nukleotidna karaktera i tri insercije u regionu  $trnC^{(GCA)}-trnD^{(GUC)}$ . Detektovana su i dva karaktera koja su sinapomorfna za individue populacije *J. macrocarpa* iz okoline Trogira, i to jedan nukleotidni karakter i jedna insercija u regionu  $trnC^{(GCA)}-trnD^{(GUC)}$  (Tabela 4.16).

Uočeno je i prisustvo karaktera koji su prisutni kod više taksona sekcije *Juniperus*. Detektovane su dva nukleotidna karaktera u regionu  $trnC^{(GCA)}-trnD^{(GUC)}$  koji su sinapomorfni za *J. oxycedrus s.l.* Međutim, uočeno je i prisustvo karaktera deljenih između jednog taksona sekcije *Juniperus* i dela drugog taksona ove sekcije, npr. *J. deltoides* i *J. macrocarpa* sa Krita (dva nukleotidna karaktera, tri insercije/delecije i jedan mikrosatelit motiva (A) koji kod ovih individua sadrži 7 ponovaka, dok kod ostalih individua i taksona ima 6), ali i između jednog taksona sekcije *Juniperus* i sekcije *Sabina* - *J. macrocarpa* i *J. sabina* (jedan nukleotidni karakter u  $trnC^{(GCA)}-trnD^{(GUC)}$  regionu). Prisustvo ovakvih karaktera se obično objašnjava retencijom ancestralnih polimorfizama ili interspecijskom hibridizacijom praćenom introgresijom.

### 5.3.1. Filogenetski odnosi ispitivanih predstavnika roda *Juniperus*

Za konstrukciju filogenetskih stabala na osnovu ispitivanih hloroplastnih regiona bilo je potrebno najpre utvrditi optimalne modele evolucije sekvenci. Uočeno je da je za regione koji se odlikuju manjim brojem mutacija uključujući i kodirajuće regione matrice sastavljene od sva 4 regiona, pokazano na osnovu BIC vrednosti da su optimalni modeli evolucije sekvenci oni koji su primenljivi u slučajevima kada postoji veći udeo GC nukleotida i veći broj tranzicija od transverzija (T92, optimalan model evolucije *trnG*<sup>(UUC)</sup>-*trnS*<sup>(GCU)</sup> regiona), zatim, modeli koji razlikuju 2 tipa tranzicija a pretpostavljaju da se transverzije odvijaju sa podjednakom učestalošću (TN93, optimalni model evolucije *psbA-trnH*<sup>(GUG)</sup> regiona), kao i modeli koji pretpostavljaju nejednake učestalosti tranzicija i transverzija sa ili bez I korekcije koja uzima u obzir udeo invarijabilnih mesta (HKY, optimalni model evolucije *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> regiona; HKY+I, optimalni model evolucije matrice kodirajućih regiona sva četiri ispitivana hloroplastna regiona). Zanimljivo je napomenuti da, iako su za navedene regione na osnovu BIC vrednosti kao optimalni modeli evolucije sekvenci utvrđeni navedeni modeli, kod svih navedenih regiona, niske BIC vrednosti su uočene upravo za pet-parametarski HKY model sa ili bez G i/ili I korekcija.

Drugačiji trend je uočen kod regiona koji se odlikuju većim brojem mutacija, kao što je *trnC*<sup>(GCA)</sup>-*trnD*<sup>(GUC)</sup> region, matrica sastavljena od 4 ispitivana regiona i matrica nekodirajućih regiona sva 4 ispitivana regiona, kod kojih se kao optimalni model evolucije sekvenci, sa najnižim BIC vrednostima, pokazao tri-parametarski T92 model sa ili bez G i/ili I korekcija, ali je u svim slučajevima GTR model evolucije sa ili bez G i/ili I korekcija takođe imao niske BIC vrednosti. GTR model evolucije se smatra najopštijim, neutralnim i vremenski reverzibilnim modelom, i jedan je najčešće korišćenih modela u filogenetskim rekonstrukcijama.

Shodno očekivanjima vezanim za broj filogenetski informativnih mutacija u pojedinačnim hloroplastnim regionima, ML stabla konstruisana korišćenjem optimalnih modela evolucije za svaki pojedinačni region su uglavnom neinformativna u slučaju regiona sa malim brojem informativnih mutacija (*psbA-trnH*<sup>(GUG)</sup>, *trnG*<sup>(UUC)</sup>-*trnS*<sup>(GCU)</sup> i *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup>, Slike 4.3.2, 4.3.3, 4.3.4), dok su ML stabla konstruisana na osnovu regiona sa većim brojem mutacija (*trnC*<sup>(GCA)</sup>-*trnD*<sup>(GUC)</sup>, Slika 4.3.1), matrice nekodirajućih regiona sva 4 ispitivana

regiona (Slika 4.3.6) kao i matrice kodirajućih i nekodirajućih regiona sva 4 ispitivana regiona (Slika 4.3.5) informativna, i pokazuju topološku kongruentnost.

ML stablo konstruisano korišćenjem GTR+G modela evolucije matrice sastavljene od 4 ispitivana regiona, čija je poravnata dužina kod 75 individua predstavnika sekcije *Juniperus* i tri individue autgrupe *J. sabina* iznosi 3.400 bp, pokazuje da je sekcija *Juniperus* monofiletskog porekla (BS 100%) (Slika 4.3.5). Uočene su 2 statistički dobro podržane klade, **Klada I** (BS 100%) koja obuhvata sve individue *J. communis*, i **Klada II** (BS 78%) koja obuhvata sve individue *J. deltoides* i *J. macrocarpa*. Zanimljivo je napomenuti da je uočena divergencija predstavnika sekcije *Juniperus* u skladu sa neformalnom podelom na kleke sa plavim bobicama (u koje spada *J. communis*) i kleke sa crvenim ili mrkim bobicama (u koje spadaju *J. deltoides* i *J. macrocarpa*) (Adams, 2011a).

Odnosi u okviru **klade I** su ostali nerazjašnjeni, iako se može se uočiti trend grupisanja individua *J. communis* var. *communis* kao i jedinki *J. communis* var. *saxatilis* i *J. communis* var. *intermedia*. Naime, jedinke *J. communis* var. *intermedia* se sa nekoliko jedinki *J. communis* var. *communis* (Suva1, Suva2 i Mavrovo3) grupišu zajedno i zauzimaju terminalni položaj u **kladi I** (BS 53%), jedinke *J. communis* var. *saxatilis* uglavnom zauzimaju središnji položaj u ovoj kladi, dok jedinke *J. communis* var. *communis* uglavnom zauzimaju bazalni položaj u okviru **klade I**. Stoga se može zaključiti da, iako je filogenetska analiza zasnovana na 4 hloroplastna regiona poravnate dužine 3.400 nukleotida, ispitivani regiona ne sadrže dovoljan filogenetski signal, odnosno, nemaju dovoljnu rezoluciju da bi se razrešili odnosi u okviru kompleksa *J. communis*, odnosno na infraspecijском nivou. Međutim, imajući u vidu navedene trendove grupisanja koji se uglavnom poklapaju sa podelom na infraspecijском nivou, dodatne analize, koje bi uključile dodatne hloroplastne regione, mogle bi da razreše odnose u okviru *J. communis* s.l.

U okviru **klade II**, uočene su 2 dobro podržane subklade, *Ila* (BS 100%), koju čine predstavnici *J. deltoides*, i *Iib* (BS 46%), koji čine predstavnici *J. macrocarpa*. Sestrinski odnos ove dve vrste je uočen do danas. Šta više, postoji neslaganje o statusu ovog taksona. Neki autori smatraju da je *J. macrocarpa* zapravo podvrsta *J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa* (Farjon, 2001; Farjon & Filer, 2013), međutim, ove dve vrste se jasno razlikuju na morfološkim (Klimko et al., 2007), fitohemijskim i molekularnim karakterima (Adams, 2011a).

Zanimljivo je napomenuti da u okviru subklade *Ila* nije uočena dalja podela. Imajući u vidu da su ispitivane populacije *J. deltoides* distribuirane manje-više u celom arealu rasprostranjenja ove vrste na Balkanu, kao i da nije uočena divergencija individua iz međusobno prostorno

udaljenih populacija, kao što su populacije iz Rovinja, Pčinje i Krita (udaljene međusobno 730 do 1450 km), može se zaključiti da se *J. deltoides* sa Balkana odlikuje malom varijabilnošću na nivou hloroplastnog genoma. To sa jedne strane znači da bi dodatne analize, koje bi uključile dodatne hloroplastne regione, bile ograničenog uspeha, a sa druge strane, ukazuje na delovanje određenih procesa tokom evolucione istorije ovog taksona koji su doveli do sadašnjeg malog nivoa varijabilnosti na nivou hloroplastnog genoma kod *J. deltoides*. Ovo je u skladu sa istraživanjima Boratyński i saradnici (2014), koji su ispitivali varijabilnost *J. oxycedrus s.l.* sa područja Mediterana, Bliskog istoka i Atlantskih ostrva na nivou nuklearnih mikrosatelita, i pokazali da pored toga što postoji jasno odvajanje *J. oxycedrus s.str.* i *J. deltoides*, ova druga se može podeliti na dve grupe, Balkansku i Blisko-istočnu, pri čemu je najveći genetički diverzitet uočen upravo u Balkanskim populacijama. Autori su zatim pokazali da postoji mnogo manja varijabilnost kod *J. deltoides*, nego kod sestrinske *J. oxycedrus*, što su objasnili prolaskom ovih populacija kroz nekoliko uskih grla nakon odvajanja ova dva taksona pre 8-10 miliona godina (Mao et al., 2010). Sa druge strane, kao mogući pokretač diferencijacije Balkanskih i Blisko-istočnih populacija *J. deltoides* autori navode rekolonizacije ili, pak, fragmentacije areala, posebno tokom poslednjeg glacijalnog maksimuma (LGM).

Nasuprot tome, u okviru subklade *Iib*, uočena je statistički podržana diferencijacija *J. macrocarpa* na dve subklade, jednu koju čine individue iz populacije sa Krita (BS 79%) i drugu koju čine individue iz okoline Trogira (BS 68%). To ukazuje na duboku divergenciju i diferencijaciju populacija vrste *J. macrocarpa*. Međutim, to nije iznenađujuće, s obzirom da su u okviru celog areala rasprostranjenja, populacije ove vrste fragmentarno distribuirane, što ukazuje na mogućnost visoke genetičke diferencijacije populacija usled delovanja genetičkog drifta, uskih grla i efekata osnivača tokom vremena.

Boratyński i saradnici (2014) su pokazali da se jugozapadne populacije *J. macrocarpa* odlikuju najvećim diverzitetom alela na nivou nuklearnih mikrosatelita, te stoga autori smatraju da potencijalni glacijalni refugijum ove vrste može biti u zapadnom Mediteranu, odakle je usledila postglacijalna kolonizacija Mediterana. Sa druge strane, potrebno je napomenuti da se ispitivane individue *J. macrocarpa* nalaze u simpatriji sa individuama *J. deltoides*, pri čemu su individue ovih vrsta međusobno izmešane (na lokalitetu u blizini Trogira) ili se njihove populacije u prostoru nadovezuju jedna na drugu (lokalitet na Kritu). Iako je jasna distinkcija ovih vrsta i njihov sestrinski odnos uočen tokom filogenetskih rekonstrukcija kao i na nivou fitohemijskih markera, potrebno je naglasiti da individue *J. macrocarpa* sa Krita dele pet mutacija na nivou hloroplastnog genoma sa *J. deltoides*. Uočeni fenomen najverovatnije predstavlja

retenciju ancestralnih polimorfizama ili interspecijsku hibridizaciju praćenu introgresijom koja se odvijala samo u delu areala *J. macrocarpa*. Međutim, za razrešenje ovog problema potrebno je uključiti u analize i markere nuklearnog genoma, ali i dodatne populacije sa ostatka areala.

## 5.4 OPŠTA DISKUSIJA

Razvojem strukturnih instrumentalnih metoda u hemiji polovinom prethodnog veka, započinje era proučavanja sekundarnih metabolita biljaka sa taksonomskog aspekta. Šezdesetih godina se krenulo sa prvim analizama površinskih voskova kao hemotaksonomskih markera, a gotovo u isto vreme i analizama sastava etarskog ulja. Iako su ova istraživanja imala svoja ograničenja, posebno u tehničkim aspektima, ona su uspostavila bazu biohemijske sistematike.

Na osnovu fitohemijskih markera (alkana i etarskog ulja) bilo je moguće uočiti dva hemotipa u profilima površinskih alkana (kontinentalni i primorski), kao i nekoliko hemotipova u sastavu etarskog ulja. Podaci dobijeni na osnovu ovih markera kod ispitivanih populacija taksona sekcije *Juniperus* sa Balkanskog poluostrva dala su osnovu za dalja istraživanja ovog roda na osnovu izabranih fitohemijskih markera. Bez obzira na dobijene razlike u “rezoluciji” alkana i etarskih ulja, opšti trendovi su mogli biti uočeni. Naime, na osnovu oba fitohemijska markera dolazi do odvajanja primorskih i kontinentalnih populacija. Te razlike su, svakako, daleko veće kada se posmatraju samo alkani, najviše zbog njihove izuzetno male rezolucije, međutim one su uočljive i kod sastava etarskog ulja. Alkani su pokazali jako odvajanje primorskih od kontinentalnih populacija, koje je najjače bilo kod *J. deltoides*. Kada su u pitanju etarska ulja, odvajanje, iako i dalje jasno, je bilo donekle blaže. Naime, odvajanje koje postoji u pravcu primorje-kontinent, je bazirano na učestalosti detektovanih hemotipova, odnosno dominantnih komponenti etarskog ulja.

Svakako, u jednoj ovakvoj studiji teško je u potpunosti odvojiti uticaj ekoloških faktora, pogotovu kada je sastav epikutikularnih voskova u pitanju gde je pokazana statistički značajna korelacija. Iako je u ovom trenutku nemoguće dati odgovor na ovo pitanje, jasno se mogu uočiti neki trendovi. Razlikovanje vrsta na osnovu sastava alkana, pogotovu kada su u pitanju jedinke koje žive blizu, jeste moguće, međutim razlike između populacija iste vrste daleko prevazilaze razlike između taksona. Posmatrajući profile površinskih alkana kod ispitivanih populacija sa Balkana, kao i dostupne malobrojne podatke iz literature, uočljiv je jedan trend – što su uslovi sredine suroviji (pre svega hladne zime, sa niskim temperaturama) to je distribucija oko *N* manja, odnosno, to je veća dominacija jednog alkana. Ovo je uočljivo



i kod populacija proučavanih taksona sa Balkana, ali i kod *J. communis* var. *saxatilis* sa Alpa i Pirineja (Poveda et al., 2002), kao i nekoliko vrsta ovog roda iz istočnog Sibira (Tarasov et al., 2012). Različiti podaci o upotrebi alkana kao hemotaksonomskih markera potiču i od toga što u zavisnosti od taksona oni imaju različit značaj za preživljavanje biljke. Pa tako, kod kleke, koja je zimzelena četinar sušnih staništa, alkani najverovatnije imaju izuzetno bitnu ulogu u preživljavanju u takvim uslovima. Dosadašnja istraživanja pokazuju da suša i temperatura igraju znatnu ulogu u selekciji određenog profila površinskih alkana listova kod biljaka, pa tako, kod tropskih vrsta, kao i kod zeljastih i listopadnih vrsta, najbitniju ulogu imaće sredinski uslovi tokom vegetacione periode. S druge strane, kleka je zimzelena vrsta, za koju se pokazalo u ovim istraživanjima, da daleko više utiču nepovoljni zimski uslovi (temperature ispod tačke mržnjenja i zimska fiziološka suša) nego letnji, s obzirom na to da su kod kontinentalnih populacija, ali i onih na većim nadmorskim visinama, profilom epikutiklarnih voskova dominirali duži alkani, te da je kod njih dominacija jednog alkana (tritriakontana) bila daleko izraženija.

Za razliku od alkana, nijedna komponenta etarskog ulja nije pokazala linearnu zavisnost ni sa jednim od bioklimatskih faktora. Odsustvo korelacije sa biološkim faktorima ne znači i odsustvo selekcije ka određenim profilima. Naime, pokazano je u dosadašnji radovima da herbivori mogu da imaju značajnu ulogu u selekciji određenih hemotipova (Adams et al., 2013a; Markó et al., 2011). No, u svakom slučaju, zanimljivo je da se podaci dobijeni na osnovu sastava etarskog ulja poklapaju sa podacima dobijenim na osnovu površinskih alkana. Postoji jasno razdvajanje kontinentalnih i priobalnih populacija. Ovo odvajanje je bazirano na dominaciji određenih hemotipova. Pa tako, u primorskim populacijama *J. deltooides* dominiraju hemotipovi bogati limonenom (limonenski i intermedijerni hemotip) dok kod kontinentalnih populacija dominira  $\alpha$ -pinenski hemotip. Slično je pokazano i kod preostalih proučavanih taksona. Koliko je kvalitativni i kvantitativni sastav etarskog ulja pod jakom genetičkom kontrolom, pokazuju i dobijeni rezultati za ispitivane populacije taksona sekcije *Juniperus* sa Balkanskog poluostrva gde je dobijeno njihovo jasno odvajanje bez obzira na geografsko poreklo populacije. Svakako su razlike između dva varijeteta *J. communis* bile manje nego između *J. communis*, *J. deltooides* i *J. macrocarpa*, no bilo je moguće i ova dva taksona razlikovati.

Podudaranje rezultata fitohemijskih markera, dodatno potvrđuje diferencijaciju kontinentalnih i primorskih populacija, i tri vrste sekcije *Juniperus* sa Balkanskog poluostrva. Svakako, sem za vrstu *J. deltooides*, Balkan predstavlja tek mali deo ukupnog areala, i nemoguće je na osnovu ovih podataka izvući zaključke za cele vrste, no moguće je uočiti neke pravilnosti



prilikom poređenja sa literaturnim podacima. Činjenica da je sastav etarskog ulja *J. macrocarpa* iz okoline Trogira (ulje dobijeno SDE po Likens-Nikersonu) najsličniji sastavu etarskog ulja populacije sa susednog Hvara, koje je dobijeno destilacijom po Klevendžeru (Lešjak et al., 2014), govori u prilog jakoj genetičkog kontroli sastava, jer je za pretpostaviti da su ovako bliske populacije, genetički i najsirodnije. Ovo, kao i uklapanje dobijenih podataka istraživanih populacija sa literaturnim podacima, potvrđuje upotrebljivost, pre svega terpena, kao hemotaksonomskih markera kod roda *Juniperus*, pogotovu na infraspecijskom nivou. Prilikom korišćenja alkana, pak, treba biti oprezniji, jer bioklimatski faktori mogu imati jak uticaj na detektovan sastav površinskih alkana.

Od četiri hloroplastna regiona koji su ispitivani kod predstavnika sekcije *Juniperus*, najinforamtivniji je bio *trnC*<sup>(GCA)</sup>-*trnD*<sup>(GUC)</sup> region poravnate dužine 1.684, jer je sadržao 63 mutacija (supstitucija baza i dužinskih mutacija), od kojih je 17 karaktera sinapomorfno za sekciju *Juniperus*, po devet za *J. communis* i *J. deltoides*, četiri za *J. macrocarpa* i jedan za neformalnu grupu kleka sa crvenim/mrkim šišaricama. Kao najmanje informativan se pokazao *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> poravnate dužine 344 bp, jer je sadržao 9 mutacija (supstitucija baza i dužinskih mutacija) od kojih samo jedna mutacija odvaja *J. communis* od *J. oxycedrus s.l.*

Diferencijacija populacija i taksona na nivou hloroplastnog genoma se u i izvesnom stepenu preklapa sa rezultatima fitohemijskih istraživanja. Naime, podela na tri jasno odvojena taksona – *J. communis*, *J. deltoides* i *J. macrocarpa* uočena ispitivanjem površinskih alkana iglica i etarskog ulja izolovanog iz iglica ispitivanih populacija, jasno je uočljiva i u filogenetskoj analizi na nivou ispitivanih regiona hloroplastnog genoma.

Kod *J. communis*, na nivou fitohemijskih markera i na nivou hloroplastnog genoma nije bilo moguće utvrditi jasno odvajanje varijeteta *communis* i *saxatilis*. Poređenjem distribucije dominantnih komponenti etarskog ulja kod predstavnika ovih varijeteta, uočavaju se slične tendencije kao kod *J. deltoides* i *J. macrocarpa*. Kod *J. communis* var. *communis*, koji ima manje-više kontinuiranu distribuciju širom Evrope a ispitivane populacije predstavljaju rubne populacije, razlike u sastavu etarskog ulja su u formi fine kline, gde udeo  $\alpha$ -pinena lagano raste od zapada ka istoku, dok udeo sabinena polako opada istom klinom. *J. communis* var. *saxatilis* ima disjunktni areal u južnoj i centralnoj Evropi, te su i razlike u dominantnim komponentama etarskog ulja drastičnije između populacija u odnosu na var. *communis*. Filogenetska analiza, sa druge strane, nije pokazala jasnu distinkciju ovih taksona, ali je uočena tendencija odvajanja var. *communis* od var. *saxatilis* i var. *intermedia*, pošto u okviru **klade I** var. *intermedia* sa nekoliko

individua var. *communis* zauzima terminalni, položaj, var. *saxatilis* središnji, a var. *communis* pretežno bazalni položaj u navedenoj kladi, što ukazuje na to da bi rezolucija mogla biti poboljšana uključivanjem u analize dodatnih hloroplastnih regiona.. Zanimljivo je da je uočen jedan nukleotidni karakter, G na poziciji 3.259 u okviru regiona *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup>, koji je najverovatnije sinapomorfna za var. *intermedia*.

Fitohemijski markeri su pokazali da je interpopulaciona varijabilnost sastava površinskih alkana i etarskog ulja iglica kod ispitivanih inidividua iz populacija *J. deltoides*, distribuiranih u okviru najvećeg dela areala ove vrste, najmanja u poređenju sa drugim ispitivanim taksonima. Međutim, ipak je bilo moguće detektovati određenu prostornu diferencijaciju populacija. Naime, na nivou površinskih alkana, bila je uočljiva diferencijacija na istočne i zapadne, odnosno kontinentalne i priobalne populacije, što je u izvesnoj meri u vezi i sa ekološkim faktorima. Isti trend je uočen na nivou terpena, gde je distribucija hemotipova u populacijama odgovorna za diferencijaciju istočnih i zapadnih populacija. Međutim, na nivou hloroplastnog genoma, *J. deltoides* se odlikuje veoma malom varijabilnošću, te nije bilo moguće uočiti ni diferencijaciju individua iz prostorno veoma udaljenih populacija, kao što su Rovinj, Pčinja i Krit (udaljene međusobno 730 do 1.450 km). Ovakav rezultat ukazuje na to da je, sa jedne strane, *J. deltoides* tokom evolutivne istorije najverovatnije prolazio kroz uska grla, što je dovelo do smanjenja nivoa varijabilnosti na nivou hloroplastnog genoma, što je uočeno i u ranijim studijama na nivou nuklearnog genoma (Boratyński et al., 2014). Sa druge strane, dodatne analize sa dodatnim hloroplastnim regionima najverovatnije ne bi mogle da doprinesu sticanju boljeg uvida u genetičku diferencijaciju populacija u okviru areala distribucije ovog taksona.

Nasuprot njima, sastav etarskog ulja *J. macrocarpa* u populacijama distribuiranim širom areala, je pokazao izuzetnu prostornu diferencijaciju. I dok je kod sestrinske *J. deltoides* uočena izvesna klinalna distribucija hemotipova, kod *J. macrocarpa* postoje oštre razlike u sastavu etarskog ulja u okviru areala distribucije. Na nivou hloroplastnog genoma je, takođe, uočena statistički podržana diferencijacija individua iz dve populacije – jedne sa Balkana (Trogir) i druge udaljene ostrvske populacije (Krit). Zanimljivo je da su na nivou hloroplastnog genoma uočene mutacije deljene između *J. deltoides* i *J. macrocarpa* sa Krita, što može predstavljati retenciju ancestralnih polimorfizama ili interspecijsku hibridizaciju praćenu introgresijom koja se odvijala samo u delu areala *J. macrocarpa*. Uključivanje dodatnih populacija kao i molekularnih markera nuklearnog genoma bi doprinelo sticanju boljeg uvida u evolucionu istoriju ovog taksona..

Ilustracija: *Juniperus oxycedrus* L., Krüssmann, G. (1972). Handbuch der Nadelgehölze (Berlin: Paul Parey), pp. 137.



