

UNIVERZITET U BEOGRADU

ŠUMARSKI FAKULTET

Milena A. Stefanović

**VARIJABILNOST TERPENSKOG
SASTAVA I MORFOLOŠKIH
KARAKTERISTIKA ČETINA
Taxus baccata L. U SRBIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF FORESTRY

Milena A. Stefanović

**VARIABILITY OF TERPENE
COMPOSITION AND MORPHOLOGICAL
CHARACTERISTICS OF *Taxus baccata*
L. NEEDLES FROM SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

MENTOR:

dr Srđan Bojović, naučni savetnik,
Institut za biološka istraživanja
„Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Dragica Obratov-Petković,
redovni profesor, Šumarski fakultet,
Univerzitet u Beogradu

dr Mirjana Ocokoljić, vanredni profesor,
Šumarski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Matilda Đukić, redovni profesor,
Šumarski fakultet, Univerzitet u Beogradu

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

Datum odbrane:

Beograd, _____

Ova doktorska disertacija je urađena na Odeljenju za ekologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom „Procena ekofiziološkog i genetičkog diverziteta biljaka u šumskim ekosistemima“ (ev. br. 173011, rukovodilac projekta dr Srđan Bojović), i u saradnji sa:

Šumarskim fakultetom Univerziteta u Beogradu,
Institutom za šumarstvo u Beogradu i
Institutom za proučavanje lekovitog bilja „Josif Pančić“ u Beogradu.

Najveću zahvalnost želim da izrazim:

Dr Srđanu Bojoviću, mentoru i naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu, za pruženo poverenje, podršku i smernice u svim fazama izrade disertacije; i

Prof. dr Dragici Obratov-Petković sa Šumarskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, rukovodiocu doktorskih studija, za pomoć pri odabiru teme, predusretljivost i korisne savete.

Posebno se zahvaljujem:

Dr Biljani Nikolić, višem naučnom saradniku Instituta za šumarstvo, na pomoći u eksperimentalnom radu, pisanju rada i iskrenoj podršci; i

Mr Mihailu Ristiću, istraživaču saradniku Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Josif Pančić“ u Beogradu, na stručnoj pomoći u hemijskim analizama i obradi podataka, dragocenim konsultacijama i ažurnosti.

Zahvalnost želim da izrazim i kolegama iz istraživačkog tima sa Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu:

Dr Zorici Popović, višem naučnom saradniku, na prenesenom znanju iz ekofiziologije i pomoći u pisanju rada;

Dr Radi Matić, višem naučnom saradniku, na pomoći u statističkoj obradi rezultata i kolegijalnosti;

Veri Vidaković, istraživaču saradniku, na pomoći i prenesenom znanju pri eksperimentalnom radu i obradi rezultata, kao i na druženju i razgovorima koji su mi ulepšali rad; i

Miroslavi Smiljanić, istraživaču saradniku, na prenesenom znanju i iskustvu, i kolegijalnosti.

Veliko hvala prof. dr Mirjani Ocokoljić i prof. dr Matildi Đukić sa Šumarskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na mnogobrojnim savetima i stručnoj pomoći u radu.

Iskreno se zahvaljujem i dr Gordani Gajić, naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu, na prenesenom znanju iz ekofiziologije i predusretljivosti.

Želim da se zahvalim dr Pavlu Pavloviću, naučnom savetniku i direktoru, kao i ostalim kolegama sa Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu, koji su mi pomogli u ispunjenju cilja.

Beskrajno hvala mojoj porodici i prijateljima, koji su uz mene na mom putu.

Ključna dokumentaciona informacija

Redni broj (RBR)	
Identifikacioni broj (IBR)	
Tip dokumenta (TD)	Monografska publikacija
Tip zapisa (TZ)	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (VR)	Doktorska disertacija
Autor (AU)	Milena A. Stefanović, istraživač saradnik
Mentori (MN)	dr Srđan Bojović, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu
Naslov (NR)	Varijabilnost terpenskog sastava i morfoloških karakteristika četina <i>Taxus baccata</i> L. u Srbiji
Jezik publikacije (JP)	Srpski/latinica
Jezik izvoda (JI)	Srpski/Engleski
Zemlja publikovanja (ZP)	Srbija
Geografsko područje (UGP)	Srbija
Godina publikovanja (GP)	2015
Izdavač (IZ)	Autorski reprint
Mesto izdavanja (MI)	Kneza Višeslava 1, 11030 Beograd, Srbija
Fizički opis rada (br.pogl./str/tab./sl./citata)	7/169/23/73/259
Naučna oblast (NO)	Biotehničke nauke
Naučna disciplina	Pejzažna arhitektura i hortikultura
Uža naučna disciplina	Ekofiziologija biljaka
Ključne reči (KR)	<i>Taxus</i> L., tisa, refugijum, etarsko ulje, morfologija, diverzitet, varijabilnost, klima, multivarijaciona analiza
UDK	574:630*18]:582.471:581.135.5(497.11)(043.3)
Čuva su u (ČU)	Biblioteci Šumarskog fakulteta, Kneza Višeslava 1, 11030 Beograd, Srbija
Izvod (I)	U tekstu koji sledi
Datum prihvatanja teme (DPT)	Odlukom Univerziteta u Beogradu, Veća naučnih oblasti biotehničkih nauka, broj 61206-4577/2-13 od 12.11.2013.
Članovi komisije (KO)	dr Srđan Bojović, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu dr Dragica Obratov-Petković, redovni profesor, Šumarski fakultet, Univerzitet u Beogradu dr Mirjana Očokoljić, vanredni profesor, Šumarski fakultet, Univerzitet u Beogradu dr Matilda Đukić, redovni profesor, Šumarski fakultet, Univerzitet u Beogradu dr Biljana Nikolić, viši naučni saradnik, Institut za šumarstvo u Beogradu

Key Word Documentation

Accession Number (ANO)	
Identification number (IBR)	
Document type (DT)	Monographic publication
Type of record (TR)	Textual printed document
Contains code (CC)	Doctoral dissertation
Author (AU)	Milena A. Stefanović, Research Assistant
Mentors (MN)	Srdan Bojović, Ph.D., Principal Research Fellow, Institute for Biological Research 'Siniša Stanković', University of Belgrade
Title (TI)	Variability of Terpene Composition and Morphological Characteristics of <i>Taxus baccata</i> L. needles from Serbia
Language of Text (LT)	Serbian
Language of abstract (LA)	Serbian/English
Country of Publication (CP)	Serbia
Locality of Publication (LP)	Serbia
Publication Year (PY)	2015
Publisher (PU)	Autor's reprint
Publication Place (PP)	Kneza Višeslava 1, 11030 Belgrade, Serbia
Physical description (FD) chapter/pages/tables/pictures/citations	7/169/23/73/259
Scientific area (SA)	Biotechnical Sciences
Scientific field (SF)	Landscape architecture and horticulture
Scientific discipline (SD)	Ecophysiology
Key words (KW)	<i>Taxus</i> L., yew, refugium, essential oil, morphology, diversity, variability, climate, multivariate analysis
UDC	574.630*18]:582.471:581.135.5(497.11)(043.3)
Holding Data (HD)	Library of Faculty of Forestry, Kneza Višeslava 1, 11030 Belgrade, Serbia
Abstract (AB)	In the following text
Accepted by Scientific Board on (ACB)	Decision of University of Belgrade, Biotechnical Sciences Board, No 61206-4577/2-13 on 12.11.2013.
Thesis Defend Board (DB)	Srdan Bojović, Ph.D., Principal Research Fellow, Institute for Biological Research 'Siniša Stanković', University of Belgrade Dragica Obratov-Petković, Ph.D., Full Professor, Faculty of Forestry, University of Belgrade Mirjana Očokoljić, PhD, Associate Professor, Faculty of Forestry, University of Belgrade Matilda Đukić, Ph.D., Full Professor, Faculty of Forestry, University of Belgrade Biljana Nikolić, Senior Research Associate, Institute of Forestry, Belgrade

VARIJABILNOST TERPENSKOG SASTAVA I MORFOLOŠKIH KARAKTERISTIKA ČETINA *Taxus baccata* L. U SRBIJI

SAŽETAK

U radu su ispitani sastav etarskog ulja i morfološke karakteristike četina *Taxus baccata* L. Uzorkovanje biljnog materijala (četina sa grančicama) je izvršeno u jesen 2012. i 2013. godine iz tri prirodne populacije tise u Srbiji sa sledećih lokaliteta: Požar (Nacionalni park „Tara“), rezervat prirode „Jelak“ (Nacionalni park „Kopaonik“) i spomenik prirode „Lazarev kanjon“ (planina Malinik).

Sastav i sadržaj etarskog ulja ispitan je na ukupno 47 uzoraka iz sve tri populacije. Ekstrakcije su vršene hidrodestilacijom po Clevenger-u, a sastav izolovanog ulja rastvorenog u pentanu je utvrđen GC-FID i GC-MS analizama. Ukupno je detektovana 91 komponenta, od kojih je 87 identifikovano. U sastavu etarskog ulja preovlađuju alifatični alkoholi (43.31%), terpeni (19.34%), alifatični ugljovodoni (13.18%) i alifatični aldehidi (11.09%). Ketoni, masne kiseline, derivati karotenoida, estri i aromatična jedinjenja zastupljeni su u manjem procentu. Neidentifikovana jedinjenja čine 1.96% ulja. Najzastupljenija terpenska frakcija za sve tri populacije su oksigenovani monoterpeni (13.99%). U etarskom ulju najzastupljenija jedinjenja su 1-okten-3-ol (23.48%), (*Z*)-3-heksenol (11.46%) i mirtenol (11.38%).

U radu je ispitana međupopulaciona varijabilnost sadržaja etarskog ulja pomoću jednofaktorske analize varijanse, analize glavnih komponenti, klaster analize i kanonijske diskriminacione analize. ANOVA je pokazala da se 8 jedinjenja (koja imaju normalnu raspodelu) statistički značajno razlikuje prema zastupljenosti među populacijama ($p < 0.05$): *n*-oktanal, β -linalol, β -ciklocitral, (*E*)- β -jonon, eikozanal, *trans*-feruginol, trikozanal i heksakozan. Analiza glavnih komponenti sa 22 najzastupljenije hemijske komponente etarskog ulja je pokazala razdvajanje jedinki iz populacija Kopaonik i Malinik, kao i jedinki iz populacija Tara i Malinik. Sa grafičkih prikaza analize mogu se uočiti jedinjenja kojima obiluju pojedine populacije. Jedinke sa Tare obiluju sadržajem heksahidrofarnezil acetona, pentakozana, geraniola i mirtenola, jedinke sa Kopaonika sadržajem 1-okten-3-ola, 1-okten-3-ona, 3-oktanona, *n*-nonanala, palmitinske kiseline i junicedranola, a jedinke sa Malinika sadržajem n.k. 1, (*Z*)-3-

heksenola, fitola i heptadekana. Statistički značajne razlike (Mann-Whitney *U* test) utvrđene su u sadržaju: pentakozana, 1-okten-3-ola, 1-okten-3-ona, 3-oktanona, *n*-nonanala, palmitinske kiseline, junicedranola, (*Z*)-3-heksenola i heptadekana. Klaster analiza je potvrdila rezultate PCA, tj. da su prema hemijskom sastavu sličnije populacije Tara i Kopaonik, dok se populacija Malinik razlikuje. Ovo istraživanje predstavlja prvo istraživanje varijabilnosti populacija tise u odnosu na sadržaj etarskog ulja.

Regresionom analizom ispitana je linearna zavisnost između klimatskih faktora (temperature, padavina i nadmorske visine) i pojedinih komponenti etarskog ulja. Jedinjenja koja su najjače korelisana sa bioklimatskim varijablama vezanim za temperaturu vazduha su β -linalol, 1-okten-3-on i *n*-nonanal. Jedinjenja koja su najjače korelisana sa bioklimatskim varijablama vezanim za količinu padavina su (*Z*)-3-heksenol i β -ciklocitral. Pretpostavka je da su navedena jedinjenja pod jakim uticajem abiotičkih faktora (klimatskih karakteristika i nadmorske visine).

Za ispitivanje morfoloških karakteristika dvogodišnjih četina tise uzorci su prikupljeni sa 51 jedinke iz tri populacije koje su predmet ovog istraživanja. U radu je ispitana međupopulaciona varijabilnost morfoloških karakteristika pomoću jednofaktorske i dvofaktorske analize varijanse, Kruskal-Wallis testa, analize glavnih komponenti i klaster analize. Klaster analiza je pokazala da su prema morfološkim karakteristikama (dužini, širini i površini četine, odnosu dužine i širine četine, broju redova stoma na jednoj polovini naličja četine i gustini stoma) sličnije populacije Tara i Malinik, dok se populacija Kopaonik razlikuje. Jedinke iz populacije Kopaonik se karakterišu manjom dužinom, širinom, površinom i specifičnom površinom četina, manjim odnosom dužine i širine četina i manjim brojem redova stoma u odnosu na jedinke iz populacija Tara i Malinik. Značajane razlike u morfološkim karakteristikama utvrđene su između polova. Ženske jedinke tise u Srbiji imaju značajno veću dužinu, širinu i površinu četina, veći odnos dužine i širine četina, broj redova stoma i veću gustinu stoma u odnosu na muške jedinke. Regresionom analizom se težilo utvrđivanju linearne zavisnosti između klimatskih faktora (temperature, padavina i nadmorske visine) i morfoloških karakteristika. Utvrđeno je da su morfološke karakteristike kod ženskih jedinki tise pod jačim uticajem klimatskih faktora, a samim tim da su osetljivije na promene klime i nose više informacija o klimi nego muške jedinke.

VARIABILITY OF TERPENE COMPOSITION AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *Taxus baccata* L. NEEDLES FROM SERBIA

SUMMARY

In this study, the composition of the essential oil and morphological characteristics of *Taxus baccata* L. needles were examined. Plant material (twigs with needles) was collected in the autumn of 2012 and 2013, from three natural yew populations in Serbia from the following locations: Požar (National Park “Tara”), nature reserve “Jelak” (National Park “Kopaonik”) and natural monument “Lazarev kanjon” (Mt. Malinik).

The composition of the essential oil was investigated on a total of 47 samples from all studied populations. The isolation of oil was performed by hydrodistillation using Clevenger-type apparatus, and the composition was determined by GC-FID and GC-MS analyses. Of the 91 detected compounds, 87 were identified. The most abundant compound classes were aliphatic alcohols (43.31%), terpenes (19.34%), aliphatic hydrocarbons (13.18%) and aliphatic aldehydes (11.09%). Ketones, fatty acids, carotenoid derived compounds, esters and aromatic compounds were presented in smaller amounts. Unknown compounds had an average relative content of 1.96%. In the terpene fraction, oxygenated monoterpenes dominated (13.99%). The predominant constituents of the essential oil were 1-octen-3-ol (23.48%), (*Z*)-3-hexenol (11.46%) and myrtenol (11.38%).

To assess variability of the essential oil content between studied populations analysis of variance, principal component analysis, cluster analysis and canonical discriminant analysis were performed. One-way ANOVA revealed that 8 (normally distributed compounds) exhibited statistically significant differences between populations ($p < 0.05$): *n*-octanal, β -linalool, β -cyclocitral, (*E*)- β -ionone, eicosanal, *trans*-ferruginol, tricosanal and hexacosane. The principal component analysis of 22 selected compounds revealed differentiations of individuals from populations Kopaonik and Malinik, as well as individuals from populations Tara and Malinik. The graphical visualization of analysis showed that individuals from Tara were rich in

hexahydrofarnesyl acetone, pentacosane, geraniol and myrtenol, individuals from Kopaonik contained high levels of 1-octen-3-ol, 1-octen-3-one, 3-octanone, *n*-nonanal, hexadecanoic acid and junicedranol and individuals from Malinik contained high levels of unknown compound 1, (*Z*)-3-hexenol, phytol and heptadecane. The statistically significant differences (Mann-Whitney *U* test, $p < 0.05$) were determined in the contents of: pentacosane, 1-octen-3-ol, 1-octen-3-one, 3-octanone, *n*-nonanal, hexadecanoic acid, junicedranol, (*Z*)-3-hexenol and heptadecane. The cluster analysis confirmed that populations Tara and Kopaonik were more similar, and population Malinik was distinct according to the essential oil content. This is the first investigation of the variability of *Taxus baccata* L. populations based on essential oil composition.

The regression analysis was performed to examine linear relationship between climatic factors (temperature, precipitation and altitude) and essential oil constituents. The results revealed that β -linalool, 1-octen-3-one and *n*-nonanal were statistically significant correlated with bioclimatic factors related to the temperature, while (*Z*)-3-hexenol and β -cyclocitral were statistically significant correlated with bioclimatic factors related to the precipitation. It is assumed that listed compounds are under strong influence of abiotic factors (climate and altitude).

For investigation of morphological characteristics of 2-year-old needles of *Taxus baccata* L. samples were collected from 51 trees from three studied populations. The variability of morphological characteristics between studied populations was assessed by analysis of variance, Kruskal-Wallis test, principal component analysis and cluster analysis. The cluster analysis revealed that populations Tara and Malinik were more similar, and population Kopaonik was distinct, according to morphological characteristics (needle length, width and area, length to width ratio, number of stomata rows on one-half of the abaxial needle surface and stomata density). Comparing to individuals from populations Tara and Malinik, the individuals from Kopaonik were characterized by the smaller length, width, area and specific leaf area of needles, the smaller length to width ratio and fewer number of stomata rows. Significant differences were determined in morphological characteristics between male and female individuals of *Taxus baccata* L. Female individuals had significantly greater length, width and surface of needles, greater length to width ratio, a larger number of stomata rows and higher stomata density in comparison to male individuals.

The regression analysis was performed to examine linear relationship between climatic factors (temperature, precipitation and altitude) and morphological characteristics. It was determined that morphological characteristics of female individuals are under stronger influence of climatic factors, and therefore females are more sensitive to climate changes and carry more information about climate than males.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREDMET ISTRAŽIVANJA	3
2.1. OPIS VRSTE, RASPROSTRANJENJE I ISTORIJA	3
2.2. EKOLOGIJA VRSTE.....	6
2.3. POLNOST	8
2.4. TAKSONOMIJA	10
2.5. ISPARLJIVE HEMIJSKE KOMPONENTE.....	12
2.5.1. Definicija i značaj.....	12
2.5.2. Varijabilnost isparljivih komponenti	14
2.5.3. Dosadašnja istraživanja isparljivih komponenti roda <i>Taxus</i> L.....	15
2.5.4. Veza isparljivih komponenti i klimatskih faktora	18
2.6. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE ČETINA	18
2.6.1. Morfološke karakteristike četina <i>Taxus baccata</i> L.....	18
2.6.2. Dosadašnja istraživanja morfoloških karkateristika četina roda <i>Taxus</i> L.	20
2.6.3. Morfološke karakteristike i ekološki faktori	23
3. CILJEVI RADA I POLAZNE HIPOTEZE	27
4. MATERIJAL I METODE	29
4.1. ISTRAŽIVANE POPULACIJE	29
4.2. VELIČINA UZORKA	36
4.3. EKSTRAKCIJA ETARSKOG ULJA	37
4.4. ISPITIVANJE SASTAVA I SADRŽAJA ETARSKOG ULJA.....	37
4.5. ISPITIVANJE MORFOLOŠKIH KARAKTERISTIKA ČETINA	38

4.6.	STATISTIČKA ANALIZA	39
5.	REZULTATI I DISKUSIJA	40
5.1.	REZULTATI ISPITIVANJA ETARSKOG ULJA IZ ČETINA TISE	40
5.1.1.	Hemijski sastav etarskog ulja iz četina tise	40
5.1.2.	Varijabilnost sadržaja etarskog ulja iz četina tise.....	50
5.1.2.1.	Unutarpopulaciona varijabilnost sadržaja etarskog ulja iz četina tise...	50
5.1.2.2.	Međupopulaciona varijabilnost sadržaja etarskog ulja iz četina tise	50
5.1.3.	Povezanost sadržaja hemijskih komponenti i klimatskih faktora.....	63
5.2.	DISKUSIJA REZULTATA ISPITIVANJA ETARSKOG ULJA IZ ČETINA TISE	74
5.3.	REZULTATI ISPITIVANJA MORFOLOŠKIH KARAKTERISTIKA ČETINA <i>Taxus baccata</i> L.....	82
5.3.1.	Morfološke karakteristike četina <i>Taxus baccata</i> L. u populacijama u Srbiji	82
5.3.2.	Unutar i među-populaciona varijabilnost morfoloških karakteristika četina tise.....	88
5.3.3.	Povezanost morfoloških karakteristika i klimatskih faktora	110
5.4.	DISKUSIJA REZULTATA ISPITIVANJA MORFOLOŠKIH KARAKTERISTIKA ČETINA TISE	125
6.	ZAKLJUČCI	133
7.	LITERATURA	140

1. UVOD

„Biološki diverzitet“ ili skraćeno „biodiverzitet“ predstavlja sumu svih bioloških varijacija od nivoa gena do ekosistema. Za brojne istraživače, ne postoji sumnja da ljudi uništavaju ovu raznolikost u alarmantnim razmerama. Aktuelno pitanje je u kojoj meri gubitak biodiverziteta utiče na funkcionisanje ekosistema. Iako su uloženi veliki istraživački napor u istraživanja biodiverziteta, oni su još uvek nedovoljni s obzirom na važnost i hitnost zadatka (Purvis i Hector, 2000).

Iako 95% eksperimentalnih studija potvrđuje da diverzitet pozitivno deluje na funkcionisanje ekosistema, svega 20-50% vrsta je dovoljno za održavanje biogeochemijskih ekosistemskih procesa (Schwartz et al., 2000). Ostale vrste su važne na dužim vremenskim skalama i obezbeđuju stabilnost ekosistemu u slučaju promena u životnoj sredini. Biodiverzitet takođe može uticati na ekološke procese kao što su pojava herbivora i bolesti i otpornost zajednica na invaziju (Purvis i Hector, 2000). Eksperimenti koji istražuju diverzitet su pokazali da su zajednice koje imaju više vrsta često otpornije na invaziju (Knops et al., 1999; Stachowicz et al., 1999). Diverzitet jedne grupe organizama često stimuliše diverzitet drugih grupa koje su sa njom u vezi, na primer mikorize i biljke (Van der Heijden et al., 1998) ili biljke i insekti (Knops et al., 1999).

Različite populacije jedne vrste će evoluirati u određenoj meri nezavisno od drugih, s obzirom na ograničen protok gena između njih. Zato je svaka populacija važna i dodatno doprinosi diverzitetu (Hughes et al., 1997; Purvis i Hector, 2000).

U istraživanja biodiverziteta spadaju i istraživanja međupopulacione varijabilnosti u pogledu morfoloških, fizioloških, hemijskih i genetičkih karakteristika. Ova istraživanja su naročito značajna kada su u pitanju ugrožene vrste i predstavljaju polaznu osnovu za sprovođenja mera konzervacije. Takođe, ovakva istraživanja često rezultiraju definisanjem novih taksona.

Vrste iz roda *Taxus* L. su se našle u fokusu naučnog istraživanja od kada je dokazana efikasnost taksola (složenog diterpensskog alkaloida) izolovanog iz kore *Taxus brevifolia* Nutt. u hemioterapijskom lečenju raka (Wani et al., 1971). Kao rezultat toga, sproveden je veliki broj studija koje proučavaju potencijalnu primenu različitih

hemijskih konstituenata izolovanih iz tise u medicini (Malik et al., 2011; Khosroushahi et al., 2006; Navia-Osorio et al., 2002; Hirasuna et al., 1996; Strobel et al., 1993; Witherup et al., 1990). Paralelno sa ovim istraživanjima razvija se i interes za bolje razumevanje kompleksne ekologije *Taxus baccata* L., kao i za zaštitu i očuvanje vrste (Svenning i Magård, 1999; Dhar et al., 2008; Iszkulo et al., 2009; Piovesan et al., 2009).

Populacije tise u Srbiji su slabo istražene. Postoji svega nekoliko studija ili zapisa o njihovom postojanju i biljnim zajednicama kojima pripadaju (Fukarek, 1957; Mišić, 1981; Stojanović i Jovanović, 1989; Sarić, 1997; Obratov-Petković et al., 2002; Radulović et al., 2010; Vilotić et al., 2011).

Iz svega napred navedenog, nameće se potreba ispitivanja varijabiliteta prirodnih populacija tise u Srbiji korišćenjem morfoloških i hemijskih markera čime bi se dao značajan doprinos ekologiji, zaštiti i očuvanju ove reliktnne, značajne i retke drvenaste vrste, kako na području Srbije, tako i na globalnom nivou.

2. PREDMET ISTRAŽIVANJA

2.1. OPIS VRSTE, RASPROSTRANJENJE I ISTORIJA

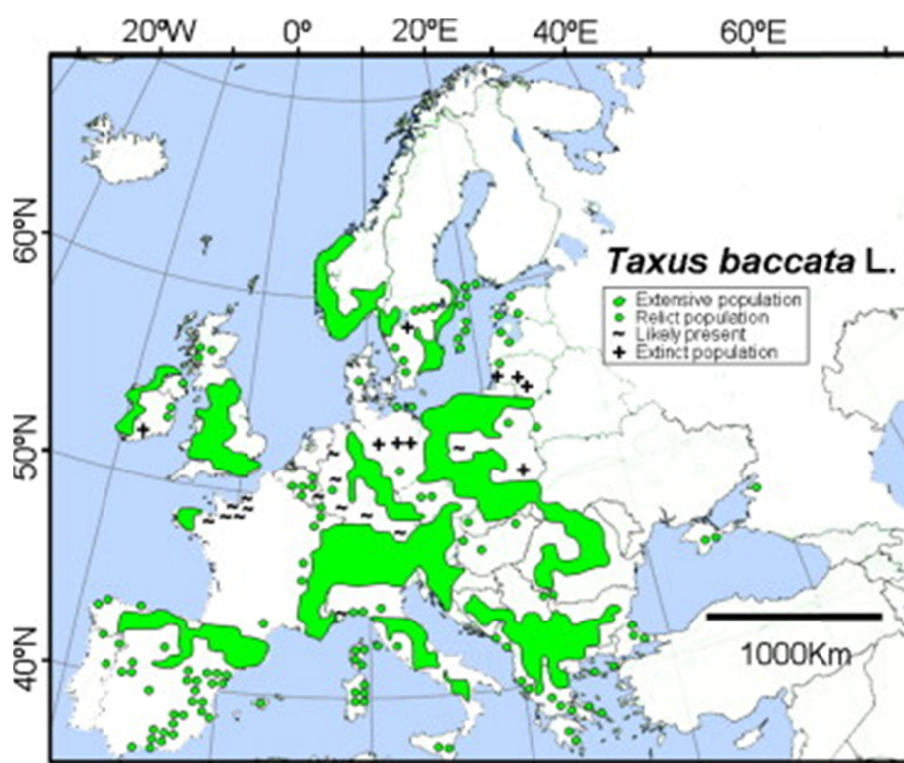
Tisa (*Taxus baccata* L.) je tercijarni reliktna i autohtona vrsta u Srbiji. Raste kao zimzeleno drvo ili žbun, visine do 20 m, često sa višestrukim isprepletanim stablima i široko zaobljenom ili kupastom krošnjom (Očokoljić i Ninić-Todorović, 2003; Thomas i Polwart, 2003). Ima jako razvijen korenov sistem koji joj obezbeđuje mehaničku potporu i na najnepristupačnijim terenima (kao što su kamenjari i strme litice). Tokom čitavog života tise jačanje korenovog sistema ima prednost u odnosu na rast, što predstavlja integralni deo njene ekološke strategije (Hageneder, 2013).

Taxus baccata L. je rasprostranjena u Evropi, zapadnoj Aziji i severozapadnoj Africi (Slika br. 1). Na mnogim lokalitetima širom Evrope i Mediterana, prirodne populacije tise su iščezle, a njen areal je sveden na male izolovane populacije ili grupe stabala (Svenning i Magård, 1999; Deforce i Bastiaens, 2007; Dubreuil et al., 2008; Myking et al., 2009). Objavljene su i brojne studije o naporima za konzervaciju prirodnih populacija tise u Danskoj (Svenning i Magård, 1999), Austriji (Vacik et al., 2001; Dhar, 2006; Dhar, 2007; Dhar, 2008; Ruprecht et al., 2009; Klumpp i Dhar, 2011), Norveškoj (Myking et al., 2009), Italiji (Piovesan, 2009; Farris et al., 2012), Grčkoj (Katsavou i Gantasas, 2012), Portugalu (Vessella et al., 2013) i Irskoj (Devaney et al., 2014). Glavni razlog za nestajanje populacija tise je nekontrolisana seča šuma zbog velike upotrebne vrednosti drveta, o čemu svedoče brojni arheološki nalazi. Od tisovine pravljeni su lukovi, posuđe, nameštaj, pribor za šivenje, razne vrste oruđa za rad i alati (Dumitru, 1992 prema Hageneder, 2011; Earwood, 1993 prema Hageneder, 2011). Tisovina se odlikuje velikom čvrstinom i fleksibilnošću, ali i visokom otpornošću na vlagu i proces truljenja, pa je korišćena i za izgradnju brodova i čamaca, cevi za navodnjavanje i slavina na bačvama (Hageneder, 2011).

Od 13. veka u Engleskoj je počela masovna proizvodnja dugih lukova od tisovine za potrebe vojske (Clark, 1963; Hageneder, 2011). Zbog jedinstvenih karakteristika beljike i srčike, ovi lukovi su predstavljali najjače oružje u srednjem veku. Za izradu dugih lukova od tisovine korišćen je deo drveta gde se beljika i srčika spajaju,

tako da su oni predstavljali prirodne kompozitne lukove. Zbog čestih ratova koje je Engleska vodila, šume tise na Britanskom ostrvu nisu mogle da zadovolje zahteve za proizvodnjom. U 14. veku Engleska je počela da uvozi tisovinu najpre iz Irske, a zatim sa Baltika, iz Nemačke, Holandije, Španije, Francuske i Italije. Najviše su eksploatisane mešovite šume alpskih predela, šume Karpata u istočnoj Evropi i mediteranske šume u Španiji, Italiji i Albaniji. Tisovina iz kontinentalnih područja je bila superiornija zbog sporog rasta u poređenju sa tisovinom sa britanskih ostrva koja raste u vlažnijim uslovima. Proizvodnja dugih lukova za potrebe ratovanja engleske vojske je dovela do pustošenja šuma tise širom Evrope koje je trajalo do 1589. godine kada je označen kraj „Monopola nad tisom“, jer više nije ostalo odraslih stabala koja bi se mogla poseći. Kraljica Elizabeta I je 1589. godine naložila zamenu dugih lukova puškama. U to vreme još uvek su luk i strela predstavljali moćnije oružje od vatrenog, ali nije bilo drugog izbora s obzirom da je svo drveće bilo posečeno (Hageneder, 2011).

Danas se tisovina smatra retkom i skupom drvenom građom i koristi se uglavnom za proizvodnju furnira i skulptura (Hageneder, 2011).



Slika br. 1. Rasprostranjenje populacija *Taxus baccata* L. u Evropi na osnovu pregleda Jalas i Suominen (1973) (preuzeto od Linares, 2013)

Opustošene populacije tise širom Evrope do danas nisu obnovljene. Jedan od razloga za slabo obnavljanje populacija tise u umerenom regionu su herbivori (Bugala, 1978; Tittensor, 1980; Hulme, 1996; García i Obeso, 2003; Mysterud i Østbye, 2004; Perrin et al., 2006; Farris i Filigheddu, 2008). Četine tise su mekane i sočne (ne sadrže mehaničko potporno tkivo – sklerenhim), pa su zbog toga omiljena hrana životinjama poput jelena i zečeva, uprkos toksinima (Hageneder, 2013). Pored herbivora, ograničavajući faktori prirodnog obnavljanja populacija tise su predatori semena, nepovoljni mikrostanišni uslovi za razvoj mladih biljaka, genetička izolacija i intraspecijska kompeticija (Hulme, 1996; Hilfiker et al., 2004; Piovesan et al., 2009).

Klimatski i antropogeni faktori su doveli do izolacije populacija tise tokom dugog vremenskog perioda što je uticalo na divergenciju populacija kroz ograničen protok gena, inbriding i genetički drift (Couvett, 2002). Može se pretpostaviti da se male i izolovane populacije tise karakterišu smanjenom genetičkom varijabilnošću i adaptivnom sposobnošću što povećava rizik od iščezavanja (Chybicki et al., 2011; Schirone et al., 2010; González- Martínez et al., 2010; Dubreuil et al., 2008; Myking et al., 2009; Hilfiker et al., 2004).

Zbog relativno malog broja individua i populacija, šume tise su dobile prioritetni status u skladu sa direktivom Evropske Unije o zaštiti staništa (EU Habitats Directive, European Commission, 2007).

U Srbiji se prirodne populacije tise nalaze na izolovanim lokalitetima, obično u klisurama i kanjonima, na strmim planinskim kosinama (Pulević, 2001 prema Obratov-Petković, 2002). Ovi refugijumi, teško dostupni uticaju čoveka, omogućili su očuvanje brojnih tercijarnih relikata među kojima je i tisa. Prema IUCN-ovoj crvenoj listi (2013), tisa je svrstana u kategoriju “Poslednja briga” (“Least Concern”), koju čine taksoni koji nisu izdvojeni kao zavisni od zaštite (Stevanović i Vasić, 1995). U Srbiji je tisa strogo zaštićena vrsta s obzirom da je vrlo retka i ugrožena (Pravilnik o proglašenju i zaštiti strogo zaštićenih i zaštićenih divljih vrsta biljaka, životinja i gljiva, “Službeni glasnik RS”, br. 5/2010).

2.2. EKOLOGIJA VRSTE

Tisa ima jedinstvenu ekološku strategiju, koja je u velikoj meri razlikuje od strategija drugih šumskih vrsta u umerenoj zoni severne hemisfere (Hageneder, 2013). Za nju je karakteristično da izrazito sporo raste, kasno dostiže zrelost (oko 70-te godine života), dugovečna je (živi oko 1000 godina), dobro podnosi senku, raste na različitim tipovima zemljišta i veoma je otporna na proces truljenja (Thomas i Polwart, 2003; Linares, 2013).

Tisa ima veliku moć vegetativnog razmnožavanja. Ima sposobnost adventivnog rasta, usled čega veliki broj izbojaka raste u osnovi stabla, što je redak fenomen kod golosemenica. Grane koje rastu nisko imaju tendenciju da se spuštaju do zemlje i ukorenjuju, nakon čega proizvode adventivne izbojke koji rastu vertikalno i postaju nova biljka. Oborena stabla tise nastavljaju da rastu sve dok je ostvaren dovoljan kontakt preko korenja, pri čemu se iz bočnih grana ili stabla razvijaju apikalni izbojci. Takođe, za stara stabla tise je karakteristično da postaju šuplja usled dejstva specijalizovanih gljiva. U ovim šupljinama iz vegetativne kupe na vrhu stabla rastu nova stabla prema zemlji i ukorenjuju se. Nova stabla vremenom preuzimaju ulogu starog i na taj način se organizam u potpunosti obnavlja. Ovaj proces je dug, ne odvija se kod svih stabala kroz sve faze i do kraja (Hageneder, 2013).

Tisi najviše pogoduju klimati sa blagom zimom, prohladnim letom i velikom količinom padavina. Česte magle mogu u određenoj meri nadomestiti vlagu ukoliko nema dovoljno padavina. Naročito su značajne padavine u julu i avgustu, kada se formiraju pupoljci za sledeću godinu, kao i u martu i maju kada se otvaraju ovogodišnji pupoljci. Minimalna količina padavina koju zahteva tisa je od 500 do 1000 mm godišnje, a pogoduju joj i veće količine (do 2000 mm). Tisa jedino ne toleriše stagnirajuću vodu u zemljištu i visoku kiselost. Drugi faktori koji ograničavaju rast tise su: oštre zime, kasni mrazovi, hladni i suvi vetrovi na eksponiranim staništima i suša (Thomas i Polwart, 2003; Pietzarka, 2005; Hageneder, 2013).

Tanka kora čini tisu podložnom šumskim požarima. Međutim, odsustvo smonih kanala čini da je zapaljivost tise mnogo niža u odnosu na druge četinare (Núñez-Regueira et al., 1997; Hageneder, 2013).

Temperaturni opseg u kome tisa može da vrši fotosintezu je veoma širok. Ona vrši fotosintezu i tokom zime do minimalne temperature od -8°C . Zimi ona nadoknađuje

nisku fotosintetičku aktivnost koju je imala tokom letnjih meseci, ispod krošnji listopadnog drveća (Hageneder, 2013).

Ekološki faktori koji ograničavaju areal tise su: niske temperature i fiziološka suša (uzrokovana smrznutim zemljištem) na severu; oštra kontinentalna klima sa hladnim zimama i toplim, suvim letima u Baltičkim zemljama i Poljskoj na istoku; dugotrajne suše u Turskoj na jugoistoku i suša i visoke temperature na jugu u severozapadnoj Africi. Između ovih ekstrema, populacije tise rastu u vlažnim nišama kao što su doline reka ili na višim nadmorskim visinama (gde je veća vlažnost i niža temperatura).

U Velikoj Britaniji tisa formira guste sastojine u kojima je ona jedina dominantna vrsta. U ovim sastojinama sporadično se mogu javiti druge vrste, kao što su *Sorbus aria* (L.) Crantz i *Fraxinus excelsior* L., a ređe *Fagus sylvatica* L., *Acer pseudoplatanus* L. i *Quercus robur* L. U spratu žbunja samo sporadično se javljaju *Sambucus nigra* L., *Ilex aquifolium* L. ili *Crataegus monogyna* Jacq. Takođe, u osnovi stabala tise primetni su ostaci nekadašnjih žbunova *Juniperus communis* L., koji su važni prekursori za formiranje ovih sastojina (Pigott i Rodwell, 1991). *Taxus baccata* L. može kolonizovati ivice šume i otvorene travne površine na strmim i ekspaniranim terenima poput pionirskih vrsta, ali joj je za to potrebna asistencija žbunova sa sočnim plodovima, kao što su *Juniperus communis* L., *Crataegus* spp. i *Prunus spinosa* L. Sočni plodovi ovih vrsta privlače ptice koje raznose seme tise. U osnovi ovih trnovitih žbunova, mlade sadnice tise će naći potrebnu zaštitu od herbivora i povoljne mikroklimatske uslove za razvoj (Pigott i Rodwell, 1991; Hulme, 1996; García et al., 2000; Mendoza et al., 2009). Na dubljim i vlažnijim staništima, drugo drveće, a naročito *Fraxinus* sp., će konkurisati tisi za osvajanje staništa i voditi ka formiranju prelazne sastojine tise i jasena. U krajnjem stadijumu će se formirati šuma tise sa mestimičnim stablima jasena ili neke druge vrste (Pigott i Rodwell, 1991). Hageneder (2013) navodi da je tisa istovremeno pionirska i klimaksna vrsta.

U umerenoj zoni, tisa najčešće raste u zajednici sa bukvom, bukvom i četinarima ili hrastovima. U ovakvim zajednicama, tisa opstaje zahvaljući velikoj toleranciji na senku (Thomas i Polwart, 2003; Hageneder, 2013).

Spor rast, velika regenerativna moć, efektivno skladištenje resursa, toksičnost i visoka tolerancija na stres čine jedinstvenu ekološku strategiju koja je tisi omogućila da preživi 15 miliona godina i adaptira se na raznovrsne faktore sredine.

2.3. POLNOST

Taxus baccata L. je dvodoma vrsta, mada se kod pripadnika jednog pola mogu javiti grane sa karakteristikama suprotnog pola. Procenat jednodomih jedinki u populacijama tise se kreće od 1-2%. Takođe, moguće su i promene pola kod pojedinih stabala (Thomas i Polwart, 2003; Hageneder, 2013). Tisa dostiže polnu zrelost od 30-35 godine života, a ako raste u zatvorenom sklopu od 70-120 godine života (Hageneder, 2013). Cvetni pupoljci se formiraju u drugoj polovini leta, a otvaraju u proleće naredne godine (u uslovima umereno-kontinentalne klime marta-aprila). Cvetovi su sitni i mnogobrojni. Muški cvetovi imaju prečnik 2-3 mm (Slika br. 2), a ženski su za trećinu manji. Ženske jedinke proizvode više cvetova kada su izložene većem intenzitetu svetlosti (Pietzarka, 2005).



Slika br. 2. Cvetovi na muškom stablu tise u parku „Slavujev potok“ u Beogradu (Foto: Stefanović, 2014)

Tisa se oprašuje vetrom, ali može se oprašivati i entomofilno. Seme tise je ovalno, dimenzija 6-7 x 5 mm, braon-žute boje i dozreva u jesen prve godine. Seme ima tvrdnu semenjaču i delimično je okruženo mesnatim arilusom, dimenzija oko 9 x 7 mm. Boja arilusa je crvena kod osnovne vrste, a kod kultivara može biti narandžasta ili zlatna. Arilus je jedini deo tise koji nije toksičan za sisare (kada je zreo), a razvija se iz

dela gde je seme pričvršćeno za biljku. Njegova uloga je da zaštiti seme i privuče ptice koje ga dalje raznose. Seme tise najčešće klija u drugoj ili trećoj godini. Zbog arilusa koji podseća na bobicu tisa je dobila naučni naziv *Taxus baccata* L. („baccata“ znači „sa bobicama“).

Kao dvodoma vrsta, tisa predstavlja retkost među četinarima. Dvodomost se javlja kod 6-9% vrsta viših biljaka (Sakai i Weller, 1999) i najzastupljenija je kod drvenastih vrsta, posebno onih koje se oprašuju vetrom (Freeman et al., 1980). Prema Popović i sar. (2012), od ukupno 108 drvenastih vrsta u Srbiji koje su bile obuhvaćene analizom, 28% je hermafroditno, 43% jednodomo i 29% dvodomo.

Brojne studije su pokazale da postoji veća verovatnoća za iščezavanje dvodomih vrsta u odnosu na vrste sa drugačijim reproduktivnim sistemima (Heilbuth, 2000; Vamosi i Vamosi, 2005). Kao jedan od glavnih razloga zašto su dvodome vrste podložnije iščezavanju navodi se to da polovi imaju nejednaka energetska ulaganja u reprodukciju (Delph, 1990; Krischnik i Denno, 1990a; Krischnik i Denno 1990b; Cipollini i Stiles, 1991; Allen i Antos, 1993; Laporte i Delph, 1996; Cipollini i Whigham, 1994; Massei et al., 2006; Iszkulo et al., 2009). Reproductivna ulaganja mogu direktno uticati na rast i razvoj vegetativnih organa (Obeso, 1997; Leigh i Nicotra, 2003; Leigh et al., 2006; Zunzunegui et al., 2006). U najvećem broju slučajeva, ženske jedinke rastu sporije od muških i imaju manji prečnik debla (Obeso, 2002; Leigh et al., 2006; Montesinos et al., 2006; Iszkulo et al., 2009; Gao et al., 2010). U stresnim uslovima sredine ženske jedinke imaju veću stopu mortaliteta (Sawyer i Anderson, 1998; Espirito-Santo et al., 2003; Massei et al., 2006; Xu et al., 2008). Odnos polova u populacijama često nije jednak (de Jong i van der Meijden, 2004) i može biti pokazatelj adaptacije na određene uslove sredine (Vessella et al., 2015). Muške jedinke najviše ulažu u reprodukciju u periodu cvetanja. Za razliku od muških, ženske jedinke imaju velika energetska ulaganja i za vreme, i nakon cvetanja, u periodu sazrevanja semena (Obeso, 2002).

Razlike između muških i ženskih jedinki tise su tipične za dvodome vrste. Muške jedinke tise su višeg rasta i imaju veći prečnik debla. Odnos polova u populacijama se menja sa starenjem populacije u korist muških jedinki (Iszkulo et al., 2009). Sa povećanjem količina padavina povećava se i zastupljenost ženskih jedinki tise

u populacijama, što ukazuje da ženske jedinke imaju veće zahteve za vlagom (Freeman et al., 1976; Iglesias i Bell, 1989; Bertiller et al., 2002; Iszkulo et al., 2009).

Ova korelacija ukazuje na veću stopu mortaliteta ženskih jedinki na suvljim staništima na ivicama areala vrste. Viši zahtevi za vodom ženskih jedinki potvrđuje i činjenica da vlažniji regioni imaju veći procenat dvodomih vrsta (12-20%) (Ward et al., 2002; Krishnan i Ramesh, 2005).

2.4. TAKSONOMIJA

pododeljak *Pynophyta*

klasa *Pinopsida*

red *Pinales* Gorozh.

familija *Taxaceae* S.F. Gray

rod *Taxus* L.

Tokom istorije u klasifikaciji biljaka, pozicija tise je često bila kontraverzna. Tisa je smeštena među četinare, u red *Pinales* Gorozh., ali je karakterišu neke specifičnosti u odnosu na ovu grupu biljaka. Naime, tisa nema smone kanale i ne obrazuje šišarice.

Sahni (1920) je prvi izdvojio rodove *Taxus* L., *Torreya* Arn. i *Cephalotaxus* Siebold & Zucc. ex Endl. u poseban red *Taxales* Knobl. na osnovu karakteristika semena. Nekoliko kasnijih klasifikacija je podržalo ovo odvajanje reda *Taxales* Knobl. od reda *Coniferales* (*Pinales* Gorozh.) (Arnold, 1948 prema Singh, 2006; Florin, 1948; Pant, 1957 prema Singh, 2006; Bierhorst, 1971 prema Singh, 2006; Sporne, 1974 prema Singh, 2006; Taylor, 1981 prema Singh, 2006; Stewart, 1983; Holmes, 1986 prema Singh, 2006). Međutim, kasnije prikupljeni podaci o proembriogeniji (Doyle, 1963; Singh, 1978 prema Cheng et al., 2000; Dogra, 1980 prema Cheng et al., 2000), kao i hemijskim (Hegnauer, 1988), morfološkim (Hart, 1987) i molekularnim (Raubeson i Jansen, 1992; Chase et al., 1993; Chaw et al., 1993; Stefanovic et al., 1998) karakteristikama *Taxaceae* S.F. Gray pružaju dovoljno dokaza da se ova familija svrsta među četinare u red *Pinales* Gorozh. (Cheng et al., 2000).

Carl Linnaeus (1753) je u svojoj knjizi “Systema Naturae” opisao jednu vrstu tise – evropsku tisu *Taxus baccata* L. sa rasprostranjenjem u Evropi i Kanadi.

U toku 20. veka, botaničari su podelili rod *Taxus* L. na 8 vrsta prema geografskom rasprostranjenju: *Taxus baccata* L. u Evropi, severnoj Africi i jugozapadnoj Aziji (Franco, 1964 prema Spjut, 2007b), *Taxus cuspidata* Siebold & Zucc. u umerenom pojasu istočne Azije (Krüssmann, 1985; Ohwi, 1965 prema Spjut, 2007b), *Taxus wallichiana* Zucc. na Himalajima (Krüssmann, 1985 prema Spjut, 2007b), *Taxus sumatrana* (Miq.) de Laub. u južnoj Kini, na Filipinima, Tajvanu, Sulavesiju i Sumatri (de Laubenfels, 1988), *Taxus globosa* Schltdl. u severnoj centralnoj Americi do Meksika (Ferguson, 1978), *Taxus brevifolia* Nutt. na severozapadu Severne Amerike (Ferguson, 1978; Hils, 1993 prema Spjut, 2007b), *Taxus floridana* Nutt. ex Chapm. na zapadnoj Floridi (Ferguson, 1978; Price, 1990; Hils, 1993 prema Spjut, 2007b) i *Taxus canadensis* Marshall na severoistoku Severne Amerike (Ferguson, 1978; Price, 1990; Hils, 1993 prema Spjut, 2007b). Richard W. Spjut (2000) je predstavio taksonomiju roda *Taxus* L. zasnovanu na morfološkim parametrima. Prema njegovoj klasifikaciji (Spjut, 2007a; Spjut, 2007b), rod *Taxus* L. obuhvata 24 vrste i 55 varijeteta, svrstanih u tri grupe: Wallichiana, Baccata i Sumatrana.

Na osnovu morfoloških i hemijskih analiza neki autori smatraju da se vrste iz roda *Taxus* L. mogu podvesti pod jednu – *Taxus baccata* L. (Pilger, 1903 in Hageneder, 2013; Elwes i Henry, 1906; Fukarek, 1957; Burns i Honkala, 1990; Demspey i Hook, 2000) s obzirom da među njima nisu ustanovljene razlike od taksonomskog značaja. Hageneder (2013) navodi da novija genetička istraživanja pružaju dovoljno dokaza da se vrste iz roda *Taxus* L. ipak mogu podvesti pod jednu. To bi značilo da tisu karakteriše širok opseg morfološke plastičnosti, štaviše opisano je više od 70 varijeteta i kultivara (Cope, 1998; Thomas i Polwart, 2003). Naravno, geografska pozicija će usloviti izvesne adaptacije u populacijama koje egzistiraju u različitim klimatskim uslovima.

2.5. ISPARLJIVE HEMIJSKE KOMPONENTE

2.5.1. Definicija i značaj

Biljke sintetisu širok opseg organskih jedinjenja koja se mogu klasifikovati kao primarni ili sekundarni metaboliti, ali u nekim slučajevima ne postoji jasna granica između ove dve grupe. *Primarni metaboliti* su jedinjenja koja imaju fundamentalne uloge u procesima fotosinteze, disanja, rasta i razvoja. Oni obuhvataju fitosterole, lipide, nukleotide, aminokiseline i organske kiseline. *Sekundarni metaboliti* takođe imaju važnu ulogu u fiziološkim procesima biljaka i utiču, između ostalog, i na njihovu fertilnost. Sekundarni metaboliti se javljaju kod ograničenog broja vrsta biljaka i mogu poslužiti u sistematici i analizi utacaja genetičkih i sredinskih faktora. Sekundarni metaboliti imaju ključnu ulogu u zaštiti biljaka od herbivora i mikrobnih infekcija, zatim u privlačenju polinatora i životinja koje raznose seme, kao alelopatski agensi, u zaštiti od UV zračenja i kao signalni molekuli u formiranju azoto-fiksirajućih korenskih nodula kod leguminoza. Sekundarni metaboliti imaju primenu kao boje, vlakna, lepkovi, voskovi, aditivi za poboljšanje ukusa, lekovi i parfemi, a takođe su potencijalni izvori prirodnih lekova, antibiotika, insekticida i pesticida (Croteau et al., 2000; Dewick, 2002).

Na osnovu načina biosinteze sekundarni metaboliti se mogu svrstati u tri grupe: (1) flavonoidi i druga fenolna i polifenolna jedinjenja, (2) terpenoidi i (3) alkaloidi i jedinjenja koja sadrže sumpor (Crozier et al., 2006).

Mešavine isparljivih jedinjenja i etarska ulja, koje predstavljaju mirisne konstituente biljaka, su najčešće u tečnom obliku na sobnoj temperaturi, slabo rastvorljive u vodi i lako rastvorljive u organskim rastvaračima (Sarić, 1989; Fugueiredo, 2008). U hemijskom pogledu etarska ulja su vrlo složene smeše različitih alifatskih, hidroaromatskih i aromatičnih jedinjenja. Glavni i najčešći sastojci su razni terpeni i njihovi derivati (Sarić, 1989).

Terpeni su sekundarni metaboliti čija je osnovna jedinica strukture izopren, jednostavni ugljovodonični molekul, i predstavljaju najbrojnije i strukturno najraznovrsnije prirodne produkte biljaka. Terpenoidi nastaju modifikacijom terpena, kao na primer dodatkom kiseonika (Zwenger, 2008). Prema broju izoprenskih jedinica

terpeni su podeljeni na: monoterpene, seskviterpene, diterpene, sesterterpene, triterpene, tetraterpene i politerpene.

U proteklim decenijama intezivno se tragalo za novim biološki aktivnim supstancama. Između ostalog, veliki broj istraživanja je usmeren na ispitivanja antimikrobnog i antioksidativnog dejstva etarskih ulja i isparljivih jedinjenja.

Aromatične biljke i etarska ulja se upotrebljavaju pre svega u hemijsko-farmaceutskoj industriji i apotekama za izradu lekovitih preparata, zatim u proizvodnji kozmetičkih i parfimerijskih proizvoda, u prehrambeno-konzervnoj industriji kao začini, u industriji bezalkoholnih i alkoholnih napitaka, poslastica i sličnih proizvoda, u duvanskoj industriji itd. (Sarić, 1989). Pored toga, etarska ulja se mogu koristiti u zaštiti useva protiv štetočina i imaju širok spektar aktivnosti što umanjuje rizik razvoja rezistentnih patogenih sojeva. Takođe, ne postoji opasnost od njihove akumulacije u životnoj sredini (Figueiredo, 2008).

Etarska ulja ili neke njihove komponente imaju primenu u hemotaksonomiji. Terpeni se često koriste u istraživanjima diverziteta i geografske varijabilnosti vrsta, naročito kod četinara. Otto i Wilde (2001) su ukazali na značaj terpenoida u hemotaksonomiji i filogeniji četinara, kao i njihovu primenljivost kao genetičkih markera na različitim taksonomskim nivoima. Terpeni četinara, kao ekološki i hemotaksonomski markeri, najpre su korišćeni na nivou roda, i to *Pinus* L. (Mirov, 1961), *Picea* A. Dietr. (von Rudloff, 1967), *Abies* Mill. (Zavarin, 1968), a kasnije i na nivou familija Pinaceae Lindley i Cupressaceae Bartlett (von Rudloff, 1975; Yatagai i Sato, 1986). Međutim, terpeni se mnogo češće koriste za procenu geografske varijabilnosti vrsta (von Rudloff, 1973; Lapp i von Rudloff, 1982).

Diverzitet terpena može ukazati na genetički diverzitet (Loreto, 2002). Različiti hemotipovi u okviru iste vrste podrazumevaju prisustvo različitih sekundarnih metabolita (npr. terpena), kao i razlike u njihovim relativnim koncentracijama (na primer kod Petrakis et al., 2000; Lahlou i Berrada, 2003; Thoss et al., 2007; Arrabal et al., 2012; Lakušić et al., 2012; Stešević et al., 2014). Mnoge vrste se odlikuju izuzetnim diverzitetom terpena. Pitanje zašto biljke ulažu resurse u sintezu toliko različitih terpena je često predmet rasprave ekologa. Jones i Firn (1991) su predstavili model zasnovan na jednostavnom predlogu: potencijalna biološka aktivnost je retka karakteristika molekula. Prema ovom modelu, evolucija će favorizovati organizme koji mogu da

proizvedu i održe hemijski diverzitet uz mala energetska ulaganja. Organizmi (biljke) koji proizvode veliki broj hemijskih jedinjenja imaju veće šanse da povećaju vitalnost, jer što je veći hemijski diverzitet, veća je šansa da se proizvede potencijalno biološki aktivno jedinjenje (Firn i Jones, 1996; Firn i Jones, 2003).

2.5.2. Varijabilnost isparljivih komponenti

Brojni faktori utiču na proizvodnju isparljivih hemijskih jedinjenja kod biljaka, što značajno otežava razvijanje modela koji predviđaju količine sekundarnih metabolita u različitim ekološkim uslovima. Stoga konstrukcija takvih modela predstavlja jedan od najvećih izazova u pitanjima vezanim za sekundarni metabolizam biljaka (Ormeño et al., 2008).

Produkcija sekundarnih metabolita, kao na primer terpena, je najčešće pod udruženim uticajem ekoloških uslova i genetike (Hamilton et al., 2001). Postoje primeri gde su koncentracije sekundarnih metabolita pod uticajem varijacija iz spoljašnje sredine (Herms i Mattson, 1992; Marquis, 1992 prema Hamilton et al., 2001; Koricheva et al., 1998). Međutim, u ovakvim primerima ne može se zaključiti da je efekat spoljašnje sredine nezavistan od dejstva gena. Moguće je da spoljašnja sredina direktno deluje na ekspresiju gena, uzrokujući indukciju ili supresiju (Hamilton et al., 2001). Kod vrsta iz rodova *Abies* Miller, *Achillea* L., *Clarkia* Pursh, *Cupressus* L., *Juniperus* L., *Perilla* L., *Pinus* L., *Salvia* L. i *Thymus* L. je dokazano da je sastav etarskog ulja genetički determinisan (Figueiredo et al., 1997 prema Figueiredo et al., 2008; Stahl-Biskup i Saez, 2002; Theis i Lerdau, 2003; Nemeth, 2005).

Drugi biotički faktori koji utiču na proizvodnju terpena kod biljaka su: kompeticija između biljaka (Ormeño et al., 2007a; Ormeño et al., 2007b), polinatori (Cassard et al., 2004), mehaničke povrede (Pasqua et al., 2002), herbivori, virusi, bakterije i gljive (Panizzi et al., 1993; Lahlou i Berrada, 2003; Giordani et al., 2004). Terpeni su takođe osetljivi na abiotičke faktore kao što su: ultravioletno B zračenje (Zavala i Ravetta, 2002), intenzivni uslovi vodenog stresa (Delfine et al., 2005; Ormeño et al., 2007c), visoke temperature i intezitet svetlosti (Flesh et al., 1992; Wassner i Ravetta, 2005) i ozon (Kainulainen et al., 2000).

Brojne studije su sprovedene u cilju da se ispituju varijacije u sastavu etarskog ulja između populacija iz različitih geografskih oblasti (na primer kod *Satureja montana* L. i *Satureja kitaibelii* Wierzb. Ex Heuff – Slavkowska et al., 2011; *Rosmarinus officinalis* L. – Diab et al., 2002 i Jordán et al., 2013; *Pinus halepensis* Miller – Ghanmi et al., 2005 i Djerrad et al., 2015; *Salvia tomentosa* Mill. – Hanlidou et al., 2014).