# 6 ZAKLJUČCI

1. U kutikularnim voskovima ispitivanih taksona sa Balkanskog poluostrva detektovani su alkani u nizu od  $C_{21}$  do  $C_{35}$ , osim kod populacija *J. communis* var. *communis* sa Neretve i iz Mavrova, gde su detektovani i kraći alkani ( $C_{18}$ - $C_{35}$ ). Najzastupljeniji alkan u svim populacijama kod svih ispitanih taksona je bio tritriakontan. Pored tritriakontana, u većim količinama su se nalazili  $C_{29}$ ,  $C_{31}$ ,  $C_{35}$ .
2. U uzorcima dominiraju alkani dužeg niza, što i odgovara generalno kseromorfnoj prirodi ovih taksona. Ujedno, jedinke koje su pokazale i najmanju kseromorfnost (široke, relativno mekane iglice, *J. macrocarpa*, Trogir) imale su i najveći udeo alkana srednjeg niza.
3. Univarijantne analize su pokazale odvajanje sva četiri taksona (*J. communis* var. *communis*, *J. communis* var. *saxatilis*, *J. deltoides*, *J. macrocarpa*) na osnovu većine alkana. Multivarijantna statistička obrada rezultata ispitivanih alkana na celokupnom uzorku je pokazala manje-više iste tendencije kao i rezultati statističke obrade po pojedinim vrstama. Analiza glavnih komponenti i klaster analiza pokazuju jako odvajanje (sub)mediteranskih i kontinentalnih populacija, bez obzira na taksonomsku pripadnost. Iako ove dve analize daju prednost geografskoj asocijaciji, pre nego taksonomskoj, jedinke istog taksona su unutar svakog od ta dva geografska regiona grupišu zajedno. Diskriminantna analiza odvaja i grupiše taksone na osnovu sastava epikutikularnih voskova, gde je odvajanje *J. communis* var. *communis* i var. *saxatilis* najslabije.
4. Prosečna dužina lanca ( $N$ ) i disperzija oko nje ( $d$ ) pokazuje u svim populacijama sličnu tendenciju – što su uslovi aridniji, to je prosečna dužina lanca veća, i što su uslovi “surovij” (veće amplitude u vrednostima temperature tokom godine, temperature ispod tačke mrženjenja, letnja suša i fiziološka zimska suša...) to je disperzija oko prosečne dužine lanca manja, odnosno dominacija jednog alkana je izraženija
5. Kod *J. communis* var. *communis* pored tritriakontana (66,6%), dominirali su i pentatriakontan (11,8%) i hentriakontan (8,3%), dok se kod *J. communis* var. *saxatilis* može uočiti jako odvajanje u pravcu zapad-istok, gde su pored dominantnog tritriakontana (59,1 %), u zavisnosti od lokaliteta u većim količinama bila zastupljena druga dva alkana. Kod kontinentalnih populacija, u većim količinama se nalaze hentriakontan (8,6%) i pentatriakontan (8,2%), dok se kod submediteranskih nalaze hentriakontan (19,8%) i nonakozan (10,9%). Kod *J. deltoides* odvajanje između kontinentalnih i priobalnih populacije je još jače. Kod kontinentalnih populacija pored dominantnog tritriakontana (61,1 %), u većim količinama nalaze i hentriakontan (14,0 %) i pentatriakontan (9,3 %),

dok je dominacija tritriakontana u obalskim populacijama znatno manje izražena (41,3%), a u većim količinama se nalaze i hentriakontan (23,2%) i nonakozan (17,6%). Kod *J. macrocarpa*, pored dominantnog tritriakontana (41,9%), dominiraju takođe hentriakontan (20,9%) i nonakozan (12,6%).

6. Prosečna dužina ugljovodoničnog lanca ( $N$ ) je imala najmanju vrednost kod *J. deltooides* (28,5 - Senj) i *J. macrocarpa* (30,5 - Trogir), a najvišu kod *J. communis* var. *communis*. (32,8 – Deliblatska peščara). Najmanja disperzija oko  $N$  ( $d$ ) je pronađena kod populacije *J. communis* var. *saxatilis* (Kopaonik,  $d=1,4$ ), a najveća kod primorske populacije *J. deltooides* (Senj,  $d=10,4$ ). Generalna tendencija je da od zapada ka istoku dolazi do povećanja prosečne dužine ugljovodoničnog lanca ( $N$ ) i smanjenja disperzije oko nje ( $d$ ). Najveća varijacija u prosečnoj dužini lanca ( $N$ ) od čak četiri C atoma je pronađena kod *J. deltooides*, dok je ona bila svega dva C atoma kod *J. communis*.
7. Regresiona analiza urađena kod populacija *J. communis* var. *saxatilis* je pokazala da dvanaest od devetnaest bioklimatskih parametara imaju statistički značajnu korelaciju sa relativnim udelom alkana kao i  $N$  i  $d$  vrednostima. Većina bioklimatskih parametara vezanih za temperaturu ne pokazuju statistički značajnu korelaciju sa alkanima. Jedino je temperaturna sezonalnost (BIO4) pokazala visoku pozitivnu korelaciju sa dužim alkanima, a negativnu sa kraćim. Odnosno, duži alkani su bili povezani sa onim populacijama u kojima su razlike između najviših i najnižih temperatura u toku godine bile najveće. S druge strane, većina bioklimatskih parametara vezanih za precipitaciju je pokazala statistički značajnu i visoku korelaciju. Svi ovi parametri pokazuju tendenciju da se sa smanjenjem količina padavina povećava udeo dužih alkana ( $C_{31+}$ ). Sastav alkana nije bio u korelaciji sa nadmorskom visinom, dok je pronađena relativno umerena korelacija sa nagibom terena. *Pirsonov* koeficijent korelacije za kontinentalne ( $R=0,42$   $p=3,26 \times 10^{-5}$ ) i submediteranske populacije ( $R=0,51$   $p=2,34 \times 10^{-10}$ ) je pokazao statistički značajnu ali umerenu korelaciju sa nagibom terena.
8.  $N$  vrednost je pokazala statistički značajnu korelaciju sa nagibom terena.  $N$  i  $d$  vrednosti pokazuju sličan trend kao i pojedinačni alkani – pronađena je visoka pozitivna korelacija sa godišnjim temperaturnim rasponom (BIO7) i srednjom temperaturom najsušnijeg perioda (BIO9), kao i negativne korelacije sa bioklimatskim parametrima precipitacije (npr. BIO12, BIO15, BIO17) što sve sugeriše da aridnost igra važnu ulogu. Uočen je jedan zanimljiv trend – što su uslovi staništa bili suroviji (velike razlike između najnižih i najviših temperatura u toku godine, zimska fiziološka suša kao i letnja suša), to je manja disperzija oko  $N$ .

9. *Mantelov* i *Parcijalni Mantelov* test su na celom setu podataka pokazali statistički značajnu korelaciju sa celim setom bioklimatskih parametara, ali je ta veza bila nešto slabija, ukazujući na isto tako jaku ulogu genetičkih faktora u diferencijaciji populacija.
10. Kako je Kopaonik jedini lokalitet gde zajedno žive tri taksona (*J. communis* var. *communis*, *J. communis* var. *saxatilis* i *J. deltoides*), multivarijacionom analizom je pokazan jak uticaj genetičkih faktora na sastav alkana epikutikularnih voskova, s obzirom na to da je moguće razlikovati ova tri taksona na osnovu sastava epikutikularnih voskova iako žive na istom lokalitetu, te su izložena istom setu ekoloških faktora.
11. U etarskom ulju izabranih vrsta sekcije *Juniperus* sa Balkanskog poluostrva identifikovano je preko 200 jedinjenja. Najviše jedinjenja je identifikovano u etarskom ulju iglica *J. deltoides* (208), a najmanje kod *J. macrocarpa* (103). Monoterpeni su dominantna grupa u etarskom ulju (61,6 – 75,2 %). Od monoterpena najzastupljeniji su monoterpeni ugljovodonici (55,9 – 71,5 %), dok su oksigenisani monoterepeni pronađeni samo u malom ukupnom procentu. Seskviterpeni (18,2 – 31,88 %) su, takođe, dominantno predstavljeni seskviterpenskim ugljovodonicima (11,8 – 26,1 %).
12. Poređenje sastava etarskog ulja između svih ispitivanih taksona sa Balkanskog poluostrva je potvrdilo da je sastav pod jakom genetičkom kontrolom. Već u analizi glavnih komponenti došlo je do jakog odvajanja tri vrste – *J. macrocarpa*, *J. deltoides* i *J. communis*. Štaviše, dolazi i do odvajanja između dva ispitivana varijeteta vrste *J. communis*. Ovo odvajanje je dalje potvrđeno klaster i diskriminantnom analizom.
13. Sastav etarskog ulja pokazuje korelaciju sa distribucijom taksona. *J. deltoides*, koji ima najmanji areal, pokazuje najmanju varijabilnost u sastavu etarskog ulja. Kod ovog taksona se javljaju tri hemotipa ( $\alpha$ -pinenski,  $\alpha$ -pinen/limonenski i limonenski). S druge strane, *J. communis* var. *communis*, takson koji ima manje-više kontinuiranu distribuciju kroz najveći deo Evrope i dela Azije, pokazuje znatno veću varijabilnost. I kod ovog taksona postoji jasna geografska podela između severnih i južnih, odnosno istočnih i zapadnih populacija u Evropi. Štaviše, kod severnoevropskih populacija dominira  $\alpha$ -pinen kao glavna komponenta, dok je broj dominantnih komponenti znatno veći kod centralno- i južnoevropskih populacija. Kod *J. communis* var. *saxatilis* razlike u profilu etarskog ulja (odnosno dominantnim komponentama) su izuzetno velike. Uz to, jedino kod ovog taksona u okviru sekcije *Juniperus* postoje jedinke u čijem ulju dominira seskviterpen (germakren D). Na Balkanskom poluostrvu postoji jasna granica između

zapadnih (submediteranskih) i istočnih (kontinentalnih) populacija. Za razliku od ostalih ispitivanih taksona, ulje *J. macrocarpa* ima samo jednu izuzetno dominantnu komponentu, dok se velika većina nalazi u malom procentu.

14. Etarsko ulje *J. communis* var. *communis* se karakteriše najvećim udelom monoterpena, i to, pre svega, monoterpenskih ugljovodonika, dok se etarsko ulje *J. communis* var. *saxatilis* karakteriše izuzetno visokim udelom seskviterpena u odnosu na sva ostala ulja. S druge strane, etarska ulja *J. deltoides* su pokazala najveći udeo diterpena od svih ispitivanih grupa.
15. U etarskom ulju izolovanom iz iglica *J. communis* var. *communis* detektovano je 117 jedinjenja. Etarskim uljem dominiraju monoterpeni (75,2%). Dva monoterpena,  $\alpha$ -pinen i sabinen, su dominantna jedinjenja, gde zajedno u proseku čine 55,0 % ukupnog etarskog ulja. Sastav etarskog ulja je pokazao geografsku diferencijaciju. Kod *J. communis* var. *communis* je pokazao tendenciju smanjenja udela sabinena u pravcu zapad-istok, i povećanja udela  $\alpha$ -pinena.
16. U etarskom ulju izolovanom iz iglica *J. communis* var. *saxatilis* detektovano je 141 jedinjenje, gde dominiraju monoterpeni (67,3%). Dominantno jedinjenje je  $\alpha$ -pinen koji u proseku čini 50,4 % etarskog ulja. Sastav etarskog ulja je pokazao geografsku diferencijaciju. U submediteranskim populacijama germakren D je drugo najzastupljenije jedinjenje (7,0%), dok je u kontinentalnim populacijama to sabinen (17,2%). Analiza glavnih komponentni je pokazala odvajanje submediteranskih od kontinentalnih populacija, dok je klaster analiza pokazala da populacije koje su geografski bliže pokazuju i sličniji sastav etarskog ulja, te se grupišu u odvojene subklade. Diskriminantna analiza je potvrdila odvajanje četiri grupe.
17. U etarskom ulju izolovanom iz iglica *J. deltoides* je detektovano 208 jedinjenja. U ulju dominiraju monoterpeni (61,6%). Dva monoterepena,  $\alpha$ -pinen i limonen, su dominantna jedinjenja, gde zajedno u proseku čine oko 46,7 % ukupnog etarskog ulja. Analiza glavnih komponenti svih trinaest populacija je pokazala odvajanje jedinki na dve grupe u zavisnosti od dominantne komponente, a dalje statističke analize su pokazale postojanje tri grupe, potencijalna hemotipa:  $\alpha$ -pinenski,  $\alpha$ -pinen/limonenski (intermedijarni) i limonenski hemotip. U mediteranskim populacijama dominiraju limonenski i inermedijarni, dok u kontinentalnim dominira  $\alpha$ -pinenski tip. Jedina populacija koja odskaje od svih je iz Žanjica kod koje dominira  $\alpha$ -pinenski tip. Ove jedinke žive na potpuno drugačijem staništu, na pesku, na svega nekoliko metara od otvorenog mora.



18. U etarskom ulju *J. macrocarpa* je detektovano 103 jedinjenja, od kojih dominiraju monoterpeni (68,8 %). Dominantno jedinjenje je  $\alpha$ -pinen, koji u proseku čini oko 55,5 % ulja, dok je germakren D drugo jedinjenje po procentualnom sadržaju (6,0%) u ukupnom ulju.
19. U poređenju sa literaturnim podacima, etarsko ulje *J. deltoides* pokazuje veliku homogenost na celom arealu, i značajne kvalitativne razlike u sastavu od *J. oxycedrus s.str.* S druge strane, sastav etarskog ulja *J. communis* var. *communis* a pogotovu sa *J. communis* var. *saxatilis* je znatno varirao širom areala. Dobijeni podaci za Balkanske populacije *J. communis* var. *communis* se u potpunosti uklapaju sa profilima etarskog ulja izolovanog iz iglica ovog taksona širom Evrope. Etarsko ulje *J. communis* var. *saxatilis* pokazuje opštu sličnost sa uljem grčkih kleka, međutim profili etarskog ulja dobijenog širom Evrope ukazuju na velike razlike između ovih disjunktnih populacija. Etarsko ulje *J. macrocarpa* uvek ima izrazito dominantan  $\alpha$ -pinen, dok druge dominantne komponente veoma variraju od lokaliteta do lokaliteta. Profil etarskog ulja populacije sa Hvara je bio najbliži onom u populaciji iz Trogira.
20. Od četiri hloroplastna regiona koji su ispitivani i za koje je bilo moguće odrediti primarni redosled nukleotida pomoću jednog do četiri prajmera, najinformativniji je bio *trnC*<sup>(GCA)</sup>-*trnD*<sup>(GUC)</sup> region poravnate dužine 1.684 kod 69 individua, jer je sadržao 63 mutacije (supstitucije baza i dužinske mutacije). Kao najmanje informativan se pokazao *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> poravnate dužine 344 bp, jer je sadržao svega devet mutacija (supstitucija baza i dužinskih mutacija) od kojih samo jedna mutacija odvaja *J. communis* od *J. oxycedrus s.l.*, a uočen jedan nukleotidni karakter, koji je najverovatnije sinapomorfan za var. *intermedia*.
21. Kod 75 individua predstavnika sekcije *Juniperus* u matrici sastavljenoj od četiri ispitivana hloroplastna regiona poravnate dužine 3400 bp, detektovano je 38 pozicija sa supstitucijama baza (*parsimony informative sites* i *singleton* mutacije), kao i veliki broj dužinskih mutacija, 32 indela i 10 mikrosatelita sa mononukleotidnim motivom (A)<sub>n</sub> ili (T)<sub>n</sub>, ne računajući dodatne mutacije u okviru insercija različite dužine koje se javljaju samo kod pojedinih taksona.
22. Shodno očekivanjima, najveći broj mutacija pronađen u nekodirajućim regionima hloroplastnog genoma 56 pozicija sa supstitucijama baza u okviru 2.862 bp (ne računajući dodatne mutacije u okviru insercija različite dužine koje se javljaju samo kod



- pojedinih taksona), naspram svega sedam pozicija sa supstitucijama baza pronađenih u kodirajućim regionima čija je dužina 526 bp. Najinformativnijim se pokazao *pe1N-psbM* spejser poravnate dužine 674 bp (22 pozicije sa supstitucijama baza, 10 indela, 2 mikrosatelita sa mononukleotidnim motivima, ne računajući dodatne mutacije u okviru insercija različite dužine koje se javljaju u ovom regionu samo kod pojedinih taksona).
23. Optimalni model evolucije regiona sa najvećim brojem mutacija (*trnC*<sup>(GCA)</sup>-*trnD*<sup>(GUC)</sup>) kao i matrice sastavljene od četiri ispitivana regiona i matrice nekodirajućih regiona sva četiri ispitivana regiona je GTR+G, dok su se za regione sa manjim brojem mutacija kao optimalni modeli evolucije pokazali manje opšti modeli, uključujući i HKY model.
24. ML stablo konstruisano na osnovu matrice četiri ispitivana regiona poravnate dužine 3.400 bp kod 78 individua i GTR+G modela evolucije, pokazuje da je sekcija *Juniperus* monofiletskog porekla. Uočene su 2 statistički dobro podržane klade, Klada I (BS 100%) koja obuhvata sve individue *J. communis*, i Klada II (BS 78%) koja obuhvata sve individue *J. deltoides* i *J. macrocarpa*. Odnosi u okviru klade I su ostali nerazjašnjeni, iako se može se uočiti trend grupisanja individua *J. communis* var. *communis* kao i jedinki *J. communis* var. *saxatilis* i *J. communis* var. *intermedia*. U okviru klade II, uočene su 2 dobro podržane subklade, IIa (BS 100%), koju čine predstavnici *J. deltoides*, i IIb (BS 46%), koji čine predstavnici *J. macrocarpa*. Odnosi unutar subklade IIa nisu razjašnjeni. Nasuprot tome, u okviru subklade IIb, uočena je statistički podržana diferencijacija *J. macrocarpa* na dve subklade, jednu koju čine individue iz populacije sa Krita (BS 79%) i drugu koju čine individue iz okoline Trogira (BS 68%). To ukazuje na duboku divergenciju i diferencijaciju populacija vrste *J. macrocarpa*.
25. Diferencijacija populacija i taksona na osnovu četiri generisana regiona hloroplastnog genoma se u i izvesnom stepenu preklapa sa rezultatima fitohemijskih istraživanja. Naime, podela na tri jasno odvojena taksona – *J. communis*, *J. deltoides* i *J. macrocarpa* uočena ispitivanjem površinskih alkana iglica i etarskog ulja izolovanog iz iglica ispitivanih populacija, je jasno uočljiva i u filogenetskoj analizi na nivou ispitivanih regiona hloroplastnog genoma
26. Filogenetska analiza nije pokazala jasnu distinkciju populacija i infraspecijskih taksona koja je uočena na fitohemijskim markerima, ali je uočena tendencija odvajanja var. *communis* od var. *saxatilis* i var. *intermedia*, pošto u okviru klade I, var. *intermedia* sa nekoliko individua var. *communis* zauzima terminalni položaj, var. *saxatilis* središnji, a var. *communis* pretežno bazalni položaj u navedenoj kladi.

27. Odnosi unutar subklade sa individuama *J. deltooides* nisu razjašnjeni zbog male varijabilnosti ispitivanih hloroplastnih regiona kod individua uzorkovanih iz skoro celog areala ove vrste, što se podudara sa podacima dobijenim korišćenjem nuklearnih mikrosatelita, i ukazuje na istorijske procese, kao što su uska grla, fragmentacije areala i/ili rekolonizacije iz refugijuma, koji su tokom vremena doveli do smanjenja varijabilnosti u populacijama *J. deltooides*.
28. Filogenetska analiza je pokazala statistički podržanu diferencijaciju *J. macrocarpa* na dve subklade, jednu koju čine individue iz populacije sa Krita i drugu koju čine individue iz okoline Trogira. To ukazuje na duboku divergenciju i diferencijaciju populacija vrste *J. macrocarpa*, što se podudara sa rezultatima fitohemijskih karaktera. Ovo je u skladu sa očekivanjima, s obzirom da su u okviru celog areala rasprostranjenja, populacije ove vrste fragmentarno distribuirane, što ukazuje na mogućnost visoke genetičke diferencijacije populacija usled delovanja genetičkog drifta, uskih grla i efekata osnivača tokom vremena.
29. Dodatne analize koje bi uključile druge hloroplastne regione bi, najverovatnije, doprinele razjašnjavanju infraspecijskih odnosa *J. communis s.l.*, ali ne odnose unutar vrste *J. deltooides*. Uključenje nuklearnih regiona i dodatnih populacija bi najverovatnije omogućilo bolji uvidu u taksonomske, genetičke i evolutivne procese u populacijam kleka iz sekcije *Juniperus*, te doprinelo razumevanju fenomena deljenih polimorfizama određenih taksona, koji mogu nastati usled retencije ancestralnih polimorfizama ili hibridizacijom i introgresijom.
30. U matrici četiri ispitana hloroplastna regiona poravnate dužine 3.400 bp kod 75 individua, detektovao je petnaest karaktera koji su sinapomorfni za *J. communis*, deset za *J. deltooides*, četiri za *J. macrocarpa*, kao i 28 karaktera koji odvajaju ingrupu od autgrupe, te se mogu koristiti u svrhe barkodinga
31. Dobijeni rezultati istraživanja fitohemijskih (*n*-alkana i etarskih ulja) i molekularnih markera (hloroplastne DNK) ukazuju na izuzetnu kompleksnost proučavane odabrane grupe kleka. Rezultati analize ogromnog broja uzoraka, korišćenjem najsavremenijih fitohemijskih i molekularnih metoda, ukazuju na veliki značaj ovih pristupa u razumevanju biologije, evolucije i filogeografije i u rasvetljavanju srodničkih odnosa kompleksne grupe Balkanskih vrsta iz sekcije *Juniperus*, kao i roda *Juniperus* u celini.

# 7 LITERATURA

- ABBASIPOUR, H., MOZAFFARI, F., SHEIKHI, A., & SABOORI, A. (2011). Effect of essential oil vapours of *Juniperus sabina* L. and *Thuja orientalis* (Cupressaceae) on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). In Third Meeting.
- ABBASSY, M.A., & MAREI, G.I. (2013). Antifungal and Chemical Composition of Essential Oils of *Juniperus communis* L. and *Thymus vulgaris* L. against Two Phytopathogenic Fungi. *J. Appl. Sci. Res.* 9, 4584–4588.
- ABDEL-KADER, M., EL-MOUGY, N., & LASHIN, S. (2011). Essential Oils and *Trichoderma Harzianum* as an Integrated Control Measure Against Faba Bean Root Rot Pathogens. *J. Plant Prot. Res.* 51, 306–313.
- ABDEL-MAKSOUDA, G., & EL-AMINB, A.R. (2011). A review on the materials used during the mummification processes in Ancient Egypt. *Mediterr. Archaeol. Archaeom.* 11, 129–150.
- ACHAK, N., ROMANE, A., ALIFRIQUI, M., & ADAMS, R.P. (2009). Chemical Studies of Leaf Essential Oils of Three Species of *Juniperus* From Tensift Al Haouz-Marrakech Region (Morocco). *J. Essent. Oil Res.* 21, 337–341.
- ACKERMAN, J., MELENDEZ-ACKERMAN, E., & SALGUERO-FARIA, J. (1997). Variation in pollinator abundance and selection on fragrance phenotypes in an epiphytic orchid. *Am. J. Bot.* 84, 1383–1383.
- ADAM, K.-P., & ZAPP, J. (1998). Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. *Phytochemistry* 48, 953–959.
- ADAMS, R.P. (1970). Seasonal variation of terpenoid constituents in natural populations of *Juniperus pinchotii* Sudw. *Phytochemistry* 9, 397–402.
- ADAMS, R.P. (1986). Geographic Variation in *Juniperus silicicola* and *J. virginiana* of the Southeastern United States: Multivariate Analyses of Morphology and Terpenoids. *Taxon* 35, 61–75.
- ADAMS, R.P. (1990a). The Chemical Composition of Leaf Oils of *Juniperus excelsa* M.-Bieb. *J. Essent. Oil Res.* 2, 45–48.
- ADAMS, R.P. (1990b). Variation in the Chemical Composition of the Leaf Oil *Juniperus foetidissima* Willd. *J. Essent. Oil Res.* 2, 67–70.

- ADAMS, R.P. (1994). Geographic variation in the volatile terpenoids of *Juniperus monosperma* and *J. osteosperma*. *Biochem. Syst. Ecol.* 22, 65–71.
- ADAMS, R.P. (1997). Comparisons of the leaf oils of *Juniperus drupacea* Labill. from Greece, Turkey and the Crimea. *J. Essent. Oil Res.* 9, 541–544.
- ADAMS, R.P. (1998). The leaf essential oils and chemotaxonomy of *Juniperus* sect. *Juniperus*. *Biochem. Syst. Ecol.* 26, 637–645.
- ADAMS, R.P. (1999). Systematics of multi-seeded eastern hemisphere *Juniperus* based on leaf essential oils and RAPD DNA fingerprinting. *Biochem. Syst. Ecol.* 27, 709–725.
- ADAMS, R.P. (2000a). Systematics of *Juniperus* section *Juniperus* based on leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochem. Syst. Ecol.* 28, 515–528.
- ADAMS, R.P. (2000b). Systematics of smooth leaf margin *Juniperus* of the western hemisphere based on leaf essential oils and RAPD DNA fingerprinting. *Biochem. Syst. Ecol.* 28, 149–162.
- ADAMS, R.P. (2000c). Systematics of the one seeded *Juniperus* of the eastern hemisphere based on leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochem. Syst. Ecol.* 28, 529–543.
- ADAMS, R.P. (2000d). The serrate leaf margined *Juniperus* (Section *Sabina*) of the western hemisphere: systematics and evolution based on leaf essential oils and Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochem. Syst. Ecol.* 28, 975–989.
- ADAMS, R.P. (2001). Geographic variation in leaf essential oils and RAPDs of *Juniperus polycarpus* K. Koch in central Asia. *Biochem. Syst. Ecol.* 29, 609–619.
- ADAMS, R.P. (2008). Taxonomy of *Juniperus communis* in North America: Insight from variation in nrDNA SNPs. *Phytologia* 90, 176–192.
- ADAMS, R.P. (2009a). Analyses and taxonomic utility of the cedarwood oils of the serrate leaf junipers of the western hemisphere. *Phytologia* 91, 117–139.
- ADAMS, R.P. (2009b). The leaf essential oil of *Juniperus maritima* RP Adams compared with *J. horizontalis*, *J. scopulorum* and *J. virginiana* oils. *Phytologia* 91, 31–39.
- ADAMS, R.P. (2009c). Variation in *Juniperus durangensis* and related junipers (Cupressaceae): Analysis of nrDNA and petN SNPs. *Phytologia* 91, 353–358.