U Srbiji i regionu sprovedena su istraživanja varijabilnosti sastava etarskog ulja iz četina na sledećim vrstama: *Picea omorika* (Pancic) Purk., *Pinus peuce* Griseb., *Pinus heldreichii* Christ (Nikolić et al., 2007, 2008, 2009, 2011, 2014, 2015; Nikolić, 2008; Bojović et al., 2011), *Pinus nigra* J.F. Arnold (Bojovic et al., 2005; Šarac et al., 2013; Šarac, 2014) i nekoliko vrsta i varijeteta kleke (*Juniperus deltoides* R.P. Adams – Rajčević et al., 2013, 2015; Rajčević, 2015; *Juniperus communis* L. i *Juniperus macrocarpa* Sibith.&Sm. (Rajčević, 2015)). Glavni cilj ovih istraživanja bio je da se proširi znanje o diverzitetu i taksonomiji ovih vrsta. Kod svih vrsta ustanovljena je visoka varijabilnost između i unutar populacija, kao i specifičnost pojedinih populacija u pogledu sastava etarskog ulja. Veza između određenih ekoloških faktora (geološke podloge) i diverziteta terpena ustanovljena je kod *Pinus heldreichii* Christ. i *Pinus peuce* Griseb., ali ne i kod *Picea omorika* (Pancic) Purk. (Nikolić et al., 2011), *Juniperus communis*, *J. deltoides* i *J. macrocarpa* (Rajčević, 2015).

2.5.3. Dosadašnja istraživanja isparljivih komponenti roda *Taxus* L.

Do danas je objavljeno svega nekoliko studija o isparljivim komponentama izolovanim iz roda *Taxus* L.

Prvu studiju o glikozidno vezanim isparljivim jedinjenjima iz četina *Taxus baccata* L. koja su izolovana enzimskom hidrolizom sa β -glukozidazom objavili su Merx i Svendsen (1990). Oni su registrovali samo tri jedinjenja: 1-okten-3-ol (>50%), eugenol (0.5-5%) i (Z)-3-heksenol (<0.5%).

Jean i sar. (1993) analizirali su etarsko ulje i glikozidno vezana isparljiva jedinjenja iz *Taxus canadensis* Marsh. Biljni materijal je sakupljen sa obale jezera Sen Žen u Kvebeku. U etarskom ulju iz svežih četina i grančica *T. canadensis* Marsh. identifikovano je 18 jedinjenja. Kao glavni konstituenti etarskog ulja iz svežih četina zabeleženi su 1-okten-3-ol (44.6%) i (E)-2-heksenol (24.13%). U većem procentu

zastupljeno je i jedinjenje koje su autori predstavili samo molekularnom formulom ($C_8H_{14}O$), a koje bi, na osnovu retencionog vremena, moglo da bude 1-okten-3-on. Četiri monoterpenska alkohola su prisutna u malim količinama: mirtenol (0.68%), geraniol (0.20%), *p*-menta-2-en-7-ol (0.52%) i *p*-menta-1,8-dien-7-ol (0.84%), kao i jedan seskviterpensi alkohol okcidentalol (1.41%). Jean i sar. (1993) zaključuju da je ulje *T. canadensis* Marsh. siromašno monoterpenima u odnosu na druge četinare.

Jean i sar. (1993) ispitali su i sastav aglikona koji su ekstrahovani nakon hidrolize suvih četina pomoću β -glukozidaze i celulaze. U oba slučaja glavni aglikoni su 3,5-dimetoksifenol i 1-okten-3-ol, ali njihov procenat varira u zavisnosti od enzima koji je korišćen u ekstrakciji.

Erdemoglu i sar. (2003) su prvi objavili studiju u kojoj su GC-MS analizom ispitali isparljive komponente iz četina *Taxus baccata* L. Materijal je sakupljen u Turskoj u oblasti Rize na nadmorskoj visini od 1100m. Erdemoglu i sar. (2003) su ispitali sastav ulja dobijenog hidrodestilacijom iz suvih (uzorak A) i iz svežih četina (uzorak B) nakon enzimske hidrolize. Utvrđeno je da oba uzorka imaju sličan hemijski sastav u odnosu glavne klase isparljivih jedinjenja; 61-63% ulja čine masne kiseline i njihovi estri, a 6-14% alifatična jedinjenja. Terpenoidi čine svega 6.4-9.3% ulja. Iz ulja dobijenog iz suvih četina identifikovano je 65 jedinjenja, dok je iz ulja svežih četina identifikovano 63 jedinjenja. Glavni konstituenti ulja su palmitinska kiselina u uzorku A (22.5%) i uzorku B (19.6%), kao i dekanska kiselina u uzorku A (12.6%) i uzorku B (19.5%). Druga jedinjenja koja su zastupljena u većem procentu su: laurinska kiselina u uzorku A (5.9%) i u uzorku B (8.1%), miristinska kiselina u uzorku A (8.0%) i u uzorku B (2.1%), dekanol u uzorku A (3.6%) i uzorku B (5.4%) i heksahidrofarnezil aceton u uzorku A (4.7%) i u uzorku B (1.6%).

Khan i sar. (2006) su ispitali sastav etarskog ulja dobijenog hidrodestilacijom iz svežih četina *T. wallichiana* Zucc. Uzorci su sakupljeni u oblasti severnih Himalaja u Gulmargu u Džamu i Kašmiru. GC i GC-MS analizama identifikovano je 62 jedinjenja u etarskom ulju. Glavni konstituenti su (*E*)-2-okten-1-ol (14.5%), *n*-pentakozan (8.1%), kariofilen oksid (7.1%), 1-oktanol (6.5%), heksanska kiselina (5.5%) i (*Z*)-3-heksenol (4.1%). Khan i sar. (2006) uporedili su svoje rezultate na *Taxus wallichiana* Zucc. sa rezultatima Jean i sar. (1993) na *Taxus canadensis* Marsh. Nađeno je 6 jedinjenja koja su zajednička za *T. wallichiana* Zucc. i *T. canadensis* Marsh. Od ovih šest jedinjenja,

količina (*Z*)-3-heksenola (4.1 i 2.0%) je 2 puta, eugenola (0.9 i 0.2%) 4–5 puta, kao i oktanola (6.5 i 0.6%) i geraniola (2.4 i 0.2%) 10–12 puta veća kod *T. wallichiana* Zucc. nego kod *T. canadensis* Marsh. Sa druge strane, količina *n*-heksenola (1.0 i 0.6%) i mirtenola (0.7 i 0.3%) je oko dva puta veća kod *T. canadensis* Marsh. nego kod *T. wallichiana* Zucc. Khan i sar. (2006) zaključuju da se sastav etarskog ulja himalajske i kanadske tise u velikoj meri razlikuje što se može pripisati geografskom poreklu i uslovima sredine.

Radulović i sar. (2010) su prvi ispitali sastav etarskog ulja *Taxus baccata* L. dobijenog direktno iz biljnog materijala (bez podvrgavanja nekom tretmanu pre hidrodestilacije). Biljni materijal (četine i grančice) je sakupljen iz prirodne populacije tise u klisuri reke Jerme u jugoistočnoj Srbiji. GC-MS analizama je identifikovano 62 jedinjenja u ulju dobijenom iz svežih četina i grančica *Taxus baccata* L. Pet glavnih konstituenata su: heksahidrofarnesil acetone (18.3%), mirtenol (18.3%), (*Z*)-3-heksenol (6.0%), 3-metil-2-butenska kiselina (5.9%) i trikozane (5.5%). Najzastupljenija klasa jedinjenja su terpenoidi (28.2%), za razliku od istraživanja Erdemoglu i sar. (2003) gde ova klasa jedinjenja čini svega 6.4–9.3% ulja. U većem procentu zastupljeni su i derivati karotenoida (18.4%), *n*-alkani (18.4%) i isparljiva organska jedinjenja (“green leaf volatiles“) (12.0%). Masne kiseline i njihovi estri čine 7.2% ulja, za razliku od rezultata Erdemoglu i sar. (2003) gde ova klasa jedinjenja čini najveći deo ulja (61–63%). Radulović i sar. (2010) navode da su monoterpoidna i diterpoidna frakcija ulja u njihovim istraživanjima i istraživanjima tise iz Turske slične. Međutim, u ulju dobijenom iz tise u Srbiji nisu detektovani seskviterpenoidi, za razliku od ulja iz tise u Turskoj. Kao moguće objašnjenje za to, Radulović i sar. (2010) navode da su seskviterpenoidi u tisi glikozidno vezani i ne isparavaju u uslovima hidrodestilacije. Oni takođe navode da su samo muške jedinke bile predmet njihovog istraživanja i da su moguće razlike u hemijskom sastavu na nivou polova. Radulović i sar. (2010) zaključuju da najviše sličnosti prema hemijskom sastavu imaju ulja dobijena iz tise iz Srbije i Turske, s obzirom da su samo u njima detektovani derivati karotenoida, masne kiseline i estri.

2.5.4. Veza isparljivih komponenti i klimatskih faktora

Proizvodnja etarskog ulja je u velikoj meri zavisna od vremenskih prilika (Figueiredo et al., 2008).

U istraživanjima Lakušić i sar. (2012) ispitana je linerana zavisnost hemijskih konstituenata etarskog ulja *Rosmarinus officinalis* L. od bioklimatskih, geografskih i orografskih karakteristika. Istraživanjem je obučeno 10 populacija ruzmarina sa Balkanskog poluostrva. Regresiona analiza je pokazala da bioklimatski faktor temperatura staništa predstavlja dominantan abiotički faktor, koji vodi ka diferencijaciji populacija *Rosmarinus officinalis* L. u proučavanom području i stvaranja nekoliko hemotipova. Bioklimatski faktori količina padavina i vlažnost nisu pokazali jak uticaj na varijabilnost sastava etarskog ulja ruzmarina. Rezultati Lakušić i sar. (2012) potvrđuju pretpostavku da je geografska distribucija različitih tipova etarskog ulja *Rosmarinus officinalis* L. jako povezana sa klimatskim karakteristikama staništa i da geografski položaj populacije predstavlja važan faktor koji utiče na hemijski sastav etarskog ulja.

2.6. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE ČETINA

2.6.1. Morfološke karakteristike četina *Taxus baccata* L.

U proučavanjima geografske varijabilnosti vrsta, težište je na biohemijskim i genetičkim istraživanjima. Pa ipak, prilikom determinisanja novih formi morfološki markeri su najpouzdaniji.

Do sada je objavljen veliki broj studija o morfološkim karakteristikama četina tise (Strobel i Hess, 1996; Di Sapio et al., 1997; Cope, 1998; Dempsey i Hook, 2000; Spjut, 2007a; Spjut, 2007b; Zarek, 2007; Iszkulo et al., 2009; Schirone et al., 2010; Vessella et al., 2013), ali koliko je poznato, populacije tise u Srbiji nisu istražene.

Četine *Taxus baccata* L. su usko linearne, zašiljenog vrha i asimetrične osnove na kratkoj peteljci, na licu tamnozeleno i sjajne, a na naličju blede zelene. Na preseku su četine dorzoventralno konveksne sa povijenim rubom i istaknutim lisnim nervom na naličju (Di Sapio et al., 1997). Na izbojcima su četine spiralno raspoređene; dugačke od 10 do 30 mm (retko do 45 mm), široke 2 do 3 mm, bez smonih kanala. Trajnost četina

je 4-8 godina (Thomas i Polwart, 2003; Ocokoljić i Ninić-Todorović, 2003). U pogledu morfoloških karakteristika četina, tisa je veoma varijabilna.

Stome se nalaze samo na naličju četina u uzdužnim redovima grupisanim u dve celine koje odvaja lisni nerv (Di Sapio et al., 1997). Broj redova stoma na jednoj polovini naličja četine je od velike važnosti za klasifikaciju vrsta u okviru roda *Taxus* L. Severnoameričke *Taxus* L. vrste imaju 3-5 redova stoma na jednoj polovini naličja četine, dok vrste iz Evrope i Azije karakteriše 7-10 redova. Prema Spjut (2007b), četine tise iz Evrope i sa Mediterana najčešće imaju 8-10 redova stoma na jednoj polovini naličja četine. Osim ove karakteristike, za taksonomiju je od značaja i raspored papiloznih epidermalnih ćelija koje se nalaze između stoma. Kombinovanjem ove dve morfološke karakteristike može se dobiti koristan dihotoman ključ za taksonomiju roda *Taxus* L., pomoću koga se mogu odvojiti neke, ali ne sve vrste (Strobel i Hess, 1996).

Stomini otvori su okruženi sa 4-8 pomoćnih papilarnih ćelija koje čine „Florinov prsten“ (Spjut, 2007b). Širenje i skupljanje pomoćnih ćelija reguliše zatvaranje i otvaranje stoma, a samim tim i razmenu gasova.

Mnogi autori (Salisbury, 1928; Mitchell, 1998; Dempsey i Hook, 2000; Iszkulo et al., 2009; Schirone et al., 2010) smatraju da je gustina stoma značajna taksonomska i ekološka karakteristika. Salisbury (1928) je zabeležio da prosečna gustina stoma kod *Taxus baccata* L. iznosi 115 stoma po mm^2 , dok je Mitchell (1998) izmerio prosečnu gustinu od 89.4 stoma po mm^2 za četine na punoj svetlosti. Dempsey i Hook (2000) su zabeležili vrednosti između 82.28 i 119.53 stoma po mm^2 kod različitih kultivara *Taxus baccata* L., kao i veće vrednosti kod drugih vrsta iz roda *Taxus* L. Iszkulo i sar. (2009) su izmerili veću gustinu stoma kod ženskih (75.06 stoma po mm^2) u odnosu na muške jedinke (68.64 po mm^2). Schirone i sar. (2010) su zabeležili gustinu stoma od 138.12 po mm^2 za tisu iz Italije (Karpineto Romano) i čak 231.87 stoma po mm^2 za tisu sa Azorskih ostrva. Vessella i sar. (2013) navode vrednosti od 141.87 stoma po mm^2 za tisu iz Italije (Rozelo) i 194.57 stoma po mm^2 za tisu sa Madeire. Prema Hageneder (2013) četine tise imaju od 59 do 119 stoma po mm^2 .

2.6.2. Dosadašnja istraživanja morfoloških karakteristika četina roda *Taxus* L.

Strobel i Hess (1996) su pokušali da uoče razlike između *Taxus* L. vrsta na osnovu mikromorfologije epikutikularnih voskova na površini četina koje su posmatrali skenirajućim elektronskim mikroskopom. Njihova istraživanja su pokazala da iako se šema kutikularnih voskova u izvesnoj meri razlikuje između različitih *Taxus* L. vrsta (*Taxus floridana* Nutt. ex Chapman, *Taxus canadensis* Marshall i *Taxus globosa* Schltl.), ista, ako ne i veća varijabilnosti je utvrđena između jedinki iste vrste (*Taxus baccata* L.). Razlike u karakteristikama epikutikularnih voskova uočene su kod *Taxus brevifolia* Nutt. između odraslih jedinki iz središnjih delova šume i mladih žbunastih jedinki sa južne granice areala, koje rastu u aridnijim uslovima. Autori pripisuju prisustvo velikih depozita epikutikularnih voskova kod biljke koja raste u aridnim uslovima uticaju faktora sredine. Kod vrste *Taxus chinensis* (Pilg.) Rehd. utvrđeno je da se šema epikutikularnih voskova značajno razlikuje između mladih i starih biljaka (Strobel i Hess, 1996). Strobel i Hess (1996) zaključuju da su razlike u morfologiji epikutikularnih voskova rezultat delovanja različitih faktora sredine i starosti biljke. Nasuprot tome, razvoj i šema papiloznih epidermalnih ćelija ne zavise od starosti biljke i faktora sredine.

Dempsey i Hook (2000) su obavili istraživanje sa ciljem da utvrde da li postoje značajne razlike u pogledu morfologije četina i hemijskih konstituenata između *Taxus* L. vrsta i varijeteta koje bi mogle biti od taksonomskog značaja. Uzorci su prikupljeni u isto vreme sa biljaka približne starosti koje rastu na istom lokalitetu. Njihovi rezultati ukazuju da značajne razlike postoje u gotovo svim ispitivanim morfološkim karakteristikama četina i količini paklitaksela, ne samo između različitih *Taxus* L. vrsta, već i između varijeteta u okviru iste vrste. U odnosu na gustinu stoma (broj stoma po mm²) značajne razlike nisu ustanovljene između *Taxus* L. vrsta i varijeteta. U zaključku autori navode da njihovi rezultati ukazuju da se vrste iz roda *Taxus* L. mogu podvesti pod jednu vrstu, kao i da 7 opisanih *Taxus* L. vrsta predstavljaju samo geografske forme. Neophodno je sprovesti dalja istraživanja sa drugim hemijskim konstituentima, kao i DNK analize genoma da bi se doneo konačan zaključak (Dempsey i Hook, 2000).

Zarek (2007) je proučavao varijabilnost prirodnih populacija tise u južnoj Poljskoj u pogledu morfoloških karakteristika četina, izdanaka i semena. Najveće razlike među populacijama ustanovljene su u pogledu karakteristika četina. On je uočio da su širina i površina četina negativno korelisane sa dužinom vegetacionog perioda. Tako su rezultati njegovog istraživanja za 9 prirodnih populacija pokazali da su četine tise iz južne Poljske značajno šire i imaju značajno veću površinu u poređenju sa rezultatima Dempsey i Hook (2000) za tisu iz Velike Britanije, gde je duža vegetaciona sezona. Zarek (2007) navodi da je odnos dužine i širine četina individualna karakteristika i ne može se vezati za određenu populaciju.

Iszkulo i sar. (2009) su proučavali 5 prirodnih populacija tise u Poljskoj i Ukrajini sa ciljem da ustanove razlike između muških i ženskih jedinki. Merili su visinu i prečnik debla jedinki oba pola, zatim dužinu i površinu četina, specifičnu površinu četina, broj redova stoma, gustinu stoma i sadržaj ugljenika i azota. Rezultati su pokazali da su ženske jedinke *Taxus baccata* L. bile značajno niže od muških i imale manji prsni prečnik debla. Ove razlike u rastu između polova su posledica većih energetskih ulaganja ženskih jedinki za proizvodnju semena u odnosu na energetska ulaganje muških jedinki za proizvodnju polena (Krischik i Denno, 1990a; Cipollini i Whigham, 1994; Obeso, 2002; Massei et al., 2006). Međutim, ženske jedinke karakteriše veća dužina i površina četina, kao i gustina stoma. Veći listovi i veća gustina stoma može ukazati na veći intenzitet fotosinteze kod ženskih jedinki (Dawson i Bliss, 1993; Dawson i Ehleringer, 1993).

Shirone i sar. (2010) su opisali preostalih 5 stabala *Taxus baccata* L. na ostrvu Piko (Azorski arhipelag), gde su nekada prirodne populacije tise bile široko rasprostranjene. Autori navode da iako je veličina populacije kritično mala, njeno proučavanje je od velike važnosti za procenu genetičkog diverziteta i filogeografije vrste. Marginalne populacije, kao rezultat činjenice da su opstale u specifičnim ekološkim uslovima, mogu posedovati neuobičajene adaptacije i predstavljati vredne genetičke resurse (Vaxevanidou et al., 2006). U svojoj studiji Shirone i sar. (2010) su obavili morfološke i DNK analize, koje su pokazale da tisa sa Azorskih ostrva predstavlja posebnu evolutivnu liniju u okviru roda *Taxus* L. Autori postavljaju hipotezu da je ova evolutivna linija starija od linije kojoj pripadaju populacije iz Evroazije i Afrike.

Dužina, širina, površina i odnos dužine i širine četina tise sa Azorskih ostrva su značajno manji od opisanih u prethodnim studijama (Di Sapio et al., 2010; Cope, 1998; Mitchell, 1998; Dempsey i Hook, 2000; Hageneder, 2007; Iszkulo et al., 2009). Takođe, utvrđeno je da su navedene morfološke karakteristike značajno manje kod tise sa Azorskih ostrva u odnosu na tisu iz populacije u Italiji (Karpineto Romano). Gustina stoma kod proučavanih jedinki tise sa Azorskih ostrva je značajno veća u odnosu na gustinu stoma u italijanskim populacijama (Karpineto Romano i Rozelo), ali su stome manjih dimenzija. Međutim, ne postoje razlike u ukupnom broju stoma po četini između jedinki sa ostrva Piko i jedinki iz italijanskih populacija. Takođe, gustina stoma u italijanskim populacijama je veća u odnosu na vrednosti zabeležene u literaturi. Kao obrazloženje za to, Shirone i sar. (2010) navode da su u prethodnim studijama uglavnom analizirane populacije iz Centralne Evrope ili izvan Evrope, dok se njihova studija bavi mediteranskim populacijama.

Nadovezujući se na istraživanja Shirone i sar. (2010), Vessella i sar. (2013) su sproveli istraživanje čiji su cilj bile preliminarne morfološke i genetičke karakterizacije tise sa arhipelaga Madeira, gde su nekada prirodne populacije tise bile široko rasprostranjene (zapisi iz 15. i 16. veka). Nakon viševjekovne eksploatacije, tisa je u drugoj polovini 19. veka postala retka vrsta na Madeiri (Lowe, 1857-1872; Taylor, 1882 prema Shirone et al., 2010). Danas se na Madeiri nalaze svega 59 jedinke u 19 mikro-populacija (Vessella et al., 2013).

Vessella i sar. (2013) su poredili morfološke karakteristike tise sa Madeire (dužina, širina, površina i odnos dužine i širine četina) sa literaturnim podacima za tisu sa Azorskih ostrva, Mediterana, kao i iz drugih populacija (Di Sapio et al., 1997; Cope, 1998; Mitchell, 1998; Dempsey i Hook, 2000; Hageneder, 2007; Zarek, 2007; Wyka et al., 2008; Iszkulo et al., 2009; Schirone et al., 2010). Sve navedene morfološke karakteristike imaju značajno manje vrednosti za tisu sa Madeire u poređenju sa ostalim populacijama. PCA i klaster analiza su pokazale da postoje tri grane (aglomerativni koeficijent = 0.93) koje odgovaraju različitim biogeografskim oblastima: Makaroneziji, Mediteranskom basenu i kontinentalnoj Evropi i Velikoj Britaniji (Vessella et al., 2013).

Gustina stoma na jedinkama sa Madeire je značajno manja od gustine stoma koju su Schirone i sar. (2010) zabeležili na Azorskim ostrvima, ali značajno veća od gustine stoma tise sa Mediterana (Vessella et al., 2013). Uzimajući u obzir ukupan broj

stoma po četini, Vessella i sar. (2013) su ustanovili da jedinke sa Madeire imaju značajno manje stoma u odnosu na populacije iz Italije, Evrope i sa Azorskih ostrva. Na osnovu ove karakteristike, tisa sa Madeire se odvaja u odnosu na sve dosadašnje proučavane populacije *Taxus baccata* L. i zauzima intermedijarni položaj sa *Taxus brevifolia* Nutt. (Vessella, 2013). Takođe, dimenzije stoma jedinki sa Madeire su značajno manje od dimenzija stoma jedinki sa Azorskih ostrva i iz Italije, mada su još uvek u opsegu koji su definisali Dempsey i Hook (2000).

Genetičke analize sa plastidnim i nuklearnim molekularnim markerima su pokazale da se tisa sa Madeire, zajedno sa tisom sa Azorskih ostrva, nalazi bliže odvajanju od predačke linije u odnosu na populacije iz mediteranskog i evropskog regiona. Razlike u morfološkim i genetičkim karakteristikama tise sa Makaronezije su verovatno uzrokovane dugoročnom kolonizacijom arhipelaga i izolacijom od kopna (Vessella, 2013). Kako se stepen izolacije između dve populacije povećava i protok gena je ograničen, evolutivne sile deluju u pravcu specijacije (Wright, 1943; Kimura i Weiss, 1964). Studija koju su sprovedi Vessella i sar. (2013) predstavlja osnovu za identifikovanje filo- i fitogeografskog interesa makaronezijskih populacija, i potvrđuje da arhipelazi igraju značajnu ulogu u očuvanju reliktno flore.

2.6.3. Morfološke karakteristike i ekološki faktori

Morfologija i distribucija stoma najviše zavise od genotipa i fenotipske plastičnosti i odražavaju dugoročne adaptacije biljnih vrsta na okruženje (Wang et al., 2014). Pokretanje stoma (otvaranje i zatvaranje) su kratkoročni odgovori na promene faktora sredine (Hetherington i Woodward, 2003; Bresson et al., 2011), ali su gustina i veličina stoma bolji pokazatelji adaptivnih odgovora biljnih vrsta na promene u spoljašnjoj sredini (Wang et al., 2014). Gustina stoma je karakteristika koja više reaguje na promene u spoljašnjoj sredini nego veličina stoma (Premoli i Brewer, 2007; Zhang et al., 2012).

Salisbury (1928) je uradio niz istraživanja na različitim zeljastim vrstama biljaka kojima je hteo da ispita da li se gustina stoma može smatrati adaptivnom karakteristikom. Od spoljašnjih faktora pratio je uticaj osvetljenosti i vlažnosti na gustinu stoma. Rezultati istraživanja sa *Ficaria verna* Huds., *Scilla nutans*, *Circea*

lutetiana L. i *Lepidium sativum* L., pokazuju da je malo verovatno da osvetljenost ima uticaj na gustinu stoma (Salisbury, 1928).

Salisbury (1928) je ispitivao i uticaj vlažnosti staništa na gustinu stoma u nizu eksperimenata sa *Scilla nutans*, *Circea lutetiana* L. i *Epilobium montanum* L. Ustanovljeno je da biljke koje rastu na suvom staništu imaju značajno veću gustinu stoma od biljaka koje rastu na vlažnom staništu i da se ta razlika još uvećava od osnove lista prema vrhu. Ova tvrdnja je potvrđena i eksperimentima sa *Circea lutetiana* L. i *Epilobium montanum* L. Slični eksperimenti izvedeni su sa marginalnim akvatičnim biljkama *Alisma plantago* L., *Veronica anagallis* L. i *Veronica beccabunga* L. koji su pokazali da biljke koje rastu na suvom blatu imaju značajno veći broj stoma po mm² od biljaka koje rastu na vlažnom blatu.

Đukić i Đunisijević (2002) su analizirali stome bukve na Kopaoniku u Srbiji. Utvrđeno je da su stome na staništima na višim nadmorskim visinama koja su suvlja (subalpskija bukva) gušće i manjih dimenzija od onih na nižim nadmorskim visinama u vlažnijim šumskim sastojinama (bukva i jela) (Đukić i Đunisijević, 2002).

Na osnovu navedenog jasno je da se gustina stoma može smatrati ekološkim indikatorom u pogledu vlažnosti sredine (Salisbury, 1928).

Međutim, tačno je da je veličina stoma na listovima koji su izloženi punoj svetlosti manja nego na listovima senke, a veličina stoma kod biljaka na suvim staništima manja nego kod biljaka na vlažnim staništima. Tako je kod *Scilla nutans* preračunata prosečna veličina stominog aparata kod biljaka koje rastu na suvim i vlažnim staništima, a zatim su te vrednosti pomnožene sa ukupnim brojem stoma. Rezultati su pokazali da je ukupna površina stoma samo neznatno veća kod biljaka koje rastu na suvim staništima. Uzimajući u obzir navedeno, Salisbury (1928) zaključuje da se broj stoma po jedinici površine i distribucija stoma ne mogu smatrati adaptivnim karakteristikama u pogledu transpiracije ili asimilacije.

Utvrđeno je da postoji negativna korelacija između veličine lista i gustine stoma. Veći listovi imaju manju gustinu stoma, a manji listovi veću gustinu stoma. Međutim, ove razlike su posledice rasta epidermalnih ćelija i formiranja različitog prostora između stoma, a ne razlika u ukupnom broju stoma (Salisbury, 1928).

Mitchell (1998) je proučavao uticaj osunčanosti i senke na fiziologiju i morfologiju četina kod 5 muških i 5 ženskih jedinki *Taxus brevifolia* Nutt. Takođe,

proučavao je razlike u pogledu adaptacije četina na osunčanost između *Taxus brevifolia* Nutt. i *Taxus baccata* L. Ispitivanjem fiziologije i morfologije četina kod obe vrste, nisu utvrđene razlike između polova u pogledu adaptacije na osvetljenost. Mitchell (1998) je ustanovio da postoje značajne razlike u morfologiji četina koje su izložene suncu i četina u senci kod *Taxus brevifolia* Nutt. Četine koje rastu u senci su duže i imaju veću specifičnu površinu (cm^2/g) od četina koje su izložene suncu. Smanjenje u specifičnoj površini lista javlja se kao odgovor na izlaganje punoj svetlosti sunca i zabeleženo je kod mnogih zimzelenih i listopadnih vrsta tolerantnih na uslove senke, uključujući *Abies amabilis* Douglas ex J.Forbes (Tucker i Emmingham, 1977; Sprugel et al., 1996), *Tsuga heterophylla* (Raf.) Sarg. (Mitchell i Arnott, 1995) i *Acer saccharum* Marshall (Logan i Krotkov, 1968). Iako je gustina stoma (broj stoma po mm^2) značajno veća kod četina koje su izložene suncu nego kod četina u senci, ne postoje razlike u ukupnom broju stoma po četini. Mitchell (1998) zaključuje da je prilagođavanje uslovima svetlosti i senke rezultat promena u rastu četina, a ne promena u inicijaciji i razvoju stoma.

Cedro i Iszkulo (2011) su sprovedi istraživanje u pet prirodnih populacija *Taxus baccata* L. sa ciljem da utvrde razlike u godišnjem prirastu između ženskih i muških jedinki i ispituju uticaj klimatskih faktora (temperature i količine padavina) na rast. Dendrohronološka merenja i analize su pokazale da od perioda dostizanja polne zrelosti (okvirno 10-30 godina) godišnji prirast opada kod ženskih u odnosu na muške jedinke tise. Sa povećanjem starosti populacija tise smanjuje se procenat ženskih jedinki. Verovatno je da usled više stope rasta muških jedinki, ženske jedinke gube u kompeticiji za svetlošću, nutrijentima i vodom, što može dovesti do postepenog nestajanja populacija, naročito u graničnim delovima areala gde su ekološki uslovi nepovoljniji (Iszkulo et al., 2009).

Utvrđeno je da postoji pozitivna korelacija između godišnjeg prirasta (debljine goda) ženskih jedinki sa količinom padavina u junu i julu. To je period intenzivnog rasta za tisu. U tom periodu muške jedinke su završile cvetanje, dok kod ženskih jedinki počinje proces razvoja i sazrevanja semena i arilusa (Cedro i Iszkulo, 2011). Rezultat istraživanja podržava opšte pravilo da su ženske biljke uglavnom zahtevnije u pogledu vlažnosti od muških (Freeman et al., 1976; Iglesias i Bell, 1989; Bertiller et al., 2002). Godišnji prirast ženskih jedinki tise je negativno korelisan sa visokim temperaturama u

avgustu i septembru u prethodnoj godini u većini istraživanih populacija (Cedro i Iszkulo, 2011). To je period sazrevanja semena kod ženskih jedinki i formiranja generativnih pupoljaka kod oba pola (Bugala, 1978). Visoke temperature pogoduju sazrevanju semena, pa ženske jedinke imaju veća energetska ulaganja u reproduktivne procese. Visoka produkcija semena će u narednoj godini rezultirati sporijim rastom (Cedro i Iszkulo, 2011).

U prethodnim studijama utvrđeno je da se kod ženskih jedinki *Acer negundo* L. povećava stopa rasta sa povećanjem količine padavina i dostupne vlage u zemljištu (Ward et al., 2002). Takođe, godišnji rast izdanaka je kod ženskih jedinki *Salix glauca* L. intenzivniji na vlažnijim staništima i ženske jedinke imaju nižu toleranciju na sušu od muških (Dudley, 2006; Dudley i Galen, 2007). Kod *Fraxinus mandshurica* Rupr. je utvrđeno da postoji pozitivna korelacija između godišnjeg prirasta ženskih jedinki sa količinom padavina iz novembra prethodne godine, kao i negativna koralacija između godišnjeg prirasta muških jedinki sa temperaturama iz novembra prethodne godine (Gao et al., 2010).

3. CILJEVI RADA I POLAZNE HIPOTEZE

Empirijska istraživanja su zabeležila negativne genetičke posledice nakon dugogodišnje fragmentacije areala evropskih vrsta drveća uprkos rasipanju semena i polena na velike distance (Thompson, 2005 prema Linares, 2013; Couvet, 2002; Hewitt, 1996). Male i izolovane populacije tise u Evropi se karakterišu smanjenom genetičkom varijabilnošću usled ograničenog protoka gena, inbridinga i genetičkog drifta, zbog čega se njihova adaptivna sposobnost smanjuje, a rizik od iščezavanja povećava (Chybicki et al., 2011; Schirone et al., 2010; González- Martínez et al., 2010; Dubreuil et al., 2010; Myking et al., 2009; Hilfiker et al., 2004; Couvet, 2002).

U Srbiji se prirodne populacije tise nalaze u refugijumima, teško pristupačnim klisurama i kanjonima. Istraživanja ovih populacija sa stanovišta morfologije, hemijskog sastava i genetike su oskudna. Zbog toga je opšti cilj ovog istraživanja formiranje naučne osnove za sprovođenje mera konzervacije populacija ove autohtone, reliktno i strogo zaštićene vrste u Srbiji.

Posebni ciljevi istraživanja su:

- Utvrđivanje sastava i sadržaja etarskog ulja iz četina tise iz prirodnih populacija u Srbiji
- Utvrđivanje međupopulacione varijabilnosti sastava i sadržaja etarskog ulja iz četina tise u Srbiji
- Utvrđivanje razlika u sastavu i sadržaju etarskog ulja između muških i ženskih jedinki tise
- Utvrđivanje zavisnosti sadržaja pojedinih komponenti etarskog ulja tise od temperature vazduha, količine padavina i nadmorske visine
- Utvrđivanje morfoloških karakteristika četina tise iz prirodnih populacija tise u Srbiji
- Utvrđivanje međupopulacione varijabilnosti morfoloških karakteristika tise u Srbiji
- Utvrđivanje razlika u morfološkim karakteristikama između muških i ženskih jedinki tise

- Pozicioniranje populacija tise iz Srbije u odnosu na ostale istraživane populacije u regionu u pogledu morfoloških karakteristika
- Utvrđivanje zavisnosti pojedinih morfoloških karakteristika četina od temperature vazduha, količine padavina i nadmorske visine

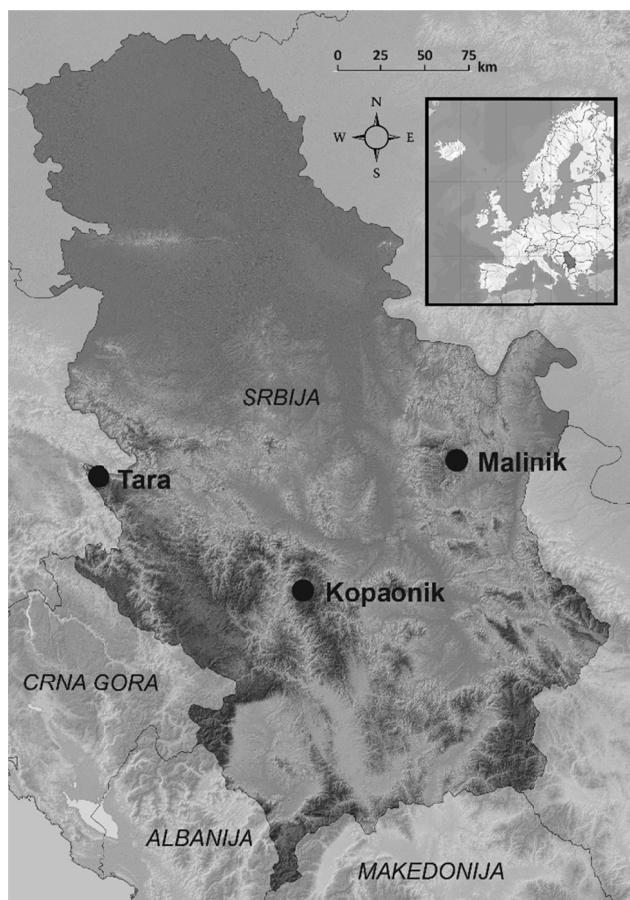
U istraživanjima se pošlo od sledećih hipoteza:

- Prirodne populacije tise u Srbiji se razlikuju prema sastavu i sadržaju etarskog ulja iz četina
- Muške i ženske jedinke tise se razlikuju prema sastavu i sadržaju etarskog ulja iz četina
- Sadržaj pojedinih komponenti etarskog ulja tise zavisi od temperature vazduha, količine padavina i nadmorske visine
- Prirodne populacije tise u Srbiji se razlikuju prema morfološkim karakteristikama četina
- Muške i ženske jedinke tise se razlikuju prema morfološkim karakteristikama četina
- Morfološke karakteristike četina tise zavise od temperature vazduha, količine padavina i nadmorske visine

4. MATERIJAL I METODE

4.1. ISTRAŽIVANE POPULACIJE

U nameri da se obuhvati što širi areal vrste i omogućiti relativno sagledavanje distanci među populacijama odabrane su tri prirodne populacije tise u Srbiji (iz zapadnog, centralnog i istočnog dela teritorije) sa sledećih lokaliteta: Požar (KO Rastište, Nacionalni park Tara), rezervat prirode „Jelak“ (KO Brzeće, Nacionalni park Kopaonik) i spomenik prirode „Lazarev kanjon“ (KO Zlot, planina Malinik). Geografski položaj istraživanih populacija je prikazan na slici br. 3. U daljem tekstu, za navedene populacije će se koristiti nazivi „Tara“, „Kopaonik“ i „Malinik“. Stanišne karakteristike istraživanih populacija su određene na osnovu terenskih istraživanja, kartografskih podataka i literature i prikazane su u tabeli br. 1.



Slika br. 3. Geografski položaj istraživanih populacija *Taxus baccata* L.

Tabela br. 1. Stanišne karakteristike istraživanih populacija *Taxus baccata* L.

Lokalitet/ populacija	Tara	Kopaonik	Malinik
Nadmorska visina	880 - 920 m	1100 - 1300 m	920- 980 m
Geografska širina	43° 57' 20" N	43° 18' 23" N	43° 59' 55" N
Geografska dužina	19° 20' 14" E	20° 51' 23" E	21° 55' 00" E
Ekspozicija	E	E, NE, NW	NW
Nagib	< 30°	30° - 40°	45° - 50°
Podloga	krečnjaci	mermerisani krečnjaci i dolomiti	mermerisani krečnjaci i filiti
Veličina uzorka (broj stabala)	7	22	22
Datum uzorkovanja	8-12.10.2012.	25-26.10.2012.	11-12.10.2013.

Veoma složen reljef planine Tare uslovljava veoma složene mikroekološke uslove koji se manifestuju specifičnim klimatskim, edafskim, orografskim i biljnogeografskim karakteristikama. Klima Nacionalnog parka Tara se karakteriše svežim do prohladnim letom, dosta hladnom zimom i neznatnim godišnjim kolebanjem temperature vazduha. Toplotni uslovi u različitim delovima masiva variraju. Leto se produžava i na prve jesenje mesece, a jesen je u celini toplija od proleća. Padavine su najobilnije u u kasno proleće. Zima ima preko 100 snežnih dana. Sneg počinje da pada početkom novembra (ili ranije), a zadržava se do maja. Ovakav kompleks klimatskih karakteristika određuje režim kontinentalne planinske klime koja se približava subalpskoj. Prosečna godišnja vlažnost vazduha za Taru iznosi 83%, a za jesenje mesece 84.7%. Indeks humidnosti za okolinu Rastišta iznosi 25.0% što je odlika slabije humidne klime. Za Taru nije bilo moguće dobiti klimatske podatke za aktuelan period, pošto je meteorološka stanica na Mitrovcu prestala sa radom. Klimatske karakteristike Tare su opisane za meteorološku stanicu „Mitrovac“ za period od 1954-1973. godine prema Gajić i sar. (1988) i Gajić i sar. (1992).

U zapadnoj Srbiji, na području NP Tara, tisa je retka. Veličinu uzorka od 20 jedinki nije bilo moguće obezbediti na ovom lokalitetu jer su većinom prisutne mlade biljke, bez dovoljno biljne mase i ovakvo uzorkovanje bi ih trajno oštetilo. Istraživanjem je obuhvaćeno 7 jedinki tise (3 ženske i 4 muške). Dva dominantna stabla,

muško i žensko, nalaze se u KO Rastište (mesto Požar) na privatnom posedu Đorđa Milovanovića (Slika br. 4). Pored ova dva, istraživanjem je obuhvaćeno još 5 jedinki u bližoj okolini imanja (u prečniku 1-2 km). Na ovom lokalitetu mlade sadnice tise se razvijaju pored trnovitih žbunova sa sočnim plodovima *Crataegus* spp. i *Rosa* sp. ili uz odrasla stabla *Prunus* sp., koja im omogućavaju potrebnu zaštitu od herbivora i povoljne mikroklimatske uslove za razvoj. Vremenom stabla šljive ili žbunovi počinju da se suše, a tisa postepeno osvaja prostor (Slika br. 5). Takođe, mestimično se mogu zapaziti mlada stabla *Fraxinus excelsior* L., koja će konkurisati tisi u osvajanju prostora.

Vilotić i sar. (2011) navode da je prirodno podmlađivanje tise odlično na ovom lokalitetu, na nadmorskoj visini od 950 m i da bi se u budućnosti, zahvaljujući odgovarajućim mikroklimatskim uslovima i uz stručan nadzor osoblja NP Tara, mogla formirati čista sastojina tise. Zbog toga se u okviru programa zaštite i razvoja NP Tara ovoj populaciji treba posvetiti posebna pažnja. U neposrednoj blizini ove populacije se nalazi Tisovo brdo, čiji toponim podseća da je tisa ovde nekada bila rasprostranjena, po čemu je najverovatnije i ovo brdo dobilo ime (Jovanović et al., 1977).



Slika br. 4. Dva stara stabla tise na privatnom posedu na Tari (Foto: Stefanović, 2013)



Slika br. 5. Kolonizacija tise i sušenje šljive na Tari (Foto: Stefanović, 2013)

Kopaonik ima specifičnu mezoklimu, sa velikom mikroklimatskom diferencijacijom. Kopaonik čini poseban klimatski rejon koji ima prosečno najhladnije i najduže zime u Srbiji, najniže srednje godišnje temperature, veliki broj vedrih dana i prosečno trajanje snežnog pokrivača od 162 dana u godini. Leta na Kopaoniku su prohladna, zime jako hladne, a jesen je toplija od proleća. Najtopliji mesec je jul, a na većim visinama avgust. Najhladniji mesec je januar, dok prosečne mesečne temperature ispod nule na Ravnom Kopaoniku traju od novembra do marta, a na Pančičevom vrhu od novembra do aprila. Godišnja temperaturna amplituda opada sa visinom i na vrhu iznosi 17.6 °C. Vrednost vertikalnog termičkog gradijenta za Kopaonik iznosi prosečno 0.56 °C na svakih 100 m visine. Najveća količina padavina izluči se u junu, julu i avgustu. Prosečna godišnja vlažnost vazduha na Kopaoniku iznosi 79.8%, a najveća je u periodu od novembra do februara (u proseku 82.2%). Klimatske karakteristike Kopaonika su opisane prema podacima Republičkog hidrometeorološkog zavoda Srbije

za meteorološku stanicu „Kopaonik“ za referentni period od 1981-2010. godine (<http://www.hidmet.gov.rs/>) i na osnovu Prostornog plana područja posebne namene Nacionalnog parka „Kopaonik“ („Službeni glasnik RS“, broj 95/09).

U centralnoj Srbiji, u okviru NP Kopaonik, na desnoj strani klisure Brzečke reke nalazi se rezervat prirode „Jelak“. U ovom rezervatu, u zoni bukovo-jelovih šuma, nalazi se tisa kao edifikatorska vrsta zajednice *Taxo-Abieto-Fagetum* ass. nova koju su opisali Obratov-Petković i sar. (2002). U sastav zajednice ulaze 42 vrste. Pored tise, jele i bukve, značajno učešće imaju i *Acer campestre* L., *Rubus idaeus* L., *Sesleria rigida* Heuffel ex Reichenb., *Asperula odorata* L. i *Luzula luzuloides* (Lam.) Dandy & Wilmott. Biološki spektar zajednice određuje je kao hemikriptofitsku, a u analizi areal spektra preovlađuju srednjeevropski florni elementi (Obratov-Petković et al., 2002).

Istraživanjem su obuhvaćene 22 jedinke tise (11 ženskih i 11 muških) iz ove populacije (Slike br. 6 i 7).

Prema izveštaju Republičkog hidrometeorološkog zavoda Republike Srbije, jesen 2012. godine (kada je izvršeno uzorkovanje za populacije Tara i Kopaonik) je bila ekstremno topla, u većini mesta u Srbiji najtoplija od kada postoje meteorološka merenja.



Slika br. 6. Rezervat prirode „Jelak“ na Kopaoniku (Foto: Stefanović, 2012)



Slika br. 7. Šuma tise, jele i bukve u rezervatu prirode „Jelak“ (Foto: Stefanović, 2012)

Planina Malinik pripada umereno kontinentalnom klimatu i zalazi u područje Vlaško-pontijske klime koja se karakteriše najvećim godišnjim amplitudama temperatura vazduha u Srbiji (u proseku 20.1°C). Leta su umereno topla i jesen je toplija od proleća. Najtopliji mesec u godini je jul, a najhladniji januar. Najveće količine padavina izluče se u junu i novembru. Zima ima u proseku 123 snežna dana. Prosečna godišnja vlažnost vazduha na Maliniku iznosi 78.5% i najveća je u periodu od novembra do februara (u proseku 84.9%). Klimatske karakteristike Malinika su opisane prema podacima Republičkog hidrometeorološkog zavoda Srbije za meteorološku stanicu „Crni Vrh“ za referentni period od 1981-2010. godine (<http://www.hidmet.gov.rs/>). Područje Malinika je u dodiru sa Timočkom Krajinom koja predstavlja posebnu florno-vegetacionu celinu sa klimatogenom mešovitom šumom hrastova sa sivim lužnjakom. Utoliko je interesantnija i kontrastnija pojava daleko maritimnije tise u ovim krajevima, koja se ovde javlja kao indikator za specifične stanišne uslove *Fagus moesiaca* (K.Malý) Czeczott. Povoljni mikroklimatski uslovi, pre svega vlažnost vazduha, zatim činioci reljefa (nagib, ekspozicija, nadmorska visina) i bukova šuma sa svojim sklopom stvaraju određene uslove koji pogoduju rastu tise (Stojanović i Jovanović, 1989).

Stojanović i Jovanović (1989) su u okviru proučavanih sastojina bukve sa tisom na Maliniku izdvojili dve ekološke jedinice, i to:

- Planinska šuma bukve i tise sa papratima – *Polypodio-Taxo-Fagetum montanum*, na srednje dubokoj rendzini na mermerisanom krečnjaku
- Planinska šuma bukve – *Fagetum montanum mercurialietosum perennis*, na dubokoj rendzini na mermerisanom krečnjaku i filitu.

Istraživanjem je obuhvaćeno 22 jedinice iz populacije Malinik (11 ženskih i 11 muških) (Slike br. 8 i 9). Prema izveštaju Republičkog hidrometeorološkog zavoda Republike Srbije, jesen 2013. godine (kada je izvršeno uzorkovanje za populaciju Malinik) je bila topla i kišna.



Slika br. 8. Planina Malinik (Foto: Bojović, 2013)



Slika br. 9. Šuma bukve i tise na Maliniku (Foto: Bojović, 2013)

4.2. VELIČINA UZORKA

Izbor reprezentativnog uzorka spada među najvažnije operacije od kojih se sastoji prikupljanje podataka za statističku obradu. Ta se operacija svodi na izbor dela populacije (dela njenih statističkih jedinica-elemenata) na kojem će se obaviti istraživanje (u konkretnom slučaju elementi su stabala tise sa kojih će se sakupiti grane sa četinama). Broj jedinica koje obezbeđuju reprezentativan uzorak je od velikog značaja (Eng, 2003), posebno kada su u pitanju retke i ugrožene vrste drveća, kao što je *Taxus baccata* L. Potrebno je odrediti dovoljno reprezentativan uzorak i ne povećavati ga suviše, jer bi to povećalo ekonomske troškove istraživanja. Stefanović et al. (2013) su sprovedli istraživanje da odrede dovoljnu veličinu uzorka za istraživanja varijabilnosti sadržaja etarskog ulja. Istraživanje je bazirano na rezultatima ranijih istraživanja varijabilnosti sadržaja 19 jedinjenja iz etarskog ulja *Pinus heldreichii* Christ (Bojović et al., 2011). Utvrđeno je da bi uzorak za ovakav tip istraživanja trebalo da sadrži 20 jedinki da bi srednja vrednost izračunata iz njega reprezentovala osnovni skup sa

verovatnoćom većom od 95% (Stefanović et al., 2013). Veličina uzorka za svaku populaciju prikazana je u Tabeli 1.

4.3. EKSTRAKCIJA ETARSKOG ULJA

Ekstrakcija etarskog ulja iz četina tise je obavljena postupkom destilacije vodenom parom po Clevenger-u na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu. Sa svakog od 47 stabala iz tri populacije prikupljeno je oko 1200 g grančica sa četinama. Uzorci su do ekstrakcija čuvani u zamrzivaču na temperaturi od -20°C. Grančice i četine su pre ekstrakcije usitnjene na delove veličine oko 5 mm. Za svaki uzorak urađene su 4 sukcesivne ekstrakcije od po 300 g u trajanju od 3 sata. U izolovano ulje dodat je rastvarač pentan i rastvor profiltriran preko anhidrovanog natrijum sulfata. Ratsvoreno ulje čuvano je u vialama na temperaturi od 4°C do gasno hromatografske analize.

4.4. ISPITIVANJE SASTAVA I SADRŽAJA ETARSKOG ULJA

Sastav etarskog ulja tise ispitan je gasnom hromatografijom (GC-FID) i kombinacijom gasne hromatografije i masene spektrometrije (GC-MS) na Institutu za lekovito bilje „Josif Pančić“ u Beogradu. Za gasno hromatografsku analizu korišćen je gasni hromatograf Agilent Technologies, model 7890A, sa plamenojonizacionim detektorom (FID), kolonom HP-5 (30 m x 0.32 mm, debljina filma 0.25 mikrometara), injektorom sa split/splitless režimom injektovanja i autosemplerom. Gasna hromatografska analiza je izvedena pod sledećim uslovima: protok nosećeg gasa (H₂) je 1 ml/min, temperatura injektora 250°C, detektora 300°C, dok je temperatura kolone linearno programirana od 40- 260°C (4°C/min). Navedeni analitički uslovi su korišćeni i u GC-MS analizama, sa kolonom HP-5MS (30 m x 0.25 mm, debljina filma 0.25 mikrometara) na HP G 1800C Series II GCD sistemu. Umesto vodonika, korišćen je helijum kao noseći gas.

Za identifikaciju komponenata etarskog ulja korišćeni su programi Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS ver. 2.1.) i Agilent Technologies ChemStation, biblioteke Wiley275 i NIST/NBS, kao i poređenje

retencionih indeksa sa literaturnim vrednostima (Adams, 2001). Nakon identifikacije komponenta pristupilo se određivanju njihove procentualne zastupljenosti. Za svaki uzorak, određena je procentualna zastupljenost komponenti na osnovu površine pikova hromatograma u Microsoft Office Excel-u.

4.5. ISPITIVANJE MORFOLOŠKIH KARAKTERISTIKA ČETINA

Za ispitivanje morfoloških karakteristika *Taxus baccata* L. uzorci su prikupljeni sa 51 jedinke iz tri prirodne populacije u Srbiji, koje su obuhvatile 47 jedinki kod kojih je ispitan sastav etarskog ulja i po dve dodatne jedinke iz populacija Kopaonik i Malinik. Grančice sa četinama su uzorkovane iz donjeg i središnjeg dela krune, ravnomerno sa svih strana.

Dužina, širina i površina četine merene su na po 50 dvogodišnjih četina sa svake jedinke (ukupno na 2550 četina). Četine su skenirane i izmerene u programu ImageJ.

Specifična površina četine predstavlja odnos između površine četine i suve mase četine. Za svako stablo određena je prosečna specifična površina četine. Na analitičkoj vagi izmerena je masa 50 suvih četina za svako stablo, čije su površine prethodno izračunate. Zatim je zbir površina četina podeljen sa suvom masom četina da bi se dobila vrednost prosečne specifične površine četine za određenu jedinku.

Broj redova stoma na jednoj polovini naličja četine i gustina stoma mereni su uz pomoć svetlosnog mikroskopa „Leica Galen III“ sa kamerom „Topica TP - 5001“ (sa objektivom uvećanja 10x) na Institutu za šumarstvo u Beogradu. Broj redova stoma na jednoj polovini četine meren je sa po dva ponavljanja na 10 dvogodišnjih četina sa svakog stabla (ukupno 1020 snimaka). Gustina stoma je merena sa po tri ponavljanja na 10 dvogodišnjih četina sa svakog stabla (ukupno 1530 snimaka).

Površina četina snimljena je na skenirajućem elektronskom mikroskopu Jeol JSM-6390LV sa uvećanjima 150x i 1200x u laboratoriji Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. Pre snimanja uzorci su napareni zlatom na uređaju BAL-TEC SCD 005 Sputter Coater (pritisk u komori 2.5×10^{-1} mbar, struja naparavanja 30 mA i vreme 100 sekundi).

4.6. STATISTIČKA ANALIZA

Za svaku proučavanu varijablu izračunata je deskriptivna statistika i proverena normalnost distribucije χ^2 testom. Za poređenje srednjih vrednosti ispitivanih varijabli korišćeni su t-test i ANOVA sa post-ANOVA Bonferroni testom (parametarski testovi). Za poređenje medijana ispitivanih svojstava korišćeni su Mann Whitney U test i Kruskal-Wallis test (neparametarski testovi).

Za vizuelizaciju grupisanja i odnosa jedinki na osnovu hemijskih ili morfoloških karakteristika korišćene su analiza glavne komponente, klaster analiza i kanonijska diskriminaciona analiza. Njima je prethodila korelaciona analiza u cilju eliminisanja visokokorelisanih varijabli, kao i logaritamske transformacije. Klaster analizi je prethodila standardizacija varijabli. Isprobano je više metoda klaster analize (i više distanci): „Average Linkage“ (*Euclidean distance* i *Squared Euclidean distance*)“, „Single Linkage“ (*Euclidean distance* i *Squared Euclidean distance*)“, „Ward's Linkage“ (*Euclidean distance* i *Squared Euclidean distance*)“, a u radu su prikazane neke od njih.

Linearna zavisnost istraživanih parametara i bioklimatskih varijabli ispitana je prostom linearnom regresijom.