- ADAMS, R.P. (2010). Chemosystematics of *Juniperus*: Effects of leaf drying on essential oil composition. *Phytologia* 92, 186–198.
- ADAMS, R.P. (2011a). *Junipers of the world: the genus Juniperus* (Trafford Publishing).
- ADAMS, R.P. (2011b). Geographic variation in the leaf essential oils of *Juniperus californica*. *Phytologia* 93, 245–259.
- ADAMS, R.P. (2011c). Intraspecific terpenoid variation in *Juniperus scopulorum*: Pleistocene refugia and Post-Pleistocene recolonization. *Phytologia* 93, 3–12.
- ADAMS, R.P. (2012a). Geographic variation in the leaf essential oils of *Juniperus osteosperma* (Cupressaceae) II. *Phytologia* 94, 118–132.
- ADAMS, R.P. (2012b). *Juniperus occidentalis* forma *corbetii* RP Adams, a new shrubby variant: geographic variation in leaf essential oils. *Phytologia* 94, 22–34.
- ADAMS, R.P. (2012c). Seasonal variation in the leaf essential oil of *Taxodium distichum* (Cupressaceae). *Phytologia* 94, 91–102.
- ADAMS, R.P. (2013a). Geographic variation in the volatile leaf oils of *Juniperus procera* Hochst. ex. Endl. *Phytologia* 95, 269–273.
- ADAMS, R.P. (2013b). Hybridization between *Juniperus grandis*, *J. occidentalis* and *J. osteosperma* in northwest Nevada I: Terpenes, Leviathan Mine, Nevada. *Phytologia* 95, 58–69.
- ADAMS, R.P. (2014). Morphological comparison and key to *J. deltooides* and *J. oxycedrus*. *Phytologia* 96, 58–62.
- ADAMS, R.P., & BAKER, L.E. (2007). Pleistocene intraspecific evolution in *Juniperus ashei* Buch. *Phytologia* 89, 8–23.
- ADAMS, R.P., & CHAUDHARY, R.P. (1996). Leaf essential oil of *Juniperus indica* Bertol. from Nepal. *J. Essent. Oil Res.* 8, 677–680.
- ADAMS, R.P., & DEMEKE, T. (1993). Systematic relationships in *Juniperus* based on random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Taxon* 42, 553–571.
- ADAMS, R.P., & HOJJATI, F. (2012). Taxonomy of *Juniperus* in Iran: insight from DNA sequencing. *Phytologia* 94, 219–227.
- ADAMS, R.P., AND KAUFFMANN, M.E. (2010). Variation in nrDNA and cpDNA of *Juniperus californica*, *J. grandis*, *J. occidentalis* and *J. osteosperma* (Cupressaceae). *Phytologia* 92, 266–276.

- ADAMS, R.P., & MATARACI, T. (2011). Taxonomy of *Juniperus deltoides* forma *Yaltirikiana* in Turkey: Leaf terpenoids and SNPs from nrDNA and petN. *Phytologia* 93, 293–303.
- ADAMS, R.P., & NGUYEN, S. (2005). Infra-specific variation in *Juniperus deppeana* and f. *sperryi* in the Davis Mountains, Texas: Variation in leaf essential oils and Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). *Phytologia* 87, 96–108.
- ADAMS, R.P., & PANDEY, R.N. (2003). Analysis of *Juniperus communis* and its varieties based on DNA fingerprinting. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 1271–1278.
- ADAMS, R.P., & SCHWARZBACH, A.E. (2011). DNA barcoding a juniper: the case of the south Texas Duval county juniper and serrate junipers of North America. *Phytologia* 93, 146–154.
- ADAMS, R.P., & SCHWARZBACH, A.E. (2012a). Taxonomy of the multi-seeded, entire leaf taxa of *Juniperus* section SABINA: Sequence analysis of nrDNA and four cpDNA regions. *Phytologia* 94, 350–368.
- ADAMS, R.P., & SCHWARZBACH, A.E. (2012b). Taxonomy of the turbinate shaped seed cone taxa of *Juniperus*, section *Sabina*: Sequence analysis of nrDNA and four cpDNA regions. *Phytologia* 94, 388–403.
- ADAMS, R.P., & SCHWARZBACH, A.E. (2013a). Phylogeny of *Juniperus* using nrDNA and four cpDNA regions. *Phytologia* 95, 179–187.
- ADAMS, R.P., & SCHWARZBACH, A.E. (2013b). Taxonomy of *Juniperus deppeana* varieties and forms based on nrDNA (ITS), petN-psbM, trnS-trnG, trnD-trnT, trnL-trnF sequences. *Phytologia* 95, 161–166.
- ADAMS, R.P., & SCHWARZBACH, A.E. (2013c). Taxonomy of the turbinate shaped seed cone taxa of *Juniperus*, section *Sabina*: Revisited. *Phytologia* 95, 122–124.
- ADAMS, R.P., & STOEHR, M. (2013). Multivariate detection of hybridization using conifer terpenes II: Analyses of terpene inheritance patterns in *Pseudotsuga menziesii* F1 hybrids. *Phytologia* 95, 42–57.
- ADAMS, R.P., & TASHEV, A.N. (2012). Geographic Variation in Leaf Oils of *Juniperus deltoides* From Bulgaria, Greece, Italy and Turkey. *Phytologia* 94, 310–318.

- ADAMS, R.P., & TURNER, B.L. (1970). Chemosystematic and Numerical Studies of Natural Populations of *Juniperus ashei* Buch. *Taxon* 19, 728.
- ADAMS, R.P., & WINGATE, D. (2008). Hybridization between *Juniperus bermudiana* and *J. virginiana* in Bermuda. *Phytologia* 90, 123–133.
- ADAMS, R.P., THAPPA, R.K., AGARWAL, S.G., KAPAHI, B.K., & SARIN, Y.K. (1992). The volatile leaf oils of *Juniperus semiglobosa* Regel from India compared with *J. EXCELSA* M.-Bieb. from Greece. *J. Essent. Oil Res.* 4, 143–149.
- ADAMS, R.P., SHAO-ZHEN, Z., & GE-LIN, C. (1993). The Volatile Leaf Oil of *Juniperus convallium* Rehd. and Wils. from Gansu, China. *J. Essent. Oil Res.* 5, 571–573.
- ADAMS, R.P., GE-LIN, C., & SHAO-ZHEN, Z. (1994a). Comparison of the Volatile Leaf Oils of *Juniperus chinensis* L., *J. chinensis* var. *kaizuka* Hort. and cv. *pyramidalis* from China. *J. Essent. Oil Res.* 6, 149–154.
- ADAMS, R.P., GE-LIN, C., & SHAO-ZHEN, Z. (1994b). The volatile leaf oils of *Juniperus przewalskii* Kom. and *forma pendula* (Cheng and LK Fu) RP Adams and Chu Ge-lin from China. *J. Essent. Oil Res.* 6, 17–20.
- ADAMS, R.P., SHATAR, S., & DEMBITSKY, A.D. (1994c). Comparison of the volatile leaf oils of *Juniperus davurica* Pall. from Mongolia, with plants cultivated in Kazakhstan, Russia and Scotland. *J. Essent. Oil Res.* 6, 217–221.
- ADAMS, R.P., ZHANG, S.-Z., & CHU, G.-L. (1995). Essential oil of *Juniperus formosana* Hayata leaves from China. *J. Essent. Oil Res.* 7, 687–689.
- ADAMS, R.P., DEMBITSKY, A.D., & SHATAR, S. (1998a). The Leaf Essential Oils and Taxonomy of *Juniperus centrasiatica* Kom., *J. jarkendensis* Kom., *J. pseudosabina* Fisch., Mey. and Ave-Lall., *J. sabina* L. and *J. turkestanica* Kom. from Central Asia. *J. Essent. Oil Res.* 10, 489–496.
- ADAMS, R.P., THAPPA, R.K., AGARWAL, S.G., KAPAHI, B.K., SRIVASTAVA, T.N., & CHAUDHARY, R.P. (1998b). The Leaf Essential Oil of *Juniperus recurva* Buch.-Ham. ex D. Don from India and Nepal Compared with *J. recurva* var. *squamata* (D. Don) Parl. *J. Essent. Oil Res.* 10, 21–24.
- ADAMS, R.P., ALTAREJOS, J., FERNANDEZ, C., & CAMACHO, A. (1999). The Leaf Essential Oils and Taxonomy of *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus*, subs. *badia* (H.Gay) Debeaux, and subsp. *macrocarpa* (Sibth. and Sm.) Ball. *J. Essent. Oil Res.* 11, 167–172.



- ADAMS, R.P., HSIEH, C.F., MURATA, J., & NARESH PANDEY, R. (2002). Systematics of *Juniperus* from eastern Asia based on Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochem. Syst. Ecol.* *30*, 231–241.
- ADAMS, R.P., PANDEY, R.N., LEVERENZ, J.W., DIGNARD, N., HOEGH, K., & THORFINNSSON, T. (2003a). Pan-Arctic variation in *Juniperus communis*: historical biogeography based on DNA fingerprinting. *Biochem. Syst. Ecol.* *31*, 181–192.
- ADAMS, R.P., MUMBA, L.E., JAMES, S.A., PANDEY, R.N., GAUQUELIN, T., & BADRI, W. (2003b). Geographic variation in the leaf oils and DNA fingerprints (RAPDs) of *Juniperus thurifera* L. from Morocco and Europe. *J. Essent. Oil Res.* *15*, 148–154.
- ADAMS, R.P., SCHWARZBACH, A.E., & PANDEY, R.N. (2003c). The concordance of terpenoid, ISSR and RAPD markers, and ITS sequence data sets among genotypes: an example from *Juniperus*. *Biochem. Syst. Ecol.* *31*, 375–387.
- ADAMS, R.P., MORRIS, J.A., PANDEY, R.N., & SCHWARZBACH, A.E. (2005). Cryptic speciation between *Juniperus deltooides* and *Juniperus oxycedrus* (Cupressaceae) in the Mediterranean. *Biochem. Syst. Ecol.* *33*, 771–787.
- ADAMS, R.P., NGUYEN, S., & LIU, J. (2006a). Geographic Variation in the Leaf Essential Oils of *Juniperus sabina* L. and *J. sabina* var. *arenaria* (E.H. Wilson) Farjon. *J. Essent. Oil Res.* *18*, 497–502.
- ADAMS, R.P., GONZÁLEZ ELIZONDO, M.S., ELIZONDO, M.G., & SLINKMAN, E. (2006b). DNA fingerprinting and terpenoid analysis of *Juniperus blancoi* var. *buebuentensis* (Cupressaceae), a new subalpine variety from Durango, Mexico. *Biochem. Syst. Ecol.* *34*, 205–211.
- ADAMS, R.P., SCHWARZBACH, A.E., NGUYEN, S., MORRIS, J.A., & LIU, J.Q. (2007). Geographic variation in *Juniperus sabina* L., *J. sabina* var. *arenaria* (EH Wilson) Farjon, *J. sabina* var. *davurica* (Pall.) Farjon and *J. sabina* var. *mongolensis* RP Adams. *Phytologia* *89*, 153–166.
- ADAMS, R.P., RUMEU, B., NOGALES, M., & FONTINHA, S.S. (2008a). Geographic variation and systematics of *Juniperus phoenicea* L. from Madeira and the Canary islands: analyses of leaf volatile oils. *Phytologia* *91*, 40–53.
- ADAMS, R.P., MORRIS, J.A., & SCHWARZBACH, A.E. (2008b). Taxonomic affinity of rushforth's Bhutan juniper and *Juniperus indica* using SNP's from nrDNA and cp trnC-trnD, terpenoids and RAPD data. *Phytologia* *90*, 233–245.

- ADAMS, R.P., MORRIS, J.A., & SCHWARZBACH, A.E. (2008c). Taxonomic study of *Juniperus excelsa* and *J. POLYCARPOS* using SNPs from nrDNA and cp trnC-trnD plus essential oils and RAPD data. *Phytologia* 90, 216–233.
- ADAMS, R.P., MORRIS, J.A., & SCHWARZBACH, A.E. (2008d). The Evolution of Caribbean *Juniperus* (Cupressaceae): Terpenoids, RAPDs and DNA SNPs data. *Phytologia* 90, 103–120.
- ADAMS, R.P., BARTEL, J.A., & PRICE, R.A. (2009). A new genus, *Hesperocyparis*, for the cypresses of the Western Hemisphere (Cupressaceae). *Phytologia* 91, 160–185.
- ADAMS, R.P., TERZIOĞLU, S., & MATARACI, T. (2010a). Taxonomy of *Juniperus oxycedrus* var. *spilinanus* in Turkey: Leaf terpenoids and SNPS from nrDNA and petN. *Phytologia* 92, 156–166.
- ADAMS, R.P., BEAUCHAMP, P.S., DEV, V., & BATHALA, R.M. (2010b). The Leaf Essential Oils of *Juniperus communis* L. Varieties in North America and the NMR and MS Data for Isoabienol. *J. Essent. Oil Res.* 22, 23–28.
- ADAMS, R.P., RUMEU, B., NOGALES, M., & FONTINHA, S.S. (2010c). Geographic variation and systematics of *Juniperus phoenicea* L. from Madeira and the Canary islands: SNPs from nrDNA and petN-psbM. *Phytologia* 92, 59–67.
- ADAMS, R.P., SCHWARZBACH, A.E., & MORRIS, J.A. (2010d). *Juniperus zanonii*, a new species from Cerro Potosi, Nuevo Leon, Mexico. *Phytologia* 92, 105–117.
- ADAMS, R.P., EARLE, C.J., & THORNBURG, D. (2011a). Taxonomy of infraspecific taxa of *Abies lasiocarpa*: leaf essential oils and DNA of *Abies lasiocarpa*, var. *bifolia* and var. *arizonica*. *Phytologia* 93, 73–87.
- ADAMS, R.P., HSIEH, C.F., MURATA, J., & SCHWARZBACH, A.E. (2011b). Systematics of *Juniperus chinensis* and *J. tsukusiensis* from Japan and Taiwan: DNA sequencing and terpenoids. *Phytologia* 93, 118–131.
- ADAMS, R.P., MURATA, J., TAKAHASHI, H., & SCHWARZBACH, A.E. (2011c). Taxonomy and evolution of *Juniperus communis*: Insight from DNA sequencing and SNPs.
- ADAMS, R.P., ELIZONDO, M.S.G., & ZANONI, T.A. (2012). Variation in leaf essential oils, DNA sequences and morphology in *Juniperus durangensis*. *Phytologia* 94, 40–52.

- ADAMS, R.P., MUIR, J.P., TAYLOR JR., C.A., & WHITNEY, T.R. (2013a). Differences in chemical composition between browsed and non-browsed *Juniperus ashei* Buch. Trees. Biochem. Syst. Ecol. 46, 73–78.
- ADAMS, R.P., TASHEV, A.N., BASER, K.H.C., & CHRISTOU, A.K. (2013b). Geographic variation in the volatile leaf oils of *Juniperus excelsa* M.-Bieb. Phytologia 95, 279–285.
- ADAMS, R.P., MAO, K., & LIU, J. (2013c). The volatile leaf oil of *Juniperus microsperma* and its taxonomy. Phytologia 95, 87–93.
- ADAMS, R.P., TASHEV, A.N., & SCHWARZBACH, A.E. (2014a). Variation in *Juniperus communis* trees and shrubs from Bulgaria: analyses of nrDNA and cpDNA regions plus leaf essential oil. Phytologia 92, 124–129.
- ADAMS, R.P., BORATYNSKI, A., ARISTA, M., SCHWARZBACH, A.E., LESCHNER, H., LIBER, Z., MINISSALE, P., MATARACI, T., & MANOLIS, A. (2014b). Analysis of *Juniperus phoenicea* from throughout its range in the Mediterranean using DNA sequence data from nrDNA and petN-psbM: The case for the recognition of *J. turbinata* Guss. Phytologia 95, 202–209.
- ADAMS, R.P., DOUAIHY, B., DAGHER-KHARRAT, M.D., SCHWARZBACH, A.E., & FARZALIYEV, V. (2014c). Geographic variation in nrDNA and four cpDNA regions of *Juniperus excelsa* and *J. polycarpus* from Greece, Turkey, Lebanon and Azerbaijan. Phytologia 96, 89–95.
- ADAMS, R.P., HOJJATI, F., & SCHWARZBACH, A.E. (2014d). Taxonomy of *Juniperus* in Iran: DNA sequences of nrDNA plus three cpDNAs reveal *Juniperus polycarpus* var. *turcomanica* and *J. seravschanica* in southern Iran. Phytologia 96, 19–25.
- ADORJAN, B., & BUCHBAUER, G. (2010). Biological properties of essential oils: an updated review. Flavour Fragr. J. 25, 407–426.
- ALARCÓN, M., ROQUET, C., GARCÍA-FERNÁNDEZ, A., VARGAS, P., & ALDASORO, J.J. (2013). Phylogenetic and phylogeographic evidence for a Pleistocene disjunction between *Campanula jacobaea* (Cape Verde Islands) and *C. balfourii* (Socotra). Mol. Phylogenet. Evol. 69, 828–836.
- ALEKSIĆ, J.M., STOJANOVIĆ, D., BANOVIĆ, B., & JANČIĆ, R. (2012). A Simple and Efficient DNA Isolation Method for *Salvia officinalis*. Biochem. Genet. 50, 881–892.

- ALIEVA, A.M., RADJABOV, G.K., & STEPANOVA, G.V. (2012). Component analysis of supercritical CO<sub>2</sub> extract of *Juniperus oblonga* M.-Bieb fruits.
- ALMAARRI, K., ALAMIR, L., JUNAID, Y., & XIE, D.Y. (2010). Volatile compounds from leaf extracts of *Juniperus excelsa* growing in Syria via gas chromatography mass spectrometry. *Anal. Methods* 2, 673–677.
- ALQASOUMI, S.I., & ABDEL-KADER, M.S. (2012). Terpenoids from *Juniperus procera* with hepatoprotective activity. *Pak. J. Pharm. Sci.* 25, 315.
- AMRI, I., HAMROUNI, L., GARGOURI, S., HANANA, M., & JAMOSSI, B. (2013). Chemical composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Juniperus oxycedrus* L. *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.* 4, 227–233.
- ANGIONI, A., BARRA, A., RUSSO, M.T., CORONEO, V., DESSÍ, S., & CABRAS, P. (2003). Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3073–3078.
- ARRHENIUS, S.P., & LANGENHEIM, J.H. (1983). Inhibitory effects of *Hymenaea* and *Copaifera* leaf resins on the leaf fungus, *Pestalotia subcuticularis*. *Biochem. Syst. Ecol.* 11, 361–366.
- ASGARY, S., SAHEBKAR, A., NADERI, G.A., ARDEKANI, M.R.S., KASHER, T., ASLANI, S., AIRIN, A., & EMAMI, S.A. (2013). Essential oils from the fruits and leaves of *Juniperus sabina* possess inhibitory activity against protein glycation and oxidative stress: an in vitro phytochemical investigation. *J. Essent. Oil Res.* 25, 70–77.
- ASIL, J., EMAMI, S.A., SEDDIGH, N., & KHAYYAT, M.H. (2013). The Antioxidant Activity of the Essential Oil of Different Parts of *Juniperus foetidissima* Willd. in Lipid System. *Anal. Chem. Lett.* 3, 18–29.
- ATHANASSIOU, C.G., KAVALLIERATOS, N.G., EVERGETIS, E., KATSOULA, A.-M., & HAROUTOUNIAN, S.A. (2013). Insecticidal Efficacy of Silica Gel With *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* (Pinales: Cupressaceae) Essential Oil Against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.* 106, 1902–1910.
- AUDUS, L., & CHEETHAM, A.H. (1940). Investigations on the significance of ethereal oils in regulating leaf temperatures and transpiration rates. *Ann. Bot.* 4, 465–483.

- AVATO, P., BIANCHI, G., & MARIANI, G. (1984). Epicuticular waxes of *Sorghum* and some compositional changes with plant age. *Phytochemistry* 23, 2843–2846.
- BAHRI, F., HARRAK, R., ACHAK, N., & ROMANE, A. (2013). Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils isolated from *Juniperus thurifera* L. var. *africana*. *Nat. Prod. Res.* 1–6.
- BAKER, E.A. (1982). Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. Cutler F Alvin K Price C E Ed *Plant Cuticle* Acad. Press Lond. Etc 139–165.
- BANERJEE, A., & SHARKEY, T.D. (2014). Methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway metabolic regulation. *Nat. Prod. Rep.* 31, 1043.
- BANTHORPE, D.V., & LE PATOUREL, G.N. (1972). The biosynthesis of (+)-alpha-pinene in *Pinus* species. *Biochem J* 130, 1055–1061.
- BARNES, J.D., PERCY, K.E., PAUL, N.D., JONES, P., McLAUGHLIN, C.K., MULLINEAUX, P.M., CREISSEN, G., AND WELLBURN, A.R. (1996). The influence of UV-B radiation on the physicochemical nature of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaf surfaces. *J. Exp. Bot.* 47, 99–109.
- BARRERO, A.F., SANCHEZ, J.F., & ALTAREJOS, J. (1987). Resin acids in the woods of *Juniperus sabina* L. and *Juniperus oxycedrus* L. *Ars Pharm* 28, 449–457.
- BARRERO, A.F., OLTRA, J.E., ALTAREJOS, J., BARRAGÁN, A., LARA, A., & LAURENT, R. (1993). Minor components in the essential oil of *Juniperus oxycedrus* L. wood. *Flavour Fragr. J.* 8, 185–189.
- BARTHOLOTT, W., & NEINHUIS, C. (1997). Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* 202, 1–8.
- BARTHOLOTT, W., NEINHUIS, C., CUTLER, D., DITSCH, F., MEUSEL, I., THEISEN, I., & WILHELMI, H. (1988). Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Bot. J. Linn. Soc.* 126, 237–260.
- BARTRAM, S., JUX, A., GLEIXNER, G., & BOLAND, W. (2006). Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. *Phytochemistry* 67, 1661–1672.
- BASER, K.H.C., & BUCHBAUER, G. (2009). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications* (CRC Press).

- BEKER, R., DAFNI, A., EISIKOWITZ, D., & RAVID, U. (1989). Volatiles of two chemotypes of *Majorana syriaca* L. (Labiatae) as olfactory cues for the honeybee. *Oecologia* 79, 446–451.
- BEKHECHI, C., BEKKARA, F.A., CONSIGLIO, D., BIGHELLI, A., & TOMI, F. (2012). Chemical Variability of the Essential Oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Algeria. *Chem. Biodivers.* 9, 2742–2753.
- BENDLE, J., KAWAMURA, K., YAMAZAKI, K., & NIWAI, T. (2007). Latitudinal distribution of terrestrial lipid biomarkers and n-alkane compound-specific stable carbon isotope ratios in the atmosphere over the western Pacific and Southern Ocean. *Geochim. Cosmochim. Acta* 71, 5934–5955.
- BENNETT, K.D., BOREHAM, S., SHARP, M.J., & SWITSUR, V.R. (1992). Holocene History of Environment, Vegetation and Human Settlement on Catta Ness, Lunnasting, Shetland. *J. Ecol.* 80, 241.
- BERMADINGER-STABENTHEINER, E. (1995). Physical injury, re-crystallization of wax tubes and artefacts: identifying some causes of structural alteration to spruce needle wax. *New Phytol.* 130, 67–74.
- BERNARD-DAGAN, C. (1988). Biosynthesis of Lower Terpenoids: Genetic and Physiological Controls in Woody Plants. In *Genetic Manipulation of Woody Plants*, J. HANOVER, D. KEATHLEY, C. WILSON, & G. KUNY, eds. (Springer US), pp. 329–351.
- BIANCHI, G. (1995). Plant waxes. *Waxes Chem. Mol. Biol. Funct.* 6, 175–222.
- BIANCHI, G., VLAHOV, G., ANGLANI, C., & MURELLI, C. (1992). Epicuticular wax of olive leaves. *Phytochemistry* 32, 49–52.
- BICK, J.A., & LANGE, B.M. (2003). Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* 415, 146–154.
- BOHLMANN, J., STEELE, C.L., & CROTEAU, R. (1997). Monoterpene Synthases from Grand Fir (*ABIES GRANDIS*) cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (–)-(4s)-limonene synthase, and (–)-(1s, 5s)-pinene synthase. *J. Biol. Chem.* 272, 21784–21792.
- BOHLMANN, J., MEYER-GAUEN, G., & CROTEAU, R. (1998a). Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 4126–4133.