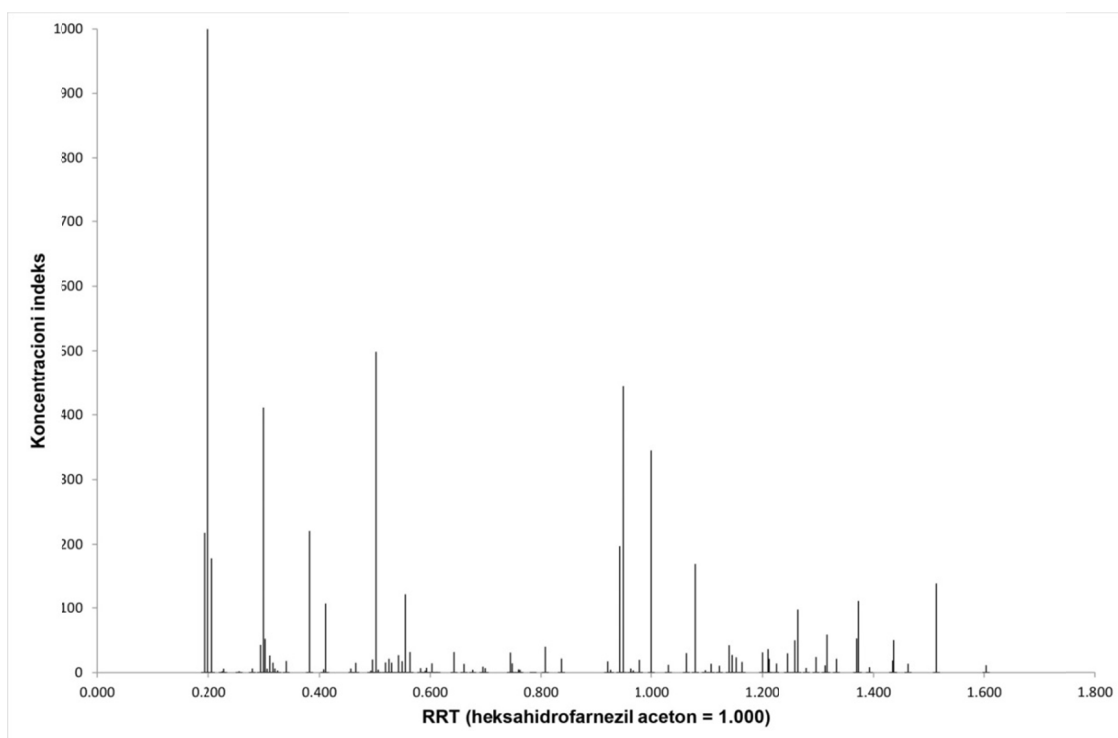
Statistička obrada podataka rađena je u programima: STATISTICA 10, STATA 12 i Microsoft EXCEL 2010.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

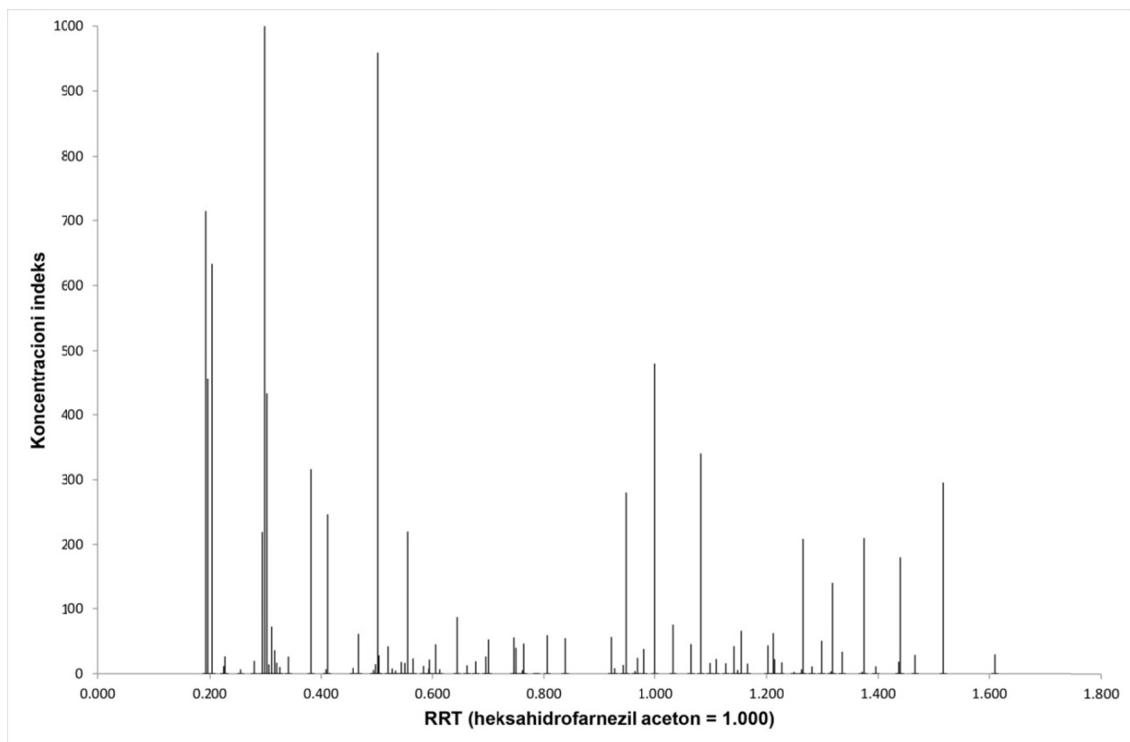
5.1. REZULTATI ISPITIVANJA ETARSKOG ULJA IZ ČETINA TISE

5.1.1. Hemijski sastav etarskog ulja iz četina tise

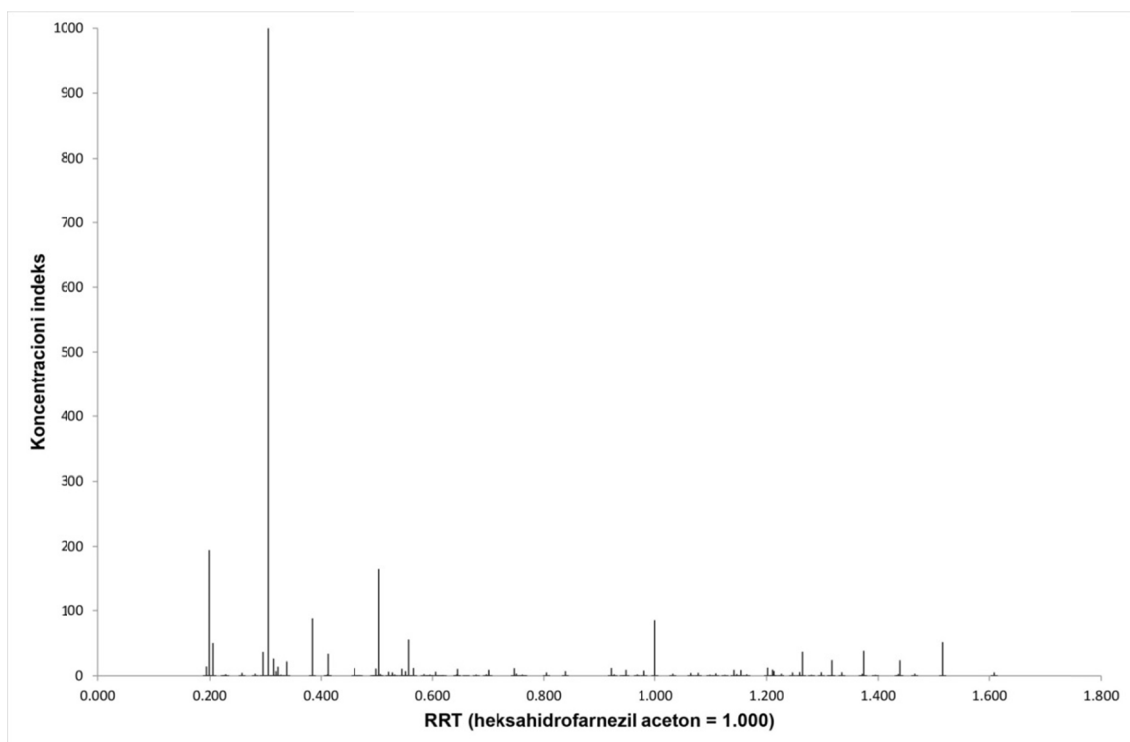
Hemijski sastav etarskog ulja iz četina *Taxus baccata* L. prikazan je u tabeli br. 2 i tabeli br. 3. U etarskom ulju 47 jedinki tise iz tri prirodne populacije u Srbiji detektovana je 91 komponenta, od kojih je 87 identifikovano. Na slikama br. 10, 11 i 12 su prikazani normalizovani hromatogrami etarskih ulja za referentne uzorke iz tri prirodne populacije. Ovi hromatogrami prikazuju koncentracione indekse hemijskih komponenata etarskog ulja u zavisnosti od retencionih vremena. Kao referentno jedinjenje za određivanje relativnih retencionih vremena izabran je heksahidrofarnezil acetone.



Slika br. 10. Normalizovani hromatogram etarskog ulja referentnog uzorka za populaciju Tara



Slika br. 11. Normalizovani hromatogram etarskog ulja referentnog uzorka za populaciju Kopaonik



Slika br. 12. Normalizovani hromatogram etarskog ulja referentnog uzorka za populaciju Malinik

U sastavu etarskog ulja preovlađuju alifatični alkoholi (43.31%), zatim ukupni terpeni (19.34%), alifatični ugljovodonici (13.18%) i alifatični aldehidi (11.09%) (Tabela br. 3 i slika br. 13). Ketoni, masne kiseline, derivati karotenoida, estri i aromatična jedinjenja zastupljeni su u manjem procentu. Neidentifikovana jedinjenja čine 1.96% ulja.

U populaciji Tara, najzastupljenije klase jedinjenja su alifatični alkoholi (30.77%), alifatični ugljovodonici (17.79%) i oksigenovani monoterpeni (16.75%) (Slika br. 14). U populaciji Kopaonik, preovlađuju alifatični alkoholi (40.97%), oksigenovani monoterpeni (15.32%) i alifatični aldehidi (13.29%) (Slika br. 15). U populaciji Malinik, 50.05% etarskog ulja čine alifatični alkoholi, 14.64% alifatični ugljovodonici i 11.70% oksigenovani monoterpeni (Slika br. 16).

Najzastupljenija terpenska frakcija za sve tri populacije su oksigenovani monoterpeni (13.99%). Ukupni monoterpeni (ugljovodonični i oksigenovani) čine 14.41%, a ukupni seskviterpeni (ugljovodonični i oksigenovani) čine 2.31% etarskog ulja tise. U populaciji Tara, ukupni monoterpeni čine 17.53% (od toga 16.75% oksigenovani i 0.78% ugljovodonični), dok ukupni seskviterpeni čine 4.41% etarskog ulja (od toga 3.74% oksigenovani i 0.67% ugljovodonični) (Slika br. 14). U populaciji Kopaonik, ukupni monoterpeni čine 16.01% ulja (od toga 15.32% oksigenovani i 0.69% ugljovodonični). Ukupni seskviterpeni su zastupljeni u procentu od 2.63% (od toga 2.19% oksigenovani i 0.44% ugljovodonični) (Slika br. 15). U populaciji Malinik, ukupni monoterpeni čine 11.94% (od toga 11.70% oksigenovani i 0.24% ugljovodonični), dok ukupni seskviterpeni čine 1.27% etarskog ulja (od toga 0.99% oksigenovani i 0.28% ugljovodonični) (Slika br. 16).

U prirodnim populacijama tise u Srbiji najzastupljenija jedinjenja su alifatični alkoholi 1-okten-3-ol (23.48%) i (Z)-3-heksenol (11.46%), kao i oksigenovani monoterpen mirtenol (11.38%). U svim populacijama najzastupljenija isparljiva komponenta je 1-okten-3-ol. U populaciji Tara, 1-okten-3-ol čini 15.56%, (Z)-3-heksenol čini 6.84% i mirtenol 13.30% etarskog ulja. U populaciji Kopaonik, 1-okten-3-ol, (Z)-3-heksenol i mirtenol su zastupljeni u procentima od 27.55%, 4.77% i 12.88%, respektivno, dok su u populaciji Malinik navedene komponente zastupljene u procentima od 22.18%, 19.78% i 9.22%, respektivno (Slika br. 17).

Srednje visok sadržaj od 0.5 do 10.0% (Nikolić, 2008) ima 26 jedinjenja. U procentu od 0.1 do 0.5% zastupljeno je 52 jedinjenja. U tragovima, manje od 0.1% (Lieutier et al., 1991; Rajčević et al., 2013; Venditti et al., 2013), zastupljeni su *n*-nonan, benzaldehid, 2-pentil furan, *n*-hexil acetat, β -linalol, mirtenil acetat, eugenol, *p*-menta-1,4-dien-7-ol, miristinska kiselina i 1-tetrakozen.

U uzorcima sa Tare, ispod praga detekcije bili su: benzaldehid, metil salicilat, *p*-menta-1,4-dien-7-ol i eugenol. Ispod praga detekcije u uzorcima sa Kopaonika bili su: benzaldehid, *p*-menta-1,4-dien-7-ol i eugenol, a u uzorcima sa Malinika: β -pinen i miristinska kiselina.

Tabela br. 3. Sadržaj različitih klasa jedinjenja u etarskom ulju *Taxus baccata* L.

Klasa jedinjenja	Tara I	Kopaonik II	Malinik III	I-III
	Sadržaj	Sadržaj	Sadržaj	Prosečan
	[%]	[%]	[%]	sadržaj *
Ugljovodonični monoterpeni	0.78	0.69	0.24	0.51
Oksigenovani monoterpeni	16.75	15.32	11.70	13.99
Ugljovodonični seskviterpeni	0.67	0.44	0.28	0.40
Oksigenovani seskviterpeni	3.74	2.19	0.99	1.91
Ugljovodonični diterpeni	1.21	0.56	0.52	0.64
Oksigenovani diterpeni	2.47	1.65	1.90	1.88
Ukupni terpeni	25.63	20.85	15.63	19.34
Derivati karotenoida	0.66	1.02	1.13	1.01
Alifatični aldehidi	12.58	13.29	8.36	11.09
Alifatični alkoholi	30.77	40.97	50.05	43.31
Alifatični ugljovodonic	17.79	10.10	14.64	13.18
Masne kiseline	1.79	3.34	0.21	1.78
Estri	0.53	0.22	0.38	0.33
Ketoni	6.75	8.33	6.54	7.33
Aromatična jedinjenja	0.00	0.03	0.50	0.23
Ostalo	0.69	0.44	0.32	0.43
Neidentifikovana jedinjenja	2.81	1.40	2.22	1.96
Ukupno	100	100	100	100

* Prosečan sadržaj određenih klasa jedinjenja predstavlja srednju vrednost izračunatu na osnovu procentualne zastupljenosti komponenti za svih 47 uzoraka iz tri populacije

Tabela br. 2. Hemijski sastav etarskog ulja iz četina *Taxus baccata* L.

R. br.	Komponente *	Tara I		Kopaonik II		Malinik III		I-III
		KIE	Sadržaj [%]	KIE	Sadržaj [%]	KIE	Sadržaj [%]	Prosečan sadržaj [%]**
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	(E)-2-Heksenal	861.4	3.62 (2.82)	861.2	2.88 (2.84)		0.75 (0.54)	2.08 (2.43)
2	(Z)-3-Heksenol	867.6	6.84 (5.61)	865.8	4.77 (5.94)	862.5	19.78 (7.05)	11.46 (9.59)
3	n-Heksanol	876.8	2.47 (1.28)	876.2	3.91 (2.66)	870.6	3.09 (1.38)	3.35 (2.05)
4	<i>n</i> -Nonan	897.5	0.06 (0.05)	897.1	0.08 (0.06)	891.1	0.05 (0.08)	0.06 (0.07)
5	Heptanal	904.4	0.11 (0.04)	901.5	0.18 (0.08)	893.6	0.09 (0.10)	0.13 (0.10)
6	α -Pinen	928.3	0.09 (0.07)	927.7	0.26 (0.46)	920.3	0.13 (0.06)	0.18 (0.31)
7	Benzaldehid		0.00 (0.00)		0.00 (0.00)	952.6	0.09 (0.04)	0.04 (0.05)
8	β -Pinen	970.1	0.20 (0.09)	970.1	0.17 (0.06)		0.00 (0.00)	0.10 (0.10)
9	1-Okten-3-on	977.6	0.59 (0.35)	976.3	1.56 (0.71)	969.8	0.84 (0.56)	1.11 (0.72)
10	1-Okten-3-ol	981.5	15.56 (9.92)	980.7	27.55 (12.69)	993.1	22.18 (12.23)	23.48 (12.59)
11	3-Oktanone	985.1	0.49 (0.34)	984.6	1.49 (1.83)	991.1	0.43 (0.52)	0.89 (1.33)
12	2-Pentil furan	989.6	0.24 (0.16)	989.1	0.11 (0.10)	976.8	0.01 (0.02)	0.08 (0.12)
13	3-Oktanol	998.4	0.22 (0.21)	997.0	0.54 (0.42)	999.6	0.45 (0.31)	0.45 (0.36)
14	<i>n</i> -Oktanal	1003.7	0.31 (0.10)	1002.3	0.36 (0.16)	1002.2	0.20 (0.12)	0.28 (0.15)
15	(Z)-3-Hexenil acetat	1010.2	0.31 (0.17)	1007.7	0.08 (0.14)	1004.9	0.19 (0.20)	0.16 (0.19)
16	<i>n</i> -Hexil acetat	1014.1	0.14 (0.11)	1014.0	0.09 (0.04)	1010.5	0.05 (0.02)	0.08 (0.06)
17	Limonen	1024.6	0.49 (0.30)	1024.1	0.26 (0.14)	1017.8	0.11 (0.23)	0.23 (0.24)
18	n-Oktanol	1072.9	4.23 (1.21)	1072.5	3.40 (0.74)	1074.0	3.42 (1.06)	3.53 (0.99)
19	β -Linalol	1102.0	0.12 (0.05)	1100.8	0.09 (0.13)	1097.1	0.06 (0.08)	0.08 (0.10)
20	n-Nonanal	1102.8	1.74 (0.91)	1102.3	4.10 (2.38)	1099.7	1.90 (0.86)	2.81 (2.00)
21	(Z)-3-Nonen-1-ol	1158.7	0.23 (0.14)	1158.0	0.15 (0.13)	1152.2	0.27 (0.25)	0.21 (0.20)
22	Borneol	1164.9	0.17 (0.12)	1164.7	0.24 (0.19)	1159.9	0.08 (0.06)	0.17 (0.16)
23	α -Terpineol	1197.2	0.08 (0.10)	1190.3	0.15 (0.18)	1183.8	0.09 (0.11)	0.12 (0.14)
24	Mirtenal	1193.4	0.35 (0.39)	1192.6	0.39 (0.44)	1186.7	0.06 (0.08)	0.25 (0.36)
25	Metil salicilat		0.00 (0.00)	1200.7	0.03 (0.14)	1187.5	0.31 (0.30)	0.15 (0.26)
26	Mirtenol	1197.2	13.30 (8.60)	1196.1	12.88 (7.32)	1197.0	9.22 (7.62)	11.38 (7.70)

27	<i>n</i> -Dekanal	1204.5	0.21 (0.16)	1204.2	0.46 (0.32)	1200.1	0.43 (0.28)	0.41 (0.29)
28	β -Ciklocitral	1218.1	0.28 (0.09)	1217.4	0.34 (0.09)	1212.5	0.20 (0.08)	0.27 (0.11)
29	Nerol	1232.1	0.71 (0.49)	1232.5	0.17 (0.15)	1225.2	0.50 (0.46)	0.39 (0.41)
30	(<i>Z</i>)-3-Heksenil-3-metil butanoat	1235.3	0.08 (0.09)	1234.8	0.05 (0.03)	1229.1	0.15 (0.16)	0.10 (0.12)
31	N.k. 1	1254.3	0.89 (0.35)	1253.8	0.69 (0.36)	1247.8	1.14 (0.85)	0.91 (0.64)
32	Geraniol	1257.1	1.37 (1.30)	1256.5	0.61 (0.47)	1254.0	0.94 (0.83)	0.86 (0.82)
33	(<i>E</i>)-2-Decenal	1260.9	2.88 (1.10)	1260.4	2.33 (0.73)	1258.1	2.44 (0.73)	2.46 (0.79)
34	<i>n</i>-Dekanol	1275.5	0.95 (0.42)	1274.4	0.55 (0.21)	1269.5	0.68 (0.33)	0.66 (0.32)
35	Tridekan	1296.2	0.16 (0.07)	1295.7	0.15 (0.06)	1289.9	0.10 (0.03)	0.13 (0.06)
36	Perila alkohol	1300.5	0.13 (0.16)	1300.5	0.38 (0.30)	1295.2	0.39 (0.43)	0.34 (0.36)
37	Undekanal	1307.5	0.12 (0.05)	1305.3	0.26 (0.15)	1299.1	0.14 (0.06)	0.19 (0.12)
38	N.k. 2	1313.2	0.26 (0.08)	1312.5	0.41 (0.22)	1306.4	0.25 (0.06)	0.32 (0.17)
39	Mirtenil acetat	1324.0	0.22 (0.28)	1322.6	0.06 (0.04)	1316.2	0.05 (0.03)	0.08 (0.12)
40	Eugenol		0.00 (0.00)		0.00 (0.00)	1326.4	0.10 (0.06)	0.04 (0.06)
41	<i>p</i> -Menta-1,4-dien-7-ol		0.00 (0.00)		0.00 (0.00)	1353.3	0.12 (0.10)	0.05 (0.08)
42	(<i>E</i>)-2-Undecenal	1365.0	0.68 (0.24)	1363.3	0.53 (0.30)	1356.5	0.47 (0.13)	0.53 (0.24)
43	(<i>E</i>)- β -Damascenon	1382.7	0.12 (0.07)	1381.7	0.13 (0.09)	1375.1	0.07 (0.05)	0.10 (0.08)
44	Tetradekan	1396.2	0.11 (0.07)	1395.9	0.15 (0.10)	1389.0	0.09 (0.03)	0.12 (0.08)
45	(<i>E</i>)-Kariofilen	1413.9	0.18 (0.23)	1413.9	0.21 (0.16)	1405.7	0.06 (0.04)	0.14 (0.15)
46	(<i>E</i>)- α -Jonon	1426.0	0.14 (0.09)	1425.0	0.37 (0.21)	1418.5	0.43 (0.16)	0.36 (0.20)
47	(<i>E</i>)-β-Jonon	1484.3	0.40 (0.19)	1483.5	0.52 (0.18)	1477.3	0.63 (0.22)	0.55 (0.21)
48	Pentadekan	1495.9	0.23 (0.09)	1495.2	0.25 (0.18)	1488.3	0.17 (0.09)	0.21 (0.14)
49	(<i>E,E</i>)- α -Farnezen	1506.5	0.15 (0.23)	1504.8	0.16 (0.15)	1498.0	0.14 (0.07)	0.15 (0.14)
50	Tridekanal	1510.0	0.23 (0.22)	1508.2	0.22 (0.27)	1500.5	0.05 (0.05)	0.15 (0.21)
51	(<i>Z</i>)- α -Bisabolen	1539.9	0.34 (0.81)	1539.2	0.06 (0.09)	1531.6	0.07 (0.06)	0.11 (0.31)
52	Kariofilen oksid	1579.0	0.67 (0.41)	1578.6	0.56 (0.46)	1569.8	0.29 (0.18)	0.46 (0.38)
53	Tetradekanal	1611.2	0.43 (0.22)	1609.8	0.63 (0.41)	1601.6	0.49 (0.30)	0.54 (0.35)
54	Heptadekan	1695.4	0.35 (0.16)	1694.9	0.60 (0.36)	1686.7	0.75 (0.40)	0.63 (0.37)
55	Pentadekanal	1712.4	0.12 (0.08)	1711.3	0.11 (0.08)	1703.4	0.12 (0.06)	0.12 (0.07)
56	N.k. 3	1738.7	0.88 (1.33)	1738.7	0.19 (0.15)	1728.6	0.20 (0.28)	0.30 (0.58)
57	Junicedranol	1744.0	3.07 (2.62)	1743.5	1.63 (1.54)	1734.0	0.70 (0.75)	1.45 (1.66)
58	Miristinska kiselin	1776.0	0.09 (0.04)	1776.4	0.04 (0.02)		0.00 (0.00)	0.03 (0.04)
59	Oktadekan	1795.6	0.19 (0.15)	1795.2	0.27 (0.22)	1786.2	0.21 (0.14)	0.23 (0.18)

60	Heksadekanal	1814.2	0.44 (0.24)	1813.6	0.37 (0.23)	1804.8	0.35 (0.17)	0.37 (0.21)
61	Heksahidrofarnezil aceton	1843.4	5.67 (2.62)	1842.4	5.28 (3.93)	1838.9	5.27 (2.91)	5.33 (3.28)
62	Nonadekan	1894.4	0.31 (0.10)	1894.4	0.56 (0.35)	1886.0	0.39 (0.37)	0.45 (0.34)
63	Izofitol	1944.8	0.41 (0.21)	1944.7	0.30 (0.21)	1935.6	0.25 (0.14)	0.30 (0.19)
64	Palmitinska kiselina	1974.6	1.70 (0.96)	1975.8	3.30 (3.64)	1967.6	0.21 (0.16)	1.75 (2.77)
65	Eikozan	1994.4	0.13 (0.07)	1994.8	0.14 (0.10)	1985.5	0.09 (0.05)	0.12 (0.08)
66	13-epi-Manol oksid	2006.0	0.28 (0.14)	2006.3	0.28 (0.23)	1993.4	0.21 (0.10)	0.25 (0.17)
67	Oktadekanal	2017.5	0.42 (0.38)	2016.7	0.14 (0.13)	2006.8	0.15 (0.12)	0.19 (0.20)
68	Abietatrien	2049.8	1.21 (1.22)	2050.2	0.56 (0.46)	2039.2	0.52 (0.32)	0.64 (0.62)
69	<i>n</i> -Oktadekanol	2081.7	0.28 (0.18)	2082.4	0.10 (0.09)	2073.9	0.19 (0.08)	0.16 (0.12)
70	Heneikozan	2094.8	0.60 (0.49)	2094.9	0.46 (0.29)	2086.1	0.60 (0.32)	0.54 (0.34)
71	Fitol	2111.1	0.79 (0.67)	2111.3	0.65 (1.34)	2101.8	1.02 (2.20)	0.83 (1.68)
72	Sandarakopimarinal	2178.1	0.83 (0.94)	2178.3	0.32 (0.26)	2164.8	0.33 (0.28)	0.40 (0.46)
73	1-Dokozen	2189.3	0.86 (0.50)	2189.7	0.37 (0.23)	2179.7	0.59 (0.34)	0.53 (0.36)
74	Dokozan	2194.4	0.83 (0.83)	2195.0	0.27 (0.20)	2185.6	0.36 (0.32)	0.39 (0.43)
75	Eikozanal	2221.1	0.23 (0.08)	2221.5	0.14 (0.08)	2210.3	0.16 (0.08)	0.16 (0.08)
76	N.k. 4	2259.2	0.78 (0.46)	2260.1	0.11 (0.07)	2249.3	0.63 (0.45)	0.43 (0.44)
77	1-Trikozen	2285.2	0.60 (0.34)	2285.4	0.15 (0.15)	2276.5	0.57 (0.33)	0.39 (0.34)
78	Trikozan	2294.9	2.14 (0.97)	2295.2	1.23 (0.79)	2286.7	2.23 (1.28)	1.79 (1.14)
79	<i>trans</i> -Feruginol	2326.9	0.17 (0.08)	2328.2	0.09 (0.07)	2315.7	0.09 (0.04)	0.10 (0.07)
80	4,8,12,16-Tetrametilheptadekan-4-olid	2350.5	0.46 (0.23)	2350.3	0.33 (0.25)	2338.6	0.31 (0.19)	0.34 (0.22)
81	1-Tetrakozen	2389.2	0.13 (0.06)	2389.7	0.04 (0.02)	2378.4	0.12 (0.07)	0.09 (0.06)
82	Tetrakozan	2394.6	1.45 (0.71)	2395.0	0.62 (0.40)	2386.6	1.30 (0.73)	1.03 (0.70)
83	Dokozanal	2425.2	0.47 (0.37)	2425.3	0.26 (0.15)	2413.6	0.30 (0.16)	0.30 (0.21)
84	1-Pentakozen	2489.1	0.69 (0.34)	2490.0	0.18 (0.44)	2480.3	0.53 (0.54)	0.40 (0.50)
85	Pentakozan	2494.7	2.76 (1.54)	2495.2	1.22 (0.67)	2486.8	1.99 (1.20)	1.77 (1.18)
86	Trikozanoal	2527.9	0.23 (0.17)	2527.9	0.09 (0.06)	2514.8	0.10 (0.06)	0.11 (0.09)
87	1-Heksakozen	2589.5	0.22 (0.12)	2590.1	0.15 (0.09)	2577.9	0.25 (0.15)	0.20 (0.13)
88	Heksakozan	2593.9	1.94 (1.14)	2594.7	1.08 (0.78)	2584.5	1.37 (0.69)	1.33 (0.84)
89	Tetrakozanoal	2629.1	0.36 (0.29)	2629.3	0.24 (0.14)	2616.6	0.21 (0.12)	0.25 (0.17)
90	Heptakozan	2694.7	3.49 (1.90)	2694.4	1.97 (1.31)	2685.3	2.65 (1.43)	2.49 (1.52)
91	Oktakozan	2793.6	0.56 (0.34)	2794.7	0.17 (0.12)	2779.6	0.25 (0.15)	0.26 (0.22)
Ukupno [%]			100		100		100	100

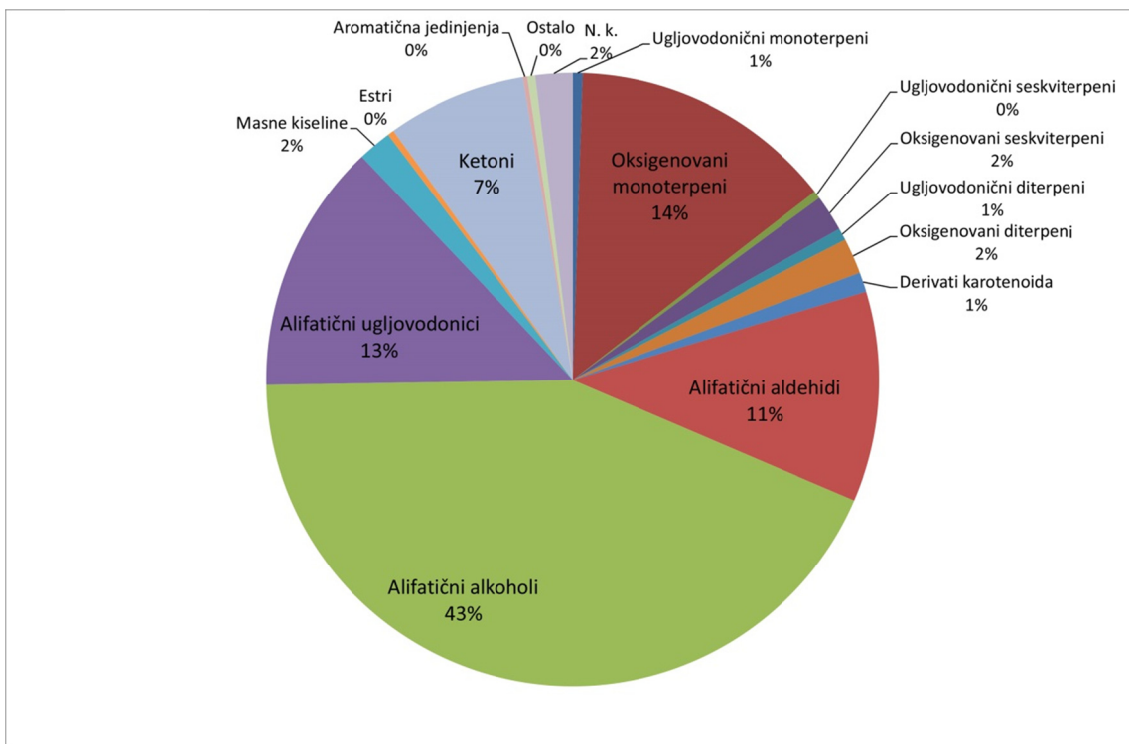
KIE = Kovačev (retencioni) indeks eksperimentalno određen

Sadržaj [%] = procentualni sadržaj odgovarajućih komponenata: aritmetička sredina ($\pm S$)

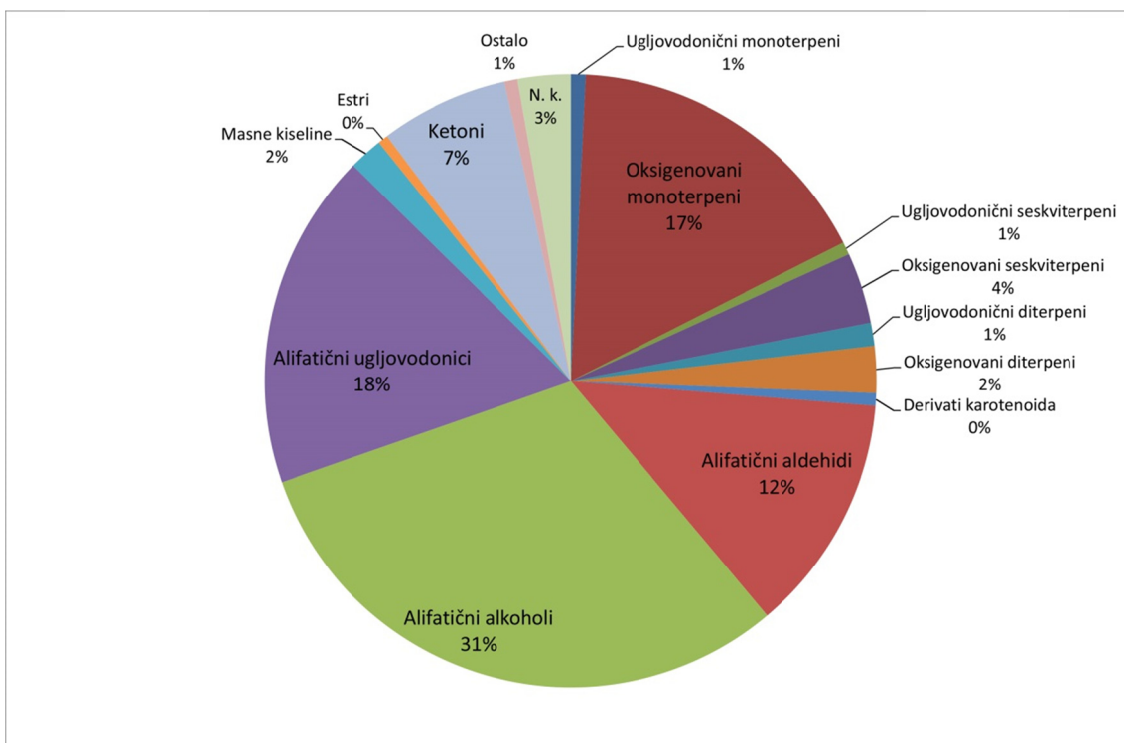
N.k. = neidentifikovana komponenta

* Komponente označene bold-om su izabrane za analizu glavnih komponenti i kanonijsku diskriminacionu analizu

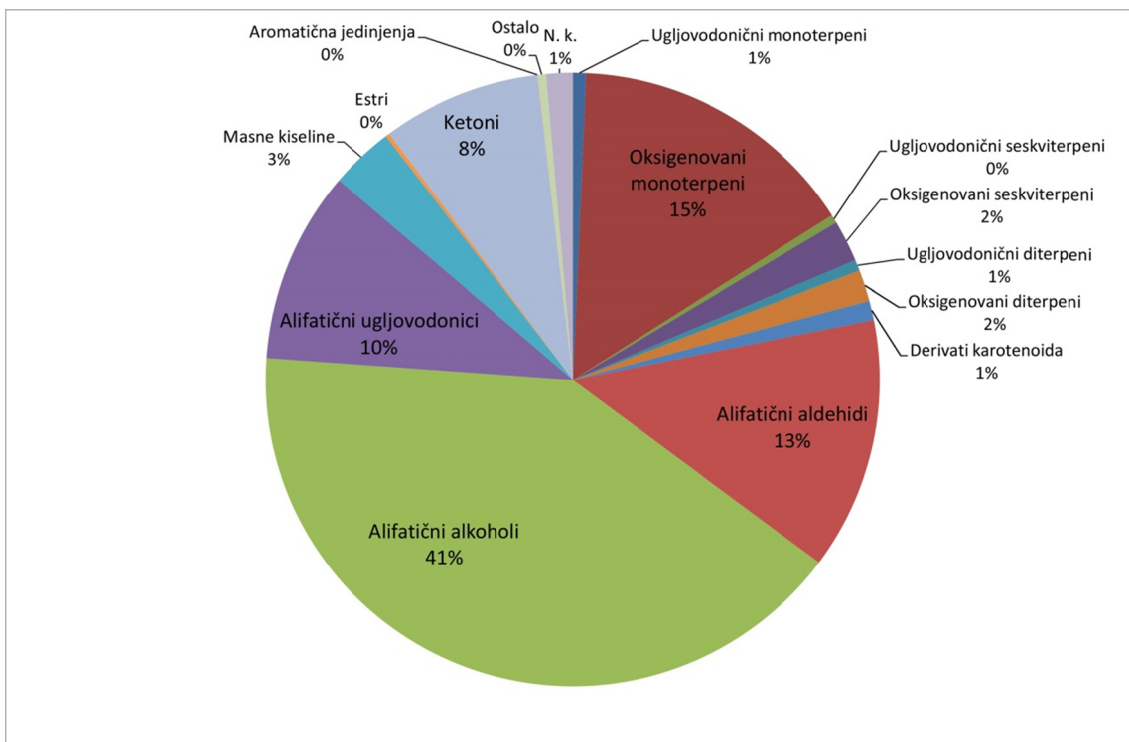
** Prosečan sadržaj predstavlja srednju vrednost izračunatu na osnovu procentualne zastupljenosti komponenti za svih 47 uzoraka iz tri populacije



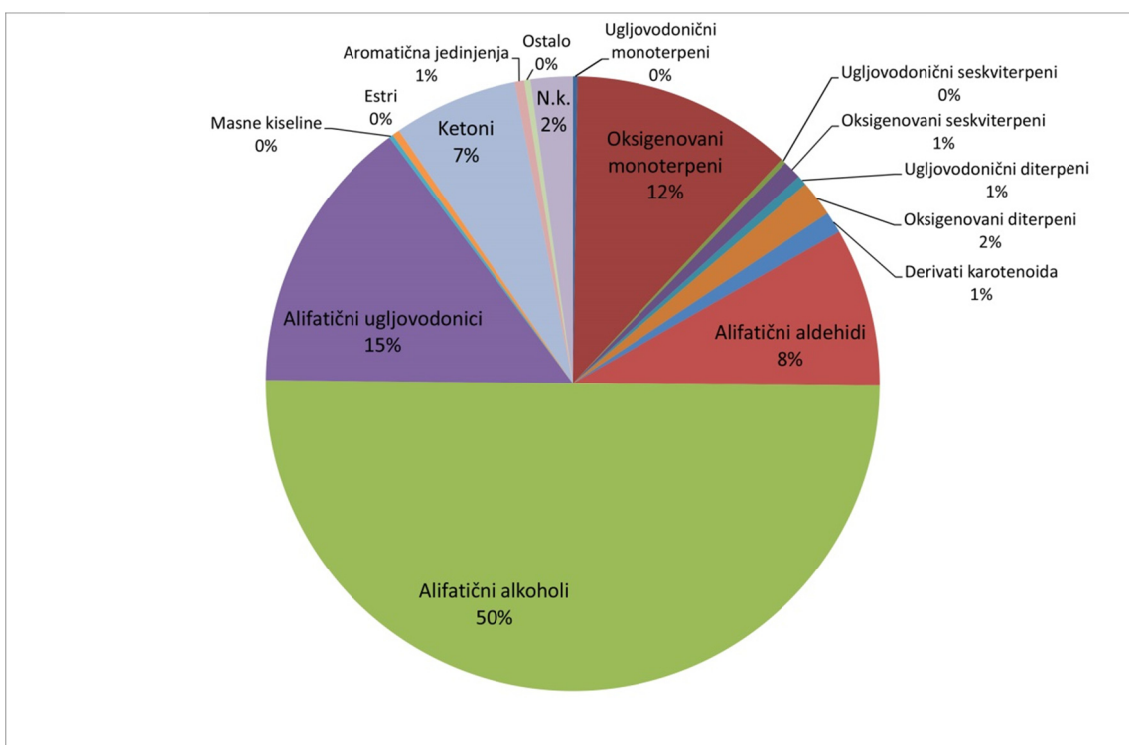
Slika br. 13. Prosečan sadržaj različitih klasa jedinjenja u etarskom ulju četina *Taxus baccata* L. za sve tri populacije



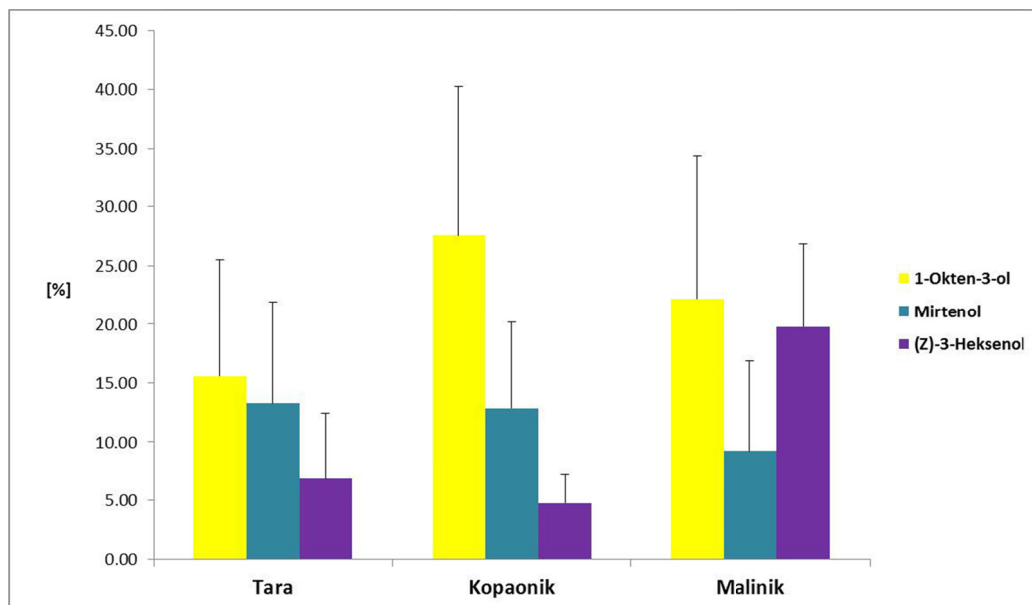
Slika br. 14. Prosečan sadržaj različitih klasa jedinjenja u etarskom ulju četina *Taxus baccata* L. za populaciju Tara



Slika br. 15. Prosečan sadržaj različitih klasa jedinjenja u etarskom ulju četina *Taxus baccata* L. za populaciju Kopaonik



Slika br. 16. Prosečan sadržaj različitih klasa jedinjenja u etarskom ulju četina *Taxus baccata* L. za populaciju Malinik



Slika br. 17. Varijabilnost najzastupljenijih jedinjenja u tri prirodne populacije tise u Srbiji prikazana preko srednjih vrednosti i standardne devijacije

5.1.2. Varijabilnost sadržaja etarskog ulja iz četina tise

5.1.2.1. Unutarpopulaciona varijabilnost sadržaja etarskog ulja iz četina tise

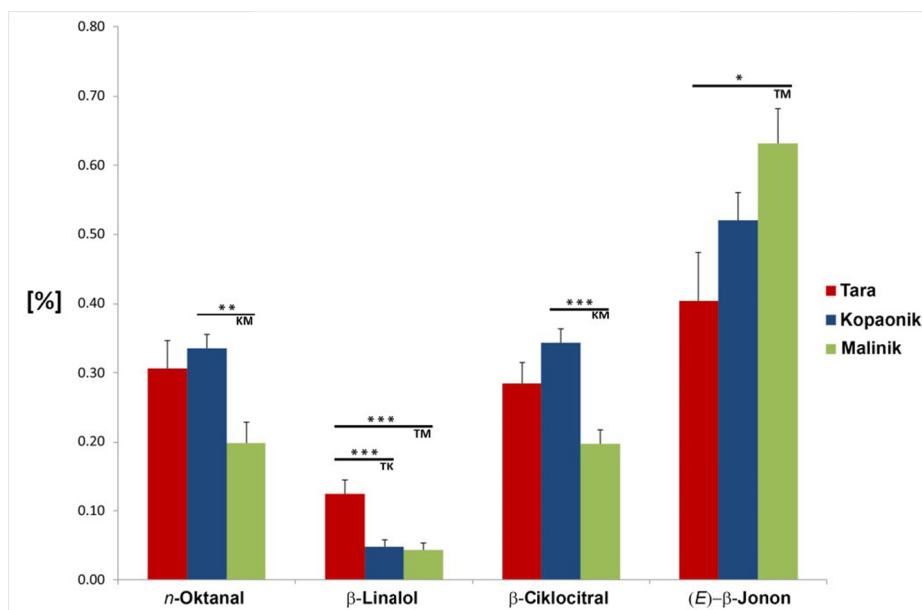
Varijabilnost sadržaja etarskog ulja četina tise iz tri prirodne populacije u Srbiji prema klasama jedinjenja prikazana je na slikama br. 13, 14, 15 i 16. Varijabilnost najzastupljenijih jedinjenja prikazana je na slici br. 17.

5.1.2.2. Međupopulaciona varijabilnost sadržaja etarskog ulja iz četina tise

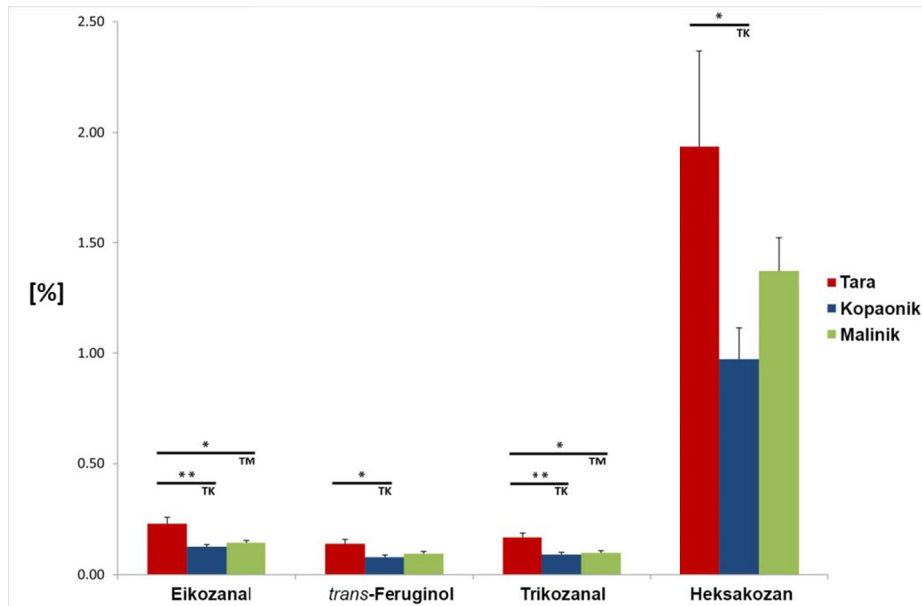
Razlike između srednjih vrednosti populacija za pojedina svojstva, ispitivane su jednofaktorskom analizom varijanse. Normalnost 91 hemijske komponente iz etarskog ulja proverena je χ^2 testom ($p \geq 0.05$) u programu STATISTICA 10. Ukupno 17 jedinjenja ima normalnu raspodelu: α -pinen, 3-oktanol, *n*-oktanal, *n*-oktanol, β -linalol, mirtenol, β -ciklocitral, (*E*)-2-decenal, (*E*)- α -jonon, (*E*)- β -jonon, heksadekanal, heksahidrofarnezil aceton, eikozanal, *trans*-feruginol, dokozanal, trikozanal i heksakozan. Njihova međupopulaciona varijabilnost je ispitana jednofaktorskom

analizom varijanse u programu STATA 12. Homogenost varijansi između populacija proverena je Bartlett-ovim testom ($p \geq 0.05$) i u analizu su ušla samo jedinjenja koja su zadovoljila ovaj uslov. ANOVA je pokazala da se 8 jedinjenja statistički značajno razlikuje prema zastupljenosti među populacijama ($p < 0.05$): *n*-oktanal, β -linalol, β -ciklocitral, (E)- β -jonon, eikozanal, *trans*-feruginol, trikozanal i heksakozan. Kao „post-hoc“ test korišćen je Bonferroni test sa korekcijom. Prema sadržaju *n*-oktanala, značajno se razlikuju populacije Kopaonik i Malinik ($p = 0.001$), na taj način što je ovo jedinjenje više zastupljeno u uzorcima sa Kopaonika (Slika br. 18). Utvrđeno je da uzorci sa Tare sadrže statistički značajno više β -linalola od uzoraka sa Kopaonika ($p = 0.000$) i Malinika ($p = 0.000$) (Slika br. 18). Populacije Kopaonik i Malinik se značajno razlikuju i prema sadržaju β -ciklocitrala, na taj način što ovog jedinjenja ima značajno više u uzorcima sa Kopaonika ($p = 0.000$) (Slika br. 18). Značajne razlike su utvrđene i u sadržaju (E)- β -jonona između populacija Tara i Malinik ($p = 0.039$). Uzorci sa Malinika sadrže više ovog jedinjenja (Slika br. 18). Statistički značajne razlike su utvrđene i u sadržaju eikozanala, koga ima više u uzorcima sa Tare u odnosu na populacije Kopaonik ($p = 0.002$) i Malinik ($p = 0.01$) (Slika br. 19). Prema sadržaju *trans*-feruginola statistički značajne razlike postoje između populacija Tara i Kopaonik ($p = 0.021$). Jedinke sa Tare sadrže više *trans*-feruginola (Slika br. 19). Prema sadržaju trikozanala statistički značajne razlike postoje između populacije Tara u odnosu na populacije Kopaonik ($p = 0.008$) i Malinik ($p = 0.019$) (Slika br. 19). Trikozanala ima više u jedinkama sa Tare u odnosu na druge dve populacije. Populacije Tara i Kopaonik se statistički značajno razlikuju prema sadržaju heksakozana ($p = 0.015$). Jedinke sa Tare sadrže više ovog jedinjenja u odnosu na jedinke sa Kopaonika (Slika br. 19).

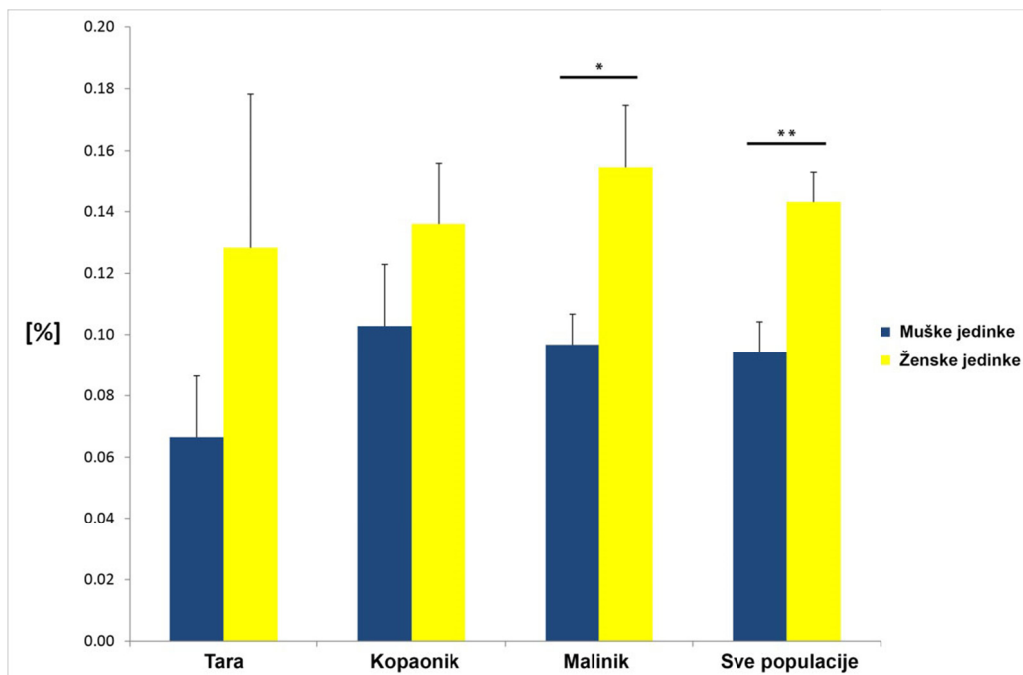
Razlike u sadržaju jedinjenja koja imaju normalnu raspodelu između ženskih i muških jedinki ispitane su t-testom za nezavisne uzorke. Statistički značajne razlike između ženskih i muških jedinki su utvrđene samo za sadržaj α -pinena u populaciji Malinik ($p = 0.023$), kao i na nivou sve tri populacije zajedno ($p = 0.006$) (Slika br. 20). Ženske jedinke sadrže značajno više α -pinena od muških.



Slika br. 18. Razlike u sadržaju *n*-oktanala, β-linalola, β-ciklocitrala i (*E*)-β-jonona u etarskom ulju tise između tri prirodne populacije u Srbiji (ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; TK – razlike između populacija Tara i Kopaonik, TM – razlike između populacija Tara i Malinik, KM – razlike između populacija Kopaonik i Malinik)



Slika br. 19. Razlike u sadržaju eikozanala, *trans*-feruginola, trikozanala i heksakozana u etarskom ulju tise između tri prirodne populacije u Srbiji (ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; TK – razlike između populacija Tara i Kopaonik, TM – razlike između populacija Tara i Malinik, KM – razlike između populacija Kopaonik i Malinik)



Slika br. 20. Razlike u sadržaju α -pinena između ženskih i muških jedinki u populacijama (t-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

U cilju sagledavanja tendencije odnosa, grupisanja i izdvajanja individua, populacija i svojstava u masi podataka korišćena je analiza glavnih komponenti (deskriptivna multivarijaciona statistička metoda). Njen glavni cilj je da u grafičkoj formi prikaže maksimum informacija sadržanih u tabelarnoj formi (Bojović i Mitrović, 2010).

Analiza glavnih komponenti je urađena na setu od 22 izabrane varijable koje predstavljaju hemijske komponente zastupljene u procentu većem od 0.5%. Na podacima su urađene logaritamske transformacije. Takođe, visokokorelisane varijable ($r > 0.7$) su izostavljene iz analize. U tabeli br. 4, dat je pregled glavnih komponenti (osa). Najviše informacija o totalnoj varijabilnosti daje prva osa (29.21%), zatim druga (17.02%) i treća (9.44%). Prve tri ose objašnjavaju 55.66% totalne varijabilnosti. Grafički je predstavljen plan prve i druge glavne ose (Slika br. 21) i plan druge i treće glavne ose (Slika br. 22).

U tabeli br. 5 su dati koeficijenti linearnih kombinacija koji izgrađuju glavne ose. Svojstva (hemijske komponente) koja imaju najveće apsolutne vrednosti koeficijenata su svojstva koja najviše doprinose formiranju te ose. Tako 1-okten-3-ol,

(*E*)-2-undecenal, heksahidrofarnezil aceton i abietatrien najviše doprinose formiranju prve glavne ose. Zatim, 1-okten-3-on, 3-oktanon, n-nonanal i palmitinska kiselina najviše doprinose formiranju druge glavne ose, a (*E*)-2-heksenal, (*Z*)-3-heksenol, mirtenol i geraniol formiranju treće glavne ose.

Tabela br. 4. Glavne komponente i procenti totalne varijabilnosti koje one objašnjavaju

Glavna komponenta	Eigen- vrednost	% Varijabilnost	% Kumulativni
1	6.426	29.21	29.21
2	3.744	17.02	46.23
3	2.076	9.44	55.67
4	1.777	8.08	63.74
5	1.527	6.94	70.68
6	1.159	5.27	75.95
7	0.996	4.53	80.48
8	0.752	3.42	83.89
9	0.553	2.51	86.41
10	0.499	2.27	88.68
11	0.412	1.87	90.55
12	0.392	1.78	92.33
13	0.331	1.51	93.84
14	0.294	1.34	95.18
15	0.266	1.21	96.39
16	0.204	0.93	97.31
17	0.167	0.76	98.07
18	0.135	0.61	98.69
19	0.102	0.46	99.15
20	0.072	0.33	99.47
21	0.062	0.28	99.76
22	0.053	0.24	100

Na grafičkom prikazu (Slika br. 21) vidljivo je razdvajanje populacija Kopaonik i Malinik u odnosu na drugu glavnu osu. Jedinke iz populacije Kopaonik se pretežno grupišu u pozitivnom segmentu, a jedinke iz populacije Malinik u negativnom segmentu prve glavne ose. Na grafičkom prikazu (Slika br. 22) može se uočiti razdvajanje populacija Tara i Malinik u odnosu na treću glavnu osu. Takođe na ovom prikazu se uočava grupisanje jedinki sa Tare u pozitivnom segmentu druge glavne ose.

Na grafičkim prikazima, varijable (hemijske komponente) su predstavljene vektorima. Uglavnom, mada to nije pravilo, svojstva sa dužim vektorima su vernije prezentovana. Takođe nije pravilo ali i elementi dalje od koordinatnog početka vernije su prezentovani od onih u njegovoj blizini (Bojović i Mitrović, 2010). Položaj elementa

(stabla) u odnosu na vektor takođe daje značajne informacije. Tako se sa grafičkih prikaza (Slika br. 21 i 22) može očitati da jedinke sa Tare obiluju sadržajem heksahidrofarnezil acetona, pentakozana, geraniola i mirtenola. Stabla sa Kopaonika obiluju sadržajem 1-okten-3-ola, 1-okten-3-ona, 3-oktanona, *n*-nonanala, palmitinske kiseline i junicedranola. Jedinke sa Malinika obiluju sadržajem n.k. 1, (*Z*)-3-heksenola, fitola i heptadekana. Za utvrđivanje značajnosti razlika u relativnim sadržajima ovih komponenata korišćen je Mann-Whitney *U* test.

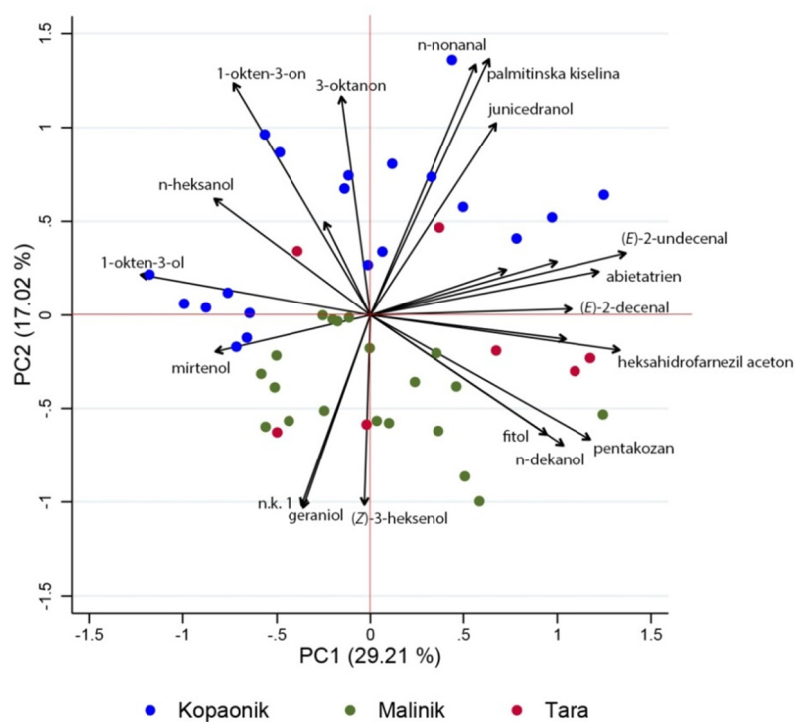
Prema sadržaju (*Z*)-3-heksenola, statistički značajne razlike su ustanovljene između populacija Tara i Kopaonik ($p=0.019$), Tara i Malinik ($p=0.001$) i Kopaonik i Malinik ($p=0.000$). Jedinke sa Tare sadrže manji procenat (*Z*)-3-heksenola u etarskom ulju u odnosu na jedinke sa Malinika. Jedinke sa Kopaonika sadrže manji procenat (*Z*)-3-heksenola u etarskom ulju od jedinki sa Tare i Malinika (Slika br. 23). Prema sadržaju 1-okten-3-ola značajno se razlikuju populacije Kopaonik i Tara ($p=0.038$), na taj način što jedinke sa Kopaonika sadrže više ovog jedinjenja (Slika br. 23). Statistički značajne razlike su utvrđene u sadržaju pentakozana između jedinki sa Tare i Kopaonika ($p=0.007$) i jedinki sa Kopaonika i Malinika ($p=0.021$). Pentakozan je detektovan u većoj količini u uzorcima sa Tare i Malinika u odnosu na uzorke sa Kopaonika (Slika br. 24). Statistički značajne razlike postoje u sadržaju 1-okten-3-ona između populacija Tara i Kopaonik ($p=0.003$) i Kopaonik i Malinik ($p=0.001$). Jedinke sa Kopaonika sadrže više 1-okten-3-ona od jedinki sa Tare, kao i od jedinki sa Malinika (Slika br. 24). Jedinke sa Kopaonika sadrže statistički značajno više 3-oktanona u odnosu na jedinke sa Malinika ($p=0.006$) (Slika br. 24). U sadržaju *n*-nonanala postoje značajne razlike između populacija Tara i Kopaonik ($p=0.001$) i Kopaonik i Malinik ($p=0.001$). Ovog jedinjenja ima više u jedinkama sa Kopaonika u odnosu na druge dve populacije (Slika br. 24). Prema sadržaju palmitinske kiseline značajne razlike su ustanovljene između populacija Kopaonik i Malinik ($p=0.000$) i populacija Tara i Malinik ($p=0.000$). Uzorci sa Tare i Kopaonika sadrže značajno više palmitinske kiseline od uzoraka sa Malinika (Slika br. 25). Statistički značajne razlike su utvrđene i u sadržaju junicedranola između populacija Tara i Malinik ($p=0.002$) i populacija Kopaonik i Malinik ($p=0.019$). Jedinke sa Tare i Kopaonika sadrže više junicedranola u etarskom ulju od jedinki sa Malinika (Slika br. 25). Statistički značajne razlike postoje u sadržaju heptadekana između

populacija Malinik i Tara ($p=0.000$). Heptadekana ima značajno više u uzorcima sa Malinika nego u uzorcima sa Tare (Slika br. 25).

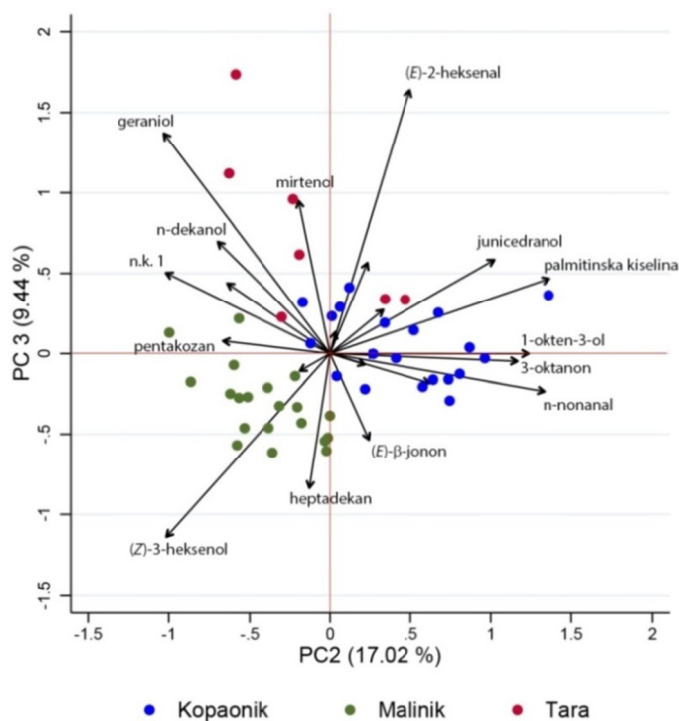
Analiza glavnih komponenti je urađena u programu STATA 12.

Tabela br. 5. Koeficijenti linearnih kombinacija koji izgrađuju prve tri glavne ose. Svojstva (hemijske komponente) koja imaju najveće apsolutne vrednosti koeficijenata su svojstva koja najviše doprinose formiranju te ose

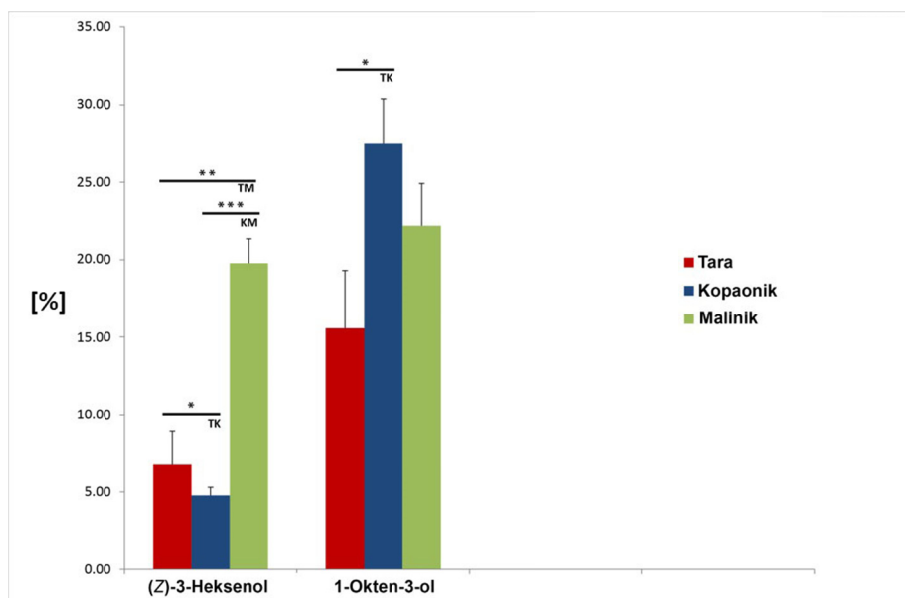
Hemijske komponente	Glavna osa 1	Glavna osa 2	Glavna osa 3
(E)-2-Heksenal	-0.0587	0.1367	-0.5246
(Z)-3-Heksenol	-0.0077	-0.2803	0.3649
n-Heksanol	-0.2007	0.1712	0.0588
1-Okten-3-on	-0.1761	0.3412	0.0001
1-Okten-3-ol	-0.2957	0.0597	0.0219
3-Oktanon	-0.0374	0.3219	0.0152
n-Oktanol	0.2406	0.0788	0.0012
n-Nonanal	0.1358	0.3685	0.0752
Mirtenol	-0.1994	-0.0540	-0.3039
N.k. 1	-0.0886	-0.2812	-0.1609
Geraniol	-0.0866	-0.2847	-0.4382
(E)-2-Decenal	0.2595	0.0092	-0.0432
n-Dekanol	0.2489	-0.1927	-0.2229
(E)-2-Undecenal	0.3296	0.0914	-0.0875
(E)- β -Jonone	0.1754	0.0669	0.1713
Heptadekan	0.2521	-0.0355	0.2674
Junicedranol	0.1621	0.2825	-0.1869
Heksahidrofarnesil aceton	0.3217	-0.0519	0.0346
Palmitinska kiselina	0.1532	0.3766	-0.1491
Abietatrien	0.2948	0.0642	-0.1811
Fitol	0.2276	-0.1767	-0.1401
Pentakozan	0.2840	-0.1838	-0.0250



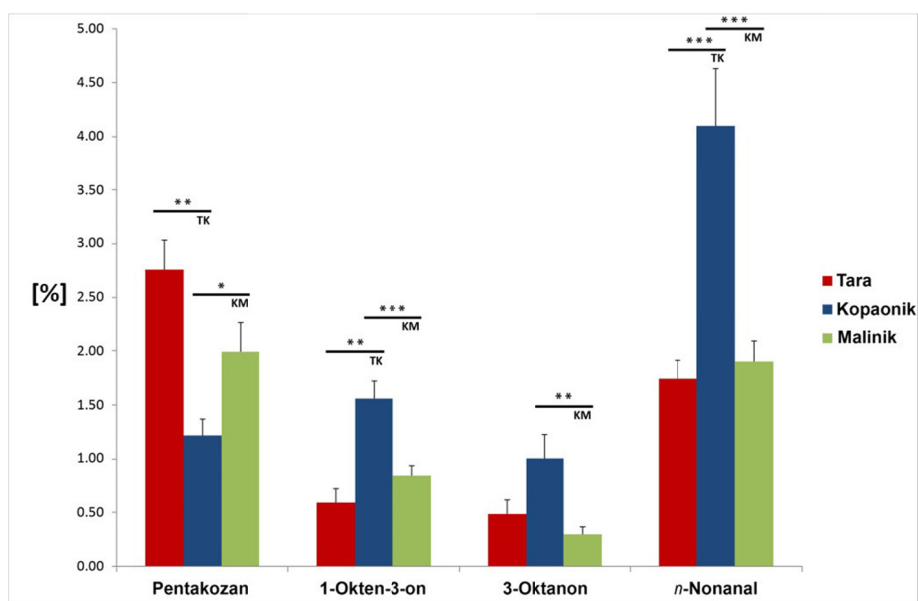
Slika br. 21. Plan prve i druge glavne ose prikazuje razdvajanje jedinki iz populacija Kopaonik i Malinik na osnovu 22 izabrane hemijske komponente



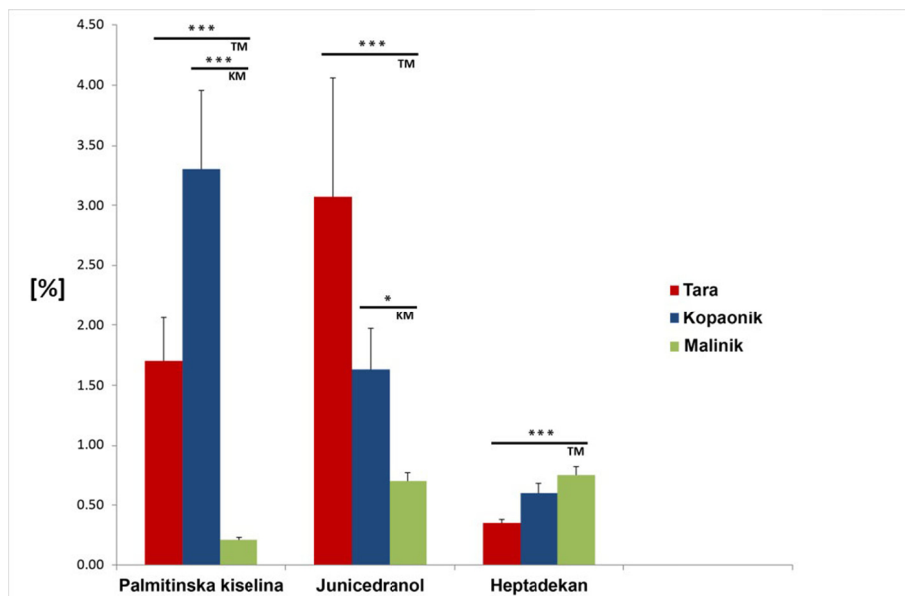
Slika br. 22. Plan druge i treće glavne ose prikazuje razdvajanje jedinki iz populacija Tara i Malinik na osnovu 22 izabrane hemijske komponente



Slika br. 23. Razlike u sadržaju (Z)-3-heksenola i 1-okten-3-ola u etarskom ulju tise između tri prirodne populacije u Srbiji (Mann-Whitney *U* test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; TK – razlike između populacija Tara i Kopaonik, TM – razlike između populacija Tara i Malinik, KM – razlike između populacija Kopaonik i Malinik)

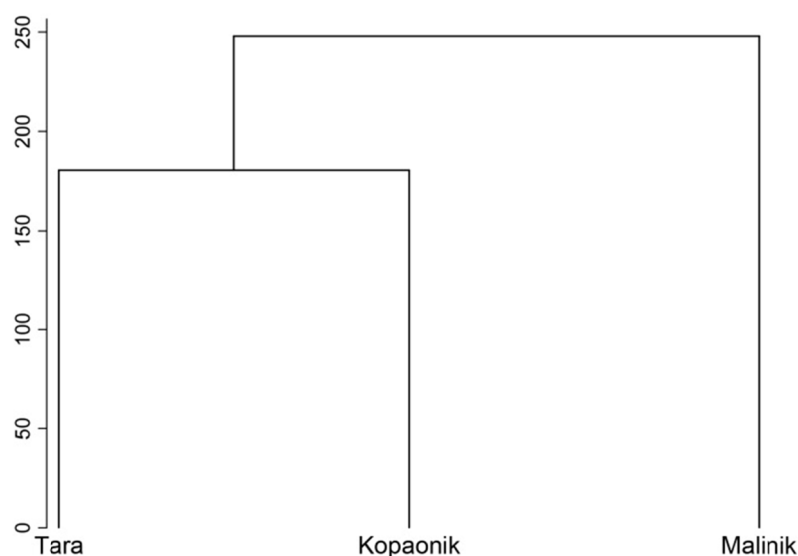


Slika br. 24. Razlike u sadržaju pentakozana, 1-okten-3-ona, 3-oktanona i *n*-nonanala u etarskom ulju tise između tri prirodne populacije u Srbiji (Mann-Whitney *U* test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; TK – razlike između populacija Tara i Kopaonik, TM – razlike između populacija Tara i Malinik, KM – razlike između populacija Kopaonik i Malinik)



Slika br. 25. Razlike u sadržaju palmitinske kiseline, junicedranola i heptadekana u etarskom ulju tise između tri prirodne populacije u Srbiji (Mann-Whitney U test: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; TK – razlike između populacija Tara i Kopaonik, TM – razlike između populacija Tara i Malinik, KM – razlike između populacija Kopaonik i Malinik)

Isprobano je više metoda klaster analize (sa različitim distancama): „Average Linkage“ (*Euclidean* distance i *Squared Euclidean* distance), „Single Linkage“ (*Euclidean* distance i *Squared Euclidean* distance), „Ward’s Linkage“ (*Euclidean* distance i *Squared Euclidean* distance). Sve navedene metode klaster analize su pokazale da su prema hemijskom sastavu sličnije populacije Tara i Kopaonik, dok se populacija Malinik razlikuje (Slika br. 26).



Slika br. 26. Dendrogram na osnovu klaster analize „Single Linkage“ (Squared *Euclidean* distance) za 22 izabrane hemijske komponente etarskog ulja tise iz tri prirodne populacije u Srbiji

U cilju sagledavanja diskriminacije unapred definisane 3 grupe (Tara, Kopaonik i Malinik) korišćena je kanonijska diskriminaciona analiza (multivarijaciona statistička analiza). Standardizovanim diskriminacionim koeficijentima omogućeno je detektovanje varijabli kojima se vrši diskriminacija između grupa.

Za kanonijsku diskriminacionu analizu odabrane su hemijske komponente koje su zastupljene u procentu iznad 0.5% u etarskom ulju iz četina tise (Šarac, 2014). Na podacima su urađene logaritamske transformacije. Zatim su ispitane korelacije i iz dalje analize su izostavljene visokokorelisane komponente ($r > 0.7$), tako da krajnji set čine 22 varijable. Na slici br. 27 je prikazano razdvajanje populacija na osnovu prve i druge diskriminacione funkcije. Prva diskriminaciona funkcija objašnjava 70.0% varijanse za ispitivane parametre i odvaja populaciju Kopaonik od populacija Tara i Malinik. Za razdvajanje po prvoj diskriminacionoj funkciji najveći značaj imaju (*Z*)-3-heksenol, 1-okten-3-ol, palmitinska kiselina i pentakozan (Tabela br. 6 i slika br. 28). Jedinke sa Kopaonika imaju veći sadržaj 1-okten-3-ola i palmitinske kiseline, a manji sadržaj (*Z*)-3-heksenola i pentakozana u odnosu na jedinke sa Tare i Malinika. Druga diskriminaciona funkcija objašnjava preostali procenat varijanse i odvaja populaciju Malinik u odnosu na populacije Tara i Kopaonik. Najveći značaj za razdvajanje po

drugoj diskriminacionoj fukciji ima sadržaj heptadekana, (*E*)- β -jonona i (*Z*)-3-heksenola (Tabela br. 6 i slika br. 28). Jedinke sa Malinika sadrže veći procenat heptadekana, (*E*)- β -jonona i (*Z*)-3-heksenola od jedinki sa Tare i Kopaonika.

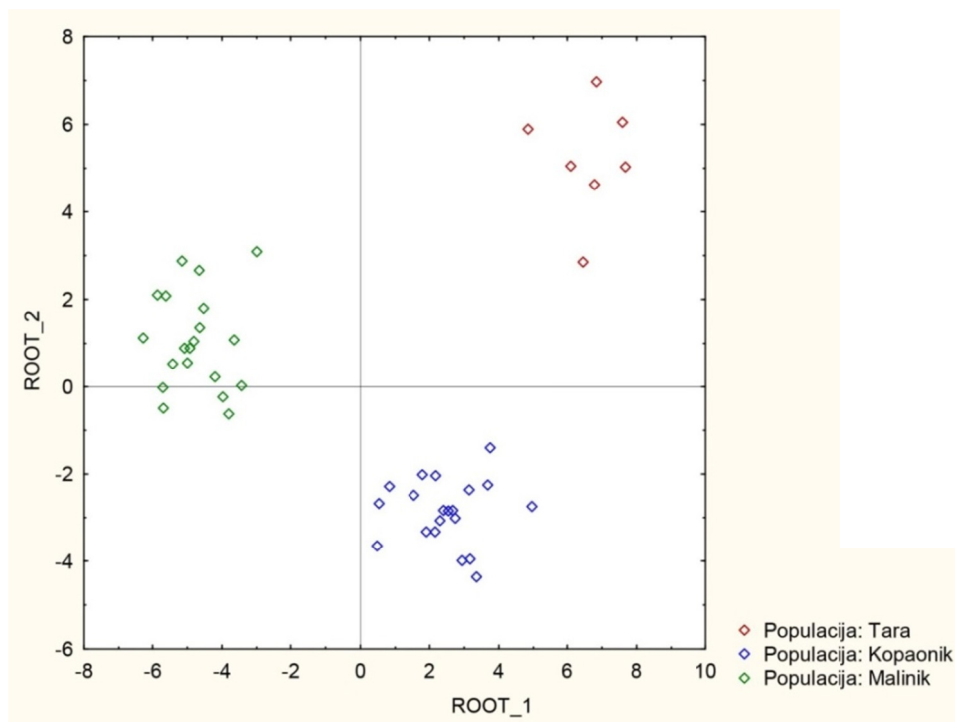
Razlike u sadržaju navedenih komponenti koje izdvajaju populacije Kopaonik i Malinik su ispitane pomoću ANOVA i Mann-Whitney *U* test-a u okviru analize glavnih komponenti.

Razlike u sadržaju izabrane 22 komponente između muških i ženskih jedinki ispitane su pomoću Mann-Whitney *U* test-a za sve tri populacije zajedno (47 jedinki). Razlike između polova prema hemijskom sastavu nisu utvrđene.

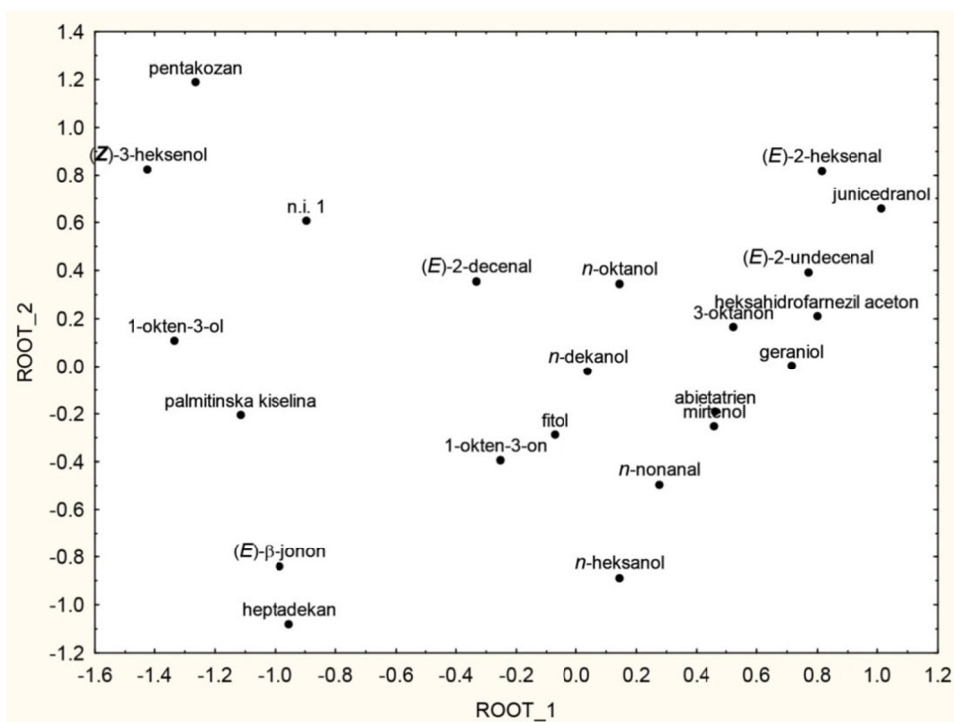
Kanonijska diskriminaciona analiza i Mann-Whitney *U* test rađeni su u programu STATISTICA 10.

Tabela br. 6. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable i njihov doprinos varijabilnosti etarskog ulja tise iz tri prirodne populacije u Srbiji

Varijable	ROOT 1	ROOT 2
(<i>E</i>)-2-Heksenal	0.8154	0.8178
(<i>Z</i>)-3-Heksenol	-1.4236	0.8252
<i>n</i> -Heksanol	0.1441	-0.8891
1-Okten-3-one	-0.2527	-0.3930
1-Okten-3-ol	-1.3341	0.1095
3-Oktanon	0.5230	0.1659
<i>n</i> -Oktanol	0.1438	0.3446
<i>n</i> -Nonanal	0.2757	-0.4954
Mirtenol	0.4598	-0.2515
N.k. 1	-0.8946	0.6068
Geraniol	0.7149	0.0035
(<i>E</i>)-2-Decenal	-0.3327	0.3549
<i>n</i> -Dekanol	0.0381	-0.0205
(<i>E</i>)-2-Undecenal	0.7701	0.3915
(<i>E</i>)-β-Jonon	-0.9850	-0.8398
Heptadekan	-0.9532	-1.0798
Junicedranol	1.0124	0.6586
Heksahidrofarnetil aceton	0.7994	0.2115
Palmitinska kiselina	-1.1149	-0.2054
Abietatrien	0.4636	-0.1910
Fitol	-0.0719	-0.2874
Pentakozan	-1.2638	1.1889
Eigen-vrednosti	20.0464	8.5684
% objašnjene varijabilnosti	0.7006	1.0000



Slika br. 27. Plan prve i druge kanonijske diskriminacione funkcije prikazuje razdvajanje 47 jedinki *Taxus baccata* L. u tri grupe koje odgovaraju prirodnim populacijama



Slika br. 28. Izabrana hemijska jedinjenja za kanonijsku diskriminacionu analizu i njihov doprinos varijabilnosti etarskog ulja tise iz tri prirodne populacije u Srbiji

5.1.3. Povezanost sadržaja hemijskih komponenti i klimatskih faktora

Mikroklimatski uslovi u kojima rastu populacije značajno utiču na varijabilnost sadržaja etarskog ulja. Zavisnost sadržaja pojedinih komponenti etarskog ulja tise od temperature vazduha, količine padavina i nadmorske visine ispitivana je regresionom analizom. Klimatske karakteristike lokaliteta na kojima se nalaze istraživane populacije tise su dobijene na osnovu geografskih koordinata iz WorldClim baze globalnih klimatskih slojeva u prostornoj rezoluciji od oko 1 km², koju su razvili Hijmans i sar. (2005). WorldClim klimatske površine su razvijene na osnovu podataka za količinu padavina i srednju, minimalnu i maksimalnu temperaturu po mesecima, za period od 1950. do 2000. godine. Za prirodne populacije tise u Srbiji, 19 bioklimatskih varijabli (Tabela br. 7) je dobijeno iz WorldClim baze podataka uz pomoć DIVA-GIS 7.5 softvera (Hijmans et al., 2012).

Rezultati proste linearne regresije su prikazani u Tabelama 8 i 9. Za regresionu analizu izabrane su komponente ulja čiji se sadržaji značajno razlikuju između populacija (Slike 18, 19, 23, 24 i 25). Zavisne varijable (relativni sadržaji komponenti) su logaritamski transformisane. Analizirano je ukupno 15 komponenata u odnosu na bioklimatske varijable (BIO1-BIO19), minimalnu i maksimalnu temperaturu za oktobar (kada je izvršeno uzorkovanje), prosečnu količinu padavina za oktobar, minimalnu, maksimalnu i srednju temperaturu za jesenje mesece, prosečnu količinu padavina za jesenje mesece i nadmorsku visinu. Rezultati linearne regresije za junicedranol i palmitinsku kiselinu nisu prikazani u tabeli jer je utvrđeno da za ova jedinjenja reziduali ne ispunjavaju uslov homogenosti varijansi (White's test, $p < 0.05$). Takođe, u tabelama nisu prikazani ni koeficijenti regresije za zavisne varijable za koje uslov homogenosti varijansi reziduala nije ispunjen.

Tabela br. 7. Bioklimatske varijable dobijene iz programa DIVA-GIS 7.5

Bioklimatske varijable	Tara	Kopaonik	Malinik
BIO1 = Srednja godišnja temperatura [°C]	8.2	5.7	6.6
BIO2 = Srednji mesečni temperaturni opseg (max temp – min temp) [°C]	9.2	8.2	7.4
BIO3 = Izotermnost (BIO1/BIO7) * 100 [°C]	32.1	30.1	27.5
BIO4 = Sezonske varijacije u temperaturi (standardna devijacija * 100)	714.3	704.4	745.7
BIO5 = Maksimalna temperatura najtoplijeg perioda [°C]	23.2	20.0	20.9
BIO6 = Minimalna temperatura najhladnijeg perioda [°C]	-5.6	-7.3	-6
BIO7 = Godišnji temperaturni opseg (BIO 5 – BIO6) [°C]	28.8	27.3	26.9
BIO8 = Srednja temperatura najvlažnijeg kvartala [°C]	14.9	12.3	13.8
BIO9 = Srednja temperatura najsuvljeg kvartala [°C]	0.5	-2.0	-1.5
BIO10 = Srednja temperatura najtoplijeg kvartala [°C]	16.7	14.1	15.6
BIO11 = Srednja temperatura najhladnijeg kvartala [°C]	-0.9	-3.2	-2.7
BIO12 = Prosečna godišnja količina padavina [mm]	951	911	808
BIO13 = Količina padavina u najvlažnijem periodu [mm]	103	101	105
BIO14 = Količina padavina u najsuvljem periodu [mm]	61	60	50
BIO15 = Sezonske varijacije u količini padavina (koeficijent varijacije)	17.0	15.9	26.3
BIO16 = Količina padavina u najvlažnijem kvartalu [mm]	294	277	282
BIO17 = Količina padavina u najsuvljem kvartalu [mm]	189	195	158
BIO18 = Količina padavina u najtoplijem kvartalu [mm]	271	246	257
BIO19 = Količina padavina u najhladnijem kvartalu [mm]	206	207	168

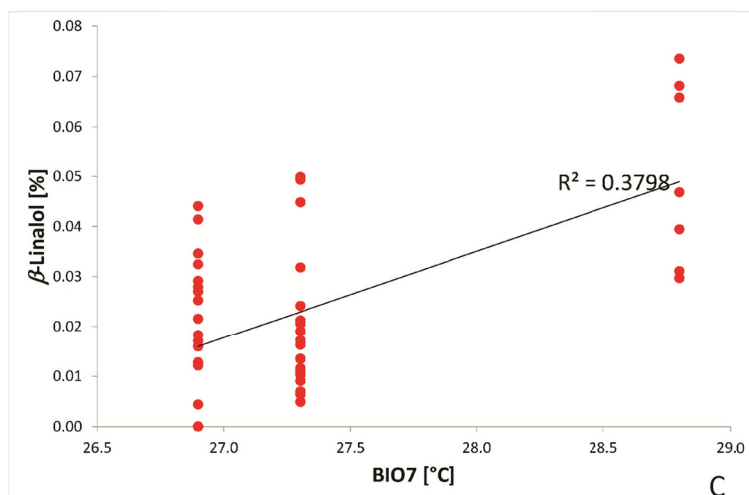
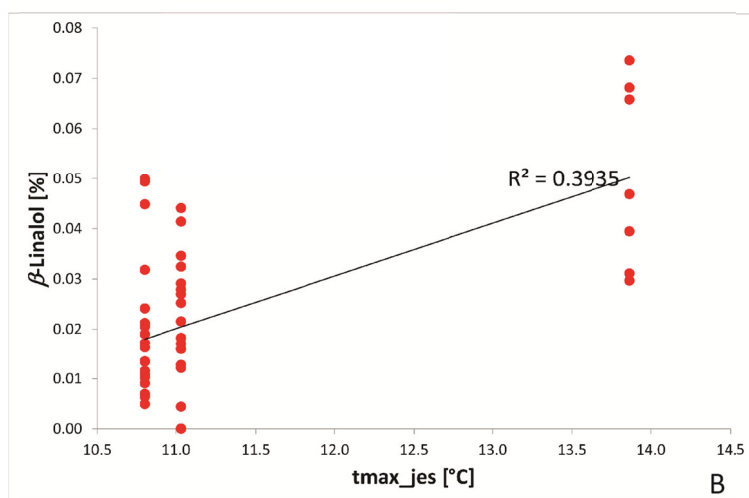
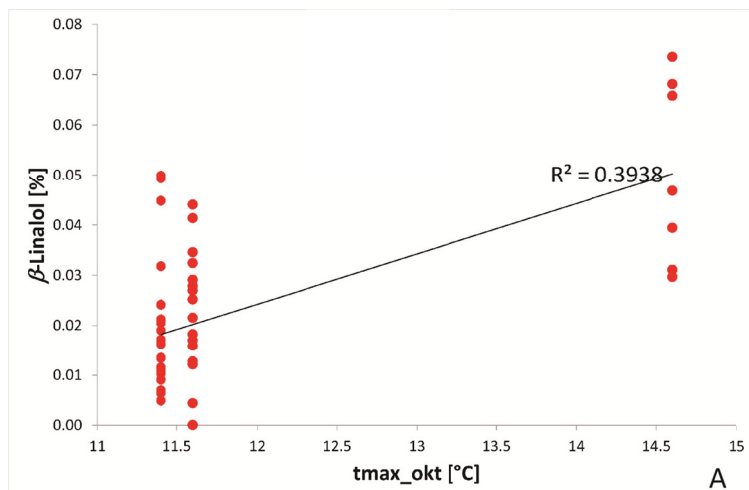
Na osnovu rezultata proste linearne regresije se može zaključiti da su sve nezavisne varijable statistički značajno korelisane sa analiziranim komponentama etarskog ulja.

Postoji statistički značajna linearna zavisnost između bioklimatskih varijabli vezanih za temperaturu vazduha i sadržaja analiziranih komponenti etarskog ulja (Tabela br. 8- 1 deo i tabela br. 8- 2.deo). Značajno predviđanje sadržaja najvećeg broja hemijskih komponenti daju varijable BIO8 (srednja temperatura najvlažnijeg kvartala), BIO10 (srednja temperatura najtoplijeg kvartala), tmin_okt (minimalna temperatura za oktobar) i tmin_jes (minimalna temperatura za jesenje mesece). Najmanji broj predviđanja imaju varijable BIO3 (izotermnost) i BIO4 (sezonske varijacije u temperaturi). Jedinjenja koja u najvećoj meri variraju u odnosu na varijable vezane za temperaturu vazduha su β -linalol, 1-okten-3-on i *n*-nonanal. Najveće koeficijente regresije za β -linalol imaju varijable tmax_okt (maksimalna temperatura za oktobar), tmax_jes (maksimalna temperatura za jesenje mesece) i BIO7 (godišnji temperaturni opseg) (Slika br. 29). Maksimalna temperatura za oktobar i maksimalna temperatura za jesenje mesece objašnjavaju 39.4%, a godišnji temperaturni opseg 38% varijabilnosti β -linalola. Sadržaje 1-okten-3-ona i *n*-nonanala bolje predviđaju varijable koje su vezane za minimalne temperature: BIO6 (minimalna temperatura najhladnijeg perioda), tmin_okt (minimalna temperatura za oktobar) i tmin_jes (minimalna temperatura za jesenje mesece) (Slika br. 30). Minimalna temperatura najhladnijeg perioda objašnjava 34.1% i 37.3%, a minimalna temperatura za oktobar i minimalna temperatura za jesenje mesece 31.9% i 35.1% varijabilnosti 1-okten-3-ona i *n*-nonanala, respektivno.

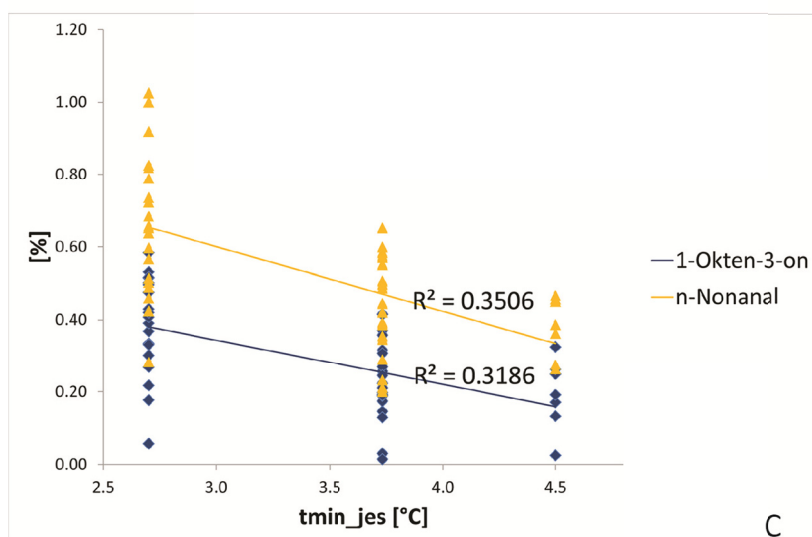
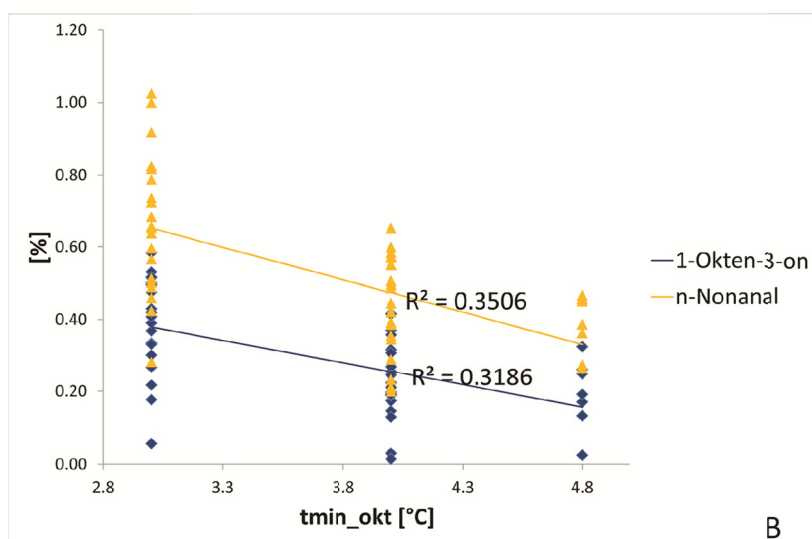
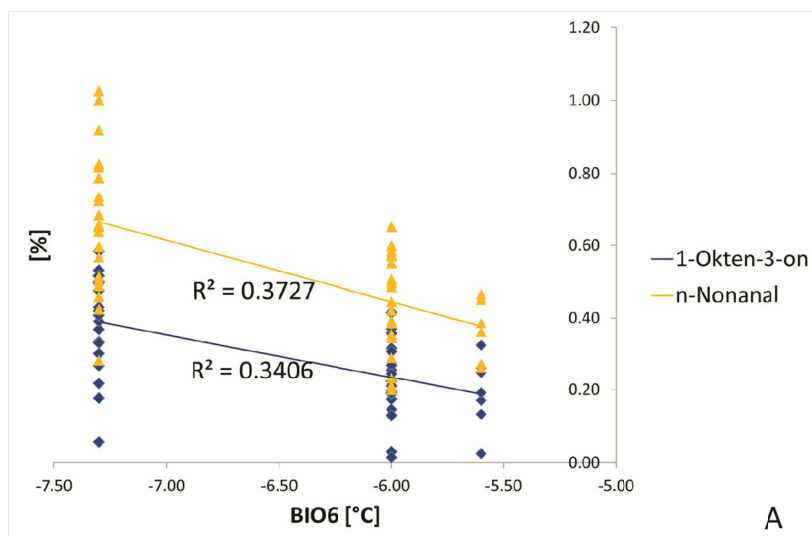
Linearna zavisnost između bioklimatskih varijabli vezanih za količinu padavina i sadržaja analiziranih komponenti je nešto slabija (Tabela br. 9). Značajno predviđanje sadržaja najvećeg broja hemijskih komponenti imaju BIO16 (količina padavina u najvlažnijem kvartalu) i BIO18 (količina padavina u najtoplijem kvartalu). Najmanji broj predviđanja sadržaja hemijskih komponenti imaju BIO12 (prosečna godišnja količina padavina), BIO13 (količina padavina u najvlažnijem periodu), BIO15 (sezonske varijacije u količini padavina), BIO17 (količina padavina u najsuvljem kvartalu) i pad_jes (prosečna količina padavina za jesenje mesece). Jedinjenja koja najviše variraju u odnosu na varijable vezane za količinu padavina su (*Z*)-3-heksenol i β -ciklocitral. Sadržaji (*Z*)-3-heksenola i β -ciklocitrala se najbolje mogu predvideti na

osnovu BIO13 (količina padavina u najvlažnijem periodu), BIO4 (sezonske varijacije u temperaturi), BIO17 (količina padavina u najsuvljem kvartalu) i BIO15 (sezonske varijacije u količini padavina) (Slike br. 31 i 32). Količina padavina u najvlažnijem periodu objašnjava 70.4% i 36.5%, sezonske varijacije u temperaturi 70.1% i 36.3%, količina padavina u najsuvljem kvartalu 69.1% i 35.7%, a sezonske varijacije u količini padavina 68.2% i 35.2% varijabilnosti (*Z*)-3-heksenola i β -ciklocitrala, respektivno.

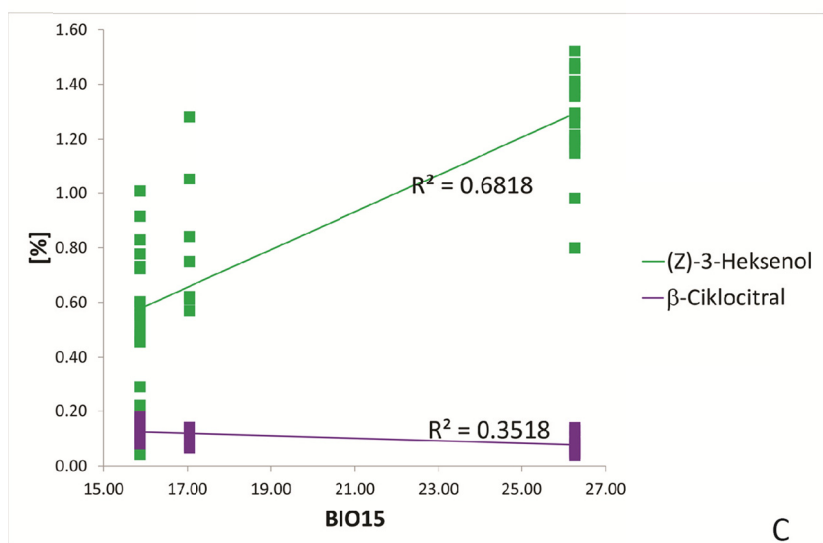
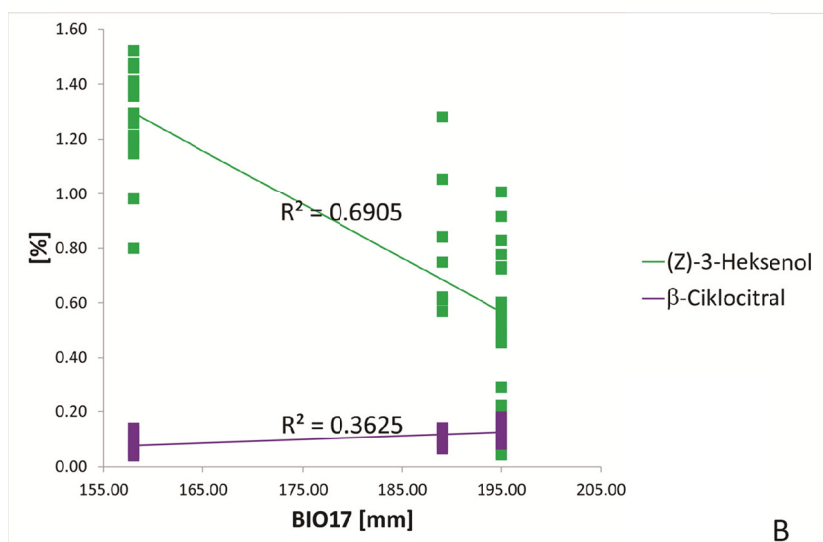
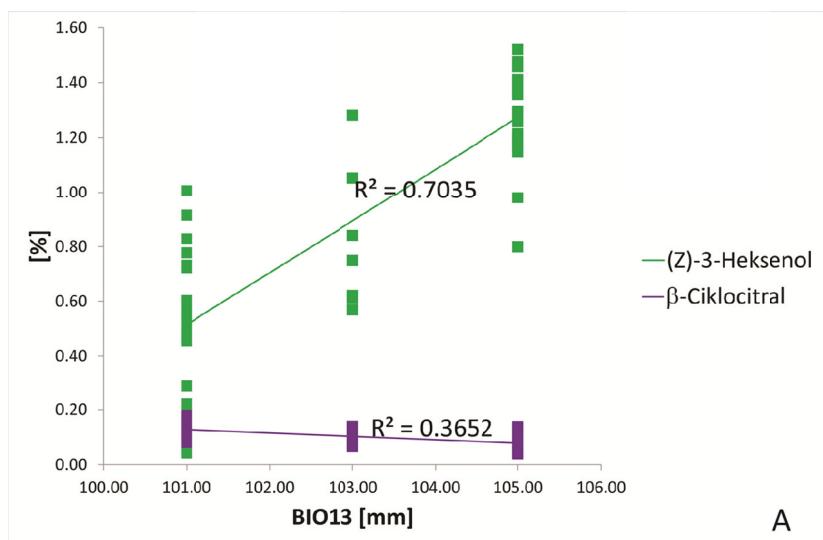
Značajne korelacije su utvrđene za nadmorsku visinu i sadržaje velikog broj analiziranih jedinjenja. U odnosu na nadmorsku visinu, najviše varijaju sadržaji (*Z*)-3-heksenola, 1-okten-3-ona i *n*-nonanala (Slika br. 33). Nadmorska visina predviđa 49.2% varijabilnosti za (*Z*)-3-heksenol, 37.5% varijabilnosti za *n*-nonanal i 34.1% varijabilnosti za 1-okten-3-on.



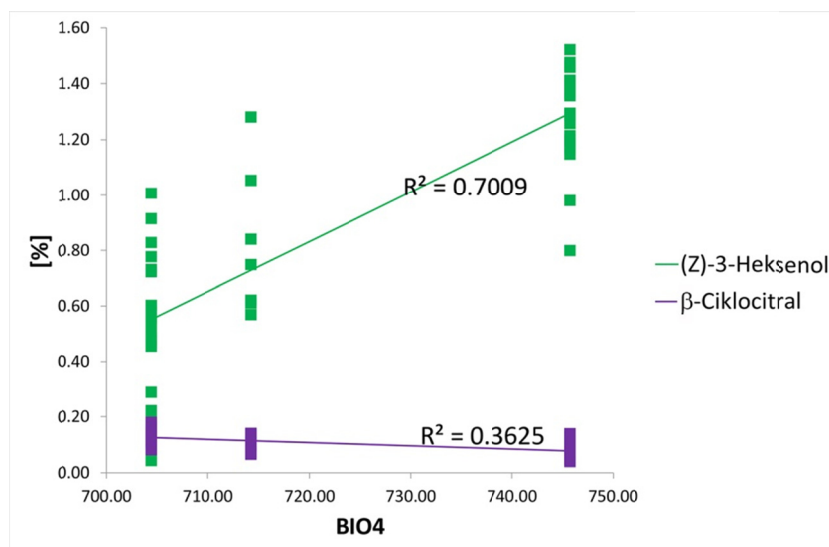
Slika br. 29. Linearna zavisnost između nezavisnih bioklimatskih varijabli t_{max_akt} (A), t_{max_jes} (B) i BIO7 (C) i sadržaja β -linalola



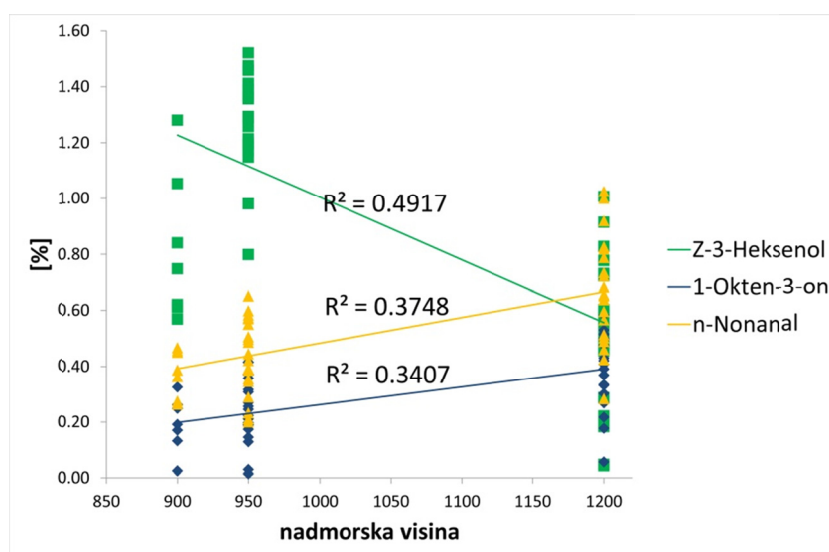
Slika br. 30. Linearna zavisnost između nezavisnih bioklimatskih varijabli BIO6 (A), tmin_okt (B) i tmin_jes (C) i sadržaja 1-okten-3-ona i *n*-nonanala



Slika br. 31. Linearna zavisnost između nezavisnih bioklimatskih varijabli BIO13 (A), BIO17 (B) i BIO15 (C) i sadržaja (Z)-3-heksenola i β -ciklocitrala



Slika br. 32. Linearna zavisnost između sezonskih varijacija u temperaturi (BIO4) i sadržaja (Z)-3-heksenola i β -ciklocitrala



Slika br. 33. Linearna zavisnost između nadmorske visine istraživanih populacija i sadržaja (Z)-3-heksenola, 1-okten-3-ona i *n*-nonanala

Tabela br. 8. Koeficijenti regresije (R^2) i nivoi značajnosti za nezavisne bioklimatske varijable vezane za temperaturu vazduha – 1. deo

	BIO1	BIO2	BIO3	BIO4	BIO5	BIO6	BIO7	BIO8
(<i>Z</i>)-3-Heksenol	0.134 *	0.315***		0.701 ***	0.066		0.101*	
1-Okten-3-on	0.262***	0.004	0.024	0.190**	0.219***	0.341***	0.018	0.323***
1-Okten-3-ol	0.096*	0.009	0.002	0.016	0.092*	0.082	0.036	0.093*
3-Oktanon	0.080	0.061	0.100*		0.051		0.009	0.140**
<i>n</i> -Oktanal	0.028	0.154**	0.196**	0.271***	0.010	0.139**	0.065	0.084*
β -Linalol	0.274***	0.282***	0.220***	0.026	0.323***		0.380***	0.168**
<i>n</i> -Nonanal	0.290***	0.004	0.024	0.204**	0.244***	0.373***	0.022	0.354***
β -Ciklocitral	0.072	0.160**	0.218***	0.363***	0.036	0.237***	0.050	0.162**
(<i>E</i>)- β -Jonon	0.025	0.160**	0.155**	0.086*	0.043	0.000	0.143**	0.003
Heptadekan	0.077	0.172**	0.152**	0.050	0.103*	0.009	0.188**	0.032
Eikozanal	0.223***	0.088*	0.054	0.002	0.235***	0.132*	0.168**	0.178**
<i>trans</i> -Feruginol	0.172**	0.056	0.032	0.003	0.179**	0.109*	0.117*	0.143**
Pentakozan	0.154**	0.000	0.002	0.071	0.136*	0.172**	0.025	0.174**
Trikozanal	0.161**	0.090*	0.061	0.000	0.176**	0.081	0.149**	0.119*
Heksakozan	0.163**	0.008	0.001	0.041	0.152**	0.153**	0.047	0.166**

Tabela br. 8. Koeficijenti regresije (R^2) i nivoi značajnosti za nezavisne bioklimatske varijable vezane za temperaturu vazduha – 2. deo

	BIO9	BIO10	BIO11	tmin_ okt	tmax_ okt	tmin_ jes	tmax_ jes	taver_ jes
(Z)-3-Heksenol	0.022		0.040		0.000		0.000	0.048
1-Okten-3-on	0.174**	0.323***	0.196**	0.319***	0.112*	0.319***	0.113*	0.203**
1-Okten-3-ol	0.085*	0.093*	0.087*	0.094*	0.071	0.094*	0.064	0.090*
3-Oktanon	0.028	0.140**	0.039	0.134*	0.007	0.134*	0.007	0.043
<i>n</i> -Oktanal	0.000	0.085*	0.004	0.078	0.005	0.078	0.005	0.005
β -Linalol	0.361***	0.167**	0.344***	0.178**	0.394***	0.178**	0.394***	0.337***
<i>n</i> -Nonanal	0.194**	0.355***	0.219***	0.351***	0.127*	0.351***	0.128*	0.227***
β -Ciklocitral	0.013	0.163**	0.023	0.154**	0.000	0.153**	0.000	0.027
(<i>E</i>)- β -Jonon	0.063	0.003	0.053	0.004	0.092*	0.004	0.092*	0.050
Heptadekan	0.127*	0.032	0.116*	0.035	0.157**	0.035	0.156**	0.111*
Eikozanal	0.239***	0.178**	0.238***	0.183**	0.230***	0.183**	0.230***	0.237***
<i>trans</i> -Feruginol	0.179**	0.142**	0.180**	0.146**	0.168**	0.146**	0.169**	0.180**
Pentakozan	0.115*	0.174**	0.126*	0.173**	0.084*	0.173**	0.084*	0.129*
Trikozanal	0.184**	0.118*	0.181**	0.123*	0.185**	0.123*	0.185**	0.179**
Heksakozan	0.136*	0.166**	0.144**	0.167**	0.109*	0.167**	0.110*	0.147**

tmin_ okt = minimalna temperatura za oktobar

tmax_ okt = maksimalna temperatura za oktobar

tmin_ jes = minimalna temperatura za jesenje mesece

tmax_ jes = maksimalna temperatura u jesenje mesece

taver_ jes = srednja temperatura za jesenje mesece

Tabela br. 9. Koeficijenti regresije (R^2) i nivoi značajnosti za nezavisne bioklimatske varijable vezane za količinu padavina i nadmorsku visinu

	BIO12	BIO13	BIO14	BIO15	BIO16	BIO17	BIO18	BIO19	pad_ okt	pad_ jes	n.v.
(Z)-3-Heksenol		0.704***	0.629***	0.682***	0.074	0.691***	0.187**	0.663***	0.582***		0.492***
1-Okten-3-on	0.062	0.254***	0.112*	0.159**	0.225***	0.171**	0.286***	0.139**	0.081	0.062	0.341***
1-Okten-3-ol	0.000	0.033	0.003	0.010	0.093*	0.012	0.100*	0.007	0.001	0.000	0.078
3-Oktanon	0.135*		0.170**		0.055		0.100*	0.186**	0.150**	0.134*	0.193**
<i>n</i> -Oktanal	0.233***	0.259***	0.259***	0.270***	0.011	0.271***	0.044	0.267***	0.245***	0.233***	0.156**
β -Linalol		0.001		0.047	0.316***	0.039	0.239***	0.064			0.072
<i>n</i> -Nonanal	0.065	0.274***	0.118*	0.170**	0.250***	0.183**	0.316***	0.147**	0.085*	0.064	0.375***
β -Ciklocitral	0.277***	0.365***	0.324***	0.352***	0.041	0.357***	0.101*	0.341***	0.298***	0.276***	0.259***
(<i>E</i>)- β -Jonon	0.142**	0.055	0.121*	0.100*	0.040	0.095*	0.015	0.023*	0.134*	0.142**	0.003
Heptadekan	0.123*	0.021	0.092*	0.065	0.099*	0.059	0.060	0.076	0.110*	0.123*	0.005
Eikozanal	0.024	0.018	0.006	0.000	0.234***	0.000	0.211**	0.001	0.015	0.024	0.117*
<i>trans</i> -Feruginol	0.012	0.020	0.002	0.000	0.178**	0.001	0.164**	0.000	0.007	0.012	0.098*
Pentakozan	0.014	0.106*	0.034	0.056	0.139**	0.062	0.164**	0.046	0.022	0.014	0.169**
Trikozanal	0.033	0.005	0.013	0.003	0.174**	0.002	0.148**	0.006	0.024	0.034	0.07
Heksakozan	0.002	0.072	0.013	0.028	0.154**	0.033	0.166**	0.021	0.006	0.002	0.147**

pad_ okt = prosečna količina padavina za oktobar

pad_ jes = prosečna količina padavina za jesenje mesece

n.v. = nadmorska visina

5.2. DISKUSIJA REZULTATA ISPITIVANJA ETARSKOG ULJA IZ ČETINA TISE

Upoređivanje dosadašnjih istraživanja o isparljivim komponentama roda *Taxus* L. sa ovim istraživanjem prikazano je u tabeli br. 10.

U ovom istraživanju etarsko ulje iz tise je ekstrahovano postupkom hidrodestilacije iz svežih četina i grančica tise, što odgovara postupku opisanom kod Jean i sar. (1993), Khan i sar. (2006) i Radulović i sar. (2010).

U etarskom ulju iz svežih četina i grančica iz tri prirodne populacije tise u Srbiji detektovana je 91 komponenta, od kojih je 87 identifikovano (Tabela br. 2). U sve tri populacije najzastupljenija jedinjenja su alifatični alkoholi 1-okten-3-ol (23.48%) i (Z)-3-heksenol (11.46%) i oksigenovani monoterpen mirtenol (11.38%). U istraživanjima Jean i sar. (1993), 1-okten-3-ol je takođe identifikovan kao glavni konstituent ulja kanadske tise, dok su (Z)-3-heksenol i mirtenol zastupljeni u manjem procentu (1.97% i 0.68%, respektivno). Kao drugi po zastupljenosti konstituent ulja kanadske tise identifikovan je (E)-2-heksenol (24.13%), koji je u istraživanju koje je predmet ove disertacije pronađen u mnogo manjoj količini (2.08% u proseku za sve tri populacije).

Razultati ovog istraživanja u velikoj meri se razlikuju od istraživanja Khan i sar. (2006) sa *T. wallichiana* Zucc. u pogledu najzastupljenijih jedinjenja. Dok je 1-okten-3-ol najzastupljenije jedinjenje u ulju evropske i kanadske tise, (E)-2-okten-1-ol je najzastupljeniji u ulju *T. wallichiana* Zucc. Ova dva alifatična alkohola imaju približna retencionna vremena, pa se dovodi u pitanje ispravnosti identifikacije (E)-2-okten-1-ola u ulju *T. wallichiana* Zucc. Alifatični alkohol (Z)-3-heksenol je detektovan u skoro 3 puta, a mirtenol u čak 38 puta većoj količini u ovom istraživanju u odnosu na istraživanje sa *T. wallichiana* Zucc. Ukupno 18 jedinjenja je zajedničko za *Taxus baccata* L. i *Taxus wallichiana* Zucc., ali se njihova procentualna zastupljenost u ulju razlikuje.

Svakako najinteresantnije za poređenje sa rezultatima disertacije je istraživanje Radulović i sar. (2010) na ulju iz *Taxus baccata* L. iz prirodne populacije koja se nalazi u klisuri reke Jerme u Srbiji. Dva glavna konstituenta ulja u ovom istraživanju nalaze se i u populaciji tise iz jugoistočne Srbije, s tim što je 1-okten-3-ol zastupljeniji 10 puta, a (Z)-3-heksenol 2 puta u istraživanju koje je predmet ove disertacije. Treće najzastupljenije jedinjenje u ovom istraživanju (11.38%), mirtenol, detektovan je u

većoj količini kod Radulović i sar. (18.3%). Heksahidrofarnezil aceton je najzastupljenije jedinjenje u ulju tise iz klisure reke Jerme (18.3%), a u rezultatima disertacije detektovan je u oko tri puta manjoj količini (5.33%). Ukupno 40 jedinjenja se podudara za oba istraživanja, ali se njihova procentualna zastupljenost razlikuje. Prema navedenom, može se zaključiti da je sastav etarskog ulja iz istraživanja koje je predmet ove disertacije najsličniji sastavu ulja tise iz jugoistočne Srbije.

Tabela br. 10. Dosadašnja istraživanja isparljivih komponenti roda *Taxus* L.