- BOHLMANN, J., CROCK, J., JETTER, R., & CROTEAU, R. (1998b). Terpenoid-based defenses in conifers: cDNA cloning, characterization, and functional expression of wound-inducible (*E*)- $\alpha$ -bisabolene synthase from grand fir (*Abies grandis*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 6756–6761.
- BOHLMANN, J., PHILLIPS, M., RAMACHANDIRAN, V., KATOH, S., & CROTEAU, R. (1999). cDNA Cloning, Characterization, and Functional Expression of Four New Monoterpene Synthase Members of the Tpsd Gene Family from Grand Fir (*Abies grandis*). *Arch. Biochem. Biophys.* *368*, 232–243.
- BOHLMANN, J., GERSHENZON, J., & AUBOURG, S. (2000). Chapter Five Biochemical, molecular, genetic and evolutionary aspects of defense-related terpenoid metabolism in conifers. *Recent Adv. Phytochem.* *34*, 109–150.
- BOJOVIĆ, S., ŠARAC, Z., NIKOLIĆ, B., TESEVIĆ, V., TODOSIJEVIĆ, M., VELJIĆ, M., & MARIN, P.D. (2012). Composition of *n*-Alkanes in Natural Populations of *Pinus nigra* from Serbia - Chemotaxonomic Implications. *Chem. Biodivers.* *9*, 2761–2774.
- BOOM, A., MORA, G., CLEEF, A.M., & HOOGHIEMSTRA, H. (2001). High altitude C4 grasslands in the northern Andes: relicts from glacial conditions? *Rev. Palaeobot. Palynol.* *115*, 147–160.
- BOOM, A., MARCHANT, R., HOOGHIEMSTRA, H., & SINNINGHE DAMSTÉ, J.S. (2002). CO<sub>2</sub>- and temperature-controlled altitudinal shifts of C4- and C3-dominated grasslands allow reconstruction of palaeoatmospheric pCO<sub>2</sub>. *Reconstr. Model. Grass-Domin. Ecosyst.* *177*, 151–168.
- BORATYŃSKI, A., WACHOWIAK, W., DERING, M., BORATYŃSKA, K., SKEKIEWICZ, K., SOBIERAJSKA, K., JASIŃSKA, A.K., KLIMKO, M., MONTSERRAT, J.M., & ROMO, A. (2014). The biogeography and genetic relationships of *Juniperus oxycedrus* and related taxa from the Mediterranean and Macaronesian regions. *Bot. J. Linn. Soc.*
- BOWMAN, R.N. (1980). Phylogenetic implications from cuticular wax analyses in *Epilobium* sect. *Zauschneria* (Onagraceae). *Am. J. Bot.* 671–685.
- BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W., & JONES, R.L. (2009). Natural Products (Secondary Metabolites). In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, (Maryland: American Society of Plant Physiologists), pp. 1251–1268.
- BUSH, R.T., & MCINERNEY, F.A. (2013). Leaf wax n-alkane distributions in and across modern plants: Implications for paleoecology and chemotaxonomy. *Geochim. Cosmochim. Acta.*



- BUTKIENĖ, R., NIVINSKIENĖ, O., & MOCKUTĖ, D. (2009). Two chemotypes of essential oils produced by the same *Juniperus communis* L. growing wild in Lithuania. *Chemija* 20, 195–201.
- CABRAL, C., FRANCISCO, V., CAVALEIRO, C., GONÇALVES, M.J., CRUZ, M.T., SALES, F., BATISTA, M.T., & SALGUEIRO, L. (2012). Essential Oil of *Juniperus communis* subsp. *alpina* (Suter) Čelak Needles: Chemical Composition, Antifungal Activity and Cytotoxicity. *Phytother. Res.* 26, 1352–1357.
- CAMERON, K.D., TEECE, M.A., BEVILACQUA, E., & SMART, L.B. (2002). Diversity of cuticular wax among *Salix* species and *Populus* species hybrids. *Phytochemistry* 60, 715–725.
- CANTRELL, C.L., ZHELJAZKOV, V.D., OSBRINK, W.L.A., CASTRO, A., MADDOX, V., CRAKER, L.E., & ASTATKIE, T. (2013). Podophyllotoxin and essential oil profile of *Juniperus* and related species. *Ind. Crops Prod.* 43, 668–676.
- CARAMIELLO, R., BOCCO, A., BUFFA, G., & MAFFEI, M. (1995). Chemotaxonomy of *Juniperus communis*, *J. sibirica* and *J. intermedia*. *J. Essent. Oil Res.* 7, 133–145.
- CASTAÑEDA, I.S., & SCHOUTEN, S. (2011). A review of molecular organic proxies for examining modern and ancient lacustrine environments. *Quat. Sci. Rev.* 30, 2851–2891.
- DEL CASTILLO, J.B., BROOKS, C.J.W., CAMBIE, R.C., EGLINTON, G., HAMILTON, R.J., & PELLITT, P. (1967). The taxonomic distribution of some hydrocarbons in gymnosperms. *Phytochemistry* 6, 391–398.
- CAVALEIRO, C., REZZI, S., SALGUEIRO, L., BIGHELLI, A., CASANOVA, J., & PROENÇA DA CUNHA, A. (2001). Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Portugal. *Biochem. Syst. Ecol.* 29, 1175–1183.
- CAVALEIRO, C., SALGUEIRO, L., BARROSO, J.G., FIGUEIREDO, A.C., PEDRO, L.G., FONTINHA, S.S., BIGHELLI, A., CASANOVA, J., LOOMAN, A., & SCHEFFER, J.J.C. (2002). Composition of the essential oil of *Juniperus cedrus* Webb and Berth. grown on Madeira. *Flavour Fragr. J.* 17, 111–114.
- CAVALEIRO, C., SALGUEIRO, L.R., DA CUNHA, A.P., FIGUEIREDO, A.C., BARROSO, J.G., BIGHELLI, A., & CASANOVA, J. (2003). Composition and variability of the essential oils of the leaves and berries from *Juniperus navicularis*. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 193–201.
- CAVALEIRO, C., PINTO, E., GONÇALVES, M.J., & SALGUEIRO, L. (2006). Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1333–1338.



- CBOLE PLANT WORKING GROUP, P.M. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 12794–12797.
- CHARENTREAU, A. (2001). Simultaneous distillation–extraction: from birth to maturity—Review. *Flavour Fragr. J.* *16*, 136–148.
- CHANDRA, K., CHAUDHARI, B.G., DHAR, B.P., MANGAL, A.K., DABUR, R., & MANDAL, T.K. (2007). Database on medicinal plants used in Ayurveda (Central Council for Research in Ayurveda and Siddha (Deptt. of AYUSH, Min. of Health and Family Welfare), Govt. of India).
- CHATZOPOULOU, P.S., & KATSIOTIS, S.T. (1993). Chemical Investigation of *Juniperus communis* L. *J Essent Oil Res* *5*, 603–607.
- CHIANG, Y.-C., HUNG, K.-H., MOORE, S.-J., GE, X.-J., HUANG, S., HSU, T.-W., SCHAAL, B.A., & CHIANG, T. (2009). Paraphyly of organelle DNAs in *Cycas* Sect. *Asiorientales* due to ancient ancestral polymorphisms. *BMC Evol. Biol.* *9*, 161.
- CLEGG, M.T., GAUT, B.S., LEARN, G.H., & MORTON, B.R. (1994). Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *91*, 6795–6801.
- CLOUGH, R.C., MATTHIS, A.L., BARNUM, S.R., & JAWORSKI, J.G. (1992). Purification and characterization of 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III from spinach. A condensing enzyme utilizing acetyl-coenzyme A to initiate fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* *267*, 20992–20998.
- COLBY, S.M., ALONSO, W.R., KATAHIRA, E.J., MCGARVEY, D.J., & CROTEAU, R. (1993). 4S-limonene synthase from the oil glands of spearmint (*Mentha spicata*). cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the catalytically active monoterpene cyclase. *J. Biol. Chem.* *268*, 23016–23024.
- CONTE, M.H., WEBER, J.C., CARLSON, P.J., & FLANAGAN, L.B. (2003). Molecular and carbon isotopic composition of leaf wax in vegetation and aerosols in a northern prairie ecosystem. *Oecologia* *135*, 67–77.
- CORDOBA, E., SALMI, M., & LEON, P. (2009). Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *J. Exp. Bot.* *60*, 2933–2943.
- CORRIGAN, D., TIMONEY, R.F., & DONNELLY, D.M.X. (1978). n-Alkanes and ω-hydroxyalkanoic acids from the needles of twenty-eight *Picea* species. *Phytochemistry* *17*, 907–910.

- CRANWELL, P.A. (1973). Chain-length distribution of *n*-alkanes from lake sediments in relation to post-glacial environmental change. *Freshw. Biol.* 3, 259–265.
- CRANWELL, P.A., EGLINTON, G., & ROBINSON, N. (1987). Lipids of aquatic organisms as potential contributors to lacustrine sediments—II. *Org. Geochem.* 11, 513–527.
- CROTEAU, R., GURKEWITZ, S., JOHNSON, M.A., & FISK, H.J. (1987). Biochemistry of Oleoresinosis Monoterpene and Diterpene Biosynthesis in Lodgepole Pine Saplings Infected with *Ceratocystis clavigera* or Treated with Carbohydrate Elicitors. *Plant Physiol.* 85, 1123–1128.
- CROTEAU, R., SATTERWHITE, M.D., CANE, D.E., & CHANG, C. (1988). Biosynthesis of Monoterpenes. *J. Biol. Chem.* 263, 10063–10071.
- CROTEAU, R., KETCHUM, R.E., LONG, R.M., KASPERA, R., & WILDUNG, M.R. (2006). Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochem. Rev.* 5, 75–97.
- CSEKE, L.J., KIRAKOSYAN, A., KAUFMAN, P.B., WARBER, S., DUKE, J.A., & BRIELMANN, H.L. (2006). Natural products from plants (CRC Press).
- DAMJANOVIĆ, B., SKALA, D., BARAS, J., & PETROVIĆ-DJAKOV, D. (2006). Isolation of essential oil and supercritical carbon dioxide extract of *Juniperus communis* L. fruits from Montenegro. *Flavour Fragr. J.* 21, 875–880.
- DAVID, P.C. (2005). *Molecular Biology: Understanding the genetic revolution* (Amsterdam: Elsevier Academic Press).
- DAVIS, E.M., & CROTEAU, R. (2000). Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. In *Biosynthesis*, (Springer), pp. 53–95.
- DEGENHARDT, J., KÖLLNER, T.G., & GERSHENZON, J. (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* 70, 1621–1637.
- DEMASURE, B., SODZI, N., & PETTI, R.J. (1995). A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol. Ecol.* 4, 129–134.
- DERWICH, E., BENZIANE, Z., & BOUKIR, A. (2010). Chemical composition of leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* and evaluation of its antibacterial activity. *Int J Agric Biol* 12, 199–204.

- DERWICH, E., BENZIANE, Z., & CHABIR, R. (2011). Aromatic and medicinal plants of Morocco: chemical composition of essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Juniperus phoenicea*. *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.* 2.
- DEWICK, P.M. (1995). The biosynthesis of C5-C20 terpenoid compounds. *Nat. Prod. Rep.* 12, 507.
- DJEBAILI, H., ZELLAGUI, A., & GHERRAF, N. (2013). Germacrene-D, a characteristic component of the Essential Oils from the Leaves of *Juniperus oxycedrus* ssp. *macrocarpa* (S. et Sm.) Ball Growing in El Kala, Algeria. *J. Nat. Prod. Plant Resour.* 3, 40–44.
- DOB, T., DAHMANE, D., & CHELGHOU, C. (2006). Essential Oil Composition of *Juniperus oxycedrus* Growing in Algeria. *Pharm. Biol.* 44, 1–6.
- DODD, R.S., & AFZAL-RAFI, Z. (2000). Habitat-related adaptive properties of plant cuticular lipids. *Evolution* 54, 1438–1444.
- DODD, R.S., & POVEDA, M.M. (2003). Environmental gradients and population divergence contribute to variation in cuticular wax composition in *Juniperus communis*. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 1257–1270.
- DODD, R.S., FROMARD, F., RAFI, Z.A., & BLASCO, F. (1995). Biodiversity among West African *Rhizophora*: Foliar wax chemistry. *Biochem. Syst. Ecol.* 23, 859–868.
- DOUCE, R., & JOYARD, J. (1980). Structure and Function of the Plastid Envelope. In *Advances in Botanical Research*, H.W. Woolhouse, ed. (Academic Press), pp. 1–116.
- DOVE, H., & MAYES, R.W. (1991). The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores: a review. *Crop Pasture Sci.* 42, 913–952.
- DOYLE, J.J., & DOYLE, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19, 11–15.
- DUC, G., ALEKSIĆ, J.M., MARGET, P., MIKIĆ, A., PAULL, G., REDDEN, R.J., SASS, O., STODDARD, F.L., VANDENBERG, A., VISHNIAKOVA, M., ET AL. (2015). Faba bean. In *Grain Legumes*, A.M. De Ron, ed. (New York (in press): Springer Science+Business media),.
- DUDAREVA, N., PIECHULLA, B., & PICHERSKY, E. (2000). Biogenesis of floral scents. *Hort Rev* 24, 31–53.
- DYSON, W.G., & HERBIN, G.A. (1968). Studies on plant cuticular waxes-IV: Leaf wax alkanes as a taxonomic discriminant for cypresses grown in Kenya. *Phytochemistry* 7, 1334–1344.

- ECKENWALDER, J.E. (1976). Re-evaluation of Cupressaceae and Taxodiaceae: a proposed merger. *Madrono* 23, 237–256.
- EDGAR, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- EGLINTON, G., & HAMILTON, R.J. (1963). The distribution of alkanes. *Chem. Plant Taxon.* 187, 217.
- EGLINTON, G., & HAMILTON, R.J. (1967). Leaf epicuticular waxes. *Science* 156, 1322–1335.
- EGLINTON, G., HAMILTON, R.J., & MARTIN-SMITH, M. (1962a). The alkane constituents of some New Zealand plants and their possible taxonomic implications. *Phytochemistry* 1, 137–145.
- EGLINTON, G., GONZALEZ, A.G., HAMILTON, R.J., & RAPHAEL, R.A. (1962b). Hydrocarbon constituents of the wax coatings of plant leaves: A taxonomic survey. *Phytochemistry* 1, 89–102.
- EHSANI, E., AKBARI, K., TEIMOURI, M., & KHADEM, A. (2012). Chemical composition and antibacterial activity of two *Juniperus* species essential oils. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6, 6704–6710.
- EIGENBRODE, S.D., & ESPELIE, K.E. (1995). Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores. *Annu. Rev. Entomol.* 40, 171–194.
- EISENREICH, W., BACHER, A., ARIGONI, D., & ROHDICH, F. (2004). Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* 61.
- EL-SAWI, S.A., MOTAWAE, H.M., & ALI, A.M. (2008). Chemical composition, cytotoxic activity and antimicrobial activity of essential oils of leaves and berries of *Juniperus phoenicea* L. grown in Egypt. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 4, 417–426.
- ELANGO, G., ABDUL RAHUMAN, A., KAMARAJ, C., BAGAVAN, A., ABDUZ ZAHIR, A., SANTHOSHKUMAR, T., MARIMUTHU, S., VELAYUTHAM, K., JAYASEELAN, C., KIRTHI, A.V., ET AL. (2012). Efficacy of medicinal plant extracts against Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*. *Ind. Crops Prod.* 36, 524–530.
- EMAMI, S.A., JAVADI, B., & HASSANZADEH, M.K. (2007). Antioxidant Activity of the Essential Oils of Different Parts of *Juniperus communis*. subsp. *hemisphaerica*. and *Juniperus oblonga*. *Pharm. Biol.* 45, 769–776.

- EMAMI, S.A., ASGARY, S., NADERI, G.A., ARDEKANI, M.R.S., KASHER, T., ASLANI, S., AIRIN, A., & SAHEBKAR, A. (2011). Antioxidant activities of *Juniperus foetidissima* essential oils against several oxidative systems. *Rev. Bras. Farmacogn.* 21, 627–634.
- EMAMI, S.A., ASGARY, S., NADERI, G.A., ARDEKANI, M.R.S., ASLANI, S., AIRIN, A., KASHER, T., & SAHEBKAR, A. (2012). Investigation of antioxidant and anti-glycation properties of essential oils from fruits and branchlets of *Juniperus oblonga*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 22, 985–993.
- ENNAJAR, M., BOUAJILA, J., LEBRIHI, A., MATHIEU, F., ABDERRABA, M., RAIES, A., & ROMDHANE, M. (2009). Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of essential oils and various extracts of *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae). *J. Food Sci.* 74, M364–M371.
- ENNAJAR, M., AFLLOULOUS, S., ROMDHANE, M., IBRAHIM, H., CAZAUX, S., ABDERRABA, M., RAIES, A., & BOUAJILA, J. (2011). Influence of the Process, Season, and Origin on Volatile Composition and Antioxidant Activity of *Juniperus phoenicea* L. Leaves Essential Oils. *J. Food Sci.* 76, C224–C230.
- ESPINA, L., SOMOLINOS, M., LORAN, S., CONCHELLO, P., GARCÍA, D., & PAGÁN, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control* 22, 896–902.
- FARJON, A. (2001). Cupressaceae. In *World Checklist and Bibliography of Conifers*, (England: The Royal Botanic Gardens, Kew), pp. 31–103.
- FARJON, A., & FILER, D. (2013). *An Atlas of the World's Conifers: An Analysis of Their Distribution, Biogeography, Diversity and Conservation Status* (Brill).
- FEHLING, E., & MUKHERJEE, K.D. (1991). Acyl-CoA elongase from a higher plant (*Lunaria annua*): metabolic intermediates of very-long-chain acyl-CoA products and substrate specificity. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Lipids Lipid Metab.* 1082, 239–246.
- FICKEN, K.J., LI, B., SWAIN, D.L., & EGLINTON, G. (2000). An *n*-alkane proxy for the sedimentary input of submerged/floating freshwater aquatic macrophytes. *Org. Geochem.* 31, 745–749.
- FILIPOWICZ, N., MADANECKI, P., GOŁĘBIEWSKI, M., STEPNOWSKI, P., & OCHOCKA, J.R. (2009). HS-SPME/GC Analysis Reveals the Population Variability of Terpene Contents in *Juniperus communis* Needles. *Chem. Biodivers.* 6, 2290–2301.

- FLAKE, R.H., VON RUDLOFF, E., & TURNER, B.L. (1969). Quantitative study of clinal variation in *Juniperus virginiana* using terpenoid data. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 64, 487–494.
- FOUAD, B., ABDERRAHMANE, R., YOUSSEF, A., RAJAE, H., & EL FELS, M.A. (2011). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of Moroccan *Juniperus phoenicea*. *Nat. Prod. Commun.* 6, 1515.
- GADEK, P.A., ALPERS, D.L., HESLEWOOD, M.M., & QUINN, C.J. (2000). Relationships within Cupressaceae sensu lato: a combined morphological and molecular approach. *Am. J. Bot.* 87, 1044–1057.
- GAMBLIEL, H., AND CROTEAU, R. (1982). Biosynthesis of (+/-)-alpha-pinene and (-)-beta-pinene from geranyl pyrophosphate by a soluble enzyme system from sage (*Salvia officinalis*). *The Journal of Biological Chemistry* 257, 2335–2342.
- GAMBLIEL, H., & CROTEAU, R. (1984). Pinene cyclases I and II. Two enzymes from sage (*Salvia officinalis*) which catalyze stereospecific cyclizations of geranyl pyrophosphate to monoterpene olefins of opposite configuration. *J. Biol. Chem.* 259, 740–748.
- GAWDE, A.J., CANTRELL, C.L., & ZHELJAZKOV, V.D. (2009). Dual extraction of essential oil and podophyllotoxin from *Juniperus virginiana*. *Ind. Crops Prod.* 30, 276–280.
- GERSHENZON, J. (1993). The cost of plant chemical defenses against herbivory: A biochemical perspective. In *Insect-Plant Interactions*, E.A. Bernays, ed. (Boca Raton, Florida, US: CRC Press),.
- GHAZVIN, I. (2007). Essential Oil Constituents of Leaves of the Male and Female Shrubs of *Juniperus chinensis* L. from Isfahan. *Iran. J. Pharm. Sci.* 3, 177–180.
- GIATROPOULOS, A., PITAROKILI, D., PAPAIOANNOU, F., PAPACHRISTOS, D.P., KOLIOPOULOS, G., EMMANOUEL, N., TZAKOU, O., & MICHAELAKIS, A. (2012). Essential oil composition, adult repellency and larvicidal activity of eight Cupressaceae species from Greece against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 112, 1113–1123.
- GIBBS, A. (1995). Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: model mixtures and lipid interactions. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 112, 667–672.
- GIBBS, A.G. (2002). Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. *J. Insect Physiol.* 48, 391–400.

- GIJZEN MARK, LEWINSOHN EFRAIM, SAVAGE THOMAS J., & CROTEAU RODNEY B. (1993). Conifer Monoterpenes. In *Bioactive Volatile Compounds from Plants*, (American Chemical Society), pp. 8–22.
- GLIŠIĆ, S.B., MILOJEVIĆ, S.Z., DIMITRIJEVIĆ, S.I., ORLOVIĆ, A.M., & SKALA, D.U. (2007). Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and a comparison with some commercial antibiotics. *J. Serbian Chem. Soc.* 72, 311–320.
- GONNY, M., CAVALEIRO, C., SALGUEIRO, L., & CASANOVA, J. (2006). Analysis of *Juniperus communis* subsp. *alpina* needle, berry, wood and root oils by combination of GC, GC/MS and <sup>13</sup>C-NMR. *Flavour Fragr. J.* 21, 99–106.
- GONZÁLEZ-GUTIÉRREZ, P.A., KÖHLER, E., & BORSCH, T. (2013). New species of *Buxus* (Buxaceae) from northeastern Cuba based on morphological and molecular characters, including some comments on molecular diagnosis. *Willdenowia* 43, 125–137.
- GORDIEN, A.Y., GRAY, A.I., FRANZBLAU, S.G., & SEIDEL, V. (2009). Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus communis* L.(Cupressaceae). *J. Ethnopharmacol.* 126, 500–505.
- GRANT, R.H., JENKS, M.A., RICH, P.J., PETERS, P.J., & ASHWORTH, E.N. (1995). Scattering of ultraviolet and photosynthetically active radiation by *Sorghum bicolor*: influence of epicuticular wax. *Agric. For. Meteorol.* 75, 263–281.
- GRAUR, D., & LI, W.-H. (2000). *Fundamentals of molecular evolution* (Sunderland, Mass.: Sinauer Associates).
- GÜLZ, P.-G. (1994). Epicuticular leaf waxes in the evolution of the plant kingdom. *J. Plant Physiol.* 143, 453–464.
- GÜLZ, P.-G., & MÜLLER, E. (1992). Seasonal variation in the composition of epicuticular waxes of *Quercus robur* leaves. *Z. Für Naturforschung C J. Biosci.* 47, 800–806.
- GÜLZ, P.G., & BOOR, G. (1992). Seasonal variations in epicuticular wax ultrastructures of *Quercus robur* leaves. *Z Naturforsch Sect C-J Biosci* 47, 800–806.
- GÜLZ, P.-G., MÜLLER, E., & PRASAD, R.B.N. (1991). Developmental and seasonal variations in the epicuticular waxes of *Tilia tomentosa* leaves. *Phytochemistry* 30, 769–773.



- GÜLZ, P.G., MÜLLER, E., & PRASAD, R.B.N. (1989). Organ-specific composition of epicuticular waxes of beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves and seeds. *Z Naturforsch* 44, 731–734.
- GÜNTHARDT-GOERG, M.S. (1986). Epicuticular wax of needles of *Pinus cembra*, *Pinus sylvestris* and *Picea abies*. *Eur. J. For. Pathol.* 16, 400–408.
- GUO, W., GREWE, F., COBO-CLARK, A., FAN, W., DUAN, Z., ADAMS, R.P., SCHWARZBACH, A.E., & MOWER, J.P. (2014). Predominant and Substoichiometric Isomers of the Plastid Genome Coexist within *Juniperus* Plants and Have Shifted Multiple Times during Cupressophyte Evolution. *Genome Biol. Evol.* 6, 580–590.
- HĂDĂRUGĂ, N., BRANIC, A., HĂDĂRUGĂ, D., GRUIA, A., PLEȘA, C., COSTESCU, C., ARDELEAN, A., & LUPEA, A. (2011). Comparative study of *Juniperus communis* and *Juniperus virginiana* essential oils: TLC and GC analysis. *JPC - J. Planar Chromatogr. - Mod. TLC* 24, 130–135.
- HAIDER, N. (2011). Chloroplast-specific universal primers and their uses in plant studies. *Biol. Plant.* 55, 225–236.
- HAMILTON, M.B. (1999). Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Mol. Ecol.* 521–523.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., & RYAN, P.D. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron.* 4, 1–9.
- HAN, J., & CALVIN, M. (1969). Hydrocarbon distribution of algae and bacteria, and microbiological activity in sediments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 64, 436–443.
- HAN, J., MCCARTHY, E.D., VAN HOEVEN, W., CALVIN, M., & BRADLEY, W.H. (1968). Organic geochemical studies, II. A preliminary report on the distribution of aliphatic hydrocarbons in algae, in bacteria, and in a recent lake sediment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 59, 29.
- HANOVER, J.W., & KEATHLEY, D.E. (1988). *Genetic Manipulation of Woody Plants* (Boston, MA: Springer US).
- HANS-WALTER, H. (2005). Chapter 20. In *Plant Biochemistry*, (Elsevier), pp. 518–557.
- HARBORNE, J.B. (1967). *Comparative biochemistry of the flavonoids*.