Autori	Vrsta	Lokalitet	Ispitivani deo biljke	Postupak ekstrakcije	GC-MS analiza	Broj identifikovanih komponenti	Obilnije komponente
1	2	3	4	5	6	7	8
Merkx i Svendsen (1990)	<i>T. baccata</i> L.	Nedostaju podaci	Nedostaju podaci	Enzimaska hidroliza	Nedostaju podaci	Nedostaju podaci	1-okten-3-ol (>50%), eugenol (0.5-5%) i (<i>Z</i>)-3-heksenol (<0.5%)
Jean et al. (1993)	<i>T. canadensis</i> Marsh.	Jezero Sen Žen, Kvebek	Sveže četine i grančice	Destilacija vodenom parom ili enzimaska hidroliza sa β -glukozidazom i celulazom	Supelcowax i DB-5 kolona	Destilacija vodenom parom: 18; enzimaska hidroliza: 16	Destilacija vodenom parom: 1-okten-3-ol (44.6%) i (<i>E</i>)-2-heksenal (24.13%); enzimaska hidroliza: 3,5- dimetoksifenol (48.65%, 26.29%) i 1-okten-3-ol (23.05%, 39.11%)
Erdemoglu et al. (2003)	<i>T. baccata</i> L.	Riza, Turska	Suve četine ili sveže četine	Enzimaska hidroliza i hidrodestilacija	HP-Innowax FSC kolona	Suve četine: 63; Sveže četine: 65	Suve četine: palmitinska kiselina (22.5%) i dekanska kiselina (12.6%); sveže četine: palmitinska kiselina (19.6%) i dekanska kiselina (19.5%)

Khan et al. (2006)	<i>T. wallichiana</i> Zucc.	Gulmarg, Džamu i Kašmir	Sveže četine	Hidrodestilacija	PE-Wax kolona	62	(<i>E</i>)-2-okten-1-ol (14.5%), <i>n</i> -pentakozan (8.1%) i kariofilen oksid (7.1%)
Radulović et al. (2010)	<i>T. baccata</i> L.	Klisura reke Jerme, Srbija	Sveže četine i grančice	Hidrodestilacija	HP-5MS kolona	62	Heksahidrofarnezil aceton (18.3%), mirtenol (18.3%) i (<i>Z</i>)-3-heksenol (6.0%)
Istraživanje u disertaciji	<i>T. baccata</i> L.	Tara, Kopaonik i Malinik, Srbija	Zamrznute četine i grančice	Hidrodestilacija	HP-5MS kolona	87	1-okten-3-ol (23.48%), (<i>Z</i>)-3-heksenol (11.46%) i mirtenol (11.38%)

Tabela br. 11. Razlike u sadržaju glavnih konstituenata etarskog ulja iz prirodnih populacija tise u Srbiji

Jedinjenje	Tara Istraživanje u disertaciji [%]	Kopaonik Istraživanje u disertaciji [%]	Malinik Istraživanje u disertaciji [%]	Jerma Radulović i sar. (2010) [%]
1-Okten-3-ol	15.56	27.55	22.18	2.3
(Z)-3-Heksenol	6.84	4.77	19.78	6.0
Mirtenol	13.30	12.88	9.22	18.3
Heksahidrofarnezil acetone	5.67	5.28	5.27	18.3
3-Metil-2- butenska kiselina	-	-	-	5.9
Trikozan	2.14	1.23	2.23	5.5

U sastavu etarskog ulja iz tri prirodne populacije u Srbiji najzastupljenije klase jedinjenja su alifatični alkoholi (43.31%), zatim terpeni (19.34%), alifatični ugljovodonici (13.18%) i alifatični aldehidi (11.09%) (Tabela br. 3 i slika br. 13). Ostale klase jedinjenja zastupljene su u manjem procentu. Neidentifikovana jedinjenja čine 1.96% ulja. Najzastupljeniju frakciju terpena čine monoterpeni (14.41%), a zatim diterpeni (2.52%). Nešto drugačija kategorizacija jedinjenja napravljena je u istraživanju Radulović i sar. (2010) gde preovlađuju terpenoidi (28.2%), derivati karotenoida (18.4%), *n*-alkani (18.4%) i isparljiva organska jedinjenja (“green leaf volatiles”) (12.0%). Monoterpeni su najzastupljenija frakcija terpenoida, sa 19.1%. Radulović i sar. (2010) nisu detektovali seskviterpene i kao mogući razlog za to navode da su seskviterpenoidi u tisi glikozidno vezani i ne isparavaju u uslovima hidrodestilacije. Međutim, u ovim istraživanjima seskviterpeni su detektovani u procentu 2.31%. Ovakve razlike u zastupljenosti pojedinih klasa jedinjenja mogu se objasniti različitim vremenom uzorkovanja materijala. Za naša istraživanja uzorkovanje je izvršeno krajem oktobra (u periodu zrelosti arilusa), dok su Radulović i sar. (2010) uzorke prikupili početkom marta. Figueiredo i sar. (1992) su dokazali da su kod *Achillea millefolium* L. seskviterpenski ugljovodonici glavne komponente etarskog ulja

u vegetativnom periodu, dok su u vreme cvetanja najzastupljeniji monoterpenski ugljovodonici.

Razlike u procentualnoj zastupljenosti između glavnih konstituenata etarskog ulja iz prirodnih populacija tise u Srbiji, na osnovu dosadašnjih istraživanja prikazane su u Tabeli br. 11.

Statistička analiza je pokazala da se prirodne populacije tise u Srbiji razlikuju prema sadržaju etarskog ulja iz četina. Zastupljenost pojedinih komponenti je različita u različitim populacijama u Srbiji. Analizom varijanse je utvrđeno da se od ukupno 17 jedinjenja koja imaju normalnu raspodelu, 8 jedinjenja statistički značajno razlikuje prema zastupljenosti među populacijama ($p < 0.05$): *n*-octanal, β -linalol, β -ciklocitral, (E)- β -jonon, eikozanal, *trans*-feruginol, trikozanal i heksakozan (Slike br. 18 i 19). Utvrđeno je da jedinke sa Tare sadrže značajno više β -linalola, eikozanala i trikozanala u etarskom ulju u odnosu na jedinke sa Kopaonika i Malinika.

Razlike u sadržaju jedinjenja koja imaju normalnu raspodelu između ženskih i muških jedinki ispitane su t-testom za nezavisne uzorke. Statistički značajne razlike između ženskih i muških jedinki su utvrđene samo za sadržaj α -pinena u populaciji Malinik i na nivou sve tri populacije zajedno (Slika br. 20).

Analiza glavnih komponenti sa 22 najzastupljenije hemijske komponente etarskog ulja je pokazala razdvajanje jedinki sa Kopaonika od jedinki sa Malinika, kao i jedinki sa Tare od jedinki sa Malinika. Na planu prve i druge glavne ose (Slika br. 21) vidljivo je razdvajanje populacija Kopaonik i Malinik u odnosu na prvu glavnu osu na čije formiranje najviše utiču 1-okten-3-ol, (E)-2-undecenal, heksahidrofarnezil aceton i abietatrien. Na planu druge i treće glavne ose (Slika br. 22) može se uočiti razdvajanje populacija Tara i Malinik u odnosu na drugu glavnu osu na čije formiranje najviše utiču 1-okten-3-on, 3-oktanon, *n*-nonanal i palmitinska kiselina. Osim toga, ova analiza je grafički prikazala hemijska jedinjenja kojima obiluju pojedine populacije. Sa grafičkih prikaza (Slike br. 21 i 22) može očitati da jedinke sa Tare obiluju sadržajem heksahidrofarnezil acetona, pentakozana, geraniola i mirtenola. Jedinke sa Kopaonika obiluju sadržajem 1-okten-3-ola, 1-okten-3-ona, 3-oktanona, *n*-nonanala, palmitinske kiseline i junicedranola. Jedinke sa Malinika obiluju sadržajem n.k. 1, (Z)-3-heksenola, fitola i heptadekana. Mann-Whitney *U* test-om ispitane su razlike u sadržaju ovih

jedinjenja. Statistički značajne razlike utvrđene su u sadržaju: pentakozana, 1-okten-3-ola, 1-okten-3-ona, 3-oktanona, *n*-nonanala, palmitinske kiseline, junicedranola, (*Z*)-3-heksenola i heptadekana između tri prirodne populacije tise u Srbiji (Slike br. 23, 24 i 25).

Na osnovu klaster analize može se zaključiti da su prema hemijskom sastavu sličnije populacije Tara i Kopaonik, dok se populacija Malinik razlikuje (Slika br. 26).

Kanonijska diskriminaciona analiza sa 22 izabrane hemijske komponente je pokazala grupisanje 47 jedinki tise u 3 grupe koje odgovaraju različitim populacijama (Slika br. 27). Prva diskriminaciona funkcija objašnjava 70.0% varijanse za ispitivane parametre i odvaja populaciju Kopaonik od populacija Tara i Malinik. Druga diskriminaciona funkcija objašnjava preostali procenat varijanse i odvaja populaciju Malinik u odnosu na populacije Tara i Kopaonik. Utvrđeno je da jedinke sa Kopaonika sadrže značajno veći procenat 1-okten-3-ona, 3-oktanona, *n*-nonanala, palmitinske kiseline, kao i značajno manji procenat (*Z*)-3-heksenola i pentakozana u etarskom ulju iz četina u odnosu na jedinke sa Tare i Malinika. Jedinke sa Malinika sadrže značajno više (*Z*)-3-heksenola, a značajno manje palmitinske kiseline i junicedranola u etarskom ulju u odnosu na druge dve ispitivane populacije.

Razlike u sadržaju izabrane 22 komponente između muških i ženskih jedinki ispitane su pomoću Mann-Whitney *U* test-a za sve tri populacije zajedno (47 jedinki). Razlike između polova prema hemijskom sastavu nisu utvrđene.

Jednofaktorska analiza varijanse, analiza glavnih komponenti i kanonijska diskriminaciona analiza su ukazale na specifičnost hemijskog sastava etarskog ulja svake od tri istraživane populacije *Taxus baccata* L. u Srbiji.

Regresionom analizom je utvrđeno da su sve nezavisne bioklimatske varijable statistički značajno korelisane sa pojedinim komponentama etarskog ulja iz četina tise. Pošto su komponente etarskog ulja isparljive, očekivano je da će njihov sadržaj zavisiti od temperature i vlažnosti vazduha. Jedinjenja koja su najjače korelisana sa bioklimatskim varijablama vezanim za temperaturu vazduha su β -linalol, 1-okten-3-on i *n*-nonanal (Tabela br. 8- 1 deo i Tabela br. 8- 2.deo). Sa dijagrama na slici (Slika br. 29) se može videti da se sa porastom maksimalne temperature u oktobru (t_{max_okt}) i u jesenjim mesecima (t_{max_jes}) i sa povećanjem godišnjeg temperaturnog opsega (BIO7)

povećava sadržaj monoterpena β -linalola u populacijama. Sa porastom minimalne temperature najhladnijeg perioda (BIO6), minimalne temperature za oktobar (t_{min_okt}) i minimalne temperature za jesenje mesece (t_{min_jes}) se povećava sadržaj ketona 1-okten-3-ona i aldehida *n*-nonanala (Slika br. 30) u populacijama. Sa porastom sezonskih varijacija u temperaturi (BIO4), sadržaj (*Z*)-3-heksenola raste, a sadržaj β -ciklocitrala opada (Slika br. 32).

Jedinjenja koja su najjače korelisana sa bioklimatskim varijablama vezanim za količinu padavina su (*Z*)-3-heksenol i β -ciklocitral (Tabela br. 9). Alkohol (*Z*)-3-heksenol i monoterpen β -ciklocitral su najjače korelisani sa količinom padavina u najvlažnijem periodu (BIO13), količinom padavina u najsuvljem kvartalu (BIO17) i sezonskim varijacijama u količini padavina (BIO15), ali pokazuju suprotne trendove u odnosu na ove varijable (Slika br. 31).

Utvrđene su značajne korelacije za nadmorsku visinu i sadržaja velikog broja analiziranih jedinjenja. Na dijagramu (Slika br. 33) su prikazane linearne zavisnosti sadržaja (*Z*)-3-heksenola, 1-okten-3-ona i *n*-nonanala od nadmorske visine.

Regresiona analiza je identifikovala konstituente etarskog ulja tise koji pokazuju najjaču linearnu zavisnost od bioklimatskih faktora i koji pritom predstavljaju potencijalne hemijske markere za geografsku diferencijaciju populacija. Pretpostavka je da su sadržaji β -linalola, 1-okten-3-ona, *n*-nonanala, (*Z*)-3-heksenola i β -ciklocitrala pod jakim uticajem abiotičkih faktora (klimatskih karakteristika i nadmorske visine), dok su sadržaji ostalih komponenti, koji se takođe značajno razlikuju među istraživanim populacijama, verovatno pod jačim uticajem biotičkih faktora.

5.3. REZULTATI ISPITIVANJA MORFOLOŠKIH KARAKTERISTIKA ČETINA *Taxus baccata* L.

5.3.1. Morfološke karakteristike četina *Taxus baccata* L. u populacijama u Srbiji

Površina četina snimljena je na skenirajućem elektronskom mikroskopu sa uvećanjima 150x i 1200x i prikazana na slikama br. 34, 35 i 36. Pregled morfoloških karakteristika i osnovnih statističkih parametara dat je u tabeli br. 12.

Prosečna dužina četina *Taxus baccata* L. za prirodne populacije u Srbiji iznosi 22.14 mm. Dužina četina je veća kod ženskih jedinki (22.79 mm) nego kod muških (21.50 mm). Najduže četine imaju jedinke iz populacije Tara (23.96 mm), zatim iz populacije Malinik (23.10 mm), a najkraće jedinke sa Kopaonika (20.59 mm). U sve tri prirodne populacije ženske jedinke imaju u proseku duže četine od muških. U populaciji Tara, dužina četina kod ženskih jedinki iznosi 26.61 mm, a kod muških 21.98 mm. U populaciji Malinik, prosečna dužina četina kod ženskih i muških jedinki iznosi 23.80 mm i 22.40 mm, respektivno. Na Kopaoniku, dužina četina kod ženskih jedinki iznosi u proseku 20.74 mm, dok je kod muških nešto manja (20.44 mm). Variranje u dužini četina najveće je u populaciji Tara ($S=4.28$).

Prosečna širina četina *Taxus baccata* L. za prirodne populacije u Srbiji iznosi 2.35 mm, i veća je kod ženskih (2.36 mm) nego kod muških jedinki (2.33 mm). U proseku, najveću širinu četina imaju jedinke sa Tare (2.53 mm), zatim sa Malinika (2.40 mm) i na kraju jedinke sa Kopaonika (2.23 mm). U populaciji Tara, ženske jedinke imaju šire četine (2.67 mm) od muških (2.42 mm). Širina četina muških jedinki sa Malinika (2.41 mm) je nešto veća od ženskih (2.40 mm). Na Kopaoniku širina četina kod ženskih jedinki (2.24 mm) je nešto veća nego kod muških (2.22 mm). Variranje u širini četina najveće je u populaciji Tara ($S=0.27$).

Prosečna površina četina *Taxus baccata* L. za prirodne populacije u Srbiji iznosi 47.18 mm², i veća je kod ženskih (49.24 mm²) nego kod muških jedinki (45.19 mm²). Proporcionalno dužini i širini četina, površina četina najveća je za populaciju Tara (54.83 mm²), zatim Malinik (49.58 mm²), i na kraju Kopaonik (42.34 mm²). Ženske jedinke sa Tare imaju u proseku veću površinu četina (64.09 mm²) od muških jedinki

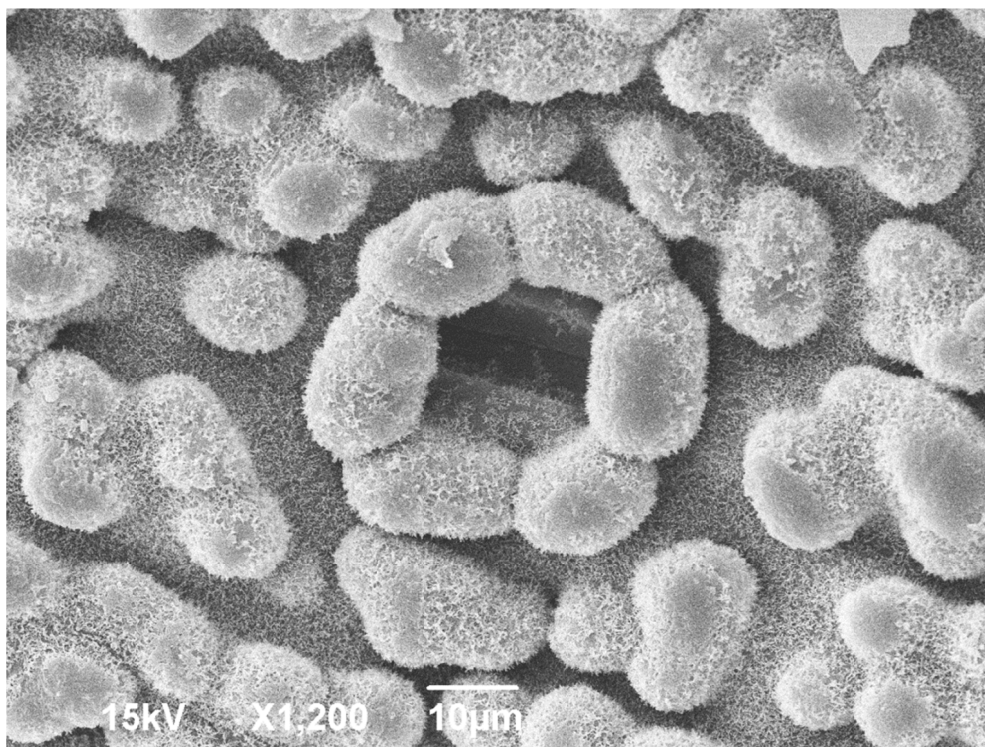
(47.89 mm²). Ženske jedinke sa Malinika imaju veću površinu četina (51.31 mm²) od muških (47.84 mm²). Takođe, u populaciji Kopaonik, veću površinu u proseku imaju ženske jedinke (43.12 mm²) u odnosu na muške (41.56 mm²). Variranje u površini četina najveće je u populaciji Tara ($S=14.36$).

Prosečan odnos dužine i širine četina za prirodne populacije tise u Srbiji je 9.47, i veći je kod ženskih (9.68) nego kod muških (9.26) jedinki. Odnos dužine i širine četine najveći je za populaciju Malinik (9.64), zatim Tara (9.49) i na kraju Kopaonik (9.29). U populaciji Malinik, odnos dužine i širine četina veći je kod ženskih jedinki i iznosi 9.94. Kod muških jedinki iz iste populacije iznosi 9.33. Ženske jedinke sa Tare karakteriše veći odnos dužine i širine četine (9.99) u odnosu na muške jedinke (9.12). Isto važi i za populaciju Kopaonik, ženske jedinke imaju veći odnos dužine i širine četine (9.33) u odnosu na muške (9.24). Odnos dužine i širine četina najviše varira u populaciji Tara ($S=1.44$).

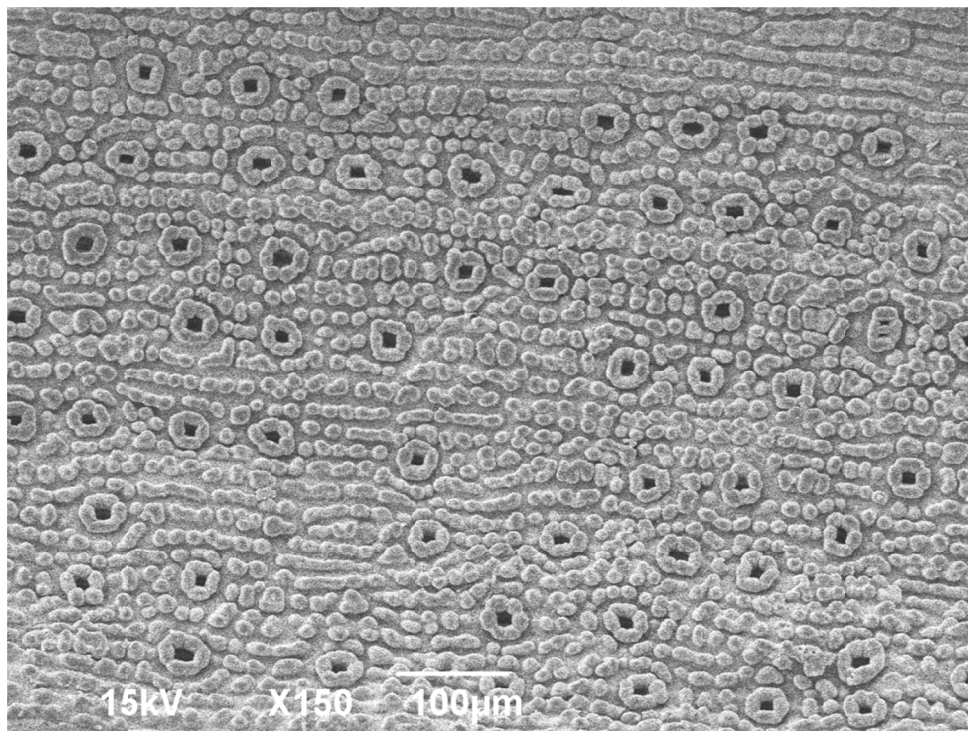
Prosečna specifična površina četina za prirodne populacije tise u Srbiji iznosi 42.89 cm²/g, i veća je kod ženskih (44.76 cm²/g) nego kod muških (41.08 cm²/g) jedinki. U proseku, najveću specifičnu površinu četina imaju jedinke iz populacije Tara (49.85 cm²/g), zatim Malinik (45.07 cm²/g), a najmanju jedinke sa Kopaonika (38.49 cm²/g). Na Tari, specifična površina četina za ženske jedinke iznosi 58.26 cm²/g, a za muške 43.54 cm²/g. Na Malniku, specifična površina četina za ženske jedinke iznosi 46.65 cm²/g, a za muške 43.49 cm²/g. Specifična površina četina kod ženskih jedinki sa Kopaonika iznosi 39.20 cm²/g, a kod muških 37.78 cm²/g. Variranje u specifičnoj površini četina najveće je u populaciji Tara ($S=12.10$).

Broj redova stoma za prirodne populacije tise iz Srbije u proseku iznosi 8.5. Ženske jedinke imaju 6-13 redova stoma, a muške 6-12 redova. Srednja vrednost za broj redova stoma je najveća za populaciju Malinik (8.88), zatim Taru (8.62) i na kraju Kopaonik (8.09). U populacijama Tara i Kopaonik izmereno je od 6 do 12 redova stoma, a u populaciji Malinik od 6 do 13. Kod muških jedinki sa Tare ovaj opseg se kreće od 6 do 10 redova, a kod ženskih od 7 do 12. Kod muških jedinki sa Kopaonika izmereno je od 6 do 12 redova stoma na jednoj polovini četine, dok se kod ženskih ovaj opseg kreće od 6 do 11. U populaciji Malinik, za muške jedinke izmereno je od 7 do 11 redova stoma, a za ženske od 6 do 13. Najveće variranje u broju redova stoma zabeleženo je u populaciji Tara ($S=1.28$).

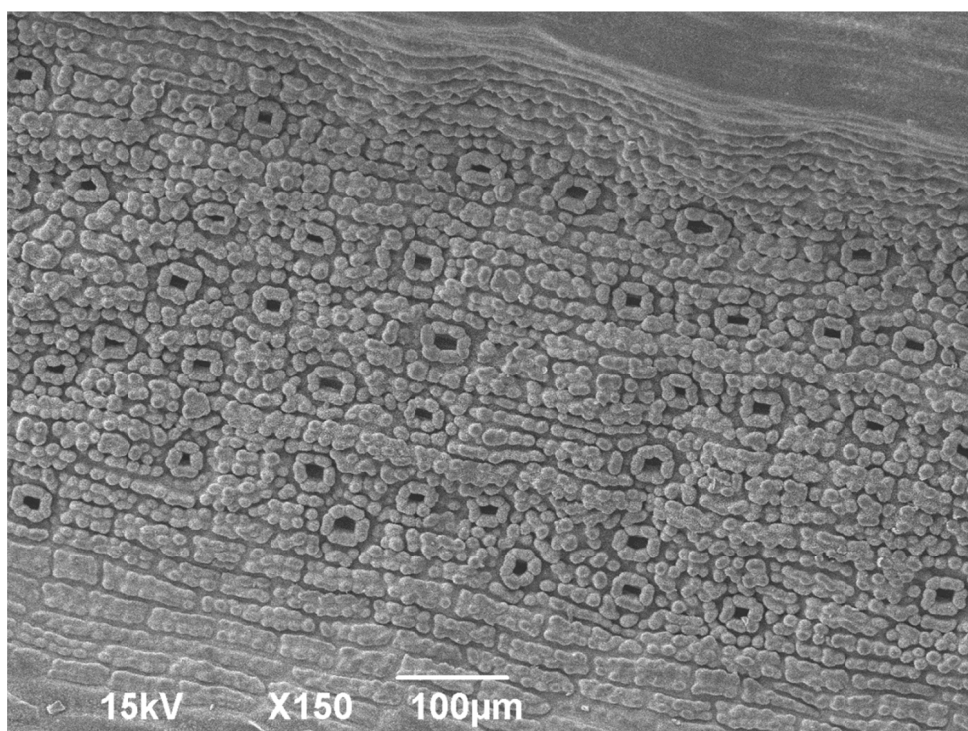
Prosečna gustina stoma u prirodnim populacijama tise u Srbiji iznosi 135.16 mm² i veća je kod ženskih (137.67 mm²) nego kod muških (132.76 mm²) jedinki. Najveća je u populaciji Malinik (138.78 mm²), zatim Kopaonik (133.54 mm²), a najmanja u populaciji Tara (128.91 mm²). U populaciji Malinik, veću gustinu stoma imaju ženske jedinke (141.48 mm²) u odnosu na muške (136.08 mm²). U populaciji Kopaonik, veću gustinu stoma imaju takođe ženske jedinke (134.66 mm²) u odnosu na muške (132.42 mm²). I u populaciji Tara, ženske jedinke imaju u proseku veću gustinu četina (131.25 mm²) od muških (127.15 mm²). Gustina stoma najviše varira u populaciji Kopaonik ($S=23.51$).



Slika br. 34. SEM-prikaz stominog otvora okruženim „Florinovim prstenom“ i susedne papilarne ćelije



Slika br. 35. SEM-prikaz površine naličja dvogodišnje četine *Taxus baccata* L. sa jednog ženskog stabla iz populacije Kopaonik



Slika br. 36. SEM-prikaz površine naličja dvogodišnje četine *Taxus baccata* L. sa jednog muškog stabla iz populacije Kopaonik

Tabela br. 12. Deskriptivna statistika morfoloških karakteristika dvogodišnjih četina *Taxus baccata* L. u populacijama u Srbiji

Morfološke karakteristike	Statistički parametri	Tara I			Kopaonik II			Malinik III			I - III		
		M	Ž	M + Ž	M	Ž	M + Ž	M	Ž	M + Ž	M	Ž	M + Ž
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Dužina četine (mm)	n	200	150	350	550	550	1100	550	550	1100	1300	1250	2550
	min	16.31	16.74	16.31	14.11	14.77	14.11	15.33	17.33	15.33	14.11	14.77	14.11
	max	28.83	40.21	40.21	28.24	28.08	28.24	30.80	30.86	30.86	30.80	40.21	40.21
	opseg	12.52	23.47	23.90	14.13	13.31	14.13	15.47	13.53	15.53	20.54	25.44	26.10
	\bar{X}	21.98	26.61	23.96	20.44	20.74	20.59	22.40	23.80	23.10	21.50	22.79	22.14
	S	2.97	4.33	4.28	3.02	2.22	2.66	3.00	2.73	2.95	2.72	2.72	2.77
	S\bar{X}	0.21	0.35	0.23	0.13	0.09	0.08	0.13	0.12	0.09	0.08	0.08	0.05
Širina četine (mm)	n	200	150	350	550	550	1100	550	550	1100	1300	1250	2550
	min	1.88	2.18	1.88	1.67	1.72	1.67	2.01	1.91	1.91	1.67	1.72	1.67
	max	2.89	3.18	3.18	2.87	2.77	2.87	2.93	3.20	3.20	3.18	3.20	3.20
	opseg	1.02	1.00	1.30	1.20	1.05	1.20	0.92	1.29	1.29	1.51	1.48	1.53
	\bar{X}	2.42	2.67	2.53	2.22	2.24	2.23	2.41	2.40	2.40	2.33	2.36	2.35
	S	0.25	0.24	0.27	0.22	0.22	0.22	0.16	0.22	0.19	0.19	0.23	0.21
	S\bar{X}	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
Površina četine (mm ²)	n	200	150	350	550	550	1100	550	550	1100	1300	1250	2550
	min	29.57	31.68	29.57	25.74	26.02	25.74	29.28	32.08	29.28	25.74	26.02	25.74
	max	68.51	98.04	98.04	63.85	67.56	67.56	71.27	78.65	78.65	96.55	98.04	98.04
	opseg	38.95	66.36	68.47	38.11	41.54	41.82	41.99	46.57	49.37	70.81	72.02	72.30
	\bar{X}	47.89	64.09	54.83	41.56	43.12	42.34	47.84	51.31	49.58	45.19	49.24	47.18
	S	9.73	14.34	14.36	8.83	7.10	8.05	7.95	9.33	8.84	8.05	9.90	9.14
	S\bar{X}	0.69	1.17	0.77	0.38	0.30	0.24	0.34	0.40	0.27	0.22	0.28	0.18

Odnos dužina/širina četine	n	200	150	350	550	550	1100	550	550	1100	1300	1250	2550
	min	6.39	7.19	6.39	5.35	5.68	5.35	5.97	7.45	5.97	5.35	5.68	5.35
	max	12.54	15.47	15.47	12.29	13.42	13.42	12.88	13.15	13.15	12.88	15.47	15.47
	opseg	6.15	8.28	9.08	6.94	7.74	8.07	6.91	5.70	7.18	7.53	9.79	10.12
	\bar{X}	9.12	9.99	9.49	9.24	9.33	9.29	9.33	9.94	9.64	9.26	9.68	9.47
	S	1.26	1.52	1.44	1.16	1.30	1.23	1.31	1.08	1.26	0.97	0.85	0.93
	$S_{\bar{X}}$	0.09	0.12	0.08	0.05	0.06	0.04	0.06	0.05	0.04	0.03	0.02	0.02
Specifična površina četina (cm²/g)	n	200	150	350	550	550	1100	550	550	1100	1300	1250	2550
	min	34.28	45.06	34.28	29.93	33.02	29.93	34.91	34.29	34.29	29.93	33.02	29.93
	max	52.09	68.49	68.49	50.28	48.55	50.28	53.86	58.89	58.89	53.86	68.49	68.49
	opseg	17.81	23.43	34.21	20.35	15.53	20.35	18.95	24.61	24.61	23.93	35.47	38.56
	\bar{X}	43.54	58.26	49.85	37.78	39.20	38.49	43.49	46.65	45.07	41.08	44.76	42.89
	S	8.49	11.99	12.10	7.16	4.96	6.06	6.33	6.95	6.68	7.31	9.00	8.31
	$S_{\bar{X}}$	0.60	0.98	0.65	0.31	0.21	0.18	0.27	0.30	0.20	0.20	0.25	0.16
Broj redova stoma na jednoj polovini četine	n	80	60	140	220	220	440	220	220	440	520	500	1020
	min	6	7	6	6	6	6	7	6	6	6	6	6
	max	10	12	12	12	11	12	11	13	13	12	13	13
	opseg	4	5	6	6	5	6	4	7	7	6	7	7
	\bar{X}	7.96	9.50	8.62	8.09	8.09	8.09	8.84	8.91	8.88	8.42	8.68	8.50
	S	1.02	1.05	1.28	1.11	1.12	1.11	1.05	1.22	1.14	0.79	1.00	0.85
	$S_{\bar{X}}$	0.11	0.14	0.11	0.08	0.08	0.05	0.07	0.08	0.05	0.03	0.04	0.03
Gustina stoma (po mm²)	n	120	90	210	330	330	660	330	330	660	780	750	1530
	min	87.50	81.25	81.25	81.25	81.25	81.25	75.00	93.75	75.00	75.00	81.25	75.00
	max	168.75	193.75	193.75	206.25	206.25	206.25	212.50	225.00	225.00	212.50	225.00	225.00
	opseg	81.25	112.50	112.50	125.00	125.00	125.00	137.50	131.25	150.00	137.50	143.75	150.00
	\bar{X}	127.15	131.25	128.91	132.42	134.66	133.54	136.08	141.48	138.78	132.76	137.67	135.16
	S	17.03	21.32	19.05	23.56	23.45	23.51	21.42	23.28	22.52	12.84	13.78	13.40
	$S_{\bar{X}}$	1.55	2.25	1.31	1.30	1.29	0.92	1.18	1.28	0.88	0.46	0.50	0.34

M = muške jedinke; Ž = ženske jedinke; \bar{X} = srednja vrednost; **S** = standardna devijacija; $S_{\bar{X}}$ = standardna greška srednje vrednosti

5.3.2. Unutar i među-populaciona varijabilnost morfoloških karakteristika četina tise

Varijabilnost morfoloških karakteristika četina tise iz tri prirodne populacije u Srbiji ispitana je sledećim analizama: jednofaktorskom i dvofaktorskom analizom varijanse, Kruskal-Wallis testom, analizom glavnih komponenti i klaster analizom.

Razlike između srednjih vrednosti populacija za pojedina svojstva ispitivane su analizom varijanse. Normalnost raspodele morfoloških karakteristika ispitana je χ^2 testom ($p \geq 0.05$) u programu STATISTICA 10. Merena svojstva, osim površine četina, imaju normalnu raspodelu.

Dvofaktorskom analizom varijanse je ispitan uticaj populacije (geografskog porekla) i pola na dužinu četina, širinu četina, odnos dužine i širine, specifičnu površinu četina i broj redova stoma na jednoj polovini četina. Uticaj populacije (geografskog porekla) na gustinu stoma ispitan je jednofaktorskom analizom varijanse.

Analiza je pokazala da je uticaj populacije (geografskog porekla) na dužinu četina različit kod ženskih i muških individua ($p=0.000$, $p<0.001$) (Tabela br. 13). Bonferroni testom ispitane su razlike između grupa.

Tabela br. 13. Dvofaktorska analiza varijanse za uticaj faktora populacije i pola na dužinu četina *Taxus baccata* L.

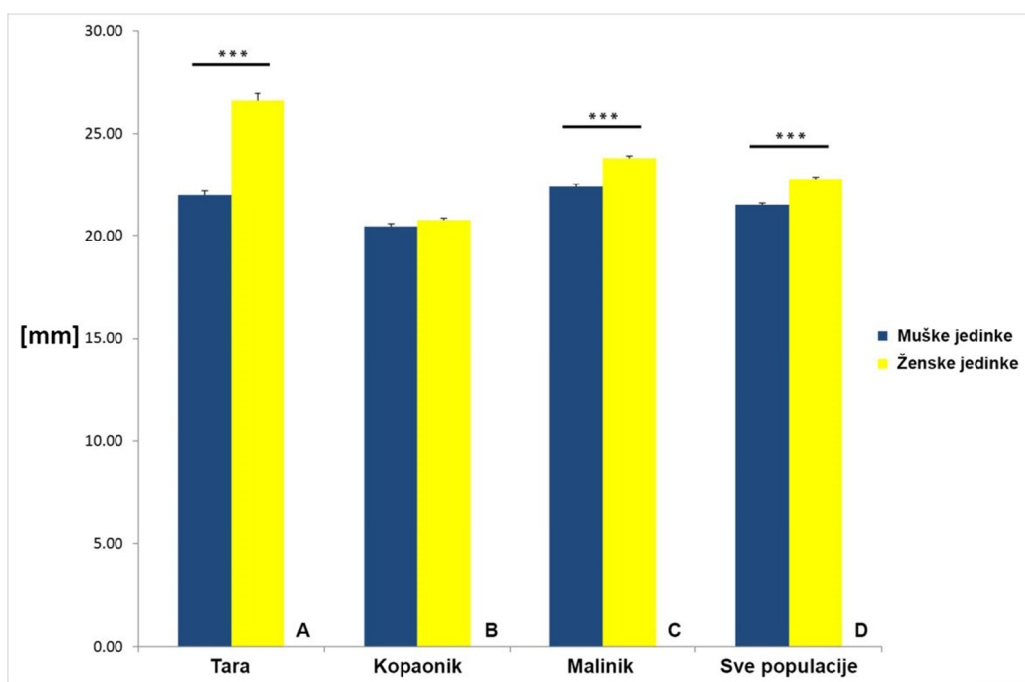
Izvori variranja	SS	df	MS	F	<i>p</i>
Populacija	5241.3	2	2620.6	312.7	0.0000
Pol	2123.2	1	2123.2	253.3	0.0000
Populacija x Pol	1223.9	2	612.0	73.0	0.0000
Greška	21313.5	2543	8.4		
Total	29901.9	2548			

Analizom je utvrđeno da se muške i ženske jedinke na nivou sve tri populacije značajno razlikuju prema dužini četina ($p=0.000$) (Slika br. 37 D). Statistički značajne razlike u dužini četina između ženskih i muških jedinki ustanovljene su u populacijama

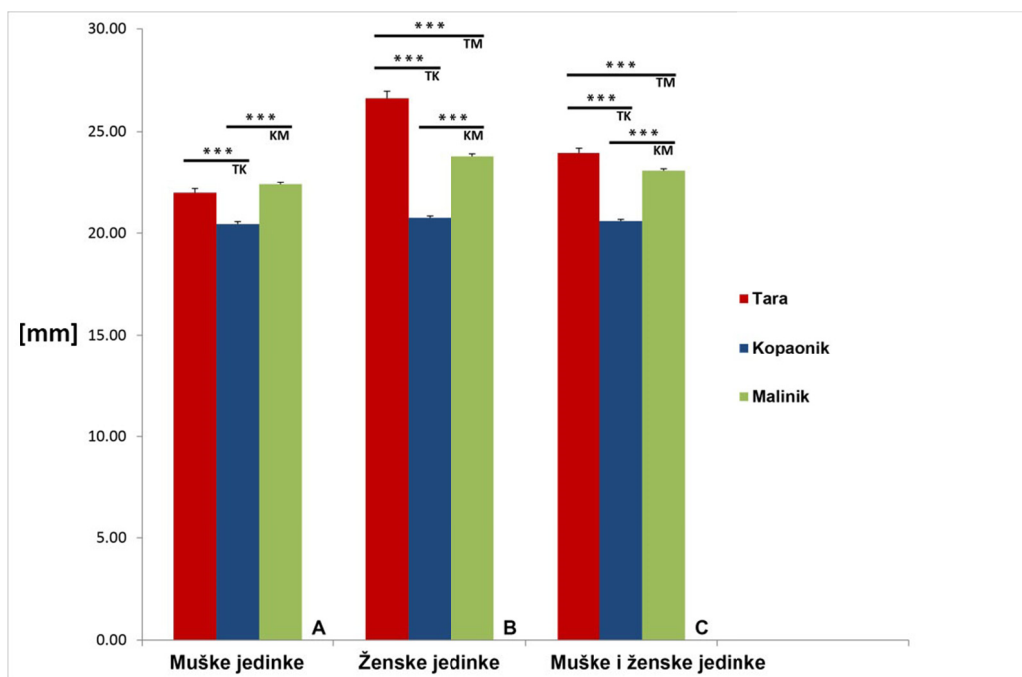
Tara i Malinik ($p=0.000$). Ženske jedinke u populacijama Tara i Malinik imaju značajno duže četine od muških (Slika br. 37 A i C).

Takođe, utvrđeno je da se populacije međusobno značajno razlikuju prema dužini četina ($p=0.000$). Jedinke sa Tare imaju značajno duže četine od jedinki sa Kopaonika ($p=0.000$) i Malinika ($p=0.000$). Jedinke sa Kopaonika imaju značajno kraće četine u odnosu na jedinke sa Malinika ($p=0.000$) (Slika br. 38 C).

Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da muške jedinke sa Tare imaju značajno duže četine od muških jedinki sa Kopaonika ($p=0.000$). Muške jedinke sa Kopaonika imaju značajno kraće četine od muških jedinki sa Malinika ($p=0.000$) (Slika br. 38 A). Ženske jedinke sa Tare imaju značajno duže četine od ženskih jedinki sa Kopaonika ($p=0.000$) i Malinika ($p=0.000$). Ženske jedinke sa Kopaonika imaju značajno kraće četine od ženskih jedinki sa Malinika ($p=0.000$) (Slika br. 38 B).



Slika br. 37. Razlike u dužini četina *Taxus baccata* L. između muških i ženskih jedinki u populacijama u Srbiji (ANOVA: *** $p<0.001$)



Slika br. 38. Uticaj populacije (geografskog porekla) na dužinu četina *Taxus baccata* L. kod muških i ženskih jedinki (ANOVA: *** $p < 0.001$; TK – razlike između populacija Tara i Kopaonik, TM – razlike između populacija Tara i Malinik, KM – razlike između populacija Kopaonik i Malinik)

Dvofaktorskom analizom varijanse je utvrđeno da je uticaj populacije (geografskog porekla) na širinu četine *Taxus baccata* L. različit kod ženskih i muških individua ($p = 0.000$, $p < 0.001$) (Tabela br. 14). Bonferroni testom ispitane su razlike između grupa.

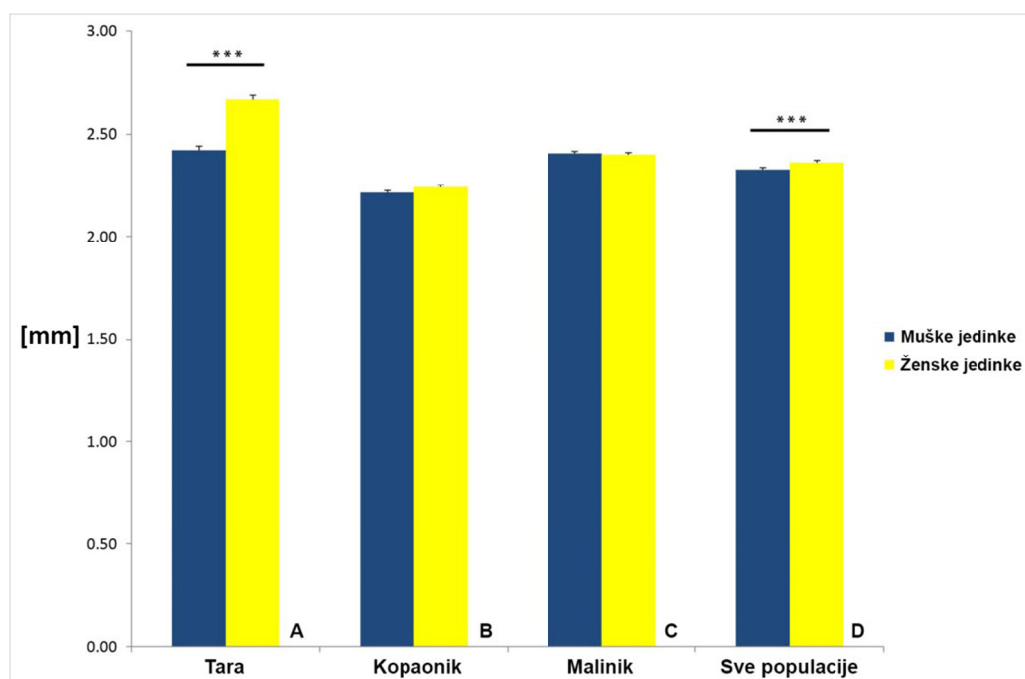
Tabela br. 14. Dvofaktorska analiza varijanse za uticaj faktora populacije i pola na širinu četina *Taxus baccata* L.

Izvori variranja	SS	df	MS	F	<i>p</i>
Populacija	32.30	2	16.15	355.1	0.0000
Pol	3.72	1	3.72	81.7	0.0000
Populacija x Pol	4.20	2	2.10	46.2	0.0000
Greška	115.67	2543	0.05		
Total	155.86	2548			

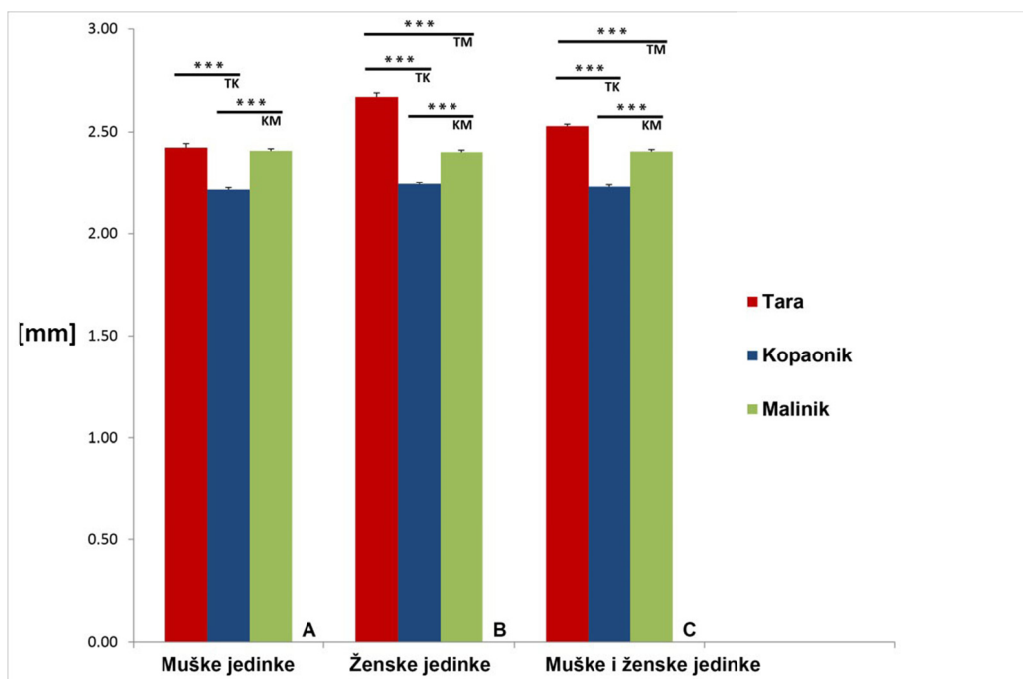
Analizom je utvrđeno da se muške i ženske jedinke značajno razlikuju prema širini četine ($p=0.000$) (Slika br. 39 D). Statistički značajne razlike u širini četina između ženskih i muških jedinki ustanovljene su u populaciji Tara ($p=0.000$). Ženske jedinke sa Tare imaju značajno šire četine od muških (Slika br. 39 A).

Utvrđeno je da se populacije međusobno značajno razlikuju prema širini četine ($p=0.000$). Jedinke sa Tare imaju značajno šire četine od jedinki sa Kopaonika ($p=0.000$) i Malinika ($p=0.000$). Jedinke sa Kopaonika imaju značajno uže četine od jedinki sa Malinika ($p=0.000$) (Slika br. 40 C).

Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da muške jedinke sa Tare imaju značajno šire četine od muških jedinki sa Kopaonika ($p=0.000$), dok muške jedinke sa Kopaonika imaju značajno uže četine od muških jedinki sa Malinika ($p=0.000$) (Slika br. 40 A). Ženske jedinke sa Tare imaju značajno šire četine od ženskih jedinki sa Kopaonika ($p=0.000$) i Malinika ($p=0.000$). Ženske jedinke sa Kopaonika imaju značajno uže četine od ženskih jedinki sa Malinika ($p=0.000$) (Slika br. 40 B).



Slika br. 39. Razlike u širini četina *Taxus baccata* L. između muških i ženskih jedinki u populacijama u Srbiji (ANOVA: *** $p<0.001$)



Slika br. 40. Uticaj populacije (geografskog porekla) na širinu četinina *Taxus baccata* L. kod muških i ženskih jedinke (ANOVA: *** $p < 0.001$; TK – razlike između populacija Tara i Kopaonik, TM – razlike između populacija Tara i Malinik, KM – razlike između populacija Kopaonik i Malinik)

Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da je uticaj populacije (geografskog porekla) na odnos dužine i širine četinina *Taxus baccata* L. različit kod ženskih i muških individua ($p = 0.000$, $p < 0.001$) (Tabela br. 15). Bonferroni testom ispitane su razlike između grupa.

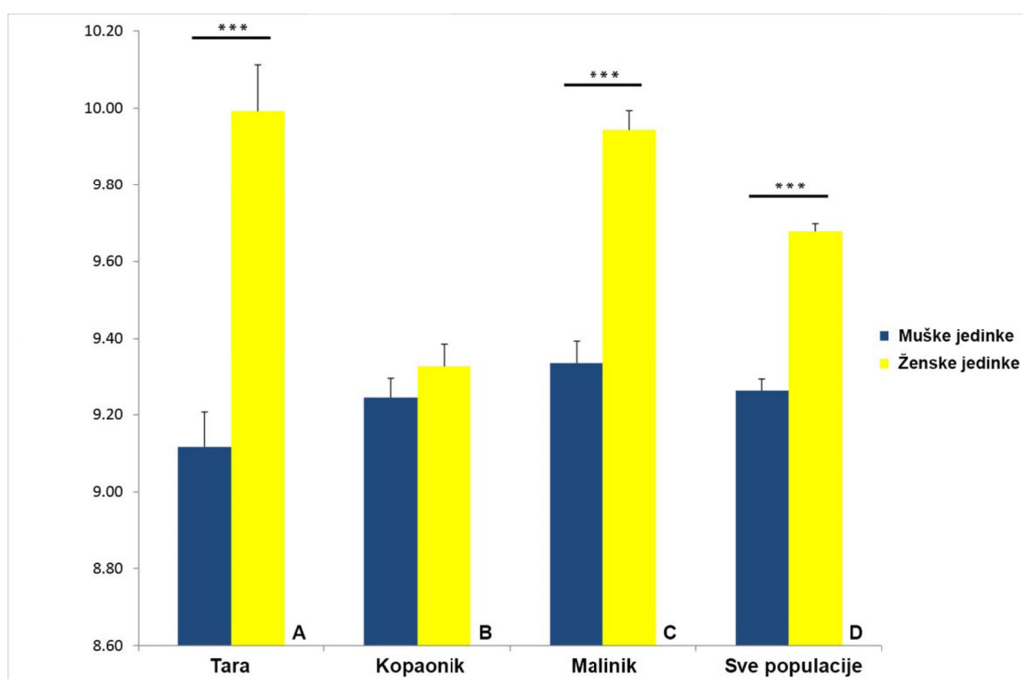
Tabela br. 15. Dvofaktorska analiza varijanse za uticaj faktora populacije i pola na odnos dužine i širine četinina *Taxus baccata* L.

Izvori variranja	SS	df	MS	F	<i>p</i>
Populacija	108.2	2	54.1	35.2	0.0000
Pol	161.3	1	161.3	105.0	0.0000
Populacija x Pol	83.3	2	41.7	27.1	0.0000
Greška	3905.3	2543	1.5		
Total	4258.1	2548			

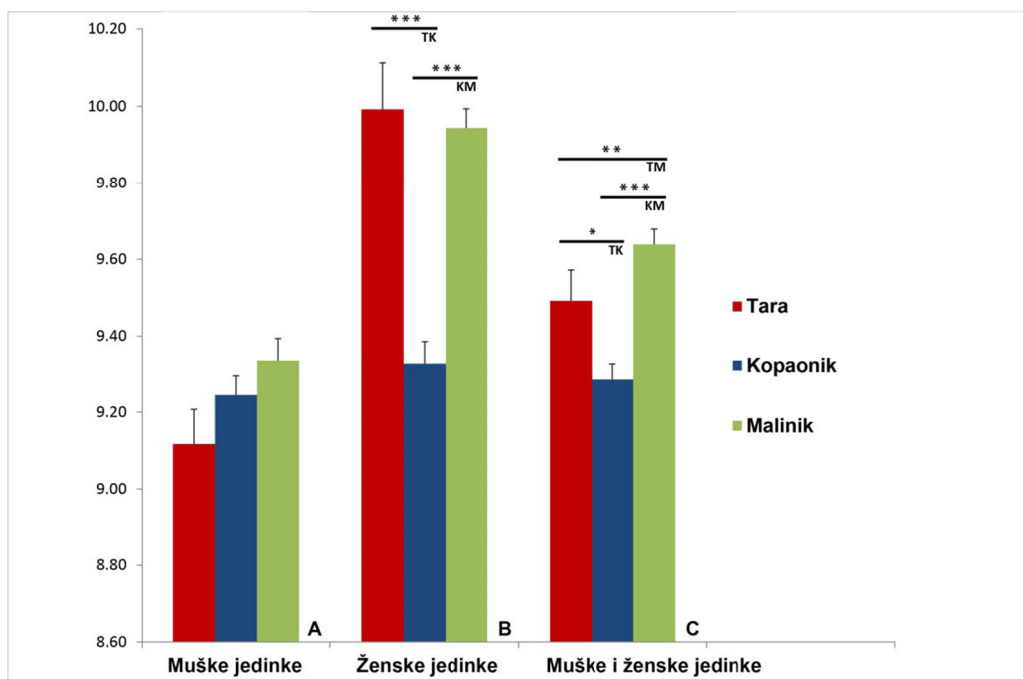
Utvrđeno je da se muške i ženske jedinke na nivou sve tri populacije značajno razlikuju prema odnosu dužine i širine četina ($p=0.000$). Kod ženskih jedinki je ovaj odnos značajno veći (Slika br. 41). Statistički značajne razlike u odnosu dužine i širine četina između ženskih i muških jedinki ustanovljene su u populacijama Tara i Malinik. U obe populacije ovaj odnos je značajno veći kod ženskih jedinki ($p=0.000$) (Slika br. 41 A i C).

Takođe, utvrđeno je da se populacije međusobno značajno razlikuju prema odnosu dužine i širine četine ($p=0.000$). Odnos između dužine i širine četina je značajno veći za populaciju Tara u odnosu na populaciju Kopaonik ($p=0.027$). Jedinke sa Malinika imaju značajno veći odnos dužine i širine četina od jedinki sa Tare ($p=0.007$) i Kopaonika ($p=0.000$) (Slika br. 42 C).

Dvofaktorskom analizom varijanse je utvrđeno da je odnos između dužine i širine četina kod ženskih jedinki sa Tare statistički značajno veći nego kod ženskih jedinki sa Kopaonika. Kod ženskih jedinki sa Kopaonika je ovaj odnos značajno manji nego kod ženskih jedinki sa Malinika ($p=0.000$) (Slika br. 42 B).



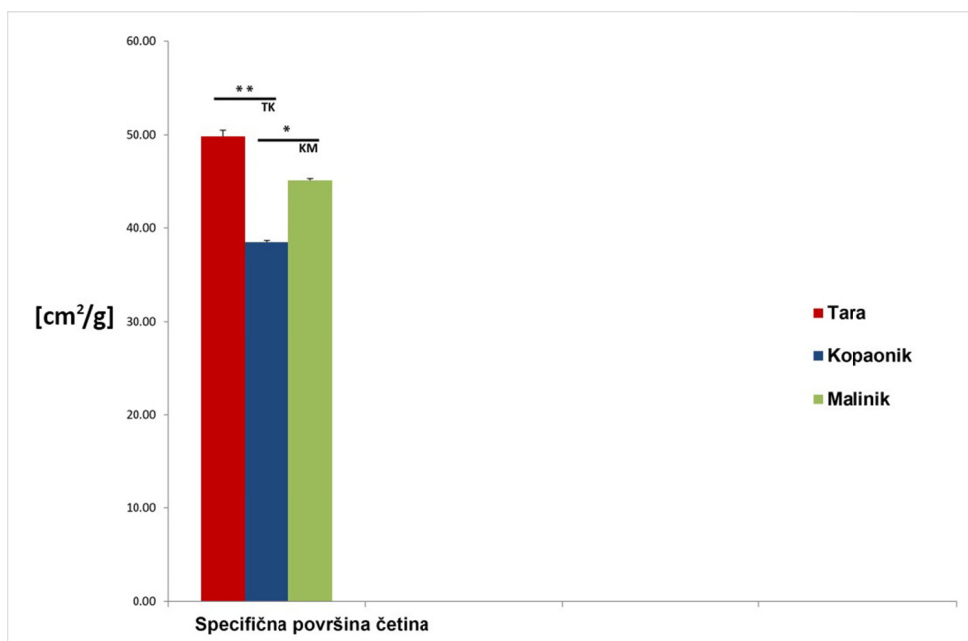
Slika br. 41. Razlike u odnosu dužine i širine četina *Taxus baccata* L. između muških i ženskih jedinki u populacijama u Srbiji (ANOVA: *** $p<0.001$)



Slika br. 42. Razlike u odnosu dužine i širine četina *Taxus baccata* L. između muških i ženskih jedinki u populacijama u Srbiji (ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; TK – razlike između populacija Tara i Kopaonik, TM – razlike između populacija Tara i Malinik, KM – razlike između populacija Kopaonik i Malinik)

Jednofaktorskom analizom varijanse je utvrđeno da se populacije tise u Srbiji značajno razlikuju prema specifičnoj površini četina ($p=0.000$, $p < 0.001$). Jedinke sa Tare imaju značajno veću specifičnu površinu četina od jedinki sa Kopaonika ($p=0.002$). Jedinke sa Kopaonika imaju značajno manju specifičnu površinu četina od jedinki sa Malinika ($p=0.014$) (Slika br. 43).

Statistički značajne razlike između muških i ženskih jedinki prema specifičnoj površini četina nisu utvrđene.



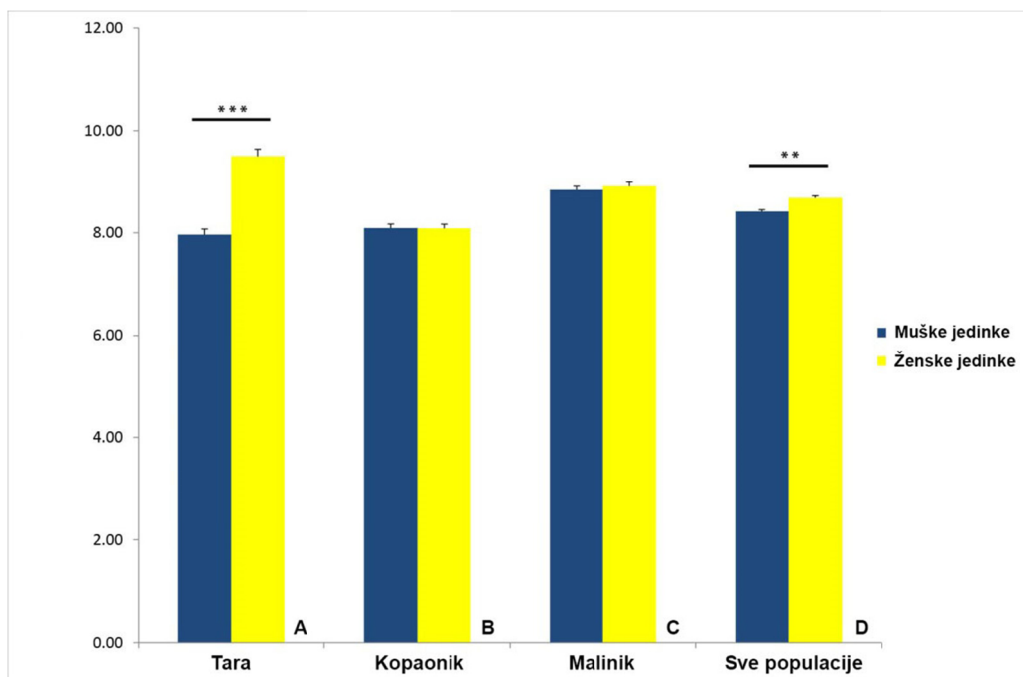
Slika br. 43. Razlike u specifičnoj površini četina *Taxus baccata* L. u populacijama u Srbiji (ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; TK – razlike između populacija Tara i Kopaonik, TM – razlike između populacija Tara i Malinik, KM – razlike između populacija Kopaonik i Malinik)

Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da je uticaj populacije (geografskog porekla) na broj redova stoma na jednoj polovini četine *Taxus baccata* L. različit kod ženskih i muških jedinki ($p = 0.000$, $p < 0.001$) (Tabela br. 16). Razlike između grupa ispitane su Bonferroni testom.