- HASEGAWA, M., KISHINO, H., & YANO, T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22, 160–174.
- HAUKE, V., & SCHREIBER, L. (1998). Ontogenetic and seasonal development of wax composition and cuticular transpiration of ivy (*Hedera helix* L.) sun and shade leaves. *Planta* 207, 67–75.
- HERBIN, G.A., & ROBINS, P.A. (1968). Studies on plant cuticular waxes—I: The chemotaxonomy of alkanes and alkenes of the genus *Aloe* (Liliaceae). *Phytochemistry* 7, 239–255.
- HERBIN, G.A., & ROBINS, P.A. (1969). Patterns of variation and development in leaf wax alkanes. *Phytochemistry* 8, 1985–1998.
- HEZARI, M., KETCHUM, R.E., GIBSON, D.M., & CROTEAU, R. (1997). Taxol Production and Taxadiene Synthase Activity in *Taxus canadensis* Cell Suspension Cultures. *Arch. Biochem. Biophys.* 337, 185–190.
- HIJMANS, R.J., CAMERON, S.E., PARRA, J.L., JONES, P.G., & JARVIS, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* 25, 1965–1978.
- HIJMANS, R.J., GUARINO, L., BUSSINK, C., MATHUR, P., CRUZ, M., BARRENTES, I., & ROJAS, E. (2012). DIVA-GIS 7.5. *Geogr. Inf. Syst. Anal. Species Distrib. Data Man.* Available <http://www.Diva-Gis.Org>.
- HILL, K. (2005). Diversity and evolution of Gymnosperms. In *Plant Diversity and Evolution: Genotypic and Phenotypic Variation in Higher Plants*, pp. 33–38.
- HINRICHS, K.-U., RINNA, J., RULLKÖTTER, J., & STEIN, R. (1997). A 160-kyr record of alkenone-derived sea-surface temperatures from Santa Barbara Basin sediments. *Naturwissenschaften* 84, 126–128.
- HIRAO, T., WATANABE, A., KURITA, M., KONDO, T., & TAKATA, K. (2008). Complete nucleotide sequence of the *Cryptomeria japonica* D. Don. chloroplast genome and comparative chloroplast genomics: diversified genomic structure of coniferous species. *BMC Plant Biol.* 8, 70.
- HOLLOWAY, P. (1994). Plant Cuticles: Physicochemical Characteristics and Biosynthesis. In *Air Pollutants and the Leaf Cuticle*, K. Percy, J.N. Cape, R. Jagels, and C. Simpson, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–13.

- HOLLOWAY, P.J. (1971). The chemical and physical characteristics of leaf surfaces. Sect. I, Chap. 2. In Ecology of Leaf Surface Microorganisms, T. PREECE, & C.H. DICKINSON, eds. (PREECE, T, F, DICKINSON, C, H ED (S). Ecology of leaf surface micro-organisms. Academic Press),.
- HOLLOWAY, P.J. (1982). Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: an overview (CUTLER, D. F, ALVIN, K. L, PRICE, C. E ED(S). The plant cuticle. London etc., Academic Press).
- HOLTHUIJZEN, A.M., & SHARIK, T.L. (1985). The avian seed dispersal system of eastern red cedar (*Juniperus virginiana*). Can. J. Bot. 63, 1508–1515.
- HOLTHUIJZEN, A.M.A., SHARIK, T.L., & FRASER, J.D. (1987). Dispersal of eastern red cedar (*Juniperus virginiana*) into pastures: an overview. Can. J. Bot. 65, 1092–1095.
- HOWARD, J.J., GREEN, T.P., & WIEMER, D.F. (1989). Comparative deterrence of two terpenoids to two genera of attine ants. J. Chem. Ecol. 15, 2279–2288.
- HUANG, Y., LOCKHEART, M.J., COLLISTER, J.W., & EGLINTON, G. (1995). Molecular and isotopic biogeochemistry of the Miocene *Clarkia* Formation: hydrocarbons and alcohols. Org. Geochem. 23, 785–801.
- HUBBELL, S.P., WIEMER, D.F., & ADEJARE, A. (1983). An antifungal terpenoid defends a neotropical tree (*Hymenaea*) against attack by fungus-growing ants (*Atta*). Oecologia 60, 321–327.
- HUDGINS, J.W., CHRISTIANSEN, E., & FRANCESCHI, V.R. (2004). Induction of anatomically based defense responses in stems of diverse conifers by methyl jasmonate: a phylogenetic perspective. Tree Physiol. 24, 251–264.
- JALAS, J., & SUOMINEN, J. (1988). Atlas Florae Europaeae: distribution of vascular plants in Europe (Cambridge University Press).
- JAMES, S.A. (2009). Geographic Variation in the Leaf Oils and DNA Fingerprints (RAPDs) of *Juniperus thurifera* L. from. J. Essent. Oil Res. 15, 148–154.
- JANSEN, R.K., & RUHLMAN, T.A. (2012). Plastid Genomes of Seed Plants. In Genomics of Chloroplasts and Mitochondria, R. BOCK, & V. KNOOP, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 103–126.
- JEFFREE, C.E. (1986). The cuticle, epicuticular waxes and trichomes of plants, with reference to their structure, functions and evolution. Insects Plant Surf. Edw. Arnold Lond. 23–64.

- JEFFREE, C.E., BAKER, E.A., & HOLLOWAY, P.J. (1976). Origins of the fine structure of plant epicuticular waxes. DICKINSON C H PREECE T F Ed Microbiol. Aer. Plant Surf. Academic Press Lond. N. Y. San Franc. 119–158.
- JENKS, M.A., JOLY, R.J., PETERS, P.J., RICH, P.J., AXTELL, J.D., & ASHWORTH, E.N. (1994a). Chemically induced cuticle mutation affecting epidermal conductance to water vapor and disease susceptibility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant Physiol.* 105, 1239–1245.
- JENKS, M.A., RICH, P.J., & ASHWORTH, E.N. (1994b). Involvement of cork cells in the secretion of epicuticular wax filaments on *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Int. J. Plant Sci.* 506–518.
- JENKS, M.A., TUTTLE, H.A., EIGENBRODE, S.D., & FELDMANN, K.A. (1995). Leaf epicuticular waxes of the *eceriferum* mutants in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 108, 369–377.
- JO, G.G., & KIM, J.H. (2005). Intraspecific variability of *Juniperus* L. (Cupressaceae) based on monoterpenoid compositions. *J. Plant Biol.* 48, 155–158.
- JOFFRE, R., RAMBAL, S., & DAMESIN, C. (1999). Functional attributes in Mediterranean-type ecosystems. *Handb. Funct. Plant Ecol.* 347–380.
- JOVANOVIĆ, B. (1970). 2. Rod *Juniperus* L. In *Flora SR Srbije I*, M. JOSIFOVIĆ, ed. (Belgrade, Serbia: SANU), pp. 158–164.
- JUKES, T.H., & CANTOR, C.R. (1969). Evolution of protein molecules. *Mamm. Protein Metab.* 3, 21–132.
- KAI, G., ZHAO, L., ZHANG, L., LI, Z., GUO, B., ZHAO, D., SUN, X., MIAO, Z., & TANG, K. (2005). Characterization and expression profile analysis of a new cDNA encoding taxadiene synthase from *Taxus media*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38, 668.
- KALENDAR, R., LEE, D., AND SCHULMAN, A.H. (2011). Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics* 98, 137–144.
- KALLIO, H., & JUNGER-MANNERMAA, K. (1989). Maritime influence on the volatile terpenes in the berries of different ecotypes of juniper (*Juniperus communis* L.) in Finland. *J. Agric. Food Chem.* 37, 1013–1016.

- KAMPRANIS, S.C., IOANNIDIS, D., PURVIS, A., MAHREZ, W., NINGA, E., KATERELOS, N.A., ANSSOUR, S., DUNWELL, J.M., DEGENHARDT, J., MAKRIS, A.M., ET AL. (2007). Rational Conversion of Substrate and Product Specificity in a Salvia Monoterpene Synthase: Structural Insights into the Evolution of Terpene Synthase Function. *PLANT CELL ONLINE* 19, 1994–2005.
- KARLSEN, J., & SVENDSEN, A.B. (1965). The Constituents of Norwegian Oil of *Juniper*. *Medd Nor. Farm. Selsk* 27, 165.
- KATOH, S., HYATT, D., & CROTEAU, R. (2004). Altering product outcome in *Abies grandis* (-)-limonene synthase and (-)-limonene/(-)- $\alpha$ -pinene synthase by domain swapping and directed mutagenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 425, 65–76.
- KATZ, D.A., SNEH, B., & FRIEDMAN, J. (1987). The allelopathic potential of *Coridothymus capitatus* L.(Labiatae). Preliminary studies on the roles of the shrub in the inhibition of annuals germination and/or to promote allelopathically active actinomycetes. *Plant Soil* 98, 53–66.
- KAWAMURA, K., ISHIMURA, Y., & YAMAZAKI, K. (2003). Four years' observations of terrestrial lipid class compounds in marine aerosols from the western North Pacific. *Glob. Biogeochem. Cycles* 17, 3–1–3–19.
- KEELING, C.I., & BOHLMANN, J. (2006). Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytol.* 170, 657–675.
- KELLOGG, E.A., & WATSON, L. (1993). Phylogenetic studies of a large data set. I. Bambusoideae, Andropogonodae, and Pooideae (Gramineae). *Bot. Rev.* 59, 273–343.
- KERFOURN, C., & GARREC, J.P. (1992). Modifications in the alkane composition of cuticular waxes from spruce needles (*Picea abies*) and ivy leaves (*Hedera helix*) exposed to ozone fumigation and acid fog: comparison with needles from declining spruce trees. *Can. J. Bot.* 70, 861–869.
- KERSTIENS, G. (1996). Cuticular water permeability and its physiological significance. *J. Exp. Bot.* 47, 1813–1832.
- KHAJJAK, M.H., RAZA, A.M., SHAWANI, M.N., AHMED, F., SHAHEEN, G., & SAEED, M. (2012). Comparative analysis of essential oil contents of *Juniperus excelsa* (M. Beib.) found in Balochistan, Pakistan. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 8154–8159.

- KIM, K.W. (2012). Epicuticular Waxes and Stomata of Adult Scale Leaves of the Chinese Juniper *Juniperus chinensis*. *Applied Microscopy* 42, 124–128.
- KIM, S.-M., KUZUYAMA, T., KOBAYASHI, A., SANDO, T., CHANG, Y.-J., & KIM, S.-U. (2008). 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase (IDS) is encoded by multicopy genes in gymnosperms *Ginkgo biloba* and *Pinus taeda*. *Planta* 227, 287–298.
- KLIMKO, M., BORATYŃSKA, K., MONTSERRAT, J.M., DIDUKH, Y., ROMO, A., GÓMEZ, D., KLUZA-WIELOCH, M., MARCYSIAK, K., & BORATYŃSKI, A. (2007). Morphological variation of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* (Cupressaceae) in the Mediterranean region. *Flora-Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 202, 133–147.
- KLOUCEK, P., SMID, J., FRANKOVA, A., KOKOSKA, L., VALTEROVA, I., & PAVELA, R. (2012). Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. 15th IUFOST World Congr. Food Sci. Technol. – Food Sci. Solut. Evol. World 47, 161–165.
- KNIGHT, T.G., WALLWORK, M.A., & SEDGLEY, M. (2004). Leaf epicuticular wax and cuticle ultrastructure of four *Eucalyptus* species and their hybrids. *Int. J. Plant Sci.* 165, 27–36.
- KOCH, M.A. (2005). Evolution of the *trnF*<sup>(GAA)</sup> Gene in *Arabidopsis* Relatives and the Brassicaceae Family: Monophyletic Origin and Subsequent Diversification of a Plastidic Pseudogene. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1032–1043.
- KOLATTUKUDY, P., STUMPF, P.K., & E. E. CONN (1980). The biochemistry of plants. *Biochem. Plants*.
- KOMEH-NKRUMAH, S.A., NANJUNDAIAH, S.M., RAJAJIAH, R., YU, H., & MOUDGIL, K.D. (2011). Topical dermal application of essential oils attenuates the severity of adjuvant arthritis in lewis rats. *Phytother. Res.* 26, 54–59.
- KOROTKOVA, N., BORSCH, T., QUANDT, D., TAYLOR, N.P., MULLER, K.F., & BARTHLOTT, W. (2011). What does it take to resolve relationships and to identify species with molecular markers? An example from the epiphytic Rhipsalideae (Cactaceae). *Am. J. Bot.* 98, 1549–1572.
- KOUKOS, P.K., PAPADOPOULOU, K.I., PAPAGIANNPOULOS, A.D., & PATIAKA, D.T. (2002). Variation in the Chemical Composition of the Berry Oil of *Juniperus oxycedrus* L Grown in North and West Greece. *Holz Als Roh- Werkst.* 60, 152–153.

- KUHN, T.K., KRULL, E.S., BOWATER, A., GRICE, K., & GLEIXNER, G. (2010). The occurrence of short chain n-alkanes with an even over odd predominance in higher plants and soils. *Org. Geochem.* *41*, 88–95.
- KUNST, L., & SAMUELS, A.. (2003). Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog. Lipid Res.* *42*, 51–80.
- LANGENHEIM, J.H. (1994). Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.* *20*, 1223–1280.
- LAREDO, M.A., SIMPSON, C., MINSON, D.J., & ORPIN, C.G. (1991). The potential for using n-alkanes in tropical forages as a marker for the determination of dry matter by grazing ruminants. *Growth D* *90*, 40.
- LASKARIS, G., DE JONG, C.F., JAZIRI, M., VAN DER HEIJDEN, R., THEODORIDIS, G., & VERPOORTE, R. (1999). Geranylgeranyl diphosphate synthase activity and taxane production in *Taxus baccata* cells. *Phytochemistry* *50*, 939–946.
- LEŠJAK, M., BEARA, I., SIMIN, N., SVIRČEV, E., FRANCIŠKOVIĆ, M., BALOG, K., & KNEŽEVIĆ, P. (2012). Chemical characterization and antimicrobial property of essential oils of *Juniperus macrocarpa* Sibth. ET SM. leaves and cones. *Planta Med.* *78*, PF43.
- LEŠJAK, M.M., BEARA, I.N., ORČIĆ, D.Z., RISTIĆ, J.D., ANAČKOV, G.T., BOŽIN, B.N., & MIMICA-DUKIĆ, N.M. (2013). Chemical characterisation and biological effects of *Juniperus foetidissima* Willd. 1806. *LWT - Food Sci. Technol.* *53*, 530–539.
- LEŠJAK, M.M., BEARA, I.N., ORČIĆ, D.Z., PETAR, K.N., SIMIN, N.Đ., EMILIJ, S.Đ., & MIMICA-DUKIĆ, N.M. (2014). Phytochemical composition and antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities of *Juniperus macrocarpa* Sibth. et Sm. *J. Funct. Foods* *7*, 257–268.
- LEWINSOHN, E., GIJZEN, M., & CROTEAU, R. (1992). Wound-inducible pinene cyclase from grand fir: purification, characterization, and renaturation after SDS-PAGE. *Arch. Biochem. Biophys.* *293*, 167–173.
- LEWINSOHN, E., GIJZEN, M., MUZIKA, R.M., BARTON, K., & CROTEAU, R. (1993). Oleoresinosis in Grand Fir (*Abies grandis*) saplings and mature trees (modulation of this wound response by light and water stresses). *Plant Physiol.* *101*, 1021–1028.

- LI, H.-L. (1953). A reclassification of Libocedrus and Cupressaceae. *J. Arnold Arbor.* *34*, 17–36.
- LI, J., HUANG, J., GE, J., HUANG, X., & XIE, S. (2013). Chemotaxonomic significance of *n*-alkane distributions from leaf wax in genus of *Sinojackia species* (Styracaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* *49*, 30–36.
- LI, R., LUO, G., MEYERS, P.A., GU, Y., WANG, H., & XIE, S. (2012). Leaf wax *n*-alkane chemotaxonomy of bamboo from a tropical rain forest in Southwest China. *Plant Syst. Evol.* *298*, 731–738.
- LIN, C.-P., HUANG, J.-P., WU, C.-S., HSU, C.-Y., & CHAW, S.-M. (2010). Comparative Chloroplast Genomics Reveals the Evolution of Pinaceae Genera and Subfamilies. *Genome Biol. Evol.* *2*, 504–517.
- LIN, C.-P., WU, C.-S., HUANG, Y.-Y., & CHAW, S.-M. (2012). The Complete Chloroplast Genome of *Ginkgo biloba* Reveals the Mechanism of Inverted Repeat Contraction. *Genome Biol. Evol.* *4*, 374–381.
- LOIZZO, M.R., TUNDIS, R., CONFORTI, F., SAAB, A.M., STATTI, G.A., & MENICHINI, F. (2007). Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon. *Food Chem.* *105*, 572–578.
- LOIZZO, M.R., SAAB, A.M., TUNDIS, R., STATTI, G.A., MENICHINI, F., LAMPRONTI, I., GAMBARI, R., CINATL, J., & DOERR, H.W. (2008). Phytochemical analysis and in vitro antiviral activities of the essential oils of seven Lebanon species. *Chem. Biodivers.* *5*, 461–470.
- LOOMAN, A., & SVENDSEN, A.B. (1992). The needle essential oil of Norwegian mountain juniper, *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. *Flavour Fragr. J.* *7*, 23–25.
- LOŽIENĖ, K., & LABOKAS, J. (2012). Effects of abiotic environmental conditions on amount and enantiomeric composition of  $\alpha$ -pinene in *Juniperus communis* L. *Biochem. Syst. Ecol.* *44*, 36–43.
- LÜTZ, C., HEINZMANN, U., & GÜLZ, P.G. (1990). Surface structures and epicuticular wax composition of spruce needles after long-term treatment with ozone and acid mist. *Tree Expo. Exp. Closed Chamb.* *64*, 313–322.



- MAFFEI, M. (1994a). Discriminant analysis of leaf wax alkanes in the Lamiaceae and four other plant families. *Biochem. Syst. Ecol.* **22**, 711–728.
- MAFFEI, M. (1994b). Chemotaxonomic significance of leaf wax alkanes in the Compositae. In *Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference*, Kew, pp. 141–158.
- MAFFEI, M. (1996a). Chemotaxonomic significance of leaf wax n-alkanes in the Umbelliferae, Cruciferae and Leguminosae (Subf. Papilionoideae). *Biochem. Syst. Ecol.* **24**, 531–545.
- MAFFEI, M. (1996b). Chemotaxonomic significance of leaf wax alkanes in the Gramineae. *Biochem. Syst. Ecol.* **24**, 53–64.
- MAFFEI, M., BADINO, S., & BOSSI, S. (2004). Chemotaxonomic significance of leaf wax n-alkanes in the Pinales (Coniferales). *J Biol Res* **1**, 3–19.
- MAHMOUDVAND, M., ABBASIPOUR, H., HOSSEINPOUR, M.H., RASTEGAR, F., & BASIJ, M. (2011). Using some plant essential oils as natural fumigants against adults of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Munis Entomol Zool* **6**, 150–154.
- MANSOURI, N., SATRANI, B., GHANMI, M., EL GHADRAOUI, L., & AAFI, A. (2011). Étude chimique et biologique des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* ssp. *lycia* et *Juniperus phoenicea* ssp. *turbinata* du Maroc. *Biotechnol. Agron. Société Environ.* **15**.
- MAO, K., HAO, G., LIU, J., ADAMS, R.P., & MILNE, R.I. (2010). Diversification and biogeography of *Juniperus* (Cupressaceae): variable diversification rates and multiple intercontinental dispersals. *New Phytol.* **188**, 254–272.
- MARGARIS, N.S., & VOKOU, D. (1982). Structural and physiological features of woody plants in phrygic ecosystems related to adaptive mechanisms. *Ecol. Mediterr.* **8**, 449–459.
- MARJANOVIĆ-BALABAN, Ž., & MILETIĆ, P. (2011). Utvrđivanje hemijskog sastava eteričnog ulja četinarara i ispitivanje mogućnosti njihove primjene u industriji. UDK 665.528.214.7:615
- MARKÓ, G., GYURICZA, V., BERNÁTH, J., & ALTBACKER, V. (2008). Essential Oil Yield and Composition Reflect Browsing Damage of Junipers. *J. Chem. Ecol.* **34**, 1545–1552.



- MARKÓ, G., NOVÁK, I., BERNÁTH, J., & ALTBÄCKER, V. (2011). Both Gas Chromatography and an Electronic Nose Reflect Chemical Polymorphism of Juniper Shrubs Browsed or Avoided by Sheep. *J. Chem. Ecol.* 37, 705–713.
- MARONGIU, B., PORCEDDA, S., CAREDDA, A., DE GIOANNIS, B., VARGIU, L., & LA COLLA, P. (2003). Extraction of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* essential oil by supercritical carbon dioxide: influence of some process parameters and biological activity. *Flavour Fragr. J.* 18, 390–397.
- MARONGIU, B., PORCEDDA, S., PIRAS, A., SANNA, G., MURREDDU, M., & LODDO, R. (2005). Extraction of *Juniperus communis* L. ssp. *nana* Willd. essential oil by supercritical carbon dioxide. *Flavour Fragr. J.* 21, 148–154.
- MARTIN, D.M. (2004). Functional Characterization of Nine Norway Spruce TPS Genes and Evolution of Gymnosperm Terpene Synthases of the TPS-d Subfamily. *PLANT Physiol.* 135, 1908–1927.
- MARTIN, J.T., & JUNIPER, B.E. (1970). The cuticles of plants. *Cuticles Plants*.
- MARTIN-SMITH, M., SUBRAMANIAN, G., & CONNOR, H.E. (1967). Surface wax components of five species of *Cortaderia* (gramineae)—A chemotaxonomic comparison. *Phytochemistry* 6, 559–572.
- MARTZ, F., PELTOLA, R., FONTANAY, S., DUVAL, R.E., JULKUNEN-TIITTO, R., & STARK, S. (2009). Effect of Latitude and Altitude on the Terpenoid and Soluble Phenolic Composition of Juniper (*Juniperus communis*) Needles and Evaluation of Their Antibacterial Activity in the Boreal Zone. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9575–9584.
- MASTELIĆ, J., MILOŠ, M., KUŠTRAK, D., & RADONIĆ, A. (2000). Essential Oil and Glycosidically Bound Volatile Compounds from the Needles of Common Juniper (*Juniperus communis* L.). *Croat. Chem. Acta* 73, 585–593.
- MAZUREK, M.A., & SIMONEIT, B.R.T. (1997). Higher Molecular Weight Terpenoids as Indicators of Organic Emissions from Terrestrial Vegetation. In *Molecular Markers in Environmental Geochemistry*, (American Chemical Society), pp. 92–108.
- McKAY, S.A.B. (2003). Insect Attack and Wounding Induce Traumatic Resin Duct Development and Gene Expression of (–)-Pinene Synthase in Sitka Spruce. *PLANT Physiol.* 133, 368–378.
- McPHERSON, J.K., & MULLER, C.H. (1967). Light competition between *Ceanothus* and *Salvia* shrubs. *Bull. Torrey Bot. Club* 41–55.

- MECKLENBURG, H.C. (1966). Inflorescence hydrocarbons of some species of *Solanum* L., and their possible taxonomic significance. *Phytochemistry* 5, 1201–1209.
- MEDINA, E., AGUIAR, G., GOMEZ, M., ARANDA, J., MEDINA, J.D., & WINTER, K. (2006). Taxonomic significance of the epicuticular wax composition in species of the genus *Clusia* from Panama. *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 319–326.
- MEDINI, H., ELAISSI, A., FARHAT, F., KHOUJA, M.L., CHEMLI, R., & HARZALLAH-SKHIRI, F. (2009a). Seasonal and geographical influences on the chemical composition of *Juniperus phoenicea* L. essential oil leaves from the Northern Tunisia. *Chem. Biodivers.* 6, 1378–1387.
- MEDINI, H., MARZOUKI, H., CHEMLI, R., KHOUJA, M.L., MARONGIU, B., PIRAS, A., PORCEDDA, S., & TUVERI, E. (2009b). Comparison of the antimicrobial activity and the essential oil composition of *Juniperus oxycedrus* subsp. *macrocarpa* and *J. oxycedrus* subsp. *rufescens* obtained by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide extraction methods. *Chem. Nat. Compd.* 45, 739–741.
- MEDINI, H., ELAISSI, A., KHOUJA, M.L., CHRAIEF, I., FARHAT, F., HAMMAMI, M., CHEMLI, R., & HARZALLAH-SKHIRI, F. (2010). Leaf Essential Oil of *Juniperus oxycedrus* L. (Cupressaceae) Harvested in Northern Tunisia: Composition and Intra-Specific Variability. *Chem. Biodivers.* 7, 1254–1266.
- MEDINI, H., MANONGIU, B., AICHA, N., CHEKIR-GHEDIRA, L., HARZALLAH-SKHIRI, F., & KHOUJA, M.L. (2013). Chemical and Antibacterial Polymorphism of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* ssp. *macrocarpa* (Cupressaceae) Leaf Essential Oils from Tunisia. *J. Chem.* 2013, 1–8.
- MERINO, E.F., MAESTRI, D.M., & PLANCHUELO, A.M. (1999). Chemotaxonomic evaluation of leaf alkanes in species of *Lupinus* (Leguminosae). *Biochem. Syst. Ecol.* 27, 297–301.
- MEYERS, P.A. (2003). Applications of organic geochemistry to paleolimnological reconstructions: a summary of examples from the Laurentian Great Lakes. *Org. Geochem.* 34, 261–289.
- MICHALCZYK, I.M. (2008). Application of DNA marker systems to test for genetic imprints of habitat fragmentation in *Juniperus communis* L. on different spatial and temporal scales-Integration of scientific knowledge into conservation measures. Universitätsbibliothek Marburg.

- MICHALCZYK, I.M., OPGENOORTH, L., LUECKE, Y., HUCK, S., & ZIEGENHAGEN, B. (2010). Genetic support for perglacial survival of *Juniperus communis* L. in Central Europe. *The Holocene* 20, 887–894.
- MILLER, B. (2005). Insect-Induced Conifer Defense. White Pine Weevil and Methyl Jasmonate Induce Traumatic Resinosis, de Novo Formed Volatile Emissions, and Accumulation of Terpenoid Synthase and Putative Octadecanoid Pathway Transcripts in Sitka Spruce. *PLANT Physiol.* 137, 369–382.
- MILOJEVIĆ, S.Ž., GLIŠIĆ, S.B., & SKALA, D.U. (2010). The batch fractionation of *Juniperus communis* L. essential oil: Experimental study, mathematical simulation and process economy. *Chem. Ind. Chem. Eng. Quarterly* 16, 183–191.
- MILOS, M., & RADONIC, A. (2000). Gas chromatography mass spectral analysis of free and glycosidically bound volatile compounds from *Juniperus oxycedrus* L. growing wild in Croatia. *Food Chem.* 68, 333–338.
- MISHARINA, T.A., TEREININA, M.B., & KRIKUNOVA, N.I. (2009). Antioxidant properties of essential oils. *Appl. Biochem. Microbiol.* 45, 642–647.
- MOEIN, M.R., GHASEMI, Y., MOEIN, S., & NEJATI, M. (2010). Analysis of antimicrobial, antifungal and antioxidant activities of *Juniperus excelsa* M. B subsp. *polycarpus* (K. Koch) Takhtajan essential oil. *Pharmacogn. Res.* 2, 128.
- MOGENSEN, H.L. (1996). The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *Am. J. Bot.* 83, 383–404.
- MOTTA, L.B., SALATINO, A., & SALATINO, M.L. (2009). Foliar cuticular alkanes of *Camarea* (Malpighiaceae) and their taxonomic significance. *Biochem. Syst. Ecol.* 37, 35–39.
- NEINHUIS, C., KOCH, K., & BARTHOLOTT, W. (2001). Movement and regeneration of epicuticular waxes through plant cuticles. *Planta* 213, 427–434.
- NGUYEN-TU, T.T., EGASSE, C., ZELLER, B., & DERENNE, S. (2007). Chemotaxonomical investigations of fossil and extant beeches. I. Leaf lipids from the extant *Fagus sylvatica* L. *Paléobotanique Lévolution Monde Végétal Quelques Problèmes Actual. Palaeobot. Evol. Plants World Some Curr. Probl.* 6, 451–461.
- NICHOLS, J., BOOTH, R.K., JACKSON, S.T., PENDALL, E.G., & HUANG, Y. (2010). Differential hydrogen isotopic ratios of *Sphagnum* and vascular plant biomarkers in ombrotrophic peatlands as a quantitative proxy for precipitation—evaporation balance. *Geochim. Cosmochim. Acta* 74, 1407–1416.

- NICHOLS, J.E., BOOTH, R.K., JACKSON, S.T., PENDALL, E.G., & HUANG, Y. (2006). Paleohydrologic reconstruction based on *n*-alkane distributions in ombrotrophic peat. *Org. Geochem.* *37*, 1505–1513.
- NIKOLIC, B., RISTIC, M., BOJOVIC, S., & MARIN, P.D. (2008). Variability of the needle essential oils of *Pinus peuce* from different Populations in Montenegro and Serbia. *Chem. Biodivers.* *5*, 1377–1388.
- NIKOLIC, B., TESEVIC, V., DJORDJEVIC, I., JADRANIN, M., BOJOVIC, S., & MARIN, P.D. (2009). *n*-Alkanes in needle waxes of *Picea omorika* var. *vukomanii*. *Chem. Nat. Compd.* *45*, 697–699.
- NIKOLIC, B., RISTIC, M., BOJOVIC, S., MATEVSKI, V., KRIVOSEJ, Z., AND MARIN, P.D. (2014). Essential-Oil Composition of the Needles Collected from Natural Populations of Macedonian Pine (*Pinus peuce* GRISEB.) from the Scardo-Pindic Mountain System. *Chem. Biodivers.* *11*, 934–948.
- NIKOLIĆ, B., RISTIĆ, M., BOJOVIĆ, S., & MARIN, P.D. (2007). Variability of the needle essential oils of *Pinus heldreichii* from different populations in Montenegro and Serbia. *Chem. Biodivers.* *4*, 905–916.
- NIKOLIĆ, B., TEŠEVIĆ, V., DJORDJEVIĆ, I., JADRANIN, M., TODOSIJEVIĆ, M., BOJOVIĆ, S., & MARIN, P.D. (2010). *n*-Alkanes in the needle waxes of *Pinus heldreichii* var. *pančićii*. *J. Serbian Chem. Soc.* *75*, 1337–1346.
- 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.
- NIKOLIĆ, B., TEŠEVIĆ, V., DJORDJEVIĆ, I., TODOSIJEVIĆ, M., JADRANIN, M., BOJOVIĆ, S., & MARIN, P.D. (2012a). Population Variability of Nonacosan-10-ol and *n*-Alkanes in Needle Cuticular Waxes of Macedonian Pine (*Pinus peuce* Griseb.). *Chem. Biodivers.* *9*, 1155–1165.
- NIKOLIĆ, B., TEŠEVIĆ, V., DJORDJEVIĆ, I., TODOSIJEVIĆ, M., JADRANIN, M., BOJOVIĆ, S., & MARIN, P.D. (2012b). Chemodiversity of Nonacosan-10-ol and *n*-Alkanes in the Needle Wax of *Pinus heldreichii*. *Chem. Biodivers.* *9*, 80–90.

- NIKOLIĆ, B., TEŠEVIĆ, V., DJORDJEVIĆ, I., TODOSIJEVIĆ, M., JADRANIN, M., BOJOVIĆ, S., & MARIN, P.D. (2013a). Variability of *n*-Alkanes and Nonacosan-10-ol in Natural Populations of *Picea omorika*. *Chem. Biodivers.* 10, 473–483.
- NIKOLIĆ, B., TEŠEVIĆ, V., BOJOVIĆ, S., & MARIN, P.D. (2013b). Chemotaxonomic Implications of the *n*-Alkane Composition and the Nonacosan-10-ol Content in *Picea omorika*, *Pinus heldreichii*, and *Pinus peuce*. *Chem. Biodivers.* 10, 677–686.
- NIP, M., TEGELAAR, E.W., LEEUW, J. DE, SCHENCK, P.A., & HOLLOWAY, P.J. (1986). A new non-saponifiable highly aliphatic and resistant biopolymer in plant cuticles. *Naturwissenschaften* 73, 579–585.
- NISHIMURA, K., & HIROSE, Y. (1962). The composition of the volatile oil from the leaves and terminal branches of *Juniperus rigida*. In *The Families and Genera of Vascular Plants*, (Springer, Verlag Berlin Heidelberg), p. 284.
- OCHOCKA, R.J., ASZTEMBORSKA, M., ZOOK, D.R., SYBILSKA, D., PEREZ, G., & OSSICINI, L. (1997). Enantiomers of monoterpenic hydrocarbons in essential oils from *Juniperus communis*. *Phytochemistry* 44, 869–873.
- OHLROGGE, J.B., JAWORSKI, J.G., & POST-BEITENMILLER, D. (1993). De novo fatty acid biosynthesis. *Lipid Metab. Plants* CRC Press Boca Raton FL 3–32.
- OHYAMA, K., FUKUZAWA, H., KOHCHI, T., SHIRAI, H., SANO, T., SANO, S., UMESONO, K., SHIKI, Y., TAKEUCHI, M., & CHANG, Z. (1986). Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA.
- OROS, D.R., STANDLEY, L.J., CHEN, X., & SIMONEIT, B. (1999). Epicuticular wax compositions of predominant conifers of Western North America. *Z. Naturforschung C* 54, 17–24.
- OSBORNE, R., SALATINO, M.L.F., & SALATINO, A. (1989). Alkanes of foliar epicuticular waxes of the genus *Encephalartos*. *Phytochemistry* 28, 3027–3030.
- OSBORNE, R., SALATINO, A., SALATINO, M.L.F., SEKIYA, C.M., & TORRES, M.V. (1993). Alkanes of Foliar Epicuticular Waxes from Five Cycad Genera in the Zamiaceae. *Int. J. Plant Biochem.* 33, 607–609.
- OTTAVIOLI, J., GONNY, M., CASANOVA, J., & BIGHELLI, A. (2009). Chemical Variability of the Needle Oil of *Juniperus communis* ssp. *alpina* from Corsica. *Chem. Biodivers.* 6, 2192–2199.

- OTTO, A., & WILDE, V. (2001). Sesqui-, di-, and triterpenoids as chemosystematic markers in extant conifers—A review. *Bot. Rev.* 67, 141–238.
- OTTO, A., SIMONEIT, B.R.T., & REMBER, W.C. (2005). Conifer and angiosperm biomarkers in clay sediments and fossil plants from the Miocene Clarkia Formation, Idaho, USA. *Org. Geochem.* 36, 907–922.
- PATEL, S., NELSON, D.R., & GIBBS, A.G. (2001). Chemical and physical analyses of wax ester properties. *J. Insect Sci.* 1.
- PEPELJNJK, S., KOSALEC, I., KALODERA, Z., & BLAZEVIĆ, N. (2005). Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., Cupressaceae). *ACTA Pharm.-Zagreb.* 55, 417.
- PETERS, R.J., & CROTEAU, R.B. (2003). Alternative termination chemistries utilized by monoterpene cyclases: chimeric analysis of bornyl diphosphate, 1,8-cineole, and sabinene synthases. *Arch. Biochem. Biophys.* 417, 203–211.
- PETERS, R.J., FLORY, J.E., JETTER, R., RAVN, M.M., LEE, H.-J., COATES, R.M., & CROTEAU, R.B. (2000). Abietadiene synthase from grand fir (*Abies grandis*): characterization and mechanism of action of the “pseudomature” recombinant enzyme. *Biochemistry (Mosc.)* 39, 15592–15602.
- PHILLIPS, F.J. (1910). The dissemination of junipers by birds. *For. Q.* 8, 60–73.
- PHILLIPS, M.A., & CROTEAU, R.B. (1999). Resin-based defenses in conifers. *Trends Plant Sci.* 4, 184–190.
- PHILLIPS, M.A., SAVAGE, T.J., & CROTEAU, R. (1999). Monoterpene Synthases of Loblolly Pine (*Pinus taeda*) Produce Pinene Isomers and Enantiomers. *Arch. Biochem. Biophys.* 372, 197–204.
- PHILLIPS, M.A., BOHLMANN, J., & GERSHENZON, J. (2006). Molecular Regulation of Induced Terpenoid Biosynthesis in Conifers. *Phytochem. Rev.* 5, 179–189.
- PIASENTIER, E., BOVOLENTA, S., & MALOSSINI, F. (2000). The *n*-alkane concentrations in buds and leaves of browsed broadleaf trees. *J. Agric. Sci.* 135, 311–320.
- PILGER, R. (1926). Gymnospermae: Coniferae. *Natureüchen Pflanzenfamilien* 13.
- PILGER, R., & MELCHIOR, H. (1954). Gymnospermeae. *Engler's Syllabus Pflanzenfamilien* 1 312–344.

- PISARIC, M.F.J., MACDONALD, G.M., VELICHKO, A.A., & CWYNAR, L.C. (2001). The Lateglacial and Postglacial vegetation history of the northwestern limits of Beringia, based on pollen, stomate and tree stump evidence. *Quat. Sci. Rev.* 20, 235–245.
- PODILA, G.K., ROGERS, L.M., & KOLATTUKUDY, P.E. (1993). Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiol.* 103, 267–272.
- POST-BEITTENMILLER, D. (1996). Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 47, 405–430.
- POURMORTAZAVI, S.M., BAGHAEI, P., & MIRHOSSEINI, M.A. (2004). Extraction of volatile compounds from *Juniperus communis* L. leaves with supercritical fluid carbon dioxide: comparison with hydrodistillation. *Flavour Fragr. J.* 19, 417–420.
- POVEDA, M., SOUQUAL, M.-C., FAUVEL, M.-T., GAMISANS, J., & GAUQUELIN, T. (2002). Alkane composition diversity among populations of dwarf forms of *Juniperus communis* L.: comparison between western Europe and northern American populations. *Bot. J. Linn. Soc.* 140, 165–168.
- POWELL, R.A., & ADAMS, R.P. (1973). Seasonal variation in the volatile terpenoids of *Juniperus scopulorum* (Cupressaceae). *Am. J. Bot.* 60, 1041–1050.
- PRASAD, R.B.N., & GÜLZ, P.G. (1990). Developmental and seasonal variations in the epicuticular Waxes of beech leaves (*Fagus sylvatica* L.). *Z. Naturforsch. [C]* 45, 805–812.
- PREUSS, D., LEMIEUX, B., YEN, G., & DAVIS, R.W. (1993). A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev.* 7, 974–985.
- PURDY, S.J., & TRUTER, E.V. (1961). Taxonomic significance of surface lipids of plants.
- PURKAYASTHA, S., NARAIN, R., & DAHIYA, P. (2012). Evaluation of antimicrobial and phytochemical screening of Fennel, Juniper and Kalonji essential oils against multi drug resistant clinical isolates.
- RADULOVIC, N., & MILOJEVIC, A. (2012). Alkanes of *Jurinea mollis*, a Pannonian subendemic species. *Chem. Nat. Compd.* 47, 963–965.
- RAINA, V.K., SRIVASTAVA, S.K., & SYAMSUNDAR, K.V. (2005). Essential oil composition of *Juniperus chinensis* from the plains of northern India. *Flavour Fragr. J.* 20, 57–59.



- RAJČEVIĆ, N., JANAČKOVIĆ, P., BOJOVIĆ, S., TEŠEVIĆ, V., & MARIN, P.D. (2013). Variability of the Needle Essential Oils of *Juniperus deltooides* RP Adams from Different Populations in Serbia and Croatia. *Chem. Biodivers.* *10*, 144–156.
- RAJČEVIĆ, N., JANAČKOVIĆ, P., DODOŠ, T., TEŠEVIĆ, V., & MARIN, P.D. (2015). Essential-Oil Variability of *Juniperus deltooides* RP Adams along the East Adriatic Coast—How Many Chemotypes Are There? *Chem. Biodivers.* *12*, 82–95.
- RAMBAUT, A. (2014). Figtree v1.4.2: Tree figure drawing tool.
- RAMDANI, M., LOGRADA, T., ZERAIB, A., CHALARD, P., FIGUEREDO, G., BOUCHAALA, M., & ZERRAR, S. (2013). Characteristics of essential oils of *Juniperus phoenicea* from eastern Algeria. *Glob. J Res Med Plants Indig. Med Vol.* *2*, 613–623.
- RAN, J.-H., WANG, P.-P., ZHAO, H.-J., & WANG, X.-Q. (2010). A Test of Seven Candidate Barcode Regions from the Plastome in *Picea* (Pinaceae). *J. Integr. Plant Biol.* *52*, 1109–1126.
- RASHOTTE, A.M., JENKS, M.A., & FELDMANN, K.A. (2001). Cuticular waxes on *eceriferum* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* *57*, 115–123.
- RATTAN, R.S., & SHARMA, A. (2011). Plant Secondary Metabolites in the Sustainable Diamondback Moth (*Plutella xylostella* L.) Management. *Indian J. Fundam. Appl. Life Sci.* *1*, 295–309.
- RAVN, M.M., COATES, R.M., FLORY, J.E., PETERS, R.J., & CROTEAU, R. (2000). Stereochemistry of the cyclization-rearrangement of (+)-copalyl diphosphate to (-)-abietadiene catalyzed by recombinant abietadiene synthase from *Abies grandis*. *Org. Lett.* *2*, 573–576.
- REICOSKY, D.A., & HANOVER, J.W. (1978). Physiological effects of surface waxes I. Light reflectance for glaucous and nonglaucous *Picea pungens*. *Plant Physiol.* *62*, 101–104.
- REYNHARDT, E.C., & RIEDERER, M. (1994). Structures and molecular dynamics of plant waxes. *Eur. Biophys. J.* *23*, 59–70.
- REZZI, S., CAVALEIRO, C., BIGHELLI, A., SALGUEIRO, L., DA CUNHA, A.P., & CASANOVA, J. (2001). Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* subsp. *turbinata* from Corsica. *Biochem. Syst. Ecol.* *29*, 179–188.
- RIEDERER, M., & SCHNEIDER, G. (1990). The effect of the environment on the permeability and composition of *Citrus* leaf cuticles. *Planta* *180*, 154–165.



- ROACH, C.R., HALL, D.E., ZERBE, P., & BOHLMANN, J. (2014). Plasticity and Evolution of (+)-3-Carene Synthase and (-)-Sabinene Synthase Functions of a Sitka Spruce Monoterpene Synthase Gene Family Associated with Weevil Resistance. *J. Biol. Chem.* *289*, 23859–23869.
- ROBLES, C., BONIN, G., & GARZINO, S. (1999). Potentialités autotoxiques et allélopathiques de *Cistus albidus* L. *Comptes Rendus Académie Sci.-Ser. III-Sci. Vie* *322*, 677–685.
- ROCINI, C., DOS SANTOS, D.Y.A.C., & GRAHAM, S. (2006). *n*-Alkane distribution patterns in species of Lythraceae sensu lato (Myrtales). *Biochem. Syst. Ecol.* *34*, 273–274.
- RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. (2002). Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids. A Metabolic Milestone Achieved through Genomics. *PLANT Physiol.* *130*, 1079–1089.
- ROMMERSKIRCHEN, F., PLADER, A., EGLINTON, G., CHIKARAISHI, Y., & RULLKÖTTER, J. (2006). Chemotaxonomic significance of distribution and stable carbon isotopic composition of long-chain alkanes and alkan-1-ols in C4 grass waxes. *Org. Geochem.* *37*, 1303–1332.
- ROSS, J.D., & SOMBRERO, C. (1991). Environmental control of essential oil production in Mediterranean plants. *Ecol. Chem. Biochem. Plant Terpenoids* Clarendon Press Oxf. 83–94.
- ROWLAND, O., ZHENG, H., HEPWORTH, S.R., LAM, P., JETTER, R., & KUNST, L. (2006). CER4 Encodes an Alcohol-Forming Fatty Acyl-Coenzyme A Reductase Involved in Cuticular Wax Production in Arabidopsis. *PLANT Physiol.* *142*, 866–877.
- ROY, B.A., & RAGUSO, R.A. (1997). Olfactory versus visual cues in a floral mimicry system. *Oecologia* *109*, 414–426.
- RUDLOFF, E. VON (1968). Gas-liquid chromatography of terpenes. Part XVI. The volatile oil of the leaves of *Juniperus ashei* Buchholz. *Can. J. Chem.* *46*, 679–683.
- RUDLOFF, E. VON (1963). Gas-liquid chromatography of terpenes: part IX. The volatile oil of the leaves of *Juniperus sabina* L. *Can. J. Chem.* *41*, 2876–2881.
- RUDLOFF, E. VON, & COUCHMAN, F.M. (1964). Gas-liquid chromatography of terpenes: part XI. The volatile oil of the leaves of *Juniperus scopulorum* Sarg. *Can. J. Chem.* *42*, 1890–1895.

- RUDLOFF, E. VON, & SOOD, V.K. (1969). Gas-liquid chromatography of terpenes. Part XVIII. The volatile oil of the leaves of *Juniperus communis* L. *Can. J. Chem.* 47, 2081–2086.
- RUDLOFF, E. VON (1975). Volatile leaf oil analysis in chemosystematic studies of North American conifers. *Biochem. Syst. Ecol.* 2, 131–167.
- RUMEU, B., CAUJAPÉ-CASTELLS, J., BLANCO-PASTOR, J.L., JAÉN-MOLINA, R., NOGALES, M., ELIAS, R.B., & VARGAS, P. (2011). The Colonization History of *Juniperus brevifolia* (Cupressaceae) in the Azores Islands. *PLoS ONE* 6, e27697.
- SAAB, A., GUERRINI, A., SACCHETTI, G., MAIETTI, S., ZEINO, M., AREND, J., GAMBARI, R., BERNARDI, F., & EFFERTH, T. (2012). Phytochemical Analysis and Cytotoxicity Towards Multidrug-Resistant Leukemia Cells of Essential Oils Derived from Lebanese Medicinal Plants. *Planta Med.* 78, 1927–1931.
- SACCHETTI, G., MAIETTI, S., MUZZOLI, M., SCAGLIANTI, M., MANFREDINI, S., RADICE, M., & BRUNI, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 91, 621–632.
- SACCHETTINI, J.C., & POULTER, C.D. (1997). Creating isoprenoid diversity. *Science* 277, 1788–1789.
- SACHSE, D., RADKE, J., & GLEIXNER, G. (2004). Hydrogen isotope ratios of recent lacustrine sedimentary n-alkanes record modern climate variability. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68, 4877–4889.
- SACHSE, D., BILLAULT, I., BOWEN, G.J., CHIKARAISHI, Y., DAWSON, T.E., FEAKINS, S.J., FREEMAN, K.H., MAGILL, C.R., MCINERNEY, F.A., VAN DER MEER, M.T.J., ET AL. (2012). Molecular Paleohydrology: Interpreting the Hydrogen-Isotopic Composition of Lipid Biomarkers from Photosynthesizing Organisms. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 40, 221–249.
- SALATINO, M.L., SALATINO, A., L DE MENEZES, N., & DE MELLO-SILVA, R. (1989). Alkanes of foliar epicuticular waxes of Velloziaceae. *Phytochemistry* 28, 1105–1114.
- SALEHI SHANJANI, P., MIRZA, M., CALAGARI, M., & ADAMS, R.P. (2010). Effects drying and harvest season on the essential oil composition from foliage and berries of *Juniperus excelsa*. *Ind. Crops Prod.* 32, 83–87.

- SALIDO, S., ALTAREJOS, J., NOGUERAS, M., SÁNCHEZ, A., PANNECOUQUE, C., WITVROUW, M., & DE CLERCQ, E. (2002). Chemical studies of essential oils of *Juniperus oxycedrus* ssp. *badia*. J. Ethnopharmacol. 81, 129–134.
- SAMOYLENKO, V., DUNBAR, D.C., GAFUR, M.A., KHAN, S.I., ROSS, S.A., MOSSA, J.S., EL-FERALLY, F.S., TEKWANI, B.L., BOSSELAERS, J., & MUHAMMAD, I. (2008). Antiparasitic, nematicidal and antifouling constituents from *Juniperus* berries. Phytoter. Res. 22, 1570–1576.
- 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* JF Arnold from Serbia. Chem. Biodivers. 10, 1507–1520.
- SCHEFUSS, E., RATMEYER, V., STUUT, J.-B.W., JANSEN, J.H., & SINNINGHE DAMSTÉ, J.S. (2003a). Carbon isotope analyses of n-alkanes in dust from the lower atmosphere over the central eastern Atlantic. Geochim. Cosmochim. Acta 67, 1757–1767.
- SCHEFUSS, E., SCHOUTEN, S., JANSEN, J.F., & DAMSTÉ, J.S.S. (2003b). African vegetation controlled by tropical sea surface temperatures in the mid-Pleistocene period. Nature 422, 418–421.
- SCHÖNHERR, J. (1976). Water permeability of isolated cuticular membranes: the effect of cuticular waxes on diffusion of water. Planta 131, 159–164.
- SCHÖNHERR, J. (1982). Resistance of plant surfaces to water loss: transport properties of cutin, suberin and associated lipids. In Physiological Plant Ecology II, (Springer), pp. 153–179.
- SCHUH, B.A., & BENJAMIN, D.M. (1984). The chemical feeding ecology of *Neodiprion dubiosus* Schedl., *N. rugifrons* Midd., and *N. lecontei* (Fitch) on jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.). J. Chem. Ecol. 10, 1071–1079.
- SEBERG, O., & PETERSEN, G. (2009). How Many Loci Does it Take to DNA Barcode a Crocus? PLoS ONE 4, e4598.
- SECA, A.M., & SILVA, A.M. (2006). The chemical composition of the *Juniperus* genus (1970–2004). Recent Prog. Med. Plants 16, 401–522.
- SELA, F., KARAPANDZOVA, M., STEFKOV, G., & KULEVANOVA, S. (2011). Chemical composition of berry essential oils from *Juniperus communis* L. (Cupressaceae) growing wild in Republic of Macedonia and assessment of the chemical composition in accordance to European Pharmacopoeia. Maced. Pharm. Bull. 57, 43–51.