Tabela br. 16. Dvofaktorska analiza varijanse za uticaj faktora populacije i pola na broj redova stoma na jednoj polovini četine *Taxus baccata* L.

Izvori variranja	SS	df	MS	F	<i>p</i>
Populacija	144.14	2	72.07	57.99	0.0000
Pol	54.45	1	54.45	43.81	0.0000
Populacija x Pol	67.37	2	33.69	27.11	0.0000
Greška	1260.22	1014	1.24		
Total	57312.04	1019			

Utvrđeno je da se muške i ženske jedinke na nivou sve tri populacije značajno razlikuju prema broju redova stoma na jednoj polovini četine ($p=0.002$) (Slika br. 44 D). Statistički značajne razlike u broju redova stoma na jednoj polovini četine između ženskih i muških jedinki ustanovljene su u populaciji Tara ($p=0.000$). Ženske jedinke sa Tare imaju značajno veći broj redova stoma na jednoj polovini četine od muških (Slika br. 44 A).

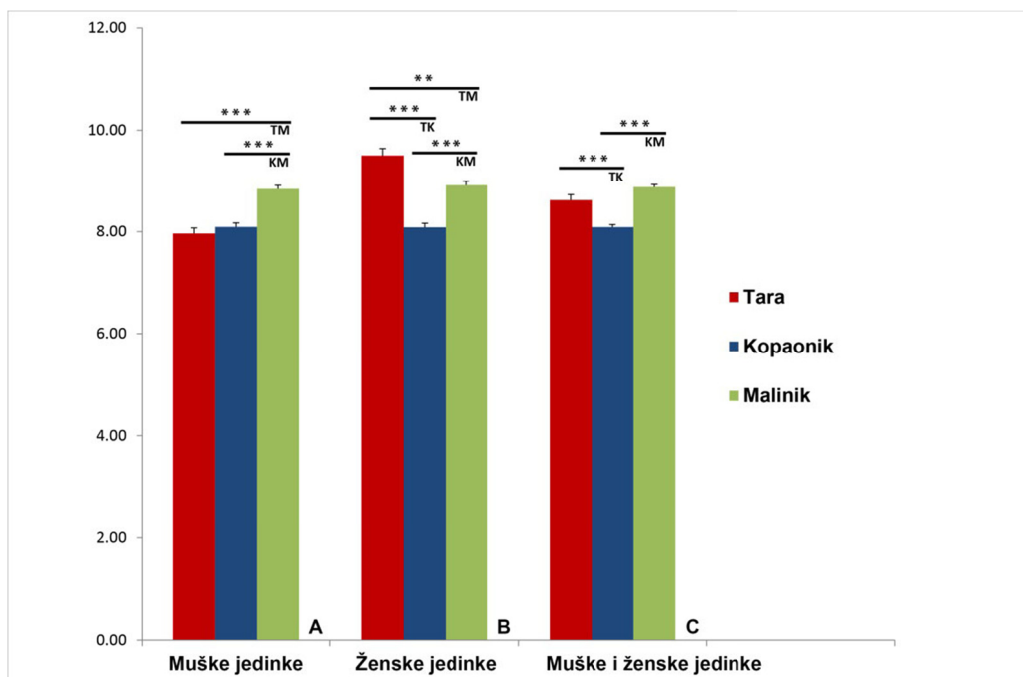


Slika br. 44. Razlike u broju redova stoma na jednoj polovini četine *Taxus baccata* L. između muških i ženskih jedinki u populacijama u Srbiji (ANOVA: ** $p<0.01$, *** $p<0.001$)

Takođe, populacije u Srbiji se međusobno značajno razlikuju prema ovom morfološkom parametru ($p=0.000$). Broj redova stoma na jednoj polovini četine je značajno veći kod jedinki sa Tare u odnosu na jedinke sa Kopaonika ($p=0.000$). Jedinke sa Kopaonika imaju značajno manji broj redova stoma u odnosu na jedinke sa Malinika ($p=0.000$) (Slika br. 45 C).

Dvofaktorskom analizom ustanovljeno je da muške jedinke sa Malinika imaju statistički značajno veći broj redova stoma na jednoj polovini četine u odnosu na muške jedinke sa Tare ($p=0.000$) i Kopaonika ($p=0.000$) (Slika br. 45 A). Ženske jedinke sa Tare imaju statistički značajno veći broj redova stoma na jednoj polovini četine u

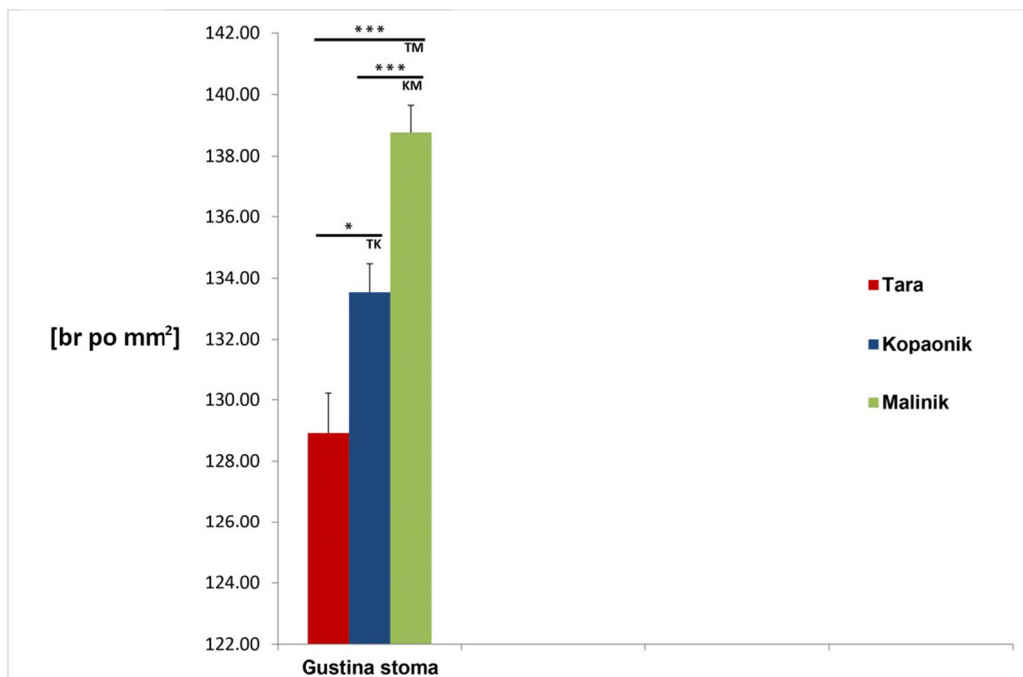
odnosu na ženske jedinke sa Kopaonika ($p=0.000$) i Malinika ($p=0.005$). Ženske jedinke sa Kopaonika imaju značajno manji broj redova stoma u odnosu na jedinke sa Malinika ($p=0.000$) (Slika br. 45 B).



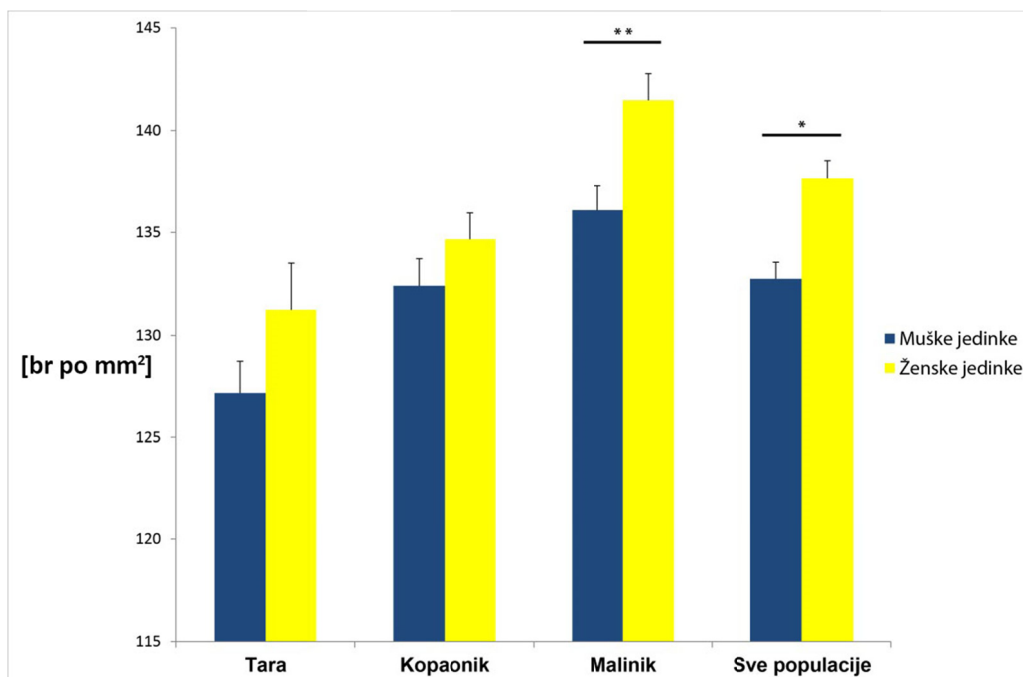
Slika br. 45. Razlike u broju redova stoma na jednoj polovini četine *Taxus baccata* L. između muških i ženskih jedinki u populacijama u Srbiji (ANOVA: ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; TK – razlike između populacija Tara i Kopaonik, TM – razlike između populacija Tara i Malinik, KM – razlike između populacija Kopaonik i Malinik)

Jednofaktorskom analizom varijanse je utvrđeno da se populacije tise u Srbiji značajno razlikuju prema gustini stoma ($p=0.000$, $p<0.001$). Na jedinkama sa Malinika je utvrđena statistički značajno veća gustina stoma nego na jedinkama sa Tare ($p=0.000$) i Kopaonika ($p=0.000$). Jedinke sa Tare imaju značajno manju gustinu stoma od jedinki sa Kopaonika ($p=0.024$) (Slika br. 46).

T-testom za nezavisne uzorke ispitane su razlike između muških i ženskih jedinki prema gustini stoma. Utvrđeno je da ženske jedinke imaju statistički značajno veću gustinu stoma u odnosu na muške na nivou sve tri populacije zajedno ($p=0.000$) i u populaciji Malinik ($p=0.002$) (Slika br. 47).



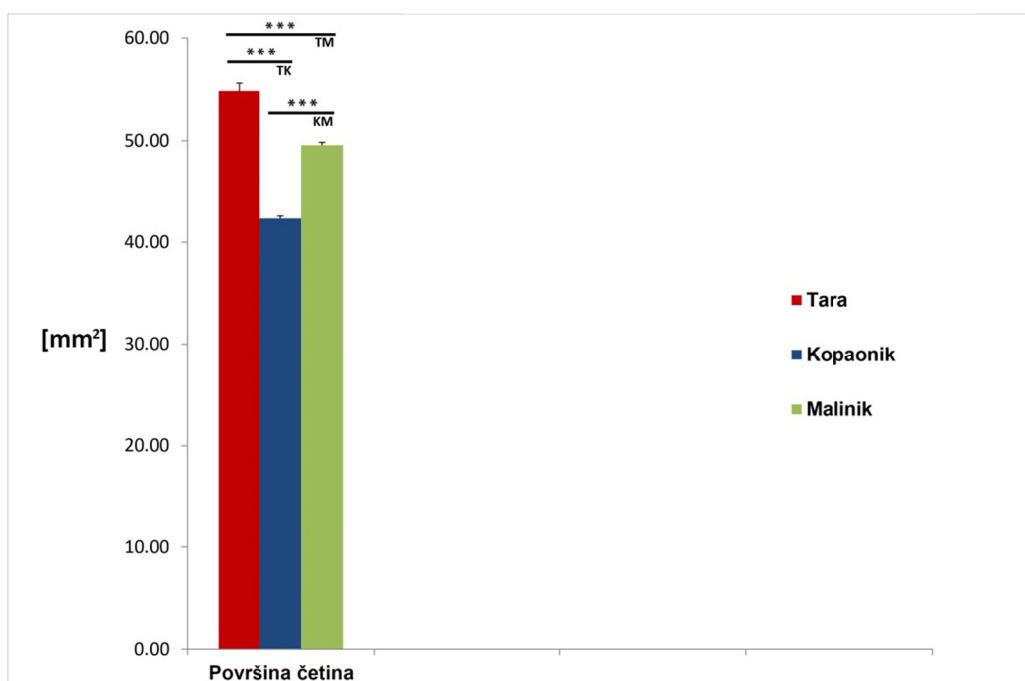
Slika br. 46. Razlike u gustini stoma na četinama *Taxus baccata* L. u populacijama u Srbiji (ANOVA: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$)



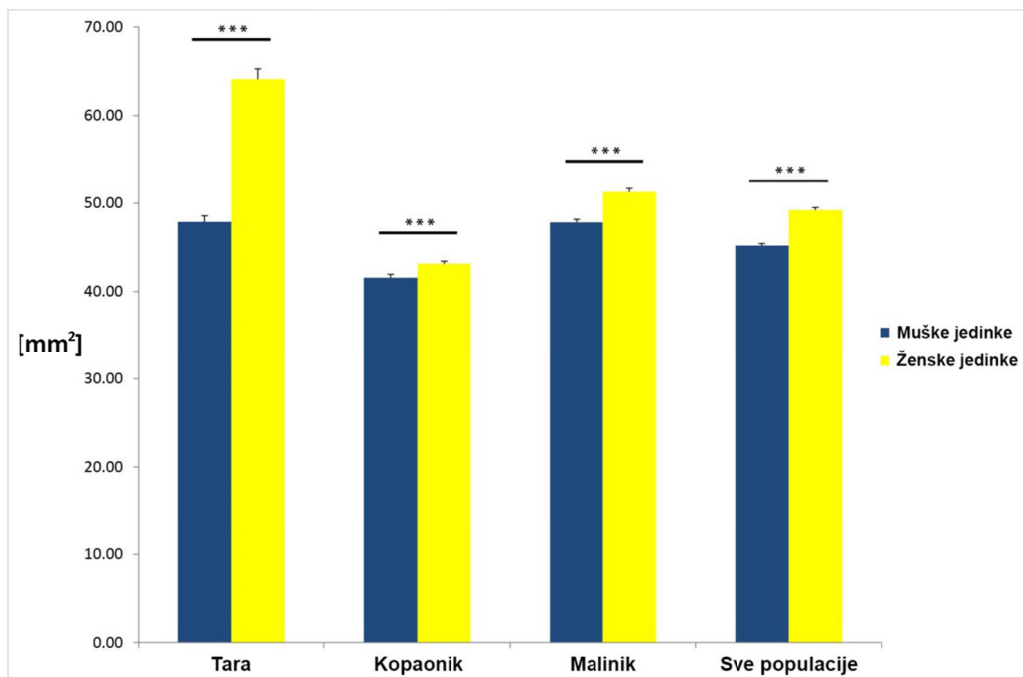
Slika br. 47. Razlike u gustini stoma na četinama *Taxus baccata* L. između muških i ženskih jedinki u populacijama u Srbiji (t-test: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Razlike između populacija za svojstvo površina četina ispitane su Kruskal-Wallis testom. Utvrđeno je da se populacije značajno razlikuju prema površini četine ($p=0.000$, $p<0.001$). Jedinke iz populacije Tara imaju značajno veću površinu četine od jedinki sa Kopaonika ($p=0.000$) i Malinika ($p=0.000$). Jedinke iz populacije Kopaonik imaju značajno manju površinu od jedinki sa Malinika ($p=0.000$) (Slika br. 48).

Mann-Whitney U testom je utvrđeno da se ženske i muške jedinke značajno razlikuju prema površini četine ($p=0.000$) na nivou sve tri populacije. Statistički značajna razlika postoji između ženskih i muških individua u svakoj od tri populacije posebno ($p=0.000$) (Slika br. 49).



Slika br. 48. Razlike u površini četina *Taxus baccata* L. između populacija u Srbiji (Kruskal-Wallis test: *** $p<0.001$)



Slika br. 49. Razlike u površini četina *Taxus baccata* L. između muških i ženskih jedinke u populacijama u Srbiji (Mann-Whitney *U* test: *** $p < 0.001$)

Dosadašnja istraživanja morfoloških karakteristika četina *Taxus baccata* L. su prikupljena i sistematizovana u tabeli br. 19 -1.deo i tabeli br. 19 -2.deo zajedno sa rezultatima istraživanja iz disertacije. Analiza glavnih komponenti je urađena na osnovu srednjih vrednosti morfoloških karakteristika za različite populacije iz Evrope i Mediterana, kao i na osnovu podataka za geografsku širinu i dužinu istraživanih populacija. U tabeli br. 17 dat je pregled 7 glavnih komponenti i procenti varijabilnosti koje one objašnjavaju. Prva i druga glavna komponenta objašnjavaju najveći procenat varijabilnosti, ukupno 90.72 %. U tabeli br. 18 su date vrednosti koeficijenata linearnih kombinacija koji izgrađuju glavne ose za morfološke karakteristike. Formiranju prve glavne ose najviše doprinose dužina četina, odnos dužine i širine četina i gustina stoma, dok na formiranje druge glavne ose najviše utiču širina četina i geografska dužina.

Tabela br. 17. Glavne komponente i procenti varijabilnosti koje one objašnjavaju

Glavna komponenta	Eigen-vrednost	% Varijabilnosti	% Kumulativni
1	5.042	72.02	72.02
2	1.309	18.70	90.72
3	0.252	3.60	94.32
4	0.198	2.83	97.16
5	0.140	2.00	99.15
6	0.050	0.71	99.86
7	0.010	0.14	100

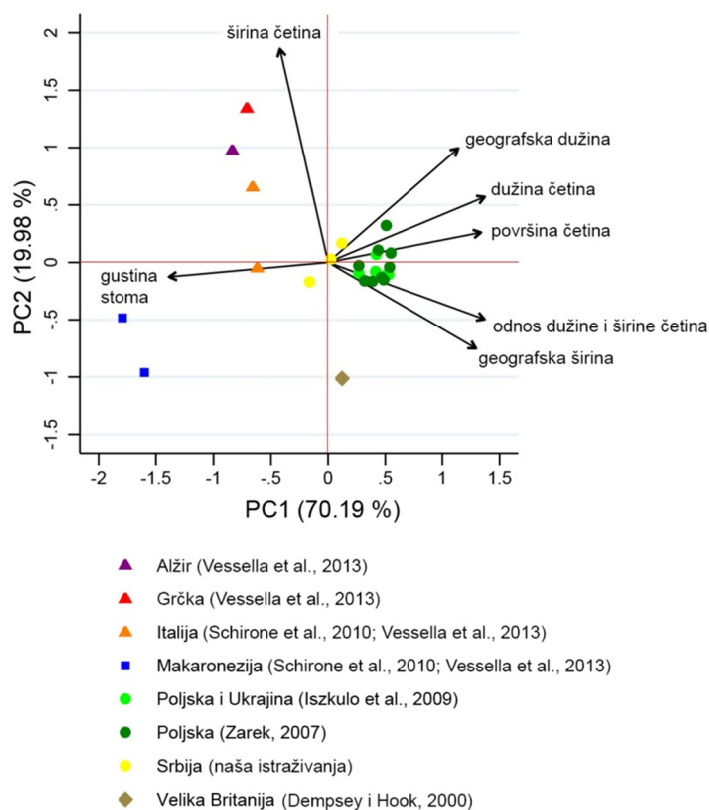
Tabela br. 18. Koeficijenti linearnih kombinacija koji izgrađuju prve dve glavne ose. Svojstva (morfološke karakteristike) koja imaju najveće apsolutne vrednosti koeficijenata su svojstva koja najviše doprinose formiranju tih osa

Morfološke karakteristike	Glavna osa 1	Glavna osa 2
Dužina četina	0.4186	0.2295
Širina četina	-0.1173	0.8231
Površina četina	0.4049	0.0905
Odnos dužine i širine četina	0.4182	-0.2101
Gustina stoma	-0.4231	-0.0165
Geografska širina	0.4090	-0.2382
Geografska dužina	0.3548	0.4006

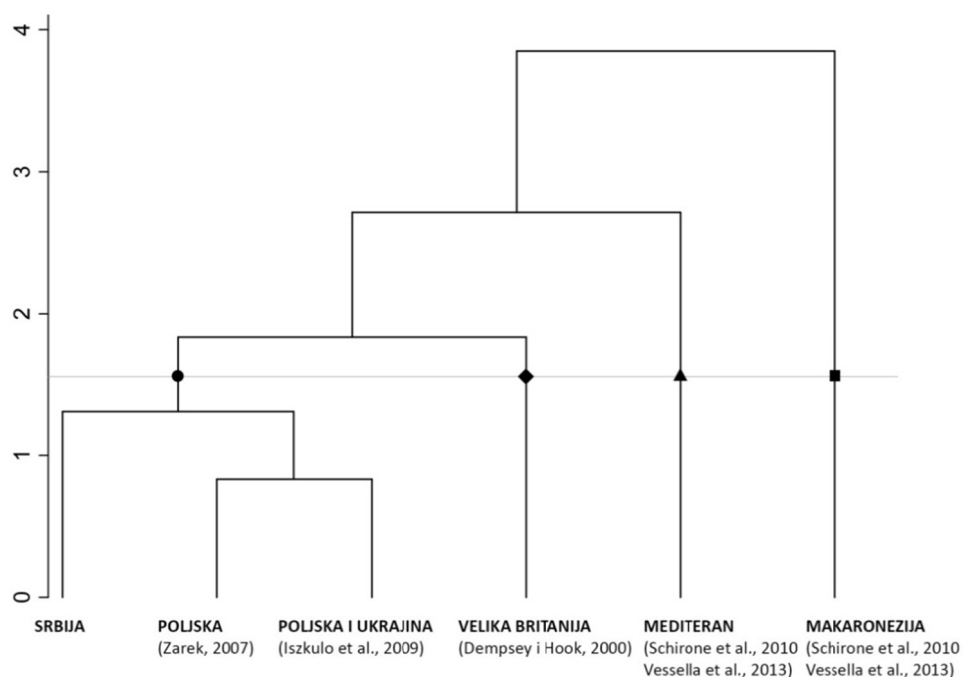
Na planu prve i druge glavne ose (Slika br. 50) može se uočiti razdvajanje istraživanih populacija *Taxus baccata* L. na osnovu morfoloških karakteristika. Najviše su izdvojene populacije iz Makaronezije (sa Azorskih ostrva i Madeire). Ove populacije se karakterišu najvećom gustinom stoma, a najmanjom dužinom i površinom četina i najmanjim odnosom dužine i širine četina u odnosu na ostale istraživane populacije. Drugu grupu čine populacije iz mediteranskog regiona (Italija, Grčka i Alžir), koje imaju manju gustinu stoma od makaronezijskih populacija, a veću u odnosu na populacije iz kontinentalne Evrope. Navedene populacije imaju najveću širinu četina u odnosu na sve ostale istraživane populacije, a manju dužinu i površinu četina i manji odnos dužine i širine četina u odnosu na populacije iz kontinentalne Evrope. Makaronezijske i mediteranske populacije se na grafičkom prikazu nalaze u negativnom segmentu druge glavne ose. *Taxus baccata* L. iz Velike Britanije se odvađa u odnosu na ostale populacije na planu prve i druge glavne ose, ali je bliža populacijama iz

kontinentalne Evrope nego makaronezijskim i mediteranskim populacijama. Ona se karakteriše manjom dužinom, širinom i površinom četina, a većim odnosom dužine i širine četina u odnosu na populacije iz kontinentalne Evrope. Populacije tise iz Srbije su prema morfološkim karakteristikama najbližije istraživanim populacijama iz Poljske i Ukrajine. One se karakterišu nešto manjom dužinom, širinom i površinom četina i manjim odnosom dužine i širine četina, ali zato većom gustinom stoma u odnosu na populacije iz Poljske i Ukrajine.

Isprobano je više metoda klaster analize: „Average Linkage“ (*Euclidean distance* i *Squared Euclidean distance*), „Single Linkage“ (*Euclidean distance* i *Squared Euclidean distance*) i „Ward’s Linkage“ (*Euclidean distance* i *Squared Euclidean distance*). Kao i analiza glavnih komponenti, sve metode klaster analize su pokazale postojanje 4 grupe populacija tise (Slika. br. 51). Na osnovu morfoloških karakteristika, populacije tise iz Srbije su najbližije populacijama iz Poljske i Ukrajine. Nešto udaljenije su populacije iz Velike Britanije, zatim sa Mediterana, a najviše se izdvajaju populacije iz Makaronezije.

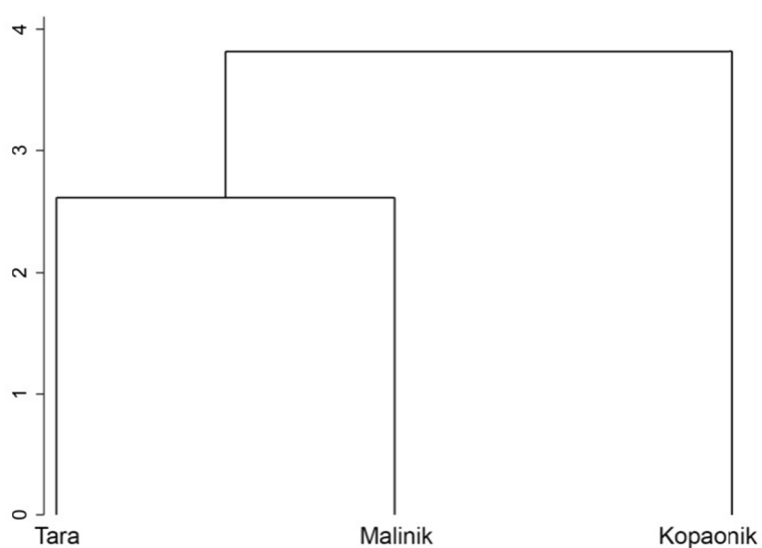


Slika br. 50. Plan prve i druge glavne ose prikazuje razdvajanje populacija *Taxus baccata* L. na osnovu morfoloških karakteristika



Slika br. 51. Dendrogram na osnovu klaster analize „Average Linkage“ (*Euclidean distance*) za morfološke karakteristike na osnovu dosadašnjih istraživanja

Klaster analiza za tri prirodne populacije tise u Srbiji je pokazala da su prema morfološkim karakteristikama (dužini, širini i površini četine, odnosu dužine i širine četine, broju redova stoma na jednoj polovini naličja četine i gustini stoma) sličnije populacije Tara i Malinik, dok se populacija Kopaonik razlikuje (Slika br. 52).



Slika br. 52. Dendrogram na osnovu klaster analize „Average Linkage“ (*Euclidean distance*) za morfološke karakteristike četina tise iz tri prirodne populacije u Srbiji

Tabela br. 19. Dosadašnja istraživanja morfoloških karakteristika četina *Taxus baccata* L. – 1. deo

Autori	Veličina uzorka*	Lokalitet	Pol	Dužina četina (mm)		Širina četina (mm)		Površina (mm ²)	
				Opseg	\bar{X}	Opseg	\bar{X}	Opseg	\bar{X}
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mitchell, 1998	5	Vancouver Island, British Columbia	Ž						
Mitchell, 1998	5	Vancouver Island, British Columbia	M						
Dempsey i Hook, 2000	100	Bedgebury National Pinetum, UK		9.00-34.00	21.1	1.90-2.10	1.86	26.53-42.25	39.75
Zarek, 2007	80-120	Sieraków		18.70-27.80	22.89	2.00-2.70	2.36	37.40-66.70	54.26
Zarek, 2007	80-120	Góra Jawor		19.40-30.20	24.21	2.00-2.90	2.37	45.90-75.70	57.55
Zarek, 2007	80-120	Nowa Wieś		16.90-29.60	24.11	2.10-3.10	2.51	39.30-81.40	60.75
Zarek, 2007	80-120	Huta Stara		17.89-26.47	22.15	2.00-2.60	2.31	38.60-64.20	51.29
Zarek, 2007	80-120	Malinówka		19.90-31.80	24.92	2.40-3.00	2.65	50.00-89.90	66.11
Zarek, 2007	80-120	Cisowa Góra		21.50-33.40	25.17	2.00-3.10	2.43	45.80-92.40	61.65
Zarek, 2007	80-120	Zadni Gaj		17.10-26.40	22.03	2.00-2.70	2.41	37.60-66.20	53.22
Zarek, 2007	80-120	Mogilno		17.40-31.60	24.9	2.20-2.90	2.53	40.20-84.20	63.49
Zarek, 2007	80-120	Liswarta		18.40-30.60	24.1	2.10-2.60	2.32	42.00-75.60	56.05
Iszkulo i sar., 2009	700	Cisowa Góra	Ž		24.5				44.60
Iszkulo i sar., 2009	700	Cisowa Góra	M		23.3				41.30
Iszkulo i sar., 2009	700	Cisy	Ž		25.7				50.80
Iszkulo i sar., 2009	700	Cisy	M		24.8				48.20
Iszkulo i sar., 2009	700	Kórnik	Ž		27.6				50.70
Iszkulo i sar., 2009	700	Kórnik	M		25.3				45.80
Iszkulo i sar., 2009	700	Wierzchlas	Ž		26.6				50.60
Iszkulo i sar., 2009	700	Wierzchlas	M		25.1				48.50
Iszkulo i sar., 2009	700	Knyazdzhvir	Ž		25.4				49.60
Iszkulo i sar., 2009	700	Knyazdzhvir	M		24.4				49.20

Schirone i sar., 2010	326	Azores, Portugal			11.1		2.30		21.30
Schirone i sar., 2010	294	Carpineto Romano, Italy			17.68		2.40		33.99
Vessella i sar., 2013	155	Madeira, Portugal			10.55		2.31		17.39
Vessella i sar., 2013	85	Rosello, Italy			19.5		3.09		35.49
Vessella i sar., 2013	90	Chr�ea National Park, Algeria			21.47		3.50		36.42
Vessella i sar., 2013	106	Mount Parnassus, Greece			20.66		3.64		34.68
Istraživanja u disertaciji	2550	Tara	�	16.74-40.21	26.61	2.18-3.18	2.67	31.68-98.04	64.09
Istraživanja u disertaciji	2550	Tara	M	16.31-28.83	21.98	1.88-2.89	2.42	29.57-68.51	47.89
Istraživanja u disertaciji	2550	Kopaonik	�	14.77-28.08	20.74	1.72-2.77	2.24	26.02-67.56	43.12
Istraživanja u disertaciji	2550	Kopaonik	M	14.11-28.24	20.44	1.67-2.87	2.22	25.74-63.85	41.56
Istraživanja u disertaciji	2550	Malinik	�	17.33-30.86	23.8	1.91-3.20	2.40	32.08-78.65	51.31
Istraživanja u disertaciji	2550	Malinik	M	15.33-30.80	22.4	2.01-2.93	2.41	29.28-71.27	47.84

* Broj  etina na kojima je izvršeno merenje morfoloških karakteristika.

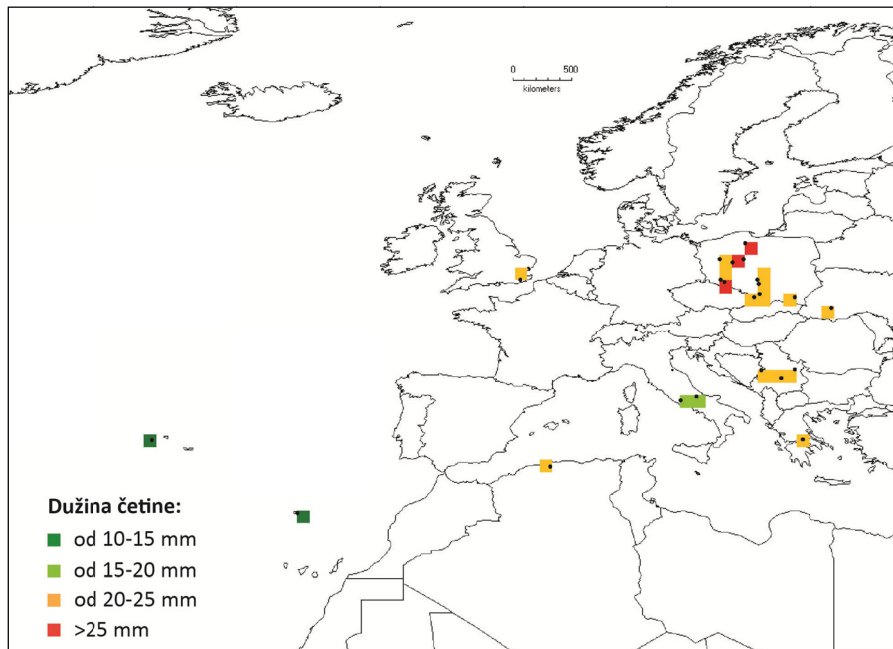
Tabela br. 19. Dosadašnja istraživanja morfoloških karakteristika četina *Taxus baccata* L. – 2. deo

Autori	Veličina uzorka*	Lokalitet	Pol	Dužina/ širina četina	Gustina stoma		Specifična površina (cm ² /g)
					Opseg	\bar{X}	
1	2	3	4	5	6	7	8
Salisbury, 1928					118.00-184.00	115.00	
Mitchell, 1998	5 (10)	Vancouver Island, British Columbia	Ž			89.40	92.4
Mitchell, 1998	5 (10)	Vancouver Island, British Columbia	M			89.40	79.0
Dempsey i Hook, 2000	100 (40)	Bedgebury National Pinetum, UK				91.67	
Zarek, 2007	80-120	Sieraków		9.77			
Zarek, 2007	80-120	Góra Jawor		10.34			
Zarek, 2007	80-120	Nowa Wieś		9.70			
Zarek, 2007	80-120	Huta Stara		9.69			
Zarek, 2007	80-120	Malinówka		9.51			
Zarek, 2007	80-120	Cisowa Góra		10.45			
Zarek, 2007	80-120	Zadni Gaj		9.26			
Zarek, 2007	80-120	Mogilno		9.88			
Zarek, 2007	80-120	Liswarta		10.47			
Iszkulo i sar., 2009	700	Cisowa Góra	Ž				84.0
Iszkulo i sar., 2009	700	Cisowa Góra	M				84.6
Iszkulo i sar., 2009	700	Cisy	Ž				100.0
Iszkulo i sar., 2009	700	Cisy	M				100.4
Iszkulo i sar., 2009	700	Kórník	Ž				80.6
Iszkulo i sar., 2009	700	Kórník	M				86.9
Iszkulo i sar., 2009	700 (200)	Wierzchlas	Ž			75.06	88.7
Iszkulo i sar., 2009	700 (200)	Wierzchlas	M			68.64	91.9
Iszkulo i sar., 2009	700	Knyazdhvir	Ž				91.6
Iszkulo i sar., 2009	700	Knyazdhvir	M				94.5

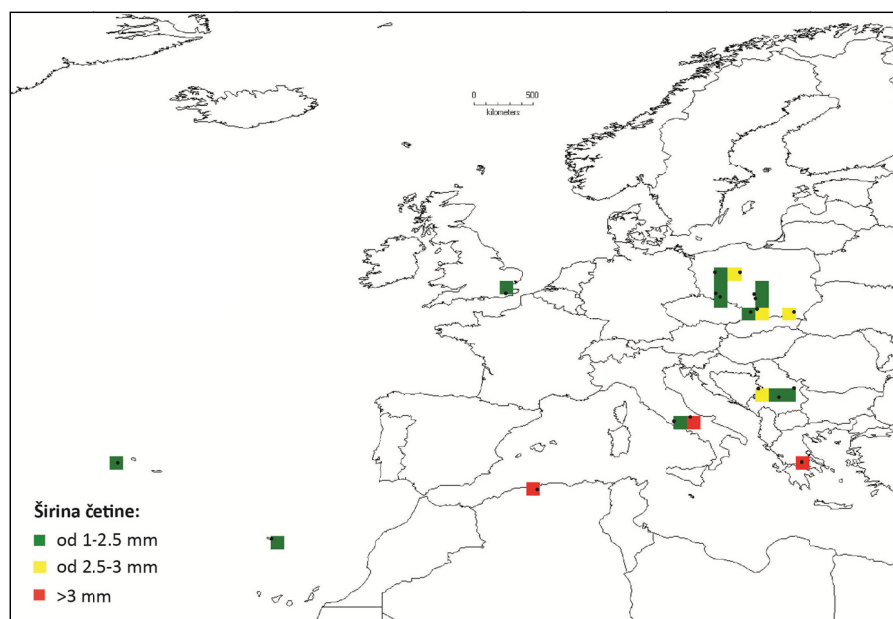
Schirone i sar., 2010	326	Azores, Portugal		7.70		231.87	
Schirone i sar., 2010	294	Carpineto Romano, Italy		7.20		138.12	
Vessella i sar., 2013	155	Madeira, Portugal		4.60		194.57	
Vessella i sar., 2013	85	Rosello, Italy		6.51		141.87	
Vessella i sar., 2013	90	Chr�ea National Park, Algeria		6.56			
Vessella i sar., 2013	106	Mount Parnassus, Greece		6.15			
Istraživanja u disertaciji	2550 (1530)	Tara	�	9.99	81.25-193.75	131.25	58.3
Istraživanja u disertaciji	2550 (1530)	Tara	M	9.12	87.50-168.75	127.15	43.5
Istraživanja u disertaciji	2550 (1530)	Kopaonik	�	9.33	81.25-206.25	134.66	39.2
Istraživanja u disertaciji	2550 (1530)	Kopaonik	M	9.24	81.25-206.25	132.42	37.8
Istraživanja u disertaciji	2550 (1530)	Malinik	�	9.94	93.75-225.00	141.48	46.7
Istraživanja u disertaciji	2550 (1530)	Malinik	M	9.33	75.00-212.50	136.08	43.5

* Broj  etina na kojima je izvršeno merenje morfoloških karakteristika. U zagradi je dat broj merenja za gustinu stoma.

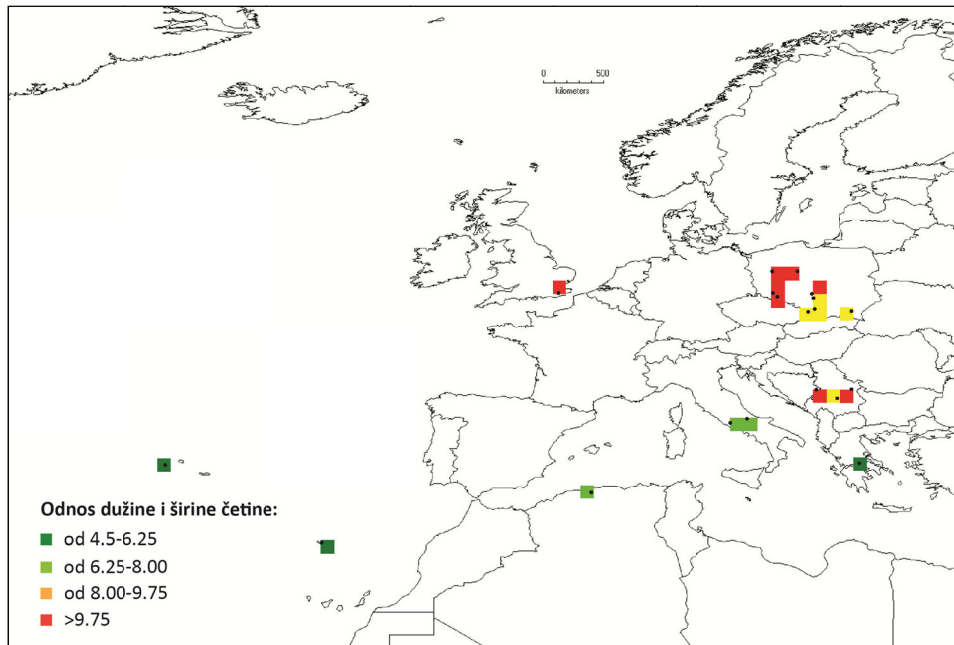
Na slikama br. 53, 54, 55, 56 i 57 su prikazane prostorne analize diverziteta populacija *Taxus baccata* L. na osnovu morfoloških karakteristika. Karte su dobijene iz programa DIVA-GIS na osnovu literaturnih podataka iz tabele br. 19.



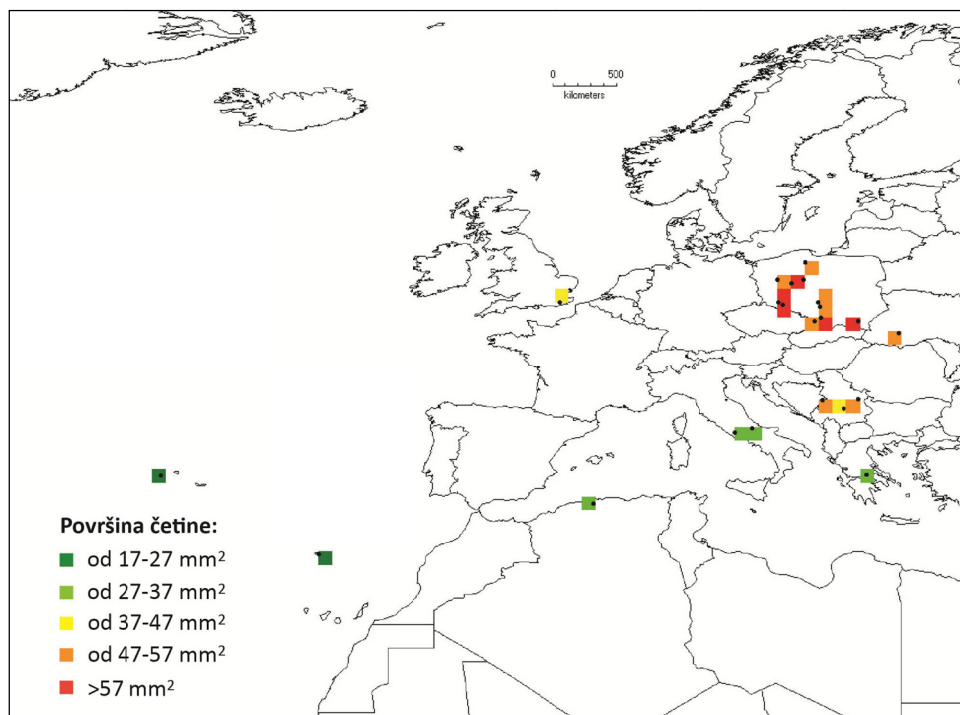
Slika br. 53. Prostorna analiza diverziteta populacija *Taxus baccata* L. na osnovu dužine četine



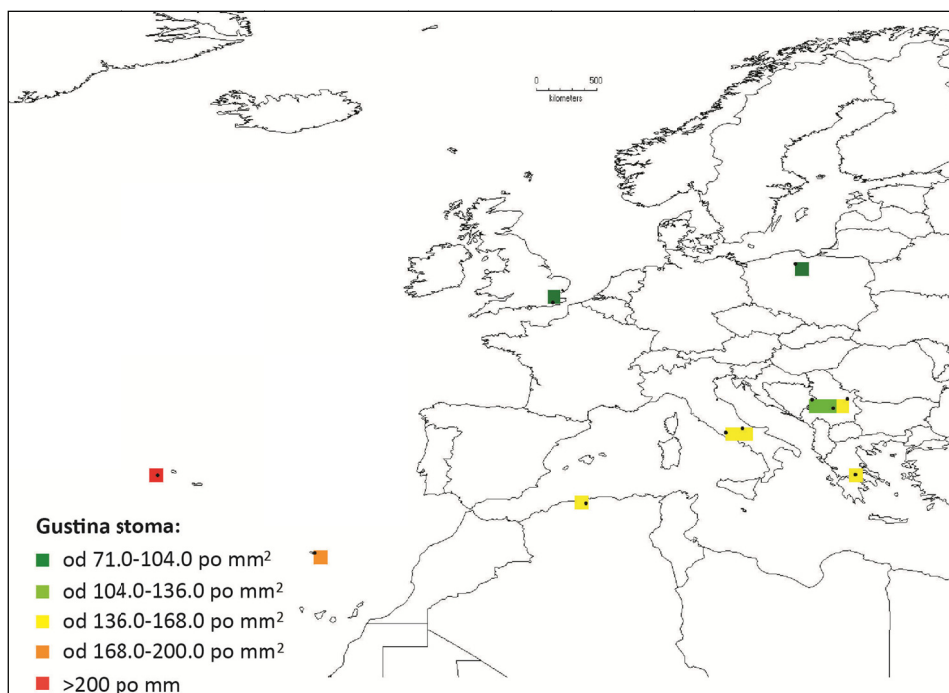
Slika br. 54. Prostorna analiza diverziteta populacija *Taxus baccata* L. na osnovu širine četine



Slika br. 55. Prostorna analiza diverziteta populacija *Taxus baccata* L. na osnovu odnosa dužine i širine četine



Slika br. 56. Prostorna analiza diverziteta populacija *Taxus baccata* L. na osnovu površine četine



Slika br. 57. Prostorna analiza diverziteta populacija *Taxus baccata* L. na osnovu gustine stoma

5.3.3. Povezanost morfoloških karakteristika i klimatskih faktora

Analizom varijanse i Kruskal-Wallis-ovim testom je utvrđeno da se prirodne populacije tise u Srbiji značajno razlikuju prema morfološkim karakteristikama četina. Takođe, statistički značajne razlike u morfološkim karakteristikama četina su utvrđene između muških i ženskih jedinki.

Regresionom analizom ispitana je linearna zavisnost između klimatskih faktora (temperature i padavina) i morfoloških karakteristika ženskih jedinki tise, kao i linearna zavisnost između klimatskih faktora i morfoloških karakteristika muških jedinki tise u istraživanim populacijama. Za potrebe istraživanja, 19 bioklimatskih varijabli (Tabela br. 7) je dobijeno iz WorldClim baze podataka uz pomoć DIVA-GIS 7.5 softvera (Hijmans et al., 2012).

Rezultati proste linearne regresije su prikazani u tabelama br. 20, 21, 22 i 23. Morfološke karakteristike ženskih jedinki analizirane su u zavisnosti od bioklimatskih varijabli (BIO1-BIO19), nadmorske visine, srednjih temperatura za avgust i septembar i prosečnih količina padavina za jun i jul. Morfološke karakteristike muških jedinki

analizirane su u zavisnosti od bioklimatskih varijabli (BIO1-BIO19) i nadmorske visine. U tabelama nisu prikazani koeficijenti regresije za zavisne varijable za koje uslov homogenosti varijansi reziduala nije ispunjen (White's test, $p < 0.05$).

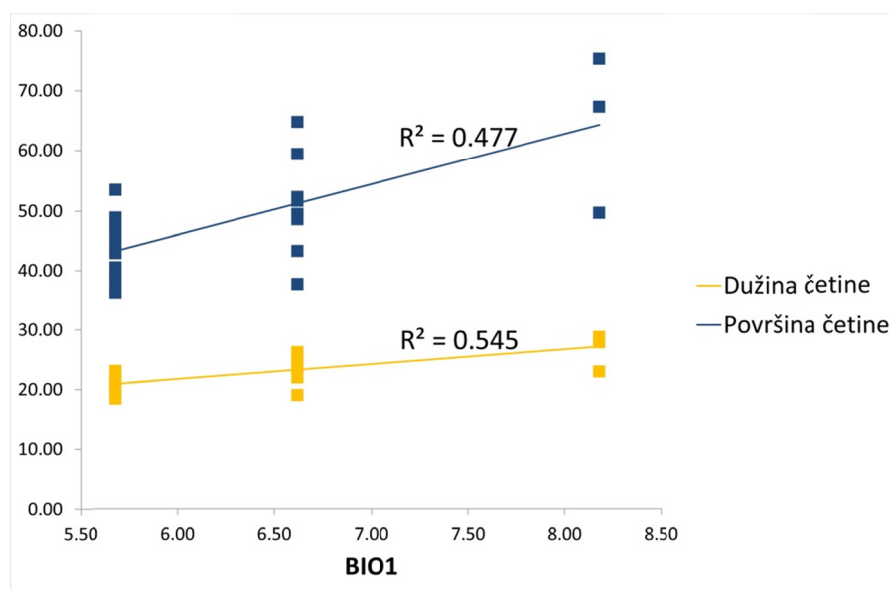
Na osnovu rezultata proste linearne regresije može se zaključiti da su kod ženskih jedinki tise, dužina, širina, površina i specifična površina četina i broj redova stoma statistički značajno korelisani sa velikim brojem bioklimatskih varijabli. Kod muških jedinki tise, statistički značajne korelacije utvrđene su samo za širinu četine i broj redova stoma sa određenim bioklimatskim karakteristikama. Morfološke karakteristike koje najviše variraju u odnosu na bioklimatske varijable su dužina, površina i specifična površina četina kod ženskih jedinki. Kod oba pola, linearna zavisnost između gustine stoma i bioklimatskih varijabli nije utvrđena.

Bioklimatske varijable koje objašnjavaju najveći procenat varijabilnosti u morfološkim karakteristikama su BIO1 (srednja godišnja temperatura), BIO8 (srednja temperatura najvlažnijeg kvartala), BIO10 (srednja temperatura najtoplijeg kvartala), BIO16 (količina padavina u najvlažnijem kvartalu), BIO18 (količina padavina u najtoplijem kvartalu), t_{avg} (srednja temperatura za avgust), t_{sept} (srednja temperatura za septembar) i pad_{jul} (prosečna količina padavina za jul).

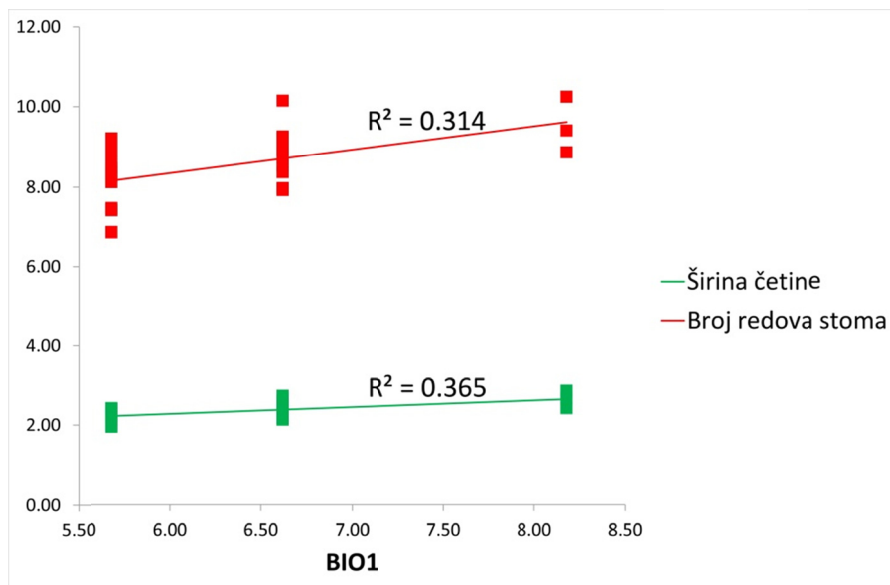
Na slikama br. 58 i 59 prikazani su dijagrami zavisnosti dužine četine ($R^2=0.477$), površine četine ($R^2=0.545$), širine četine ($R^2=0.365$) i broja redova stoma ($R^2=0.314$) kod ženskih jedinki tise od srednje godišnje temperature (BIO1). Na dijagramima na slikama br. 60 i 61 prikazana je zavisnost dužine četine ($R^2=0.565$), površine četine ($R^2=0.448$), širine četine ($R^2=0.336$) i broja redova stoma ($R^2=0.343$) kod ženskih jedinki tise od srednje temperature najvlažnijeg kvartala (BIO8). Zavisnost dužine četine ($R^2=0.565$), površine četine ($R^2=0.447$), širine četine ($R^2=0.336$) i broja redova stoma ($R^2=0.343$) od srednje temperature najtoplijeg kvartala (BIO10) kod ženskih jedinki tise prikazana je na slikama br. 62 i 63. Isti koeficijenti regresije su dobijeni za navedene morfološke karakteristike kod ženskih jedinki u zavisnosti od srednje temperature za avgust (t_{avg}). Na dijagramima na slikama br. 64 i 65 su prikazane zavisnost dužine četine ($R^2=0.475$), površine četine ($R^2=0.559$), širine četine ($R^2=0.362$) i broja redova stoma ($R^2=0.327$) kod ženskih jedinki tise od srednje temperature za septembar (t_{sept}).

Varijable vezane za količinu padavina su slabije korelisane sa morfološkim karakteristikama četina. Na slikama br. 66 i 67 su prikazani dijagrami zavisnosti dužine četina ($R^2=0.508$), površine četine ($R^2=0.466$), širine četine ($R^2=0.360$) i broja redova stoma ($R^2=0.286$) kod ženskih jedinki tise od količine padavina u najvlažnijem kvartalu (BIO16). Na dijagramima (Slika br. 68 i 69) je prikazana zavisnost dužine četine ($R^2=0.561$), površine četine ($R^2=0.474$), širine četine ($R^2=0.361$) i broja redova stoma ($R^2=0.329$) kod ženskih jedinki tise od količine padavina u najtoplijem kvartalu (BIO18). Zavisnost dužine četina ($R^2=0.364$), površine četine ($R^2=0.383$), širine četine ($R^2=0.302$) i broja redova stoma ($R^2=0.190$) kod ženskih jedinki tise od prosečne količine padavina za jul (pad_jul) je prikazana na dijagramima na slikama br. 70 i 71.

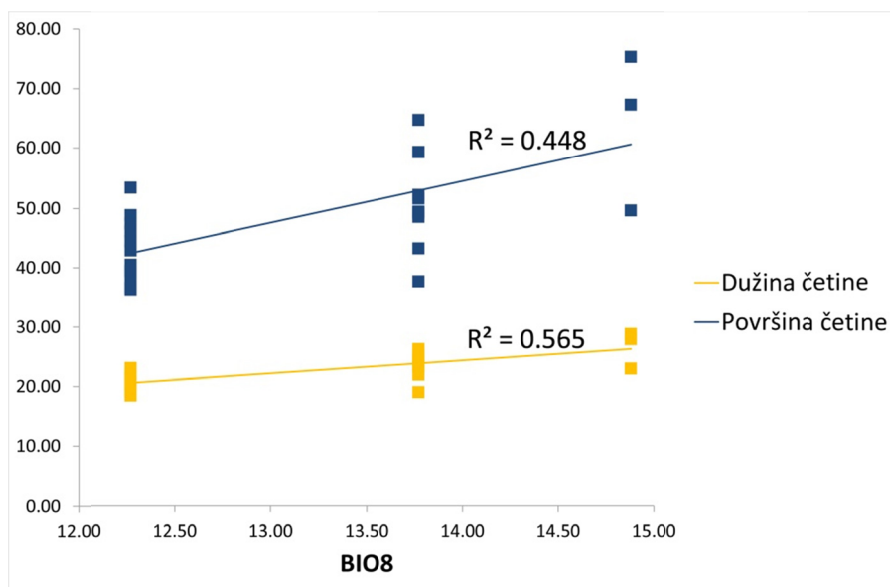
Kod ženskih jedinki tise, dužina četine je morfološka karakteristika koja je najjače korelisana sa nadmorskom visinom ($R^2=0.510$) (Slika br. 72). Kod muških jedinki, karakteristika koja je najjače korelisana sa nadmorskom visinom je širina četine ($R^2=0.277$) (Slika br. 73).



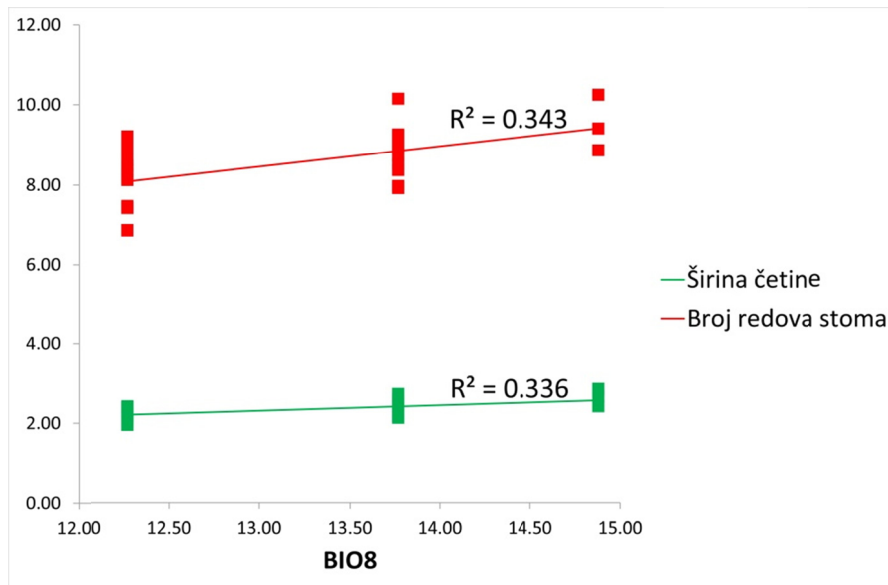
Slika br. 58. Linearna zavisnost između srednje godišnje temperature (BIO1) i zavisnih varijabli dužina i površina četine kod ženskih jedinki tise



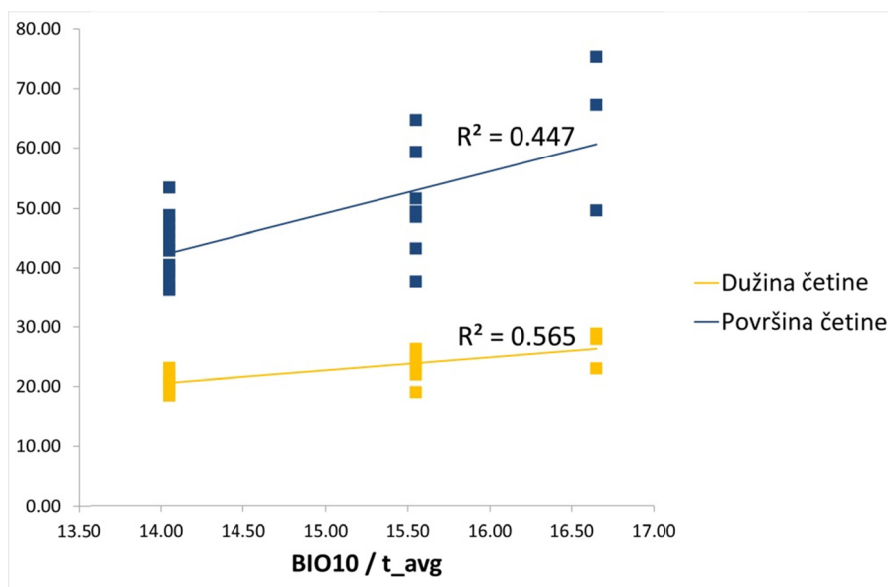
Slika br. 59. Linearna zavisnost između srednje godišnje temperature (BIO1) i zavisnih varijabli širina četine i broj redova stoma kod ženskih jedinki tise



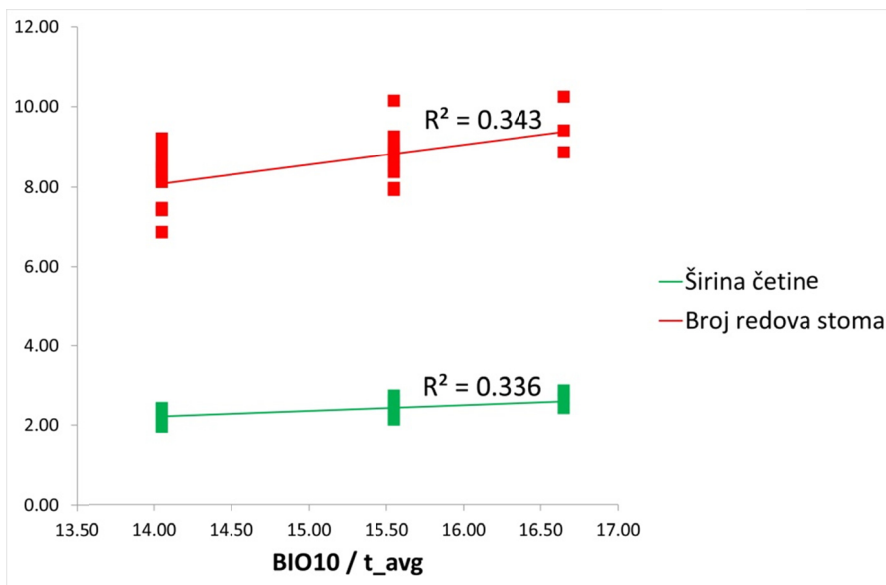
Slika br. 60. Linearna zavisnost između srednje temperature najvlažnijeg kvartala (BIO8) i zavisnih varijabli dužina i površina četine kod ženskih jedinki tise



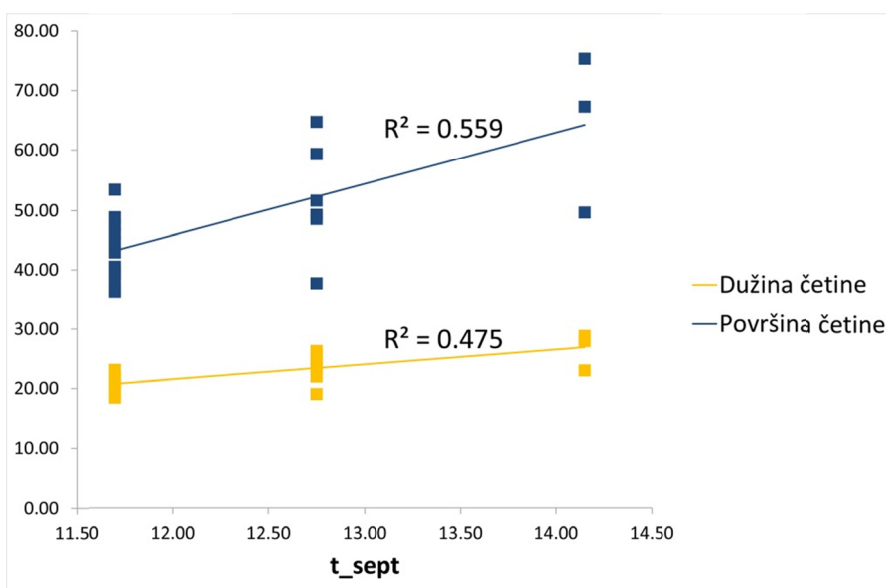
Slika br. 61. Linearna zavisnost između srednje temperature najvlažnijeg kvartala (BIO8) i zavisnih varijabli širina četine i broj redova stoma kod ženskih jedinki tise



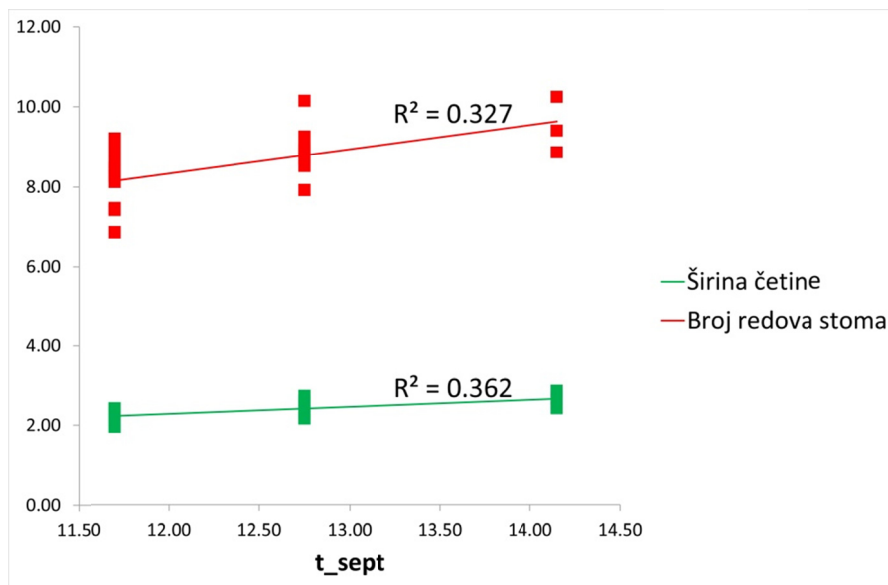
Slika br. 62. Linearna zavisnost između srednje temperature najtoplijeg kvartala (BIO10) ili srednje temperature za avgust i zavisnih varijabli dužina i površina četine kod ženskih jedinki tise



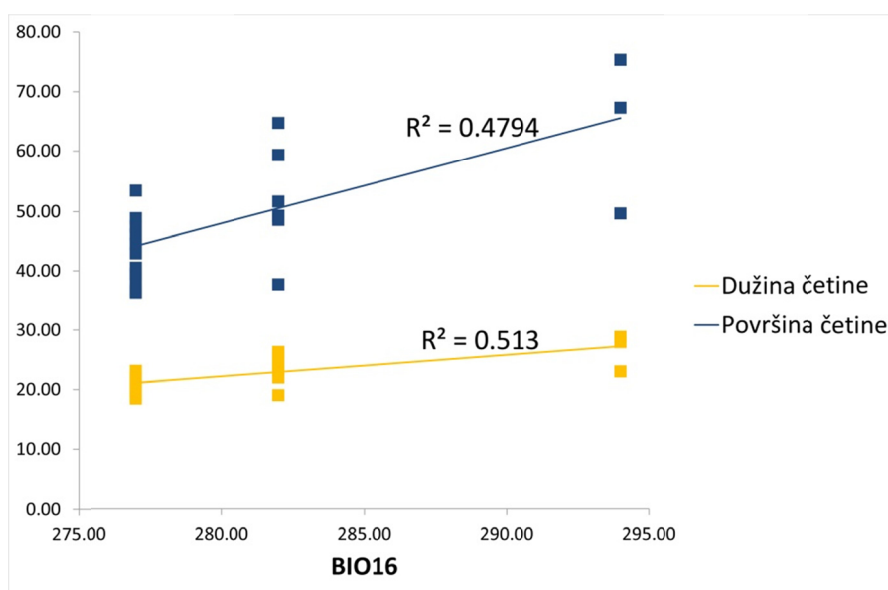
Slika br. 63. Linearna zavisnost između srednje temperature najtoplijeg kvartala (BIO10) ili srednje temperature za avgust i zavisnih varijabli širina četine i broj redova stoma kod ženskih jedinki tise



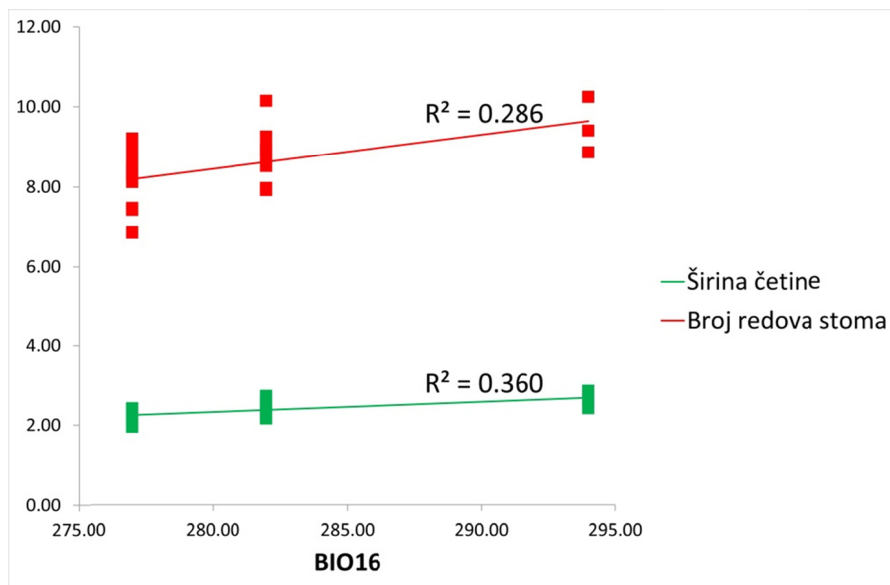
Slika br. 64. Linearna zavisnost između srednje temperature za septembar i zavisnih varijabli dužina i površina četine kod ženskih jedinki tise



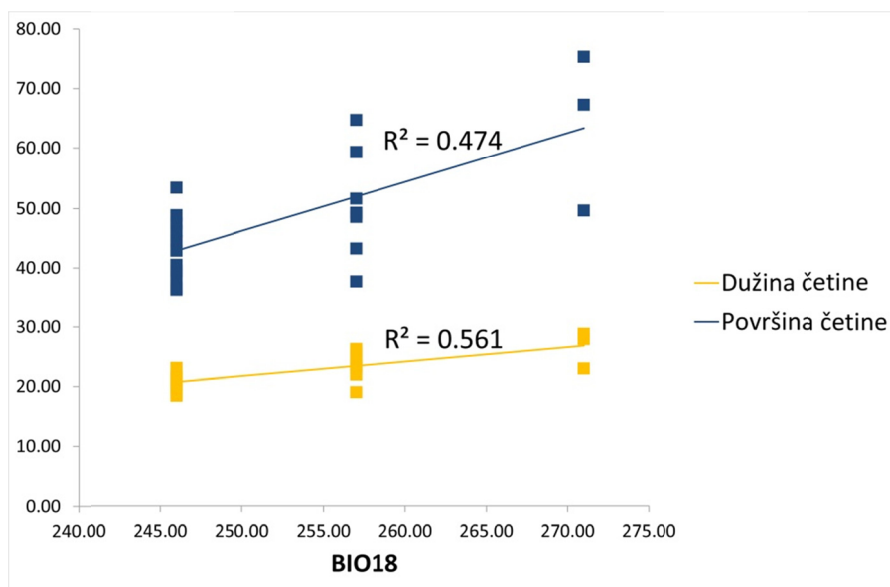
Slika br. 65. Linearna zavisnost između srednje temperature za septembar i zavisnih varijabli širina četine i broj redova stoma kod ženskih jedinki tise



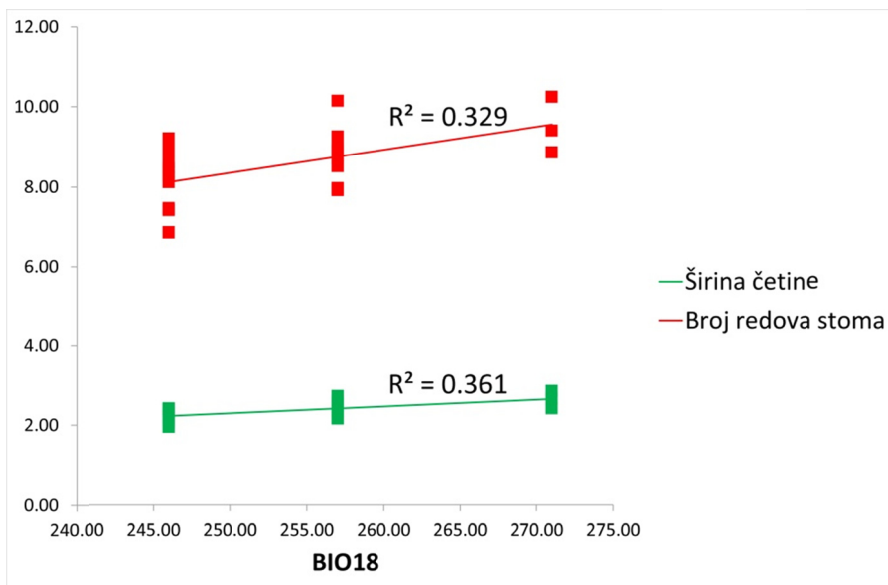
Slika br. 66. Linearna zavisnost između količine padavina u najvlažnijem kvartalu (BIO16) i zavisnih varijabli dužina i površina četine kod ženskih jedinki tise



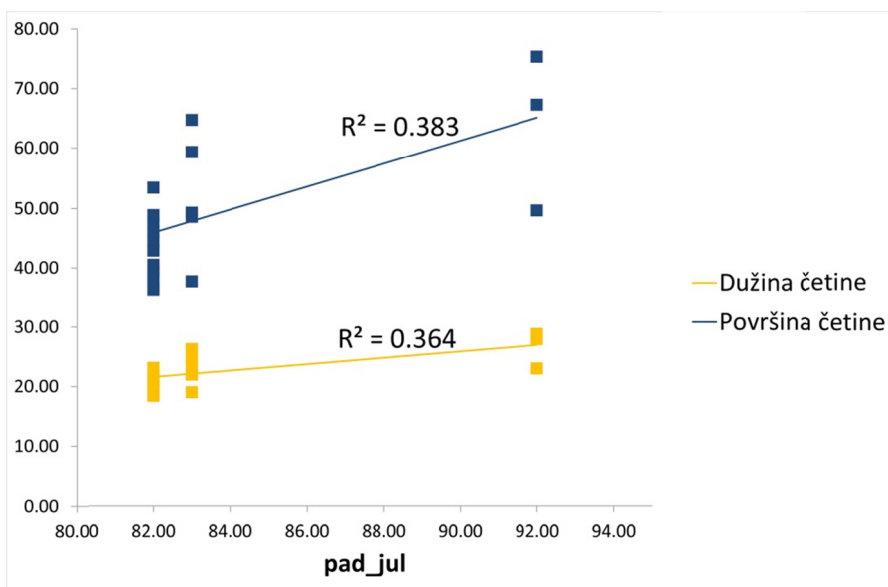
Slika br. 67. Linearna zavisnost između količine padavina u najvlažnijem kvartalu (BIO16) i zavisnih varijabli širina četine i broj redova stoma kod ženskih jedinki tise



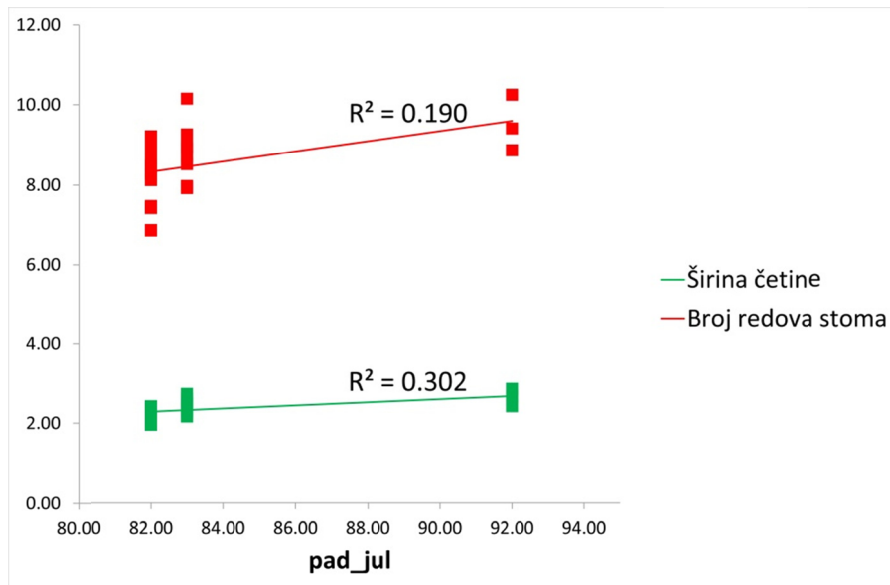
Slika br. 68. Linearna zavisnost između količine padavina u najtoplijem kvartalu (BIO18) i zavisnih varijabli dužina i površina četine kod ženskih jedinki tise



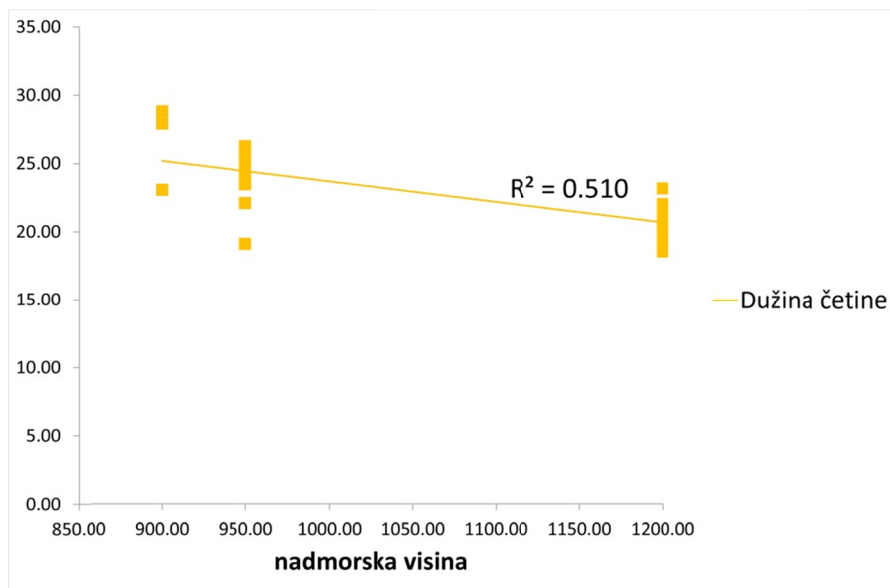
Slika br. 69. Linearna zavisnost između količine padavina u najtoplijem kvartalu (BIO18) i zavisnih varijabli širina četine i broj redova stoma kod ženskih jedinki tise



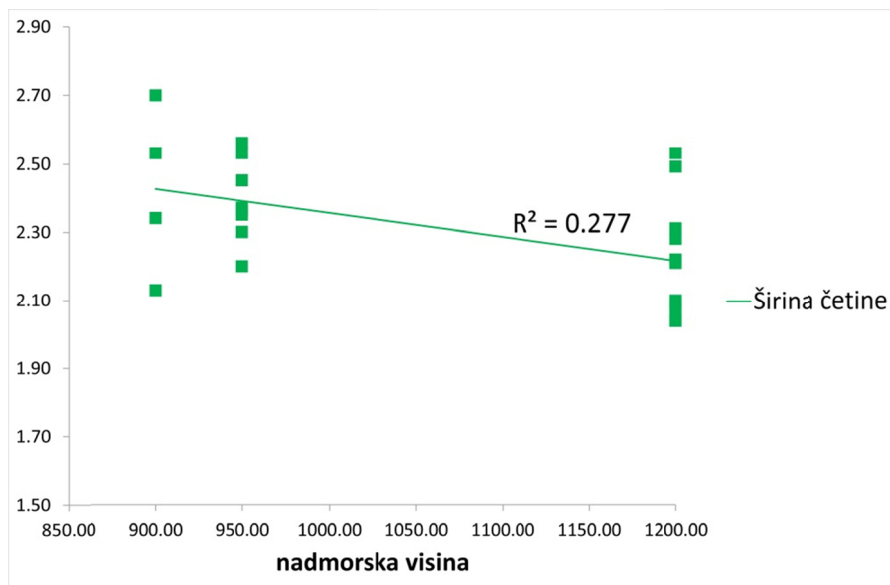
Slika br. 70. Linearna zavisnost između prosečne količine padavina za jul (pad_jul) i zavisnih varijabli dužina i površina četine kod ženskih jedinki tise



Slika br. 71. Linearna zavisnost između prosečne količine padavina za jul (pad_jul) i zavisnih varijabli širina četine i broj redova stoma kod ženskih jedinki tise



Slika br. 72. Linearna zavisnost između nadmorske visine i dužine četine kod ženskih jedinki tise



Slika br. 73. Linearna zavisnost između nadmorske visine i širine četine kod muških jedinki tise

Tabela br. 20. Koeficijenti regresije (R^2) i nivoi značajnosti za nezavisne bioklimatske varijable vezane za temperaturu vazduha i morfološke karakteristike četina ženskih jedinki tise

	BIO1	BIO2	BIO3	BIO4	BIO5	BIO6	BIO7	BIO8	BIO9	BIO10	BIO11	t_avg	t_sept
Dužina četine	0.545***	0.004	0.003		0.500***	0.529***	0.107	0.565***	0.438***	0.565***	0.470***	0.565***	0.559***
Širina četine	0.365**	0.032	0.007	0.055	0.358**	0.286**	0.139	0.336**	0.336**	0.336**	0.349**	0.336**	0.362**
Površina četine	0.477***	0.034	0.006	0.084	0.463***		0.167*	0.448***	0.431***	0.447***	0.449***	0.447***	0.475***
Odnos dužina/širina četine	0.095	0.013	0.028	0.100	0.075	0.137	0.000	0.125	0.055	0.125	0.065	0.125	0.105
Specifična površina četine	0.477***	0.034	0.006	0.084	0.463***		0.166*	0.448***	0.431***	0.447***	0.449***	0.447***	0.475***
Broj redova stoma	0.314**	0.000	0.009	0.143	0.281**	0.332**	0.043	0.343**	0.238*	0.343**	0.260**	0.343**	0.327**
Gustina stoma	0.000	0.075	0.080	0.067	0.002	0.016	0.052	0.005	0.008	0.005	0.005	0.005	0.000

t_avg = srednja temperatura za avgust

t_sept = srednja temperatura za septembar

Tabela br. 21. Koeficijenti regresije (R^2) i nivoi značajnosti za nezavisne bioklimatske varijable vezane za količinu padavina i nadmorsku visinu i morfološke karakteristike četina ženskih jedinki tise

	BIO12	BIO13	BIO14	BIO15	BIO16	BIO17	BIO18	BIO19	pad_jun	pad_jul	n.v.
Dužina četine	0.033		0.086	0.146	0.508***		0.561***	0.119		0.364**	0.510***
Širina četine	0.000	0.109	0.012	0.035	0.360**	0.043	0.361**	0.024	0.186*	0.302**	0.268**
Površina četine	0.002		0.022	0.056	0.466***	0.066	0.474***	0.040		0.383**	
Odnos dužina/ širina četine	0.050	0.120	0.071	0.089	0.078	0.093	0.107	0.082	0.135	0.036	0.139
Specifična površina četine	0.002		0.022	0.056	0.466***	0.066	0.474***	0.040		0.383**	
Broj redova stoma	0.036	0.204*	0.075	0.116	0.286**	0.126	0.329**	0.098	0.272**	0.190*	0.324**
Gustina stoma	0.080	0.055	0.077	0.072	0.002	0.070	0.001	0.074	0.037	0.016	0.02

pad_jun = prosečna količina padavina za jun

pad_jul = prosečna količina padavina za jul

n.v. = nadmorska visina

Tabela br. 22. Koeficijenti regresije (R^2) i nivoi značajnosti za nezavisne bioklimatske varijable vezane za temperaturu vazduha i morfološke karakteristike četina muških jedinki tise

	BIO1	BIO2	BIO3	BIO4	BIO5	BIO6	BIO7	BIO8	BIO9	BIO10	BIO11
Dužina četine	0.056	0.019	0.035	0.100	0.040	0.000	0.006	0.087	0.003	0.088	0.033
Širina četine	0.190*	0.010	0.033	0.179*	0.153*	0.274**	0.006	0.248**	0.116	0.249**	0.134
Površina četine	0.097	0.010	0.025	0.109	0.076	0.150	0.001	0.133	0.056	0.133	0.065
Odnos dužina/ širina četine	0.001	0.019	0.006	0.003	0.002	0.000	0.006	0.000	0.003	0.000	0.002
Specifična površina četine	0.097	0.010	0.025	0.109	0.076	0.150	0.001	0.133	0.056	0.133	0.065
Broj redova stoma	0.000	0.197*	0.223*	0.225*	0.002	0.060	0.120	0.023	0.012	0.024	0.006
Gustina stoma	0.012	0.060	0.057	0.030	0.019	0.000	0.055	0.002	0.027	0.002	0.023

Tabela br. 23. Koeficijenti regresije (R^2) i nivoi značajnosti za nezavisne bioklimatske varijable vezane za količinu padavina i nadmorsku visinu i morfološke karakteristike četina muških jedinki tise

	BIO12	BIO13	BIO14	BIO15	BIO16	BIO17	BIO18	BIO19	n.v.
Dužina četine	0.055	0.115	0.075	0.091	0.042	0.095	0.067	0.085	0.111
Širina četine	0.070	0.228*	0.113		0.158*		0.212*	0.136	0.277**
Površina četine	0.047	0.134	0.073	0.095	0.079	0.100	0.110	0.085	0.153*
Odnos dužina/ širina četine	0.005	0.002	0.005	0.004	0.002	0.004	0.001	0.004	0.000
Specifična površina četine	0.047	0.134	0.073	0.095	0.079	0.100	0.110	0.086	0.153*
Broj redova stoma	0.240*	0.191*	0.243*	0.235*	0.001	0.232*	0.005	0.240*	0.074
Gustina stoma	0.052	0.018	0.044	0.035	0.018	0.033	0.008	0.039	0.000

n.v. = nadmorska visina

5.4. DISKUSIJA REZULTATA ISPITIVANJA MORFOLOŠKIH KARAKTERISTIKA ČETINA TISE

Prosečna dužina dvogodišnjih četina *Taxus baccata* L. za prirodne populacije u Srbiji iznosi 22.14 mm. Minimalna izmerena dužina iznosi 14.11 mm, a maksimalna 40.21 mm, što spada u opseg koji su definisali Cope (1998), Thomas i Polwart (2003) i Hageneder (2013).

Muške i ženske jedinke tise se statistički značajno razlikuju prema dužini četina. Ženske jedinke imaju značajno duže četine od muških u populacijama Tara (u proseku 26.61 mm ženske i 21.98 mm muške) i Malinik (u proseku 23.80 mm ženske i 22.40 mm muške), kao i na nivou sve tri populacije zajedno (u proseku 22.79 mm ženske i 21.50 muške) (Slika br. 37). Populacije tise u Srbiji se statistički značajno razlikuju prema dužini četina. Najduže četine imaju jedinke sa Tare (23.96 mm), zatim sa Malinika (23.10 mm), a najkraće jedinke sa Kopaonika (20.59 mm) (Slika br. 38).

Prosečna širina dvogodišnjih četina za prirodne populacije tise u Srbiji iznosi 2.35 mm i kreće se u opsegu od 1.67 mm do 3.20 mm. Izmeren opseg širine četina je nešto širi od opsega koji su zabeležili Thomas i Polwart (2003) i Hageneder (2013).

Utvrđene su statistički značajne razlike u širini četina između muških i ženskih jedinki tise. Ženske jedinke imaju značajno šire četine od muških u populaciji Tara (u proseku 2.67 mm ženske i 2.42 mm muške) i na nivou sve tri populacije zajedno (u proseku 2.36 mm ženske i 2.33 mm muške) (Slika br. 39). Populacije tise u Srbiji se statistički značajno razlikuju prema širini četina. Najšire četine imaju jedinke sa Tare (2.53 mm), zatim sa Malinika (2.40 mm), a najuže jedinke sa Kopaonika (2.23 mm) (Slika br. 40).

Prosečna površina dvogodišnjih četina *Taxus baccata* L. u prirodnim populacijama u Srbiji iznosi 47.18 mm² i kreće se u opsegu od 25.74 mm² do 98.04 mm².

Muške i ženske jedinke se statistički značajno razlikuju prema površini četina u svim istraživanim populacijama, kao i na nivou sve tri populacije zajedno. Površina četina veća je kod ženskih jedinki i u proseku, za sve populacije, iznosi 49.24 mm², dok

prosečna površina četina za muške jedinke iznosi 45.19 mm². Ženske jedinke imaju značajno veću površinu četina od muških u svim istraživanim populacijama (u proseku 64.09 mm² za ženske i 47.89 mm² za muške na Tari, 51.31 mm² za ženske i 47.84 mm² za muške na Maliniku i 43.12 mm² za ženske i 41.56 mm² za muške na Kopaoniku) (Slika br. 49). Utvrđeno je da se populacije tise u Srbiji statistički značajno razlikuju prema površini četina. Proporcionalno dužini i širini četina, najveću površinu četina imaju jedinke sa Tare (54.83 mm²), zatim sa Malinika (49.58 mm²), a najmanju površinu četina imaju jedinke sa Kopaonika (42.34 mm²) (Slika br. 48).

Prosečan odnos dužine i širine četina za populacije tise u Srbiji iznosi 9.47 i kreće se u opsegu od 5.35 do 15.47.

Muške i ženske jedinke tise se statistički značajno razlikuju prema odnosu dužine i širine četina. Ovaj odnos je značajno veći kod ženskih jedinki sa Tare (u proseku 9.99 za ženske i 9.12 za muške) i na nivou sve tri populacije zajedno (u proseku 9.68 za ženske i 9.26 za muške) (Slika br. 41). Takođe, utvrđeno je da se istraživane populacije tise statistički značajno razlikuju prema odnosu dužine i širine četina. Najveći odnos dužine i širine četina izmeren je za populaciju Malinik (9.64), zatim Tara (9.49), a najmanji za populaciju Kopaonik (9.29) (Slika br. 42).

Prosečna specifična površina četina za populacije tise u Srbiji iznosi 42.89 cm²/g. Razlike u specifičnoj površini četina između muških i ženskih jedinki nisu utvrđene. Iszkulo et al. (2009) takođe nisu ustanovili razlike u specifičnoj površini četina između polova *Taxus baccata* L.

Istraživane populacije tise se statistički značajno razlikuju prema specifičnoj površini četina. Jedinke sa Kopaonika (38.49 cm²/g) imaju statistički značajno manju specifičnu površinu četina u odnosu na jedinke sa Tare (49.85 cm²/g) i Malinika (45.07 cm²/g) (Slika br. 43).

Populacije tise u Srbiji u proseku imaju 8.5 redova stoma na jednoj polovini naličja četine, što spada u opseg koji su definisali Strobel i Hess (1996) i Spjut (2007b). Broj redova stoma je u direktnoj vezi sa širinom četine. Muške i ženske jedinke se statistički značajno razlikuju prema broju redova stoma. Proporcionalno širini četina,

ženske jedinke imaju značajno veći broj redova stoma na jednoj polovini naličja četine od muških u populaciji Tara (u proseku 9.5 za ženske i 7.96 za muške), i na nivou sve tri populacije zajedno (u proseku 8.68 za ženske i 8.42 za muške) (Slika br. 44). Između istraživanih populacija tise postoje statistički značajne razlike u broju redova stoma. Jedinke sa Kopaonika imaju značajno manje redova stoma (u proseku 8.09) u odnosu na jedinke sa Tare (u proseku 8.62) i Malinika (u proseku 8.88) (Slika br. 45).

Prosečna gustina stoma za populacije tise u Srbiji iznosi 135.16 po mm² i kreće se u opsegu od 75 do 225 stoma po mm². Izmeren prosek je veći od proseka koji su za tisu zabeležili Salisbury (1928), Mitchell (1998), Dempsey i Hook (2000), Iszkulo i sar. (2009) i Hageneder (2013), a manji od proseka koji su zabeležili Schirone i sar. (2010) za tisu sa Azorskih ostrva i Vessella i sar. (2013) za tisu sa Madeire.

Populacije tise u Srbiji se statistički značajno razlikuju prema gustini stoma. Jedinke sa Tare imaju značajno manju gustinu stoma (u proseku 128.91 po mm²) u odnosu na jedinke sa Kopaonika (u proseku 133.54 po mm²) i Malinika (u proseku 138.78 po mm²). Takođe, jedinke sa Malinika imaju značajno veću gustinu stoma u odnosu na jedinke sa Kopaonika (Slika br. 46). Kako jedinke sa Tare imaju najveću dužinu, širinu i površinu četina, očekivano je da imaju najmanju gustinu stoma. Negativnu korelaciju između veličine listova i gustine stoma Salisbury (1928) je pripisao razlikama u rastu epidermalnih ćelija između stoma, a ne razlikama u ukupnom broju stoma. Odstupanje od ovog pravila se javlja kod populacija Kopaonik i Malinik, jer jedinke sa Kopaonika imaju značajno manje četine i manju gustinu stoma u odnosu na jedinke sa Malinika.

Gustina stoma se može smatrati ekološkim indikatorom u pogledu vlažnosti sredine. Sa povećanjem vlažnosti smanjuje se gustina stoma (Salisbury, 1928; Leuschner, 2002; Đukić i Đunisijević, 2002). U tabeli br. 7 date su vrednosti za prosečne godišnje količine padavina (BIO12) za lokacije istraživanih populacija tise. Najveću godišnju količinu padavina dobija populacija Tara (951mm), zatim Kopaonik (911 mm), a najmanju Malinik (808 mm). Takođe, najveću prosečnu godišnju vlažnost vazduha ima Tara (83%), zatim Kopaonik (79.8%), a najmanju Malinik (78.5%) (Poglavlje 4.1.). Prema navedenom, razlike u gustini stoma u populacijama tise u Srbiji mogu se smatrati morfološkim adaptacijama na različite uslove vlažnosti sredine. U

populaciji Malinik, koja ima najmanju količinu padavina, zabeležena najveća gustina stoma, dok je u populaciji Tara, koja ima najveću količinu padavina, zabeležena najmanja gustina stoma. Međutim, gustina stoma ne zavisi samo od količine vlage u vazduhu i zemljištu, već od kompleksnog delovanja više faktora, kao što su nadmorska visina (Hovenden i Brodribb, 2000; Schoettle i Rochelle, 2000; Qiang et al., 2003; Kouwenberg et al., 2007; Holland i Richardson, 2009; Wang et al., 2014), temperatura (Ciha i Brun, 1975; Luomala et al., 2005; Moura i Alves, 2014), intezitet svetlosti (Ciha i Brun, 1975; Mott, K.A., 2009; Sessa i Givnish, 2014; Yang et al., 2014), koncentracija CO₂ (Ainsworth i Rogers, 2007; Lake i Woodward, 2008; Konrad et al., 2008; Franks i Beerling, 2009; Mott, K.A., 2009), O₃ (Heath i Taylor, 1997; Paoletti i Grulke, 2005) i polutanti (Darrall, 1989; Saxe, 1991; Mansfield, 1998; Robinson et al., 1998). Lake i Woodward (2008) navode da se sa povećanjem količina padavina i smanjenjem radijacije, smanjuje gradijent transpiracije što dovodi do smanjenja gustine stoma.

Ženske jedinke imaju značajno veću gustinu stoma od muških u populaciji Malinik (138.08 po mm² za muške i 141.48 po mm² za ženske), kao i na nivou sve tri populacije zajedno (132.76 po mm² za muške i 137.67 po mm² za ženske) (Slika br. 47).

Iszkulo i sar. (2009) su došli do zaključka da ženske jedinke tise karakteriše veća dužina i površina četina, kao i gustina stoma. Ovo istraživanje je to potvrdilo. Ženske jedinke tise u Srbiji imaju značajno veću dužinu, širinu i površinu četina, odnos dužine i širine četina, broj redova stoma i gustinu stoma u odnosu na muške jedinke.

Veći listovi i veća gustina stoma može ukazati na veći intezitet fotosinteze kod ženskih jedinki (Dawson i Bliss, 1993; Dawson i Ehleringer, 1993). Razlike u fiziologiji i morfologiji između muških i ženskih jedinki objašnjavaju se razlikama u reproduktivnim ulaganjima (Delph, 1990; Krischnik i Denno, 1990a; Krischnik i Denno 1990b; Cipollini i Stiles, 1991; Allen i Antos, 1993; Laporte i Delph, 1996; Cipollini i Whigham, 1994; Massei et al., 2006; Iszkulo et al., 2009).

Podaci za dosadašnja istraživanja morfoloških karakteristika tise su prikupljeni i sistematizovani u tabeli br. 19 -1. deo i tabeli br. 19 -2. deo zajedno sa rezultatima istraživanja iz disertacije. Analiza glavnih komponenti je pokazala razdvajanje populacija *Taxus baccata* L. iz Evrope i mediteranskog regiona na osnovu morfoloških karakteristika. Prva i druga glavna osa objašnjavaju 90.72 % varijabilnosti u

morfološkim karakteristikama i njihov plan je prikazan na slici br. 50. Klaster analiza je pokazala da se istraživane populacije tise mogu svrstati u 4 grupe (Slika br. 51). Populacije iz Srbije su najbližnje populacijama iz Poljske i Ukrajine, i one zajedno čine prve grupu. Populacije tise iz Srbije se karakterišu nešto manjom dužinom, širinom i površinom četina i manjim odnosom dužine i širine četina, ali zato većom gustinom stoma u odnosu na populacije iz Poljske i Ukrajine. Drugu grupu čine populacije tise iz Velike Britanije, koje su prema morfološkim karakteristikama bliže populacijama iz kontinentalne Evrope nego makaronezijskim i mediteranskim populacijama. One se karakterišu manjom dužinom, širinom i površinom četina, a većim odnosom dužine i širine četina i većom gustinom stoma u odnosu na populacije iz kontinentalne Evrope. Treću grupu čine populacije sa Mediterana (Italija, Grčka i Alžir) koje imaju veću gustinu stoma od populacija iz kontinentalne Evrope, a manju od makaronezijskih populacija. Navedene populacije se karakterišu najvećom širinom četina u odnosu na sve istraživane populacije, kao i manjom dužinom, površinom i odnosom dužine i širine četina u odnosu na populacije iz kontinentalne Evrope. Makaronezijske populacije (Azorska ostrva i Madeira) su najviše izdvojene. Njih karakteriše najveća gustina stoma, a najmanja dužina i površina četina i najmanji odnos dužine i širine četina u odnosu na ostale istraživane populacije.

Klaster analiza za tri prirodne populacije tise u Srbiji je pokazala da su prema morfološkim karakteristikama (dužini, širini i površini četine, odnosu dužine i širine četine, broju redova stoma na jednoj polovini naličja četine i gustini stoma) sličnije populacije Tara i Malinik, dok se populacija Kopaonik razlikuje (Slika br. 52).

Populacije tise u Srbiji se statistički značajno razlikuju prema morfološkim karakteristikama. Najviše specifičnosti ima populacija Kopaonik, koja se karakteriše manjom dužinom, širinom, površinom i specifičnom površinom četina, manjim odnosom dužine i širine četina i manjim brojem redova stoma u odnosu na populacije Tara i Malinik.

Regresionom analizom se težilo utvrđivanju linearne zavisnosti između klimatskih faktora (temperature, padavina i nadmorske visine) i morfoloških

karakteristika ženskih jedinki tise, kao i linearne zavisnosti između klimatskih faktora i morfoloških karakteristika muških jedinki tise u istraživanim populacijama.

Najjača zavisnost od bioklimatskih varijabli utvrđena je za dužinu, širinu, površinu i specifičnu površinu četina i broj redova stoma kod ženskih jedinki tise. Kod muških jedinki, značajna zavisnost od bioklimatskih varijabli utvrđena je samo za širinu četina i broj redova stoma (Tabele br. 20, 21, 22 i 23).

Morfološke karakteristike četina kod ženskih jedinki tise pozitivno su korelisane sa bioklimatskim varijablama vezanim za temperaturu vazduha. Sa dijagrama na slikama br. 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 i 65 se može videti da se sa porastom srednje godišnje temperature (BIO1), srednje temperature najvlažnijeg kvartala (BIO8), srednje temperature najtoplijeg kvartala (BIO10), srednje temperature za avgust i srednje temperature za septembar povećava dužina, površina i širina četina i broj redova stoma kod ženskih jedinki tise.

Bioklimatske varijable vezane za količinu padavina su slabije korelisane sa morfološkim karakteristikama četina. Sa dijagrama na slikama br. 66, 67, 68, 69, 70 i 71 se može videti da se sa porastom količine padavina u najvlažnijem kvartalu (BIO16), količine padavina u najtoplijem kvartalu (BIO18) i prosečne količine padavina za jul povećava dužina, površina i širina četine i broj redova stoma kod ženskih jedinki tise.

Značajne korelacije su utvrđene između nadmorske visine i dužine četine kod ženskih jedinki (Slika br. 72), kao i nadmorske visine i širine četine kod muških jedinki tise (Slika br. 73). Sa porastom nadmorske visine se smanjuju dužina četina kod ženskih i širina četina kod muških jedinki tise. Promene u strukturi, morfologiji i kruženju ugljenika sa promenom nadmorske visine su najviše uzrokovane promenom u temperaturi vazduha (Tranquillini, 1979 prema Hertel i Wesche, 2008; Ohsawa, 1990; Körner, 1998).

Cedro i Iszkulo (2011) su ispitali hipotezu da postoje razlike između muških i ženskih jedinki tise na sezonskoj skali ulaganja resursa. Postavljena hipoteza je potvrđena, muške i ženske jedinke su različito reagovala na temperaturu i padavine duž sezonskog gradijenta. Utvrđeno je da postoji negativna korelacija između godišnjeg prirasta ženskih jedinki sa visokim temperaturama u avgustu i septembru u prethodnoj godini.

U avgustu i septembru se odvija proces sazrevanja semena kod ženskih jedinki i formiranje generativnih pupoljaka kod oba pola (Bugala, 1978). Ženske jedinke u ovom periodu imaju veća ulaganja u reproduktivne procese, pa stoga manje resursa ulažu u rast. Međutim, istraživanjima u disertaciji je utvrđena pozitivna korelacija između temperature u avgustu i septembru i dimenzija četina kod ženskih jedinki tise.

Povećanje dimenzija četina (dužine, širine i površine) kod tise sa porastom temperature je zabeležen za veliki broj temperaturnih bioklimatskih varijabli, što ukazuje na postojane jednog univerzalnog trenda, nezavisnog od sezonskih varijacija. U tom smislu, dimenzije četina mogu se posmatrati samo u odnosu na osnovnu temperaturnu varijablu – srednju godišnju temperaturu (BIO1).

U brojnim studijama na drugim vrstama potvrđeno je postojanje pozitivne korelacije između temperature i površine i specifične površine lista (Körner et al., 1989; Cordell et al., 1998; Moser et al., 2007; Hertel i Wesche, 2008; Macek et al., 2009; Toivonen et al., 2014). Takođe, intezitet fotosinteze se povećava sa porastom temperature (Cabrera et al., 1998; Zhang et al., 2005; Azócar et al., 2007). Direktni mehanizmi koji leže u osnovi smanjenja lisne površine sa smanjenjem temperature su nejasni, ali se povezuju sa ekonomisanjem energije i povećanjem debljine lista (Toivonen et al., 2014). Ovo istraživanje je potvrdilo hipotezu da se sa povećanjem temperature vazduha povećavaju dimenzije četina, ali samo kod ženskih jedinki. Pošto su pozitivne korelacije između dimenzija četina i temperaturnih bioklimatskih varijabli slabije izražene kod muških jedinki, može se zaključiti da se odgovor na srednju godišnju temperaturu vazduha razlikuje među polovima *Taxus baccata* L.

Cedro i Iszkulo (2011) su utvrdili da je godišnji prirast ženskih jedinki tise pozitivno korelisan sa količinom padavina u junu i julu u tekućoj godini. To je period intezivnog debljanja stabla kod oba pola, kada su muške jedinke završile fazu cvetanja, a ženske jedinke su u fazi formiranja semena i arilusa. Zbog toga ženske jedinke reaguju pozitivno na padavine u ovom periodu (Cedro i Iszkulo, 2011).

Brojne studije su sprovedene u cilju utvrđivanja razlika u rastu između muških i ženskih jedinki u zavisnosti od vlažnosti sredine (Ward et al., 2002; Dudley, 2006; Dudley i Galen, 2007), kao i u zavisnosti od padavina duž sezonskog gradijenta (Montesinos et al., 2006; Rozas et al., 2009; Gao et al., 2010). Rezultati istraživanja

podržavaju opšte pravilo da su ženske jedinke uglavnom zahtevnije u pogledu vlažnosti od muških (Freeman et al., 1976; Iglesias i Bell, 1989; Bertiller et al., 2002).

Ovo istraživanje potvrđuje da su ženske jedinke zahtevnije u pogledu vlažnosti, kao i da se ta zavisnost menja duž sezonskog gradijenta. Dimenzije četina (dužina, širina i površina) kod ženskih jedinki tise se povećavaju sa povećanjem količine padavina u najvlažnijem kvartalu (BIO16), količine padavina u najtoplijem kvartalu (BIO18) i prosečne količine padavina za jul. Navedene bioklimatske varijable odnose se na najvlažniji i najtopliji period, što bi u Srbiji odgovaralo periodu od maja do septembra, dakle period sazrevanja semena kod tise. Istraživanje u disertaciji iznosi pretpostavku da se sa povećanjem količine padavina u periodu sazrevanja semena povećavaju dimenzije četina kod ženskih jedinki tise.

Pozitivne korelacije između dimenzija četina i bioklimatskih varijabli vezanih za količinu padavina su slabije izražene kod muških jedinki, pa se stoga može zaključiti da se odgovor na količinu padavina razlikuje među polovima *Taxus baccata* L. i da ta razlika varira duž sezonskog gradijenta.

Regresiona analiza ukazuje na to da su ženske jedinke osetljivije na promene klime i nose više informacija o klimi (Fritts, 1976 prema Gao et al., 2010), kao i da su više pogođene stresnim uslovima sredine (Bullock, 1992; Guillon i Fievet, 2003; Xu et al., 2008). Zbog toga, u populacijama koje se nalaze van svog ekološkog optimuma može doći do postepenog izumiranja ženskih jedinki čime može biti ugrožena ravnoteža polova i polna reprodukcija dovedena u pitanje.

6. ZAKLJUČCI

1. U etarskom ulju iz svežih četina i grančica iz tri prirodne populacije tise u Srbiji detektovana je 91 komponenta, od kojih je 87 identifikovano. U sve tri populacije najzastupljenija jedinjenja su alifatični alkoholi 1-okten-3-ol (23.48%) i (Z)-3-heksenol (11.46%) i oksigenovani monoterpen mirtenol (11.38%). Najzastupljenije klase jedinjenja su alifatični alkoholi (43.31%), zatim terpeni (19.34%), alifatični ugljovodonici (13.18%) i alifatični aldehidi (11.09%). Neidentifikovana jedinjenja čine 1.96% ulja. Najzastupljeniju frakciju terpena čine monoterpeni (14.41%), a zatim diterpeni (2.52%).
2. U poređenju sa dosadašnjim istraživanjima isparljivih jedinjenja tise, sastav etarskog ulja iz tri prirodne populacije tise u Srbiji je najbližiji sastavu etarskog ulja tise iz jugoistočne Srbije, koji su analizirali Radulović i sar. (2010). Ukupno 40 jedinjenja se podudara u ova dva istraživanja, s tim što se njihova procentualna zastupljenost razlikuje. Radulović i sar. (2010) nisu detektovali seskviterpene u etarskom ulju tise iz jugoistočne Srbije, dok u istraživanjima u disertaciji seskviterpeni čine 2.31% etarskog ulja. Razlike u zastupljenosti pojedinih klasa jedinjenja se mogu objasniti različitim vremenom uzorkovanja materijala.
3. Prirodne populacije tise u Srbiji se razlikuju prema sadržaju etarskog ulja iz četina. Analizom varijanse je utvrđeno da se od ukupno 17 jedinjenja koja imaju normalnu raspodelu, 8 jedinjenja statistički značajno razlikuje prema zastupljenosti među populacijama ($p < 0.05$): *n*-octanal, β -linalol, β -ciklocitral, (E)- β -jonon, eikozanal, *trans*-feruginol, trikozanal i heksakozan. Utvrđeno je da jedinke sa Tare sadrže značajno više β -linalola, eikozanala i trikozanala u etarskom ulju u odnosu na jedinke sa Kopaonika i Malinika. U odnosu na jedinjenja koja imaju normalnu raspodelu, muške i ženske jedinke se razlikuju samo po sadržaju α -pinena u populaciji Malinik i na nivou sve tri populacije zajedno.

4. Klaster analiza je pokazala da su prema sadržaju etarskog ulja sličnije populacije Tara i Kopaonik, dok se populacija Malinik razlikuje. Analiza glavnih komponenti sa 22 najzastupljenije hemijske komponente etarskog ulja je pokazala razdvajanje jedinki sa Kopaonika od jedinki sa Malinika, kao i jedinki sa Tare od jedinki sa Malinika. Statistički značajne razlike utvrđene su u sadržaju: pentakozana, 1-okten-3-ola, 1-okten-3-ona, 3-oktanona, *n*-nonanala, palmitinske kiseline, junicedranola, (*Z*)-3-heksenola i heptadekana između tri prirodne populacije tise u Srbiji.

5. Kanonijska diskriminaciona analiza sa 22 izabrane hemijske komponente je pokazala grupisanje 47 jedinki tise u 3 grupe koje odgovaraju različitim populacijama. Prva diskriminaciona funkcija (objašnjava 70.0% varijanse za ispitivane parametre) odvaja populaciju Kopaonik od populacija Tara i Malinik. Druga diskriminaciona funkcija objašnjava preostali procenat varijanse i odvaja populaciju Malinik u odnosu na populacije Tara i Kopaonik. Utvrđeno je da jedinke sa Kopaonika sadrže značajno veći procenat 1-okten-3-ona, 3-oktanona, *n*-nonanala, palmitinske kiseline, kao i značajno manji procenat (*Z*)-3-heksenola i pentakozana u etarskom ulju iz četina u odnosu na jedinke sa Tare i Malinika. Jedinke sa Malinika sadrže značajno više (*Z*)-3-heksenola, a značajno manje palmitinske kiseline i junicedranola u etarskom ulju u odnosu na druge dve ispitivane populacije.

6. Jedinjenja etarskog ulja koja su najjače korelisana sa bioklimatskim varijablama vezanim za temperaturu vazduha su β -linalol, 1-okten-3-on i *n*-nonanal. Sa porastom maksimalne temperature u oktobru (t_{max_okt}) i u jesenjim mesecima (t_{max_jes}) i sa povećanjem godišnjeg temperaturnog opsega (BIO7) povećava se sadržaj monoterpena β -linalola u populacijama. Sadržaj 1-okten-3-ona i *n*-nonanala bolje predviđaju varijable vezane za minimalne temperature. Sa porastom minimalne temperature najhladnijeg perioda (BIO6), minimalne temperature za oktobar (t_{min_okt}) i za jesenje mesece (t_{min_jes}) se povećava se sadržaj ketona 1-okten-3-ona i aldehida *n*-nonanala u populacijama. Sa porastom

- sezonskih varijacija u temperaturi (BIO4), sadržaj (Z)-3-heksenola raste, a sadržaj β -ciklocitrala opada.
7. Jedinjenja etarskog ulja koja su najjače korelisana sa bioklimatskim varijablama vezanim za količinu padavina su (Z)-3-heksenol i β -ciklocitral. Alkohol (Z)-3-heksenol i monoterpen β -ciklocitral su najjače korelisani sa količinom padavina u najvlažnijem periodu (BIO13), količinom padavina u najsuvljem kvartalu (BIO17) i sezonskim varijacijama u količini padavina (BIO15). Sa povećanjem količina padavina u najvlažnijem periodu (BIO13) i sezonskih varijacija u količini padavina (BIO15), sadržaj (Z)-3-heksenola raste, a sadržaj β -ciklocitrala opada. Sa povećanjem količine padavina u najsuvljem kvartalu (BIO17), sadržaj (Z)-3-heksenola opada, a sadržaj β -ciklocitrala raste.
 8. Jedinjenja etarskog ulja koja su najjače korelisana sa nadmorskom visinom su (Z)-3-heksenol, 1-okten-3-on i *n*-nonanal. Sa porastom nadmorske visine, sadržaji 1-okten-3-ona i *n*-nonanala rastu, a sadržaj (Z)-3-heksenola opada.
 9. Regresiona analiza je identifikovala konstituente etarskog ulja tise koji pokazuju najjaču linearnu zavisnost od bioklimatskih faktora i nadmorske visine, a koji pritom predstavljaju potencijalne hemijske markere za geografsku diferencijaciju populacija. Može se zaključiti da su sadržaji β -linalola, 1-okten-3-ona, *n*-nonanala, (Z)-3-heksenola i β -ciklocitrala pod jakim uticajem abiotičkih faktora (klimatskih karakteristika i nadmorske visine), dok su sadržaji ostalih komponenti, koje se takođe značajno razlikuju među istraživanim populacijama, verovatno pod jačim uticajem biotičkih faktora.
 10. Ispitano je 7 morfoloških karakteristika četina u prirodnim populacijama *Taxus baccata* L. u Srbiji. Srednje vrednosti iznose 22.14 mm za dužinu četine, 2.35 mm za širinu četine, 47.18 mm² za površinu četine, 9.47 za odnos dužine i širine četine, 42.89 cm²/g za specifičnu površinu četine, 8.5 za broj redova stoma na jednoj polovini naličja četine i 135.16 po mm² za gustinu stoma.

11. Statističkom analizom (analizom varijanse, Kruskal-Wallis testom, analizom glavnih komponenti i klaster analizom) utvrđeno je da se istraživane populacije tise u Srbiji razlikuju prema morfološkim karakteristikama. Najviše specifičnosti ima populacija Kopaonik, koja se karakteriše manjom dužinom, širinom, površinom i specifičnom površinom četina, manjim odnosom dužine i širine četina i manjim brojem redova stoma u odnosu na populacije Tara i Malinik.
12. Razlike u gustini stoma u populacijama tise u Srbiji mogu se smatrati morfološkim adaptacijama na različite uslove vlažnosti sredine. U populaciji Malinik, koja ima najmanju količinu padavina i najmanju relativnu vlažnost vazduha, zabeležena najveća gustina stoma, dok je u populaciji Tara, koja ima najveću količinu padavina i najveću relativnu vlažnost vazduha, zabeležena najmanja gustina stoma.
13. Statističkom analizom (ANOVA i t-test za nezavisne uzorke) je utvrđeno da se muške i ženske jedinke u populacijama tise u Srbiji razlikuju prema morfološkim karakteristikama. Ženske jedinke tise u Srbiji imaju značajno veću dužinu, širinu i površinu četina, odnos dužine i širine četina, broj redova stoma i gustinu stoma u odnosu na muške jedinke.
14. Podaci za dosadašnja istraživanja morfoloških karakteristika tise su prikupljeni i sistematizovani zajedno sa rezultatima istraživanja iz disertacije. Analiza glavnih komponenti je pokazala razdvajanje populacija *Taxus baccata* L. iz Evrope i mediteranskog regiona na osnovu morfoloških karakteristika. Klaster analiza je pokazala da se istraživane populacije tise mogu svrstati u 4 grupe. Populacije iz Srbije su najbližije populacijama iz Poljske i Ukrajine, i one zajedno čine prve grupu. Drugu grupu čine populacije tise iz Velike Britanije, koje su prema morfološkim karakteristikama bliže populacijama iz kontinentalne Evrope nego makaronezijskim i mediteranskim populacijama. Treću grupu čine populacije sa Mediterana (Italija, Grčka i Alžir). Makaronezijske populacije (Azorska ostrva i Madeira) su najviše izdvojene i one predstavljaju četvrtu grupu.