- SEMEN, E., & HIZIROGLU, S. (2005). Production, yield and derivatives of volatile oils from eastern redcedar (*Juniperus virginiana* L.). *Am J Env. Sci* 1, 133–138.
- ŞERBAN, E.S., SOCACI, S.A., TOFANA, M., MAIEER, S.C., & BOJITA, M.T. (2012). Advantages of “headspace” technique for GC/MS analysis of essential oils. *Farmacia* 60, 249–256.
- SEZIK, E., KOCAKULAK, E., BASER, K.H.C., & OZEK, T. (2005). Composition of the Essential Oils of *Juniperus oxycedrus* subsp. *macrocarpa* from Turkey. *Chem. Nat. Compd.* 41, 352–354.
- SHAHMIR, F., AHMADI, L., MIRZA, M., & KORORI, S.A.A. (2003). Secretory elements of needles and berries of *Juniperus communis* L. ssp. *communis* and its volatile constituents. *Flavour Fragr. J.* 18, 425–428.
- SHALABY, E.A., NASR, N.F., & EL SHERIEF, S.M. (2011). An in vitro study of the antimicrobial and antioxidant efficacy of some nature essential oils. *J. Med. Plants Res.* 5, 922–931.
- SHARKEY, T.D., & SINGSAAS, E.L. (1995). Why plants emit isoprene. *Nature* 374, 769.
- SHAW, J., LICKEY, E.B., BECK, J.T., FARMER, S.B., LIU, W., MILLER, J., SIRIPUN, K.C., WINDER, C.T., SCHILLING, E.E., & SMALL, R.L. (2005). The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am. J. Bot.* 92, 142–166.
- SHAW, J., LICKEY, E.B., SCHILLING, E.E., & SMALL, R.L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *Am. J. Bot.* 94, 275–288.
- SHIMAKATA, T., & STUMPF, P.K. (1982). Isolation and function of spinach leaf  $\beta$ -ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 5808–5812.
- SHINOZAKI, K., OHME, M., TANAKA, M., WAKASUGI, T., HAYASHIDA, N., MATSUBAYASHI, T., ZAITA, N., CHUNWONGSE, J., OBOKATA, J., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., ET AL. (1986). The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* 5, 2043.
- SICRE, M.-A., & PELTZER, E.T. (2004). Lipid geochemistry of remote aerosols from the southwestern Pacific Ocean sector. *Atmos. Environ.* 38, 1615–1624.
- SILVA, A.C.R., LOPES, P.M., AZEVEDO, M.M.B., COSTA, D.C.M., ALVIANO, C.S., & ALVIANO, D.S. (2012a). Biological Activities of  $\alpha$ -Pinene and  $\beta$ -Pinene Enantiomers. *Molecules* 17, 6305–6316.

- SILVA, K.M.M. DA, AGRA, M. DE F., SANTOS, D.Y.A.C. DOS, & OLIVEIRA, A.F.M. DE (2012b). Leaf cuticular alkanes of *Solanum* subg. *Leptostemonum* Dunal (Bitter) of some northeast Brazilian species: Composition and taxonomic significance. *Biochem. Syst. Ecol.* *44*, 48–52.
- SILVESTRO, D., & MICHALAK, I. (2011). raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Org. Divers. Evol.* DOI: 10.1007/s13127-011-0056-0.
- SKORUPA, L.A., SALATINO, M.L.F., & SALATINO, A. (1998). Hydrocarbons of leaf epicuticular waxes of *Pilocarpus* (Rutaceae): Taxonomic meaning. *Biochem. Syst. Ecol.* *26*, 655–662.
- SMALL, R.L., CRONN, R.C., & WENDEL, J.F. (2004). L. A. S. JOHNSON REVIEW No. 2. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. *Aust. Syst. Bot.* *17*, 145.
- SMITH, D.G., MAYES, R.W., & RAATS, J.G. (2001). Effect of species, plant part, and season of harvest on n-alkane concentrations in the cuticular wax of common rangeland grasses from southern Africa. *Crop Pasture Sci.* *52*, 875–882.
- SONIBARE, M.A., JAYEOLA, A.A., & EGUNYOMI, A. (2005). Chemotaxonomic significance of leaf alkanes in species of *Ficus* (Moraceae). *Biochem. Syst. Ecol.* *33*, 79–86.
- SQUILLACE, A.E., WELLS, O.O., & ROCKWOOD, D.L. (1980). Inheritance of monoterpene composition in cortical oleoresin of loblolly pine. *Silvae Genet.* *29*, 141–152.
- STÄDLER, E., JUNIPER, B., & SOUTHWOOD, S.R. (1986). Oviposition and feeding stimuli in leaf surface waxes. *Insects Plant Surf.* 105–121.
- STAMATAKIS, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* *30*, 1312–1313.
- STASSI, V., VERYKOKIDOU, E., LOUKIS, A., HARVALA, A., & PHILIANOS, S. (1995). Essential Oil of *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sm.) Ball. *J. Essent. Oil Res.* *7*, 675–676.
- STASSI, V., VERYKOKIDOU, E., LOUKIS, A., HARVALA, C., & PHILIANOS, S. (1996). The Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Four *Juniperus* Species Growing Wild in Greece. *Flavour Fragr. J.* *11*, 71–74.
- STEELE, C.L., KATOH, S., BOHLMANN, J., & CROTEAU, R. (1998). Regulation of Oleoresinosis in Grand Fir (*Abies grandis*) Differential Transcriptional Control of Monoterpene, Sesquiterpene, and Diterpene Synthase Genes in Response to Wounding. *Plant Physiol.* *116*, 1497–1504.

- STEVENS, J.F., HART, H., BLOCK, A., ZWAVING, J.H., & MALINGRÉ, T.M. (1994). Epicuticular wax composition of some European *Sedum* species. *Phytochemistry* 35, 389–399.
- STOCKER, H., & WANNER, H. (1975). Changes in the composition of coffee leaf wax with development. *Phytochemistry* 14, 1919–1920.
- STOJANOVIC, D., ALEKSIC, J.M., JANCIC, I., & JANCIC, R. (2015). A Mediterranean medicinal plant in the continental Balkans: A plastid DNA-based phylogeographic survey of *Salvia officinalis* (Lamiaceae) and its conservation implications. *Willdenowia* 45, 103–118.
- SULTANGAZIEV, O., KONRAD, H., SCHUELER, S., & GEBUREK, T. (2012). North-south population subdivision of *Juniperus seravschanica* in Kyrgyzstan revealed through novel plastid DNA markers. *J. Syst. Evol.* 50, 411–421.
- TABANCA, N., DEMIRCI, B., CROCKETT, S.L., BAŞER, K.H.C., & WEDGE, D.E. (2007). Chemical composition and antifungal activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius*, and *Chrysothamnus nauseosus* essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8430–8435.
- TABERLET, P., GIELLY, L., PAUTOU, G., & BOUVET, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17, 1105–1109.
- TAJIMA, F. (1993). Simple methods for testing the molecular evolutionary clock hypothesis. *Genetics* 135, 599–607.
- TAMURA, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* 9, 678–687.
- TAMURA, K., & NEI, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., & KUMAR, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- TANKER, N., & SARER, E. (1975). Gas liquid chromatographic researches on the volatile oils obtained from leaves and from fruits of some *Juniperus* species. *J Fac Pharm Ank.* 54, 171–182.

- TARASOV, P.E., MÜLLER, S., ZECH, M., ANDREEVA, D., DIEKMANN, B., AND LEIPE, C. (2012). Last glacial vegetation reconstructions in the extreme-continental eastern Asia: Potentials of pollen and n-alkane biomarker analyses. *Quat. Int.*
- TARAYRE, M., THOMPSON, J.D., ESCARRÉ, J., AND LINHART, Y.B. (1995). Intra-specific variation in the inhibitory effects of *Thymus vulgaris* (Labiatae) monoterpenes on seed germination. *Oecologia* 101, 110–118.
- TATE, J.A., & SIMPSON, B.B. (2003). Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Syst. Bot.* 28, 723–737.
- TATRO, V.E., SCORA, R.W., VASEK, F.C., & KUMAMOTO, J. (1973). Variations in the Leaf Oils of Three Species of *Juniperus*. *Am. J. Bot.* 60, 236.
- TAVARÉ, S. (1986). Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lect. Math. Life Sci.* 17, 57–86.
- TERRY, R.G., NOWAK, R.S., & TAUSCH, R.J. (2000). Genetic variation in chloroplast and nuclear ribosomal DNA in Utah juniper (*Juniperus osteosperma*, Cupressaceae): evidence for interspecific gene flow. *Am. J. Bot.* 87, 250–258.
- THANOS, C.A., KADIS, C.C., & SKAROU, F. (1995). Ecophysiology of germination in the aromatic plants thyme, savory and oregano (Labiatae). *Seed Sci. Res.* 5, 161–170.
- THOMPSON, J.D. (2005). *Plant evolution in the Mediterranean* (Oxford University Press Oxford).
- THOMPSON, K.F. (1963). Resistance to the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) in brassica plants.
- TIMME, R.E., KUEHL, J.V., BOORE, J.L., & JANSEN, R.K. (2007). A comparative analysis of the *Lactuca* and *Helianthus* (Asteraceae) plastid genomes: identification of divergent regions and categorization of shared repeats. *Am. J. Bot.* 94, 302–312.
- TIN, W., VASEK, F.C., & SCORA, R.W. (1971). Analysis of *n*-Alkanes from Three Species of *Clarkia*. *Am. J. Bot.* 58, 255–256.
- TULLOCH, A.P. (1973). Composition of leaf surface waxes of *Triticum* species: Variation with age and tissue. *Phytochemistry* 12, 2225–2232.
- TULLOCH, A.P. (1984). Epicuticular waxes of four eragrostoid grasses. *Phytochemistry* 23, 1619–1623.



- TULLOCH, A.P., & BERGTER, L. (1981). Epicuticular wax of *Juniperus scopulorum*. *Phytochemistry* 20, 2711–2716.
- TULLOCH, A.P., & HOFFMAN, L.L. (1976). Epicuticular wax of *Agropyron intermedium*. *Phytochemistry* 15, 1145–1151.
- TUMEN, I., SÜNTAR, I., KELEŞ, H., & KÜPELİ AKKOL, E. (2011). A Therapeutic Approach for Wound Healing by Using Essential Oils of *Cupressus* and *Juniperus* Species Growing in Turkey. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2012.
- TUMEN, I., ELLER, F.J., CLAUSEN, C.A., & TEEL, J.A. (2012). Antifungal Activity of Heartwood Extracts from Three *Juniperus* Species. *BioResources* 8, 12–20.
- TUMEN, I., SÜNTAR, I., ELLER, F.J., KELEŞ, H., & AKKOL, E.K. (2013). Topical Wound-Healing Effects and Phytochemical Composition of Heartwood Essential Oils of *Juniperus virginiana* L., *Juniperus occidentalis* Hook., and *Juniperus ashei* J. Buchholz. *J. Med. Food* 16, 48–55.
- TURUNEN, M., HUTTUNEN, S., PERCY, K.E., McLAUGHLIN, C.K., & LAMPPU, J. (1997). Epicuticular wax of subarctic Scots pine needles: response to sulphur and heavy metal deposition. *New Phytol.* 135, 501–515.
- TUTIN, T.G., HEYWOOD, V.H., BURGESS, N.A., MOORE, D.M., VALENTINE, D.H., WALTERS, S.M., & WEBB, D.A. (1976). *Flora Europaea*. Vol. 1-5, Cambridge, London, New York and Melbourne (Cambridge University Press).
- UCAR, G., & BALABAN, M. (2002). The composition of volatile extractives from the wood of *Juniperus excelsa*, *Juniperus foetidissima* and *Juniperus oxycedrus*. *Eur. J. Wood Wood Prod.* 60, 356–362.
- UNLU, M., VARDAR-UNLU, G., VURAL, N., DONMEZ, E., AND ÇAKMAK, O. (2008). Composition and antimicrobial activity of *Juniperus excelsa* essential oil. *Chem. Nat. Compd.* 44, 129–131.
- VALENTINI, G., BELLOMARIA, B., MAGGI, F., & MANZI, A. (2003). The leaf and female cone oils of *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *oxycedrus* and *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa* (Sibth. et Sm.) Ball. from Abruzzo. *J. Essent. Oil Res.* 15, 418–421.
- VASEK, F.C., & SCORA, R.W. (1967). Analysis of the Oils of Western North American junipers by Gas-Liquid Chromatography. *Am. J. Bot.* 54, 781.



- VELASCO-NEGUERUELA, A., PÉREZ-ALONSO, M.J., PALÁ-PAÚL, J., ÍÑIGO, A., & LÓPEZ, G. (2004). Chemical Variations in the Leaf Volatile Oils of Two Populations of *Juniperus navicularis* Gandoger from the Iberian Peninsula (SW Portugal). *J. Essent. Oil Res.* *16*, 608–611.
- VIDAKOVIĆ, M. (1982). *Juniperus* L. - borovica - CUPRESSACEAE. In Četinjače, M. MIRIĆ, & P. VRANICKI, eds. (Zagreb: Biblioteka Znanstvenih Radova), pp. 207–246.
- VINUTHA, A.R., & RUDLOFF, E. VON (1968). Gas-liquid chromatography of terpenes. Part XVII. The volatile oil of the leaves of *Juniperus virginiana* L. *Can. J. Chem.* *46*, 3743–3750.
- VIOQUE, J., & KOLATTUKUDY, P.E. (1997). Resolution and Purification of an Aldehyde-Generating and an Alcohol-Generating Fatty Acyl-CoA Reductase from Pea Leaves (*Pisum sativum* L.). *Arch. Biochem. Biophys.* *340*, 64–72.
- VIOQUE, J., PASTOR, J., & VIOQUE, E. (1994). Leaf wax alkanes in the genus *Coincya*. *Int. J. Plant Biochem.* *36*, 349–352.
- VOKOU, D., DOUVLI, P., BLIONIS, G.J., & HALLEY, J.M. (2003). Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. *J. Chem. Ecol.* *29*, 2281–2301.
- VOURLIOTI-ARAPI, F., MICHAELAKIS, A., EVERGETIS, E., KOLIPOULOS, G., & HAROUTOUNIAN, S.A. (2011). Essential oils of indigenous in Greece six *Juniperus* taxa. *Parasitol. Res.* *110*, 1829–1839.
- VULICH, S.A., HANRAHAN, J.P., & O'RIORDAN, E.G. (1993). Pasture sampling for the estimation of herbage intake using n-alkanes: evaluation of alternative sampling procedures. *Ir. J. Agric. Food Res.* 1–11.
- VON WETTSTEIN-KNOWLES, P.M. (1982). Elongase and epicuticular wax biosynthesis. *Physiol Veg* *20*, 797–809.
- VON WETTSTEIN-KNOWLES, P.M. (1993). Waxes, cutin and suberin. *Lipid Metab. Plants* CRC Press Boca Raton FL 127–166.
- WHITTAKER, R.H., & FEENY, P.P. (1971). Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science* *171*, 757–770.

- WICKE, S., SCHNEEWEISS, G.M., DEPAMPHILIS, C.W., MÜLLER, K.F., & QUANDT, D. (2011). The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function. *Plant Mol. Biol.* 76, 273–297.
- WILDUNG, M.R. (1996). Abietadiene Synthase from Grand Fir (*Abies grandis*). cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase involved in resin acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 271, 23262–23268.
- WILEY, E.O., & LIEBERMAN, B.S. (2011). *Phylogenetics: theory and practice of phylogenetic systematics* (New Jersey: John Wiley and Sons).
- WILLIAMS, D.C., CARROLL, B.J., JIN, Q., RITHNER, C.D., LINGER, S.R., FLOSS, H.G., COATES, R.M., WILLIAMS, R.M., & CROTEAU, R. (2000). Intramolecular proton transfer in the cyclization of geranylgeranyl diphosphate to the taxadiene precursor of taxol catalyzed by recombinant taxadiene synthase. *Chem. Biol.* 7, 969–977.
- WILLIAMS, K.S., LINCOLN, D.E., & EHRLICH, P.R. (1983). The coevolution of *Euphydryas chalcedona* butterflies and their larval host plants. *Oecologia* 56, 323–329.
- WISE, M.L., SAVAGE, T.J., KATAHIRA, E., & CROTEAU, R. (1998). Monoterpene Synthases from Common Sage (*Salvia officinalis*): cDNA isolation, characterization, and functional expression of (+)-sabinene synthase, 1,8-cineole synthase, and (+)-bornyl diphosphate synthase. *J. Biol. Chem.* 273, 14891–14899.
- WISSEMANN, V. (2000). Epicuticular wax morphology and the taxonomy of *Rosa* (section *Caninae*, subsection *Rubiginosae*). *Plant Syst. Evol.* 221, 107–112.
- WISSEMANN, V., RIEDEL, M., & RIEDERER, M. (2007). Matroclinal inheritance of cuticular waxes in reciprocal hybrids of *Rosa* species, sect. *Caninae* (Rosaceae). *Plant Syst. Evol.* 263, 181–190.
- WOLFE, K.H., LI, W.-H., & SHARP, P.M. (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 9054–9058.
- WU, C.-S., & CHAW, S.-M. (2014). Highly rearranged and size-variable chloroplast genomes in conifers II clade (Cupressophytes): evolution towards shorter intergenic spacers. *Plant Biotechnol. J.* 12, 344–353.

- WU, C.-S., WANG, Y.-N., LIU, S.-M., & CHAW, S.-M. (2007). Chloroplast Genome (cpDNA) of *Cycas taitungensis* and 56 cp Protein-Coding Genes of *Gnetum parvifolium*: Insights into cpDNA Evolution and Phylogeny of Extant Seed Plants. *Mol. Biol. Evol.* *24*, 1366–1379.
- WU, C.-S., LAI, Y.-T., LIN, C.-P., WANG, Y.-N., & CHAW, S.-M. (2009). Evolution of reduced and compact chloroplast genomes (cpDNAs) in gnetophytes: Selection toward a lower-cost strategy. *Mol. Phylogenet. Evol.* *52*, 115–124.
- WU, C.-S., LIN, C.-P., HSU, C.-Y., WANG, R.-J., & CHAW, S.-M. (2011). Comparative Chloroplast Genomes of Pinaceae: Insights into the Mechanism of Diversified Genomic Organizations. *Genome Biol. Evol.* *3*, 309–319.
- WUBET, T., WEISS, M., KOTTKE, I., TEKETAY, D., & OBERWINKLER, F. (2006). Phylogenetic analysis of nuclear small subunit rDNA sequences suggests that the endangered African Pencil Cedar, *Juniperus procera*, is associated with distinct members of Glomeraceae. *Mycol. Res.* *110*, 1059–1069.
- WURZEL, G., & BECKER, H. (1990). Sesquiterpenoids from the liverwort *Ricciocarpos natans*. *Phytochemistry* *29*, 2565–2568.
- YU, Z. (1997). Late Quaternary paleoecology of *Thuja* and *Juniperus* (Cupressaceae) at Crawford Lake, Ontario, Canada: pollen, stomata and macrofossils. *Rev. Palaeobot. Palynol.* *96*, 241–254.
- YVON, Y., GUY RAOELISON, E., RAZAFINDRAZAKA, R., RANDRIANTSOA, A., ROMDHANE, M., CHABIR, N., GUEDRI MKADDEM, M., AND BOUJILA, J. (2012). Relation between Chemical Composition or Antioxidant Activity and Antihypertensive Activity for Six Essential Oils. *J. Food Sci.* *77*, H184–H191.
- ZAMIR, L.O., NEDEA, M.E., BÉLAIR, S., SAURICOL, F., MAMER, O., JACQMAIN, E., JEAN, F.I., AND GARNEAU, F.X. (1992a). Taxanes isolated from *Taxus canadensis*. *Tetrahedron Lett.* *33*, 5173–5176.
- ZAMIR, L.O., NEDEA, M.E., & GARNEAU, F.X. (1992b). Biosynthetic building blocks of *Taxus canadensis* taxanes. *Tetrahedron Lett.* *33*, 5235–5236.
- ZHANG, D.Y., CHEN, N., YANG, Y.Z., ZHANG, Q., & LIU, J.Q. (2008). Isolation and characterization of microsatellite DNA primers in *Juniperus przewalskii* Kom (Cupressaceae). *Conserv. Genet.* *9*, 767–769.

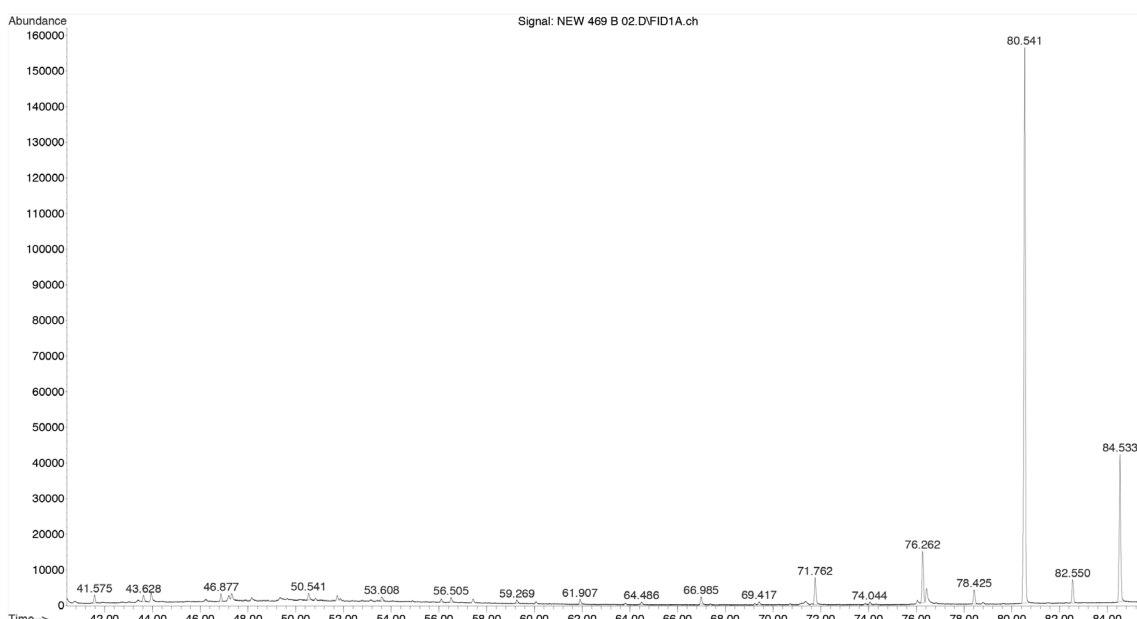
- ZHANG, Q., CHIANG, T.Y., GEORGE, M., LIU, J.Q., & ABBOTT, R.J. (2005). Phylogeography of the Qinghai-Tibetan Plateau endemic *Juniperus przewalskii* (Cupressaceae) inferred from chloroplast DNA sequence variation. *Mol. Ecol.* *14*, 3513–3524.
- ZHANG, Z., ZHAO, M., LU, H., & FAHIA, A.M. (2003). Lower temperature as the main cause of C4 plant declines during the glacial periods on the Chinese Loess Plateau. *Earth Planet. Sci. Lett.* *214*, 467–481.
- ZHAO, M., DUPONT, L., EGLINTON, G., & TEECE, M. (2003). *n*-Alkane and pollen reconstruction of terrestrial climate and vegetation for N.W. Africa over the last 160 kyr. *Org. Geochem.* *34*, 131–143.
- ZHELJAZKOV, V., ASTATKIE, T., JELIAZKOVA, E., & SCHLEGEL, V. (2012). Distillation time alters essential oil yield, composition, and antioxidant activity of male *Juniperus scopulorum* trees. *J. Oleo Sci.* *61*, 537–546.
- ZULAK, K.G., & BOHLMANN, J. (2010). Terpenoid Biosynthesis and Specialized Vascular Cells of Conifer Defense. *J. Integr. Plant Biol.* *52*, 86–97.
- ZYANI, M., MORTABIT, D., EL ABED, S., REMMAL, A., & IBNSOUDA, S. (2011). Antifungal activity of Five Plant Essential Oils against wood decay fungi isolated from an old house at the Medina of Fez. *Thymus* *51*, 2.
- ZYGADLO, J.A., MAESTRI, D.M., & GROSSO, N.R. (1994). Alkane distribution in epicuticular wax of some solanaceae species. *Biochem. Syst. Ecol.* *22*, 203–209.



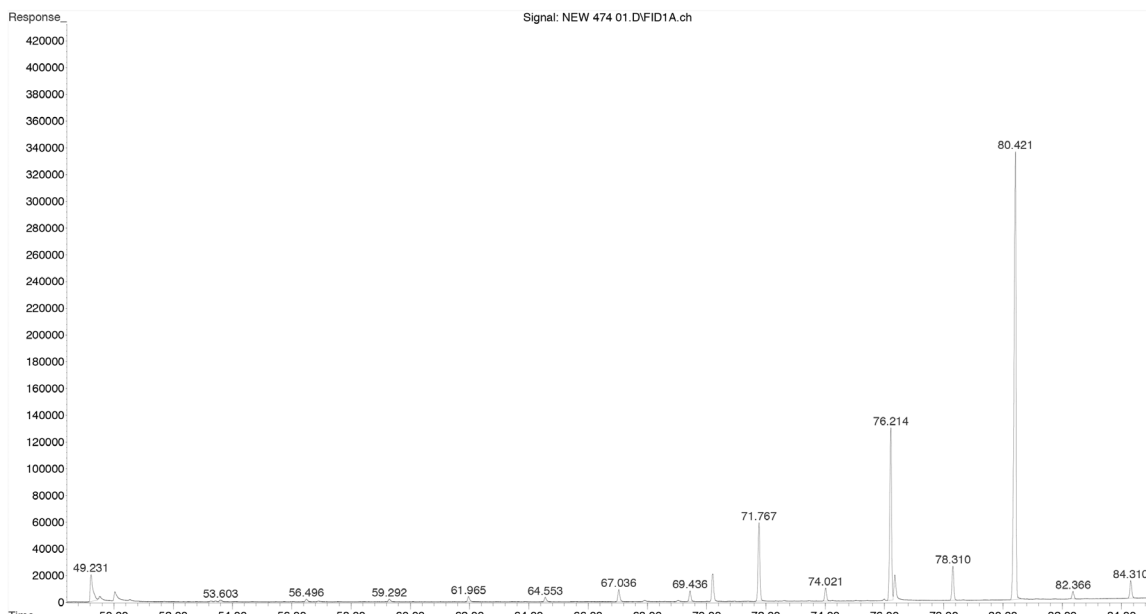
**Prilog A.** Uporedni prikaz broja vrsta, distribucije i opštih karakteristika tri sekcije roda *Juniperus* L. (Adams, 2011)

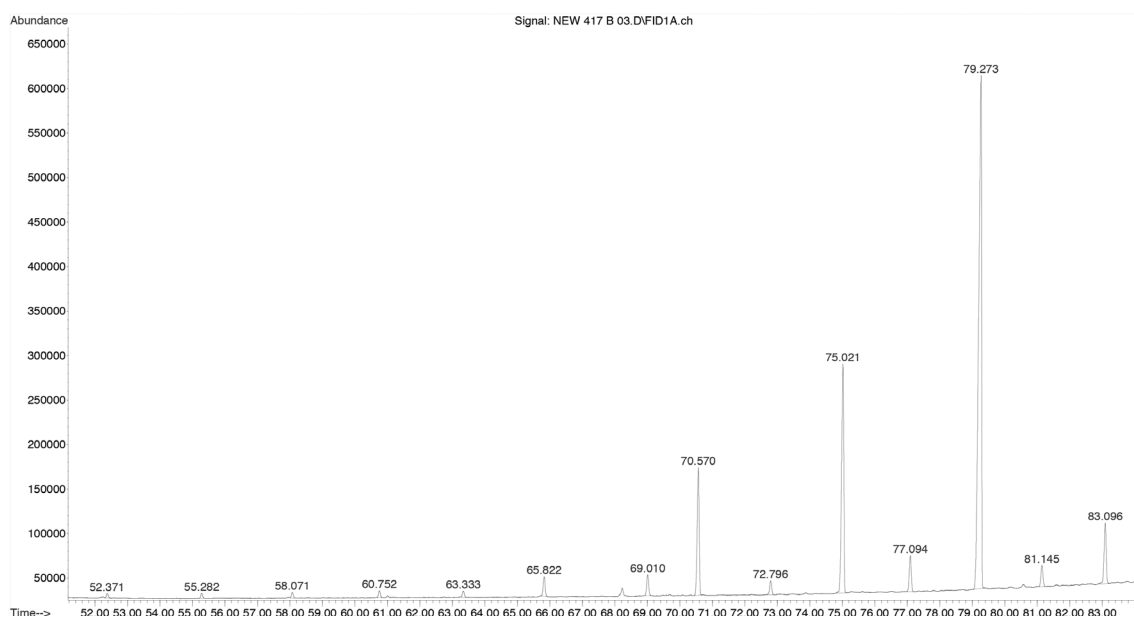
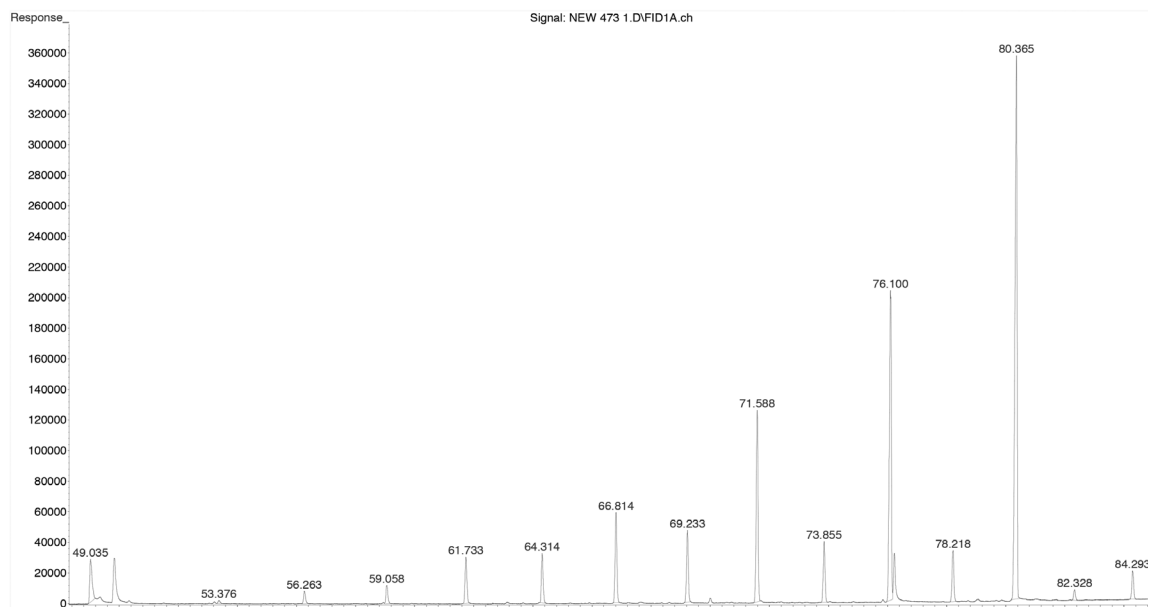
	<i>Caryocedrus</i>	<i>Juniperus</i> (= <i>Oxycedrus</i> )	<i>Sabina</i>
1 vrsta		11 vrsta	55 vrsta
Mediteran		Severna Amerika, Grenland, Island, Evropa, Azija	Severna hemisfera
igličasti listovi		igličasti listovi	ljuspasti listovi
dvodome		dvodome	dvodome i jednodome
ženske šišarice 30-40 mm		ženske šišarice 8-25 mm	ženske šišarice 6-15 mm
3 semenke po šišarici, srastaju u "košticu"		obično 3 semenke po šišarici	1 do 10 ili 12 semenki po šišarici
drvenaste šišarice		drvenaste ili ispunjene smolom šišarice	uglavnom sočne ili ispunjene smolom šišarice
ljubičaste šišarice		tamno plave, plavocrne, brao, crvenkasto braon, crvene, narandžasto-mrke	plave, crne, crvene, bakarne, braon, pink, zelene
celi listovi		celi listovi	celi ili nazubljeni listovi

**Prilog B1.** FID hromatogram epikutikularnih voskova izolovanih iz iglica *J. communis* var. *communis* (Mavrovo)

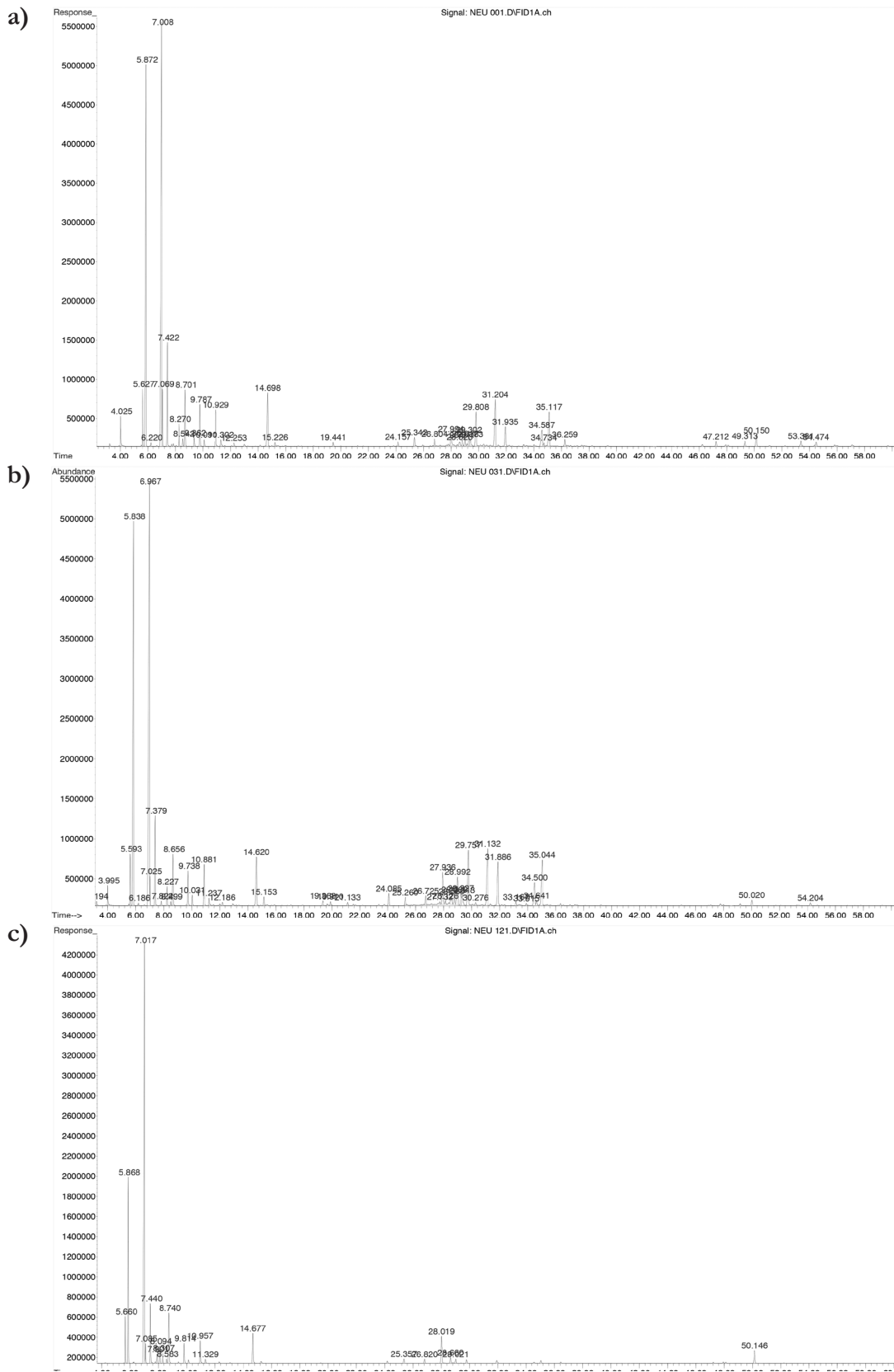


**Prilog B2.** FID hromatogram epikutikularnih voskova izolovanih iz iglica *J. communis* var. *saxatilis* (Biokovo)

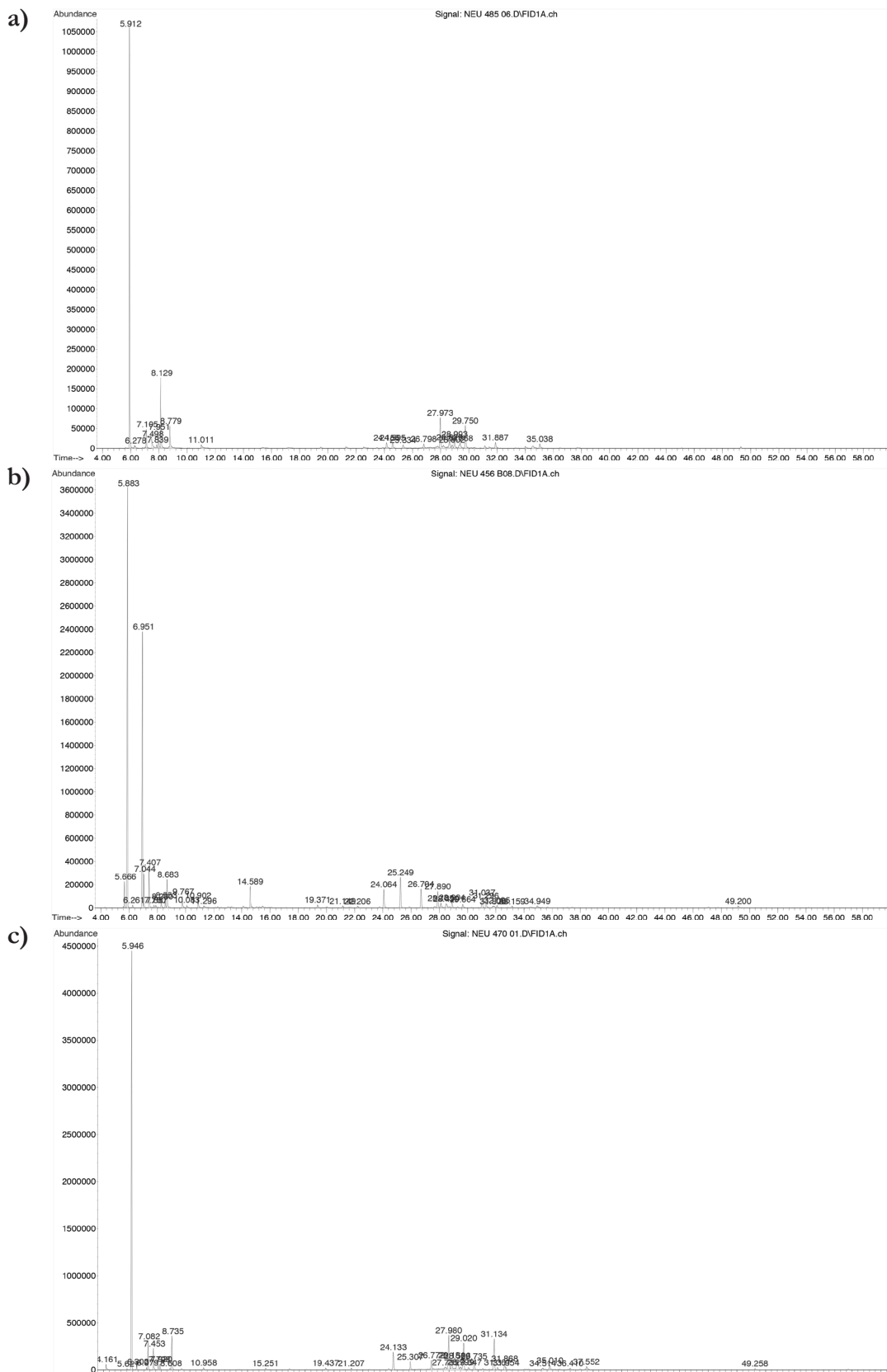


**Prilog B3.** FID hromatogram epikutikularnih voskova izolovanih iz iglica *J. deltoides* (Rovinj)**Prilog B4.** FID hromatogram epikutikularnih voskova izolovanih iz iglica *J. macrocarpa* (Trogir)

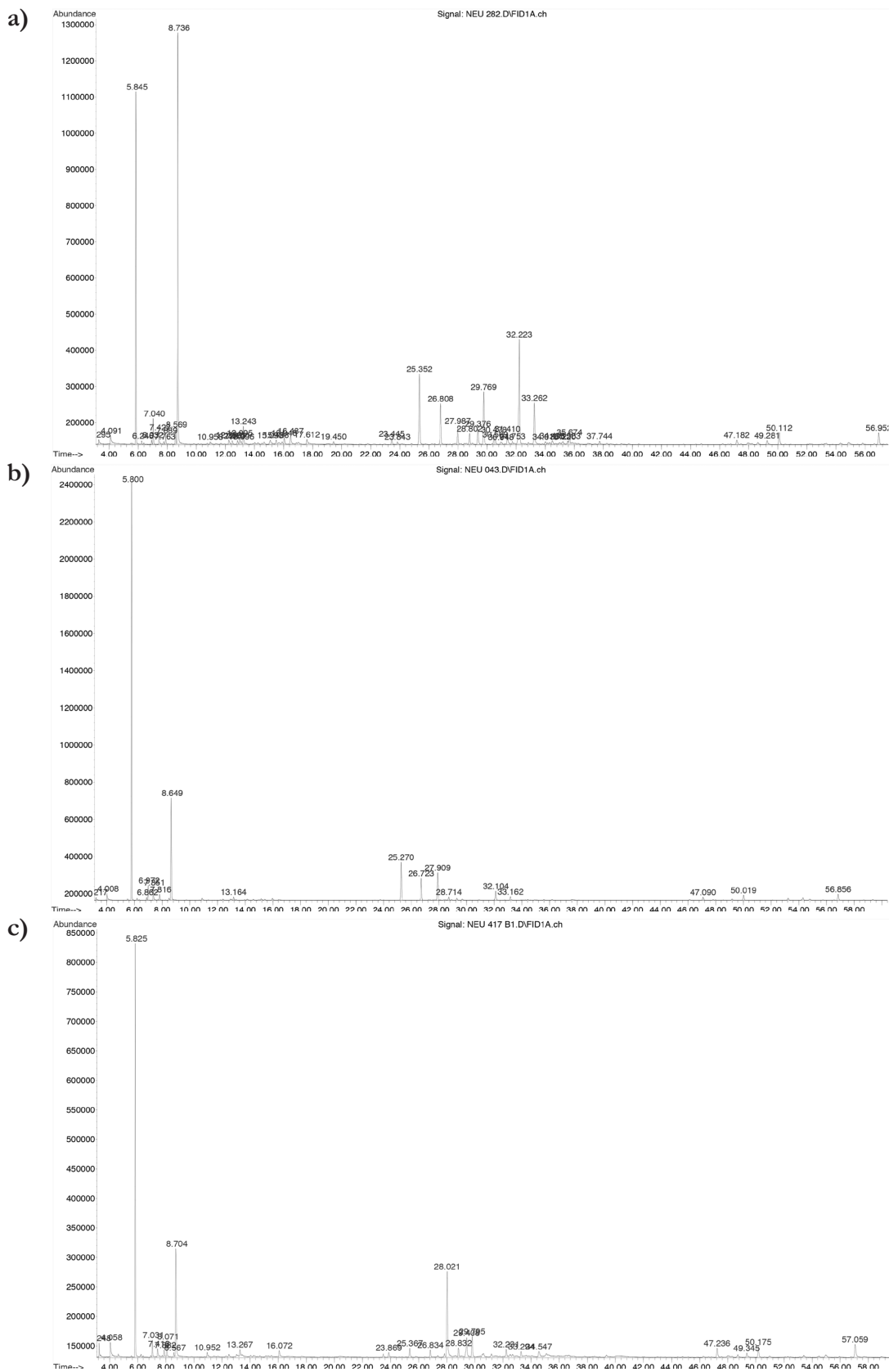


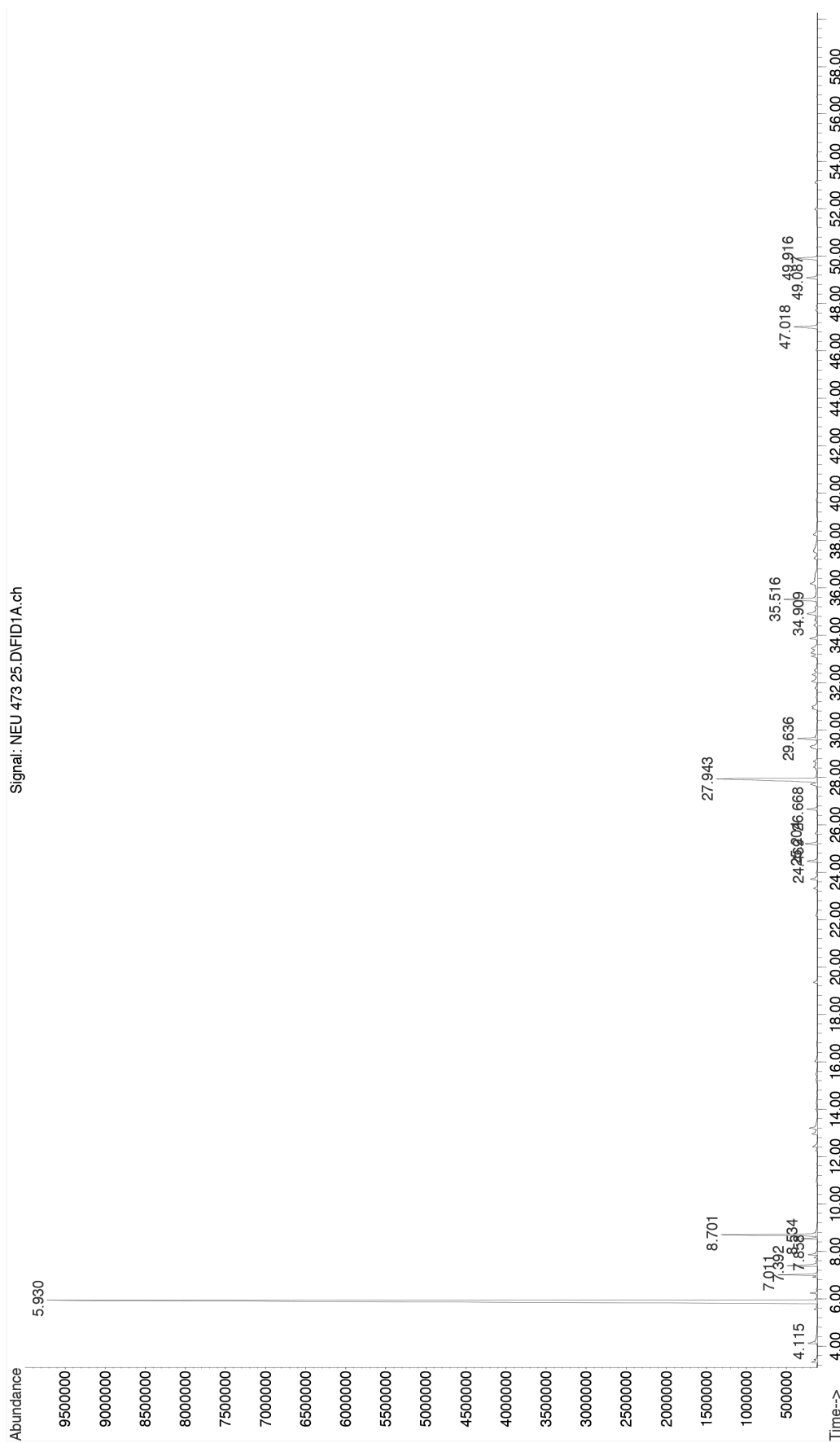


**Prilog C1.** FID hromatogram etarskog ulja izolovanog iz iglica *J. communis* var. *communis* a) Deliblatska peščara; b) Kopaonik; c) Suva planina



**Prilog C2.** FID hromatogram etarskog ulja izolovanog iz iglica *J. communis* var. *saxatilis*  
 a) Durmitor; b) Mavrovo; c) Velebit





Prilog C3. FID hromatogram etarskog ulja izolovanog iz iglica *J. macrocarpa* (Trogir)

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а **Немања Ф. Рајчевић**

број индекса **Б702/2008**

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Диференцијација врста из секције *Juniperus* рода *Juniperus* L.  
(Cupressaceae) са Балканског полуострва, коришћењем фитохемијских и  
молекуларних карактера**

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 07.05.2015



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Немања Ф. Рајчевић**

Број индекса **Б702/208**

Студијски програм **Експериментална и примењена ботаника**

Наслов рада **Диференцијација врста из секције *Juniperus* рода *Juniperus* L. (Cupressaceae) са Балканског полуострва, коришћењем фитохемијских и молекуларних карактера**

Ментори **Др Петар Д. Марин, Др Пеђа Јанаћковић**

Потписани/а **Немања Ф. Рајчевић**

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 07.05.2015.



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

**Диференцијација врста из секције *Juniperus* рода *Juniperus* L. (Cupressaceae) са Балканског полуострва, коришћењем фитохемијских и молекуларних карактера**

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 07.05.2015.



## BIOGRAFIJA AUTORA

Nemanja F. Rajčević rođen je 31. avgusta 1982. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Beogradu. Diplomirao je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,36 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Doktorske studije na modulu Eksperimentalna i primenjena botanika Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu upisao je u školskoj 2008/2009.

Od januara 2009 je stipendista Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja RS, do januara 2011, kada se zaposlio kao asistent u nastavi za užu naučnu oblast Morfologija, fitohemija i sistematika biljaka na Katedri za morfologiju i sistematiku biljaka, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Tokom ovog perioda izvodio je praktičnu i terensku nastavu iz predmeta na osnovnim i master studijama: Osnovi sistematske botanike, Sistematika i filogenija cvetnica, Eksperimentalne metode u botanici, Fitohemijski praktikum, Istorija botanike, Sistematika i filogenija biljaka, Uporedna morfologija i sistematika biljaka i Biohemijska i molekularna sistematika biljaka, te učestvovao kao član komisije za odbranu diplomskih radova.

Kao stipendista Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja RS, a potom i kao asistent učestvovao je na dva domaća naučna projekta: 2008-2011: "Strukturne, hemijske i molekularne karakteristike nekih biljnih vrsta – fundamentalni značaj i primenljivost" (ON143079); 2011-2015: "Mikromorfološka, fitohemijska i molekularna istraživanja biljaka – sistematski, ekološki i primenljivi aspekti" (ON173029).

Tokom dosadašnjeg rada autor je i koautor osam naučnih radova objavljenih u časopisima sa SCI liste. Učestvovao je na velikom broju međunarodnih i nacionalnih skupova, gde je bio u prilici da saopšti rezultate svojih istraživanja.