15. Najjača zavisnost od bioklimatskih varijabli utvrđena je za dužinu, širinu, površinu i specifičnu površinu četina i broj redova stoma kod ženskih jedinki tise. Kod muških jedinki, slabija zavisnost od bioklimatskih varijabli utvrđena je samo za širinu četina i broj redova stoma.
16. Morfološke karakteristike četina kod ženskih jedinki tise pozitivno su korelisane sa bioklimatskim karakteristikama vezanim za temperaturu vazduha. Sa porastom srednje godišnje temperature (BIO1), srednje temperature najvlažnijeg kvartala (BIO8), srednje temperature najtoplijeg kvartala (BIO10), srednje temperature za avgust i srednje temperature za septembar povećava se dužina, površina i širina četina i broj redova stoma kod ženskih jedinki tise.
17. Bioklimatske varijable vezane za količinu padavina su slabije korelisane sa morfološkim karakteristikama četina. Sa porastom količine padavina u najvlažnijem kvartalu (BIO16), količine padavina u najtoplijem kvartalu (BIO18) i prosečne količine padavina za jul povećava se dužina, površina i širina četine i broj redova stoma kod ženskih jedinki tise.
18. Značajne korelacije su utvrđene između nadmorske visine i dužine četine kod ženskih jedinki, kao i nadmorske visine i širine četine kod muških jedinki tise. Sa porastom nadmorske visine se smanjuju dužina četina kod ženskih i širina četina kod muških jedinki tise.
19. Povećanje dimenzija četina (dužine, širine i površine) kod tise sa porastom temperature je zabeležen za veliki broj temperaturnih bioklimatskih varijabli, što ukazuje na postojane jednog univerzalnog trenda, nezavisnog od sezonskih varijacija. U tom smislu, dimenzije četina možemo posmatrati samo u odnosu na osnovnu temperaturnu varijablu – srednju godišnju temperaturu (BIO1). Ovo istraživanje je potvrdilo hipotezu iznesenu u ranijim istraživanjima da se sa povećanjem temperature vazduha povećavaju dimenzije četina, ali samo kod ženskih jedinki. Pošto su pozitivne korelacije između dimenzija četina i

temperaturnih bioklimatskih varijabli slabije izražene kod muških jedinki, može se zaključiti da se odgovor na srednju godišnju temperaturu vazduha razlikuje među polovima *Taxus baccata* L.

20. Opšte pravilo je da su ženske jedinke kod dvodomih vrsta uglavnom zahtevnije u pogledu vlažnosti od muških. Ova disertacija potvrđuje da su ženske jedinke *Taxus baccata* L. zahtevnije u pogledu vlažnosti, kao i da se ta zavisnost menja duž sezonskog gradijenta. Dimenzije četina (dužina, širina i površina) kod ženskih jedinki tise se povećavaju sa povećanjem količine padavina u najvlažnijem kvartalu (BIO16), količine padavina u najtoplijem kvartalu (BIO18) i prosečne količine padavina za jul. Navedene bioklimatske varijable odnose se na najvlažniji i najtopliji period, što bi u Srbiji odgovaralo periodu od maja do septembra, dakle period sazrevanja semena kod tise. Ova disertacija iznosi pretpostavku da se sa povećanjem količine padavina u periodu sazrevanja semena povećavaju dimenzije četina kod ženskih jedinki tise. Pretpostavku bi trebalo potvrditi dodatnim istraživanjima morfologije četina na drugim populacijama iz Srbije i Evrope. Pozitivne korelacije između dimenzija četina i bioklimatskih varijabli vezanih za količinu padavina su slabije izražene kod muških jedinki, pa se stoga može zaključiti da se odgovor na količinu padavina razlikuje među polovima *Taxus baccata* L. i da ta razlika varira duž sezonskog gradijenta.
21. Regresiona analiza je pokazala da su ženske jedinke osetljivije na promene klime i nose više informacija o klimi, pa samim tim mogu biti više pogođene stresnim uslovima sredine. Zbog toga, u populacijama koje se nalaze van svog ekološkog optimuma može doći do postepenog izumiranja ženskih jedinki čime može biti ugrožena ravnoteža polova i polna reprodukcija dovedena u pitanje.

Ovo istraživanje predstavlja doprinos razumevanju kompleksne ekologije *Taxus baccata* L. i predstavlja naučnu osnovu za konzervaciju prirodnih populacija ove reliktno, autohtone i ugrožene vrste u Srbiji. U nastavku istraživanja, potrebno je istražiti odnos polova u populacijama u Srbiji. Populacije u kojima je ovaj odnos ozbiljno narušen u korist muških jedinki, nalaze se van ekološkog optimuma i imaju prioritet za konzervaciju. Takođe, mladoj populaciji na Tari treba posvetiti posebnu pažnju u okviru programa zaštite i razvoja NP Tara jer bi se na ovom lokalitetu mogla formirati čista sastojina tise.

7. LITERATURA

Adams, R.P. 2001. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Quadrupole Mass Spectroscopy, 3th Ed., Allured Publishing Corp., Carol Stream, Illinois, USA.

Ainsworth, E.A., Rogers, A. 2007. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising CO₂: mechanisms and environmental interactions. *Plant Cell and Environment* 30, 258-270.

Allen, G.A., Antos, J.A. 1993. Sex ratio variation in the dioecious shrub *Oemleria cerasiformis*. *American Naturalist* 141, 537-553.

Arrabal, C., García-Vallejo, M.C., Cadahia, E., Cortijo, M., de Simón, B.F. 2011. Characterization of two chemotypes of *Pinus pinaster* by their terpene and acid patterns in needles. *Plant Systematics and Evolution* 298, 511-522.

Azócar, A., Rada, F., García-Núñez, C. 2007. Functional characteristics of the arborescent genus *Polylepis* along a latitudinal gradient in the high Andes. *Interciencia* 32, 663-668.

Bertiller, M., Sain, C., Carrera, A. 2002. Effect of fine-scale spatial variation of soil nitrogen on the performance of the sexes of *Poa ligularis* in patchy ecosystems of Northern Patagonia. *International Journal of Plant Sciences* 163, 419-425.

Bresson, C.C., Vitasse, Y., Kremer, A., Delzon, S. 2011. To what extent is altitudinal variation of functional traits driven by genetic adaptation in European oak and beech? *Tree Physiology* 31, 1164-1174.

Bojovic, S., Jurc, M., Drazic, D., Pavlovic, P., Mitrovic, M., Djurdjevic, L., Dodd, R.S., Afzal-Rafii, Z., Barbero, M. 2005. Origin identification of *Pinus nigra* populations in southwestern Europe using terpene composition variations. *Trees* 19, 531-538.

Bojović, S., Mitrović, S. 2010. Biostatistika. Institut za šumarstvo, Beograd.

Bojović, S., Nikolić, B., Ristić, M., Orlović, S., Veselinović, M., Rakonjac, Lj., Dražić, D. 2011. Variability in Chemical Composition and Abundance of the Rare Tertiary Relict *Pinus heldreichii* in Serbia. *Chemistry & Biodiversity* 8, 1754-1765.

Bugala, W. 1978. Systematics and variability. In *The Yew – Taxus baccata L.* (eds S. Bartkowiak, W. Bugala, A. Czartoryski, A. Hejnowicz, S. Król, A. Środoń & R.K. Szaniawski), pp. 15–32. Foreign Scientific Publications, Department of the National Center for Scientific and Technical, and Economic Information (for the Department of Agriculture and the National Science Foundation, Washington, DC), Warsaw, Poland.

Bullock, S.H. 1992. Effects of sex, size and substrate on growth and mortality of trees in tropical wet forest. *Oecologia* 91, 52-55.

Burns, R.M., Honkala, B.H. 1990. *Silvics of North America, 1. Conifers.* United States Department of Agriculture Forest Service, Agricultural Handbook 654. Washington, DC, USA.

Cabrera, H.M., Rada, F., Cavieres, L. 1998. Effects of temperature on photosynthesis of two morphologically contrasting plant species along an altitudinal gradient in the tropical high Andes. *Oecologia* 114, 145-152.

Caissard, J.C., Meekijironenroj, A., Baudino, S., Anstett, M.C. 2004. Localization of production and emission of pollinator attractant on whole leaves of *Chamaerops humilis* (Arecaceae). *American Journal of Botany* 91, 1190-1199.

Cedro, A., Iszkuło, G. 2011. Do females differ from males of European yew (*Taxus baccata L.*) in dendrochronological analysis? *Tree-Ring Research* 67, 3-11.

- Chase**, M. W., Soltis, D. E., Olmstead, R. G., et al. (42 co-authors). 1993. Phylogenetics of seed plants: An analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80, 528-580.
- Chaw**, S.-M., Long, H., Wang, B.-S., Zharkikh, A., and Li, W.-H. 1993. The phylogenetic position of Taxaceae based on 18S rRNA sequences. *Journal of Molecular Evolution* 37, 624-630.
- Cheng**, Y., Nicolson, R.G., Tripp, K., Chaw, S.M. 2000. Phylogeny of Taxaceae and Cephalotaxaceae genera inferred from chloroplast *matK* gene and nuclear rDNA ITS region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14, 353-365.
- Chybicki**, I.J., Oleksa, A., Burczyk, J. 2011. Increased inbreeding and strong kinship structure in *Taxus baccata* estimated from both AFLP and SSR data. *Heredity* 107, 589-600.
- Ciha**, A.J., Brun, W.A. 1975. Stomatal size and frequency in soybeans. *Crop Science* 15, 309-313.
- Cipollini** M.L., Stiles E.W. 1991. Costs of Reproduction in *Nyssa sylvatica* – Sexual Dimorphism in Reproductive Frequency and Nutrient Flux. *Oecologia* 86, 585-815.
- Cipollini**, M. L., Whigham, D. F. 1994. Sexual dimorphism and cost of reproduction in the dioecious shrub *Lindera benzoin* (Lauraceae). *American Journal of Botany* 81, 65-75.
- Clark**, J.G.D. 1963. Neolithic bows from Somerset, England, and the prehistory of archery in North- western Europe. *Proceedings of the Prehistoric Society* 29, 50-98.
- Cope**, E.A. 1998. Taxaceae: The Genera and Cultivated Species. *Botanical Review* 64, 291-322.

Cordell, S., Goldstein, G., Mueller-Dombois, D., Webb, D., Vitousek, P.M. 1998. Physiological and morphological variation in *Metrosideros polymorpha*, a dominant Hawaiian tree species, along an altitudinal gradient: The role of phenotypic plasticity. *Oecologia* 113, 188-196.

Couvét, D. 2002. Deleterious effects of restricted gene flow in fragmented populations. *Conservation Biology* 16, 369-376.

Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G. 2000. Natural products (secondary metabolites). In Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists: 1250-1318.

Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H. 2006. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing: Oxford, UK.

Darrall, N.M. 1989. The effect of air pollutants on physiological processes in plants. *Plant, Cell and Environment* 12, 1-30.

Dawson, T.E., Bliss, L.C. 1993. Plants as Mosaics: Leaf-, Ramet-, and Gender-Level Variation in the Physiology of the Dwarf Willow, *Salix arctica*. *Functional Ecology* 7, 293–304.

Dawson, T.E., Ehleringer, J.R. 1993. Gender-specific physiology, carbon isotope discrimination, and habitat distribution in boxelder, *Acer negundo*. *Ecology* 74, 798-815.

Delph, L.F., 1990. Sex-differential resource allocation patterns in the subdioecious shrub *Hebe subalpina*. *Ecology* 71, 1342-1351.

Deforce, K., Bastiaens, J. 2007. The Holocene history of *Taxus baccata* (yew) in Belgium and neighbouring regions. *Belgian Journal of Botany* 140, 222-237.

Delfine, S., Loreto, F., Pinelli, P., Tognetti, R., Alvino, A. 2005. Isoprenoids content and photosynthetic limitations in rosemary and spearmint plants under water stress. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106, 243-252.

Dempsey, D., Hook, I. 2000. Yew (*Taxus*) species – chemical and morphological variations. *Pharmaceutical Biology* 38, 274-280.

Devaney, J.L., Jansen, M. A. K., Whelan, P.M., 2014. Spatial patterns of natural regeneration in stands of English yew (*Taxus baccata* L.); Negative neighbourhood effects. *Forest Ecology and Management* 321, 52-60.

Dewick, P.M. 2002. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Second Edition, John Wiley & Sons, New York: 121-123.

Dhar, A., Ruprecht, H., Klumpp, R., Vacik, H. 2006. Stand structure and natural regeneration of English yew (*Taxus baccata* L.) at Stiwollgraben in Austria. *Dendrobiology* 56, 19-26.

Dhar, A., Ruprecht, H., Klumpp, R., Vacik, H. 2007. Comparison of ecological condition and conservation status of English yew population in two Austrian gene conservation forests. *Journal of Forestry Research* 18, 181-186.

Dhar, A., Ruprecht, H., Vacik, H., 2008. Population viability risk management (PVRM) for in situ management of endangered tree species - A case study on a *Taxus baccata* L . population. *Forest Ecology and Management* 255, 2835-2845.

Di Sapio, O.A., Gattuso, S.J., Gattuso, M.A. 1997. Morphoanatomical characters of *Taxus baccata* bark and leaves. *Fitoterapia* 68, 252-260.

Diab, Y., Auezova, L., Chebib, H., Chalchat, J.-C., Figueredo, G. 2002. Chemical Composition of Lebanese Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Essential Oil as a

Function of the Geographical Region and the Harvest Time. *Journal of Essential Oil Research* 14, 449-452.

Djerrad, Z., Kadik, L., Djouahri, A. 2015. Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. *Industrial Crops and Products* 74, 440-449.

Doyle, J. 1963. Proembryogeny in *Pinus* in relation to that in other conifers—A survey. *Proceedings of the Royal Irish Academy, Section B* 62, 181-216.

Đukić, M., Đunisijević, D. 2002. Neka fiziološka svojstva bukve sa Kopaonika, I Konferencija "S planinom u novi vek", Kopaonik, 137-140.

Dubreuil, M., Sebastiani, F., Mayol, M., González-Martínez, S.C., Riba, M., Vendramin, G.G. 2008. Isolation and characterization of polymorphic nuclear microsatellite loci in *Taxus baccata* L. *Conservation Genetics* 9, 1665-1668.

Dubreuil, M., Riba, M., González-Martínez, S.C., Vendramin, G.G., Sebastiani, F., Mayol, M. 2010. Genetic effects of chronic habitat fragmentation revisited: strong genetic structure in a temperate tree, *Taxus baccata* (Taxaceae), with great dispersal capability. *American Journal of Botany* 97, 303-310.

Dudley, L. 2006. Ecological correlates of secondary sexual dimorphism in *Salix glauca* (Salicaceae). *American Journal of Botany* 93, 1775-1783.

Dudley, L., Galen, C. 2007. Stage-dependent patterns of drought tolerance and gas exchange vary between sexes in the alpine willow, *Salix glauca*. *Oecologia* 153, 1-9.

Elwes, H.J., Henry, A.H. 1906. *The Trees of Great Britain and Ireland*, Vol 1. SR Publishers LTD.

Eng, J. 2003. Sample Size Estimation: How Many Individuals Should Be Studied? *Radiology*, 227, 309-313.

Erdemoglu, N., Sener, B., Demirci, B. 2003. The glycosidically bound volatile compounds of *Taxus baccata*. *Chemistry of Natural Compounds* 39, 147-149.

Espirito-Santo, M.M., Madeira, B.G., Neves, F.S., Faria, M.L., Fagundes, M., Fernandes, G.W. 2003. Sexual differences in reproductive phenology and their consequences for the demography of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), a dioecious tropical shrub. *Annals of Botany* 91, 13-19.

European Commission, 2007. Interpretation manual of European Union Habitats – EUR27. DG Environment, European Commission.

Farris, E., Filigheddu, R. 2008. Effects of browsing in relation to vegetation cover on common yew (*Taxus baccata* L.) recruitment in Mediterranean environments. *Plant Ecology* 199, 309-318.

Farris, E., Fenu, G., Bacchetta, G. 2012. Mediterranean *Taxus baccata* woodlands in Sardinia: A characterization of the EU priority habitat 9580. *Phytocoenologia* 41, 231-246.

Ferguson, D.K. 1978. Some current research on fossil and recent taxads. Review of Palaeobotany and Palynology 26, 213-226.

Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pais, M.S.S., Scheffer, J.J.C. 1992. Composition of the Essential Oils from Leaves and Flowers of *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium*. *Flavour Fragr. J.* 7, 219-222.

Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Scheffer, J.J.C. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: Volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 23, 213-226.

Firn, R.D., Jones, C.G. 1996. An explanation of secondary products redundancy. In: Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions. Recent Advances in Phytochemistry 30, 295-312. Eds. Romeo, J.T., Saunders, J.A., Barbosa, P. New York: Plenum Press, 295-312.

Firn, R.D., Jones, C.G. 2003. Natural products – a simple model to explain chemical diversity. The Royal Society of Chemistry 20, 382-391.

Flesch, V., Jacques, M., Cosson, L., Teng, B.P., Petiard, V., Balz, J.P. 1992. Relative importance of growth and light level on terpene content of *Ginkgo biloba*. Phytochemistry 31, 1941-1945.

Florin, R. 1948. On the morphology and relationships on the Taxaceae. Botanical Gazette 110, 31-39.

Franks, P.J., Beerling, D.J. 2009. Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects on stomatal size and density over geologic time. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, 10343-10347.

Freeman, D., Klikoff, L., Harper, K. 1976. Differential resource utilization by the sexes of dioecious plants. Science 193, 597-599.

Freeman, D.C., Harper, K.T., Ostler, W.K. 1980. Ecology of plant dioecy in the Intermountain region of western North America and California. Oecologia 44, 410-417.

Fukarek, P. 1957. Tisa (*Taxus baccata* L.), njena nalazišta u Bosni i Hercegovini i njihova zaštita. Naše starine IV: 263-280.

Gajić, M. 1988. Flora Nacionalnog parka Tara. Šumarski fakultet, Beograd, Šumska sekcija Bajina Bašta, Bajina Bašta 1-632.

Gajić, M., Kojić, M., Karadžić, D., Vasiljević, M., Stanić, M. 1992. Vegetacija Nacionalnog parka Tara. Šumarski fakultet, Beograd, Nacionalni park Tara, Bajina Bašta 1-288.

Gao, L., Zhang, C., Zhao, X., Gadow, K. V. 2010. Gender-Related Climate Response of Radial Growth in Dioecious *Fraxinus mandshurica* Trees. *Tree-Ring Research* 66, 105-112.

García, D., Zamora, R., Hódar, J.A., Gómez, J.M., Castro, J. 2000. Yew (*Taxus baccata* L.) regeneration is facilitated by fleshy-fruited shrubs in Mediterranean environments. *Biological Conservation* 95, 31-38.

García, D., Obeso, J.R. 2003. Facilitation by herbivore-mediated nurse plants in a threatened tree, *Taxus baccata*: Local effects and landscape level consistency. *Ecography* 26, 739-750.

Ghanmi, M., El Abid, A., Chaouch, A., Aafi, A., Aberchane, M., El Alami, A., Farah, A. 2005. Yield and chemical composition study of turpentine from maritime Pine (*Pinus pinaster*) and Aleppo Pine (*Pinus halepensis*) in Morocco. *Acta Botanica Gallica* 152, 3-10.

Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., Mikail, C., Abou, L., Portugal, H. 2004. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytherapy Research* 18, 990-995.

González-Martínez, S.C., Dubreuil, M., Riba, M., Vendramin, G.G., Sebastiani, F., Mayol, M. 2010. Spatial genetic structure of *Taxus baccata* L. in the western Mediterranean Basin: past and present limits to gene movement over a broad geographic scale. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55, 805-815.

Guillon, J.M., Fievet, D. 2003. Environmental sex determination in response to light and biased sex ratios in *Equisetum gametophytes*. *Journal of Ecology* 91, 49-57.

Hageneder, F. 2011. *Yew: A History*. The History Press, Stroud.

Hageneder, F. 2013. *Yew*. Reaction Books, London.

Hamilton, J.G., Zangerl, A.R., Delucia, E.H., Berenbaum, M.R. 2001. The carbon-nutrient balance hypothesis: its rise and fall. *Ecology Letters* 4, 86-95.

Hanlidou, E., Karousou, R., Lazari, D. 2014. Essential-Oil Diversity of *Salvia tomentosa* Mill. in Greece. *Chemistry & Biodiversity* 11, 1205-1215.

Hart, J.A. 1987. A cladistic analysis of conifers: Preliminary results. *Journal of the Arnold Arboretum* 68, 296-307.

Heath, R.L., Taylor Jr. G.E. 1997. Physiological Processes and Plant Responses to Ozone Exposure. *Ecological Studies* 127, 317-368.

Hegnauer, R. 1988. Biochemistry, distribution and taxonomic relevance of higher plant alkaloids. *Phytochemistry* 27, 2423-2427.

Heilbuth, J.C. 2000. Lower Species Richness in Dioecious Clades. *The American Naturalist* 156, 221-241.

Herms, D. A., Mattson, W.J. 1992. The Dilemma of Plants: To Grow or Defend. *The Quarterly Review of Biology* 67, 283-335.

Hertel, D., Wesche, K. 2008. Tropical moist Polylepis stands at the treeline in East Bolivia: The effect of elevation on stand microclimate, above- and below-ground structure, and regeneration. *Trees – Structure and Function* 22, 303-315.

Hetherington, A.M., Woodward, F.I. 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424, 901-908.

<http://www.hidmet.gov.rs/>

Hewitt, G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of Linnean Society* 58, 247-276.

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. *International Journal of Climatology* 25, 1965-1978.

Hijmans, R.J., Guarino, L., Mathur, P. 2012. DIVA-GIS Version 7.5, Manual http://www.diva-gis.org/docs/DIVA-GIS_manual_7.pdf

Hilfiker, K., Gugerli, F., Schütz, J.P., Rotach, P., Holderegger, R. 2004. Low RAPD variation and female-biased sex ratio indicate genetic drift in small populations of the dioecious conifer *Taxus baccata* in Switzerland. *Conservation Genetics* 5, 357-365.

Hirasuna, T.J., Pestchanker, L.J., Srinivasan, V., Shuler, M.L. 1996. Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44, 95-102.

Holland, N., Richardson, A.D. 2009. Stomatal length correlates with elevation of growth in four temperate species. *Journal of Sustainable Forestry* 28, 63-73.

Hovenden, M.J., Brodribb, T. 2000. Altitude of origin influences stomatal conductance and therefore maximum assimilation rate in Southern Beech, *Nothofagus cunninghamii*. *Australian Journal of Plant Physiology* 27, 451-456.

Hughes, J.B., Daily, G.C., Ehrlich, P.R. 1997. Population diversity: its extent and extinction. *Science* 278, 689-692.

Hulme, P.H. 1996. Natural regeneration of yew (*Taxus baccata* L.): microsite, seed or herbivore limitation? *Journal of Ecology* 84, 853-861.

Iglesias, M., Bell, G. 1989. The small-scale spatial distribution of male and female plants. *Oecologia* 80, 229-235.

Iszkulo, G., Jasińska, A.K., Giertych, M.J., Boratyński, A. 2009. Do secondary sexual dimorphism and female intolerance to drought influence the sex ratio and extinction risk of *Taxus baccata*? *Plant Ecology* 200, 229-240.

IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. www.iucnredlist.org

Jalas, J., Suominen, J. 1973. Atlas Florae Europaeae. Distribution of Vascular Plants in Europe. 2. Gymnospermae (Pinaceae to Ephedraceae). The Committee for Mapping the Flora of Europe and Societas Biologica Fennica Vanamo, Helsinki.

Jean, F. I., Garneau, F. X., Collin, G. J., Bouhajib, M., Zamir, L. O. 1993. The essential oil and glycosidically bound volatile compounds of *Taxus canadensis* Marsh. *Journal of Essential Oil Research* 5, 7-11.

Jones, C.G., Firn, R.D. 1991. On the evolution of plant secondary chemical diversity. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 333, 273-280.

de Jong, T.J., van der Meijden, E. 2004. Sex ratio of some long-lived dioecious plants in a sand dune area. *Plant Biology* 6, 616-620.

Jordán, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Lorán, S., Sotomayor, J.A. 2013. Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Control* 30, 463-468.

Jovanović, B., Radulović, S., Vićentijević, M. 1977. Dendrotoponimi Srbije (van pokrajina), njihove karte i značaj. Glasnik Šumarskog fakulteta 52, 133-186.

Kainulainen, P., Utriainen, J., Holopainen, J. K., Oksanen, J., Holopainen, T. 2000. Influence of elevated ozone and limited nitrogen availability on conifer seedlings in an open-air fumigation system: effects on growth, nutrient content, mycorrhiza, needle ultrastructure, starch and secondary compounds. *Global Change Biology* 6, 345-355.

Katsavou, I., Ganatsas, P., 2012. Ecology and conservation status of *Taxus baccata* population in NE Chalkidiki, northern Greece. *Dendrobiology* 68, 55-62.

Khan, M., Verma, S. C., Srivastava, S. K., Shawl, A. S., Syamsundar, K. V., Khanuja, S. P. S., Kumar, T. 2006. Essential oil composition of *Taxus wallichiana* Zucc. from the Northern Himalayan region of India. *Flavour and Fragrance Journal* 21, 772-775.

Khosroushahi, A.Y., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosrowshahli, M., Naghdibadi, H., Dadpour, M.R., Omid, Y. 2006. Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biology International* 30, 262-269.

Klumpp, R., Dhar, A. 2011. Genetic variation of *Taxus baccata* L. populations in the Eastern Alps and its implications for conservation management. *Scandinavian Journal of Forest Research* 26, 294-304.

Kimura, M., Weiss, G.H. 1964. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 49, 561-576.

Knops, J.M.H., Tilman, D., Haddad, N.M., Naeem, S., Mitchell, C.E., Haarstad, J., Ritchie, M.E., Howe, K.M., Reich, P.B., Siemann, E., Groth, J. 1999. Effects of plant species richness on invasion dynamics, disease outbreaks, insect abundance and diversity. *Ecology Letters* 2, 286-294.

Konrad, W., Roth-Nebelsick, A., Grein, M. 2008. Modelling of stomatal density response to atmospheric CO₂. *Journal of Theoretical Biology* 253, 638-658.

Koricheva, J., Larsson, S., Haukioja, E., Keinänen, M. 1998. Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis. *Oikos* 83, 212-226.

Körner, C., Pelaez Menendez-Riedl, S., John, P.C.L. 1989. Why are bonsai plants small? A consideration of cell size. *Australian Journal of Plant Physiology* 16, 443-448.

Körner, C. 1998. A re-assessment of high elevation treeline positions and their explanation. *Oecologia* 115, 445-459.

Kouwenberg, L.L.R., Kurschner, W.M., McElwain, J.C. 2007. Stomatal frequency change over altitudinal gradients: prospects for paleoaltimetry. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 66, 215-241.

Krischik, V.A., Denno R.F. 1990a. Differences in environmental response between the sexes of the dioecious shrub *Baccharis halimifolia* (Compositae). *Oecologia* 83, 176-181.

Krischik, V.A., Denno, R.F. 1990b. Patterns of growth, reproduction, defense, and herbivory in the dioecious shrub *Baccharis halimifolia* (Compositae). *Oecologia* 83, 182-190.

Krishnan, R. M., Ramesh, B. R. 2005. Endemism and sexual systems in the evergreen tree flora of the Western Ghats, India. *Diversity and Distributions* 11, 559-565.

Lahlou, M., Berrada, R. 2003. Composition and niticidal activity of essential oils of three chemotypes of *Rosmarinus officinalis* L. acclimatized in Morroco. *Flavour and Fragrance Journal* 18, 124-127.

Lake, J.A., Woodward, F.I. 2008. Response of stomatal numbers to CO₂ and humidity: Control by transpiration rate and abscisic acid. *New Phytologist* 179, 397-404.

Lakušić, D.V., Ristić, M.S., Slavkovska, V.N., Šinžar-Sekulić, J.B., Lakušić, B.S. 2012. Environment-related variations of the composition of the essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in the Balkan Peninsula. *Chemistry & Biodiversity* 9, 1286-1302.

Laporte, M.M., Delph, L.F. 1996. Sex-specific physiology and source-sink relations in the dioecious plant *Silene latifolia*. *Oecologia* 106, 63-72.

Lapp, M.S., von Rudloff, E. 1982. Chemosystematic studies in the genus *Pinus*. IV. Leaf oil composition and geographic variation in jack pine of eastern North America. *Canadian Journal of Botany* 60, 2762-2769.

de Laubenfels, D.J. 1988. Coniferales. *Flora Malesiana* 10, 337-453.

Leigh, A., Nicotra, A.B. 2003. Sexual dimorphism in reproductive allocation and water use efficiency in *Maireana pyramidata* (Chenopodiaceae), a dioecious, semi-arid shrub. *Australian Journal of Botany* 51, 509-514.

Leigh, A., Cosgrove, M.J., Nicotra, A.B. 2006. Reproductive allocation in a gender dimorphic shrub: Anomalous female investment in *Gynatrix pulchella*? *Journal of Ecology* 94, 1261-1271.

Leuschner, C. 2002. Air humidity as an ecological factor for woodland herbs: leaf water status, nutrient uptake, leaf anatomy, and productivity of eight species grown at low or high vpd levels. *Flora* 197, 262-274.

Lieutier, F., Berryman, A.A., Millstein, J.A. 1991. Preliminary study of the monoterpene response of three pines to *Ophiostoma clavigerum* (Ascomycetes: Ophiostomatales) and two chemical elicitors. *Annals of Forest Science* 48, 377-388.

Linares, J. C. 2013. Shifting limiting factors for population dynamics and conservation status of the endangered English yew (*Taxus baccata* L., Taxaceae). *Forest Ecology and Management*, 291, 119-127.

Logan, K.T., Krotkov, G. 1968. Adaptations of the photosynthetic mechanism of sugar maple (*Acer saccharum*) seedlings grown in various light intensities. *Physiologia Plantarum* 22, 104-116.

Loreto, F. 2002. Distribution of isoprenoid emitters in the *Quercus* genus around the world : chemo-taxonomical implications and evolutionary considerations based on the ecological function of the trait. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 5, 185-192.

Luomala, E.-M., Laitinen, K., Sutinen, S., Kellomäki, S., Vapaavuori, E. 2005. Stomatal density, anatomy and nutrient concentrations of Scots pine needles are affected by elevated CO₂ and temperature. *Plant, Cell & Environment* 28, 733-749.

Macek, P., Macková, J., de Bello, F. 2009. Morphological and ecophysiological traits shaping altitudinal distribution of three *Polylepis* treeline species in the dry tropical Andes. *Acta Oecologica* 35, 778-785.

Malik, S., Cusidó, R.M., Mirjalili, M.H., Moyano, E., Palazón, J., Bonfill, M. 2011. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review. *Process Biochemistry* 46, 23-34.

Mansfield, T.A. 1998. Stomata and plant water relations: does air pollution create problems? *Environmental Pollution* 101, 1-11.

Massei, G., Watkins, R., Hartley, S.E. 2006. Sex-related growth and secondary compounds in *Juniperus oxycedrus* macrocarpa. *Acta Oecologica* 29, 135-140.

Mendoza, I., Gómez-Aparicio, L., Zamora, R., Matías, L. 2009. Recruitment limitation of forest communities in a degraded Mediterranean landscape. *Journal of Vegetation Science* 20, 367-376.

Merkx, Y.M., Svendsen, A.B. 1990. Glycosidically bound volatile aliphatic and aromatic alcohols – a common feature in the vegetable kingdom? *Journal of Essential Oil Research* 2, 207-208.

Mirov, N.T. 1961. Composition of Gum Turpentine of Pines. United States Department of Agriculture Technical Bulletin 1239, 1.

Mišić, V. 1981. Šumska vegetacija klisura i kanjona istočne Srbije. Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd.

Mitchell, A.K., Arnott, J.T. 1995. Effects of shade on the morphology and physiology of *Abies balsamea* and western hemlock seedlings. *New Forests* 10, 79-98.

Mitchell, A.K. 1998. Acclimation of Pacific yew (*Taxus brevifolia*) foliage to sun and shade. *Tree Physiology* 18, 749-757.

Montesinos, D., De Luis, M., Verdu, M., Raventós, J., García-Fayos, P. 2006. When, how and how much: Gender-specific resource-use strategies in the dioecious tree *Juniperus thurifera*. *Annals of Botany* 98, 885-889.

Moser, G., Hertel, D., Leuschner, C. 2007. Altitudinal change in LAI and stand leaf biomass in tropical montane forests: A transect study in Ecuador and a pan-tropical meta-analysis. *Ecosystems* 10, 924-935.

Mott, K.A. 2009. Opinion: Stomatal responses to light and CO₂ depend on the mesophyll. *Plant Cell and Environment* 32, 1479-1486.

Moura, B.B., Alves, E.S., 2014. Climatic factors influence leaf structure and thereby affect the ozone sensitivity of *Ipomoea nil* "Scarlet O'Hara". Environmental Pollution 194, 11-16.

Myking, T., Vakkari, P., Skrøppa, T., 2009. Genetic variation in northern marginal *Taxus baccata* L. populations. Implications for conservation. Forestry 82, 529-539.

Mysterud, A. Østbye, E. 2004. Roe deer (*Capreolus capreolus*) browsing pressure affects yew (*Taxus baccata*) recruitment within nature reserves in Norway. Biological Conservation 120, 545-548.

Navia-Osorio, A., Garden, H., Cusidó, R.M., Palazón, J., Alfermann, A.W., Piñol, M.T. 2002. Taxol® and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus baccata* and *Taxus wallichiana* in an airlift bioreactor. Journal of Plant Physiology 159, 97-102.

Németh, E. 2005. Essential oil composition of species in the genus *Achillea*. Journal of Essential Oil Research 17, 501-512.

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. Chemistry & Biodiversity 4, 905-916.

Nikolić, B. 2008. Varijabilnost sastava terpene i alkana u četinama omorike (*Picea omorika*/ Panč./ Purkyně, munike (*Pinus heldreichii* Christ.) i molike (*Pinus peuce* Griseb.). Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Nikolić, B., Ristić, M., Bojović, S., Marin, P.D. 2008. Variability of the needle essential oils of *Pinus peuce* from different populations in Montenegro and Serbia. Chemistry & Biodiversity 5, 1377-1388.

Nikolić, B., Tešević, V., Đorđević, I., Marin, P. D., Bojović, S. 2009. Essential oil variability in natural populations of *Picea omorika*, a rare European conifer. *Chemistry & Biodiversity* 6, 193-203.

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. *Chemistry & Biodiversity* 8, 2247-2260.

Nikolić, B., Ristić, M., Bojović, S., Matevski, V., Krivošej, Z., 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. *Chemistry & Biodiversity* 11, 934-948.

Nikolić, B, Ristić, M, Bojovic, S, Krivošej, Z, Matevski, V, Marin, P.D. 2015. Population variability of essential oils of *Pinus heldreichii* from the Scardo-Pindic mountains Ošljak and Galičica. *Chemistry & Biodiversity* 12, 295-308.

Núñez-Regueira, L., Rodríguez Añón, J.A., Prouřin Castiņeiras, J.P. 1997. Calorific values and flammability of forest species in Galicia. Continental high mountainous and humid Atlantic zones. *Bioresource Technology* 61, 111-119.

Obeso, J.R. 1997. Costs of reproduction in *Ilex aquifolium*: Effects at tree, branch and leaf levels. *Journal of Ecology* 85, 159-166.

Obeso, J.R. 2002. The costs of reproduction in plants. *New Phytologist* 155, 321-348.

Obratov-Petković, D., Filipović, M., Popović, I, Đukić, M. 2002. Ekološka analiza zajednice tise na području NP Kopaonik. I Konferencija "S planinom u novi vek", Kopaonik, 121-128.

Ocokoljić, M., Ninić-Todorović, J. 2003. Priručnik iz dekorativne dendrologije. Šumarski fakultet, Beograd.

Ormeño, E., Fernandez, C., Mévy, J.P. 2007a. Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species. *Phytochemistry* 68, 840-852.

Ormeño, E., Bousquet-Mélou, A., Mévy, J.P., Greff, S., Robles, C., Bonin, G., Fernandez, C. 2007b. Effect of intraspecific competition and substrate type on terpene emissions from some Mediterranean plant species. *Journal of Chemical Ecology* 33, 277-286.

Ormeño, E., Mévy, J.P., Vila, B., Bousquet-Mélou, a., Greff, S., Bonin, G., Fernandez, C. 2007c. Water deficit stress induces different monoterpene and sesquiterpene emission changes in Mediterranean species. Relationship between terpene emissions and plant water potential. *Chemosphere* 67, 276-284.

Ormeño, E., Baldy, V., Ballini, C., Fernandez, C. 2008. Production and diversity of volatile terpenes from plants on calcareous and siliceous soils: effect of soil nutrients. *Journal of Chemical Ecology* 34, 1219-29.

Ohsawa, M. 1990. An interpretation of latitudinal patterns of forest limits in south and east-Asian mountains. *Journal of Ecology* 78, 326-339.

Otto, W., Wilde, V. 2001. Sesqui-, Di-, and Triterpenoids as Chemosystematic Markers in Extant Conifers: A Review. *Botanical Review* 67, 141-238.

Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I. 1993. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *Journal of Ethnopharmacology* 39, 167-170.

Paoletti, E., Grulke, N.E. 2005. Does living in elevated CO₂ ameliorate tree response to ozone? A review on stomatal responses. *Environmental Pollution* 137, 483-493.

Pasqua, G., Monacelli, B., Manfredini, C., Loreto, F., Perez, G. 2002. The role of isoprenoid accumulation and oxidation in sealing wounded needles of Mediterranean pines. *Plant Science* 163, 355-359.

Perrin, P.M., Kelly, D.L., Mitchell, F.J.G., 2006. Long-term deer exclusion in yew-wood and oakwood habitats in southwest Ireland: natural regeneration and stand dynamics. *Forest Ecology and Management* 236, 356-367.

Petrakis, P.V., Roussis, V., Ortiz, A. 2000. Monoterpenoid diversity in relation to morphology of *Pinus brutia* and *Pinus halepensis* in an east Mediterranean area (Attiki, Greece): implications for pine evolution. *Edinburgh Journal of Botany* 57, 349-375.

Pietzarka, U. 2005. Zur ökologischen Strategie der Eibe (*Taxus baccata* L.) – Wachstums- und Verjüngungsdynamik. Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart, 1-195.

Pigott, C.D., Rodwell, J.S. 1991. In „British Plant Communities. Woodlands and Shrubs“, Ed. J. S. Rodwell, Cambridge University Press, Cambridge, Vol. 1.

Piovesan, G., Presutti Saba, E., Biondi, F., Alessandrini, A., Di Filippo, A., Schirone, B. 2009. Population ecology of yew (*Taxus baccata* L.) in the Central Apennines: spatial patterns and their relevance for conservation strategies. *Plant Ecology*, 205, 23-46.

Popović, Z., Stefanović, M., Smiljanić, M., Matic, R., Kostić, M., Vidaković, V., Bojović, S. 2012. Sex expression in Serbian dendroflora – a case study of *Fraxinus ornus* var. *angustifolia*. *Archives of Biological Sciences* 64, 107-111.

Pravilnik o proglašenju i zaštiti strogo zaštićenih i zaštićenih divljih vrsta biljaka, životinja i gljiva („Službeni glasnik RS“, br. 5/2010).

Prostorni plan područja posebne namene Nacionalnog parka „Kopaonik“ („Službeni glasnik RS“, broj 95/09).

Premoli, A.C., Brewer, C.A. 2007. Environmental v. genetically driven variation in ecophysiological traits of *Nothofagus pumilio* from contrasting elevations. Australian Journal of Botany 55, 585-591.

Price, R.A. 1990. The genera of Taxaceae in the southeastern United States. Journal of the Arnold Arboretum 71, 69-71.

Purvis, A, Hector, A., 2000. Getting the measure of biodiversity. Nature 405, 212-219.

Qiang, W.Y., Wang, X.L., Chen, T., Feng, H.Y., An, L.Z., He, Y.Q., Wang, G. 2003. Variations of stomatal density and carbon isotope values of *Picea crassifolia* at different altitudes in the Qilian Mountains. Trees 17, 258-262.

Radulović, N., Blagojević, P., Palić, R. 2010. Chemical Composition of the Essential Oil Hydrodistilled from Serbian *Taxus baccata* L. Journal of Essential Oil Research 22, 458-461.

Rajčević, N., Janačković, P., Bojović, S., Tešević, V., Marin, P.D. 2013. Variability of the needle essential oils of *Juniperus deltoides* R.P. Adams from different populations in Serbia and Croatia. Chemistry & Biodiversity 10, 144-156.

Rajčević, N., Janačković, P., Dodoš, T., Tešević, V., Marin, P.D. 2015. Essential-oil variability of *Juniperus deltoides* R.P. Adams along the east Adriatic coast - How many chemotypes are there? Chemistry & Biodiversity 12, 82-95.

Rajčević, N. 2015. Diferencijacija vrsta iz sekcije *Juniperus* roda *Juniperus* L. (Cupressaceae) sa Balkanskog poluostrva, korišćenjem fitohemijskih i molekularnih markera. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Raubeson, L.A., Jansen, R.K. 1992. A rare chloroplast-DNA structural mutation is shared by all conifers. Biochemical Systematics and Ecology 20, 17-24.

Robinson, M.F., Heath, J., Mansfield, T.A. 1998. Disturbances in stomatal behaviour caused by air pollutants. *Journal of Experimental Botany* 49, 461-470.

Rozas, V., DeSoto, L., Olano, J.M. 2009. Sex-specific, age-dependent sensitivity of tree-ring growth to climate in the dioecious tree *Juniperus thurifera*. *New Phytologist* 182, 687-697.

von Rudloff, E. 1967. Chemosystematic Studies in the Genus *Picea* (Pinaceae): I. Introduction. *Canadian Journal of Botany* 45, 891-901.

von Rudloff, E. 1973. Geographical Variation in the Terpene Composition of the Leaf Oil of Douglas Fir. *Pure and Applied Chemistry* 34, 401-410.

von Rudloff, E. 1975. Volatile leaf oil analysis in chemosystematic studies of North American conifers. *Biochemical Systematics and Ecology* 2, 131-167.

Ruprecht, H., Dhar, A., Aigner, B., Oitzinger, G., Klumpp, R., Vacik, H., 2009. Structural diversity of English yew (*Taxus baccata* L.) populations. *European Journal of Forest Research* 129, 189-198.

Sahni, B. 1920. On certain archaic features in the seed of *Taxus baccata*, with remarks on the antiquity of the Taxineae. *Annals of Botany* 34, 117-133.

Singh, V.P. 2006. Gymnosperm (naked seeds plant). Structure and development. Sarup and Sons, New Delhi.

Salisbury, E.J. 1928. On the causes and ecological significance of stomatal frequency, with special reference to the woodland flora. *Philosophical Transactions of the Royal Society London* B216, 1-65.

Sakai, A.K., Weller, S.G. 1999. Gender and sexual dimorphism in flowering plants: A review of terminology, biogeographic patterns, ecological correlates, and phylogenetic approaches. In *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants*. Eds. M.A. Geber, T.E. Dawson and L.F. Delph. Springer-Verlag, Berlin, pp 1-31.

Sarić, M. R. 1989. Lekovite biljke Srbije. Srpska akademija nauka i umetnosti, Posebna izdanja, Odeljenje prirodno-matematičkih nauka, Beograd.

Sarić, M. 1997. Vegetacija Srbije II Šumske zajednice 1, Srpska Akademija nauka i umetnosti, Beograd.

Sawyer, N.W., Anderson, G.J. 1998. Reproductive biology of the carrion-flower, *Smilax herbacea* (Smilacaceae). *Rhodora* 100, 1-24.

Saxe, H. 1991. Photosynthesis and stomatal responses to polluted air and the use of physiological and biochemical responses for early detection and diagnostic tools. *Advances in Botanical Research* 18, 2-129.

Schirone, B., Ferreira, R. C., Vessella, F., Schirone, A., Piredda, R., Simeone, M. C. 2010. *Taxus baccata* in the Azores: a relict form at risk of imminent extinction. *Biodiversity & Conservation* 19, 1547-1565.

Schoettle, A.W., Rochelle, S.G. 2000. Morphological variation of *Pinus flexilis* (Pinaceae), a bird-dispersed pine, across a range of elevations. *American Journal of Botany* 87, 1797-1806.

Schwartz, M.W., Brigham, C., Hoeksema, J.D., Lyons, K.G., Mills, M.H., van Mantgem, P.J. 2000. Linking biodiversity to ecosystem function: implications for conservation ecology. *Oecologia*, 122, 297-305.

Sessa, E.B., Givnish, T.J. 2014. Leaf form and photosynthetic physiology of *Dryopteris* species distributed along light gradients in eastern North America. *Functional Ecology* 28, 108-123.

Slavkovska, V., Jancic, R., Bojovic, S., Milosavljevic, S., Djokovic, D. 2001. Variability of essential oils of *Satureja montana* L. and *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff. from the central part of the Balkan peninsula. *Phytochemistry* 57, 71-76.

Spjut, R.W. 2000. <http://www.worldbotanical.com/Nomenclature.htm#nomenclature>

Spjut, R.W. 2007a. Taxonomy and Nomenclature of *Taxus* (Taxaceae). *Journal of the Botanical Research Institute of Texas* 1, 203-289.

Spjut, R.W. 2007b. A phylogeographical analysis of *Taxus* (Taxaceae) based on leaf anatomical characters. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas* 1, 291-332.

Sprugel, D.G., Brooks, J.R., Hinckley, T.M. 1996. Effects of light on shoot geometry and needle morphology in *Abies amabilis*. *Tree Physiology* 16, 91-98.

Stachowicz, J.J., Whitlatch, R.B., Osman, R.W. 1999. Species diversity and invasion resistance in a marine ecosystem. *Science* 286, 1577-1579.

Stahl-Biskup, E., Sáez F. 2002. Thyme. The Genus *Thymus*. Taylor & Francis, London.

Stefanović, M., Mitrović, S., Obratov-Petković, D., Vidaković, V., Popović, Z., Matić, R., Bojović, S. 2013. Repräsentativnost uzorka pri oceni varijabilnosti sadržaja terpena kod munike. *Glasnik Šumarskog fakulteta* 107, 193-204.

Stefanovic, S., Jager, M., Deutsch, J., Broutin, J., Masselot, M. 1998. Phylogenetic relationships of conifers inferred from partial 28S rRNA gene sequences. *American Journal of Botany* 85, 688-697.

Stevanović, V., Vasić, V. 1995. Biodiverzitet Jugoslavije sa pregledom vrsta od međunarodnog značaja. Biološki fakultet i Ecolibri, Beograd.

Štešević, D., Ristić, M., Nikolić, V., Nedović, M., Caković, D., Šatović, Z. 2014. Chemotype diversity of indigenous dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.) populations in Montenegro. *Chemistry & Biodiversity* 11, 101-114.

Stewart, W.N. 1983. Paleobotany and the evolution of plants. Cambridge University Press.

Stojanović, Lj., Jovanović, B. 1989. Ceno-ekološke i prirodne karakteristike sastojina bukve sa tisom na području Malinika u severoistočnoj Srbiji. *Šumarstvo* 2, 3-18.

Strobel, G.A., Hess, W.M., Ford, E. 1996. A scanning electron microscopy study of *Taxus* leaves as related to taxonomy. *Scanning Microscopy* 10, 1111-1126.

Strobel, G.A., Stierle, A., Hess, W.M. 1993. Taxol formation in yew – *Taxus*. *Plant Science* 92, 1-12.

Svenning, J., Magård, E., 1999. Population ecology and conservation status of the last natural population of English yew *Taxus baccata* in Denmark. *Biological Conservation* 88, 173-182.

Šarac, Z., Bojović, S., Nikolić, B., Tešević, V., Dević, I., Marin, P.D. 2013. Chemotaxonomic significance of the terpene composition in natural populations of *Pinus nigra* J.F. Arnold from Serbia. *Chemistry & Biodiversity* 10, 1507-1520.

Šarac, Z. 2014. Utvrđivanje varijabilnosti i diferencijacije prirodnih populacija *Pinus nigra* Arnold u Srbiji korišćenjem fitohemijskih i molekularnih markera. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Theis, N., Lerdau, M. 2002. The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. *Intrnational Journal of Plant Sciences* 164, S93-S102.

Thomas, P.A., Polwart, A., 2003. *Taxus baccata* L. *Journal of Ecology* 91, 489-524.

Thoss, V., O'Reilly-Wapstra, J., Iason, G.R. 2007. Assessment and implications of intraspecific and phenological variability in monoterpenes of Scots pine (*Pinus sylvestris*) foliage. *Journal of Chemical Ecology* 33, 477-91.

Tittensor, R.M. 1980. Ecological history of yew *Taxus baccata* L. insouthern England. *Biological Conservation* 17, 243-265.

Toivonen, J.M., Horna, V., Kessler, M., Ruokolainen, K., Hertel, D. 2014. Interspecific variation in functional traits in relation to species climatic niche optima in Andean *Polylepis* (Rosaceae) tree species: Evidence for climatic adaptations. *Functional Plant Biology* 41, 301-312.

Tucker, G.F., Emmingham, W.H. 1977. Morphological changes in the leaves of residual western hemlock after clear and shelterwood cutting. *Forest Science* 22, 195-203.

Vacik, H., Oitzinger, G., Georg, F. 2001. Evaluation of situ conservation strategies for English yew (*Taxus baccata* L.) in Bad Bleiberg by the use of population viability risk management (PVRM). *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 120, 390-405.

Vamosi, J.C., Vamosi, S.M. 2005. Present day risk of extinction may exacerbate the lower species richness of dioecious clades. *Diversity and Distributions* 11, 25-32.

Van der Heijden, M.G., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., Sanders, I.R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396, 69-72.

Vaxevanidou, Z., González-Martínez S.G., Climent, J., Gil, L. 2006. Tree populations bordering on extinction: a case study in the endemic Canary Island pine. *Biological Conservation* 129, 451-460.

Venditti, A., Serrilli, A.M., Vittori, S., Papa, F., Maggi, F., Di Cecco, M., Ciaschetti, G., Bruno, M., Rosselli, S., Bianco, A. 2013. Secondary metabolites from *Pinus mugo* Turra subsp. *mugo* growing in the Majella National Park (Central Apennines, Italy). *Chemistry & Biodiversity* 10, 2091-2100.

Vessella, F., Simeone, M. C., Fernandes, F. M., Schirone, A., Gomes, M. P., Schirone, B. 2013. Morphological and molecular data from Madeira support the persistence of an ancient lineage of *Taxus baccata* L. in Macaronesia and call for immediate conservation actions. *Caryologia* 66, 162-177.

Vessella, F., Salis, A., Scirè, M., Piovesan, G., Schirone, B. 2015. Natural regeneration and gender-specific spatial pattern of *Taxus baccata* in an old-growth population in Foresta Umbra (Italy). *Dendrobiology* 73, 75-90.

Vilotić, D., Stavretović, N., Stanić, M. 2011. Posebni primerci drvenastih vrsta Nacionalnog parka Tara. Zavod za zaštitu prirode Srbije, Beograd.

Wang, R., Yu, G., He, N., Wang, Q., Xia, F., Zhao, N., Xu, Z., Ge, J. 2014. Elevation-Related Variation in Leaf Stomatal Traits as a Function of Plant Functional Type: Evidence from Changbai Mountain, China. *PLoS One* 9, e115395.

Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., McPhail, A.T. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of American Chemical Society* 93, 83-90.

Ward, J., Dawson, T., Ehleringer, J. 2002. Responses of *Acer negundo* genders to interannual differences in water availability determined from carbon isotope ratios of tree ring cellulose. *Tree Physiology* 22, 339-346.

Wassner, D.F., Ravetta, D. A. 2005. Temperature effects on leaf properties, resin content, and composition in *Grindelia chiloensis* (Asteraceae). *Industrial Crops and Products* 21, 155-163.

Witherup, K.M., Look, S.A., Stasko, M.W., Ghiorzi, T.J., Muschik, G.M., Cragg, G.M. 1990. *Taxus* spp. Needles contain amounts of taxol comparable to the bark of *Taxus brevifolia*: Analysis and isolation. *Journal of Natural Products* 53, 1249-1255.

Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28, 114-138.

Wyka, T., Robakowski, P., Zytowski, R. 2008. Leaf age as a factor in anatomical and physiological acclimative responses of *Taxus baccata* L. needles to contrasting irradiance environments. *Photosynthesis Research* 95, 87-99.

Xu, X., Yang, F., Xiao, X; Zhang, S., Korpelainen, H., Li, C. 2008. Sex-specific responses of *Populus cathayana* to drought and elevated temperatures. *Plant, Cell and Environment* 31, 850-860.

Yang, S.-J., Sun, M., Zhang, Y.-J., Cochard, H., Cao, K.-F. 2014. Strong leaf morphological, anatomical, and physiological responses of a subtropical woody bamboo (*Sinarundinaria nitida*) to contrasting light environments. *Plant Ecology* 215, 97-109.

Yatagai, M., Sato, T. 1986. Terpenes of leaf oils from Conifers. *Biochemical Systematics and Ecology* 14, 469-478.

Zarek, M. 2007. Variability of morphological features of needles, shoots and seeds of *Taxus baccata* L. in nature reservations of Southern Poland. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 10.

Zavala, J.A., Ravetta, D.A. 2002. The effect of solar UV-B radiation on terpenes and biomass production in *Grindelia chiloensis* (Asteraceae), a woody perennial of Patagonia, Argentina. *Plant Ecology* 161, 185-191.

Zavarin, E. 1968. Chemotaxonomy of the genus *Abies*-II. Within tree variation of the terpenes in cortical oleoresin. *Phytochemistry* 7, 99-107.

Zhang, S.B., Zhou, Z.K., Hu, H., Xu, K., Yan, N., Li, S.Y. 2005. Photosynthetic performances of *Quercus pannosa* vary with altitude in the Hengduan Mountains, southwest China. *Forest Ecology and Management* 212, 291-301.

Zhang, S.B., Guan, Z.J., Sun, M., Zhang, J.J., Cao, K.F., Hu, H. 2012. Evolutionary association of stomatal traits with leaf vein density in *Paphiopedilum*, Orchidaceae. *Plos One* 7, e40080.

Zunzunegui, M., Diaz Barradas M.C., Clavijo A., Cansino L.A., Lhout F.A., Novo F.G. 2006. Ecophysiology, growth timing and reproductive effort of three sexual forms of *Corema album* (Empetraceae). *Plant Ecology* 183, 35-46.

Zwenger, S., Basu, Ch. 2008. Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 3, 01-07.

BIOGRAFIJA AUTORA

Milena Stefanović rođena je 08.08.1983. godine u Beogradu. Treću beogradsku gimnaziju (prirodno-matematički smer) završila je sa odličnim uspehom. Diplomirala je na Šumarskom fakultetu, Odseku za pejzažnu arhitekturu i hortikulturu Univerziteta u Beogradu sa prosečnom ocenom 8.81 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Doktorske studije na Šumarskom fakultetu upisala je 2009/2010. školske godine. Položila je sve planom i programom predviđene ispite sa prosečnom ocenom 10.

Od 01.01.2011. godine je angažovana na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu u realizaciji naučno-istraživačkog projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom „Procena ekofiziološkog i genetičkog diverziteta biljaka u šumskim ekosistemima“ (ev. br. 173011, rukovodilac projekta dr Srđan Bojović). Odlukom Naučnog veća Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, br. 01-1573 od 12.09.2013. godine, izabrana je u zvanje istraživač saradnik.

Do sada je kao autor i koautor objavila 4 naučna rada u međunarodnim časopisima, 1 rad u vodećem naučnom časopisu nacionalnog značaja i 2 saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova.

Publikacije:

Matić, R., Stamenković, S., Popović, Z., **Stefanović, M.**, Vidaković, V., Smiljanić, M., Bojović, S. 2015. Tree responses, tolerance and acclimation to stress: Does current research depend on the cultivation status of studied species? *Scientometrics*: u štampi (DOI 10.1007/s11192-015-1726-z).

Bojović, S., Jurc, M., Ristić, M., Popović, Z., Matić, R., Vidaković, V., **Stefanović, M.**, Jurc, D. 2015. Essential Oil Variability in Natural Populations of *Pinus mugo* Turra from the Julian Alps. *Chemistry&Biodiversity*: u štampi.

Bojović, S., Matić, R., Popović, Z., Smiljanić, M., **Stefanović, M.**, Vidaković, V. 2014. An overview of forestry journals in the period 2006–2010 as basis for ascertaining research trends. *Scientometrics* 98: 1331-1346.

Stefanović, M., Mitrović, S., Obratov-Petković, D., Vidaković, V., Popović, Z., Matić, R., Bojović, S. 2013. Representativnost uzorka pri oceni varijabilnosti sadržaja terpena kod munike. *Glasnik Šumarskog fakulteta* 107: 193-204.

Popović, Z., **Stefanović, M.**, Smiljanić, M., Matić, R., Kostić, M., Vidaković, V., Bojović, S. 2012. Sex expression in Serbian dendroflora – a case study of *Fraxinus ornus* var. *angustifolia*. *Archives of Biological Sciences* 64: 107-111.

Stefanović, M., Smiljanić, M., Cindrić, M., Matić, R., Popović, Z., Bojović, S. 2011. Tree sex expression. 19th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, 13-15 June 2011, Banja Vrujci-Serbia, Abstract 118.

Stefanović, M., Obratov-Petković, D., Bojović, S. 2010. Analysis of scientific information: studies of sycamore maple. First Serbian Forestry Congress – Future with Forests, 11-13 November 2010, Belgrade-Serbia, Abstract 153.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана : Милена А. Стефановић

број уписа: 17/2009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

„Варијабилност терпенског састава и морфолошких карактеристика четина
Taxus baccata L. у Србији“

- 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, 23. 9. 2015.

М. Стефановић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Милена А. Стефановић

Број уписа: 17/2009

Студијски програм: Пејзажна архитектура и хортикултура

Наслов рада: „Варијабилност терпенског састава и морфолошких карактеристика четина *Taxus baccata* L. у Србији“

Ментор: др Срђан Бојовић

Потписана: Милена А. Стефановић

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, 23.9.2015.

М. Стефановић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Варијабилност терпенског састава и морфолошких карактеристика четина *Taxus baccata* L. у Србији“

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

Потпис докторанда

У Београду, 23. 9. 2015.

М. Стефановић